



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

**FORMULACIÓN DE
NANOPARTÍCULAS BIOCOMPATIBLES
Y MULTIFUNCIONALES CONTRA EL
CÁNCER**

Tesis doctoral
Programa de Doctorado de Farmacia
Doctorado Internacional

Gracia García García
Granada, marzo de 2021

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Gracia García García
ISBN: 978-84-1306-920-3
URI: <http://hdl.handle.net/10481/69408>

Resumen

El cáncer es una enfermedad heterogénea y dinámica que requiere una Medicina personalizada. La Nanotecnología pretende dar respuesta a esta necesidad, mediante el desarrollo de sistemas de liberación controlada de agentes terapéuticos para mejorar la eficacia y seguridad de los tratamientos quimioterápicos, así como el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos y de diagnóstico avanzado. Los últimos esfuerzos científicos aspiran al desarrollo de plataformas nanotecnológicas multifuncionales, para mejorar el pronóstico del cáncer, siendo los óxidos de hierro uno de los nanomateriales más prometedores para tal fin.

La Tesis Doctoral tiene como objetivo principal el diseño de un nanosistema biocompatible para el tratamiento combinado de tumores mediante quimioterapia e hipertermia magnética y con capacidad de diagnóstico por resonancia magnética de imagen.

Con este fin se ha diseñado una metodología reproducible de obtención de nanopartículas de magnetita embebidas en una matriz de poli(ϵ -caprolactona) y posteriormente funcionalizadas con quitosano. Este nanocompuesto se ha sometido a una extensa caracterización para verificar su tamaño, estructura, composición química, carga eléctrica y termodinámica superficial, estabilidad coloidal y capacidad magnética. La biocompatibilidad de las nanopartículas se ha investigado mediante ensayos celulares de proliferación y morfología, mientras que su idoneidad para la vía de administración parenteral se ha verificado mediante ensayos de hemocompatibilidad. La capacidad de los nanocompuestos como sistema de transporte controlado de gemcitabina se ha analizado mediante exhaustivos ensayos *in vitro* de carga y liberación de fármaco, y de citotoxicidad inducida en células tumorales. La aplicabilidad de los nanocompuestos en hipertermia magnética antitumoral ha sido evaluada mediante la utilización de campos electromagnéticos en cultivos de líneas celulares de cáncer. Se ha estudiado también la relajatividad de las nanopartículas para validar su uso como agente de contraste en resonancia magnética de imagen. Aprovechando su capacidad como agente de contraste T_2 , se han realizado estudios de biodistribución.

A la vista de los resultados obtenidos, puede concluirse que las nanopartículas [(magnetita/poli(ϵ -caprolactona)]/quitosano constituyen una herramienta biocompatible multifuncional (quimioterapia + hipertermia + agente de contraste en resonancia magnética de imagen) con posibilidades prometedoras para la teranosis frente al cáncer.

Palabras clave: cáncer, nanopartículas, magnetita, poli(ϵ -caprolactona), gemcitabina, quimioterapia, sistema de liberación controlada, hipertermia, resonancia magnética de imagen

Abstract

Cancer is a heterogenous and dynamic disease that requires a more personalized medicine. Nanotechnology goals is to give an answer to this necessity by means of the engineering of controlled drug delivery systems to enhance both efficacy and safety chemotherapy profile but also to develop novel therapeutic approaches and advanced diagnostic tools. Current research efforts aim to design multifunctional platforms for an improved cancer prognosis. In that sense, iron oxides are one of the most promising nanomaterials.

The PhD thesis main purpose is to design a biocompatible nanosystem for combined antitumoral treatment based on chemotherapy and magnetic hyperthermia and diagnosis capability via magnetic resonance imaging.

With that aim, a reproducible obtaining methodology has been developed for magnetic nanoparticles inclusion into a poly(ϵ -caprolactone) matrix which was then functionalized using chitosan. Resultant nanocomposites have been submitted to an extensively characterization for size, structure, chemical composition, electrical charge and thermodynamic surface, colloidal stability and magnetic capability. Nanoplatfrom biocompatibility has been researched using proliferation and morphologic cellular assays whereas parenteral administration has been validated through an haemocompatibility evaluation. Control gemcitabine delivery nanocomposites potential has been investigated by exhaustive *in vitro* tests of drug payload and release in addition to the induced cytotoxicity in tumour cells. Antitumoural magnetic hyperthermia nanosystems possibilities have been explored by applying electromagnetic fields to tumoral cell lines cultures. Magnetic relaxitivity was also studied for nanoparticle validation as a contrast agent in magnetic resonance imaging. Taking into account nanoparticle capacity as a T_2 contrast agent, biodistribution experiments have been realized.

In view of the results obtained, it can be concluded that magnetite/poly(ϵ -caprolactone)]/chitosan nanoparticles constitute a biocompatible multifunctional tool (chemotherapy + hyperthermia + contrast agent for magnetic resonance imaging) with promising possibilities for the theragnosis against cancer.

Key words: cancer, nanoparticles, magnetite, poly(ϵ -caprolactone), gemcitabine, chemotherapy, controlled drug delivery system, hyperthermia, imaging magnetic resonance

Índice

Capítulo 1. Antecedentes, objetivos y plan del trabajo de investigación	1
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 <i>Cáncer</i>	<i>2</i>
1.1.2 <i>Nanotecnología.....</i>	<i>3</i>
1.1.3 <i>Diseño avanzado de nanopartículas.....</i>	<i>6</i>
1.2 Objetivos	12
1.3 Plan del trabajo de investigación.....	15
Capítulo 2. Formulación, funcionalización y caracterización	18
2.1 Introducción	19
2.1.1 <i>Magnetita.....</i>	<i>19</i>
2.1.2 <i>Poli(ϵ-caprolactona)</i>	<i>22</i>
2.1.3 <i>Quitosano</i>	<i>24</i>
2.2 Metodología y resultados.....	26
2.2.1 <i>Formulación y funcionalización</i>	<i>26</i>
2.2.1.1 <i>Núcleos de magnetita.....</i>	<i>26</i>
2.2.1.2 <i>Nanopartículas de poli(ϵ-caprolactona) y nanoplataformas de magnetita recubiertas con poli(ϵ-caprolactona.....</i>	<i>27</i>
2.2.1.3 <i>Nanopartículas de poli(ϵ-caprolactona) y nanoplataformas de magnetita recubiertas con poli(ϵ-caprolactona y funcionalizadas con quitosano</i>	<i>28</i>
2.2.2 <i>Caracterización.....</i>	<i>29</i>
2.2.2.1 <i>Tamaño hidrodinámico</i>	<i>29</i>
2.2.2.2 <i>Potencial zeta</i>	<i>30</i>
2.2.2.3 <i>Optimización y eficacia de la formulación.....</i>	<i>33</i>
2.2.2.4 <i>Efecto del pH y de la fuerza iónica en el valor del potencial zeta</i>	<i>35</i>

2.2.2.5 Estabilidad coloidal.....	39
2.2.2.6 Microscopía electrónica.....	41
2.2.2.7 Termodinámica superficial.....	47
2.2.2.8 Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier.....	51
2.2.2.9 Difracción de rayos X	55
2.2.3 Propiedades magnéticas.....	59
2.2.3.1 Ciclo de histéresis y evaluación in vitro microscópica y macroscópica	59

Capítulo 3. Nanotoxicidad 63

3.1 Introducción 64

3.1.1 Toxicidad de Nanomateriales.....	64
3.1.1.1 Toxicidad molecular	64
3.1.1.2 Toxicidad celular.....	65
3.1.1.3 Toxicidad tisular e inmunogenicidad.....	66
3.1.1.4 Evaluación de nanotoxicidad	66
3.1.2 Toxicidad de nanopartículas de óxido de hierro	67
3.1.3 Toxicidad de nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) y quitosano.....	71

3.2 Metodología y resultados..... 71

3.2.1 Ensayo de proliferación celular.....	71
3.2.2 Evaluación de hemocompatibilidad.....	75
3.2.2.1 Hemólisis	75
3.2.2.2 Activación de plaquetas.....	75
3.2.2.3 Activación del sistema complemento	76
3.2.2.4 Tiempo de recalcificación plasmáticas	76
3.2.3 Estudio de viabilidad y proliferación celular.....	79

Capítulo 4. Hipertermia magnética antitumoral 86

4.1 Introducción 87

4.1.1 Principios físicos de la hipertermia magnética.....	87
4.1.2 Características de un sistema de hipertermia magnética.....	90
4.1.2.1 Equipo de hipertermia magnética.....	90
4.1.2.2 Medio de dispersión	91

4.1.2.3 Características de las nanopartículas magnéticas.....	92
4.1.3 Eficacia de la hipertermia magnética antitumoral.....	96
4.1.4 Hipertermia magnética antitumoral como tratamiento coadyuvante	98
4.2 Metodología y resultados.....	100
4.2.1 Eficiencia de la hipertermia.....	100
4.2.2 Evaluación de la citotoxicidad de hipertermia magnética antitumoral in vitro.....	105

Capítulo 5. Capacidad de vehiculización de gemcitabina..... 108

5.1 Introducción	109
5.1.1 Gemcitabina.....	109
5.1.1.1 Introducción	109
5.1.1.2 Entrada en la célula.....	109
5.1.1.3 Formación de los metabolitos activos.....	110
5.1.1.4 Mecanismo de acción.....	110
5.1.1.5 Inactivación y eliminación.....	112
5.1.1.6 Tratamiento con gemcitabina.....	113
5.1.1.7 Nanopartículas de gemcitabina.....	115
5.2 Metodología y resultados.....	116
5.2.1 Análisis cuantitativo de clorhidrato de gemcitabina mediante espectrofotometría ultravioleta-visible	117
5.2.2 Validación del método espectrofotométrico para disoluciones aciduladas de clorhidrato de gemcitabina	118
5.2.3 Estudio de la incorporación de clorhidrato de gemcitabina en las nanopartículas de magnetita/poli(ϵ -caprolactona)	122
5.2.4 Estudio de la citotoxicidad in vitro de las nanopartículas de magnetita/poli(ϵ -caprolactona) cargadas con gemcitabina.....	126
5.2.5 Estudio de liberación in vitro de gemcitabina desde las nanopartículas de magnetita/poli(ϵ -caprolactona) y magnetita/poli(ϵ -caprolactona)/quitosano	126

Capítulo 6. Agentes de contraste en resonancia magnética de imagen. Ensayo de biodistribución .. 137

6.1 Introducción	138
6.1.1 Principios físicos de la resonancia magnética de imagen.....	139
6.1.2 Agentes de Contraste en Resonancia Magnética de Imagen	145
6.1.3 . Biodistribución de nanopartículas de óxido de hierro	152
6.2 Metodología y resultados.....	153
6.2.1 Relajatividad in vitro.....	153
6.2.2 Resonancia magnética de imagen in vivo	155
6.2.3 Histología ex vivo	162
6.2.3.1 Tinción de azul de prusia para la detección cualitativa de hierro	162
6.2.3.2 Tinción de Hematoxilina-Eosina	165
Capítulo 7. Conclusiones	168
Chapter 7. Conclusions	168
Capítulo 8. Bibliografía.....	178

Capítulo 1

**Antecedentes, objetivos y plan
del trabajo de investigación**

1.1 Antecedentes

1.1.1 Cáncer

El cáncer constituye actualmente una de las principales causas de muerte a nivel mundial y se espera que su incidencia siga siendo creciente en el futuro. Según Pilleron y cols., el número de pacientes diagnosticados con cáncer se verá triplicado en 2050 debido, en gran parte, al envejecimiento de la sociedad (1).

En España, el cáncer fue la segunda causa de muerte tras las enfermedades del sistema circulatorio en 2018 (2). Este panorama se ha visto claramente alterado con la pandemia por *COVID-19* que ha posicionado las enfermedades infecciosas a la cabeza del grupo de enfermedades que más contribuyen a la mortalidad de la población. El análisis estadístico publicado por el Instituto Nacional de Estadística de las defunciones en los cinco primeros meses de 2020 señala que la principal causa fueron las enfermedades del sistema circulatorio (23%), seguidas por las enfermedades infecciosas (20,9 %) y los tumores (20,4 %). A pesar de todo esto, se ha producido un aumento del 0.5 % de la mortalidad por tumores respecto al mismo periodo del año anterior (3).

El cáncer está constituido por un grupo de enfermedades caracterizadas por una proliferación celular descontrolada y la ausencia de muerte celular que, a excepción de los cánceres hematológicos, genera una masa celular anormal conocida como tumor. Da comienzo con la transformación de una célula no maligna a una célula maligna. Dicha transformación está formada por una serie de procesos que suceden a partir de la adquisición de alteraciones originadas principalmente por el daño o la mutación de proto-oncogenes que codifican proteínas y/o genes. Estas alteraciones conducen al aumento de la proliferación celular, evasión de la supresión del crecimiento, señales de muerte celular, inducción de angiogénesis, y, por último, la activación de mecanismos que conducen a la invasión tisular y metástasis. Sin embargo, no siempre se mantiene esta secuencia. El desarrollo y la progresión del cáncer no sigue un curso fijo siendo probablemente más acertado considerarlo como una desestabilización integrada de procesos celulares clave. Incluso después de haberse producido la transformación maligna mencionada, el cáncer se mantiene dinámico y continúa evolucionando debido a cambios genéticos, transcriptómicos, epigenéticos y/o fenotípicos. De esta forma, el cáncer se considera una enfermedad dinámica cuya evolución podría desembocar en

última instancia en un tumor heterogéneo desde el punto de vista molecular. Asimismo, la masa tumoral estaría compuesta por células cancerígenas con distintas características moleculares que supondrán una diferente sensibilidad a las terapias contra el cáncer (4-6).

La resección quirúrgica del tumor y la radioterapia son los tratamientos más efectivos cuando el cáncer se presenta de forma localizada, es decir, en fases tempranas de la enfermedad donde no tiene lugar la metástasis. Desafortunadamente, cuando el cáncer avanza y se inicia el proceso de metástasis, estos enfoques terapéuticos no presentan la suficiente eficacia para erradicarlo. Puesto que la metástasis conlleva la invasión de otros tejidos a través del sistema circulatorio y linfático, pasa a cobrar importancia el uso de agentes anticancerígenos con una extensa biodistribución. La quimioterapia, la terapia biológica e inmunoterapia constituyen entonces las herramientas para el tratamiento del cáncer debido a su alta capacidad de alcance a través del torrente circulatorio.

La quimioterapia es el grupo terapéutico de mayor variedad y más utilizado en el tratamiento del cáncer cuando se diagnostica en estados metastásicos. Los fármacos quimioterápicos son compuestos capaces de inhibir la rápida proliferación de las células cancerígenas. Sin embargo, a menudo carecen de la suficiente especificidad lo que provoca que también actúen frente a células no cancerígenas. En general, las células más afectadas son aquellas que presentan una rápida capacidad de división como las de los folículos pilosos, la médula ósea, y el tracto gastrointestinal conduciendo a efectos adversos que pueden llegar incluso a alcanzar efectos tóxicos impidiendo la continuación del tratamiento (7).

1.1.2 Nanotecnología

A pesar de los importantes progresos en el tratamiento quimioterápico del cáncer, como las terapias combinadas o el uso de agentes adyuvantes, los efectos adversos y la toxicidad han constituido una enorme limitación. Ante esto, surgen las terapias dirigidas, un modelo de terapia cuyo objetivo es bloquear de forma específica el crecimiento de las células cancerígenas tal y como proponía Paul Ehrlich con el uso de *magic bullets* (8). Las terapias dirigidas se clasifican como directas o indirectas en función del enfoque que presenten. Los anticuerpos monoclonales son, probablemente, los agentes de terapia dirigida directa que mayor crecimiento han presentado en las

últimas décadas (9). Por otro lado, el uso de sistemas de liberación controlada y, más concretamente, de nanotransportadores, están siendo ampliamente utilizados y desarrollados como terapias dirigidas indirectas (10,11).

Con el rápido avance de la Nanotecnología en Medicina, el uso de medicamentos basados en nanopartículas (NPs) ha incrementado significativamente durante las últimas décadas. En la tabla 1 se recogen los medicamentos basados en NPs aprobados para su uso clínico en Estados Unidos y Europa por la *Food and Drug Administration (FDA)* y la *European Medicines Agency (EMA)* para el tratamiento del cáncer. A pesar de que la mayoría de formulaciones nanotecnológicas están dirigidas al cáncer, cada vez existen más ejemplos del desarrollo de este tipo de formulaciones para otras indicaciones terapéuticas. Uno de los ejemplos más recientes lo constituye las dos vacunas actualmente aprobadas para la infección por *COVID-19* desarrolladas por las farmacéuticas Pfizer y Moderna. Estas vacunas están constituidas por ARN mensajero encapsulado en NPs de base lipídica (12,13).

Tabla 1. Formulaciones basadas en nanopartículas aprobadas en la clínica para el tratamiento del cáncer. Concretamente, se recoge los medicamentos aprobados por la *Food and Drug Administration (FDA)* y la *European Medicines Agency (EMA)*. El año de aprobación, agente terapéutico, tipo de nanopartícula y tipo de cáncer al que está dirigido son recogidos para cada medicamento (14,15).

Medicamento	Año de aprobación	Agente terapéutico	Tipo de nanopartícula	Tipo de cáncer
Caelyx/Doxil®	1995 (FDA)	Doxorrubicina	Liposomas pegilados	Mama, ovario, mieloma múltiple
DaunoXome®	1996 (FDA)	Daunorrubicina	Liposomas	Sarcoma de Kaposi
Myocet®	2000 (EMA)	Doxorrubicina	Liposomas	Metástasis de mama
Abraxane®	2005 (FDA)	Paclitaxel	Albúmina	Pulmón (células no pequeñas), páncreas y mama
Oncaspar®	2006 (FDA)	Conjugado covalente de L-asparaginasa	Conjugado protéico pegilado	Leucemia linfoblástica aguda
Mepact®	2009 (EMA)	Mifamurtida	Liposoma	Osteosarcoma
Sylatron®	2011 (FDA)	PEG-interferon α -2b	Conjugado protéico pegilado	Melanoma
Marqibo®	2012 (FDA)	Vincristina	Liposoma	Leucemia linfoblástica aguda
Nanotherm®	2013 (EMA)	Óxido de hierro	Nanopartícula metálica	Glioblastoma
Onyvide®	2015 (FDA)	Irinotecan	Liposoma	Páncreas
Vyxeos®	2017 (FDA)	Daunorrubicina y citarabina	Liposoma	Leucemia mieloide aguda
Hensify®	2019 (EMA)	Óxido de hafnio	Nanopartícula metálica	Sarcoma

Estas formulaciones nanotecnológicas están constituidas por partículas de tamaño nanométrico capaces de transportar agentes anticancerígenos. El objetivo principal es el transporte específico a la masa tumoral para que se dé la liberación en ella viéndose limitada la llegada a tejidos sanos. Esto conduciría a alcanzar una concentración eficaz del agente terapéutico en el tumor de forma conjunta a la considerable disminución de la concentración en los tejidos sanos en comparación con la administración del agente terapéutico libre aumentando, así, su perfil de seguridad. Estos nanotransportadores contribuyen también a la reducción de la degradación de los agentes terapéuticos, aumentando su tiempo de semivida plasmática ($t_{1/2}$). En general, contribuyen a la mejora de las características fisicoquímicas de los agentes terapéuticos con una clara repercusión positiva sobre su perfil farmacocinético (16).

1.1.3 Diseño avanzado de nanopartículas

El diseño de las NPs debe de ser cuidadosamente estudiado. La estructura y composición de las NPs presenta una enorme repercusión sobre su interacción en medios biológicos. El mayor entendimiento del microambiente tumoral ha permitido avanzar notablemente en el diseño de los nanosistemas.

Maeda H. fue uno de los primeros en señalar cómo las características fisiopatológicas únicas de la masa tumoral podrían ser de alto valor para el desarrollo de terapias dirigidas basadas en NPs. Concretamente, definió el efecto de permeabilidad y retención aumentada (*enhanced permeability and retention, EPR*). La alta tasa de crecimiento que se da en la masa tumoral aumenta la necesidad de nutrientes y oxígeno. Ante esto, las células cancerígenas liberan factores de crecimiento para la formación de nuevos vasos sanguíneos capaces de suplir dichas necesidades. Si bien en un estado fisiológico este proceso es conocido como angiogénesis, en los tumores malignos pasa a ser llamado como *neo-angiogénesis*. La diferencia existente entre ambos procesos se debe a la mayor rapidez y abundancia con la que transcurre el proceso en la masa tumoral con respecto a lo que tiene lugar en condiciones fisiológicas. Se ha visto como el rápido proceso de formación de una hipervascularización da como resultado una arquitectura vascular defectuosa, un drenaje linfático ineficiente, y una sobreproducción de una serie de mediadores de permeabilidad. El efecto *EPR* podría, por tanto, aumentar la llegada de nanotransportadores administrados por la vía

parenteral a la masa tumoral cuando su tamaño es lo suficientemente pequeño como para poder atravesar los poros existentes en la neo-vasculatura, pero no en la vasculatura normal. Además, el irregular drenaje linfático promovería la acumulación de los nanotransportadores en el microambiente tumoral (17,18). Se ha visto que el efecto *EPR* no siempre se desarrolla o, al menos, no con la misma intensidad. Esto parece deberse a la heterogeneidad del intra e intertumoral (4). A pesar de esto, el descubrimiento de este efecto ha supuesto un gran avance en el diseño de las NPs (16). La limitación de tamaño de las NPs impuesta por este fenómeno fisiopatológico ha resultado ser de alta importancia para otros aspectos que determinan el comportamiento de éstas en el organismo (10).

La rápida eliminación que sufrían los primeros nanosistemas desarrollados aunado a los avances en investigación acerca del papel del sistema fagocítico mononuclear (SFM) antes conocido como sistema reticuloendotelial, ha contribuido enormemente al diseño requerido de las NPs en la actualidad. El mecanismo por el cual los macrófagos son capaces de captar a las NPs viene determinado principalmente por el proceso de opsonización. Una vez que las NPs entran en contacto con fluidos biológicos, van a comenzar a interactuar con sus componentes. Como consecuencia, las NPs serán modificadas superficialmente mediante adsorción de diferentes proteínas plasmáticas. Este fenómeno se conoce como formación de la corona proteica u opsonización y se ha visto que es capaz de dar lugar a un cambio significativo de las propiedades fisicoquímicas incluyendo tamaño, carga superficial y estado de agregación y, consecuentemente, a la identificación por parte de los macrófagos, pero también por las células diana. Se ha observado como las características de la corona proteica van a depender de las características fisicoquímicas de las NPs pero también de otros factores ambientales (concentración de proteínas, temperatura, origen humano o murino, fuente -suero fetal, suero bovino o plasma bovino-, presencia de anticoagulante...) y fisiopatológicos (19,20). Con el objetivo de reducir esta adsorción proteica y, así, aumentar el $t_{1/2}$ de las NPs, surgen las estrategias de antiopsonización o *stealth* (21). Estas estrategias se basan en la modificación de las características superficiales de las NPs para retrasar el fenómeno de opsonización y, así, la captura por parte de los macrófagos que finalmente conlleva a la eliminación. Concretamente, la modificación superficial se lleva a cabo mediante el recubrimiento o funcionalización de las NPs con polímeros hidrófilos capaces de limitar el acercamiento de las proteínas plasmáticas mediante

impedimento estérico (fig. 1) (18). El polímero más ampliamente utilizado es el polietilenglicol (PEG) que da lugar a la estrategia *stealth* más extendida, la pegilación. El primer medicamento basado en NPs, el Doxil®, está formado por nanoliposomas cargados con doxorrubicina (tabla 1). La pegilación de estos nanotransportadores fue clave para mejorar significativamente el perfil farmacocinético de este medicamento (22).

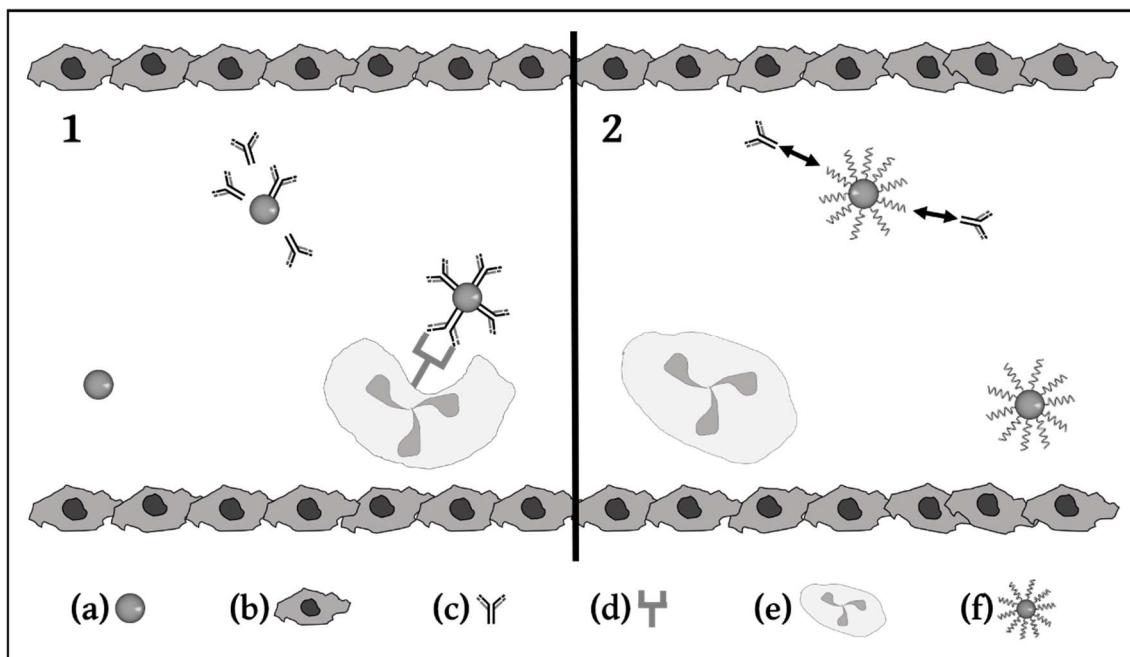


Fig. 1. Actuación del sistema fagocítico mononuclear sobre las nanopartículas. 1) Nanopartícula de estructura básica (a) con bajo tiempo de semivida plasmática (células de la vasculatura, b) debido a la rápida eliminación mediada por la actuación del sistema fagocítico mononuclear. Se produce la opsonización o unión superficial de opsoninas (c) seguida del reconocimiento de éstas a través de receptores específicos (d) por los macrófagos lo que supone la fagocitosis y eliminación plasmática. 2. Nanopartículas con un polímero hidrófilo unido a su superficie (f) capaz de crear un impedimento estérico que retrasa la opsonización y, de esta forma, el reconocimiento y la eliminación por parte de los macrófagos.

El efecto *EPR* y la pegilación se conocen de forma conjunta como estrategias de transporte pasivo o *passive targeting* (18). La experiencia de la aplicación de estas estrategias ha puesto de manifiesto ciertas limitaciones. En el caso del efecto *EPR* ya se ha mencionado como existen tumores con baja permeabilidad vascular. Por otro lado, en el caso de las NPs pegiladas, se ha visto como una administración repetitiva de éstas podría dar lugar al fenómeno de aclaramiento plasmático acelerado. Dicho fenómeno está caracterizado por la pérdida de capacidad antiopsonización al inducir la producción de inmunoglobulinas M anti-PEG (23).

Para combatir las limitaciones de las estrategias de transporte pasivo y/o contribuir a la biodistribución deseada de las NPs, se han desarrollado las estrategias de transporte activo o *active targeting*. Estas estrategias conducen a una interacción altamente específica de la NP y el tejido diana. El uso de ligandos unidos a la superficie de las NPs para su interacción específica con determinados receptores sobreexpresados y/o exclusivos de las células diana constituye uno de los enfoques más investigados (fig. 2).

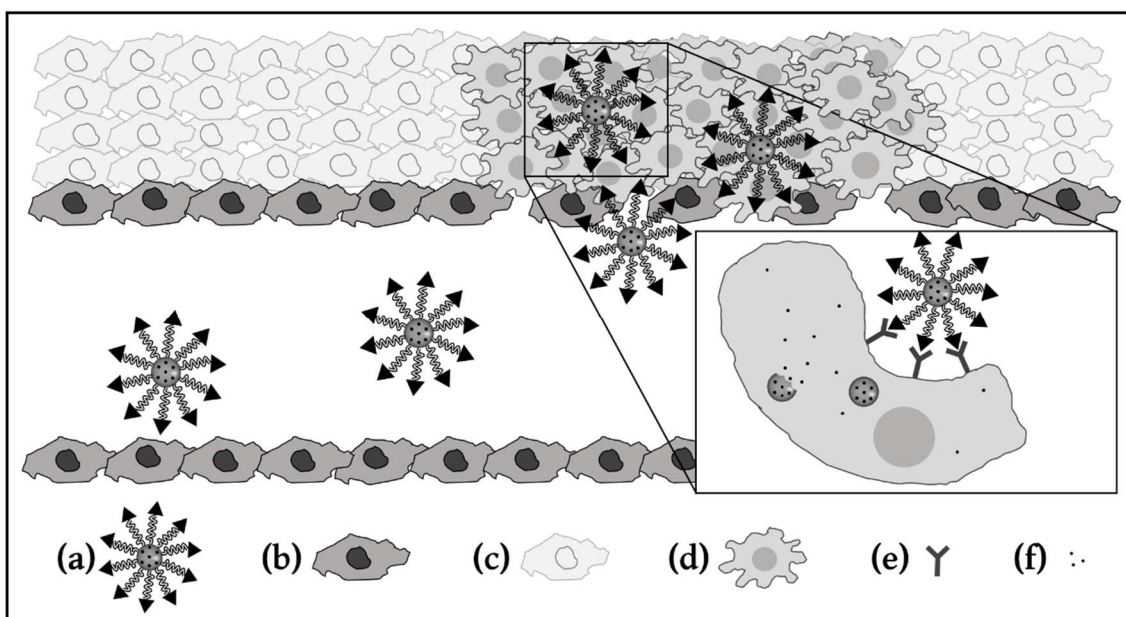


Fig. 2. Estrategias de transporte pasivo y activo. Nanopartículas diseñadas para el transporte específico de agentes terapéuticos (a) que una vez administradas por vía parenteral no pueden atravesar la pared vascular (células de la vasculatura, b) de los tejidos sanos (célula normal, c). Sin embargo, debido al efecto de permeabilidad y retención aumentadas que puede producirse en la masa de células tumorales (d) su extravasación a estos tejidos sí se ve favorecida. Una vez en la masa tumoral, las nanopartículas pueden interactuar con las células diana a través de sus receptores (e) si han sido funcionalizadas con los ligandos complementarios apropiados. Esto permitiría la internalización de la nanopartícula donde se desencadenaría la liberación del fármaco (f).

La Nanotoxicidad o estudio de la toxicidad inducida por los sistemas nanoparticulados contribuye enormemente al diseño de las NPs. Principalmente, se centra en los nanomateriales que pueden ser utilizados de forma segura. Existen numerosos nanomateriales de naturaleza orgánica (lípidos y polímeros) e inorgánica (sílice y metales)(24,25). Generalmente, las NPs constituidas por nanomateriales de naturaleza orgánica son las que presentan un perfil más biocompatible (26). El uso de NPs de naturaleza inorgánica requiere de un diseño específico para adecuar las características

fisicoquímicas que presentan. Numerosas estrategias están siendo desarrolladas para conseguir nanomateriales inorgánicos seguros. Una de las estrategias más extendidas es el uso de recubrimientos orgánicos desarrollándose así NPs híbridas de tipo *core-shell* (27).

Avances en el desarrollo de nuevos nanomateriales de aplicación en el transporte de fármacos está conduciendo al diseño de NPs capaces de liberar el agente terapéutico de forma controlada desde el punto de vista espacial y temporal. La implementación de estos nanosistemas requiere del uso de materiales biocompatibles que sean susceptibles a un estímulo específico. Dichos estímulos supondrían un cambio en su estructura que conducirían finalmente a la acumulación de las NPs en el tejido diana y/o a la liberación específica del agente terapéutico transportado (28). Para tal fin, se han seleccionado determinadas características de la región diana como podría ser la presencia y/o sobreexpresión de un determinado enzima. Uno de los estímulos más estudiados en los tumores es el pH. El microambiente tumoral presenta una alta tasa metabólica que resulta en una incrementada producción de protones. Debido a la importancia del mantenimiento del pH para los procesos celulares esenciales, las células cancerígenas expulsan una gran cantidad de protones a la matriz extracelular. Es así como se produce un microambiente ácido en la matriz extracelular del tumor (29). De esta forma, el pH de la masa tumoral se encuentra en valores sustancialmente más ácidos que el de los tejidos sanos. Diferentes nanomateriales están siendo elaborados para ofrecer una liberación aumentada de agentes terapéuticos en ambientes de pH ácido de forma casi exclusiva en base a esta característica fisiopatológica de los tumores. Esta estrategia se denomina transporte activo mediado por pH.

Las NPs inorgánicas tienen, en general, características físicas exclusivas de los materiales que los componen en escala nanométrica (no observadas escalas de tamaño superiores). Esto le confiere la posibilidad de desarrollar estrategias para controlar su biodistribución o la de los agentes terapéuticos que vehiculizan basadas en la aplicación de estímulos externos (aumento de la temperatura, aplicación de campos magnéticos, de ondas de ultrasonidos, luz o pulsos eléctricos) (fig. 3).

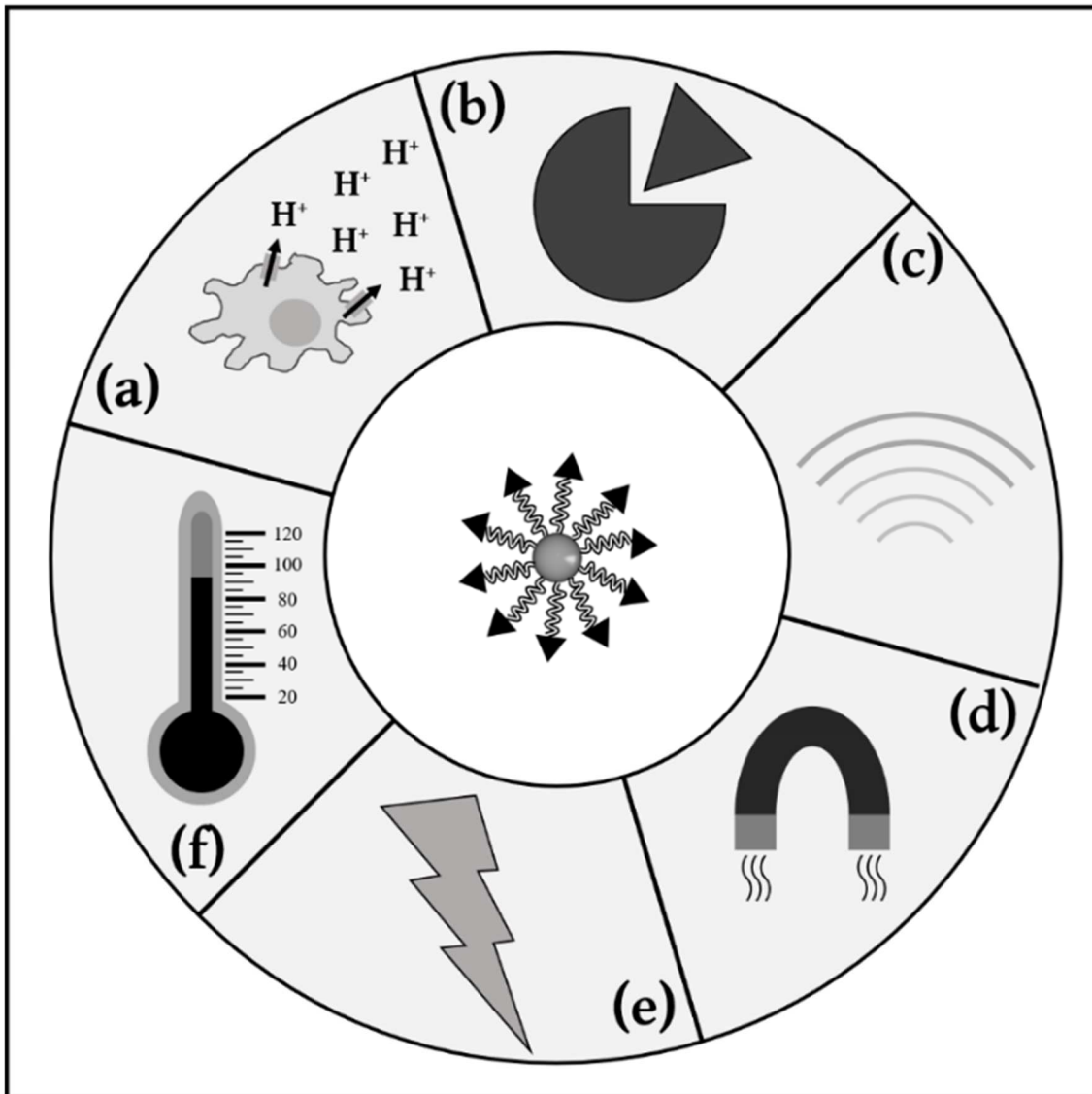


Fig. 3. Estímulos para desarrollar estrategias de transporte activo. Multitud de estímulos tanto internos como externos pueden ser utilizados para aumentar la llegada de los nanosistemas al órgano diana y/o desencadenar la liberación del agente terapéutico cargado como es la sensibilidad al pH (a), la presencia de determinadas enzimas (b), la aplicación de ultrasonidos (c), de un campo magnético (d), luz (e) o temperatura (f).

Las NPs inorgánicas presentan una gran variedad de posibilidades también en el desarrollo de nuevas terapias como la hipertermia o el diagnóstico de imagen pudiendo ser utilizadas para el desarrollo de NPs multifuncionales. La Nanotecnología está involucrada de esta forma en el desarrollo de una medicina más personalizada que permita adaptar el enfoque terapéutico a las características fisiopatológicas de cada paciente y monitorizar el avance de la enfermedad y la respuesta al tratamiento a tiempo real. Este enfoque es conocido como nanoteranosis y consiste en el desarrollo

de NPs multifuncionales para el tratamiento y el diagnóstico de la enfermedad (24,30,31).

1.2 Objetivos

La presente *Tesis Doctoral* titulada como *Formulación de Nanopartículas Biocompatibles y Multifuncionales contra el Cáncer* se engloba dentro de la línea de investigación *Tecnología del Medicamento* del grupo de investigación *Farmacología Práctica* (CTS-205, Junta de Andalucía). Las investigaciones realizadas han sido posibles gracias a los siguientes proyectos de investigación competitivos:

Nanoestructuras basadas en partículas no esféricas. Síntesis y aplicaciones en el diagnóstico y tratamiento del cáncer

Referencia: P12-FQM-694

Entidad financiadora: Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía.

Terapia combinada mediante el uso de nanocápsulas funcionalizadas para la eliminación selectiva de células madre tumorales de cáncer de colon

Referencia: PI19/01478

Entidad financiadora: Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)

Sensores magnéticos no esféricos con aplicaciones biomédicas

Referencia: A1-FQM-341-UGR18

Entidad financiadora: Programa Operativo FEDER, Junta de Andalucía

Además, se han establecido colaboraciones con los siguientes grupos de investigación para la consecución del trabajo de investigación:

Grupo de investigación Física Aplicada y Sistemas Coloidales dirigido por el Dr. Fernando González Caballero de la Universidad de Granada

Centro de Investigación Nanopharm dirigido por el Dr. Jag Shur asociado a la Universidad de Bath (Reino Unido)

Laboratorio de Resonancia Magnética Biomédica dirigido por la Dr. María Luisa García Martín en el Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología BIONAND

Grupo de investigación Nuevas Tecnologías Aplicadas a la Investigación Biomédica dirigido por el Dr. José Carlos Prados Salazar de la Universidad de Granada

Su objetivo principal es el diseño de un nanosistema biocompatible para el tratamiento combinado de tumores mediante quimioterapia e hipertermia magnética con capacidad de diagnóstico de imagen como agente de contraste en resonancia magnética de imagen (RMI). Este objetivo principal queda dividido en los objetivos de los distintos capítulos que constituyen la memoria del trabajo de investigación:

1. Formulación, funcionalización y caracterización

Se realizará un estudio exhaustivo de las condiciones óptimas de formulación de NPs biodegradables constituidas por un núcleo magnético (magnetita, Fe_3O_4), un recubrimiento polimérico [poli(ϵ -caprolactona), PCL]. Las NPs resultantes así como las funcionalizadas con quitosano (CS) serán sometidas a una extensa caracterización para verificar su tamaño, composición, estructura química, estabilidad coloidal y capacidad magnética. Para tal fin, se utilizarán las técnicas de dispersión dinámica de luz (*dynamic light scattering*, DLS), electroforesis (potencial zeta, ζ), microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM), microscopía electrónica analítica (AEM) mediante espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDX), microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM), termodinámica superficial (modelo de van Oss), espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR), difracción de rayos X (XRD), ciclo de histéresis y una evaluación magnética *in vitro* microscópica y macroscópica. Las NPs de los materiales puros (Fe_3O_4 , PCL y CS), serán utilizados como control cuando sea preciso.

2. Nanotoxicidad

El carácter biocompatible de los nanocompuestos desarrollados será evaluado *in vitro* mediante el ensayo de viabilidad celular de bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) de líneas celulares normal y tumoral. Su idoneidad para ser administrado por la vía de administración parenteral se investigará *ex vivo* mediante el estudio de la hemocompatibilidad (hemólisis, activación de plaquetas, activación del sistema complemento y tiempo de recalcificación plasmática).

Los nanocompuestos finales de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ serán evaluados con mayor detalle mediante la investigación de la proliferación y morfología de una línea celular normal utilizando un análisis de imagen *high-content*.

3. Hipertermia magnética

El análisis de la capacidad de ejercer una terapia antitumoral de hipertermia será evaluado *in vitro* mediante la capacidad de alcanzar la temperatura de hipertermia al ser sometidos a un campo electromagnético. La aplicabilidad de los nanocompuestos en hipertermia magnética antitumoral se evaluará utilizando campos electromagnéticos en ensayos de viabilidad celular MTT usando líneas celulares tumorales de cáncer de colon y de mama.

4. Vehiculización de Gemcitabina

La capacidad de los nanocompuestos de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ para vehiculizar gemcitabina (GEM) será evaluada mediante el estudio de las condiciones de formulación además de la citotoxicidad inducida en comparación con el fármaco libre. Para tal fin, se estudiarán distintas metodologías para determinar con precisión la capacidad de carga de fármaco.

El perfil de liberación de GEM desde las nanoplataformas de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ en distintas condiciones de pH y temperatura permitirán evaluar la velocidad de liberación de GEM en condiciones fisiológicas, tumorales (pH ácido) y de hipertermia y, por tanto, la sensibilidad de los nanocompuestos ante estos estímulos.

5. Resonancia magnética de imagen y estudio de biodistribución

La capacidad de los nanocompuestos de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ de actuar como agente de contraste en RMI será investigada mediante el estudio de la relajatividad *in vitro* y el estudio de biodistribución mediante un ensayo de RMI *in vivo* y un análisis histológico *ex vivo*.

1.3 Plan del trabajo de investigación

El trabajo de investigación queda estructurado en múltiples etapas:

1.- Elección del método de obtención de las NPs poliméricas de PCL en función del tamaño hidrodinámico (R_H) y del rendimiento (R) resultante.

Caracterización electroforética de las propiedades eléctricas superficiales de las NPs seleccionadas. La metodología seleccionada será la que genere partículas con las características deseadas para su inclusión en la estructura del nanosistema final.

Estos estudios se realizaron en el marco del Trabajo Fin de Grado (Grado de Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada).

2.- Optimización de la metodología de los nanocompuestos de Fe_3O_4 /PCL en función del R_H , la carga eléctrica superficial y el R.

Caracterización del tamaño, estructura, composición química, estabilidad coloidal, propiedades magnéticas y termodinámicas-

Estos estudios se realizaron mayoritariamente en el marco del Trabajo Fin de Máster (Máster de Investigación, Desarrollo, Control e Innovación de Medicamentos, Universidad de Granada) en colaboración con el grupo de investigación Física Aplicada y Sistemas Coloidales de la Universidad de Granada y la estancia en el centro de investigación Nanopharm Ltd. (Reino Unido).

3.- Funcionalización con CS de los nanocompuestos de Fe_3O_4 /PCL. Caracterización del tamaño, estructura, composición química, estabilidad coloidal y propiedades magnéticas.

4.- Evaluación del perfil biocompatible y hemocompatible de los nanocompuestos de Fe_3O_4 /PCL y de $(Fe_3O_4/PCL)/CS$.

Estos estudios se realizaron en colaboración con el grupo de investigación Nuevas Tecnologías Aplicadas a la Investigación Biomédica dirigido de la Universidad de Granada y con la Unidad de Nanoimagen del Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología BIONAND y el grupo de investigación Nuevas Tecnologías Aplicadas a la Investigación Biomédica dirigido por el Dr. José Carlos Prados Salazar de la Universidad de Granada.

5.- Evaluación de la capacidad de hipertermia de los nanocompuestos de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$.

6.- Estudio de la carga de fármaco de los nanocompuestos de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y de la citotoxicidad resultante.

Estos estudios se realizaron en colaboración con el grupo de investigación Nuevas Tecnologías Aplicadas a la Investigación Biomédica dirigido por el Dr. José Carlos Prados Salazar de la Universidad de Granada

7.- Determinación del perfil de liberación de fármaco de los nanocompuestos de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ simulando condiciones fisiológicas, tumorales y de hipertermia.

8.- Estudio de la capacidad de los nanocompuestos de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ como agentes de contraste en RMI. Ensayo de biodistribución de RMI *in vivo* y estudio histológico *ex vivo*. Estos estudios se realizaron en colaboración con el Laboratorio de Resonancia Magnética Biomédica del Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología BIONAND.

9.- Redacción de la memoria del trabajo de investigación.

Estas etapas han sido complementadas con una intensa búsqueda bibliográfica, divulgación científica y formación (Anexo I).

Capítulo 2

**Formulación, funcionalización y
caracterización**

2.1 Introducción

2.1.1 Magnetita

Las NPs son materiales nanométricos de carácter orgánico o inorgánico con características exclusivas si son comparados con los mismos materiales, pero a una escala superior de tamaño. Dentro de la multitud de tipos de NPs desarrolladas hasta la fecha, las NPs magnéticas constituyen uno de los grupos más prometedores debido a su aplicación en multitud de áreas siendo la RMI, los sistemas de liberación controlada de fármacos y la hipertermia antitumoral los de mayor interés.

Este grupo de NPs incluye metales puros como el cobalto, el hierro o el níquel, óxidos metálicos como los óxidos de hierro y aleaciones como las ferritas. Los óxidos de hierro son ampliamente utilizados debido a que presentan bajo coste y juegan un importante papel en numerosos procesos biológicos y geológicos. Los tres óxidos de hierro más comunes en la naturaleza son la Fe_3O_4 , maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) y hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). De forma adicional, otros motivos por los que su uso es el más frecuente es su perfil biocompatible, su comportamiento superparamagnético y su estabilidad química a temperatura ambiente (32,33). La Fe_3O_4 se caracteriza por presentar una estructura cristalina de tipo espinela inversa con iones de oxígeno que forma una red cúbica compacta e iones de hierro ubicados en los intersticios. Su magnetización radica en el acoplamiento antiferromagnético entre los iones Fe^{3+} en intersticios octaédricos y tetraédricos, dejando los momentos magnéticos de los iones Fe^{2+} que se encuentran en posiciones octaédricas como responsables de la magnetización de la celda unitaria (fig. 4) (34).

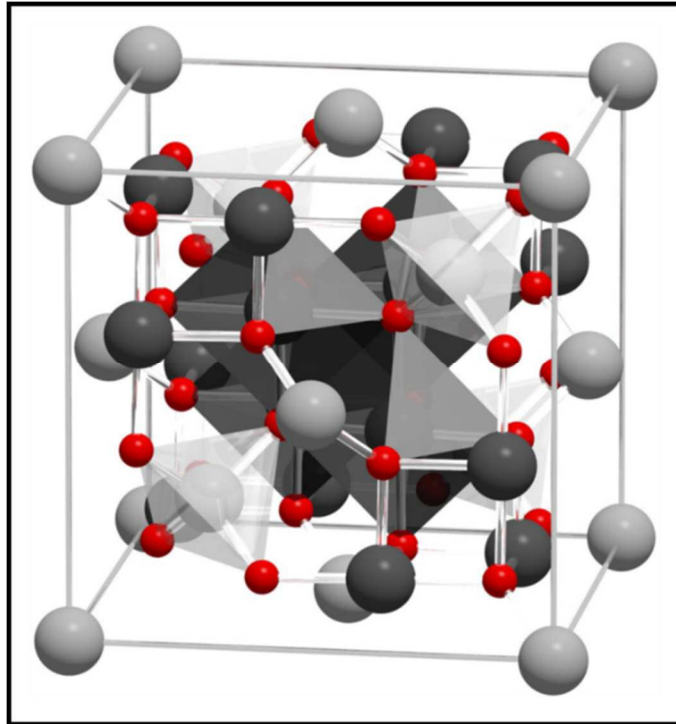


Fig. 4. Estructura de Fe₃O₄. Los átomos de oxígeno (O₂, rojo) forman una celda unitaria cúbica centrada en las caras y los iones de hierro están alojados en los espacios intersticiales. Las posiciones octaédricas están ocupadas por los iones de hierro Fe³⁺ (gris oscuro) y Fe²⁺ (gris claro) por igual mientras que las posiciones tetraédricas están ocupadas únicamente por los iones de hierro Fe²⁺ (gris claro). Reproducido de Moreno R. y cols., 2020. <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Las propiedades magnéticas de las partículas de Fe₃O₄ se definen por su inducción magnética (B) y su dependencia al campo magnético aplicado (H). En la mayoría de los casos se produce una relación lineal entre B y H de forma que se cumple la siguiente relación (Ec. 1):

$$B = \mu \times H \quad (1)$$

Donde μ es la permeabilidad magnética de las partículas. Las partículas de Fe₃O₄ son paramagnéticas cuando $\mu < 1$ y diamagnéticas cuando $\mu > 1$. La susceptibilidad magnética (χ) también difiere en las partículas paramagnéticas y diamagnéticas (Ec. 2):

$$\chi = \mu - 1 \quad (2)$$

De forma que las partículas paramagnéticas tienen $\chi > 0$, mientras que las diamagnéticas tienen $\chi < 0$.

Las propiedades magnéticas macroscópicas de los materiales son consecuencia de los momentos magnéticos asociados con sus átomos individuales. En este sentido, las partículas ferromagnéticas son aquellas donde se dan interacciones de acoplamiento que hacen que los momentos magnéticos netos de spin de átomos adyacentes se alineen unos con otros aún en ausencia de un campo magnético aplicado. Por este motivo, cuando a partículas ferromagnéticas se les retira el campo magnético aplicado presentan una magnetización permanente. A diferencia de lo que ocurre en el ferromagnetismo, las partículas paramagnéticas no presentan esta magnetización permanente cuando son retiradas del campo magnético aplicado.

El paramagnetismo es característico de aquellos átomos o moléculas que tienen momentos magnéticos permanentes que no interactúan entre sí y que, en ausencia de un campo magnético externo, se encuentran orientados al azar. Cuando los materiales ferromagnéticos son reducidos a tamaño de partícula más pequeño que un dominio magnético (<10-20 nm), pasan a presentar propiedades superparamagnéticas. Así, las NPs de óxido de hierro superparamagnéticas presentan una magnetización similar a la de los materiales ferromagnéticos y mayor que la de las partículas paramagnéticas.

El carácter superparamagnético es esencial para la aplicación biomédica de las NPs de Fe_3O_4 para asegurar su seguridad y eficacia. Las NPs superparamagnéticas no van a presentar interacciones magnéticas entre ellas y, así, se mantiene la estabilidad coloidal al no producirse aglomeraciones de partículas. Desde el punto de vista de la seguridad, esto va a disminuir la probabilidad de formación de agregados una vez hayan sido administradas vía intravenosa lo que reduce la posibilidad de generar trombos en vasos sanguíneos de pequeño diámetro como los capilares. Desde el punto de vista de la eficacia, se asegura el mantenimiento del pequeño tamaño durante su almacenamiento y aplicación siendo esto esencial para sus aplicaciones como, por ejemplo, en hipertermia y de RMI (33,35-37).

El grado de cristalinidad, el tamaño y la forma son los principales parámetros que repercuten en las propiedades magnéticas de las NPs de Fe_3O_4 . Puesto que todos ellos van a depender en gran medida de la metodología de síntesis, se han desarrollado una gran multitud de procedimientos que pueden ser físicos, químicos y biológicos. Los métodos físicos son los menos escogidos debido a que suelen ser altamente complejos y

presentan la limitación de no poder generar partículas en la escala nanométrica. Al contrario de estos, los métodos biológicos y, más concretamente, microbiológicos, sí permiten obtener NPs de Fe₃O₄ con características óptimas y presentan una alta reproducibilidad. Sin embargo, estos métodos conllevan un tiempo muy elevado que llega a abarcar incluso semanas. Son los métodos químicos los que se utilizan con mayor frecuencia debido a su simplicidad, alto R y bajo coste, lo que ha permitido incluso su desarrollo a escala industrial. A esto hay que sumarle la alta eficiencia que ofrecen para sintetizar NPs de Fe₃O₄ con propiedades óptimas para su aplicación en Biomedicina (38–41).

La coprecipitación química es una metodología usada con alta frecuencia. Este proceso se lleva a cabo en un medio acuoso y permite sintetizar NPs de Fe₃O₄ con un tamaño <50 nm. Básicamente, consiste en la adición de una base (NH₃, CH₃NH₂ y NaOH) a una solución acuosa con sal férrica y ferrosa. Esta reacción resulta en la precipitación de dichas sales lo que resulta en la formación de Fe₃O₄ (Ec. 3):



La coprecipitación química de las sales férrica y ferrosa descrita fue originalmente desarrollada por Massart a partir de cloruro férrico y ferroso (33,36,42–44).

2.1.2 Poli(ϵ -caprolactona)

Los polímeros biodegradables se proponen para el diseño de nanosistemas de liberación controlada de fármacos. A pesar de la habilidad de diversas clases de polímeros, algunos están limitados por determinadas características fisicoquímicas y biológicas, impidiendo su aplicación en el transporte de fármacos. Dichas limitaciones pueden ser vencidas mediante la formación de copolímeros híbridos o la funcionalización superficial permitiéndose así el desarrollo de nuevas formulaciones para la liberación de fármacos.

La PCL es un poliéster alifático semicristalino constituido por monómeros de ϵ -caprolactona (fig. 5). Presenta una alta biodegradabilidad y biocompatibilidad por lo que es ampliamente utilizada en el desarrollo de herramientas de ingeniería tisular y sistemas de liberación de fármacos y su uso en implantes y suturas quirúrgicas ha sido aprobado por la FDA.

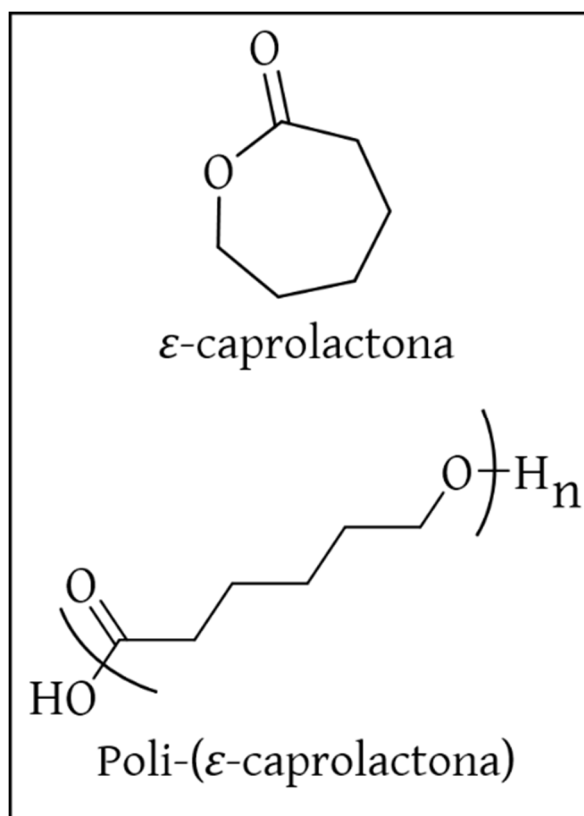


Fig. 5. Estructura química de la ϵ -caprolactona y la poli-(ϵ -caprolactona). El monómero ϵ -caprolactona es una lactona (éster cíclico) cuyo nombre deriva del ácido hexanóico. La polimerización de anillo abierto de la ϵ -caprolactona da lugar a la PCL.

A temperatura ambiente, la PCL es soluble en disolventes aromáticos y clorados como el diclorometano (DCM) y el cloroformo, parcialmente soluble en disolventes polares (acetona, acetonitrilo y dimetilformamida) e insoluble en alcohol y agua. La temperatura de transición vítrea de este polímero se encuentra sobre los 60 °C y -60 °C. Estas características hacen que sea altamente apropiado para la vehiculización de fármacos. De hecho, este polímero presenta una alta capacidad de carga de fármaco y una cinética de liberación sostenida. Su perfil semicristalino conduce a una difícil difusión del fármaco si se compara con otros polímeros de carácter amorfo.

La preparación de NPs de PCL se han descrito diferentes metodologías. En concreto, las más utilizadas para la formulación de NPs de PCL cargadas de fármaco son la de evaporación de disolvente, desplazamiento de disolvente, diálisis, emulsificación-difusión y evaporación de disolvente y disposición interfacial de polímero. En general, todos estos métodos conllevan la evaporación o extracción de un disolvente orgánico

causando la nanoprecipitación. La selección del disolvente orgánico y del agente tensioactivo constituyen parámetros determinantes para las características de las NPs resultantes.

La degradación de la PCL se produce por un proceso catalítico de hidrólisis catalizado por los ácidos carboxílicos terminales de su estructura (fig. 5) que se encuentra facilitada por el fenómeno de fagocitosis *in vivo* (45–47).

La PCL puede ser modificada de diferentes formas para obtener nanosistemas con unas características fisicoquímicas mejoradas. En este sentido, se han desarrollado múltiples copolímeros, así como su funcionalización con sustancias de diferente naturaleza como el PEG o el ácido oléico (48,49).

2.1.3 Quitosano

Los polímeros naturales son ampliamente utilizados en la industria alimentaria y farmacéutica siendo los polisacáridos uno de los grupos más destacados debido a su baja toxicidad y a su alta biocompatibilidad y biodegradabilidad. El CS es uno de los polisacáridos más utilizados. Algunas de sus numerosas aplicaciones son el transporte de agentes terapéuticos como fármacos quimioterápicos, antibióticos, antiinflamatorios, proteínas, material genético. También está siendo estudiado su uso para vacunas. En comparación con otros polímeros, el CS puede ser administrado por diferentes vías como la oral, la pulmonar o la vaginal además de la parenteral.

El CS es una molécula con una estructura principal de carbohidratos similar a la de la celulosa que consiste en dos tipos de unidades repetitivas, N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina unidas por un enlace (1,4)- β -glicosídico (fig. 6). Es un polímero catiónico que se obtiene mediante desacetilación alcalina de la quitina, un elemento estructural del exoesqueleto de moluscos y otros crustáceos marinos. Aunque el CS se obtiene a partir de la quitina, las aplicaciones de esta última en comparación con el CS están limitadas porque es químicamente inerte.

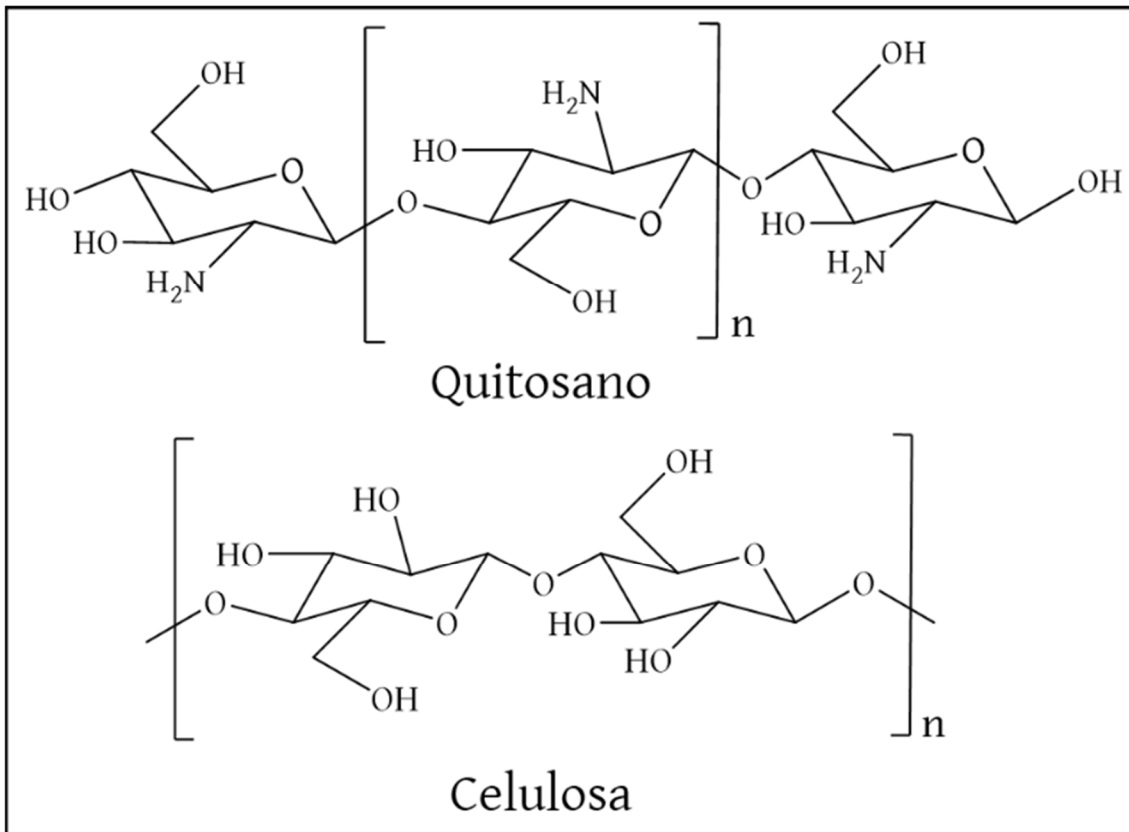


Fig. 6. Estructura química del CS y la celulosa. La representación de la estructura química de estos dos polímeros pone de manifiesto la similitud estructural existente entre ambos siendo la única diferencia la sustitución del grupo hidroxilo del carbono 2 de la estructura de la celulosa por un grupo amino en la estructura del CS.

El CS es insoluble en agua, pero soluble en soluciones acuosas acidificadas con acético, cítrico y tartárico, pero no fosfórico o sulfúrico con un pH inferior a 6.5. En dichas soluciones ácidas los grupos aminos libres de las unidades de glucosamina de CS que tienen un pKa aparente de 6.5 son protonados y convertidos en la forma $R-NH_3^+$ soluble ionizable. Para la obtención de partículas de CS, este se disuelve en las condiciones mencionadas y se precipita con polianiones y soluciones alcalinas. Es interesante destacar que una de las ventajas de la utilización de este polímero es la posibilidad de obtención sin necesidad de utilizar disolventes tóxicos.

El CS está caracterizado por sus propiedades mucoadhesivas que se producen por interacción electrostática entre sus cargas positivas ($R-NH_3^+$) y las cargas negativas de la superficie de la mucosa (50–52).

Actualmente, y como consecuencia del extenso estudio de la Nanotecnología Farmacéutica, se sabe que las características fisicoquímicas de los nanosistemas van a tener una enorme repercusión en su biodistribución, permanencia en el organismo e

interacción con las células diana, entre otros fenómenos. Una gran parte de las estrategias desarrolladas se basan en la modificación superficial de las NPs. El motivo principal es la repercusión que esto conlleva con respecto a la formación de la corona proteica y consecuentemente, sobre características fisicoquímicas como el tamaño y la carga que determinarán el destino final de la NP. Los polisacáridos están actualmente siendo investigados debido a que ya hay diversos estudios que señalan su efecto *stealth* a la vez que favorecen la interacción con las células. El CS es uno de los polisacáridos que más interés está ganando para la funcionalización de NPs (53).

2.2. Metodología y resultados

2.2.1 Formulación y funcionalización

2.2.1.1. Núcleos de magnetita

Para la síntesis de coloides magnéticos de Fe_3O_4 se siguió el método de co-precipitación química de Massart (42). Dicha metodología de síntesis comienza con la adición simultánea de una solución acuosa de cloruro férrico de 40 mL (FeCl_3 , 1M; Panreac, España) y una solución acuosa acidulada con ácido clorhídrico (HCl ; 2M) de cloruro ferroso (FeCl_2 , 2M; Panreac, España) de 10 mL sobre una solución acuosa basificada con amoníaco (NH_3 ; 0.7M) de 500 mL. Dicha adición se produjo gota a gota, a temperatura ambiente y bajo agitación mecánica (630 rpm; IKA® Eurostar 60 Digital Constant-Speed Mixer, IKA, Königswinter, Alemania). Una vez completada la reacción, los coloides magnéticos resultantes fueron aislados mediante sedimentación magnética en respuesta a la aplicación de un campo magnético (0.4 T). Inmediatamente después, el sedimento magnético fue redispersado en una solución de ácido perclórico (HClO_4 , 2M) de 500 mL donde se mantuvo durante 12 h. Este paso aseguraba que las partículas Fe_3O_4 se mantuvieran separadas unas de otras evitando la formación de agregados indeseados. Por último, el medio ácido de HClO_4 utilizado en el paso de estabilización fue restituido por agua bidestilada usando, primero, una sedimentación magnética y, después, ciclos de centrifugación consecutivos (40 min at 9000 rpm, centrifuge 5804; Eppendorf Ibérica S.L.U., Madrid, España) hasta que la conductividad del sobrenadante fuera adecuada ($<10 \mu\text{S}/\text{cm}$).

2.2.1.2. Nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) y nanoplateformas de magnetita recubiertas con poli(ϵ -caprolactona)

Las NPs de PCL se obtuvieron siguiendo la metodología de disposición interfacial de polímero (54,55). Esta metodología consiste en la preparación de dos fases, una fase orgánica de DCM de 5 mL donde se disolvía la PCL (1.25 %, p/v; peso molecular \approx 14,000; Merck KGaA, Alemania) y otra acuosa de 12.5 mL con el agente tensioactivo poloxámero 188 (Kolliphor[®] P-188; 0.125 %, p/v; BASF, Alemania). La fase orgánica se adicionaba, gota a gota, sobre la fase acuosa a temperatura ambiente y bajo condiciones de intensa agitación mecánica (1200 rpm). Tras la precipitación del polímero que daba como resultado a las NPs, se eliminó el DCM mediante evaporación en un rotavapor (Rotavapor[®] R II, Büchi, Flawil, Switzerland). Por último, la dispersión acuosa de NPs de PCL fue purificada mediante centrifugación (40 min at 9000 rpm, centrifuge 5804; Eppendorf Ibérica S.L.U., Madrid, España) para obtener valores de conductividad adecuados ($<10 \mu\text{S}/\text{cm}$).

Para la obtención de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ se siguió la metodología descrita con las siguientes modificaciones. Por un lado, la fase acuosa contenía el agente tensioactivo y los coloides de Fe_3O_4 (0.125%, p/v). Además, para la formulación de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ cargadas con clorhidrato de GEM (Merck KGaA), la cantidad de fármaco requerida también fue adicionada en la fase acuosa (10^{-5} - 10^{-3}M). De forma adicional, el proceso de purificación final se realizó mediante sedimentación magnética (0.4 T) lo que permitió, además, seleccionar las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ con óptima capacidad magnética.

El procedimiento de obtención de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ descrito fue determinado mediante el análisis de la influencia de la relación de masas iniciales $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{PCL}$. En concreto, los parámetros tenidos en cuenta en este análisis fueron el R del procedimiento de obtención (%), el tamaño de partícula obtenido por DLS y la carga eléctrica superficial (ζ) de las partículas resultantes. El R (%) de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ fue calculado de la siguiente forma (Ec. 4):

$$R (\%) = \left[\frac{\text{masa total obtenida de NPs}}{\text{masa total utilizada de material}} \right] \times 100 \quad (4)$$

2.2.1.3. Nanopartículas de quitosano y nanoplateformas de magnetita recubiertas con poli(ϵ -caprolactona) y funcionalizadas con quitosano

La metodología de coacervación se utilizó para la preparación de NPs de CS (56–58). En primer lugar, se disolvió poloxámero 188 (1%, p/v) en una disolución acuosa con ácido acético (CH_3COOH , 2%; v/v) y CS (0.05%, p/v; peso molecular \approx 50.000 – 190.000 Da, grado de acetilación 75-85%, 99% de pureza, Merck KGaA), en este orden. Tras esto, una solución de sulfato sódico (Na_2SO_4 , 20%, p/v) se vertió lentamente sobre la solución previamente preparada bajo ultrasonificación de intensidad 20% en modo pulsado al 40% (Branson Sonifier 450, Emerson Electric Co., Estados Unidos) siendo estas condiciones mantenidas durante 15 minutos adicionales. Para evitar aumentos indeseables de temperatura, el vial que contenía la muestra se mantuvo en un baño de hielo durante todo el experimento. Por último, la dispersión de NPs de CS fue purificada mediante centrifugación (40 min at 9000 rpm, centrifuge 5804; Eppendorf Ibérica S.L.U., Madrid, España) para obtener valores de conductividad adecuados ($<10 \mu\text{S}/\text{cm}$).

La metodología descrita fue adaptada para la funcionalización con CS de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ previamente obtenidas. Con tal fin, se adicionaron las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ (o NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ cargadas con GEM) a un medio acuoso con poloxámero 188 y CS de las mismas características que el utilizado para la obtención de NPs de CS puras. Por otro lado, la limpieza de la dispersión resultante se produjo siguiendo la metodología descrita para la purificación final de la dispersión de NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$. De esta forma, se desarrolló una funcionalización adecuada sin requerir la utilización de disolventes orgánicos y a través de un procedimiento menos complejo si se compara con estrategias de conjugación (23,59). El R (%) de las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ fue calculado utilizando la ecuación 4.

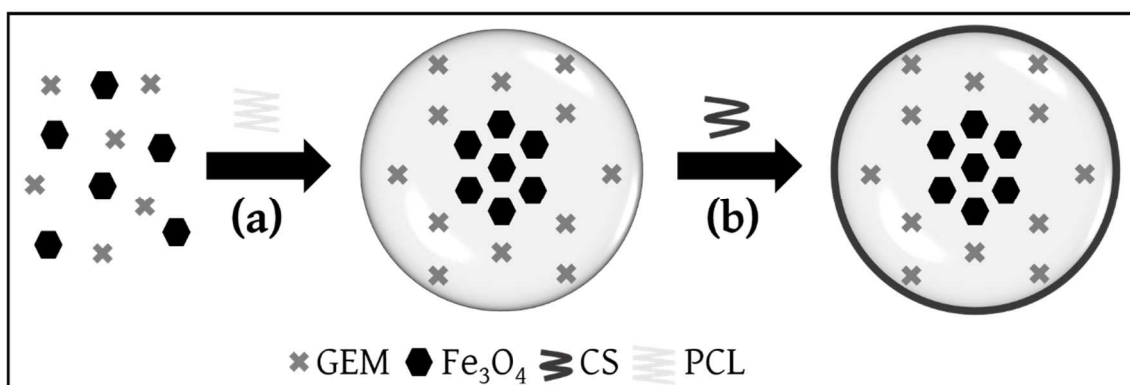


Fig. 7. Esquema del procedimiento de preparación de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4)/poli(ϵ -caprolactona) (PCL)/quitosano (CS) cargadas con gemcitabina (GEM). a) Disposición interfacial de polímero para la formación de una nanomatriz de PCL con núcleos de Fe_3O_4 y gemcitabina. b) Funcionalización mediante coacervación de CS en la superficie de las NPs de Fe_3O_4 /PCL.

2.2.2 Caracterización

2.2.2.1 Tamaño hidrodinámico

El R_H de una partícula se define como el tamaño de una esfera que difunde a la misma velocidad que la partícula que está siendo medida. La técnica capaz de analizar el R_H de una partícula se conoce como DLS.

La técnica de DLS se basa en el hecho de que las partículas en suspensión con un determinado tamaño presentan un movimiento aleatorio debido a la colisión con las moléculas del disolvente, el movimiento Browniano. La difusión resultante de dicho fenómeno se conoce como coeficiente de difusión de traslación (D_t). Para poder determinar este parámetro, se hace incidir un láser a la muestra que se encuentra en una cubeta transparente a la longitud de onda (λ) de la luz y se analiza el comportamiento de la luz dispersada. Puesto que la muestra presenta miles de partículas, y como resultado de la luz dispersada por éstas, se crea un patrón característico. Las interferencias constructivas de la luz dispersada crearán zonas claras mientras que lo contrario ocurrirá como resultado de las interferencias destructivas. Puesto que las partículas se encuentran constantemente en movimiento, dicho patrón va a fluctuar. Las interferencias constructivas y destructivas van a verse modificadas lo que se traduce en el cambio de intensidad de las zonas claras y oscuras del patrón obtenido. Entonces, si una partícula es sometida de forma repetida a la fuente de luz, las fluctuaciones en el tiempo son similares de forma que existe una correlación. Puesto

que las partículas están en continuo movimiento, a medida que pasa el tiempo, la correlación va decreciendo hasta que llega un momento en el que desaparece. Las partículas de mayor tamaño se mueven más lentamente por lo que tardan más tiempo en perder esta correlación mientras que las partículas de menor tamaño se mueven más rápidamente alcanzando la desaparición de la correlación más rápidamente. Este es el fenómeno que permite determinar el valor de D_t .

Una vez conocido el valor de D_t , la ecuación de Stoke-Einstein permite calcular el valor de R_H (Ec. 5):

$$D_t = k_B T / 6\mu\eta R_H \quad (5)$$

donde k_B es la constante de Boltzmann ($1.38064852 \times 10^{-23}$ J/K), T es la temperatura y η la viscosidad absoluta (60,61).

La determinación del R_H y la polidispersión (PDI) de las NPs obtenidas se realizó utilizando el *Zetasizer Nano-ZS* (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido). La preparación previa de la muestra consistió en la dispersión de las NPs a estudiar (≈ 0.1 %, p/v) y su correcta homogeneización. Las medidas fueron realizadas en una temperatura de 25.0 ± 0.2 °C ($n = 9$).

2.2.2.2 Potencial zeta

Un sistema coloidal está formado, al menos, por dos fases. Una de ellas es la fase dispersa y está constituida por coloides. Los coloides son partículas sólidas que se encuentran en la escala microscópica o nanoscópica, como son la mayoría de NPs de aplicación en Biomedicina. La otra fase es la dispersante y está constituida por un líquido. El comportamiento del coloide es cuantificable cuando esta fase está formada por agua o agua con electrolitos.

La mayoría de las partículas presentan algo de carga superficial en medios acuosos debido a la desionización/disociación de los grupos químicos superficiales, o debido a la adsorción de moléculas cargadas o iones en la superficie de la partícula. La carga neta de los sistemas se encuentra en equilibrio por la formación de una nube de contraiones alrededor de la partícula donde las cargas eléctricas de la superficie del coloide atraen iones de signo opuesto. La mencionada nube se conoce como doble capa eléctrica siendo este el nombre de la teoría que explica la distribución de dichos contraiones alrededor del coloide. La doble capa eléctrica está constituida por la capa de Stern, que consiste

en contraiones adsorbidos a la carga superficial de las NPs, y la capa difusa, una carga neta opuesta rodeando la NP. Así, mientras que en la capa de Stern los iones se encuentran estrechamente unidos a la superficie del coloide, en la capa difusa se localizan más alejados de la superficie distribuidos en diferentes niveles. La caracterización de la carga superficial de las NPs se realiza atendiendo a las características de la interfase o punto de neutralidad, conocido como plano de deslizamiento (*shear/slipping plane*), normalmente en términos del ζ . El plano de deslizamiento diferencia los iones que se mueven con la partícula y los que no cuando, por ejemplo, se aplica un campo eléctrico (electroforesis) (fig. 8).

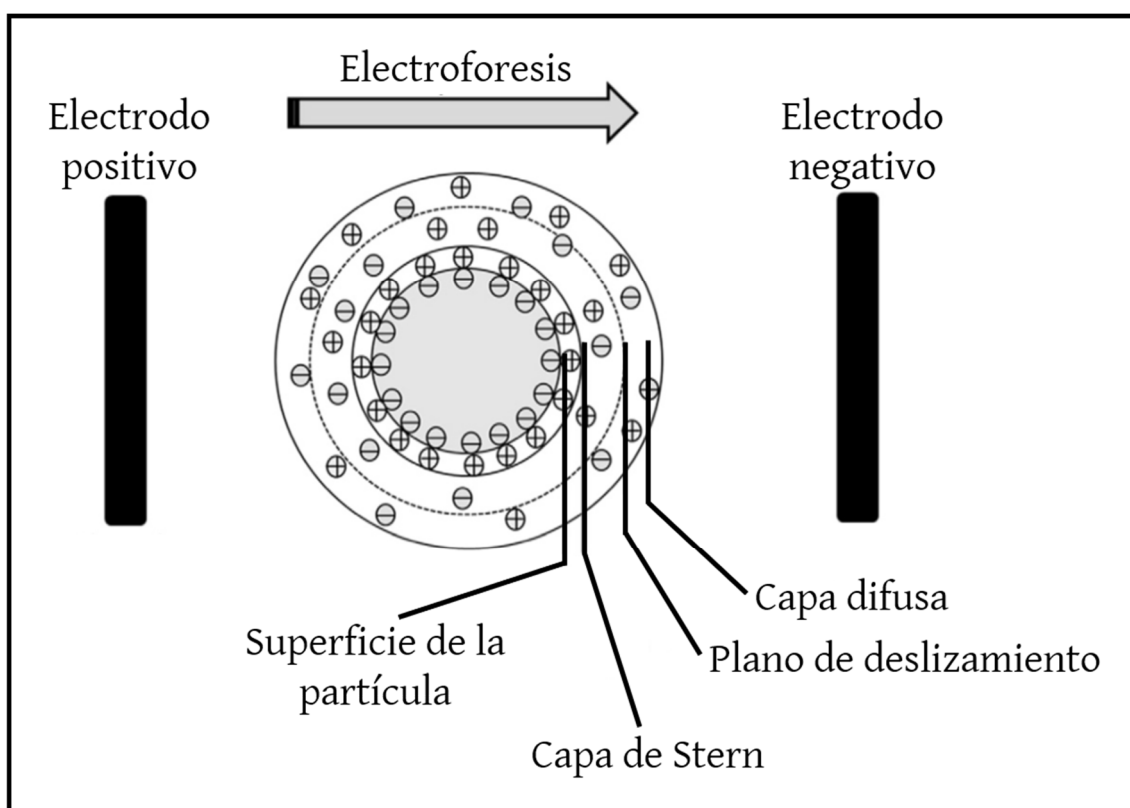


Fig. 8. Representación de electroforesis y doble capa eléctrica. El esquema muestra una partícula con superficie cargada negativamente con una capa fuertemente adherida (capa de Stern) constituida por iones de carga opuesta, es decir, cationes. A continuación de la capa de Stern, se encuentra la capa difusa formada por iones de los dos tipos. Al aplicar un campo eléctrico (electroforesis), la partícula con la doble capa eléctrica se mueve hacia el electrodo de signo contrario al de la carga de su superficie, es decir, al electrodo positivo. Entonces, el plano de deslizamiento representa la interfaz entre los iones que se mueven con la partícula y los que no siendo el potencial zeta el potencial electrocinético en este punto. Reproducido de Bhattacharjee 2016. Copyright Elsevier.

Debido a que el ζ no puede ser medido directamente, va a ser deducido de la movilidad electroforética (μ_e) de las partículas cargadas por la aplicación de un campo eléctrico. Para ello, primero se aplica la siguiente ecuación (Ec. 6):

$$\mu_e = V/E \quad (6)$$

donde V es la velocidad de la partícula ($\mu\text{m/s}$) y E es la fuerza del campo eléctrico (Volt/cm) siendo ambos parámetros conocidos. Una vez calculado el valor de μ_e , entonces podemos calcular el valor de ζ aplicando la ecuación de Henry (Ec. 7):

$$\mu_e = 2\varepsilon_r\varepsilon_0\zeta f(\kappa a)/3\eta \quad (7)$$

donde ε_r es la relación permitividad eléctrica relativa/constante dieléctrica, ε_0 es la permitividad eléctrica de vacío, $f(\kappa a)$ es la función de Henry y η es la viscosidad a la temperatura experimental.

En función del grosor de la doble capa eléctrica, del radio de la partícula y de la composición del medio de dispersión, se utilizan distintos valores de $f(\kappa a)$. Así, la ecuación de Henry será modificada de distintas formas utilizando diferentes teorías siendo las de mayor aplicación la de Hellmhollz-Smoluchowski, utilizada para partículas de tamaño de hasta $1 \mu\text{m}$ que se encuentran dispersas en un medio con una fuerza iónica alta (mayor a 10^{-3} M). Sin embargo, existen casos particulares donde se debe aplicar diferentes ecuaciones como es en el caso de los coloides de Fe_3O_4 , debido a su pequeño tamaño de partícula además de su alta carga eléctrica. En este caso la teoría más extendida es la de O'Brien y White. Otra teoría aplicable cuando no sea posible utilizar la ecuación de Hellmhollz-Smoluchowski es la teoría de Ohshima.

El instrumento utilizado para la determinación del ζ de la superficie de NPs es el zetámetro. La metodología que utiliza este instrumento consiste en determinar la μ_e mediante la realización de un ensayo de electroforesis y aplicando un láser Doppler para determinar la velocidad de la partícula. La luz dispersada en un ángulo de 17° se combina con el haz de referencia produciendo una señal de intensidad fluctuante. La tasa de fluctuación es proporcional a la velocidad de las partículas. Una vez determinada la μ_e , se aplica la ecuación de Henry para determinar el ζ de las partículas de la muestra (60,62-64).

La determinación del ζ de las dispersiones de NPs obtenidas fue realizada usando el *Zetasizer Nano-ZS* (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido). El tratamiento de la muestra previo a la medida consistió en la dilución de las NPs para obtener una concentración de ≈ 0.1 %, p/v y su posterior homogeneización. Todas las medidas fueron realizadas a una temperatura de 25.0 ± 0.2 °C ($n = 9$).

2.2.2.3 Optimización y eficacia de la formulación

La carga superficial y el tamaño de partícula son los parámetros que, con una alta frecuencia, son responsables de una gran variedad de procesos físicos (por ejemplo, magnetismo) y biológicos (por ejemplo, toxicidad)(62). Por este motivo fueron, junto al R, los parámetros seleccionados para seleccionar la metodología de formulación más adecuada para las NPs de Fe₃O₄/PCL. Si bien la metodología de obtención de estos nanocompuestos ya descritas son las que posibilitaban el tamaño, carga superficial y Rs más adecuados, para llegar a esta conclusión se investigó el efecto que tienen las diferentes proporciones de masa Fe₃O₄:PCL desde 1:4 a 4:1, manteniendo el resto de la metodología como ya se ha indicado (tabla 1;fig. 9).

Tabla 2. Análisis del rendimiento, tamaño y polidispersión de los nanocompuestos de Fe₃O₄/PCL en función de la proporción Fe₃O₄:PCL utilizada. El rendimiento del procedimiento de obtención (R; %), el tamaño hidrodinámico (tamaño; nm) y el índice de polidispersión (PDI) de las proporciones Fe₃O₄:PCL de 4:1 a 1:4 ($n = 3$).

Proporción Fe ₃ O ₄ :PCL	4:1	4:2	4:3	4:4	3:4	2:4	1:4
R (%)	≈ 15	≈ 20	≈ 30	80.1 ± 7.6	69.1 ± 12.2	91.5 ± 8.1	57.9 ± 6.3
Tamaño (nm)	136 ± 2	142 ± 3	138 ± 3	196 ± 16	278 ± 7	126 ± 1	455 ± 107
PDI	0.21 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.41 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.26 ± 0.03	0.93 ± 0.06

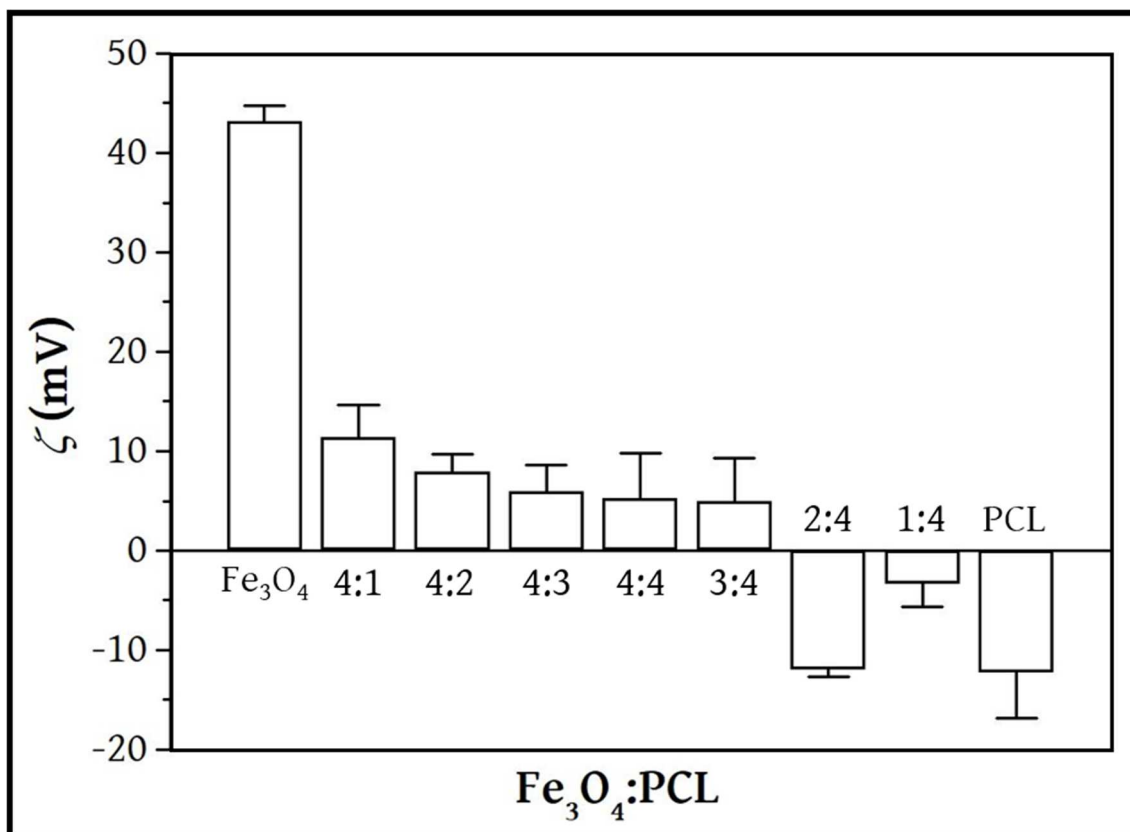


Fig. 9. Diagrama de potencial zeta (ζ , mV) de las partículas de magnetita (Fe_3O_4), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) y los nanocompuestos $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ desarrollados. Valores de ζ medidos en agua (pH 6 ± 0.2) de las diferentes proporciones $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{PCL}$ ensayadas (1:4 y 4:1) y las partículas puras de Fe_3O_4 y PCL ($n = 9$).

El tamaño determinado por DLS fue de 68 ± 1 nm (PDI: 0.3) para las NPs de Fe_3O_4 . Sin embargo, la experiencia del grupo de investigación señala que el tamaño de estos coloides es de ≈ 15 nm (38,59,65,66). La técnica de DLS mide el R_h de la partícula, que está constituido por la propia partícula, pero también los iones adheridos a su superficie que se mueven con ella. Por el contrario, las técnicas de microscopía electrónica proporcionan el área de superficie proyectada basada en la cantidad de electrones incidentes que se transmitieron a través de la muestra. De esta forma, se hipotetiza que el incremento de tamaño obtenido en la técnica de DLS se debe a los iones adheridos a la superficie y no a la partícula en sí. Por ello, es frecuente la obtención de mayores tamaños mediante DLS que mediante microscopía electrónica (por ejemplo, HRTEM) (60,67).

Cuando la masa de Fe_3O_4 excedía la cantidad de PCL utilizada en la formulación o cuando la masa de polímero utilizado era un poco superior que la de Fe_3O_4 , las NPs obtenidas

presentaban una carga superficial positiva. Esto podría ser consecuencia de un recubrimiento polimérico de PCL inadecuado de los coloides de Fe_3O_4 . De forma contraria, cuando la masa de PCL adicionada a la formulación se incrementaba (2:4 Fe_3O_4 :PCL), se producía el recubrimiento polimérico de la superficie de las partículas de Fe_3O_4 lo que suponía una carga superficial negativa, como en las NPs de PCL puras (fig. 9). La influencia de las proporciones sobre el tamaño solo se observó en la proporción con mayor cantidad de polímero (1:4 Fe_3O_4 :PCL) (tabla 2), debido precisamente a la alta concentración de PCL que contribuye a aumentar la viscosidad del medio, como ya ha sido observado en previos estudios (68,69).

Este tamaño podría explicar los menores valores en valor absoluto que se obtienen de ζ respecto a las NPs de PCL puras (70–72). Respecto al R, un notable aumento de éste se producía a medida que la proporción de PCL se incrementaba con respecto a la de Fe_3O_4 (tabla 2). Finalmente, teniendo en cuenta el análisis realizado, se pudo concluir que la proporción 2:4 Fe_3O_4 :PCL era la más adecuada debido a su alto R ($\approx 90\%$) y tamaño (126 ± 1 nm) además del valor de ζ más cercano al de las NPs de PCL. De esta forma, esta fue la proporción escogida y utilizada para la investigación de las NPs de Fe_3O_4 /PCL así como las utilizadas para la funcionalización con CS.

Las NPs de (Fe_3O_4 /PCL)/CS presentaron un tamaño de 308.1 ± 3 nm ($\text{PDI} = 0.24 \pm 0.02$). El R del procedimiento de obtención fue de $89.33 \pm 9.64\%$.

2.2.2.4 Efecto del pH y la fuerza iónica en el valor de potencial zeta

El pH es, probablemente, el parámetro que más influencia tiene sobre el ζ , especialmente en dispersiones acuosas. El ζ varía con el pH con mayor o menor intensidad en función de los grupos químicos que constituyan la superficie de las NPs. La obtención de una curva de ζ en función del pH es de alto valor para determinar cualitativamente la composición de la superficie de las NPs ya que permite determinar el punto isoeléctrico. El punto isoeléctrico es el pH donde el valor de ζ se hace cero. Debido a que es característico de los grupos químicos presentes en la superficie de las NPs, es de alta utilidad para determinar la composición de la cubierta de NPs de tipo *core/shell* o (*core/shell*)/*shell* (39,59,73,74).

Como cabe esperar, la concentración de iones del medio también va a influenciar el ζ de los coloides. Puesto que los fenómenos de floculación van a ser en gran medida

dependientes de los valores de ζ , la optimización de la composición del medio es determinante (75).

El análisis del ζ bajo la influencia de distintos valores de pH y de concentración de KNO_3 se realizó para las NPs de Fe_3O_4 , PCL, CS, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$. La preparación de las muestras consistió, en primer lugar, en la preparación del medio de dispersión. Para ello, se ajustó la fuerza iónica con KNO_3 (10^{-3} M) y los valores de pH con HNO_3 y KOH . KNO_3 fue también el analito utilizado para la obtención de medios acuosos con diferentes fuerzas iónicas (10^{-5} – 10^{-2} M) a unos valores fijos de pH (6 ± 0.2). Una vez determinadas las condiciones del medio, se adicionaron las NPs a analizar hasta alcanzar una concentración de ≈ 0.1 %, p/v y se mantuvieron 12 h en contacto bajo condiciones de agitación suave (150 rpm, universal orbital shaker OS-10, Boeco, Germany) a 25 ± 0.5 °C para favorecer la formación de la doble capa eléctrica. Previamente a la medida, los valores de pH fueron ajustados de nuevo si era necesario y la dispersión fue sonicada.

La figura 10 muestra como los valores de pH tienen una gran influencia sobre los valores de ζ . En concreto, los óxidos son especialmente sensibles a las variaciones de pH tal y como se puede observar en la curva resultante para los coloides magnéticos de Fe_3O_4 (fig. 10a). Esto se debe al carácter anfótero que presentan algunos óxidos metálicos como es el caso de Fe_3O_4 . El punto isoeléctrico obtenido para las partículas de Fe_3O_4 (pH ≈ 7) coincide con el determinado en estudios publicados para la Fe_3O_4 comercial (71). Respecto a los coloides de Fe_3O_4 , el comportamiento obtenido para las NPs de PCL es muy diferente. Si bien existe cierta sensibilidad de los valores de ζ cuando varía el pH del medio de dispersión de estas NPs, es mucho menos pronunciado que el obtenido para los coloides de Fe_3O_4 . El punto isoeléctrico obtenido para las NPs de PCL se encuentra en torno a un valor de pH de entre 5 y 5.5 (76). Por encima del punto isoeléctrico, se observan valores de ζ negativos, probablemente debido a la disociación de los grupos acrílicos característicos de la estructura química de la PCL (77). Estas grandes diferencias de comportamiento electrocinético de los núcleos y el polímero posicionan a la electroforesis en una herramienta útil para comprobar cualitativamente la eficacia de la inclusión de las NPs de Fe_3O_4 en la matriz polimérica de PCL. De hecho, la figura 10a muestra claramente que las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ presentan un comportamiento prácticamente indistinguible a las constituidas únicamente por PCL. Respecto a los valores de ζ obtenidos para las NPs de CS, se obtuvieron resultados

positivos para todo el rango de pH investigado (fig. 10a). Probablemente esto se deba a la carga positiva residual de los grupos $-NH_2$ característicos de este polisacárido. Esta carga positiva debe de mantenerse incluso cuando la precipitación del CS es inducida mediante la adición de iones sulfato y, por tanto, la neutralización de estos grupos químicos. Valores neutros y negativos de ζ son esperados en pHs extremadamente básicos ($pH \geq 10$) (57). Estos mismos resultados se obtienen para las NPs de Fe_3O_4/PCL funcionalizadas con CS lo que señala la eficacia de la formulación de las NPs de $(Fe_3O_4/PCL)/CS$. Los valores de ζ obtenidos bajo la influencia de la fuerza iónica (fig. 10b) de nuevo muestra la similitud del perfil electroforético de las NPs de Fe_3O_4/PCL con las de PCL (y diferencias con las NPs de Fe_3O_4) y las de NPs de $(Fe_3O_4/PCL)/CS$ con las de CS. En todos los casos, se observa una menor influencia de la fuerza iónica sobre de los valores de ζ si se compara con la influencia del pH (fig. 10b). Esto podría deberse al mecanismo de compresión de la doble capa eléctrica (78,79). Es interesante resaltar como en el caso de las NPs de CS y de $(Fe_3O_4/PCL)/CS$ se observa una tendencia ascendente de los valores de ζ al aumentar la fuerza iónica. Sin embargo, esto cambia cuando el medio presenta una alta concentración de KNO_3 ($10^{-2} M$), donde se produce una disminución del ζ . Una hipótesis para justificar este comportamiento es el mecanismo clásico de compresión de la doble capa eléctrica, en virtud del cual el potencial eléctrico disminuye más rápidamente con la distancia cuanto mayor es la concentración de electrolito (conductividad de la capa estancada)(78,80).

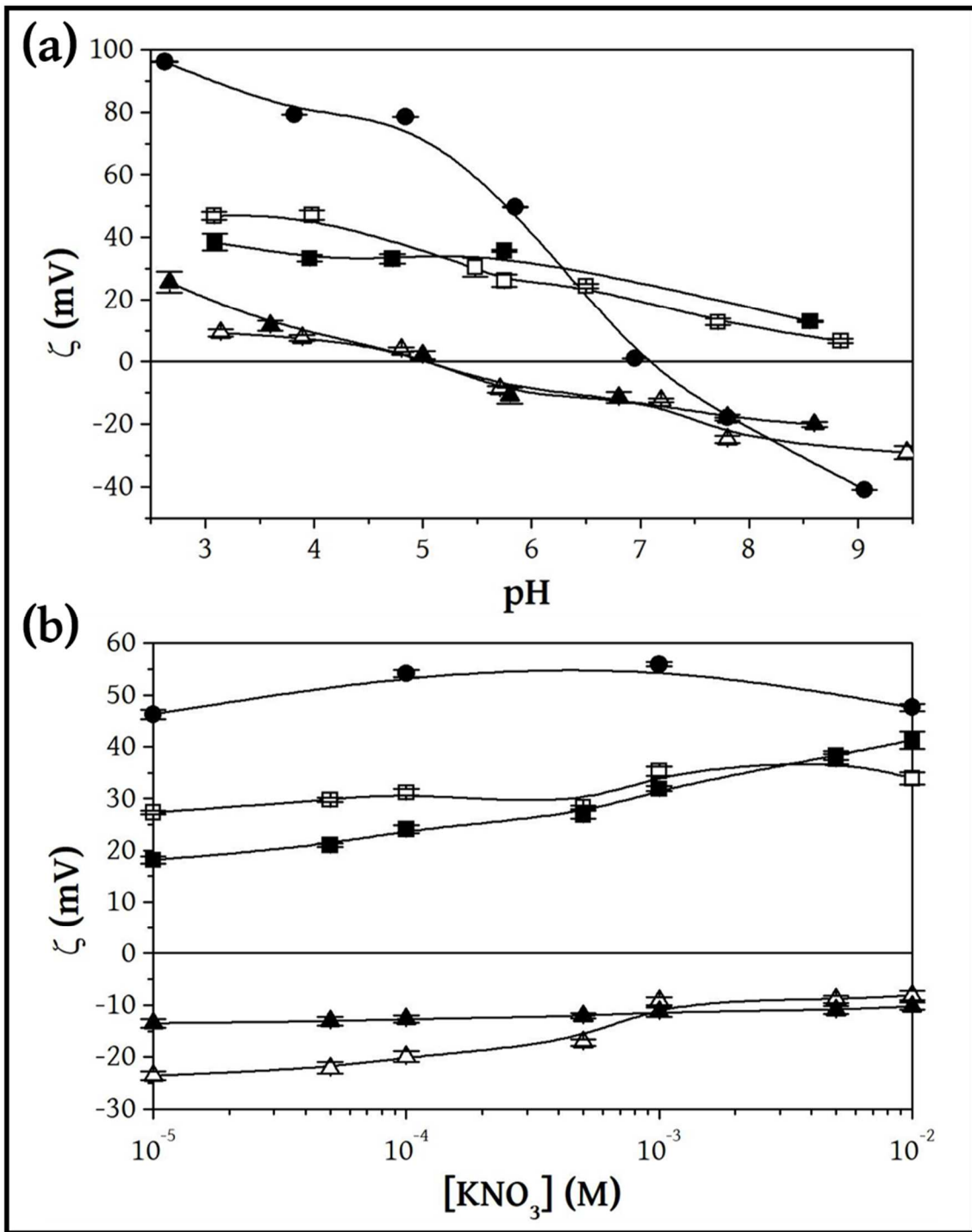


Fig. 10. Curvas de potencial zeta (ζ) de las partículas en función de las condiciones del medio de dispersión. ζ de las partículas de magnetita (Fe_3O_4 , ●), poli(ϵ -caprolactona) (PCL, Δ), quitosano (CS, □), Fe_3O_4 /PCL (▲) y Fe_3O_4 /PCL/CS (■) bajo la influencia de diferentes valores de pH con una concentración de KNO_3 constante ($10^{-3} M$) (a) y distintas concentraciones de KNO_3 con un pH constante ($pH = 6 \pm 0.2$) (b).

2.2.2.5 Estabilidad coloidal

La estabilidad de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ fue investigada a corto plazo en términos de tamaño, PDI y ζ . El análisis fue realizado durante 1 mes. Las dispersiones de NPs (1 mg/mL, pH \approx 6, Kolliphor[®] P-188 1% p/v) se mantuvieron a 4.0 ± 0.5 °C. Las muestras fueron repartidas en diferentes alícuotas de forma que una vez determinados los valores correspondientes se desecharon.

La estabilización de los coloides magnéticos es esencial para evitar la agregación y, por tanto, mantener las características físicas y no suponer problemas de toxicidad. La estabilidad es, así, esencial para que los nanosistemas tengan una potencial aplicación en Biomedicina (36,40,81–83). Los nanocompuestos de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ mostraron agregación desde el día 7 de almacenamiento (tabla 3). Además del aumento de tamaño, también se produjo un aumento de la PDI. Tal y como se había observado para la proporción 1:4 $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{PCL}$, los agregados resultantes presentaban una carga superficial menor en valores absolutos. Este comportamiento coloidal puede ser explicado a través de la carga eléctrica superficial de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ (\approx 15 mV). Las bajas repulsiones electrostáticas presentes en partículas magnéticas con un ζ bajo (\pm 10 – 20 mV) podrían resultar en una pobre estabilidad debido a la teoría de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) y las fuerzas de van der Waals (36,60,84,85). Previos estudios observan también este comportamiento de agregación señalando que la alta hidrofobicidad podría contribuir a este fenómeno (49). Por el contrario, no se produjeron alteraciones sustanciales en ninguno de los parámetros estudiados para las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ (tabla 3). Esto puede ser explicado también por las interacciones electrostáticas interparticulares que en estos nanocompuestos si resultarían favorables debido a que la carga eléctrica superficial adquirida con la funcionalización con CS es considerablemente mayor (\approx 30 mV) (37). De esta forma, es de esperar que predominen las fuerzas de repulsión y que la formación de agregados sea improbable (41,87). Además, también cabe esperar las fuerzas estéricas características del CS contribuyan a la estabilización de las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ (88–90). Entonces, se puede concluir que la funcionalización de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ con CS es esencial para mantener su estabilidad.

Tabla 3. Ensayo de la estabilidad coloidal de las NPs de magnetita (Fe₃O₄)/poli(ϵ -caprolactona) (PCL) y NPs de (Fe₃O₄/PCL)/ quitosano (CS). La estabilidad se evaluó durante un mes mediante el análisis del tamaño, Pdl and ζ ($n = 9$).

Tiempo (días)	Tamaño (nm)		Pdl		ζ (mV)	
	Fe ₃ O ₄ /PCL	(Fe ₃ O ₄ /PCL)/Cs	Fe ₃ O ₄ /PCL	(Fe ₃ O ₄ /PCL)/Cs	Fe ₃ O ₄ /PCL	(Fe ₃ O ₄ /PCL)/Cs
0	126 ± 1.8	308.1 ± 3.0	0.24 ± 0.01	0.24 ± 0.02	-15.4 ± 4.1	28.4 ± 0.6
1	149.9 ± 0.7	315.8 ± 2.6	0.22 ± 0.01	0.19 ± 0.01	-15.1 ± 0.6	32.9 ± 0.2
7	455 ± 31.44	325.2 ± 0.8	0.38 ± 0.02	0.18 ± 0.01	-5.1 ± 1.5	30.4 ± 1.2
14	828.5 ± 30.1	334 ± 2.3	0.47 ± 0.04	0.17 ± 0.01	-2.9 ± 1.2	31.5 ± 0.2
30	-	323.9 ± 6.2	-	0.16 ± 0.02	-	32.9 ± 0.5

2.2.2.6 Microscopía electrónica

La estructura ocular encargada de enfocar, el cristalino, es una lente convergente. A través del movimiento de acomodación el cristalino nos permite ver objetos a diferentes distancias. Sin embargo, existe una distancia mínima a partir de la cual el objeto no se percibe nitidez. Por debajo de esta distancia mínima se requiere el uso de lupas o microscopios ópticos. Sin embargo, como los microscopios ópticos trabajan con fotones, su resolución también es limitada. El principio de Huygens nos indica que, si el objeto observado es menor que la λ de la luz utilizada, la luz difractará alrededor del objeto. Entonces, si se tiene en cuenta la λ de la luz visible, el límite para un microscopio es de unos 600 nm.

La microscopía electrónica utiliza radiaciones de menor λ basándose en la dualidad onda-partícula que indica que todas las partículas se comportan como ondas y viceversa. En particular, utiliza electrones. Los electrones tendrán asociada una determinada λ en función de la diferencia de potencial con la que los aceleremos según la relación de Broglie pudiendo incluso llegar a alcanzar órdenes de pm. Además, los electrones son partículas cargadas de forma que sigue la ley de Lorentz y es posible deflectarlos con campos electromagnéticos. Así, se pueden construir lentes para electrones y, consecuentemente, microscopios. Pese a que no es ilimitado debido a determinados fenómenos físicos (aberraciones), el microscopio electrónico es el instrumento que más información aporta acerca de los materiales a escala nanométrica y, consecuentemente, uno de los más utilizados en el área de Nanotecnología Farmacéutica.

La microscopía electrónica es un campo inmenso. Las técnicas de microscopía de transmisión de electrones y la microscopía electrónica de barrido son las más conocidas y utilizadas. Se han desarrollado enormes avances que han dado paso al desarrollo de otras técnicas como la HRTEM, la AEM o la STEM. Las AEM conforman las técnicas de recopilación de datos espectroscópicos en HRTEM con la utilización de los detectores correspondientes. Se pueden utilizar para identificar y cuantificar la concentración de elementos presentes en un área de la muestra, mapear su distribución en la muestra con una alta resolución espacial e incluso determinar su estado químico. Una de las principales técnicas de la AEM se basa en la detección de rayos X siendo esta técnica conocida como EDX. De forma general, los rayos X emitidos por la muestra a causa del

bombardamiento de electrones son característicos de su composición elemental. Por otro lado, la técnica STEM combina los principios de microscopía de transmisión de electrones y la microscopía electrónica de barrido. La técnica de STEM permite obtener un mayor contraste, pero también un mayor ruido por lo que está indicada en aquellos casos en los que la visualización del contraste sea más importante que la resolución. STEM puede clasificarse en campo claro o campo oscuro en función de los electrones que se recojan. STEM de campo claro anular o *annular bright field* (ABF-STEM) tiene un detector ABF que recoge los electrones del haz directo. Por otro lado, se encuentra la técnica de STEM de campo oscuro anular de grandes ángulos o *high angle annular dark field* (HAADF-STEM) cuyo detector HAADF recoge los electrones del haz directo (91).

El análisis de microscopía electrónica de las NPs de Fe₃O₄/PCL optimizadas (proporción 2:4) y funcionalizadas con CS fue realizado por el servicio de microscopía del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Las técnicas de HRTEM, HAADF-STEM, ABF-STEM y AEM basado en EDX se realizaron utilizando el microscopio electrónico de transmisión de alta resolución con un detector de STEM de tipo HAADF y un sistema de microanálisis de tipo EDX (microscopio Titan G2 60-300 FEI, Thermofisher Scientific Inc., Estados Unidos; Bruker Nano GmbH, Alemania) del servicio de microscopía del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. El tratamiento previo de la muestra consistió en el depósito de gotas de una dispersión de NPs ($\approx 0.1\%$, p/v) previamente homogeneizada mediante sonicación sobre una microrejilla de cobre recubiertas con una película de formar. La humedad de la muestra fue completamente eliminada a 35.0 ± 0.5 °C en un horno de convección.

El estudio de HRTEM de las NPs de Fe₃O₄/PCL postula su esfericidad (fig. 11a). La agregación observada podría ser debida al tratamiento de la muestra, como ya ha sido observado previamente para múltiples nanosistemas magnetopoliméricos (59,65,92–94). La hidrofobicidad de la matriz de PCL que contiene los núcleos magnéticos (ver apartado de goniometría) podría promover esta agregación la cual probablemente se ve favorecida por la etapa de secado del tratamiento de la muestra.

La técnica de HAADF-STEM y ABF-STEM señalaban la completa inclusión de los coloides de Fe₃O₄ en la matriz polimérica de PCL (fig. 11ab). Esto fue confirmado mediante el mapa de distribución elemental obtenido por EDX para el Fe. La distribución de Fe y, por tanto, de las partículas Fe₃O₄, resultó ser homogénea a lo largo de la matriz de PCL

(fig. 11cd). El espectro de EDX demostró la presencia de Fe y O de las partículas de Fe_3O_4 . Por otro lado, corroboraba la composición polimérica de PCL de la matriz debido a la presencia de C y O. El uso de la microrejilla de cobre determinó la obtención de los picos característicos de dicho en el espectro (fig. 11e).

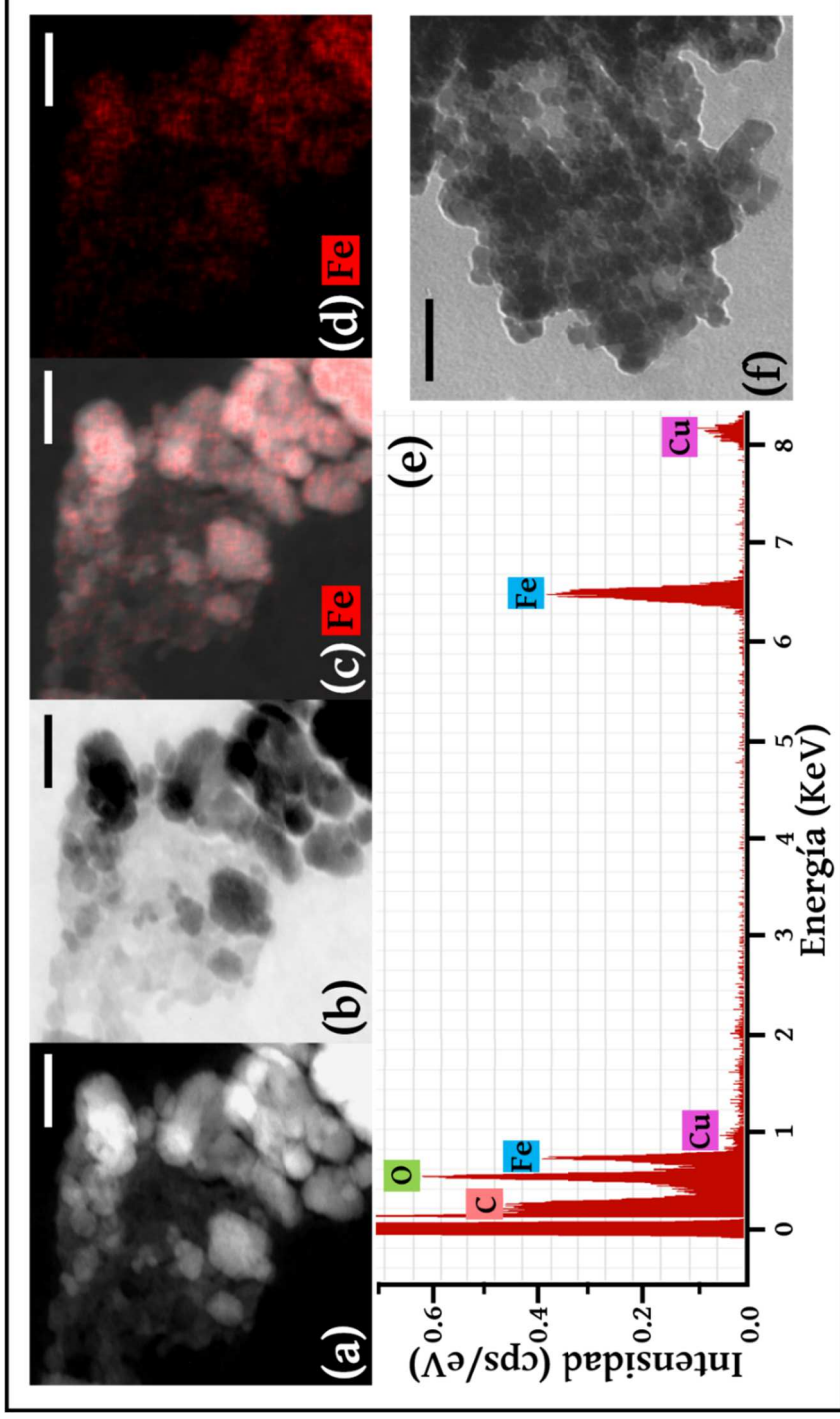


Fig. 11. Análisis de microscopía electrónica de los nanocompuestos de magnetita (Fe_3O_4)/poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (proporción 2:4). a y b) Micrografía STEM de campo oscuro anular de grandes ángulos o *high angle annular dark field* (HAADF-STEM) y STEM de campo claro anular o *annular bright field* (ABF-STEM). c y d) Mapa de espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDX) de distribución de hierro, e) Análisis elemental de EDX y f) micrografía HRTEM. Longitud de barra: 50 nm.

La técnica de AEM basada en EDX fue esencial también para evaluar la funcionalización de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ con CS. Los mapas de distribución de Fe y N muestran de forma cualitativa la presencia de coloides magnéticos (Fe_3O_4) y CS (grupos $-\text{NH}_2$) (fig. 12a-c). Mientras que el Fe se encuentra distribuido de forma similar a lo observado en las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$, el N se encuentra en la totalidad de la superficie de las NPs analizadas. Esto se corrobora de forma cuantitativa con los espectros de EDX realizados en distintos puntos de las NPs. Además, los espectros EDX muestran el resto de elementos presentes en la muestra propios de los tres nanomateriales que la conforman (Fe_3O_4 , PCL y CS) (fig. 12d-f). El tamaño de las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ fue evaluado en las micrografías electrónicas de HRTEM, HAADF-STEM y ABF-STEM (fig. 13).

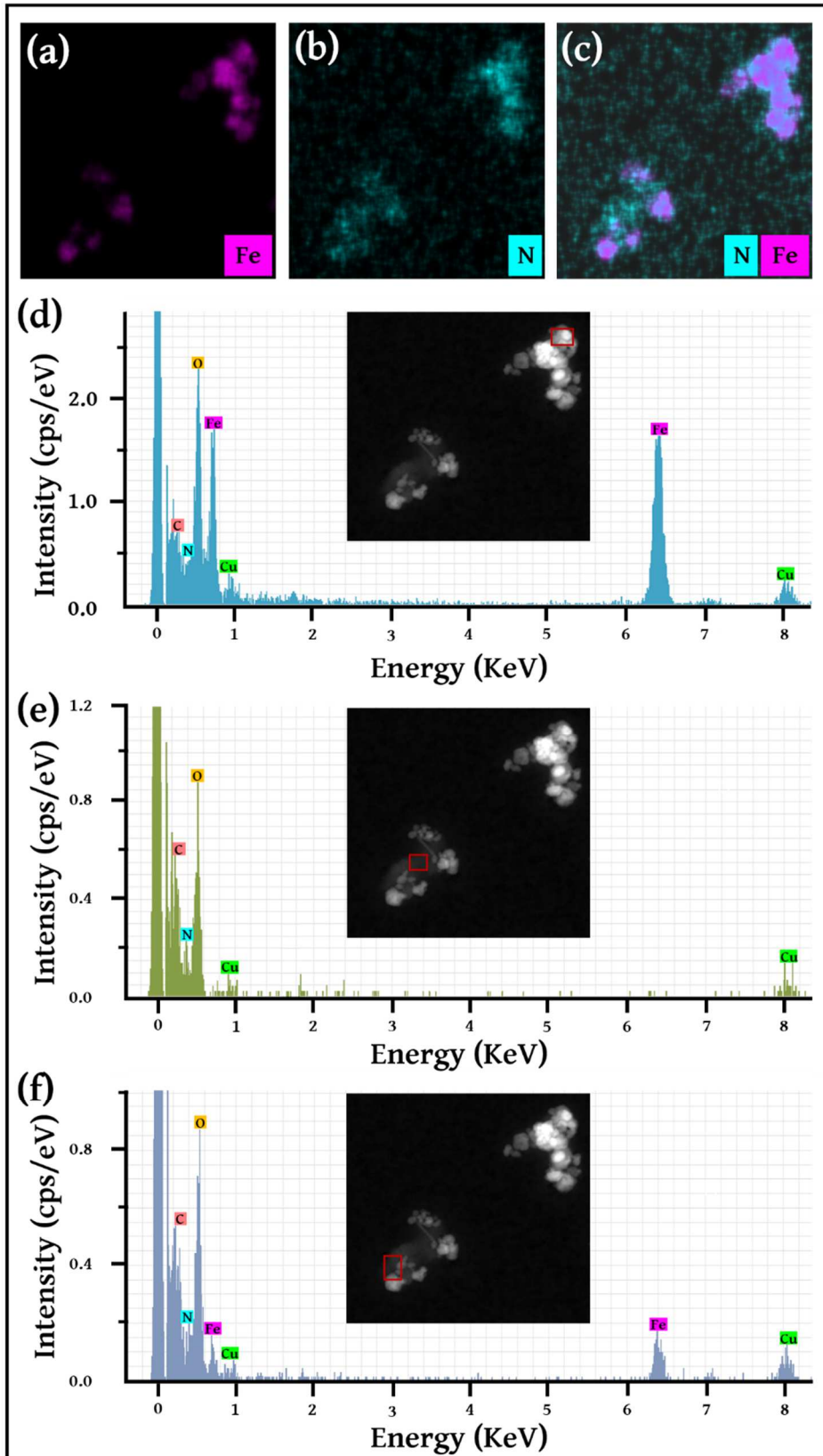


Fig. 12. Mapa elemental de espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDX) de los nanocompuestos de [magnetita (Fe_3O_4)/poli(ϵ -caprolactona) (PCL)]/quitosano (CS). a) Distribución cualitativa de Fe, b) N y c) Fe y N. d-f) Espectros EDX muestran de forma cuantitativa los elementos presentes en los diferentes puntos de la muestra (cuadro rojo).

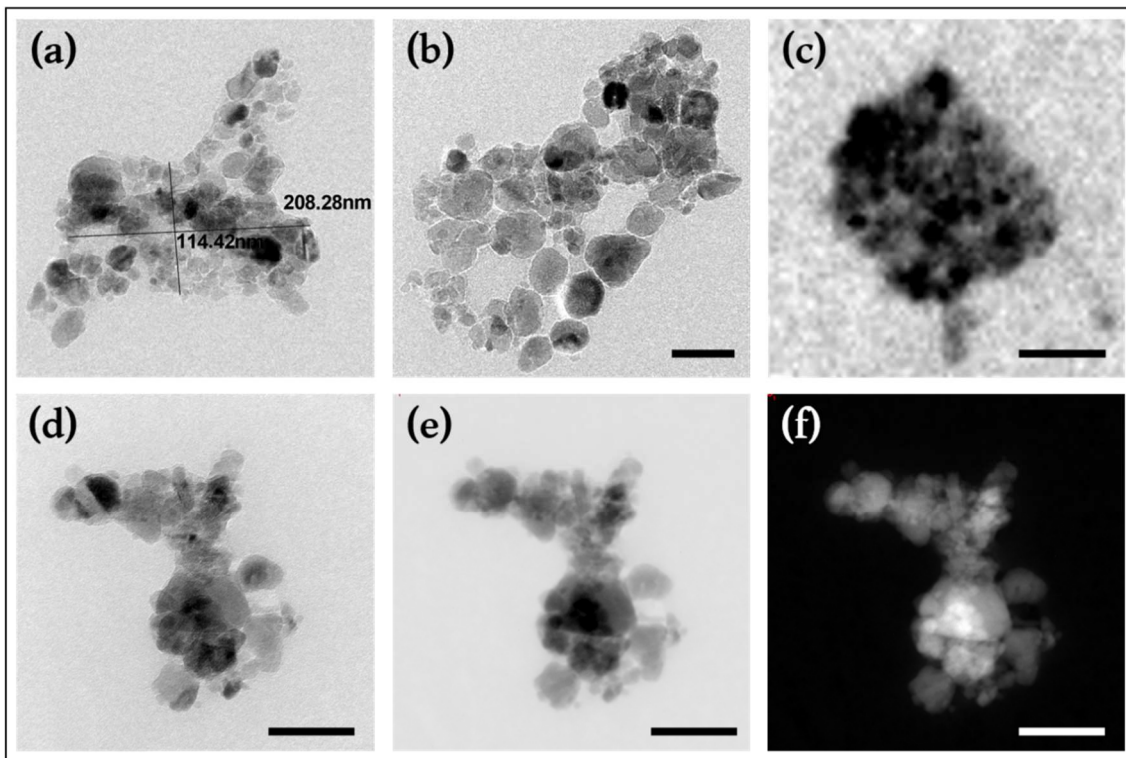


Fig. 13. Imágenes de microscopía de los nanocompuestos de de [magnetita (Fe_3O_4)/poli(ϵ -caprolactona) (PCL)]/quitosano (CS). a-d) micrograffías de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución HRTEM, e) STEM de campo oscuro anular de grandes ángulos o *high angle annular dark field* (HAADF-STEM) y f) STEM de campo claro anular o *annular bright field* (ABF-STEM). Longitud de barra: 50 (b, d-f) y 100 nm (c).

2.2.2.7 Termodinámica superficial

La importancia de la humectabilidad de las partículas y los fenómenos asociados a las interacciones interparticulares en un medio acuoso determinan la tendencia de las NPs a permanecer dispersas o agregarse reduciendo su superficie interfacial. El grado de humectabilidad que presenta un sólido va a estar definido por la tensión superficial, es decir, la cantidad de energía necesaria para aumentar su superficie por unidad de área.

La tensión superficial de la interfase líquido-vacío y líquido-líquido son magnitudes que pueden ser determinadas directamente. Sin embargo, no es posible determinar de forma directa esta propiedad termodinámica de la interfase líquido-sólido.

El modelo de van Oss permite usar el cálculo de los ángulos de contacto para determinar las interacciones no electrostáticas que tienen lugar en la interfase sólido-líquido. De esta forma, este modelo ha permitido estudiar la termodinámica superficial de NPs de aplicación en Biomedicina. La ecuación que constituye la base para el desarrollo del modelo de van Oss sobre la tensión superficial y sus componentes es la que expresa la tensión superficial total de cualquier fase (γ_i^{TOT}) como la suma de dos contribuciones o

componentes, que son las asociadas a interacciones Lifshitz-van der Waals (γ_i^{LW}) y ácido-base (γ_i^{AB}) (Ec. 8) (95):

$$\gamma_i^{TOT} = \gamma_i^{LW} + \gamma_i^{AB} = \gamma_i^{LW} + 2\sqrt{\gamma_i^+ \gamma_i^-} \quad (8)$$

donde el componente γ_i^{AB} se relaciona con la contribución electrón-aceptor (ácido de Lewis; γ_i^+) y electrón-donante (base de Lewis; γ_i^-). Puesto que γ_i^{TOT} y sus componentes γ_i^{LW} y γ_i^{AB} están relacionados con la energía libre tanto del sólido (S) como del líquido (L) (Ec. 9):

$$\begin{aligned} \gamma_{SL}^{TOT} &= \gamma_{SL}^{LW} + \gamma_{SL}^{AB} \\ &= \gamma_{SL}^{LW} + 2\sqrt{\gamma_S^+ \gamma_S^-} + 2\sqrt{\gamma_S^- \gamma_S^+} - 2\sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} - 2\sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+} \end{aligned} \quad (9)$$

estas cantidades pueden ser relacionadas con el ángulo de contacto θ entre el líquido y el sólido, usando la ecuación de Young (Ec. 10):

$$(1 + \cos \theta)\gamma_L^{TOT} = 2\sqrt{\gamma_S^{LW} \gamma_S^{LW}} + 2\sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} + 2\sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+} \quad (10)$$

De esta forma, los tres componentes desconocidos (γ_{SL}^{LW} , γ_S^+ y γ_S^-) pueden ser obtenidos resolviendo el sistema de tres ecuaciones si se determinan los ángulos de contacto de tres líquidos de conocido γ_L^{LW} , γ_L^+ y γ_L^- .

En nuestro caso, se utiliza agua ($\gamma_L^{LW} = 21.8$ y $\gamma_L^+ = \gamma_L^- = 25.5$ mJ/m²), formamida ($\gamma_L^{LW} = 39.0$ y $\gamma_L^+ = 2.28$ y $\gamma_L^- = 39.6$ mJ/m²) y diiodometano ($\gamma_L^{LW} = 50.8$ y $\gamma_L^+ = \gamma_L^- = 0$ mJ/m²).

Los ángulos de contacto de los líquidos seleccionados se determinaron sobre capas delgadas de los tres tipos de materiales depositadas sobre portaobjetos (Ramé-Hart 100-00 Telegoniometer, Estados Unidos) ($n = 9$). Estas superficies lisas se obtuvieron tras la adición de manera uniforme de una suspensión acuosa ($\approx 10\%$, p/v) de cada tipo de coloide sobre la superficie limpia y seca de un portaobjetos de vidrio. La humedad de la muestra se eliminó en una estufa 35.0 ± 0.5 ° C y, posteriormente, se mantuvo en un desecador durante 24 h. De esta manera, se obtuvo una capa de material muy uniforme a nivel macroscópico, que permitió que la medida de los ángulos de contacto se realizara en gotas muy estables. Las gotas fueron depositadas con una jeringa micrométrica (Gilmont, Estados Unidos) a 25.0 ± 0.5 ° C y la imagen de la gota en la superficie de la muestra fue capturada con una cámara adaptada al telegoniómetro.

La evaluación de la energía libre de la interacción líquido-sólido (ΔG_{SLS}) se utilizó para determinar la naturaleza hidrófila o hidrófoba del material con la siguiente ecuación (Ec. 11):

$$\Delta G_{SLS} = -2\gamma_{SL} \quad (11)$$

donde un valor negativo correspondería a un material hidrofóbico mientras que uno positivo indicaría el carácter hidrófilo del material.

En la tabla 4 se recogen los valores promedio de los ángulos de contacto obtenidos. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la existencia de importantes diferencias tal y como se puede observar en los ejemplos mostrados en la fig. 14a-c. En cuanto a los datos obtenidos para γ_s , la contribución electrón donante (γ_s^-) muestra una clara diferencia mucho entre los núcleos de Fe_3O_4 y las NPs de PCL y Fe_3O_4/PCL (fig. 14d). El elevado valor de esta componente en el caso de Fe_3O_4 confirma su carácter monopolar electrón-donante. La evaluación de ΔG_{SLS} permitió elucidar como el carácter hidrófilo de las NPs de Fe_3O_4 se pierde al ser recubierta por el polímero hidrófobo de PCL (fig. 14e). Esto puede considerarse un indicio muy claro de que dicho recubrimiento es eficaz (36,59,96).

Tabla 4. Ángulos de contacto (grados) de los líquidos utilizados en las determinaciones con nanopartículas de Fe_3O_4 , PCL y Fe_3O_4/PCL ($n = 9$).

Líquido	Fe_3O_4	PCL	Fe_3O_4/PCL
Agua	32 ± 3	62 ± 2	54 ± 2
Formamida	12 ± 1	40 ± 2	33 ± 3
Diyodometano	22 ± 2	22 ± 2	22 ± 3

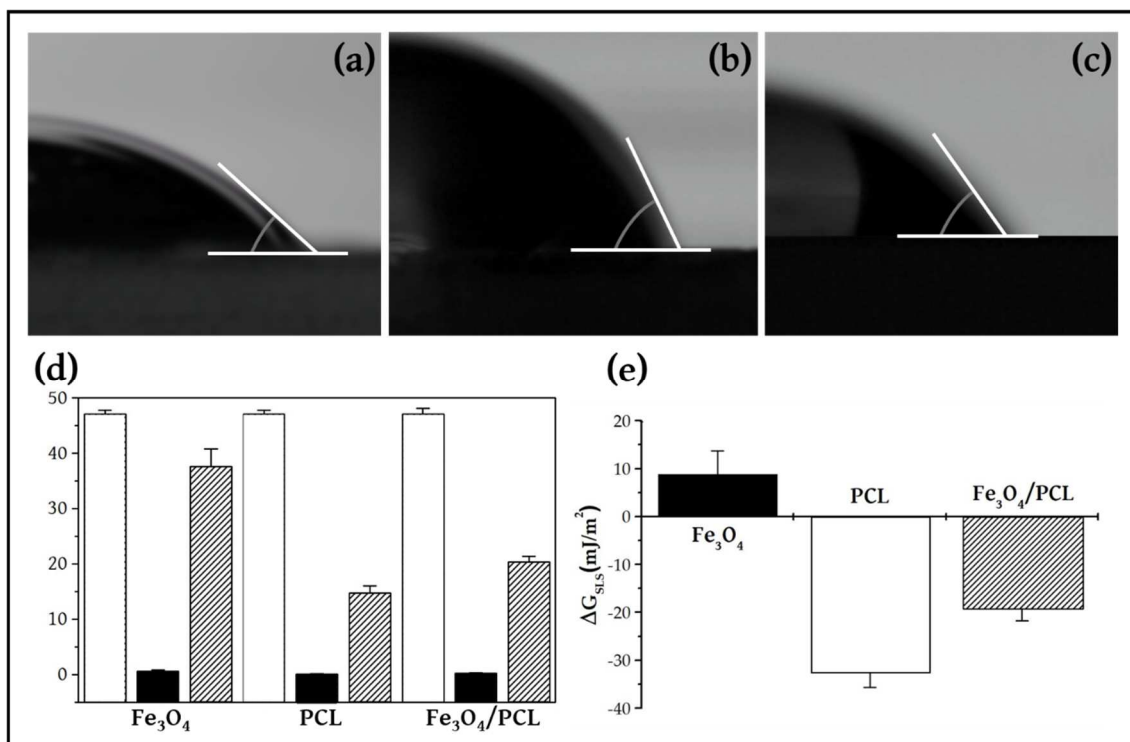


Fig. 14. Análisis de termodinámica superficial de las nanopartículas de magnetita (Fe₃O₄), poli(ε-caprolactona) (PCL) y Fe₃O₄/PCL. Imágenes de ángulos de contacto de agua sobre una superficie lisa constituida por nanopartículas de Fe₃O₄ (a), PCL (b) y Fe₃O₄/PCL (c). d) Componentes de la energía libre superficial (γ_s^{LW} en blanco, γ_s⁺ en negro, γ_s⁻ a rayas). e) Energía libre de la interacción sólido-líquido (ΔG_{SLS}; mJ/m²).

La hidrofobicidad resultante de las NPs de Fe₃O₄/PCL confirma su pobre estabilidad en medios acuosos tal y como se ha observado en el ensayo de estabilidad realizado. Fue precisamente la funcionalización de dichas partículas con CS lo que mejoró la humectabilidad de estas partículas. Este hecho se debe al carácter hidrófilo del CS. El CS es un polisacárido con una estructura muy similar a la de la celulosa con la salvedad de que el grupo hidroxilo de la posición C2 que se repite en cada unidad de celulosa es reemplazado por un grupo amino por lo que presenta una gran abundancia de grupos químicos polares (fig. 6). Dicha estructura demuestra su carácter hidrófilo. Sin embargo, previos estudios que realizan el análisis termodinámico superficial de este polímero concluyen que, a diferencia de lo esperado de su estructura, se caracteriza por una naturaleza hidrófoba. Esto parecía deberse a posibles impurezas de la muestra. Sin embargo, recientemente Hubbe postula la hipótesis de que el CS va a sufrir una reorganización de los grupos químicos de su estructura (97). Esto ocurriría en el secado de la muestra para poder medir los ángulos de contacto. De esta forma, pese a que se

espera que las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ de carácter hidrófobo pasasen a presentar un carácter hidrófilo al adoptar la estructura de NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ tal y como indica el ensayo de estabilidad coloidal, el estudio de termodinámica superficial no demostraría dicho comportamiento.

2.2.2.8 Espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier

La radiación infrarroja se encuentra localizada en el espectro electromagnético entre la zona del visible y la zona de microondas. Una molécula orgánica absorbe y convierte la radiación infrarroja entre 4000 cm^{-1} y 400 cm^{-1} en energía de vibración molecular.

Los espectros de absorción, emisión y reflexión en el infrarrojo, de especies moleculares, se pueden explicar asumiendo que todos son el resultado de los diferentes cambios energéticos producidos en las transiciones de las moléculas de unos estados de energía vibracionales y rotacionales a otros.

La radiación en el infrarrojo no es lo suficientemente energética para producir la clase de transiciones electrónicas que se dan cuando la radiación es ultravioleta, visible y de rayos X. La absorción de radiación en el infrarrojo se limita así, en gran parte, a especies moleculares para las cuales existen pequeñas diferencias de energía entre los diferentes estados vibracionales y rotacionales. Para absorber radiación en el infrarrojo, una molécula debe sufrir un cambio neto en el momento dipolar como consecuencia de su movimiento de vibración o de rotación. Únicamente en estas circunstancias, el campo eléctrico alterno de la radiación puede interactuar con la molécula, y provocar cambios en la amplitud de alguno de sus movimientos. Si la frecuencia de la radiación coincide exactamente con la frecuencia de vibración natural de la molécula, tiene lugar una transferencia neta de energía que origina un cambio en la amplitud de la vibración molecular; la consecuencia es la absorción de la radiación.

La frecuencia o λ de absorción depende 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 químico de cada átomo. 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 enantiómeros). Es muy difícil realizar un tratamiento preciso de las vibraciones de una molécula compleja, por lo que el espectro de infrarrojos se interpreta a partir de la comparación empírica y la extrapolación a

estudios de moléculas sencillas. Esto es posible gracias a que determinados grupos de átomos dan lugar a 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 los grupos funcionales. Sin embargo, debe tenerse claro que toda conclusión alcanzada tras interpretar una banda debería confirmarse mediante el examen de otras zonas del espectro.

En un espectro de infrarrojos se diferencian tres zonas características. La primera de ellas abarca desde los 4000 a 1300 cm^{-1} y constituye la región de los grupos funcionales. La segunda, conocida como la zona de la *huella dactilar*, va desde los 1300 a los 900 cm^{-1} siendo la absorción en esta región única para toda especie molecular. La tercera, continúa hasta los 650 cm^{-1} y las bandas que aparecen en esta región están limitadas a las estructuras aromáticas.

El análisis de FTIR realizado para las NPs de Fe_3O_4 , CS, PCL, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ pretendía confirmar la estructura cualitativa de las NPs desarrolladas. Sin embargo, no suponía una caracterización exhaustiva de los materiales estudiados, ya que para ello sería necesario utilizar de forma adicional las técnicas de espectroscopía de masas y la resonancia magnética nuclear. Como es bien sabido, solo con el análisis de las tres técnicas analíticas se podría determinar la estructura molecular de un material (98).

En la figura 15 se recoge el espectro de infrarrojos de las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$, CS, PCL y Fe_3O_4 . Su análisis señala una vez más la eficacia de la metodología desarrollada para la obtención de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ así como su posterior funcionalización con CS resultando en las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$. Esto se debe a la presencia de las bandas características de Fe_3O_4 y PCL en el espectro de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y de las de Fe_3O_4 , PCL y CS en las de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$.

Concretamente, la banda ancha propia de la absorción de Fe_3O_4 (600 cm^{-1}) puede observarse en las NPs de Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ (99). Se trata de la frecuencia de Restrahl (o rayo residual) de máxima absorbancia de cristales iónicos (o parcialmente iónicos) en el infrarrojo (100).

La presencia de los polímeros de PCL y CS queda representada por la banda de vibración de estiramiento del enlace C-H de la molécula (2900 cm^{-1}), la banda de flexión del enlace

O-H (1375 cm^{-1}), la banda perteneciente a la vibración de elongación del enlace C-O (1250 cm^{-1}), la banda de vibración de elongación y flexión del grupo C-CO-C ($1000 - 1100\text{ cm}^{-1}$) y la banda de la vibración de oscilación del CH_2 (950 cm^{-1}). Puesto que todas ellas son comunes a ambos polímeros, son identificables en los espectros de todas las NPs salvo en las de Fe_3O_4 .

Para la caracterización de cada uno de estos polímeros fue necesario localizar las bandas que reflejan las diferencias de su estructura química. Fue posible identificar dos bandas que únicamente están presentes en las NPs de CS y las de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$. Estas son la banda que corresponde a la vibración molecular de elongación C=O localizada a 1675 cm^{-1} debido a que pertenece a los restos de amida del CS (grado de acetilación 75-85 %) y la de N-H localizada a 1530 cm^{-1} (101-104). Dichas bandas permitían, por tanto, confirmar la presencia de CS en las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$.

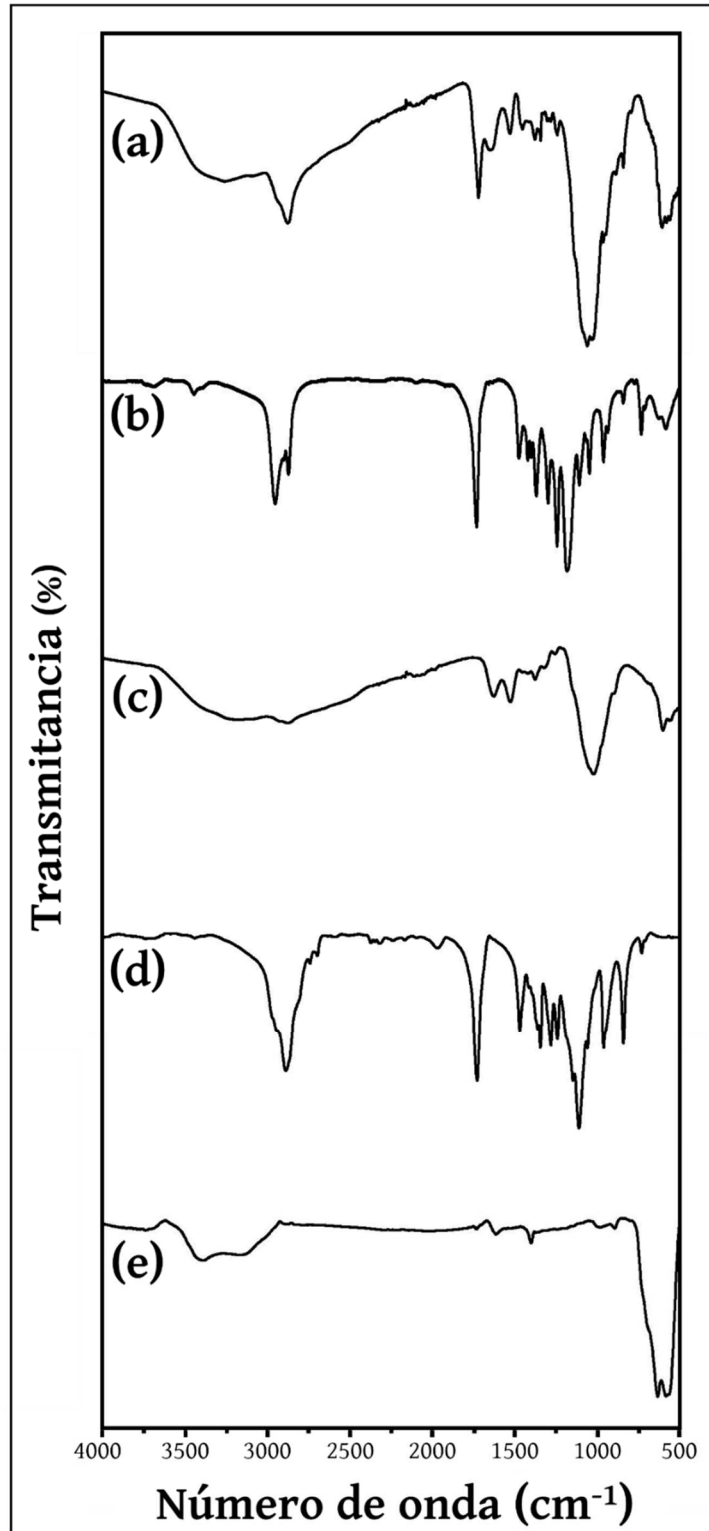


Fig. 15. Análisis de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR). Espectro de las nanopartículas de [magnetita (Fe_3O_4)/poli(ϵ -caprolactona) (PCL)]/quitosano (CS) (a), Fe_3O_4 /PCL (b), CS (c), PCL (d) y Fe_3O_4 (e).

2.2.2.9 Difracción de rayos X

Los rayos X son una radiación electromagnética de λ corta producida por el frenado de los electrones de elevada energía o por transiciones electrónicas de electrones que se encuentran en los orbitales internos de los átomos. La interacción entre el vector eléctrico de la radiación X y los electrones de la materia que atraviesa da lugar a una dispersión. Cuando los rayos X son dispersados por el entorno ordenado de un cristal, tienen lugar interferencias constructivas y destructivas entre los rayos dispersados, ya que las distancias entre los centros de dispersión son del mismo orden de magnitud que la λ de la radiación. Dichas interferencias constituyen la difracción.

Cuando un haz de rayos X choca contra la superficie de un cristal formando un ángulo θ , una porción del haz es dispersada por la capa de átomos de la superficie. La porción no dispersada del haz penetra en la segunda capa de átomos donde, de nuevo, una fracción es dispersada y la que queda pasa a la tercera capa. El efecto acumulativo de esta dispersión producida por los centros regularmente espaciados del cristal es la difracción del haz. Existen ciertos requisitos para que tenga lugar la XRD. Uno de ellos es que el espacio entre las capas de átomos sea aproximadamente el mismo que la λ de la radiación. El otro consiste en que los centros de dispersión estén distribuidos en el espacio de una manera muy regular. La ecuación de Bragg describe las condiciones para que tenga lugar una interferencia constructiva del haz que forma un ángulo θ con la superficie del cristal (Ec. 12):

$$n\lambda = 2d \operatorname{sen} \theta \quad (12)$$

En la ecuación de Bragg (Ec. 12) n es un número entero, λ y d es la distancia interplanar de cristal. Hay que señalar que los rayos X son reflejados por el cristal únicamente cuando el ángulo de incidencia satisface la condición de la siguiente ecuación (Ec. 13):

$$\operatorname{sen} \theta = n\lambda/2d \quad (13)$$

Para todos los demás ángulos, tienen lugar interferencias destructivas.

La XRD ha proporcionado una gran cantidad de importante información a la ciencia y a la industria. Gracias a los conocimientos elucidados sobre la ordenación y el espaciado de los átomos en los materiales cristalinos existe un entendimiento más claro de las propiedades físicas de los metales, de los materiales poliméricos y de otros sólidos. La

XRD es, por tanto, una herramienta altamente adecuada para la identificación de los compuestos cristalinos (98).

Para los estudios analíticos de difracción, la muestra cristalina se muele hasta obtener un polvo fino homogéneo. De esta forma, los numerosos pequeños cristales están orientados en todas las direcciones posibles y, es de esperar que cuando un haz de rayos X atraviesa el material, se puede esperar que un número significativo de partículas estén orientadas de tal manera que cumplan la condición de Bragg de la reflexión para todos los espaciados interplanares posibles. Con tal objetivo, una vez preparadas las dispersiones de NPs a analizar, es decir, las NPs de Fe₃O₄, PCL, CS, Fe₃O₄/PCL y (Fe₃O₄/PCL)/CS, fueron secadas en un horno de convección a 35.0 ± 0.5 °C y, después, conservadas en un desecador durante 24 h. Fue entonces cuando se procedió a homogeneizar la muestra desecada para obtener un polvo fino que finalmente fue prensado para obtener una superficie plana y lisa. El análisis de XRD tuvo lugar en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada en un difractor automático Bruker D8 Venture.

Los métodos de rayos X de polvo cristalino se basan en el hecho de que cada sustancia cristalina presenta un diagrama de difracción único. Así, si se encuentra una igualdad exacta entre el diagrama de una muestra desconocida y el de una muestra fiable, se puede dar por sentada su identidad química. La XRD es, por tanto, una herramienta de gran interés para evaluar la validez de la formulación desarrollada para los nanocompuestos de Fe₃O₄/PCL y (Fe₃O₄/PCL)/CS. Este tipo de análisis permitiría confirmar la presencia de cada uno de los materiales utilizados de forma que permitiría validar el procedimiento de obtención desarrollado. Además, la obtención de los espectros de XRD de los nanocompuestos de Fe₃O₄/PCL y (Fe₃O₄/PCL)/CS permitiría elucidar su posible aplicación en Biomedicina. Esto se debe a la dependencia de la estructura cristalina de los coloides de Fe₃O₄ y sus propiedades magnéticas (33,35,36). Para tal fin, se consideró el espectro patrón de la *American Society for Testing and Materials (ASTM)* de Fe₃O₄.

La figura 16 recoge los difractogramas obtenidos para los nanocompuestos de Fe₃O₄/PCL y (Fe₃O₄/PCL)/CS y los nanomateriales que los componen (Fe₃O₄, PCL y CS). El difractograma de las NPs puras de PCL demuestra el superior carácter semicristalino de la PCL en comparación con el de las NPs de CS. Los picos característicos de la PCL son

identificables en el espectro de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ mientras que, como era de esperar, los del CS solo son apreciables en las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ (105–107). Al comparar los difractogramas de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y Fe_3O_4 (fig. 16c-e) con el patrón ASTM (ver el detalle de la fig. 16e), se comprueba la perfecta coincidencia de las líneas del difractograma con las del patrón, lo que permite identificar la muestra como Fe_3O_4 y caracterizar su elevada cristalinidad de ésta tras ser incluida en la matriz de PCL y, también, tras la funcionalización de dicha matriz con CS.

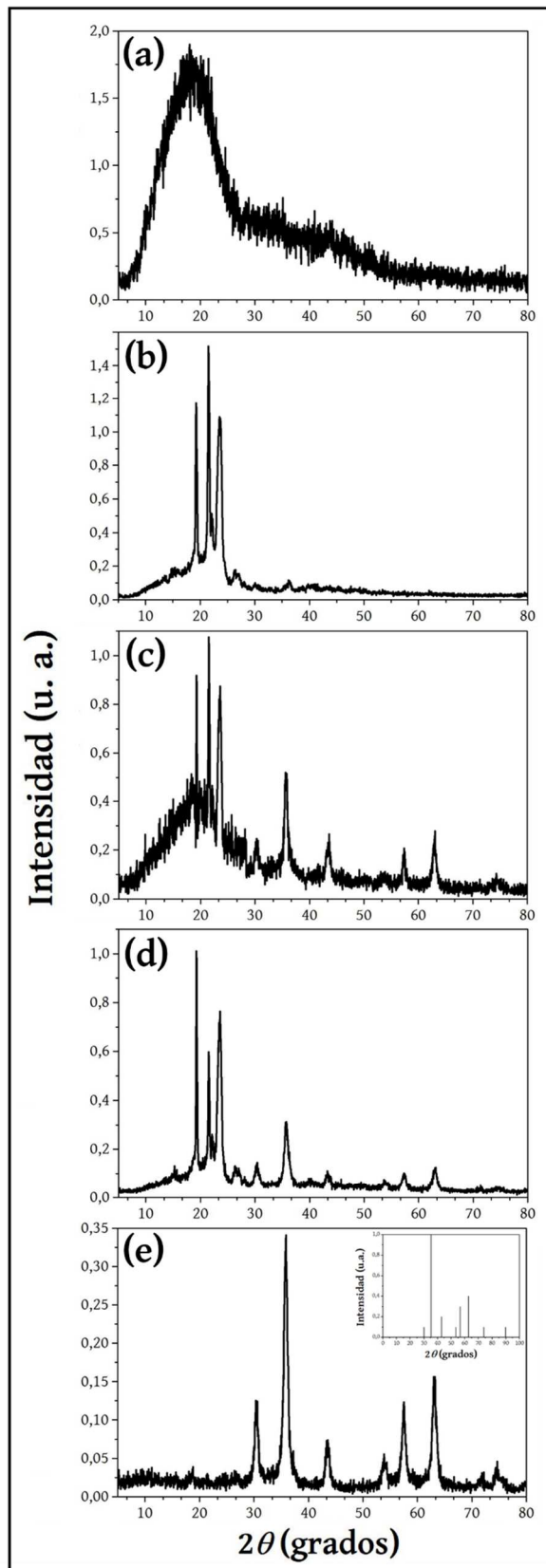


Fig. 16. Difractogramas de rayos X. Espectro de difracción de rayos X de las NPs de quitosano (CS, a), poli(ϵ -caprolactona) (PCL, b), magnetita (Fe_3O_4)/PCL (c), ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$)/CS (d) y Fe_3O_4 (e; figura insertada: patrón ASTM de Fe_3O_4). La intensidad está expresada en unidades arbitrarias (u.a.).

2.2.3 Propiedades magnéticas

2.2.3.1 Ciclo de histéresis y evaluación *in vitro* microscópica y macroscópica

Debido a la importancia de las propiedades magnéticas en la aplicación de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ en Biomedicina, estas fueron definidas mediante el ciclo de histéresis. De forma adicional, la capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados de los nanocompuestos desarrollados se analizó cualitativamente. Para tal fin, una dispersión de NPs de 0.5 % p/v fue sometida a un campo magnético de 0.4 T a una temperatura de 25.0 ± 0.5 °C. La respuesta magnética resultante fue analizada de forma macroscópica y microscópica (Microscopio óptico Olympus con objetivo BX40, Japón).

El ciclo de histéresis de los nanocompuestos de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ (fig. 17) muestra como ambos nanomateriales exhiben un carácter magnético suave dado que las ramas del campo magnético ascendentes y descendentes del ciclo eran apenas perceptibles con la sensibilidad del instrumento utilizado. A partir de las porciones lineales de la curva (campo bajo) se calcularon la susceptibilidad inicial y la magnetización de saturación (tabla 5).

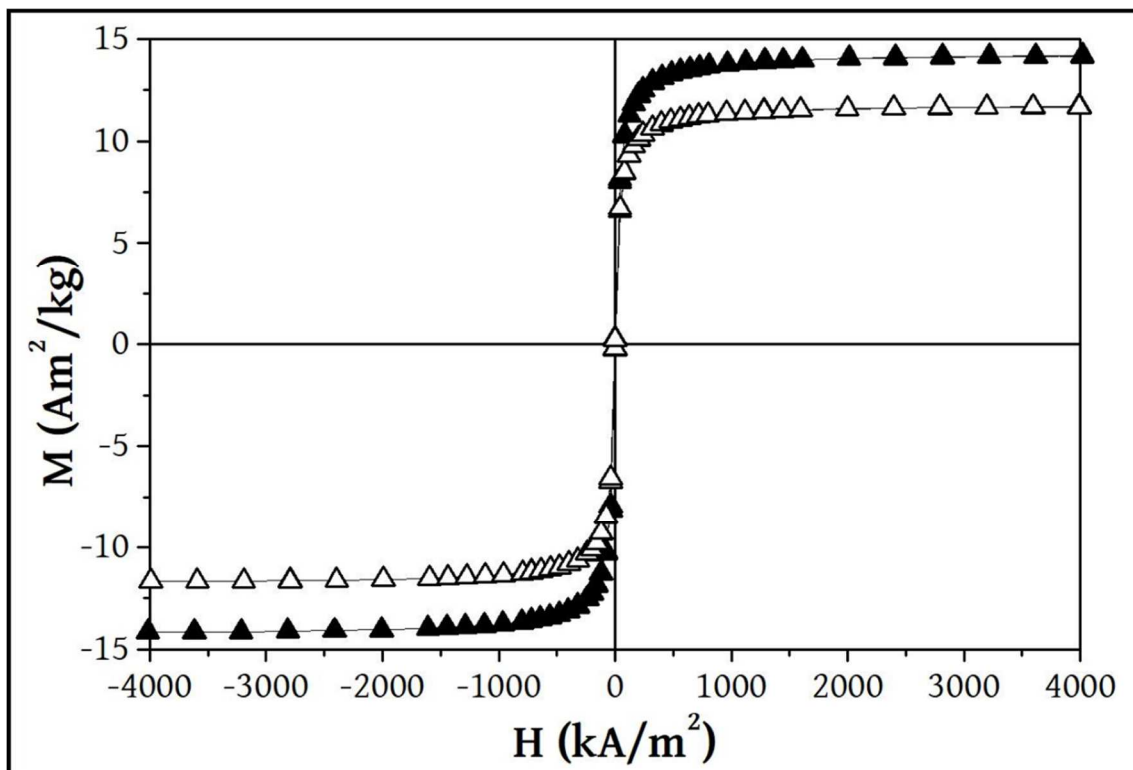


Fig. 17. Ciclo de histéresis de las nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4)/poli(ϵ -caprolactona) (PCL) y ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$)/quitosano (CS). Curva de histéresis resultante para las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ (\blacktriangle) y $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ (\triangle).

Tabla 5. Propiedades magnéticas de los nanocompuestos de magnetita (Fe₃O₄)/poli(ε-caprolactona) (PCL) y (Fe₃O₄/PCL)/quitosano (CS).

Nanopartículas	Susceptibilidad inicial × 10 ⁻³ (m ³ /kg)	Magnetización de saturación en masa (Am ² /kg)
Fe ₃ O ₄ /PCL	0.189 ± 0.032	13.74 ± 0.97
(Fe ₃ O ₄ /PCL)/CS	0.156 ± 0.026	11.34 ± 0.81

El adecuado comportamiento magnético de las NPs de Fe₃O₄/PCL y (Fe₃O₄/PCL)/CS se encuentra ilustrado en las figuras X y X, respectivamente. La atracción completa de ambos nanocompuestos se produce ante la aplicación de un campo magnético de 0.4 T en 40 s y 120 s para las NPs de Fe₃O₄/PCL y (Fe₃O₄/PCL)/CS, respectivamente (fig 18a-c y fig 19a-d). La evaluación de la respuesta magnética *in vitro* a nivel microscópico de las dispersiones de los nanocompuestos presentaba un aspecto homogéneo cuando no era sometido a ningún estímulo. A pesar de que no se podían visualizar las partículas de forma individual, cuando un gradiente magnético era colocado en los laterales del portaobjetos donde se habían depositado las muestras se podía observar la formación de agregados en forma de cadenas paralelas a la dirección de éste (fig. 18d-g y 19e-h). Este comportamiento puede explicarse si se tiene en cuenta la mayor importancia de las interacciones magnéticas en comparación con las interacciones coloidales de tipo DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbook; interacciones electrostáticas tipo van der Waals y de hidratación o ácido-base) que se producen entre las partículas de Fe₃O₄ a pesar del recubrimiento con PCL o con PCL y CS (108). Teniendo en consideración los resultados obtenidos se podría señalar el potencial uso de las NPs de Fe₃O₄/PCL y (Fe₃O₄/PCL)/CS como agentes capaces de llevar a cabo un transporte específico a la diana seleccionada cuando se aplica un gradiente magnético apropiado (59).

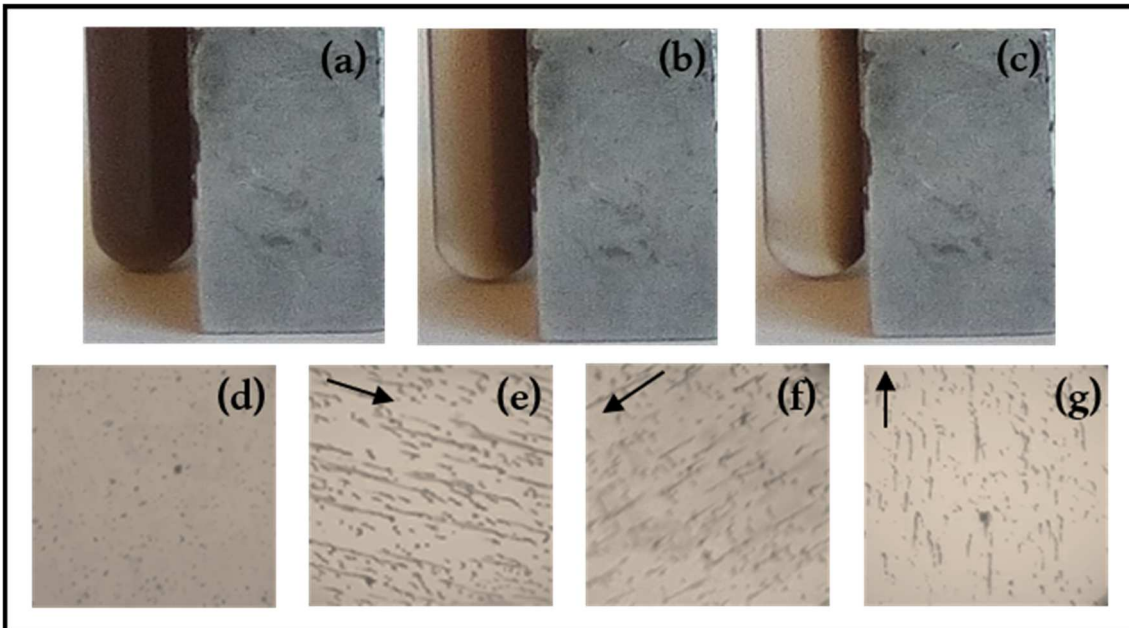


Fig. 18. Respuesta magnética *in vitro* de las nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4)/poli(ϵ -caprolactona) (PCL). Visualización macroscópica de una dispersión de nanocompuestos de Fe_3O_4 /PCL sometida a la presencia de un campo magnético (0.4 T) a tiempo 0 (a), 20 s (b) y 40 s y 24 h (c). Visualización microscópica de una dispersión de nanocompuestos de Fe_3O_4 /PCL sin presencia de un campo magnético (d) y ante la presencia de un campo magnético dirigido en la dirección de la flecha (e-g).

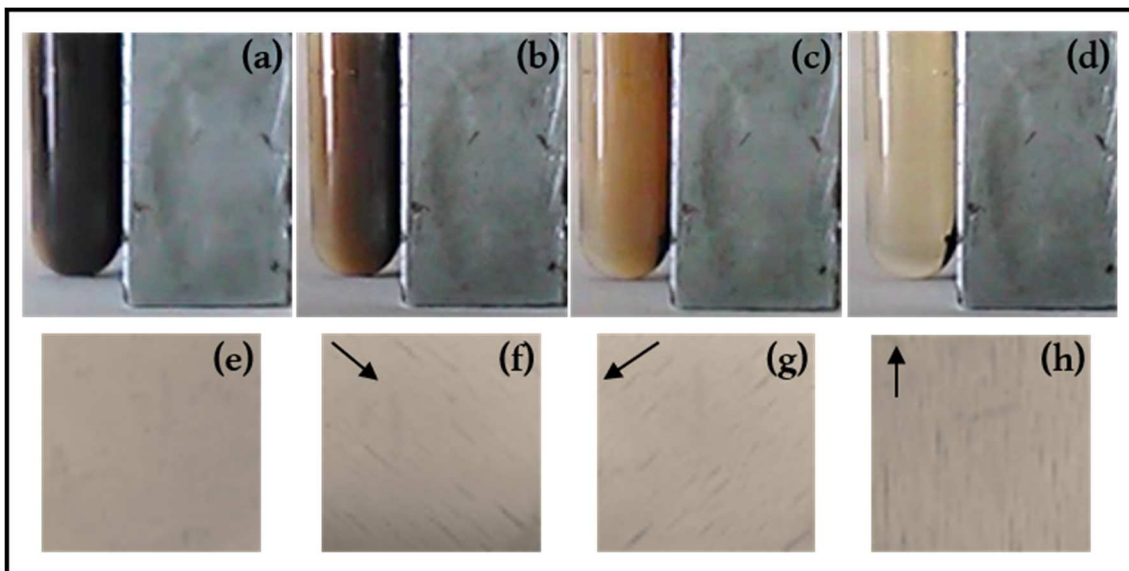


Fig. 19. Respuesta magnética *in vitro* de las nanopartículas de [magnetita (Fe_3O_4)/poli(ϵ -caprolactona) (PCL)]/quitosano (CS). Visualización macroscópica de una dispersión de nanocompuestos de (Fe_3O_4 /PCL)/CS sometida a la presencia de un campo magnético (0.4 T) a tiempo 0 (a), 20 s (b), 60 s (c) y 120 s y 24 h (d). Visualización microscópica de una dispersión de nanocompuestos de Fe_3O_4 /PCL sin presencia de un campo magnético (e) y ante la presencia de un campo magnético dirigido en la dirección de la flecha (f-h).

Capítulo 3

Nanotoxicidad

3.1. Introducción

La Nanotoxicología es la ciencia que estudia la interacción de los nanomateriales con los sistemas biológicos haciendo especial hincapié en la relación entre las propiedades fisicoquímicas de las nanoestructuras con la inducción de efectos tóxicos en organismos vivos. Esto se debe a que los materiales a escala nanométrica presentan una elevada relación área superficial/volumen. De ahí que los nanomateriales tengan unas propiedades fisicoquímicas distintas y, en ocasiones exclusivas, en comparación con los materiales de mayor tamaño. Esta es la razón por la que pueden ser ampliamente aplicados, por ejemplo, en Medicina. Sin embargo, esto también determina que los nanomateriales presenten una mayor capacidad de interacción con moléculas de su entorno lo cual podría desencadenar efectos tóxicos en los organismos vivos (109,110). Por este motivo, es imprescindible realizar una evaluación toxicológica amplia para asegurar la biocompatibilidad tanto de los propios nanomateriales como la de sus metabolitos.

3.1.1 Toxicidad de Nanomateriales

3.1.1.1. Toxicidad molecular

Una vez administradas, las NPs interactúan instantáneamente con las moléculas del entorno biológico en el que se encuentran. El resultado de estas interacciones es la adsorción superficial mayoritariamente de proteínas, generando una cubierta sobre las NPs conocida como corona proteica (19,20,111–113). La estructura de la corona proteica es de alta complejidad debido a la enorme biodiversidad de proteínas que la componen pudiendo contener más de 100 tipos diferentes (114). Estudios recientes han demostrado que las características fisicoquímicas de las NPs como el tamaño, la forma o la carga tienen una gran influencia en su composición y densidad (115). Por ejemplo, Pustulka y cols. estudian las características de la corona proteica resultante de la incubación de NPs proteicas de albúmina y ovoalbúmina con diferente grado de hidrofobicidad y carga eléctrica superficial en suero fetal bovino. Sus resultados apuntan a que estas características fisicoquímicas van a afectar a la composición y masa de la corona proteica formada (116). Otra característica fisicoquímica que también parece afectar a las características de la corona proteica y, en especial, a su densidad, es el grado de porosidad de determinadas NPs como las NPs de sílice mesoporosas (117).

Se ha visto que también las características del suero donde se encuentren las NPs van a ser importantes (118). De esta forma, pueden existir ciertas diferencias en función del estado fisiopatológico del paciente.

Una vez establecida la corona proteica en la superficie de las NPs, las propiedades fisicoquímicas del complejo resultante pueden sufrir modificaciones drásticas (62,119). Se ha visto como, la adsorción proteica puede influenciar negativamente a la estabilidad coloidal y formar agregados. También pueden producirse modificaciones en la carga eléctrica superficial y otras propiedades fisicoquímicas. Estos cambios repercutirán en el perfil farmacocinético de las NPs (115,120).

Cuando las biomoléculas endógenas se adhieren a la superficie de las NPs pueden sufrir alteraciones estructurales. Si los cambios conformacionales experimentados son lo suficientemente grandes, la funcionalidad de la biomolécula podría verse afectada negativamente y, con ella, determinados mecanismos fisiológicos. Esta desestructuración ha sido observada principalmente en el fibrinógeno. Deng y cols. estudiaron la cantidad de esta proteína plasmática que quedaba adherida sobre la superficie de NPs de oro recubiertas con ácido poliacrílico de tamaño 5 y 10 nm y con una carga superficial negativa. Los resultados mostraron como, en ambos casos, la corona proteica presentaba fibrinógeno. Sin embargo, solo las NPs de 5 nm parecían afectar lo suficiente a la conformación del fibrinógeno como para inducir una respuesta inflamatoria (121).

Si bien la corona proteica generada sobre NPs con determinadas características fisicoquímicas puede inducir problemas en determinadas estructuras proteicas, en líneas generales aumenta el perfil de seguridad de las NPs. Se ha establecido que, a medida que aumenta densidad y la rapidez de formación de la corona proteica sobre la superficie de las NPs, se reducen los efectos tóxicos al reducirse las interacciones con otras biomoléculas. Por ejemplo, los complejos resultantes suelen mitigar los efectos sobre las proteínas de las membranas celulares y prevenir la activación plaquetaria y la hemólisis inducida por NPs (26,122).

3.1.1.2. Toxicidad celular

Hasta ahora, la principal causa de toxicidad celular inducida por nanosistemas se debe al aumento de generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y su relación con múltiples patologías como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas o

enfermedades inflamatorias. De esta forma, es frecuente observar ensayos dirigidos a determinar la citotoxicidad inducida por el aumento de ROS, sobre todo en la evaluación de NPs inorgánicas (110,123).

3.1.1.3. Toxicidad tisular e inmunogenicidad

La toxicidad a nivel tisular puede ser provocada como consecuencia de la extensión de daños generados a nivel molecular y/o celulares. Suele estar determinado por la cantidad de NPs que llegan a un determinado órgano. En este sentido, será necesario la determinación de una dosis segura. Alguno de los órganos expuestos a una mayor acumulación de los nanomateriales son el hígado y el riñón en el caso de la vía de administración intravenosa. Parte de las proteínas que se van a adherir a la superficie de las NPs son opsoninas de tipo inmunoglobulinas. La función de las inmunoglobulinas será facilitar el reconocimiento de las NPs por parte de las células del SFM y su posterior aclaramiento plásmático y traslado a los órganos mencionados de forma mayoritaria (26,112). Por otro lado, también hay opsoninas que son proteínas del sistema complemento que lo activan induciendo una respuesta inmune. Recientemente se ha identificado la interacción de NPs con receptores de tipo Toll involucrados en la regulación de células presentadoras de antígenos. Esta vía puede inducir inmunogenicidad de forma independiente o contribuir y generar sinergia con la activación del sistema complemento (124–127). La toxicidad inmunológica se puede manifestar en forma de reacciones de hipersensibilidad. Se determinó una potencial relación entre la activación del sistema complemento y las reacciones de hipersensibilidad sufridas por pacientes con la primera dosis de liposomas de doxorubicina pegilados. Esta hipersensibilidad podía manifestarse con la aparición de reacciones cutáneas, hipotensión, hipertensión o problemas respiratorios. A pesar de esto, se vió que la activación del complemento no siempre inducía síntomas clínicos (125).

3.1.1.4. Evaluación de Nanotoxicidad

Hay disponibles una gran cantidad de protocolos *in vitro* que pueden ser utilizados para determinar los daños inducidos por efectos tóxicos a diferentes niveles. Estos podrán ser específicos del tipo de nanosistema (por ejemplo, orgánico o inorgánico), de la vía de administración o del tipo de aplicación. En la mayoría de los casos, los ensayos están basados en la evaluación de otro tipo de medicamentos que, con los pertinentes ajustes,

pueden servir en la evaluación de medicamentos constituidos por NPs. A pesar de esto, el desarrollo de ensayos de toxicidad con mayor capacidad de predicción y, que permitan una mejor correlación con posteriores estudios *in vivo*, es el principal objetivo de investigación en el área de Nanotoxicidad. En concreto, establecer la relación entre las características fisicoquímicas de las NPs y las interacciones con las biomoléculas (corona proteica) parece ser clave y está siendo ampliamente investigado (26,110,119).

Considerando el potencial y el crecimiento de la Nanotecnología, el Nanotechnology Characterization Laboratory, que combina los esfuerzos de la FDA, National Cancer Institute y National Institute of Standards and Technology propone una cascada de ensayos para la determinación de la posible aplicación clínica de medicamentos basados en NPs (128). Además, tanto la FDA como la EMA han desarrollado guías de referencia basadas en la experiencia adquirida en los medicamentos nanotecnológicos que han conseguido pasar a ensayos clínicos e, incluso, superarlos (129,130).

3.1.2. Toxicidad de las NPs de Óxido de Hierro

Las NPs de óxido de hierro como la Fe_3O_4 y la $\gamma-Fe_2O_3$, presentan una amplia variedad de aplicaciones en Biomedicina. El éxito de su aplicación en terapia, diagnóstico e incluso como agentes teranósticos se debe a su perfil biocompatible. Constituyen uno de los nanomateriales inorgánicos más seguros para su aplicación en Medicina (36,43,110,131).

El hierro es un nutriente esencial que se encuentra en el torrente circulatorio unido a la transferrina en forma de ión férrico (Fe^{3+}). La transferrina será la encargada de transportar el hierro a la médula ósea donde pasa a formar parte del grupo hemo de la hemoglobina de los eritrocitos en forma de ión ferroso (Fe^{2+}) (fig. 20 ab). También la transferrina será la encargada de la llegada de este elemento al resto de tejidos donde también es requerido. En los tejidos donde se requiere una alta cantidad de oxígeno como, por ejemplo, el tejido muscular cardíaco, éste va a ser almacenado en la mioglobina que también contiene un grupo hemo constituido por Fe^{2+} (fig. 20 a-c). Cuando los eritrocitos mueren, los macrófagos del SFM serán los encargados de realizar la aclaración plasmática de los restos celulares transportándolos mayoritariamente al hígado (fig. 20c). En estos órganos, el hierro será almacenado en forma de ferritina, para después ser transferido de nuevo a la transferrina. La ferritina puede aglomerarse y formar hemosiderina que constituye una reserva de hierro donde la transferencia va a

ser mucho más lenta. A pesar de que no existe una vía de excreción regulada, el hierro se pierde continuamente por la eliminación de células de la mucosa intestinal y de la piel o durante el sangrado y transpiración (fig. 20d). Estas ligeras pérdidas deben de ser compensadas con la absorción en el tracto gastrointestinal del hierro de la dieta (fig. 20). A nivel celular, la captación de hierro determinará su entrada en los endosomas celulares donde se producirá la reducción del Fe^{3+} a Fe^{2+} . En el citosol, la mayor parte del hierro se va a encontrar almacenado en forma de ferritina aunque también hay una baja proporción que se encontrará libre de forma transitoria. También puede encontrarse formando parte proteínas de especial relevancia en el metabolismo celular (132-134).

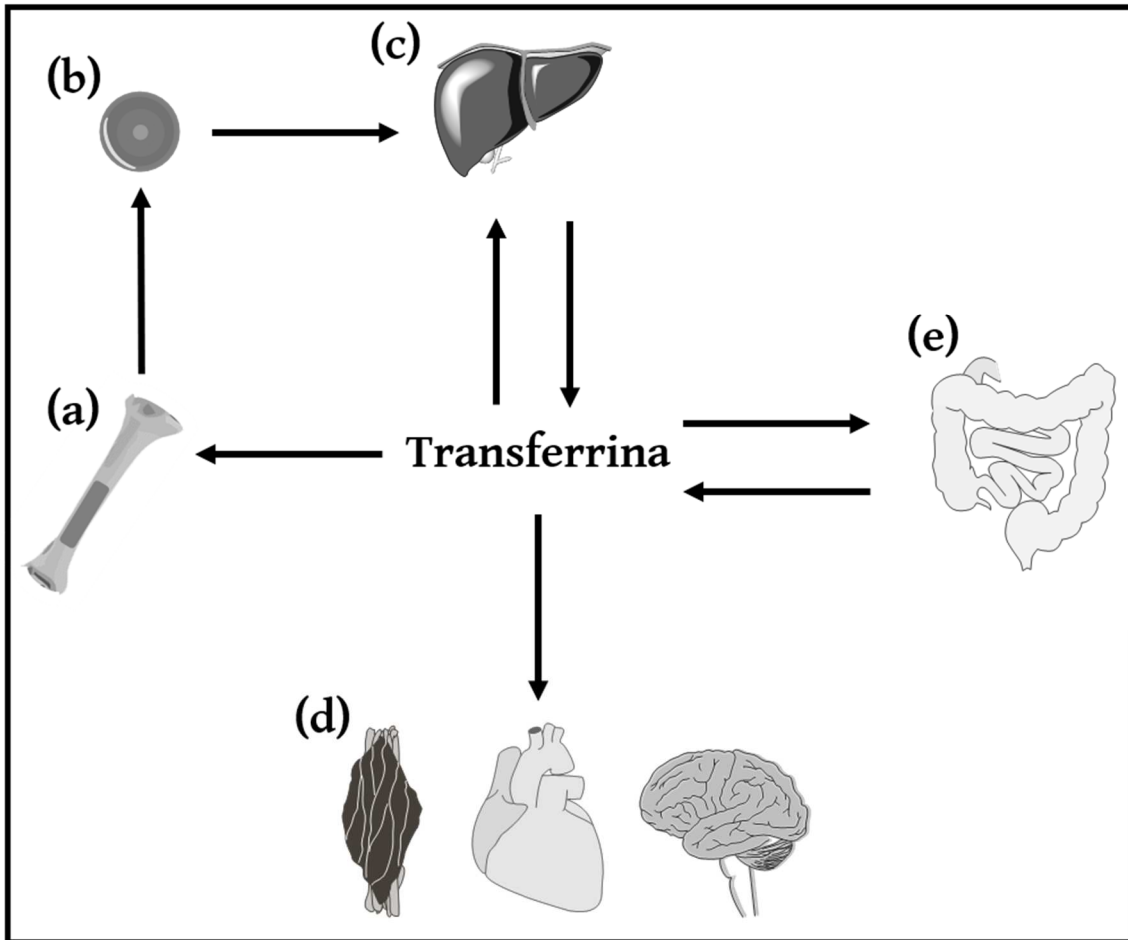


Fig. 20. Esquema de Biodistribución del hierro en el organismo. El hierro va a ser transportado por la transferrina hacia la médula ósea (a) para formar parte de los eritrocitos generados (b) que finalmente morirán. Sus restos llegarán al hígado principalmente. El hígado va a contener las proteínas de reserva del hierro que podrán pasar a la transferrina cuando sea requerido (c). La transferrina también transportará este elemento al resto de partes del cuerpo donde se requiere (d). La mayor parte del hierro es reciclado exceptuando las pérdidas cuando, por ejemplo, se eliminan las células de la mucosa intestinal. El hierro será adquirido con la dieta y absorbido en el tracto gastrointestinal (e).

La homeostasis del hierro está intensamente regulada por mecanismos específicos a diferentes niveles. A nivel celular, la desregulación del hierro conlleva daños celulares que pueden llegar a culminar en un proceso de muerte programada específico conocido como ferroptosis (135). Cuando existe una homeostasis de hierro a nivel celular, las ROS superóxido, O_2^- y peróxido de hidrógeno, H_2O_2 obtenidas en múltiples procesos celulares son detoxificadas por los sistemas antioxidantes de la célula. Por el contrario, su excesivo aumento intracelular hace que se completen las proteínas de reserva y, en consecuencia, aumente su concentración citoplasmática en forma libre. Es en esta situación cuando tiene lugar la reacción de Fenton. La reacción de Fenton está

catalizada por el hierro y consiste en la transformación de superóxido, O_2^- y peróxido de hidrógeno, H_2O_2 en otro ROS altamente reactivo, el radical hidroxilo, OH (136–138). Además, se ha visto como en estas condiciones de alto contenido de hierro la concentración celular de la especie reactiva de nitrógeno (RNS) óxido nítrico, NO también se ve aumentada (139). El aumento de ROS y RNS produce lo que se conoce como estrés oxidativo y nitrosidativo, respectivamente. Ambas condiciones se han visto asociadas al daño proteico y peroxidación lipídica resultante. Estos mecanismos de citotoxicidad son los que finalmente conducirán a la ferroptosis (134) (fig. 21).

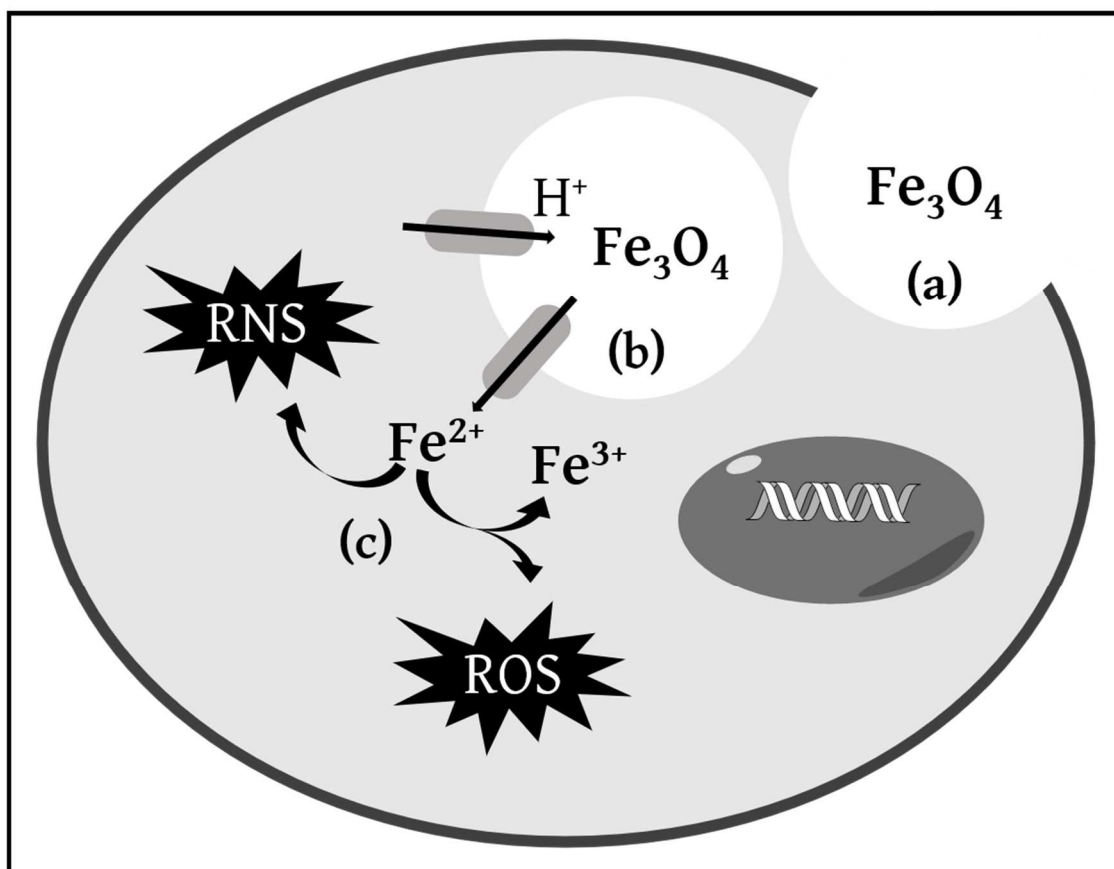


Fig. 21. Mecanismo de ferroptosis. La entrada de magnetita (Fe_3O_4) se producirá mediante su internalización en el endosoma (a), donde tendrá lugar su degradación y consecuente liberación de hierro (b). El hierro será trasladado al citoplasma en forma de Fe^{2+} donde va a contribuir a la formación de ROS (reacción de Fenton) y de RNS (c).

A nivel terapéutico es preferible una muerte celular programada como la ferroptosis por sus limitadas posibilidades de desencadenar efectos nocivos en el resto de células (140). Si a este hecho se le añaden las posibilidades que ofrece la Nanomedicina para el direccionamiento selectivo de agentes terapéuticos (23,141,142), el resultado puede ser

un nuevo enfoque terapéutico. Dicha propuesta estaría basada en el mecanismo citotóxico del hierro en células patológicas como las tumorales (134,143,144).

Otro de los posibles efectos tóxicos producidos por las NPs magnéticas de óxido de hierro se debe a su posible aglomeración en los vasos sanguíneos de bajo calibre como los capilares. De esta forma, puede generar trombos con las severas consecuencias patológicas que éstos conllevan (36,145).

El diseño de las NPs de óxido de hierro para evitar la inducción de efectos tóxicos tendrá que ser optimizado para asegurar una insuficiente captación por parte de las células sanas y evitar la aglomeración en los vasos sanguíneos. La dosis es, probablemente, el parámetro más importante a determinar para asegurar la biocompatibilidad de este tipo de nanosistemas (146,147). Pese a que se van a encontrar ciertas diferencias en función del diseño del coloide magnético, las dosis utilizadas actualmente en la clínica parecen ser adecuadas para asegurar tanto la seguridad como la eficacia de este tipo de nanosistemas (148–150).

3.1.3. Toxicidad de las nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) y quitosano

Tanto la PCL como el CS son polímeros orgánicos con demostrada biocompatibilidad en clínica. Actualmente, el uso de la PCL en suturas quirúrgicas bioabsorbibles está aprobado por la FDA. En el caso del CS, es utilizado en clínica en apósitos de heridas y en regeneración tisular. Presentan un gran potencial en su aplicación en Biomedicina como nanosistemas demostrados en numerosos estudios tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, poseen una prácticamente nula toxicidad por su naturaleza química y los numerosos mecanismos endógenos que llevan a cabo su degradación. Todo esto conduce a pensar su inminente introducción en la clínica como nanomateriales de uso seguro (151–153).

3.2. Metodología y resultados

3.2.1. Ensayo de proliferación celular

La citotoxicidad *in vitro* de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ se evaluó en una línea celular no tumoral y otra tumoral. La línea celular normal seleccionada fue la línea fibroblastos de colon humano normal CCD-18 que deriva de la biopsia de colon de una niña de etnia africana de 2.5 meses (154). En el caso de la línea celular tumoral se utilizó

la línea epitelial de carcinoma de colon humano T-84, derivada de una metástasis pulmonar de un carcinoma de colon de un hombre de 72 años (155). Ambas líneas celulares fueron suministradas por el Banco de Células del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, España.

El medio de cultivo usado fue el medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS, Lonza Group AG, Suiza), 14 mM de bicarbonato sódico, 15 mM de ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico (HEPES), 2 mM de L-glutamina (ThermoFisher Scientific, España), 40 µg/mL de gentamicina y 500 µg/mL de ampicilina (Antibióticos de León S.L.U., España). En primer lugar, se realizó el conteo celular utilizando una cámara de Neubauer. Las células se sembraron en cultivos monocapa en una placa de 96 pocillos con una densidad de 6×10^3 células/pocillo. A las 24 h el medio de cultivo fue reemplazado por medio de cultivo fresco con los distintos tipos de NPs en un amplio rango de concentración (0.05 a 100 µg/mL). Se mantuvieron a 37.0 ± 0.5 °C y una atmósfera con un 5% de riqueza de CO₂ (Incubador CO₂ con camisa de agua Autoflow UN-4750; NuAire, Estados Unidos). Finalmente, se analizó la viabilidad celular a las 48 y 72 h con el ensayo colorimétrico de MTT ($n = 3$). Para ello, se adicionó 20 µL de la solución de MTT a cada pocillo (5 mg/mL en el medio de cultivo celular). Tras la incubación durante 4 h a 37.0 ± 0.5 °C, se retiró el medio de cultivo y los cristales de formazán fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO). La densidad óptica (DO) resultante fue medida con un colorímetro Titertek multiscan (Flow Laboratories, Estados Unidos) a 570 y 690 nm. El control estaba constituido por la solución de PBS (tampón fosfato salino o *buffer fosfato saline*) sin NPs y se utilizó para calcular la viabilidad celular relativa (%) con la siguiente ecuación (Ec. 14):

$$\text{Viabilidad celular relativa (\%)} = \left[\frac{\text{DO células tratadas}}{\text{OD células no tratadas (control)}} \times 100 \right] \quad (14)$$

Las Fe₃O₄/PCL y (Fe₃O₄/PCL)/CS no indujeron toxicidad ni en la línea celular normal (CCD-18) ni en la tumoral (T-84). La alta viabilidad celular de ambas líneas se mantuvo a ambos tiempos de evaluación (48 y 72 h) y en el rango completo de concentración ensayado (fig. 22). Los ligeros aumentos de viabilidad celular relativa respecto al control en presencia de los nanosistemas estudiados parece deberse a la capacidad de las células de seguir creciendo en presencia de éstos (156,157).

Previos estudios obtuvieron resultados similares de viabilidad celular relativa cuando utilizaban nanosistemas que contenían PCL en un rango de concentración similar y en las mismas líneas celulares (77). En el caso de Fe_3O_4 , estudios anteriores muestran también una baja influencia sobre la proliferación de estas líneas celulares cuando son embebidos en nanovesículas biocompatibles como los nanoliposomas (73). Pese a que la citotoxicidad del CS no ha sido evaluada en las mismas líneas celulares, múltiples estudios señalan su nula toxicidad por lo que su presencia en el nanocompuesto no va a producir ninguna alteración (158,159)(fig. 22bc).

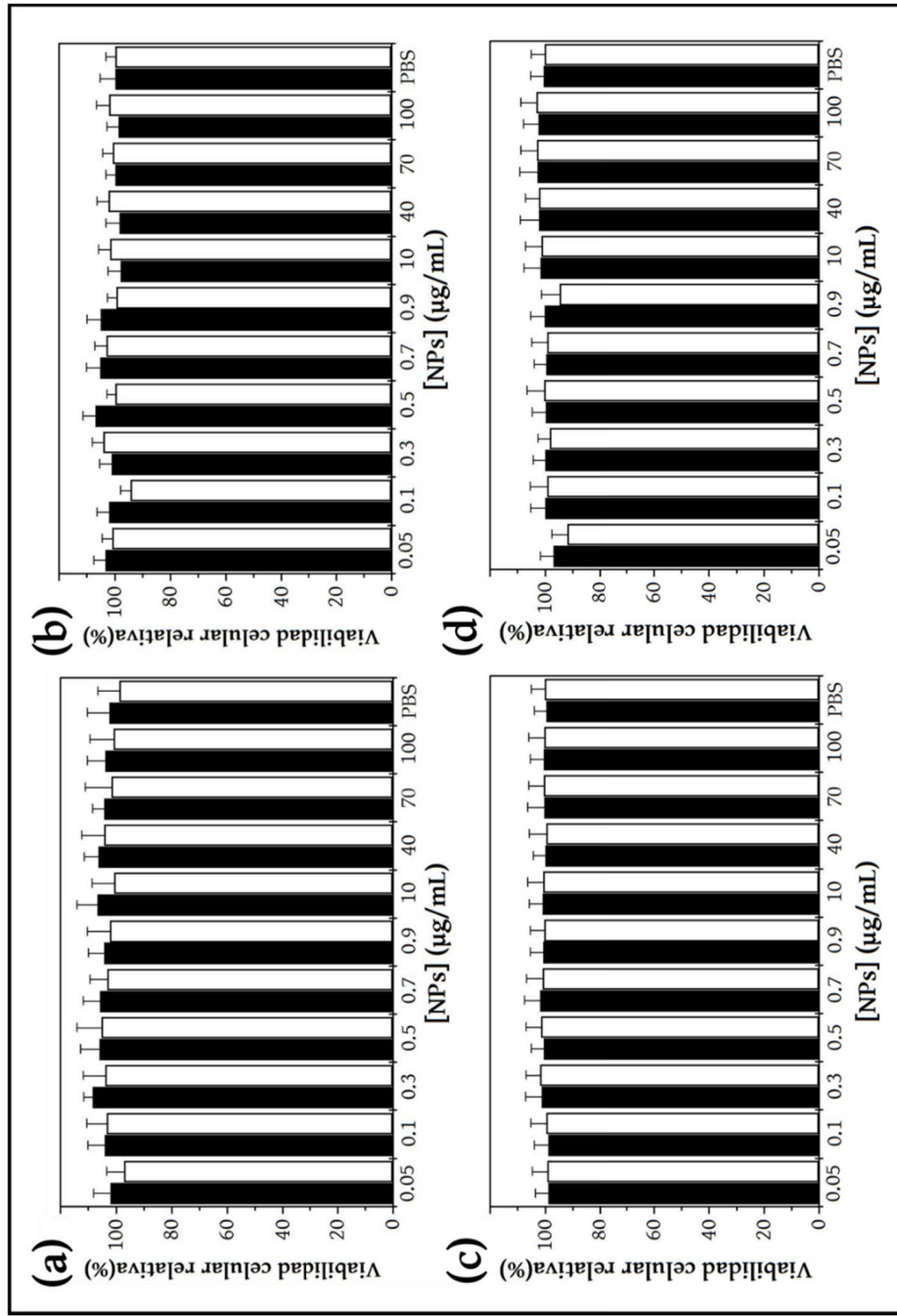


Fig. 22. Citotoxicidad *in vitro* de magnetita (Fe_3O_4)/poli(ϵ -caprolactona) (PCL) y (Fe_3O_4 /PCL)/quitosano (CS). Determinación de la viabilidad celular relativa (%) a las 48 h (columnas blancas) y 72 h (columnas negras) en un amplio rango de concentración (0.05 – 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) utilizando como control una solución de PBS (sin NPs) ($n = 3$). a) Citotoxicidad de Fe_3O_4 /PCL en CCD-18, b) citotoxicidad de las NPs de Fe_3O_4 /PCL en T-84, c) citotoxicidad de las NPs de (Fe_3O_4 /PCL)/CS en CCD-18 y d) citotoxicidad de las NPs de (Fe_3O_4 /PCL)/CS en T-84.

3.2.2. Evaluación de hemocompatibilidad

El perfil de hemocompatibilidad de las NPs de Fe₃O₄/PCL y (Fe₃O₄/PCL)/CS fue evaluado mediante una batería de ensayos constituida por la determinación de la hemólisis, la activación de plaquetas, la activación del sistema complemento y el tiempo de recalcificación plasmática siguiendo protocolos ampliamente validados para este fin (74,111,160–164). Se utilizaron muestras de sangre de tres voluntarias sanas (de 24 a 45 años) anticoaguladas con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o citrato sódico.

3.2.2.1. Hemólisis

Para examinar la posible hemólisis inducida por los distintos tipos de NPs se utilizó sangre coagulada con EDTA. La muestra de sangre fue sometida a dos ciclos de centrifugación (5 min a 2000 rpm). El sobrenadante constituido por plasma, leucocitos y plaquetas fue sustituido por una solución de NaCl 150 mM. El sedimento eritrocitario resultante fue diluido en una solución 1:10 de tampón fosfato salino (PBS; Sigma-Aldrich, España) e incubado con cada tipo de NP (2×10^8 eritrocitos/mL y 40 µg/mL de NPs) bajo agitación mecánica suave (200 rpm) a 37 ± 0.5 °C. Los grupos control utilizados fueron una solución de PBS y otra de Tritón X-100 (1%, p/v; Sigma-Aldrich, España) como control negativo y positivo para la lisis eritrocitaria, respectivamente. Para la determinación de la hemólisis, se midió la DO de la hemoglobina libre presente en el sobrenadante resultante de la centrifugación de la muestra (5 min a 2000 rpm) tomada tras 2, 4, 8 y 24 h de incubación ($n = 4$). Finalmente, el cálculo de la hemólisis (%) se realizó utilizando la siguiente ecuación (Ec. 15):

$$\% \text{ Hemólisis} = [(\text{DO muestra} - \text{DO control negativo}) / \text{DO control positivo}] \times 100 \quad (15)$$

3.2.2.2. Activación de plaquetas

El ensayo de activación de plaquetas fue realizado mediante la determinación de los niveles de sP-selectina en plasma utilizando un kit *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* o ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA; R&D Systems, Estados Unidos). La sangre anticoagulada con citrato sódico fue sometida a un ciclo de centrifugación (15 min a 950 rpm). El plasma rico en plaquetas (PRP) fue entonces obtenido de la dilución del sobrenadante con 1% de oxalato de amonio 1:100 (6×10^8 plaquetas/mL) e incubado con 40 mg de NPs durante 1h a 37.0 ± 0.5 °C. Para la determinación de los niveles de sP-

selectina la muestra fue previamente centrifugada (10 min a 4700 rpm) para retirar las NPs. El plasma pobre en plaquetas (PPP) se obtuvo de la sangre restante sometida a otro ciclo de centrifugación (5 min a 3000 rpm) ($n = 4$). Se utilizó PBS como grupo control negativo y PPP y PRP como grupos control positivos.

3.2.2.3. Activación del sistema complemento

El análisis de la activación del sistema complemento fue realizado mediante la determinación de la escisión del componente C3a. En concreto, éste fue determinado de forma indirecta mediante la cuantificación de C3a-desArg, la forma resultante más estable de la escisión de la proteína C3a. Para ello, se utilizó un kit de ELISA para la determinación de C3a humano (BD OptEIA™, Estados Unidos). La sangre anticoagulada con citrato sódico se incubó con cada tipo de NP (40 µg/mL) durante 1 h. Entonces, la muestra se centrifugó (5 min a 2000 rpm) para obtener el plasma a analizar ($n = 4$). El grupo control negativo seleccionado fue una solución de PBS.

3.2.2.4. Tiempo de recalcificación plasmática

El tiempo de recalcificación plasmática (TRP) fue determinado mediante el método de Howell (164). La sangre anticoagulada con citrato se centrifugó a 8 ± 0.5 °C (20 minutos a 3000) para obtener el PPP. 0.1 mL de PPP y 40 mg de NPs dispersadas en PBS se incubaron a 37 ± 0.5 °C en una placa de 96 pocillos durante 5 minutos. Entonces, se adicionó una solución de 0.1 mL de CaCl_2 0.025 M ($n = 4$). La coagulación se controló utilizando un alambre de acero inoxidable en forma de gancho recubierto con silicona. El TRP fue considerado como el tiempo en el que se detecta la formación de la primera hebra de fibrina.

Tabla 6. Hemocompatibilidad *in vitro* de los nanocompuestos de magnetita (Fe₃O₄/poli(ϵ -caprolactona) (PCL) y (Fe₃O₄/PCL)/quitosano (CS). La evaluación realizada incluye la determinación de la hemólisis (%), activación plaquetaria (liberación de P-selectina soluble, ng/mL), activación del sistema complemento (liberación de C3a: C3a desArg, ng/mL), tiempo de recalcificación plasmática (T_{1/2 max}, min) (n = 4).

	Hemólisis (%)			sP-selectina (ng/mL)	C3a desArg (ng/mL)	T _{1/2 max} (min)	
	Tiempo de incubación						
	2 h	4 h	8 h				24 h
NPs de (Fe ₃ O ₄ /PCL)	2.0 ± 0.6	2.1 ± 0.4	2.3 ± 0.2	1.9 ± 0.6	111 ± 6	306 ± 7	13.1 ± 1.6
NPs de (Fe ₃ O ₄ /PCL)/CS	2.4 ± 0.3	2.5 ± 0.6	2.1 ± 0.6	2.5 ± 0.4	111 ± 6	309 ± 8	13.1 ± 0.6
Control (PBS)	0	0	0	0	101 ± 4	295 ± 7	11.6 ± 1.3

La vía de administración parenteral es la más utilizada en Nanomedicina. La administración de los nanocompuestos va a suponer el contacto con la sangre lo que conducirá a la interacción con los componentes de la sangre y una posible hemotoxicidad.

Debido a que son las células más numerosas de la sangre y presentan funciones esenciales para el correcto funcionamiento del organismo, será esencial determinar si las NPs van a inducir la lisis de los eritrocitos. Por estas razones, la determinación *in vitro* de la hemólisis es uno de los ensayos de hemocompatibilidad más rutinarios en la caracterización de NPs con potencial aplicación en Biomedicina (41,81,165–168). La evaluación de los nanocompuestos de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ presentaron una alta hemocompatibilidad (hemólisis <5%) según el criterio internacional establecido por la ASTM (169) (tabla 6). La baja inducción de hemólisis resultante se encuentra en la línea de estudios de nanosistemas que contienen alguno de los materiales utilizados (Fe_3O_4 , PCL y Fe_3O_4) (170–173).

La agregación plaquetaria tampoco debe de ser inducida por los nanocompuestos puesto que podría conducir a la aparición de complicaciones trombóticas (174). Una vez activadas las plaquetas, hay múltiples pasos que se tienen que dar para que se produzca la agregación plaquetaria. Esto abre un amplio abanico de posibilidades para la evaluación *in vitro* de la agregación plaquetaria (175). La determinación de la liberación de la proteína soluble P-selectina es uno de los más escogidos para la evaluación de los sistemas nanoparticulados (39,160,176). Debido a que los valores mostrados por las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ presentaban diferencias insignificativas con el grupo control, *a priori*, no se espera una mayor agregación plaquetaria debido a su administración (tabla 6).

Una de los mecanismos que determinan la inmunogenicidad de las NPs es la activación del sistema complemento mediante la adhesión de proteínas del sistema complemento sobre la superficie de las NPs formando parte de la corona proteica. Por tanto, es de especial relevancia informar si las NPs con fines farmacéuticos conducen a la reacciones de hipersensibilidad inducidas por la activación del complemento. Con este propósito, se analizó la liberación de la anafilotoxina C3a para las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$. La similitud de los resultados obtenidos para ambos nanocompuestos

con el grupo control conducen a pensar que no existe una activación anormal del complemento (tabla 6).

Por último, se analizaron la posibilidad de que las NPs interfirieran con el curso normal del fenómeno de coagulación mediante el estudio de la recalcificación plasmática. En concreto, se midió el tiempo que tardaba en formarse los coágulos en sangre recalcificada incubada con NPs. En ninguno de los nanocompuestos ensayados (NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$) se encontraron anomalías en la coagulación siendo estos resultados ya reportados anteriormente para otras nanoplataformas magnéticas (177,178).

3.2.3. Estudio de viabilidad y morfología celular

La siguiente evaluación de Nanotoxicidad de los nanocompuestos finales de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ fue realizada en la Unidad de Nanoimagen del Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología BIONAND bajo la supervisión de la Dr. María Luisa García Martín.

Los posibles efectos en la morfología y la viabilidad inducidos por las NPs finales de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ fueron investigadas *in vitro* mediante un análisis MTT y un análisis de imagen *high-content* para las en la línea celular HFF-1 de fibroblastos de prepucio normal humano derivado de dos individuos sanos suministrada por *American Type Culture Collection* (ATCC) Estados Unidos (179).

El medio de cultivo usado fue el medio DMEM suplementado con 10% de FBS, 2 mM de L-glutamina y 1 % de penicilina/estreptomicina (Gibco™, Estados Unidos). En primer lugar, se realizó el conteo celular utilizando una cámara de Neubauer. Las células se sembraron en cultivos monocapa en una placa de 96 pocillos con una densidad de 1×10^4 células/pocillo (200 μL /pocillo). Se mantuvieron a 37.0 ± 0.5 °C y una atmósfera con un 5% de riqueza de CO_2 y, tras 24 h, el medio de cultivo fue restituido con uno fresco que contenía las NPs en un rango de concentración de 0.1 a 100 μg de Fe/mL excepto los grupos control (solución de PBS sin NPs). Tras 24 h de incubación se adicionó Tritón X-100 en los controles negativos. A las 24 h se restituyó otra vez con MTT (0.5 mg/mL) y después de 2 h de incubación en las mismas condiciones, se retiró para después disolver los cristales formados de formazán en 200 μL de DMSO mediante agitación. La absorbancia de cada pocillo se obtuvo a 550 nm con un colorímetro Dynatech MR7000

(España). Los grupos control utilizados fueron PBS y Tritón X-100 (1%, p/v; Sigma-Aldrich, España) como control negativo y positivo, respectivamente. Ambos grupos control se utilizaron para calcular la viabilidad celular relativa (%) y la desviación estándar (σ) con las siguientes ecuaciones (Ec. 14 y 15):

$$RCV(\%) = \left(\frac{[Abs]_{test} - [Abs]_{Pos.Ctrl}}{[Abs]_{Neg.Ctrl} - [Abs]_{Pos.Ctrl}} \right) \times 100 \quad (14)$$

$$Error(\%) = RCV_{test} \times \sqrt{\left(\frac{[\sigma]_{test}}{[Abs]_{test}} \right)^2 + \left(\frac{[\sigma]_{control}}{[Abs]_{control}} \right)^2} \quad (15)$$

Para la evaluación de la proliferación y morfología celular mediante el análisis de imagen *high-content* se llevó a cabo la misma metodología descrita para el ensayo de MTT en la línea celular HFF-1. Tras la incubación de las NPs de (Fe₃O₄/PCL)/CS durante 24 h se adicionó el control negativo (Tritón X-100; 1%, p/v) y se dejaron 15 minutos. Después, se adicionaron los colorantes fluorescentes 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; 1:3000), calceína AM (1:10000) y yoduro TO-PRO[®]3 (1:10000) adquiridos de Sigma-Aldrich, España.

La evaluación de la viabilidad y la morfología de las células HFF-1 en presencia de las NPs de (Fe₃O₄/PCL)/CS se realizó mediante un Análisis Confocal Automatizado con tecnología *High Content Screening* utilizando un sistema de imagen Operetta CLS (Perkin Elmer, Estados Unidos) dotado con una lente objetivo 20x de magnificación, 0.45 de apertura numérica que opera en un rango de largas distancias de trabajo (*long working distance*, *LWD*). Se analizaron 5 réplicas de pocillos para cada condición con 10 campos de imágenes aleatorios capturados por pocillo. Se obtuvieron imágenes de fluorescencia para DAPI, calceína y TO-PRO-3 para cada campo más una imagen de campo claro. Los porcentajes de células muertas se obtuvieron usando el software Operetta Harmony. Éste fue ajustado para identificar la totalidad de núcleos, tanto de células vivas como muertas, con la fluorescencia del marcador DAPI mientras que el porcentaje de células muertas se determinó la fluorescencia del marcador yoduro TO-PRO[®]3 y el de células vivas se evaluó con el marcador de calceína-AM.

El DAPI es un marcador azul fluorescente con alta permeabilidad celular y especificidad de unión al ácido desoxirribonucleico (ADN). Se une a las regiones del ADN ricas en adenina-timina formando un complejo de mayor intensidad de fluorescencia. También puede formar un complejo con el ARN mediante la intercalación selectiva del dinucleótido adenina-uracilo. Éste presenta una λ más larga que la del complejo DAPI-

ADN. Además, es útil para detectar cambios nucleares propios de la apoptosis o necrosis (180).

El yoduro TO-PRO[®]3 es un marcador nuclear y cromosómico de fluorescencia roja. Se usa como contraindicación ya que es un indicador útil de células muertas. Esto se debe a que es impermeable a las células vivas ya que éstas presentan una membrana plasmática intacta. Por el contrario, van a marcar con una fluorescencia roja las células muertas debido a que éstas presentan una membrana comprometida permitiendo su internalización (181).

La calceína AM es un derivado acetoximetilado de la calceína. Si bien la calceína AM no es fluorescente, al ser internalizada en la célula las esterasas citoplasmáticas la hidrolizan dando lugar a la calceína que sí presenta una alta intensidad de fluorescencia en color verde. Puesto que las esterasas citoplasmáticas solo son activas en células vivas, es un indicador de viabilidad celular. Además, debido a que es retenida cuando la membrana plasmática está intacta también demuestra su estado (182).

El uso de marcadores fluorescentes permite la exclusión de restos de células lo que evita pasos de purificación durante la preparación de la muestra y, así, mejorar la eficiencia de la técnica. De esta forma, el sistema avanzado de imagen usado en combinación con los marcadores celulares simplifica y aumenta la velocidad y el R del recuento y la medida de la viabilidad celular.

La citotoxicidad de los nanocompuestos finales de (Fe₃O₄/PCL)/CS fue examinada con mayor profundidad mediante la investigación de la viabilidad analizada utilizando dos metodologías, el ensayo de MTT y el análisis de imagen *high-content* utilizando tres marcadores celulares, DAPI, TO-PRO[®]3 y calceína AM. Los resultados de las dos metodologías de análisis, en concordancia con los obtenidos para las líneas celulares CCD-18 y T-84, indicaban una citotoxicidad prácticamente nula en todas las concentraciones ensayadas, tal y como ya se había observado con anterioridad para LA PCL (49) y la Fe₃O₄ (123,183) que conforman a estos nanocompuestos (fig. 23).

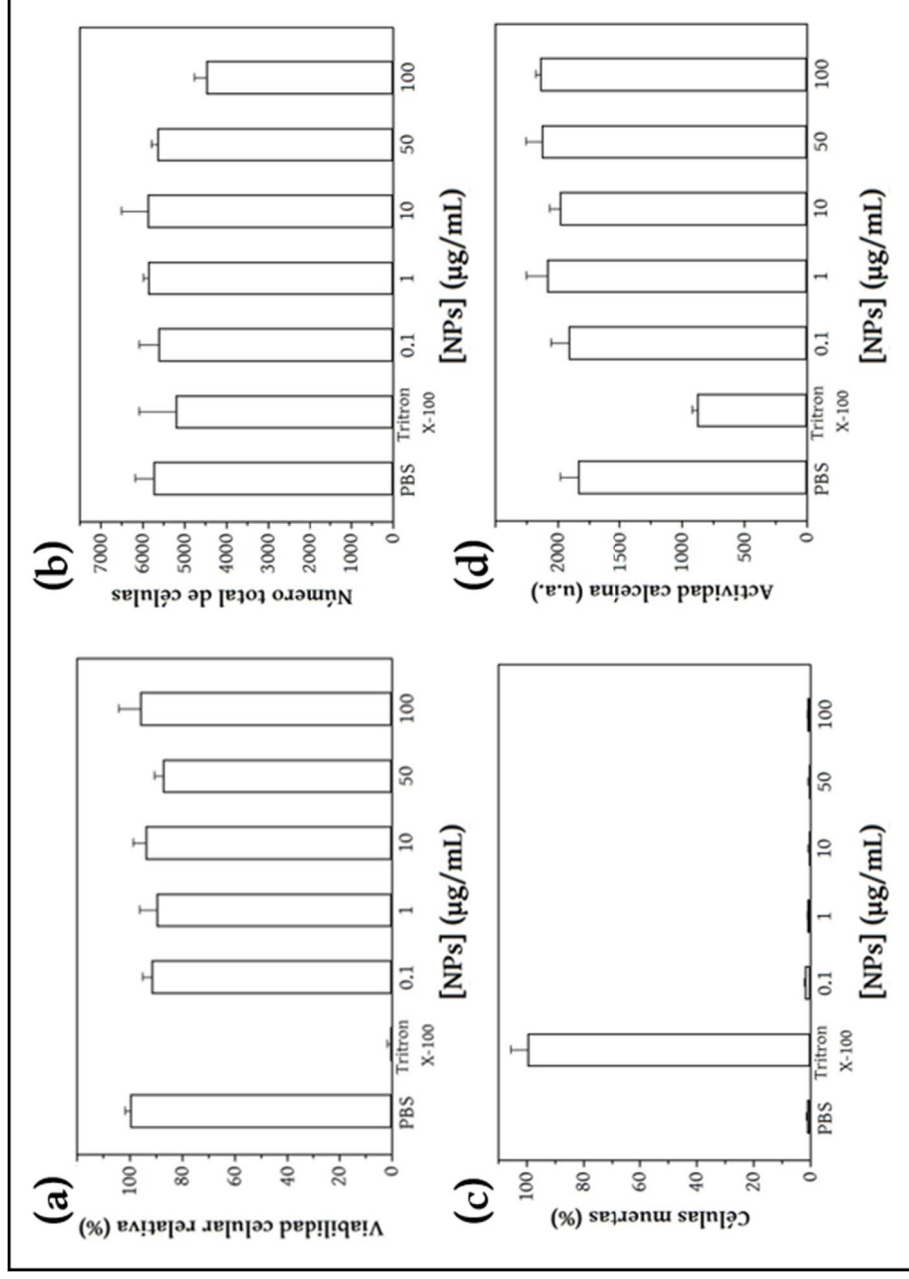


Fig.23. Citotoxicidad *in vitro* de (Fe₃O₄/PCL)/CS en HFF-1. a) Viabilidad celular relativa (%), b) número total de células, c) células muertas (%), y d) actividad calcitona (u.a.). Los valores fueron obtenidos a las 24 h de incubación. Los valores se expresaron como media \pm desviación estándar de los resultados obtenidos por triplicado. Se utilizó una solución sin NPs con PBS y Tritón X-100 para los grupos control.

Los mismos marcadores sirvieron también para investigar los posibles efectos de los nanocompuestos finales sobre la morfología de los fibroblastos HFF-1. Las células con PBS (sin NPs) constituían el grupo control negativo donde el núcleo puede ser identificado por la fluorescencia de color resultante de la formación del complejo ADN-DAPI. Además, en este control negativo los citoplasmas aparecen en verde fluorescente característico de la calceína obtenida de la hidólisis de la calceína AM (fig. 24a). Esta reacción la llevan a cabo unas enzimas celulares, las esterasas, cuya actividad indica viabilidad celular. Es por ello que, en el caso opuesto representado por el grupo control positivo (Tritón X-100), esta fluorescencia verde no aparece. Por el contrario, queda patente la fluorescencia rosácea característica del marcador TO-PRO® 3 que confirma la muerte celular debido a que éste únicamente puede interaccionar con el ADN cuando las membranas celulares están deterioradas. Aunque en menor cantidad, también se detecta fluorescencia azul del marcador nuclear DAPI (fig. 24b). Debido a la similar fluorescencia que presenta la imagen del grupo control negativo con la imagen de las células cultivadas con la máxima concentración de nanocompuestos (100 µg/mL de Fe), se deduce que tanto no se producen modificaciones sustanciales ni en la viabilidad ni en la morfología de las células (fig. 24c).

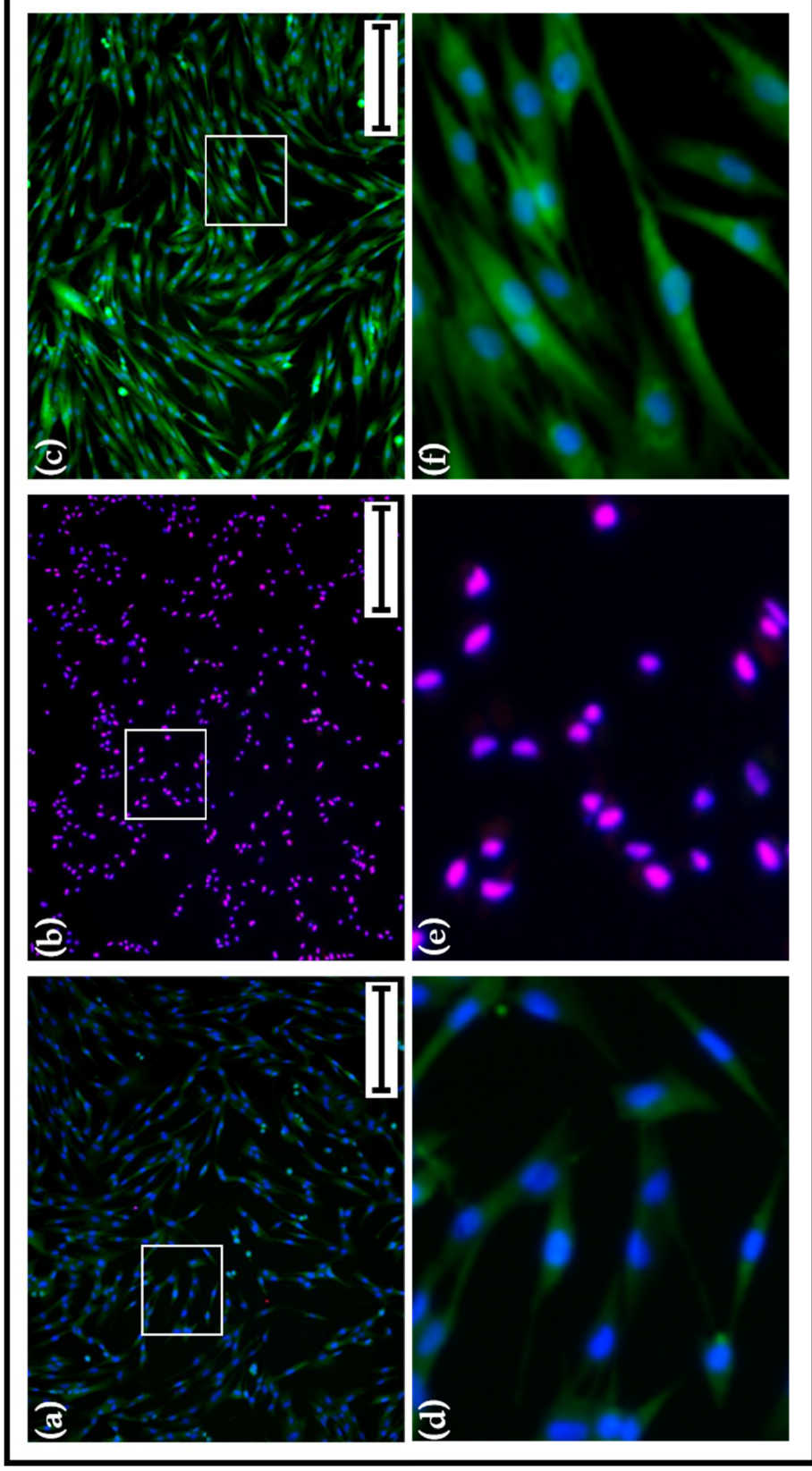


Fig. 24. Imágenes de microscopía óptica representativas de HFF-1. a) Control negativo, b) control positivo y c) células expuestas a una concentración de 100 µg/mL Fe de NPs de (Fe₃O₄/PCL)/CS. Longitud de barra 100 µm. d), e) y f) son detalles aumentados de a), b) y f), respectivamente. Las imágenes muestran la fluorescencia de DAPI (azul), calceína (verde) y TO-PRO[®]3 (rosa)

Capítulo 4

Hipertermia magnética
antitumoral

4.1. Introducción

El término médico de hipertermia se usa para referirse a un incremento anormal de la temperatura corporal. Por este motivo, también se ha utilizado para referirse al enfoque terapéutico en el que una determinada región corporal se somete a una temperatura por encima de la temperatura fisiológica. El éxito de esta terapia radica en la pobre tolerancia al calor que presentan las células cancerígenas por motivo de su alta tasa metabólica y su defectuosa neovascularización que tiene lugar en el crecimiento tumoral rápido y descontrolado.

Se han desarrollado varias metodologías para inducir el aumento de temperatura siendo la hipertermia magnética una de la más utilizadas y validada clínicamente. El éxito proviene, en comparación con otras metodologías de hipertermia convencionales, de su baja complejidad desde el punto de vista tecnológico y de su capacidad de generar un efecto altamente localizado y de bajo carácter invasivo (184). El mecanismo de la hipertermia magnética se basa en la utilización de NPs magnéticas capaces de producir calor cuando se les aplica un campo magnético alterno (36,185,186). Se introdujo por primera vez en 1957, año en el que Gilchrist y cols. aplicaron la hipertermia localizada con NPs magnéticas para destruir las células cancerígenas de los nódulos linfáticos con el objetivo final de prevenir el proceso de metástasis (187). Desde entonces, existe un intenso trabajo de investigación que ha experimentado grandes avances, sobre todo en los últimos 20 años. Probablemente, uno de los eventos más destacados en la trayectoria de la hipertermia magnética ocurre en 2010, cuando MagForce AG se convierte en la primera empresa en la obtención de la Conformidad Europea para la hipertermia magnética clínica de tumores cerebrales (43,188).

4.1.1. Principios físicos de la hipertermia magnética

Cuando un sistema de coloides magnéticos se somete a un campo magnético alterno, éstos absorben energía que será después liberada en forma de calor. Este calor se disipa entonces aumentando la temperatura de su entorno. En función de los fenómenos físicos implicados en dicha transformación, vamos a encontrar distintos nanomateriales magnéticos: las NPs ferromagnéticas y las NPs superparamagnéticas. Para las NPs ferromagnéticas será la pérdida de histéresis lo que determine la producción de calor. A nivel molecular, éstas poseen múltiples dominios magnéticos.

En ausencia de un campo magnético, los dipolos magnéticos de los múltiples dominios de los materiales ferromagnéticos están orientados de forma aleatoria. Cuando se aplica un campo magnético externo, los dominios magnéticos de las partículas se alinearán con éste. Cuando son sometidos ante un campo magnético alterno, y el campo magnético oscila, los dipolos del material ferromagnético se orientarán de forma opuesta al campo magnético pasando a un estado de energía mayor. La inversión de los dipolos determinada por la vuelta a un estado de energía menor supone la liberación de la diferencia de energía en forma de energía térmica. Este fenómeno es conocido como pérdida de histéresis (fig. 25a). Cuando disminuye el tamaño de partícula de los materiales ferromagnéticos la formación de múltiples dominios no es favorable energéticamente. En consecuencia, las NPs de menor tamaño van a poseer un solo dominio con un único momento magnético. Es entonces cuando las NPs van a ser superparamagnéticas. En este caso la liberación de calor se produce mediante la relajación de los momentos magnéticos mediante el mecanismo de Néel y el mecanismo de Brown. En la relajación de Brown se produce calor como consecuencia de la fricción resultante de la rotación física de las partículas dentro de un medio cuando las partículas intentan realinearse con el campo magnético alterno (fig. 25b) (184,185,189). En el caso de la relajación de Néel éste se produce tras los cambios en la orientación de los momentos magnéticos cuando se aplica un campo magnético alterno haciendo que éstos se opongan a la estructura cristalina de la propia NP resultando en calor (fig. 25c). El predominio de un mecanismo u otro en las NPs superparamagnéticas estará dirigido por las características fisicoquímicas del nanosistema (por ejemplo, el tamaño del núcleo superparamagnético, fig. 25).

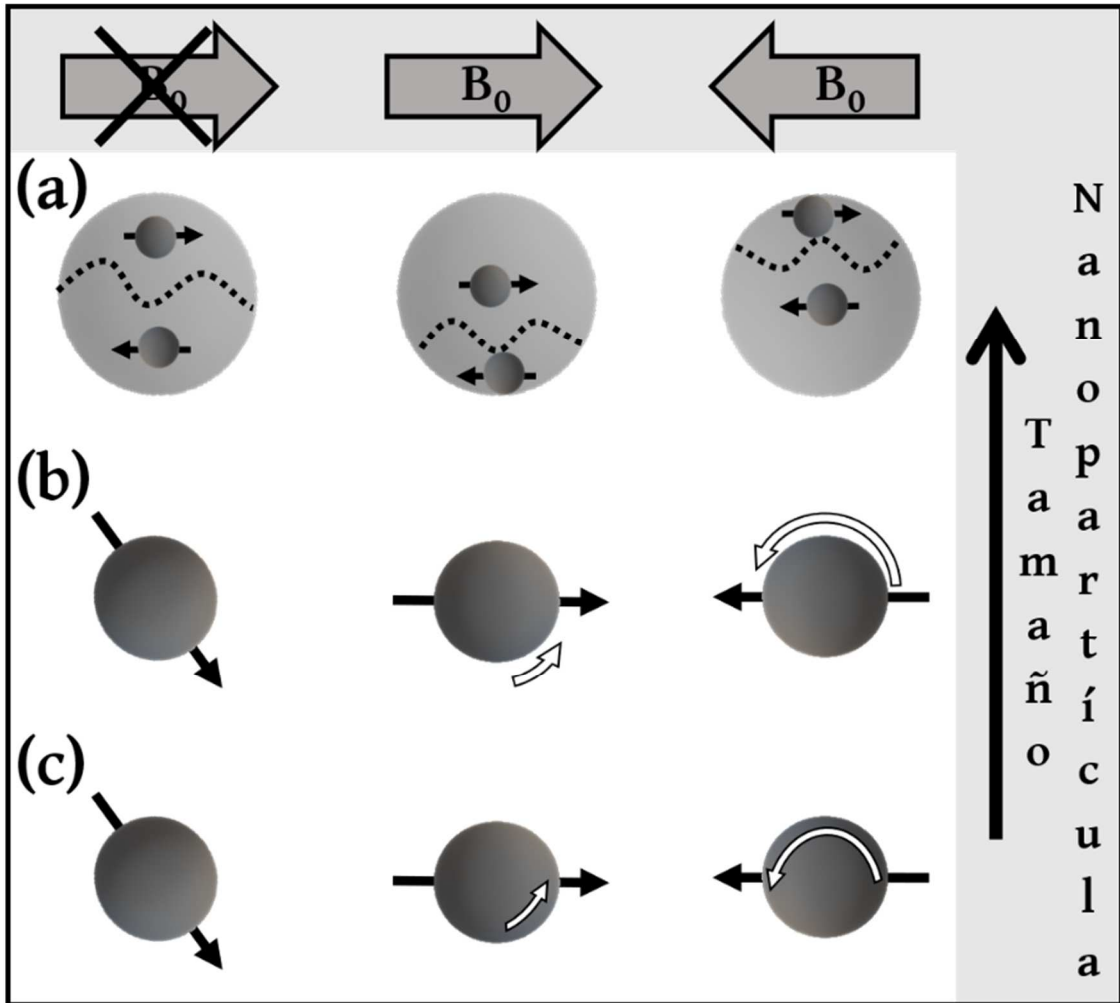


Fig. 25. Mecanismos de producción de calor de los materiales magnéticos en función de su tamaño al someterlos a un campo magnético alterno. a) Pérdida de histéresis característica de materiales ferromagnéticos con múltiples dominios magnéticos, b) relajación de Brown y c) relajación de Néel características de los materiales superparamagnéticos con un solo dominio. La contribución de estos mecanismos dependerá del tamaño de la nanopartícula magnética como se indica en la parte derecha del esquema. Las flechas grises representan la orientación del campo magnético externo, las esferas grises representan la nanopartícula magnética, las flechas negras representa la orientación de los momentos magnéticos y las flechas blancas el movimiento en la estructura cristalina (b) o en el medio externo (c).

Dentro de los dos tipos mostrados de NPs magnéticas únicamente las NPs magnéticas superparamagnéticas son aplicables en Biomedicina por su mayor seguridad con respecto a las ferromagnéticas (36,147,189). Por ello, el estudio realizado va a estar dirigido exclusivamente a este tipo de NPs.

4.1.2. Características de un Sistema de Hipertermia Magnética

4.1.2.1. Equipo de Hipertermia Magnética

Para que la hipertermia magnética tenga lugar será necesario un equipo capaz de producir el movimiento de las NPs magnéticas (y/o de sus momentos magnéticos) mediante la generación un campo magnético alterno (190)(fig. 26).

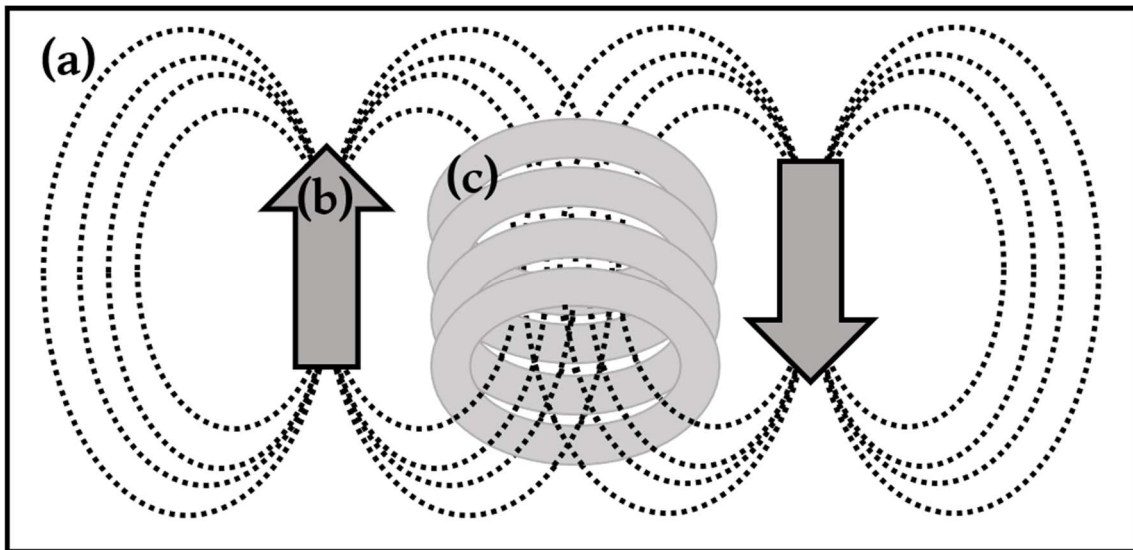


Fig. 26. Esquema de la creación del campo magnético alterno requerido para la hipertermia magnética. Los componentes que producen el campo magnético alterno (a) son dos imanes permanentes (b) y un solenoide (c) donde será introducida la región corporal a tratar siendo la temperatura monitorizada en este.

Los parámetros más importantes de este equipo son la magnitud del campo magnético y la frecuencia. El aumento de éstos afecta positivamente a la capacidad calorífica de las NPs magnéticas (36,43,190–192). A parte de las limitaciones técnicas y económicas que restringen las posibilidades de incremento de estas propiedades, también existen importantes limitaciones biomédicas. Estos deben de ser cuidadosamente escogidos para maximizar la diferencia de temperatura entre el tejido tumoral y los tejidos fisiológicos circundantes minimizando la corriente de Foucault. Esta es la corriente de electrones que se genera cuando un material conductor se ve sometido a un campo magnético alterno y producirá pérdidas de energía que se transforma en calor por el efecto de Joule. Puesto que en el caso de los sistemas de hipertermia el material conductor es el cuerpo humano, este proceso es el responsable de que se observe un excesivo calor no específico en tejidos fisiológicos a partir de un límite de amplitud y de frecuencia del campo magnético alterno aplicado. En 1988, Brezovich determinó

experimentalmente que el producto de la frecuencia y la amplitud no debían superar los 4.85×10^8 A/ms para evitar sobrepasar el límite de tolerancia de los pacientes. Se ha de tener en cuenta que este valor se obtuvo de la tolerancia y molestias expresadas por pacientes sanos sometidos a 1 h de tratamiento (191,192). Aunque este valor es considerado, la comunidad científica no ha llegado a un consenso estándar siendo muy variados los parámetros seleccionados en los diferentes estudios preclínicos publicados (de 110 a 710 kHz y de 1,2 a 20 kA/m para frecuencia y amplitud, respectivamente)(138,143,193–195). La duración y frecuencia del tratamiento y el área corporal tratada también van a influenciar significativamente a la seguridad del tratamiento. Estudios más recientes han encontrado tolerancias diferentes en función del tejido evaluado. Por ejemplo, un ensayo clínico realizado en pacientes con distintos tipos de tumor estudió la tolerabilidad en varias regiones corporales con un sistema de hipertermia que presentaba una frecuencia de 100 kHz y amplitudes desde 2,5 a 18 kA/m. Se concluyó que la amplitud tolerada iba desde 3.0 – 6.0 kA/m en la pelvis, hasta 7.5 kA/m en el tórax y el cuello y >10.0 kA/m en la cabeza (196). La determinación de que la mayor tolerancia se presenta en la cabeza probablemente haya contribuido a que la primera entrada en la clínica de la hipertermia magnética antitumoral tenga como indicación el glioblastoma (Nanotherm®).

4.1.2.2. Medio de Dispersión

Puesto que las NPs magnéticas se encontrarían en la masa tumoral, bien en los espacios intercelulares o intracelulares, la viscosidad característica del medio de suspensión será alta y variable. El fenómeno de relajación de Brown se ve afectado por este aumento de viscosidad lo que reduce la eficacia de hipertermia de aquellas NPs que generan calor por este proceso de forma predominante (fig. 27) (197). La influencia de la viscosidad del microambiente de la NP ha sido analizada mediante la determinación *in situ* del mecanismo de relajación dentro de células vivas. En concordancia los efectos expuestos en la fig. 27., cuando las NPs eran internalizadas en la célula no presentaban relajación de Brown que, tras la lisis celular, se recuperaba y podían volver a actuar (198). De forma adicional, se ha evaluado cómo esta característica parece influenciar a la temperatura alcanzada en distintas líneas celulares (197). Por el contrario, esta disminución del aumento de la temperatura no se tan notable en aquellas NPs diseñadas para que liberación de calor está gobernada por la relajación de Néel (199).

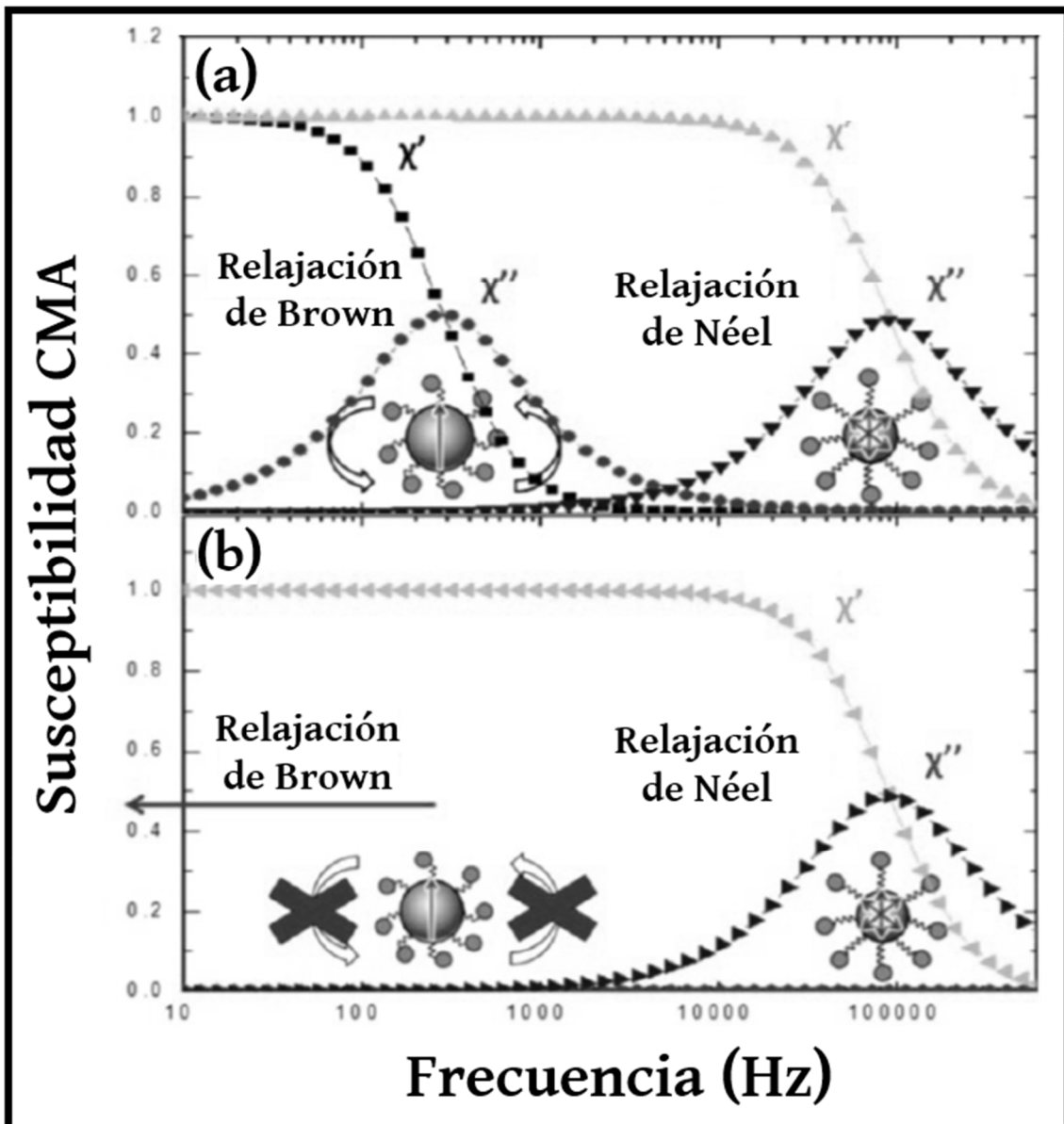


Fig. 27. Influencia de la viscosidad en los mecanismos de relajación involucrados en la susceptibilidad de las nanopartículas al campo magnético alterno (CMA). a) Nanopartículas dispersadas en un medio de baja viscosidad (agua). b) Nanopartículas dispersadas en un medio de alta viscosidad (glicerol). Reprinted (adapted) with permission from (Soukup D, Moise S, Céspedes E, Dobson J, Telling ND. In situ measurement of magnetization relaxation of internalized nanoparticles in live cells. ACS Nano. 2015;9(1):231–40). Copyright (2015) American Chemical Society.

4.1.2.3. Características de las nanopartículas magnéticas

La capacidad calorimétrica de las NPs magnéticas utilizadas va a depender de sus características fisicoquímicas pues éstas van a definir sus propiedades magnéticas. El tamaño de la NP va a ser clave para el tipo de mecanismo de relajación predominante dado el entorno biológico en el que se van a encontrar (fig. 25). Se estima que el tamaño

óptimo será aquel en el que predomine el mecanismo de Néel para evitar la limitación de eficiencia calorimétrica que sucede en microambientes biológicos donde las NPs se inmovilizan (fig. 27). Los valores experimentales de tamaño óptimos son aquellos que se sitúan entre 12 y 25 nm.

La forma de las NPs es también de especial interés. Más que una forma concreta, se ha puesto en evidencia que es la variabilidad con respecto a una esfera perfecta el factor más determinante para la aplicación en hipertermia. Los magnetosomas (Fe_3O_4 producida por bacterias magnetotácticas) constituyen uno de los modelos de NPs magnéticas más estudiado para la comprensión de esta característica.

Otro requisito es la estructura cristalina del nanomaterial. Este es uno de los principales aspectos por el cual se investigan los coloides de óxido de hierro Fe_3O_4 y maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (fig. 4). El perfil cristalino de un material dependerá de la estructura y de la composición del sistema. Se ha conseguido optimizar la eficiencia calorimétrica de estos óxidos de hierro mediante la inserción de otros metales de transición en su estructura. A pesar de las interesantes propiedades magnéticas de los ferrofluidos resultantes de estas aleaciones, las características fisicoquímicas (por ejemplo, estabilidad frente a la oxidación), el perfil biocompatible y su aprobación para su uso en humanos por la FDA, siguen posicionándolos como los materiales más utilizados para la hipertermia magnética en clínica.

En vista de estas características fisicoquímicas, será crucial utilizar una metodología de síntesis adecuada. De forma adicional a la forma, el tamaño y el perfil cristalino, ya se ha visto que la selección de un procedimiento de síntesis es fundamental por otro motivo, la homogeneidad de la dispersión coloidal resultante. Índices de PDI bajos aseguran la eficacia de hipertermia estimada mientras que se ha visto como ligeros aumentos de la PDI de la muestra obtenida reducen enormemente el aumento de temperatura (34,199–203).

Una vez sintetizadas las NPs magnéticas con las características fisicoquímicas deseadas éstas deben de mantenerse en el entorno biológico. La principal estrategia utilizada para asegurar una alta estabilidad de la dispersión coloidal, así como su biocompatibilidad, su biodistribución específica y alta internalización celular consiste en el recubrimiento o funcionalización superficial de las NPs magnéticas. Se ha visto que la composición de la cubierta de las NPs es esencial para su estabilidad o estado de

agregación. También la concentración y, por consiguiente, la dosis va a poder contribuir al estado de agregación. Esto parece deberse a que las interacciones dipolares interparticulares aumentan a medida que disminuye la distancia entre las NPs lo cual influye negativamente a las propiedades magnéticas y, por tanto, la capacidad de producir calor. Esta es la hipótesis que se propone en múltiples estudios al obtener resultados desfavorables para la aplicación de hipertermia al aumentar la concentración (o disminuir la distancia) y, consecuentemente, la agregación (197,203,204). En este sentido, la intensidad de estas interacciones puede ser disminuida aumentando la distancia interparticular. Para ello, la funcionalización de las NPs con polímero hidrofílicos constituye una de las estrategias más estudiadas por el incremento en el aumento de temperatura a pesar del aumento del R_H que conllevan (205–207).

Resultados contradictorios en cuanto a la eficiencia de hipertermia de dispersiones coloidales en función de la formación de agregados ha desencadenado el estudio del comportamiento magnético colectivo. Cuando las NPs se aglomeran, las NPs interactúan entre sí y el comportamiento magnético colectivo se vuelve relevante. Así, el estudio de las propiedades físicas de los agregados resultantes representa un nuevo enfoque para la optimización de las NPs magnéticas. Puesto que la formación de estos agregados debe de ser controlada para evitar problemas por el aumento de tamaño, se ha propuesto el recubrimiento de éstos con polímeros, es decir, la formación de matrices poliméricas conteniendo múltiples NPs magnéticas. Esta estrategia presenta la ventaja de aumentar la eficacia de hipertermia por estabilización del agregado ante la aplicación de un campo magnético alterno y al ser internalizados en la célula lo que permite mantener sus propiedades magnéticas. Además, la formación de estos sistemas multinúcleo-cubierta también presenta el resto de ventajas que presentan la funcionalización de NPs magnéticas de forma individual (203,208–211).

En conclusión, y a expensas de los nuevos avances en el área, estas son las características de un sistema de hipertermia magnética que deben de ser controladas de la forma más precisa posible para conseguir optimizar su eficacia y reproducibilidad (fig. 28). Para esto último, se utilizan parámetros que cuantifican el calor generado siendo los más comunes el índice de absorción específico (*specific absorption rate, SAR*) y la disipación intrínseca de potencia (*intrinsic los power, ILP*)

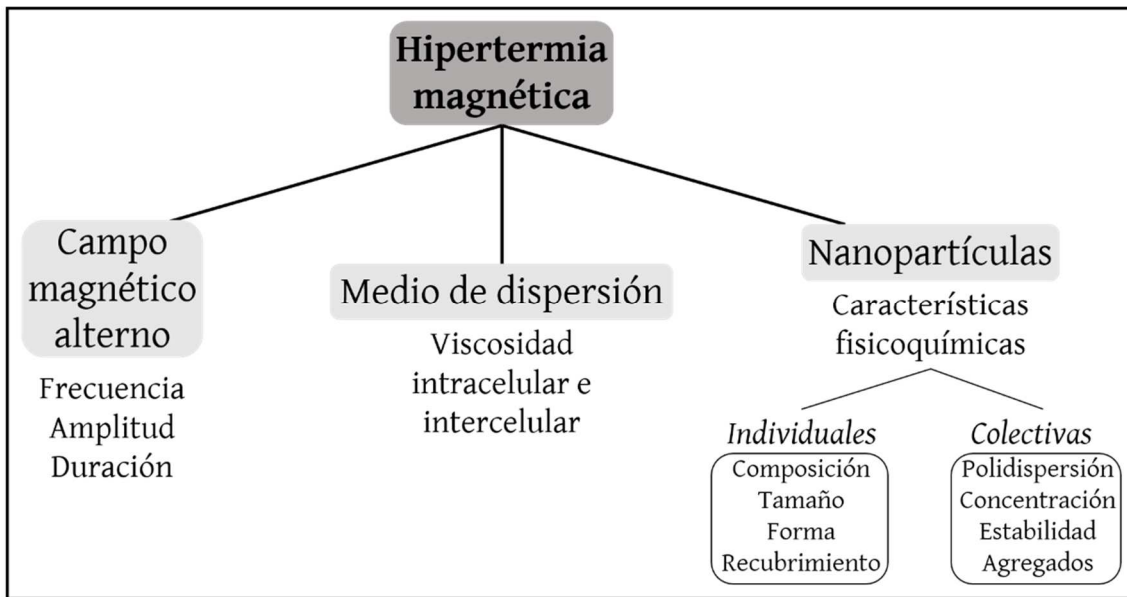


Fig. 28. Características de un Sistema de Hipertermia Magnética. La eficiencia de esta técnica va a poder ser controlada mediante la elección de las características del campo magnético, del medio de dispersión y de las nanopartículas.

La medida experimental de SAR consiste en suspender cierta cantidad de NPs en un líquido

La absorción de energía durante la exposición a una radiación electromagnética se expresa a través del SAR para los tejidos humanos (Ec. 16):

$$SAR = (\Delta Tc)/t \quad (16)$$

Donde ΔT es el incremento de la temperatura, c el calor específico del material que se está utilizando y t el periodo de tiempo del experimento. El uso de SAR para determinar y comparar la capacidad calorimétrica de las NPs magnéticas utilizadas en hipertermia está ampliamente extendido.

Como se ha visto, el control de la producción de calor se ve afectado por las características del campo magnético aplicado (apartado 4.1.2.1). El SAR es un parámetro dependiente del equipo utilizado y, por consiguiente, su valor dependerá de los valores de amplitud y frecuencia. Por este motivo, cuando estos valores sean diferentes, se requiere un parámetro más riguroso para la comparación de la eficacia de las NPs magnéticas en hipertermia. Por la variabilidad existente actualmente de estas condiciones, se ha propuesto el uso de la ILP descrito matemáticamente por la Ec. 17:

$$ILP = P/\gamma H_2 f = SAR/H_2 F \quad (17)$$

Como vemos en la Ec. 17, *ILP* relaciona la densidad de potencia volumétrica, P , la concentración (γ), la frecuencia a la que oscila el campo, f y la intensidad del campo magnético alterno aplicado, H . Sin embargo, el establecimiento de este nuevo parámetro aún se resiente debido a los límites de su aplicación a un rango determinado de frecuencia e intensidades del campo magnético, así como a las propiedades magnéticas determinadas de las NPs únicamente de forma individual sin contar la influencia del comportamiento magnético colectivo (43,202,212,213).

4.1.3. Eficacia de la hipertermia magnética antitumoral

La hipertermia ha sido ampliamente investigada y aplicada como tratamiento anticancerígeno. Cuando el aumento de temperatura alcanza el rango de 41 a 46 °C y se mantiene durante un tiempo suficiente, las células son dañadas irreversiblemente pudiendo conducir a una muerte celular programada como, por ejemplo, la apoptosis. El tiempo estimado para destruir la masa tumoral suele ser superior a los 30 minutos, aunque dependerá de la temperatura de hipertermia alcanzada. Por otro lado, a partir de temperaturas superiores a los 50 °C el proceso se conoce como termoablación. En este caso, comienza a desencadenarse una serie de sucesos que difieren significativamente de los anteriores comenzando con la coagulación de la sangre, y siguiendo con la rápida muerte celular por necrosis y, finalmente, a la carbonización del tejido. A diferencia de la muerte celular programada inducida por temperaturas menos severas, la necrosis constituye una muerte inmediata a la que se ven asociados procesos inflamatorios que pueden tener consecuencias graves en el paciente lo que confiere a la termoablación un carácter más abrasivo y menos seguro para el paciente (36,185).

La eficacia de hipertermia va a estar definida por la temperatura mínima y máxima alcanzadas, así como la duración del tratamiento entre otros parámetros. De aquí que los sistemas de hipertermia deban de ir dotados de un sensor de temperatura capaz de monitorizar el tratamiento (189,214).

La mayoría de autores señalan la mayor sensibilidad de las células tumorales a la hipertermia en comparación con las células sanas (36,43,202). Puesto que no se han demostrado diferencias consistentes en cuanto a los mecanismos moleculares desencadenados por la hipertermia, parece que son las diferencias de la eficiencia del proceso de termorregulación lo que determina esta mayor afectación de las células

tumorales. Cuando los tejidos fisiológicos son sometidos a un aumento de temperatura que sobrepasa los valores fisiológicos, tiene lugar la vasodilatación de los vasos sanguíneos que los irrigan. La vasodilatación permite la disipación del calor en exceso. Este mecanismo de termorregulación está muy limitado por la neovascularización propia de tejidos tumorales. En primer lugar, la arquitectura defectuosa de la neovasculatura impide la vasodilatación en gran medida. En segundo lugar, su distribución heterogénea impide la llegada a determinadas áreas tumorales. En tercer lugar, el menor flujo sanguíneo disminuye la disipación de calor requerida. Todo esto parece contribuir a la sensibilización al calor en tejidos tumorales. No obstante, las diferencias estructurales que presentan los distintos tipos de tumores impiden en muchos casos que esta deficiencia de termorregulación sea suficientemente selectiva. Asimismo, destaca la necesidad de la administración intratumoral de las NPs magnéticas siendo esta vía de administración la única aprobada clínicamente hasta la fecha. En consecuencia, un gran volumen de la investigación preclínica pretende posibilitar la administración intravenosa de NPs magnéticas controlando su biodistribución para que se asegure la extravasación exclusiva al tejido tumor.

La desnaturalización de proteínas se ha subrayado como principal mecanismo de acción de la hipertermia debido a la consiguiente activación o desactivación de diferentes cascadas de señalización celular. Cada proteína presenta un umbral de temperatura específica para su desnaturalización. De esta forma, a mayor temperatura, mayor cantidad de proteínas se desnaturalizarán. Esto parece contribuir al aumento de la muerte celular resultante del aumento de la temperatura, incluso, con incrementos de tan solo 0.5 °C. Además, la fracción proteica que sufre el proceso de desnaturalización, se ha visto que éstas pueden coagregar con proteínas nativas. La combinación de la desnaturalización y la coagregación asociada será importante para desencadenar mecanismos de inhibición de síntesis proteicas, de la progresión del ciclo celular y de la reparación del ADN (191,215,216). La desnaturalización proteica en la célula puede afectar al citoesqueleto, al retículo endoplásmico, a la membrana plasmática, así como otras membranas subcelulares afectando, por tanto, al tráfico intracelular y al procesamiento del ARN entre otras funciones esenciales para la célula.

Las NPs magnéticas generan un aumento de la producción de ROS mediante la catálisis de la reacción de Fenton, lo cual constituye un efecto citotóxico (ver apartado 3.1.2). Recientemente, Clerc y cols. han publicado los resultados de un estudio donde las NPs

magnéticas se acumulan en los lisosomas y, tras la aplicación de un campo magnético alterno durante 30 minutos, se produce un aumento de la catálisis de la reacción de Fenton que genera un aumento de ROS intralisosomal. Entonces, se produce la degradación de la membrana del lisosoma mediante la peroxidación de los lípidos que la constituyen. Finalmente, el contenido lisosomal es vertido al citosol lo que desencadena la muerte celular (137). Otro estudio apoya esta teoría puesto que observa un aumento de 20 veces la citotoxicidad inducida a células de hepatocarcinoma humano (HepG2) por producción de ROS de las NPs magnéticas cuando éstas son sometidas a un campo magnético alterno durante 40 min (217).

Si bien todo esto puede conducir a la muerte celular, si la célula dañada sobrevive, se activarán mecanismos para adquirir tolerancia al calor. Entre ellos destaca la activación de proteínas de choque térmico (HSP) que estabilizan las proteínas mal plegadas, las enzimas proteolíticas capaces de degradar y eliminar los agregados de proteínas o las proteínas modificadoras de ADN y ARN que pueden reparar daños en estas moléculas (215,218-221). Se ha identificado que son las HSP 70 y 90 las que más participan en el proceso de sensibilización a la hipertermia y, por tanto, sus inhibidores farmacológicos están siendo estudiados para favorecer una respuesta suficiente a la hipertermia en la clínica (138,222,223). Pese a esto, la estrategia con mayores posibilidades del establecimiento de esta terapia en la clínica es su uso como adyuvante de otras terapias anticancerígenas.

4.1.4. Hipertermia magnética antitumoral como tratamiento adyuvante

Son muy numerosos los estudios que apoyan la mejora del pronóstico del paciente cuando la terapia de hipertermia se combina con otro tipo de terapia. De hecho, se han obtenido efectos sinérgicos en combinación con quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia. Por ello, la hipertermia magnética se propone como un agente sensibilizante siendo los mecanismos que llevan a esta hipótesis ampliamente investigados.

Las características defectuosas de la arquitectura y la pobre densidad de la neovasculatura tumoral dan como resultado a una circulación limitada en el microambiente tumoral. Si a este hecho le sumamos el crecimiento exagerado de la masa tumoral y, por ello, la alta tasa metabólica, se obtiene como resultado unas condiciones de bajo pH, privación de energía e hipoxia. La hipertermia magnética

antitumoral se ha presentado como una estrategia de sensibilización ya que altas temperaturas pueden facilitar la perfusión de quimioterápicos y oxígeno en el tumor así como aumentar la migración de células efectoras inmunes, factores restrictivos de la eficacia de la quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia, respectivamente (43,189). Pese a esto, los mecanismos moleculares que produce la hipertermia parecen tener un papel más importante para aumentar la tasa de respuesta a otras terapias.

La radioterapia induce daño en el ADN lo que conduce a un aumento de la muerte celular. Ante esta situación, las células cancerígenas ponen en marcha mecanismos de reparación del ADN que pueden llegar a desencadenar la resistencia a este tipo de terapia. Puesto que la hipertermia contribuye a la inhibición de los mecanismos de reparación del ADN mediante la desnaturalización proteica, la citotoxicidad por radioterapia puede verse incrementada (189,224).

El efecto de la hipertermia sobre la quimioterapia a nivel molecular depende del mecanismo de acción del fármaco. Los agentes alquilantes del ADN como la ciclofosfamida, los compuestos de platino y las nitrosoureas presentan una mayor capacidad de alquilación del ADN cuando la temperatura es aumentada probablemente por la inhibición de los mecanismos de reparación del ADN. Por otro lado, la bleomicina podría beneficiarse también de este efecto además del aumento de ROS. Por otro lado, la mayor permeabilización de la membrana celular a los fármacos parece aumentar la internalización de fármacos hidrófilos (225–227). La combinación de hipertermia y quimioterapia también conocida como termoquimioterapia está siendo ampliamente investigada en ensayos clínicos debido a que es capaz de mejorar el pronóstico y disminuir las recaídas (capítulo introducción → GEM + hipertermia). Además, la hipertermia se ha propuesto como estrategia de liberación selectiva de fármacos antitumorales (capítulo fármaco).

La inmunoterapia es la terapia anticancerígena que pretende frenar el crecimiento tumoral mediante el restablecimiento de los mecanismos citotóxicos del sistema inmune bloqueados por las células tumorales. Se basan en el uso de anticuerpos monoclonales que inhiben mecanismos de las células cancerígenas para desactivar el sistema inmune del paciente conocidos como *checkpoints*. Si bien este nuevo enfoque terapéutico presenta una gran selectividad y eficacia, su aplicación está limitada a tumores con un microambiente tumoral con alta presencia de células inmunes como

linfocitos y, por tanto, una alta respuesta inmune. En este sentido, la hipertermia parece ampliar el espectro de tumores sensibles a la inmunoterapia. Esto se debe a que la hipertermia puede desencadenar mecanismos que mejoran la inmunogenicidad e inmunoreactividad del microambiente tumoral. De entre los mecanismos responsables destaca el aumento de la expresión de las HSP ya que están altamente implicadas en diferentes procesos inmunológicos. Esta hipótesis ya está siendo validada en la clínica con el anticuerpo monoclonal del receptor de muerte programada pembrolizumab en diferentes tipos de tumores (228–230).

4.2. Metodología y resultados

4.2.1. Eficiencia de hipertermia

El calor inducido por las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ en una dispersión acuosa de 5 mL (10 mg/mL de NPs) fue investigada a una temperatura de 25.0 ± 0.5 °C. Con este fin, se comparó con muestras control del mismo volumen (agua bidestilada sin nanocompuestos). Todas las muestras fueron sometidas a un campo magnético alterno inducido por una fuente de alimentación equipada con un solenoide de 20 mm de diámetro, 100 mm de longitud y 70 espirales ($n = 3$). El campo magnético alterno resultante presentaba una frecuencia de 250 kHz y una intensidad de 4 kA/m, valores intermedios ampliamente seleccionados (36,38,59,79,94,191) dentro del rango utilizado en investigación preclínica de la hipertermia magnética (de 110 a 710 kHz y de 1,2 a 20 kA/m para frecuencia y amplitud, respectivamente) (138,143,193–195). Puesto que no sobrepasan el producto indicado por Brezovich para no superar límite de tolerancia de los pacientes, estos parámetros pueden ser considerados seguros *a priori* (191,192). La determinación de la temperatura se realizó con una sonda de fibra óptica para evitar interferencias electromagnéticas con la medida. La monitorización de la temperatura se llevó a cabo durante todo el experimento (3h).

La hipertermia magnética *in vitro* inducida por las dispersiones de NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ al ser sometidas a un campo magnético alterno se muestra en la fig. 28. y 29, respectivamente. Puesto que ambos nanocompuestos presentan núcleos de Fe_3O_4 superparamagnéticos (ver apartado 2.2.3.1), se hipotetiza que el mecanismo de liberación de calor son la relajación de Brown y de Néel (fig. 27b y c) (184,185,189). La temperatura de hipertermia es alcanzada utilizando ambas dispersiones en un tiempo

adecuado (≤ 30 min). Concretamente, la temperatura de 41 °C, la temperatura mínima de hipertermia, fue lograda tras la aplicación del campo magnético alterno durante 20 y 30 minutos para la dispersión de NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$, respectivamente. Las modificaciones celulares inducidas a esta temperatura *in vivo* constituidos mayoritariamente por la desnaturalización proteica han demostrado ser suficientes como para destruir la masa tumoral si se mantienen durante un tiempo aproximado de 30 min (191,231–233). A partir de este momento, la temperatura siguió aumentando hasta alcanzar la temperatura de 46 °C, la temperatura máxima de hipertermia, a los 38 y 40 min para la dispersión de NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$, respectivamente. Esta temperatura se estabilizó hasta el final del experimento (3 h). De esta forma, se podrían evitar los efectos adversos consecuentes de temperaturas de termoablación donde los daños inducidos generan la muerte celular por necrosis y, por tanto, numerosos efectos secundarios. Además, esta temperatura máxima también es adecuada para evitar la disipación de temperaturas de hipertermia a los tejidos sanos circundantes (36,185,189,234).

Probablemente, las ligeras diferencias obtenidas para las dispersiones de nanocompuestos evaluadas sean debidas a la diferencia de contenido de hierro. Puesto que se utiliza la misma concentración de nanocompuestos, la dispersión de NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ contienen una mayor proporción de hierro que aquella encontrada en la dispersión de NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$. La eficiencia de hipertermia es óptima para estos nanocompuestos así como para otros publicados donde las NPs de Fe_3O_4 son embebidas directamente en CS (59,94). Esto podría ser debido la estabilidad conferida por la funcionalización de CS en las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ (ver apartado 2.2.2.5) que contribuiría al mantenimiento de las propiedades magnéticas durante todo el experimento (197,199,203,204).

Los resultados obtenidos para los nanocompuestos de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ son ligeramente superiores a los obtenidos para otros nanosistemas constituidos por núcleos de Fe_3O_4 embebidos en una cubierta lipídica sometidos a las mismas condiciones de frecuencia, amplitud y concentración de nanocompuestos (73,79). Otros diseños constituidos por NPs de Fe_3O_4 embebidas en una nanomatriz de PCL subrayan la idoneidad de este polímero como cubierta de NPs magnéticas de aplicación en hipertermia *in vitro* (235–237). Es interesante señalar que experimentos de hipertermia *in vivo* donde se utilizan nanocompuestos de PCL para embeber a los coloides de Fe_3O_4 requieren ser

funcionalizados con un polímero hidrófilo (mayoritariamente PEG) con resultados muy prometedores para su traslación a la clínica (238,239).

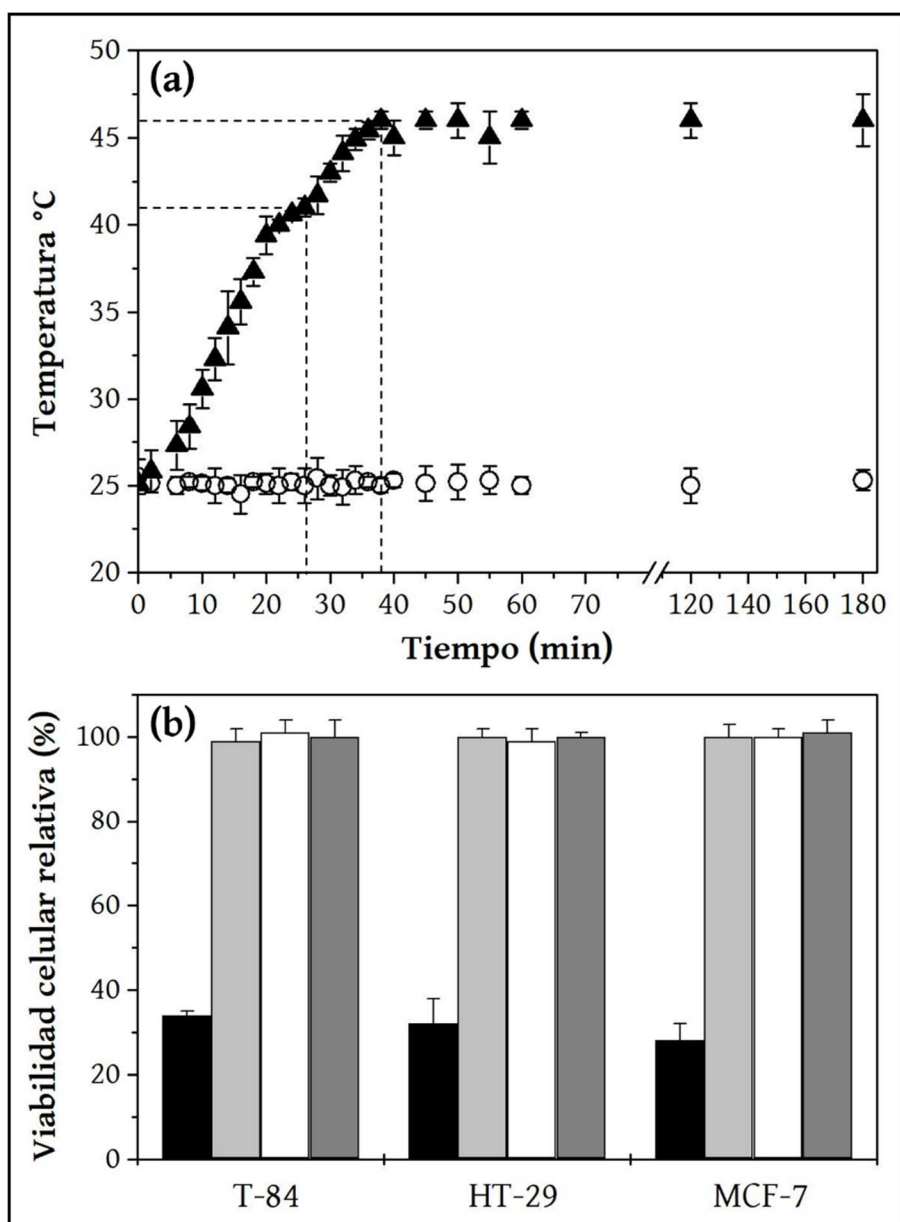


Fig. 28. Eficacia *in vitro* de la hipertermia magnética antitumoral de las NPs de Fe₃O₄/PCL. a) Curva de temperatura en función del tiempo obtenida para una dispersión de NPs de Fe₃O₄/PCL (▲, 10 mg/mL) y una muestra control (○, agua bidestilada sin nanocompuestos) expuesta a un campo magnético alterno (250 kHz, 4 kA/m, $n = 3$). b) Citotoxicidad inducida por la hipertermia producida cuando NPs de Fe₃O₄/PCL son adicionadas a un medio de cultivo de HT-29, T-84, y MCF-7. Los grupos experimentales son células incubadas en presencia de NPs (0.4%, p/p) con aplicación de un campo magnético alterno (250 kHz, 4 kA/m) (columnas de color negro), o sin la aplicación de éste (grupo control, columnas de color gris claro), o células incubadas en ausencia de NPs con aplicación del campo magnético alterno (250 kHz, 4 kA/m) (grupo control, columnas de color blanco), o sin éste (grupo control, columnas de color gris oscuro). Los datos son indicados como el valor medio \pm la desviación estándar ($n = 4$).

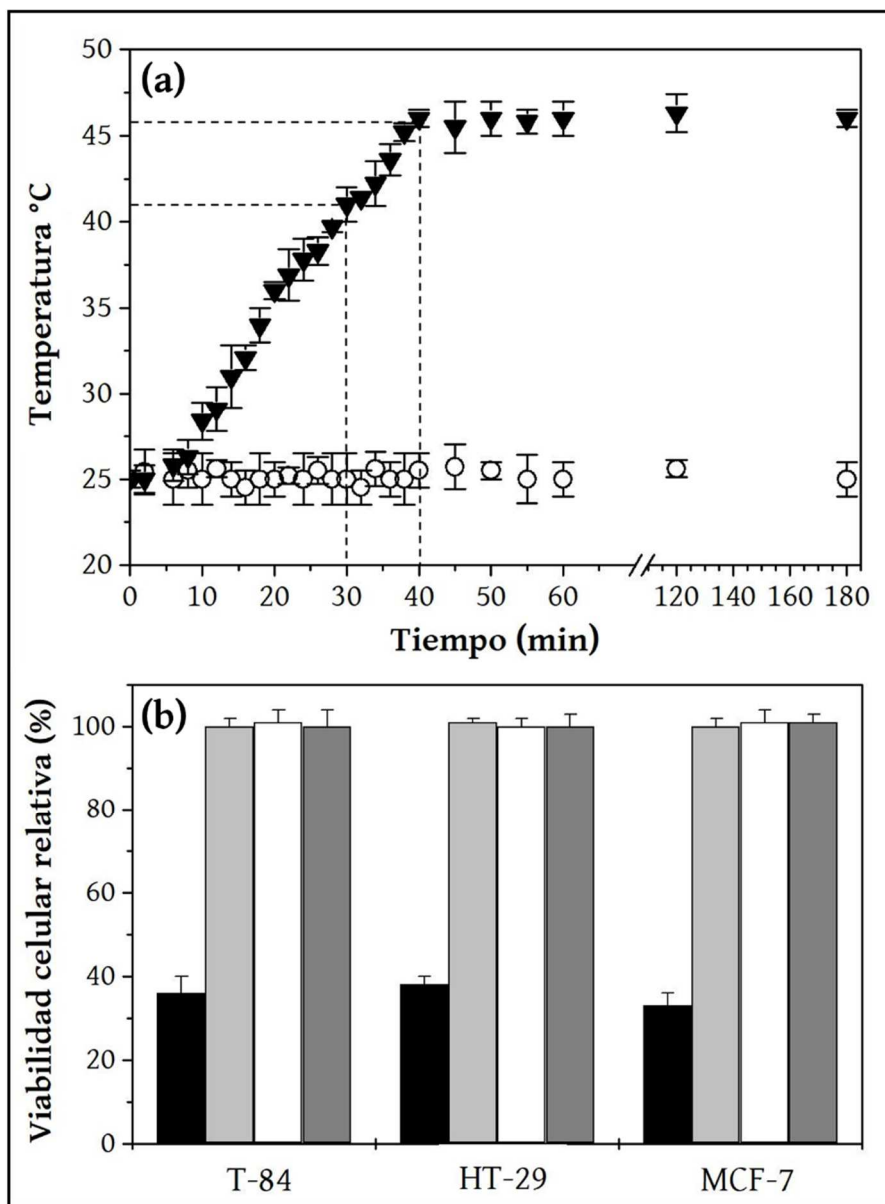


Fig. 29. Eficacia *in vitro* de la hipertermia magnética antitumoral de las NPs de (Fe₃O₄/PCL)/CS. a) Curva de temperatura en función del tiempo obtenida para una dispersión de NPs de Fe₃O₄/PCL (▲, 10 mg/mL) y una muestra control (○, agua bidestilada sin nanocompuestos) expuesta a un campo magnético alterno (250 kHz, 4 kA/m, $n = 3$). b) Citotoxicidad inducida por la hipertermia producida cuando NPs de Fe₃O₄/PCL son adicionadas a un medio de cultivo de HT-29, T-84, y MCF-7. Los grupos experimentales son células incubadas en presencia de NPs (0.4%, p/p) con aplicación de un campo magnético alterno (250 kHz, 4 kA/m) (columnas de color negro), o sin la aplicación de éste (grupo control, columnas de color gris claro), o células incubadas en ausencia de NPs con aplicación del campo magnético alterno (250 kHz, 4 kA/m) (grupo control, columnas de color blanco), o sin éste (grupo control, columnas de color gris oscuro). Los datos son indicados como el valor medio \pm la desviación estándar ($n = 4$).

4.2.2. Evaluación de la citotoxicidad de hipertermia magnética antitumoral *in vitro*

La citotoxicidad *in vitro* de la hipertermia inducida por las NPs de Fe₃O₄/PCL y de (Fe₃O₄/PCL)/CS se evaluó en las líneas celulares humanas, la de carcinoma de colon T-84 suministrada por el Banco de Células del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, España, y la de adenocarcinoma de colon HT-29 y cáncer de mama MCF-7 obtenidas de ATCC, Estados Unidos. El medio de cultivo usado fue el DNEM (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) suplementado con 10% de FBS (Lonza Group AG, Suiza), 14 mM de bicarbonato sódico, 15 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina (ThermoFisher Scientific, España), 40 µg/mL de gentamicina y 500 µg/mL de ampicilina (Antibióticos de León S.L.U., España).

El diseño del experimento de la citotoxicidad inducida por hipertermia magnética está basado en estudios previos (79,240,241). En él, las condiciones del campo magnético aplicado las mismas que las utilizadas para evaluar la capacidad calorimétrica de los nanocompuestos y la citotoxicidad será evaluada mediante la viabilidad celular relativa determinando la actividad deshidrogenasa mitocondrial utilizando el ensayo de MTT. En primer lugar, se realizó el conteo celular utilizando una cámara de Neubauer. Entonces, las células se sembraron con una densidad de 10⁴ células/pocillo en una placa de 24 pocillos e incubadas con una concentración de 0.4% v/v NPs de Fe₃O₄/PCL o (Fe₃O₄/PCL)/CS o en ausencia de estas (grupo control) durante 2 h a 37.0 ± 0.5 °C. Previamente a la exposición al campo magnético alterno, la suspensión de células fue centrifugada (10 min at 4000 rpm) para descartar las NPs no unidas o unidas débilmente y el sedimento celular fue resuspendido en 200 µL de medio de cultivo. Todas las suspensiones celulares exceptuando las seleccionadas como grupo control fueron sometidas al campo magnético alterno durante 1 h. Una vez acabado, se incubaron durante 30 min a 25.0 ± 0.5 °C, se lavaron dos veces con PBS y fueron suspendidas en medio de cultivo para ser sembradas con las condiciones ya establecidas. Finalmente, se analizó la viabilidad celular a las 48 h con el ensayo colorimétrico de MTT (*n* = 4). Para ello, se adicionó 20 µL de la solución de MTT a cada pocillo (5 mg/mL en el medio de cultivo celular). Tras la incubación durante 4 h a 37.0 ± 0.5 °C, se retiró el medio de cultivo y los cristales de formazán fueron disueltos en DMSO. La OD resultante fue medida con un colorímetro Titertek multiscan (Flow Laboratories, Estados Unidos) a 570 y 690 nm. La viabilidad celular relativa fue calculada utilizando la ecuación 14.

La eficacia antitumoral de la hipertermia inducida por las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ fue investigada *in vitro* en líneas celulares ampliamente utilizadas para evaluar tratamientos frente al cáncer de colon (T-84 y HT-29) y de mama (MCF-7). La línea celular de carcinoma de colon humano T-84 deriva de una metástasis pulmonar de un carcinoma de colon de un hombre de 72 años (155). La línea celular de adenocarcinoma de colon humano grado II HT-29 deriva de células aisladas de un tumor primario de una mujer caucasiana de 44 años (242). La línea celular de adenocarcinoma de mama humano MCF-7 fue establecida desde una efusión pleural de una mujer caucasiana de 69 años y está caracterizada por ser negativa a la expresión del receptor EGF y al receptor PAR1 de la trombina, pero positiva al receptor de estrógeno alfa (243). Las tres líneas fueron escogidas por ser ampliamente utilizadas en estudios de tumorigenicidad siendo todas ellas suministradas por el Banco de Células del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, España.

Los resultados demostraron una disminución significativa de la viabilidad celular relativa en comparación con los controles utilizados en las tres líneas celulares investigadas para ambos nanocompuestos (fig. 28 y 29). La nula toxicidad mostrada por los grupos control permiten considerar que esta disminución se debe únicamente a la hipertermia inducida por los nanocompuestos cuando son sometidos a un campo magnético alterno. Por lo tanto, se descarta la toxicidad *per se* de los nanocompuestos lo que señala de nuevo la nula toxicidad de éstos. Por otro lado, también permiten descartar un daño celular debido a la frecuencia y amplitud seleccionadas para el campo magnético alterno.

En vista de los resultados obtenidos y, de acuerdo con resultados previos de la literatura científica tanto *in vitro* como *in vivo* en T-84 y HT-29, la hipertermia constituye una estrategia con posibilidades en el tratamiento del cáncer de colon (79,244). Además, también reafirma la gran variedad de estudios recientes que demuestran el gran potencial de este tipo de terapia para el tratamiento del cáncer de mama (MCF-7) tanto *in vitro* como *in vivo* (81,165,245–247). En el caso de esta línea celular es de especial interés que la mayor citotoxicidad observada puede deberse al efecto citotóxico observado por las NPs de Fe_3O_4 mediante el aumento de ROS (248) que podría ser acentuado como se hipotetiza de forma preclínica por los mecanismos desencadenados por la hipertermia (137,217).

Capítulo 5

Capacidad de Vehiculización de Gemcitabina

5.1. Introducción

5.1.1. Gemcitabina

5.1.1.1. Introducción

El grupo quimioterápico de análogos de nucleósidos es ampliamente utilizado en el tratamiento de tumores. Estos compuestos utilizan las rutas de metabolización de los nucleósidos y nucleótidos endógenos para ser transformados en metabolitos activos capaces de interferir con la síntesis de nuevos nucleósidos y nucleótidos además de poder ser utilizados en la síntesis de ácidos ribonucleicos.

La GEM (2',2'-difluorodesoxicitidina; dFdC) es un análogo de la desoxicitidina (dC) (fig. 30) que ha mostrado efectividad en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer incluyendo el cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de colon, de cabeza y cuello y de ovarios (249–251). Puede ser utilizado tanto en monoterapia como en terapia combinada. Las terapias combinadas utilizadas en clínica están basadas en la asociación de este fármaco con otro fármaco quimioterápico. Amplia investigación preclínica y clínica acerca de posibles combinaciones de GEM con tratamientos biológicos apuntan a un incremento en la eficacia y a la ampliación de su uso en otro tipo de tumores (252).

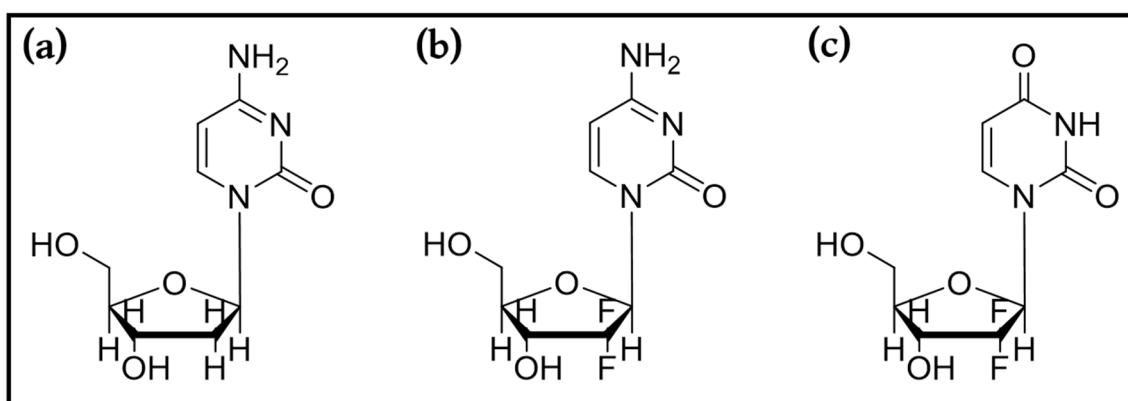


Fig. 30. Estructura química de nucleósidos y análogos. a) Desoxicitidina (dC), nucleósido natural, b) 2',2'-difluorodesoxicitidina (dFdC), agente quimioterápico análogo de dC y c) difluorodesoxiuridina (dFdU), principal metabolito de dFdC.

5.1.1.2. Entrada en la célula

La internalización celular de GEM está mediada por la familia de transportadores de nucleósidos. Estas proteínas transportadoras de membrana permiten la entrada de

nucleósidos, nucleótidos y también de este análogo de nucleósidos. Los transportadores de nucleósidos están clasificados en función de sus requerimientos de sodio en dos subtipos. Por un lado, se encuentran los transportadores de nucleósidos equilibradores humanos (hENT) independientes de sodio. Por otro lado, los transportadores de nucleósidos concentradores (CNT) dependientes de sodio. La GEM va a ser transportada mayoritariamente por los hENT, aunque algunos CNT también contribuyen en baja proporción (253,254). Debido a la naturaleza hidrófila de la GEM, se requiere la presencia de estos transportadores para poder pasar al interior celular donde se localiza su diana farmacológica (255). De hecho, se ha visto que los pacientes que presentan una alta expresión del principal transportador de la GEM, el hENT1, presentan un mejor pronóstico (256).

5.1.1.3 Formación de los metabolitos activos

La GEM es un profármaco que, una vez internalizado en la célula, requiere ser fosforilado para su activación. La deoxicitidina quinasa (dCK) es la principal enzima que cataliza este proceso. La primera fosforilación de GEM a GEM monofosfato (dFdCMP) por dCK constituye el paso limitante para las posteriores fosforilaciones que generan GEM difosfato (dFdCDP) y trifosfato (dFdCTP), las formas responsables de la citotoxicidad (257). Debido al importante papel de la dCK, la deficiencia de esta enzima ha sido descrita como un mecanismo de resistencia intrínseca a este fármaco (258). Por otro lado, la timidina quinasa 2, una enzima mitocondrial que también se encarga de fosforilar nucleósidos naturales, también puede llevar a cabo la fosforilación. Sin embargo, debido a la menor especificidad que presenta esta enzima por la GEM, su contribución será baja (251).

5.1.1.4 Mecanismo de acción

La eficacia de la GEM se debe a su capacidad de actuar sobre diferentes dianas intracelulares. dFdCTP actúa como inhibidor de la ADN polimerasa al ser incorporado como falso nucleótido al ADN y, así, inducir la terminación de la polimerización del ADN y la rotura de una sola hebra. Esto ocurre tras la incorporación de un nucleótido adicional, lo que determina la posición no terminal del dFdCTP que parece importante para impedir su detección por las enzimas de reparación del ADN. Es así como la incorporación de este análogo nucleosídico al ADN podría adquirir resistencia al mecanismo normal de reparación del ADN (259). Puesto que este proceso tiene lugar

en la fase S del ciclo celular, el dFdCTP es un agente específico de esta fase. Se ha visto que este nucleósido es retenido intracelularmente durante un tiempo lo suficientemente largo como para que la mayoría de la población celular atraviese un ciclo celular. Esta retención intracelular de dFdCTP durante largos periodos está relacionada con la sensibilidad al tratamiento (260).

La sinergia resultante de la combinación de este fármaco antitumoral con otros cuyo mecanismo de acción se basa en la inhibición de topoisomerasas sugiere su influencia a este nivel. Ritcher y cols. estudiaron los mecanismos moleculares que conducen a esta sinergia en el cáncer colorrectal y encontraron que GEM podría inducir la sobreexpresión de estas enzimas, principalmente de la topoisomerasa I (261).

El metabolito dFdCTP parece que también podría ser incorporado al ARN aunque aún no se conoce su implicación sobre la función celular (251).

Todos estos efectos descritos para la GEM van a estar acentuados por acciones farmacodinámicas adicionales de dFdCDP y dFdCTP. Estas acciones se conocen como mecanismos autopotenciadores y se basan en la inhibición de distintas enzimas. Los efectos resultantes consiguen prolongar la presencia intracelular de altas concentraciones de los metabolitos activos de GEM e inducir una disminución de la concentración de los metabolitos naturales. Ambas acciones, aumentan considerablemente la probabilidad de éxito de incorporación de los metabolitos de GEM en los ácidos nucleicos. El mecanismo de autopotenciación más importante es la inhibición por el dFdCDP de la enzima ribonucleótido reductasa. Esto causa la reducción de la reserva celular de dCTP y, por consiguiente, la disminución de su actividad inhibidora de dCK. De esta forma, no solo hay menor cantidad de dCTP disponible para la síntesis de ADN, también hay un aumento de la fosforilación de GEM. En consecuencia, se ve aumentada la incorporación de dFdCTP al ADN. También la inhibición de la enzima trifosfato de citidina (CTP) sintetasa y de la deoxicitidilato desaminasa por dFdCTP potencia el efecto de este fármaco al disminuir la presencia de dCTP y disminuir el metabolismo de dFdCTP, respectivamente (262).

Todos estos mecanismos celulares van a producir citotoxicidad mediante la inducción de apoptosis. Las vías de señalización que conducen a este tipo de muerte celular programada han sido investigadas principalmente en líneas celulares de cáncer pancreático cuya sensibilidad a la GEM es de especial interés debido a que la gran

sensibilidad que presenta contrasta con otros tratamientos. La activación de las caspasas parece contribuir en gran medida. Por otro lado, se ha visto que la GEM induce apoptosis en células tumorales a través de la activación de la proteína quinasa p-38 activada por mitógeno (263,264).

5.1.1.5 Inactivación y eliminación

Existen múltiples rutas de inactivación de GEM. Una de ellas es la desaminación de la dFdC a dFdU y de la dFdCMP a dFdUMP que produce la desoxicitidina desaminasa (dCDA) y la desoxicitidilato (dCMP) desaminasa, respectivamente. Pese a que la dCDA presenta la mitad de afinidad por la GEM que por su sustrato natural, su actuación constituye la principal forma de inactivación y posterior eliminación de GEM. Esta desaminación tiene lugar en el hígado y en la circulación sistémica mayoritariamente y puede producirse tanto en células sanas como tumorales (250,252,257). Es interesante destacar que, a pesar de todo esto, dCDA no parece tener un impacto significativo en la resistencia a este fármaco (265,266). De forma similar a la dFdC, dFdU puede ser captado por las células por la acción de transportadores nucleosídicos como, por ejemplo, el hCNT-1. Una vez dentro de la célula puede sufrir una serie de fosforilaciones que resultan en la formación de dFdUMP, dFdUDP y dFdUTP. Estudios *in vitro* han demostrado la posible incorporación de dFdUTP al ADN y al ARN y la inhibición de la timidilato sintasa por dFdUMP (267,268). Si bien estos estudios farmacodinámicos señalan la posible contribución de dFdUTP y dFdUMP al efecto citotóxico de GEM, ésta es aún cuestionable debido a los recientes estudios farmacocinéticos que revelan su pobre presencia intracelular (269).

Mientras que la fosforilación de GEM es la vía de activación principal de este fármaco, la desfosforilación va a contribuir a su desactivación. Tras la primera fosforilación de GEM a dFdCMP, se puede producir la desfosforilación de este monofosfato volviendo a ser transformado en el nucleósido dFdC oponiéndose a la acción de las enzimas nucleósido quinasas como, por ejemplo, la dCK (fig. 31). Las enzimas que catalizan dicha desfosforilación son las 5'-nucleotidasas (5'-NT). Las 5'-NT juegan un papel fundamental en el balance de las reservas de dNTP. Además de esto, su influencia sobre el paso limitante de la activación de GEM realza la importancia de estas enzimas para la consecución de una citotoxicidad suficiente. De hecho, se ha observado que su actividad aumenta en células resistentes a este fármaco (251,254,266).

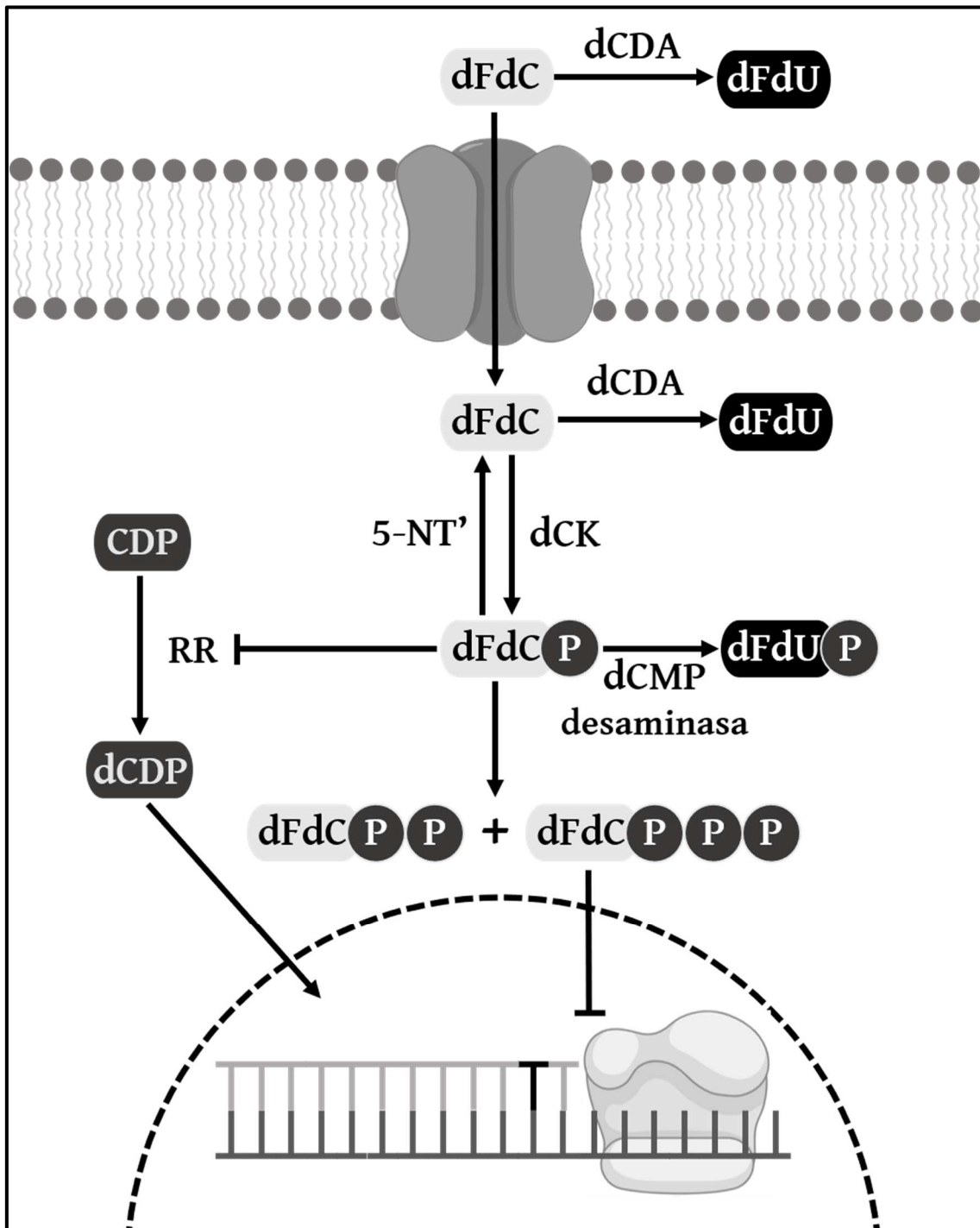


Fig. 31. Metabolismo de la GEM. Reacciones metabólicas que sufre la GEM una vez administrada por vía intravenosa y que permiten tanto su activación para interactuar con las diferentes dianas intracelulares como su inactivación para su posterior eliminación.

5.1.1.6 Tratamiento con gemcitabina

El uso clínico de la GEM está indicado en combinación con otros agentes quimioterápicos en pacientes con metástasis de cáncer de vejiga, de pulmón no microcítico, de carcinoma epitelial de ovario y de mama. También es utilizado en

monoterapia en el tratamiento de pacientes con adenocarcinoma del páncreas metastásico y en pacientes ancianos con cáncer de pulmón no microcítico metastásico. Con el objetivo de obtener un óptimo efecto terapéutico, una dosis de 1000 mg/m² (o 1250 mg/m²) de GEM es administrada en perfusión intravenosa durante 30 min. Aunque puede variar ligeramente según la indicación terapéutica y/o la posible combinación con otro agente quimioterápico, la administración se realiza semanalmente en ciclos de 3 semanas seguidos de una semana de descanso (270).

La perfusión intravenosa de GEM provee de un óptimo efecto terapéutico. Esto parece deberse a la acumulación de altas concentraciones intracelulares de dFdCTP, el principal metabolito activo de GEM. Se ha visto que este metabolito es retenido durante un tiempo suficientemente largo como para que la mayoría de la población celular atraviese un ciclo celular y, así, la fase S donde es activa la GEM. Esta retención intracelular de dFdCTP se debe también a la dosis administrada y la posología ya que esta acumulación celular de GEM parece ser saturable (250,251,262,269).

El éxito del tratamiento anticancerígeno con GEM puede verse comprometido como consecuencia de una insuficiente eficacia y/o seguridad. La necesidad de altas dosis se debe a su corto $t_{1/2}$. Como la mayor parte de la GEM administrada sufre una rápida metabolización. Esto supone un $t_{1/2}$ de entre 7 y 14 min (269,271). A esto hay que sumarle que su naturaleza hidrófila limita enormemente su internalización celular al uso de transportadores nucleosídicos por lo que su deficiencia de estos es un factor altamente limitante de la eficacia de este fármaco (ver apartado 5.1.1.2)(272). La GEM es bien tolerada por el paciente, pero debido a las altas dosis usadas se puede producir la aparición de toxicidad. Los cuadros de toxicidad hematológica y, en concreto, la mielosupresión con trombocitopenia y anemia, son los que limitan la posibilidad de aumentar la dosis. A pesar de esto, son los no hematológicos los que se producen con mayor frecuencia (por ejemplo, edema, toxicidad cutánea, disnea y toxicidad pulmonar) (273). Además, la elevada dosis de GEM también contribuye a aumentar la frecuencia de aparición de resistencias a este fármaco (254,258). Todas estas limitaciones apuntan a la clara necesidad de nuevas formas farmacéuticas que permitan una mejora en el perfil farmacocinético de este fármaco.

5.1.1.7 Nanopartículas de Gem

El fármaco y, en este caso la GEM, es el componente más importante del medicamento. Sin embargo, con frecuencia la administración de la forma libre de GEM no será útil sin un sistema de liberación adecuado. Los sistemas de liberación más ampliamente estudiados para la optimización del perfil farmacocinético de la GEM son los basados en NPs (250,252,274). Los nanotransportadores pueden ser de diferente naturaleza siendo los poliméricos uno de los más utilizados debido a las amplias posibilidades de modificación que ofrecen con el objetivo de conseguir la mayor parte de la liberación del fármaco en la masa tumoral. De entre los polímeros más utilizados para constituir la estructura básica de NPs, la PCL presenta una gran multitud de ventajas (ver apartado 2.1.2).

5.2. Metodología y resultados

La espectrometría de absorción molecular ultravioleta/visible (UV/Vis) es una técnica instrumental ampliamente utilizada para la cuantificación de una gran variedad de compuestos. Cuando la radiación electromagnética de la región de longitudes de onda comprendida entre 160 y 780 nm incide sobre un compuesto con una energía adecuada, ésta será absorbida por dicho compuesto lo que supondrá la promoción de un electrón a un estado excitado de mayor energía. Los parámetros que describen este proceso son la transmitancia (T) y la absorbancia (A). Sin embargo, ni la T ni la A van a poder ser medidas en el laboratorio. Esto es debido a las pérdidas por reflexiones en las interfases situadas entre el aire y la pared de la cubeta que contiene la disolución con el compuesto a determinar y entre esta pared y la disolución y de las pérdidas que se pueden dar por dispersión en la disolución. En su lugar, se determina la potencia del haz transmitido por una cubeta que contiene solo el disolvente (P_0) y por una cubeta con la disolución del analito (P), es decir, antes y después del proceso de absorción (Ec. 18).

$$A = -\log T = \log P_0/P \quad (18)$$

Cada compuesto presentará una absorción específica de radiación de determinadas λ que proporcionará información acerca de su composición y estructura. Conociendo el espectro de absorción específico de cada compuesto, se pueden realizar análisis cuantitativos. Esto se realiza mediante la aplicación de la ley de Lambert-Beer (Ec. 19):

$$A = abc = \epsilon bc \quad (19)$$

La ecuación 2, permiten relacionar de forma directa la A del compuesto a cuantificar con su concentración (c; g/L o mol/L). Para ello será necesario conocer el camino óptico de la radiación (b) o distancia recorrida por la radiación. La constante de absorptividad (a; $Lg^{-1}cm^{-1}$) o de absorptividad molar (ϵ ; $Lmol^{-1}cm^{-1}$) define la capacidad intrínseca del analito para absorber a una determinada λ . La utilización de una constante u otra va a determinar las unidades del valor de concentración obtenido.

Existen numerosos instrumentos para realizar las medidas de absorción de UV/Vis. Pueden estar constituidos por diferentes componentes los cuales determinaran el grado de complejidad. De forma general, presentan una fuente continua cuya potencia no cambia bruscamente en un intervalo considerable de longitudes de onda. El haz resultante (o haces si se utilizan divisores de haz), atravesará la cubeta que contiene la disolución con el compuesto a determinar. Las cubetas utilizadas deben de estar constituidas de un material que deje pasar la radiación de la región de UV/Vis como el cuarzo. Finalmente, la radiación emergente no absorbida podrá ser detectada por un dispositivo de lectura con la ayuda de un amplificador (98,275).

El espectrofotómetro utilizado en el presente trabajo de investigación fue un espectrofotómetro UV/Vis Lambda 25 (Perkin Elmer, Estados Unidos) de doble haz equipado con lámparas de deuterio y de halógeno que permite trabajar en el intervalo de longitudes de onda de 190 a 1100 nm. Las cubetas utilizadas eran de cuarzo.

5.2.1. Análisis cuantitativo de clorhidrato de gemcitabina mediante espectrofotometría ultravioleta-visible

El análisis cuantitativo de clorhidrato de GEM (fig. 32) mediante medidas de absorción se utilizó para determinar la capacidad de vehiculización de fármaco de las NPs de Fe_3O_4/PCL y $(Fe_3O_4/PCL)/Cs$.

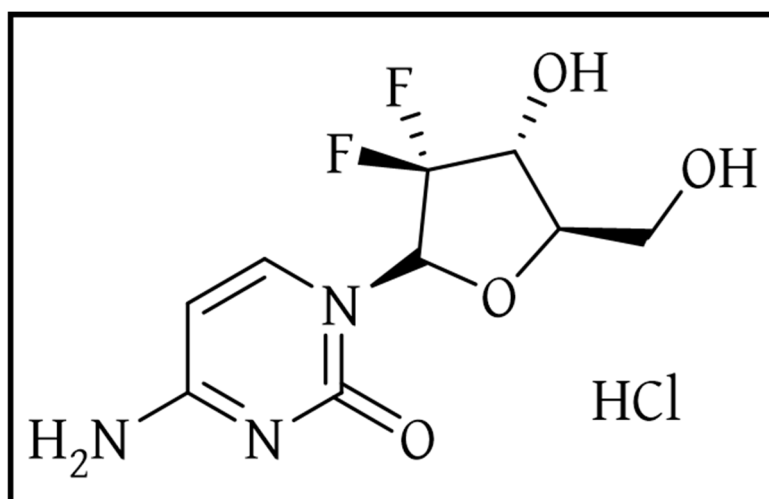


Fig. 32. Clorhidrato de gemcitabina. Estructura molecular del clorhidrato de gemcitabina.

El clorhidrato de GEM, con un peso molecular de 299,66, es estable a temperatura ambiente y soluble en agua (25 mg/mL) y en diferentes tampones (16 mg/mL y 15,3 mg/mL en tampón 5 y 7, respectivamente) (276,277). La determinación de clorhidrato de GEM tuvo lugar en diferentes disoluciones: agua bidestilada (pH 6.6), disolución acuosa tamponada con citrato con pH 7.4 ± 0.1 y disolución acuosa tamponada con citrato a pH 5 ± 0.1 . Por lo tanto, fue necesario tener en cuenta la influencia del pH de la disolución en el espectro de absorción en el barrido para seleccionar la λ donde se iba a producir el mayor pico de absorción, en la preparación de la curva de calibrado y en la validación del método. En este caso, se utilizó la metodología validada por el grupo de investigación para la cuantificación de clorhidrato de GEM en pH natural y pH 7.4 (278).

5.2.2. Validación del método espectrofotométrico para disoluciones aciduladas de clorhidrato de gemcitabina

Para establecer una metodología válida para la cuantificación de clorhidrato de GEM en pH 5 ± 0.5 se siguieron diferentes pasos. En primer lugar, se realizó un barrido de longitudes de onda de entre 200 y 500 nm para un rango de concentraciones de entre 10^{-5} M y 10^{-2} M (fig. 33).

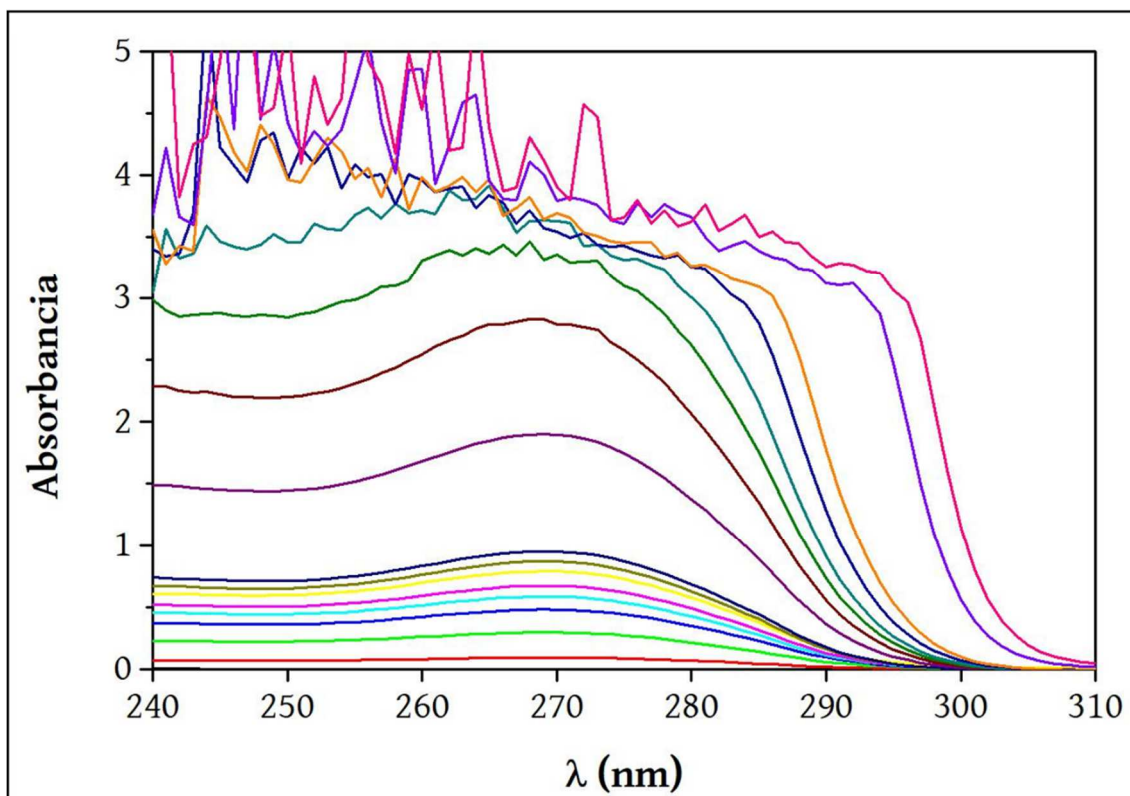


Fig. 33. Espectro de absorción de UV-Vis de disoluciones aciduladas ($\text{pH } 5 \pm 0.5$) de clorhidrato de gemcitabina. Las concentraciones molares de este principio activo en orden creciente de absorbancia son 10^{-5} M, 3×10^{-5} M, 5×10^{-5} M, 6×10^{-5} M, 7×10^{-5} M, 8×10^{-5} M, 9×10^{-5} M, 10^{-4} M, 2×10^{-4} M, 3×10^{-4} M, 4×10^{-4} M, 5×10^{-4} M, 7×10^{-4} M, 10^{-3} M, 5×10^{-3} M y 10^{-2} M.

Los resultados del barrido permitieron seleccionar 269 nm como la λ donde se producía el mayor pico de absorción (λ_{max}) en la mayoría de concentraciones de acuerdo con metodologías validadas previamente por el grupo de investigación así como otras publicadas para la determinación cuantitativa de este compuesto (59,193,277,278). Permitió, además, descartar concentraciones superiores a 3×10^{-4} M. En dichas concentraciones se observaban irregularidades en el espectro que imposibilitaban determinar la λ_{max} (fig. 33). Entonces, se procedió a comprobar que el rango de concentraciones seleccionadas cumplía la Ley de Lambert-Beer. Para ello, se determinó su absorbancia a la λ_{max} seleccionada ($n = 6$) y se realizó la regresión lineal de los datos obtenidos utilizando el método de los mínimos cuadrados. Este análisis permitió obtener el valor de ϵ y el coeficiente de correlación lineal (fig. 34). Este último determina la linealidad del método.

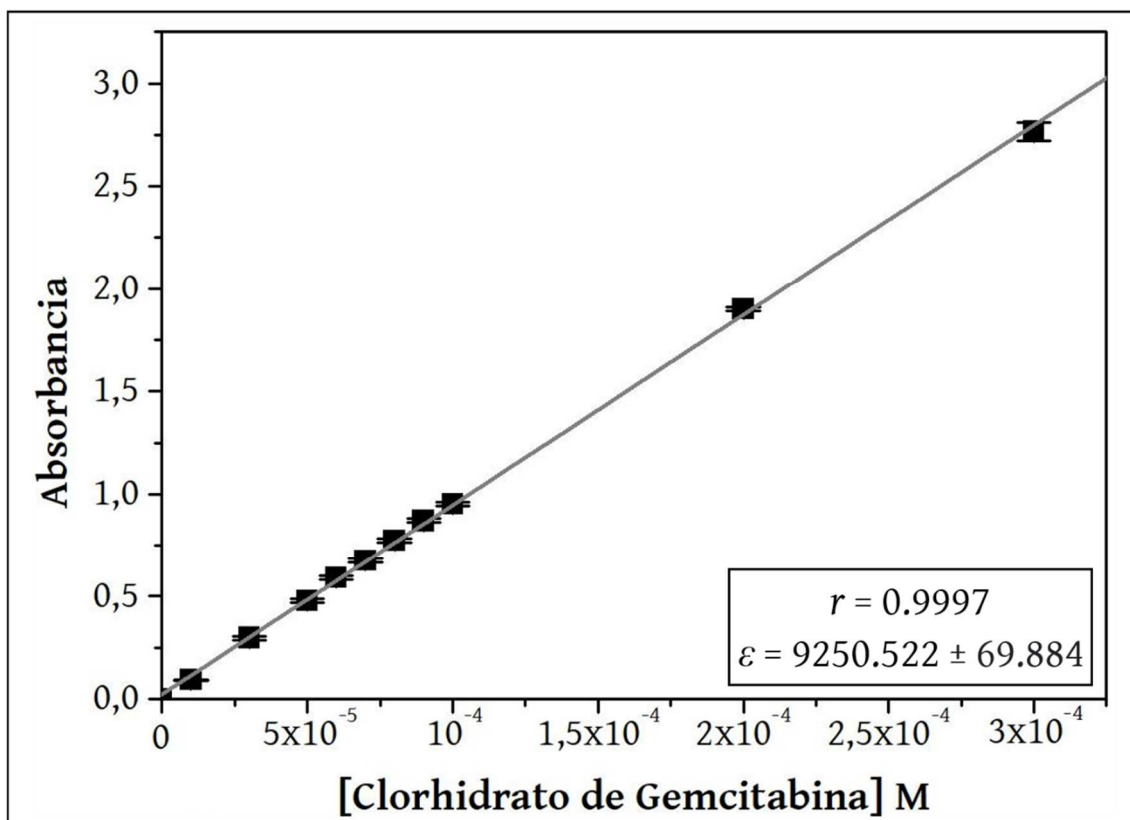


Fig. 34. Análisis de los datos de absorbancia de las disoluciones de clorhidrato de gemcitabina a pH 5 ± 0.5 . Representación de los datos de absorbancia obtenidos de disoluciones de clorhidrato de gemcitabina a pH 5 ± 0.5 de 10^{-5} M, 3×10^{-5} M, 5×10^{-5} M, 6×10^{-5} M, 7×10^{-5} M, 8×10^{-5} M, 9×10^{-5} M, 10^{-4} M, 2×10^{-4} M, 3×10^{-4} M ($n = 6$) y de la recta obtenida de su regresión lineal. Los coeficientes de correlación lineal (r) y de absorptividad molar (ϵ) aparecen indicados en la esquina inferior derecha.

Para completar la validación del método, se estudió su precisión y exactitud tal y como se muestra en la tabla 7 y 8, respectivamente. La precisión del método fue confirmada por la obtención de valores del coeficiente de variación (CV) $< 5\%$ (tabla 7) calculados con la Ec. 18 a partir de la media (\bar{X}) y la desviación estándar (σ) de los valores de absorbancia obtenidos:

$$CV = (\sigma/\bar{X}) \times 100 \quad (18)$$

Tabla 7. Evaluación de la exactitud del método espectrofotométrico. Absorbancia (A, media $\pm \sigma$) de las disoluciones de clorhidrato de gemcitabina de pH 5 ± 0.5 para cada una de las concentraciones (C) indicadas.

C (M)	A	CV (%)
-------	---	--------

10^{-5}	0.093 ± 0.003	4.44
3×10^{-5}	0.298 ± 0.009	3.12
5×10^{-5}	0.478 ± 0.008	1.75
6×10^{-5}	0.591 ± 0.010	1.64
7×10^{-5}	0.675 ± 0.008	1.25
8×10^{-5}	0.775 ± 0.011	1.46
9×10^{-5}	0.872 ± 0.009	1.01
10^{-4}	0.951 ± 0.009	0.84
2×10^{-4}	1.900 ± 0.009	0.46
3×10^{-4}	2.766 ± 0.043	1.57

Por otro lado, se pudo concluir que se trataba de un método exacto en todas las concentraciones estudiadas ya que el error relativo (ER) obtenido para cada una de ellas era < 5% (tabla 8). Los valores de ER se calcularon a partir de la concentración verdadera (C_V) y estimada (C_E) usando la siguiente ecuación (Ec. 19):

$$ER = [(C_E - C_V)/C_E] \times 100 \quad (19)$$

Tabla 8. Evaluación de la precisión del método espectrofotométrico. Comparación estadística de las concentraciones verdaderas (C_v) de clorhidrato de gemcitabina en disolución acidulada (pH 5 ± 0.5) con las concentraciones estimadas (C_E ; $\bar{x} \pm \sigma$) de las determinaciones espectrofotométricas mediante la determinación de los valores del error relativo (ER). También se representa el coeficiente de variación (CV) de la C_E .

C_v (M)	$C_E \times 10^{-5}$ (M)	ER (%)	CV (%)
10^{-5}	0.09 ± 0.08	2.73	3.48
3×10^{-5}	0.29 ± 1.21	1.82	4.05
5×10^{-5}	4.92 ± 1.09	1.07	2.22
6×10^{-5}	6.18 ± 1.11	2.86	1.80
7×10^{-5}	7.08 ± 1.03	0.93	1.46
8×10^{-5}	8.1 ± 1.06	0.73	1.31
9×10^{-5}	9.2 ± 1.09	1.57	1.19
10^{-4}	10.1 ± 1.06	0.11	1.05
2×10^{-4}	20.3 ± 1.13	0.07	0.55
3×10^{-4}	29.4 ± 0.35	3.53	0.71

5.2.3. Estudio de la incorporación de Gemcitabina en las Nanopartículas de Fe_3O_4 /PCL

Las características de la incorporación de un fármaco en una NP es un aspecto relevante para poder evaluar sus posibilidades como sistema de liberación controlada de fármaco (45,279). Los parámetros más ampliamente utilizados y que mejor describen la encapsulación de los sistemas nanotransportadores son la carga de fármaco (*drug loading*; DL %) y la eficacia de atrapamiento (*entrapment efficiency*; EE %) (Ec. 20 y 21, respectivamente):

$$DL (\%) = \left[\frac{\text{cantidad fármaco vehiculizado}}{\text{cantidad total del nanosistema cargado}} \times 100 \right] \quad (20)$$

$$EE (\%) = \left[\frac{\text{cantidad fármaco vehiculizado}}{\text{cantidad total fármaco utilizado}} \times 100 \right] \quad (21)$$

Con el objetivo de optimizar estos parámetros es importante determinar la etapa en la que el fármaco se incorpora. La carga de fármaco en un nanovehículo polimérico puede darse mediante la adición de fármaco en el momento de la formulación dando lugar a

la absorción del fármaco en la matriz o mediante la incubación con el nanovehículo previamente obtenido lo cual determina la adsorción superficial del fármaco (280). En la metodología de absorción, las condiciones de la formulación son de gran influencia sobre el *DL* y el *EE* resultantes (39,74).

Existen múltiples metodologías para determinar el *DL* y el *EE* que pueden ser clasificadas como metodologías directas o indirectas en función de si la cuantificación de fármaco se obtiene de la fracción de fármaco incorporada o no incorporada, respectivamente.

En el presente estudio se investigó la característica de la formulación de NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ cargadas con GEM evaluada fue la influencia de la concentración inicial de fármaco, el principal factor que influencia la captación de principio activo en la matriz de las NPs. Con tal fin, la GEM fue disuelto en la fase acuosa (concentración final de entre 10^{-5} a 10^{-3} M) donde se encontraban los coloides de Fe_3O_4 y el Kolliphor® P-188 de forma previa a la adición de la fase orgánica de PCL (ver apartado 2.2.1.2.). La determinación de los parámetros de *DL* y *EE* en cada una de las condiciones establecidas se realizó siguiendo una metodología indirecta y otra directa (fig. 35). La metodología indirecta utilizada consistió en la determinación de GEM residual en el sobrenadante mediante espectroscopía de UV-Vis una vez que las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ fueron separadas mediante la aplicación de un campo magnético externo (0.4 T, 10 min). Para eliminar posibles partículas restantes (por ejemplo, partículas de Fe_3O_4 y/o de PCL con una baja capacidad magnética), la muestra fue sometida a un ciclo de centrifugación (40 min a 9000 rpm; Micro 21R Microcentrifuge, ThermoFisher Scientific, Estados Unidos) (39,74). La metodología directa utilizada consistió en la determinación de GEM resultante de la digestión de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ cargadas con GEM. La digestión de las nanoplataformas magnetopoliméricas se realizó en varios pasos. Primero, las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ cargadas con GEM fueron aisladas mediante la aplicación de un campo magnético externo (0.4 T, 10 min). El sedimento resultante fue secado en una estufa a 35 ± 0.5 °C. En segundo lugar, se adicionaron 10 mL de un disolvente orgánico a la muestra y la dispersión resultante fue sonicada durante 30 min (Branson Sonifier 450, Emerson Electric Co., St. Louis, MO, USA). En concreto, el DCM fue seleccionado como disolvente orgánico apropiado para la digestión de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ cargadas con fármaco debido a la solubilidad de PCL en este (45). En tercer lugar, se realizó la extracción del fármaco con agua bidestilada (3×10). Las fases acuosas resultantes se

utilizaron para la determinación de clorhidrato de GEM mediante espectroscopía de UV-Vis ($n = 3$)(281,282).

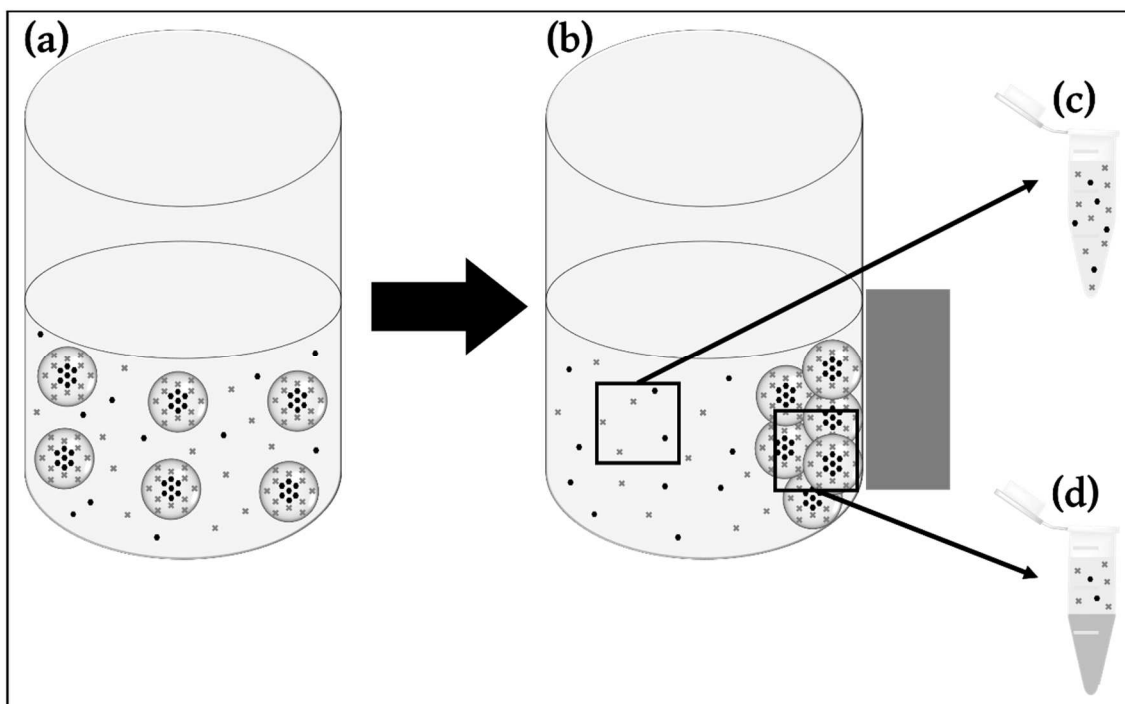


Fig. 35. Representación esquemática de la metodología directa e indirecta para la determinación de fármaco cargado de las nanopartículas de magnetita/poli-(ϵ -caprolactona). a) Dispersión resultante del procedimiento de obtención de las nanopartículas constituida por coloides de magnetita (partículas negras), clorhidrato de gemcitabina disuelto (cruces grises) y nanopartículas de magnetita/poli-(ϵ -caprolactona) (esferas grises). b) Separación de las nanopartículas de magnetita/poli-(ϵ -caprolactona) mediante la aplicación de un campo magnético externo (0.4 T). c) Fracción del sobrenadante obtenido en la etapa b). d) Fracción del sedimento magnético tratado para la extracción del fármaco encapsulado.

Los resultados de *EE* (%) y *DL* (%) obtenidos mediante la aplicación de la metodología directa e indirecta fueron muy similares. Sin embargo, los resultados obtenidos con la metodología directa fueron un poco superiores probablemente debido a la posible formación de NPs de PCL puras o con insuficientes núcleos de Fe_3O_4 cargadas con GEM que no pudieran ser tenidas en cuenta debido a su insuficiente atracción magnética (tabla 9). A pesar de esto, no se espera que sean relevantes debido al alto *R* ($\approx 90\%$).

Tabla 9. Comparación de la determinación de la incorporación de clorhidrato de gemcitabina mediante la metodología indirecta y directa. Los valores de eficacia de atrapamiento y carga de fármaco determinados por la metodología indirecta son indicados como EE_I (%) y DL_I (%) mientras que los de la metodología directa son indicados como EE_D (%) y DL_D (%). La concentración molar de clorhidrato de gemcitabina, [Gem] (M), hace referencia a la concentración de fármaco en la fase acuosa utilizada para el procedimiento de obtención de las nanopartículas de magnetita/poli-(ϵ -caprolactona cargadas con clorhidrato de gemcitabina.

[Gem] (M)	EE_I (%)	EE_D (%)	DL_I (%)	DL_D (%)
10^{-5}	12.232 ± 1.483	12.251 ± 1.482	0.016 ± 0.012	0.016 ± 0.011
5×10^{-5}	31.286 ± 1.014	29.662 ± 0.953	0.163 ± 0.013	0.151 ± 0.011
10^{-4}	56.007 ± 0.264	49.901 ± 0.202	1.094 ± 0.185	0.972 ± 0.161
5×10^{-4}	71.013 ± 0.994	65.654 ± 1.154	6.433 ± 1.141	5.941 ± 1.142
10^{-3}	87.468 ± 0.332	84.903 ± 0.142	11.174 ± 3.222	10.843 ± 3.171

La incorporación de GEM en la matriz de PCL se hipotetiza teniendo en cuenta el estudio electroforético de las partículas de PCL y Fe_3O_4 descrito en el capítulo 1. En concreto, debido a las fuerzas de atracción electrostáticas entre las cargas negativas de la PCL (≈ -20 mV a pH 6 ± 0.5) y las cargas positivas de los grupos amino protonados de la GEM (fig. 32). De esta misma forma, no se espera que el clorhidrato de GEM se incorpore al núcleo de Fe_3O_4 de las NPs debido a que presenta una carga eléctrica positiva (≈ 43 mV a pH 6 ± 0.5) al igual que la del fármaco lo que impediría una atracción electrostática entre ambos. Tanto los valores de tamaño como los de ζ para las NPs de Fe_3O_4 /PCL cargadas con GEM resultaron casi indistinguibles que los obtenidos para las NPs de Fe_3O_4 /PCL sin cargar (≈ 130 nm y ≈ -10 mV, respectivamente).

Como era de esperar, la concentración de fármaco inicial utilizada tiene una influencia claramente creciente sobre la capacidad de incorporación de fármaco (EE y DL , %). La capacidad de carga de fármaco resultante cuando se utilizó la concentración más alta de fármaco (10^{-3} M) resultó ser la altamente adecuada siendo los valores similares a los obtenidos para NPs puras de PCL cargadas con 5-fluorouracilo y considerablemente superiores que los obtenidos para nanosistemas magnetopoliméricos de GEM constituidas por una matriz de PLGA (283,284). Esto tiene especial relevancia ya que apunta a que la capacidad de carga de fármaco de las NPs magnetopoliméricas es

adecuada para el tratamiento quimioterápico. La cantidad de fármaco incorporado en el nanosistema está estrechamente correlacionada con la eficacia terapéutica ya que la respuesta farmacológica es una consecuencia de la dosis de fármaco administrada. Consecuentemente, una alta presencia de fármaco en el nanotransportador es esencial para desencadenar el efecto terapéutico y minimizar la cantidad de nanomateriales administrados (45,280).

5.2.3. Estudio de la citotoxicidad *in vitro* de las nanopartículas de magnetita/poli(ϵ -caprolactona) cargadas con gemcitabina

La naturaleza hidrófila de la GEM hace que la difusión simple a través de la membrana plasmática no pueda suceder. El acceso de este fármaco a su diana farmacológica se encuentra, por tanto, limitado por el uso de determinados transportadores siendo el principal transportador el hENT1 (250,254,255,272)(ver apartado 5.1.1.2.). La encapsulación de este fármaco en las NPs de Fe₃O₄/PCL podría aumentar su internalización celular mediante la endocitosis de dicho nanosistema. Con el fin de determinar la influencia de los nanosistemas desarrollados sobre el efecto farmacológico de este fármaco se realizó un ensayo de MTT siguiendo la misma metodología descrita en el apartado 3.2.1. utilizando la línea celular de adenocarcinoma humano de mama MCF-7. Esta línea fue escogida en base a los estudios de hipertermia donde se observó que los nanocompuestos desarrollados presentaban una mayor citotoxicidad sobre esta. Por un lado, se estudió la posible citotoxicidad de los nanocompuestos de Fe₃O₄/PCL en un amplio rango de concentraciones siendo la concentración máxima de 100 μ g/mL (fig. 36a). Por otro lado, se investigó la citotoxicidad de la Gem libre e incorporada en NPs de Fe₃O₄/PCL a diferentes concentraciones para así poder determinar la concentración capaz de producir el 50% de inhibición celular (IC₅₀) y, de esta forma, la potencia mostrada por la GEM en cada uno de los casos (fig. 36b).

La formulación de NPs de Fe₃O₄/PCL cargada con Gem inhibía la proliferación celular de forma dosis-dependiente, al igual que la Gem libre. Esta inhibición se debía únicamente al fármaco cargado y no a la NP *per se* ya que éstas no afectaban a la citotoxicidad en un amplio rango de concentraciones (fig. 36a). En comparación con la GEM libre, se obtuvieron valores de citotoxicidad de MCF-7 mayores en cada una de las concentraciones de fármaco ensayadas. La mayor potencia citotóxica de las NPs de

$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ cargadas con GEM fue confirmada con los valores de IC_{50} . Concretamente, la cantidad de Gem necesaria para la inhibición de un mínimo de 50% de las células de cáncer de mama estudiadas era de aproximadamente la mitad cuando se administraba incorporada en NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ (fig. 36b). Esto se debe probablemente a la mayor penetración celular de GEM cuando está incorporada en la NP. Esto puede ser explicado por la posible saturación de los transportadores de este fármaco, un factor que afectará en mayor medida en la entrada en forma libre. Esta mejora de internalización de fármaco facilitada por la captación celular de las NPs ya ha sido reportada en estudios previos (285,286).

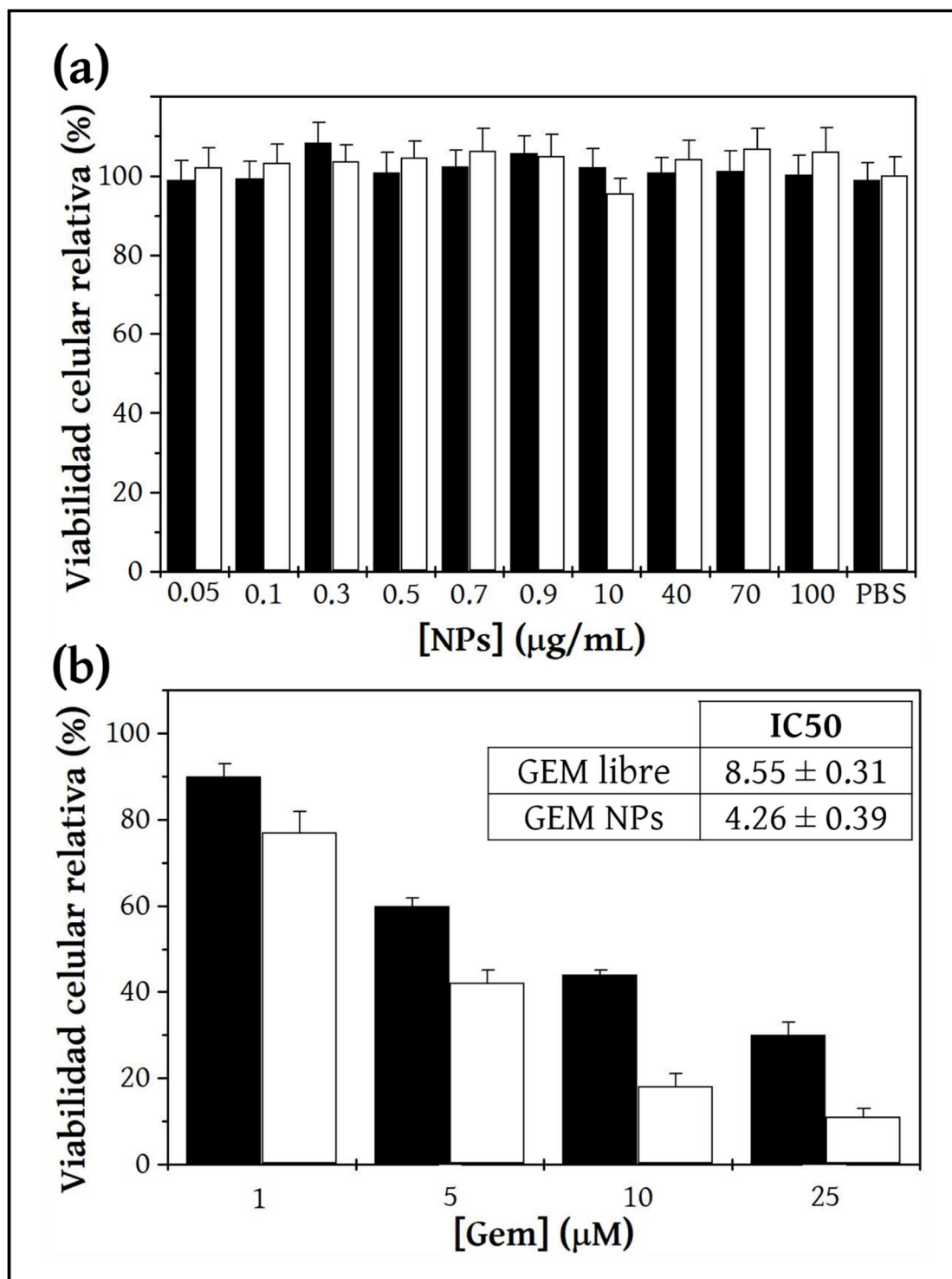


Fig. 36. Estudio de citotoxicidad *in vitro* de la gemcitabina cargada en las nanopartículas de Fe₃O₄/PCL sobre MCF-7. a) Determinación de la viabilidad celular relativa (%) a las 48 h (columnas negras) y 72 h (columnas blancas) en un amplio rango de concentración (0.05 – 100 µg/mL) utilizando como control una solución de PBS (sin NPs) (*n* = 3). b) Determinación de la viabilidad celular relativa (%) a las 72 h de concentraciones equivalentes de gemcitabina libre (columnas negras) y de gemcitabina cargada en nanopartículas de Fe₃O₄/PCL (*n* = 3). Tabla insertada con los valores resultantes de IC₅₀ de la gemcitabina libre y la gemcitabina incorporada en nanopartículas de Fe₃O₄/PCL.

5.2.4. Estudio de liberación *in vitro* de gemcitabina desde las nanopartículas de Fe_3O_4 /PCL y $(Fe_3O_4/PCL)/CS$

A pesar de que el fármaco es el componente más importante del medicamento, éste no será útil sin un sistema de liberación adecuado. La liberación de un fármaco con una cinética de liberación apropiada requiere de un alto entendimiento de las propiedades fisicoquímicas del fármaco y del material de liberación. Se han realizado avances significativos para manipular las propiedades de las NPs para que puedan ser administradas directamente en la sangre con la esperanza de que se pueda realizar la mayor parte de la liberación en el sitio de acción. Después de todo, el éxito del tratamiento del tumor entre otras cosas, depende de la habilidad del sistema de liberación de fármaco de alcanzar la diana (11).

Una de las principales limitaciones de la Gem es, precisamente, su desfavorable perfil farmacocinético. Una vez administrado, este fármaco va a sufrir una intensa metabolización mediante la desaminación llevada a cabo por la dCDA en el hígado y en la circulación sistémica mayoritariamente. Como resultado, este fármaco va a ser rápidamente inactivado y eliminado mostrando un corto $t_{1/2}$ lo que constituye una gran limitación para su uso clínico (6.1.1.5. Tratamiento con Gemcitabina) (252,253,257).

Existe una enorme variedad de polímeros biodegradables propuestos para el desarrollo de nanotransportadores. A pesar de sus posibilidades en esta área, será necesario tener en cuenta sus características fisicoquímicas para estudiar su potencial aplicación en el diseño de nanosistemas de liberación controlada de fármacos. Una de las estrategias más utilizadas para modular ciertas propiedades de los nanosistemas es la funcionalización. Un ejemplo son los nanosistemas de PCL cuya funcionalización con polímeros hidrófilos permite mejorar su estabilidad tal y como se ha demostrado en el capítulo de formulación y características fisicoquímicas (47,48).

Una estrategia muy importante para el control avanzado de la liberación de fármacos está constituida por la posibilidad de diseñar formulaciones capaces de responder a determinados estímulos. En concreto, la Nanotecnología Farmacéutica presenta una enorme variedad de nanosistemas inteligentes capaces de activar la liberación de fármaco de forma prácticamente exclusiva en el lugar diana por la presencia de determinadas condiciones intrínsecas de la región diana o creadas de forma externa afectando específicamente a ésta (28).

Para estudiar el perfil de liberación de Gem desde las nanoplataformas desarrolladas de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{Cs}$ se tuvo en cuenta las condiciones del tejido diana. El microambiente tumoral presenta ciertas diferencias respecto a tejidos fisiológicos. Una de las más destacadas es la mayor tasa metabólica que resulta en una mayor producción de protones. El control del pH intracelular es esencial para las funciones de la célula y, por ello, ante esta situación, las células cancerígenas promueven la salida de protones para el adecuado mantenimiento de éste. La masiva salida de protones al microambiente tumoral es lo que finalmente produce un medio ácido (29). Por otro lado, se conoce la entrada en la célula de las NPs está mediado por endocitosis. Las NPs van a ser internalizadas a través de la formación de vesículas que después dirigirán su tráfico celular. Las vesículas serán transformadas en endosomas tempranos y pueden llegar a constituir lisosomas. El contenido molecular de estas vesículas está caracterizado por presentar un ambiente ácido y con altas concentraciones de enzimas degradativas (287,288).

Dentro de las posibilidades de la liberación de fármaco en respuesta a estímulos también destacan aquellos que son generados de forma externa. Uno de los más utilizados es el aumento de calor en la región diana de forma que el nanosistema sea sensible a la temperatura producida. La hipertermia magnética es considerada como metodología para generar temperaturas capaces de degradar los nanosistemas de forma específica en la región diana (28). Así, el perfil de liberación de la Gem desde las nanoplataformas desarrolladas también ha sido estudiado en condiciones de hipertermia.

Las condiciones del medio de liberación seleccionadas eran diferentes en función de las características a simular. Se utilizaron dos tampones, uno de pH 7.4 ± 0.1 (tampón cítrico-fosfato) y otro de pH 5.0 ± 0.1 (tampón citrato-NaOH) para simular las condiciones de pH fisiológicas y del ambiente tumoral, respectivamente. La temperatura también fue determinada con la ayuda de baño maría y un termómetro según se quisiera simular la temperatura corporal 37.0 ± 0.5 ° C o la temperatura de hipertermia 46.0 ± 0.5 ° C. La liberación de Gem desde las NPs $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{Cs}$ se estudió en condiciones fisiológicas (pH 7.4 ± 0.1 y 37.0 ± 0.5 ° C), condiciones tumorales (pH 5.0 ± 0.1 y 37.0 ± 0.5 ° C) y condiciones de hipertermia (pH 7.4 ± 0.1 y 46.0 ± 0.5 ° C).

Todos los ensayos de liberación fueron realizados siguiendo el método de diálisis basado en la utilización de una bolsa de diálisis con un tamaño de poro de 2000 Da (Spectrum® Spectra/Por® 6 dialysis membrane tubing, USA) ($n = 3$). De esta forma, las bolsas de diálisis utilizadas permitían el paso del fármaco disuelto al medio de disolución mientras que las NPs eran retenidas en su interior. Las bolsas de diálisis fueron preparadas previamente mediante su incubación en las condiciones del medio de liberación durante 12 h. Entonces, 2 mL de una dispersión de NPs cargadas con Gem (2 mg/mL) se introdujeron en la bolsa y, tras esto, se sellaron los extremos. Las NPs seleccionadas para los ensayos de liberación fueron aquellas formuladas a partir de la máxima concentración inicial de Gem. Finalmente, fueron introducidas en 150 mL de medio de liberación apropiado bajo una agitación mecánica suave (100 rpm) ($t = 0$). La liberación de Gem fue monitorizada durante todo el experimento mediante la toma de muestras del medio de liberación y la posterior determinación de fármaco mediante espectroscopía de UV-Vis ya descrita. Para mantener las condiciones *sink* a lo largo del experimento, se restituyó con nuevo medio de liberación en las mismas condiciones.

La figura 37 recoge los valores de liberación de Gem desde las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$. Con respecto a liberación *in vitro* en condiciones de $\text{pH } 5.0 \pm 0.1$ y 37.0 ± 0.5 °C y $\text{pH } 7.4 \pm 0.1$ y 37.0 ± 0.5 °C, se observó un proceso bifásico característico de la matriz polimérica (289–291). En primer lugar, una fase de liberación rápida que probablemente se deba a la pérdida de fármaco asociado a la superficie o débilmente atrapado (hasta $\approx 40\%$ a $\text{pH } 7.4$, y $\approx 60\%$ a $\text{pH } 5.0$) tuvo lugar en las primeras 6 horas (fig. 37a) (39). Entonces, se obtuvo una liberación más sostenida de Gem durante las siguientes 124 h a $\text{pH } 7.4$, y 30 h a $\text{pH } 5$ (fig. 37b). La liberación lenta del fármaco en la fase sostenida podría deberse a que la PCL presenta un proceso de degradación muy lento en agua si se compara con otros polímeros debido a su carácter semicristalino (290,291). Además, el método de obtención escogido, la disposición interfacial de polímero, es el más efectivo para controlar la velocidad de liberación de fármacos (292). Este perfil de liberación sugiere que la mayor fracción de Gem es absorbida en la matriz polimérica de PCL. Se puede concluir que la liberación de Gem desde la matriz polimérica de PCL se encuentra estimulada en condiciones de pH ácido (fig. 37b) lo que podría estar asociado a una mayor tasa de hidrólisis de los enlaces éster de la estructura de PCL en este pH en comparación a lo que ocurriría en $\text{pH } 7.4$ (131,293). En cuanto a la liberación de GEM desde las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ en el medio de liberación con un pH de 7.4 ± 0.1 y 46.0 ± 0.5

° C, el perfil de liberación estaba constituido por una única fase rápida. En este caso, la degradación del polímero parece estar estimulada por el aumento de temperatura, algo ya observado en previos estudios (294). Una posible hipótesis para este comportamiento es que el aumento de temperatura supone el acercamiento al punto de fusión y a la temperatura de transición vítrea de este polímero lo que podría estimular la pérdida de rigidez de este sólido semicristalino (45,46,291). Probablemente, todo esto conduzca a que la liberación de Gem esté dirigida de forma prácticamente total por la matriz polimérica de PCL siendo la influencia de la funcionalización de CS mínima en el caso de las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ (fig. 38).

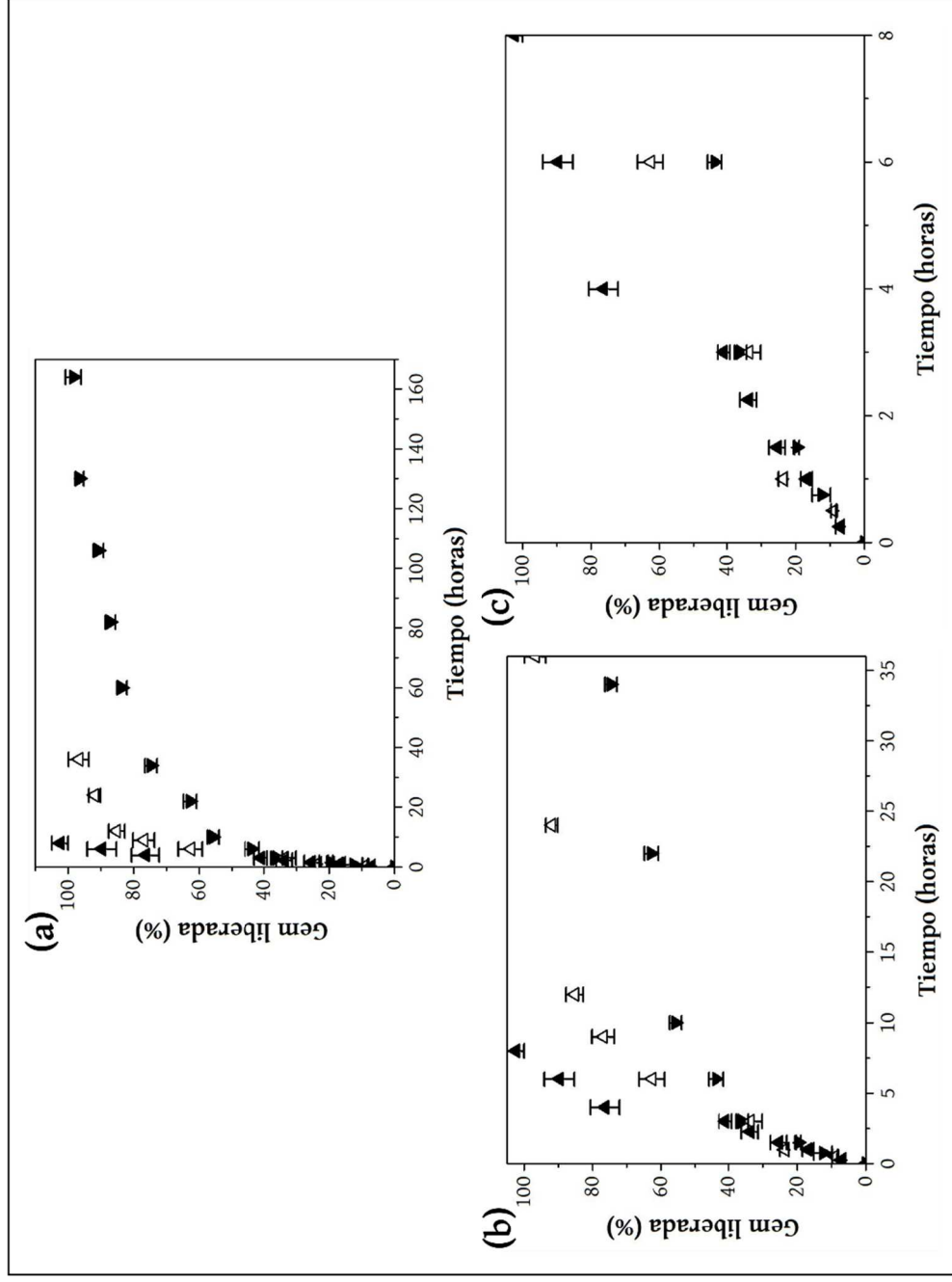


Fig. 37. Ensayos de liberación *in vitro* de gemcitabina desde las nanopartículas de Fe₃O₄/PCL. La cantidad de Gem liberada (%) en función del tiempo (horas) desde las nanoplataformas en condiciones de pH 7.4 ± 0.1 y 37.0 ± 0.5 °C (▼), pH 5.0 ± 0.1 y 37.0 ± 0.5 °C (△) y pH 7.4 ± 0.1 y 46.0 ± 0.5 °C (▲). a) Liberación de Gem (%) hasta t = 170 h, b) liberación de Gem (%) hasta t = 36 h y c) liberación de Gem (%) hasta t = 8 h.

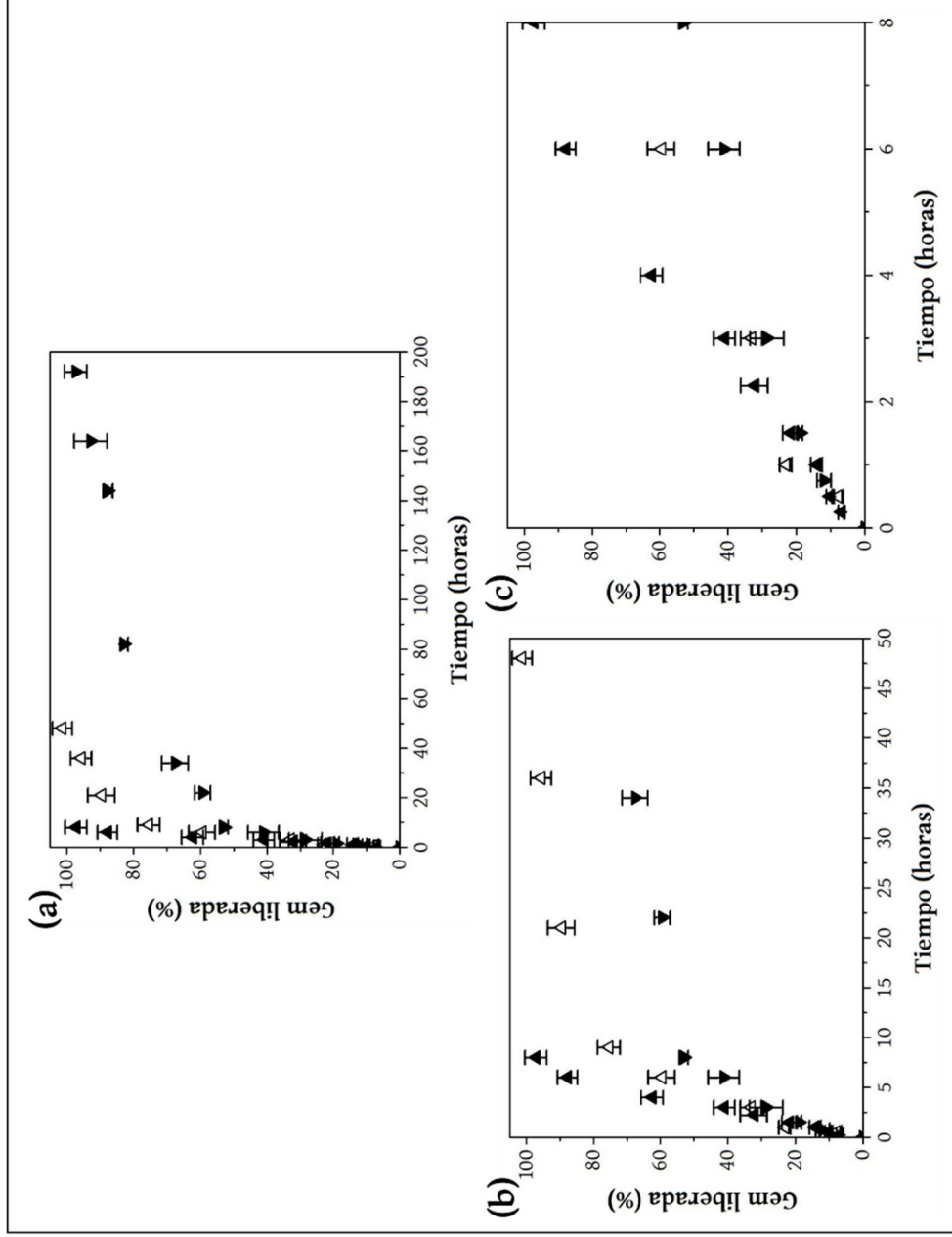


Fig. 38. Ensayos de liberación *in vitro* de gemcitabina desde las nanopartículas de (Fe₃O₄/PCL)/Cs. La cantidad de Gem liberada (%) en función del tiempo (horas) desde las nanoplataformas en condiciones de pH 7.4 ± 0.1 y 37.0 ± 0.5 ° C (▼), pH 5.0 ± 0.1 y 37.0 ± 0.5 ° C (△) y pH 7.4 ± 0.1 y 46.0 ± 0.5 ° C (▲). a) Liberación de Gem (%) hasta t = 170 h, b) liberación de Gem (%) hasta t = 36 h y c) liberación de Gem (%) hasta t = 8.

Estos ensayos demuestran que la utilización de la PCL permite conseguir una carga y liberación óptimas de Gem demostrándose así la importancia de su inclusión en el nanosistema.

Los nanosistemas resultantes de NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{Cs}$ asegurarían una menor aparición de efectos secundarios y/o cuadros tóxicos debido a la menor presencia de fármaco libre en el torrente sanguíneo lo que favorecería que mayor cantidad de fármaco alcanzase la diana farmacológica. Además, la liberación rápida y completa del principio activo en el tumor requerida para conseguir un tratamiento eficaz y evitar la aparición de resistencias estaría estimulada por el ambiente ácido del tumor y la aplicación de un campo electromagnético alterno a los nanosistemas desarrollados generándose hipertermia.

Capítulo 6

Agentes de contraste en
resonancia magnética de
imagen. Ensayo de
biodistribución

6.1. Introducción

Las técnicas de diagnóstico de imagen no invasivas son capaces de caracterizar y determinar *in vivo* estructuras anatómicas y eventos fisiológicos (295,296). De aquí radica su utilidad clínica en la evaluación de la mayoría de pacientes con tumores sólidos. No solo facilitan el diagnóstico y la estadificación, además van a ser esenciales para evaluar la respuesta al tratamiento. En este sentido, van a constituir herramientas claves para el diagnóstico de recurrencias y la identificación de complicaciones fisiopatológicas debido al avance de la enfermedad o a la toxicidad producida por el tratamiento (297).

Algunas de las herramientas para la obtención de imágenes más relevantes en el control del cáncer son la tomografía computarizada (TC), la tomografía por emisión de positrones combinada con tomografía computarizada (TEP/TC) y la RMI. En la actualidad, la TC es la modalidad más utilizada en clínica debido a su gran resolución de imagen. A pesar de esto, permite obtener una limitada información molecular y una baja resolución espacial a lo que hay que añadirle su alto coste. Por todo ello, las mejoras en imagen molecular en RMI y TEP/TC serán determinantes en la tendencia creciente de sustitución de TC (295,296,298).

En las últimas tres décadas, el surgimiento de nuevas estrategias para la optimización de las técnicas de diagnóstico de imagen ha supuesto un avance notable que queda reflejado en su entrada en un porcentaje bastante alto en estudios clínicos. De hecho, varios agentes de diagnóstico ya han conseguido ser aprobados y comercializados (299,300). Todos estos esfuerzos tienen como objetivo final la consecución de un diagnóstico de imagen que permita una detallada caracterización del tumor para identificar la patología en estadios poco avanzados y no invasivos. Además, abren la posibilidad para una monitorización a tiempo real que permita mejorar las estrategias de tratamiento de la enfermedad contribuyendo, por lo tanto, a un enfoque clínico más personalizado (16,295,301).

Fue en 1973 cuando Paul C. Lauterbur y Peter Mansfield dieron los primeros pasos de la RMI. Desde entonces, se ha producido un tremendo desarrollo que posiciona a esta técnica como la modalidad de imagen *in vivo* más versátil. Presenta la capacidad de, con una excelente resolución espacial, conseguir información anatómica, fisiológica y metabólica en una única sesión. Lo hará mediante la utilización de radiación no

ionizante de excelente penetración en el cuerpo humano aunque inofensiva para éste (302,303).

El principal obstáculo de la RMI es su menor sensibilidad con respecto a otras modalidades. Los agentes de contraste de RMI convencionales presentan una sensibilidad superior a la de aquellos de TC aunque significativamente inferior a la de los usados para TEP (296,302). Los nuevos agentes de contraste de RMI, constituidos por nanomateriales, presentan un enorme potencial para superar esta limitación como se está demostrando con su exponencial aplicación en clínica e investigación traslacional (300,304).

6.1.1. Principios físicos de la resonancia magnética de imagen

La RMI es una tecnología compleja que se fundamenta en la mecánica cuántica para producir imágenes. Específicamente, se basa en el fenómeno de resonancia magnética nuclear. Esto es, en la habilidad que presentan los núcleos atómicos para absorber y emitir energía de radiofrecuencia al aplicar un campo magnético. El átomo escogido, y al que se debe la eficiencia de la técnica, es el hidrógeno. El hidrógeno es el átomo más abundante del organismo ya que conforma el contenido acuoso así como otros componentes como la grasa corporal (los núcleos de hidrógeno ^1H representan un 63% del organismo) (302,305).

El núcleo de hidrógeno está formado por un único protón con una carga positiva. Este protón se encuentra constantemente girando de forma que la carga positiva gira con él generando una corriente eléctrica que origina un campo magnético y presenta un momento magnético propio (Fig. 39a). Cuando se aplica un campo magnético (B_0), el momento magnético del protón que se encontraba orientado aleatoriamente sin presencia del campo magnético, pasa a quedar alineado con la presencia de este (Fig. 39b).

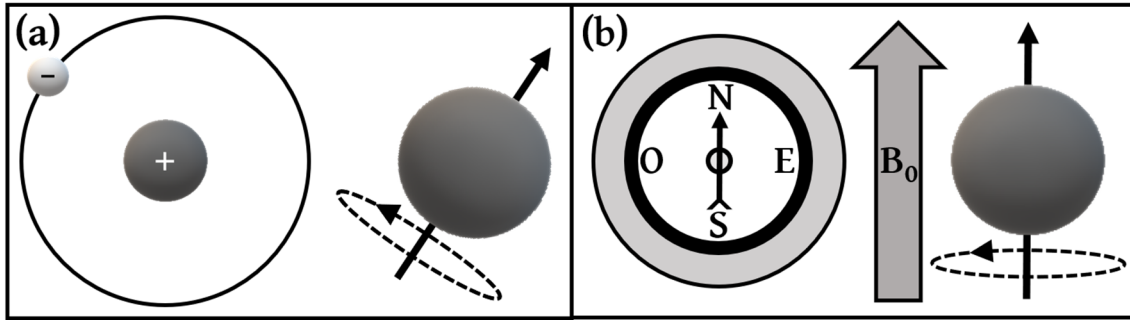


Fig. 39. Comportamiento del protón del átomo de hidrógeno. a) Un átomo de hidrógeno está formado por un núcleo constituido por un único protón y un electrón alrededor de este. El protón se comporta como un pequeño imán debido a que gira formando un campo magnético y presenta un determinado momento magnético. b) En presencia de un campo magnético (B_0), el momento magnético del protón se alinea con este al igual que la aguja de una brújula se alinea con el campo magnético terrestre.

La alineación del protón con B_0 se puede producir en paralelo (posición *up*) o antiparalelo (posición *down*), las dos posiciones posibles del spin del hidrógeno según la mecánica cuántica (Fig. 40a). Como a la posición *up* presenta una energía ligeramente menor a la posición *down*, que será por ello la forma más susceptible de adoptar (Fig. 40b).

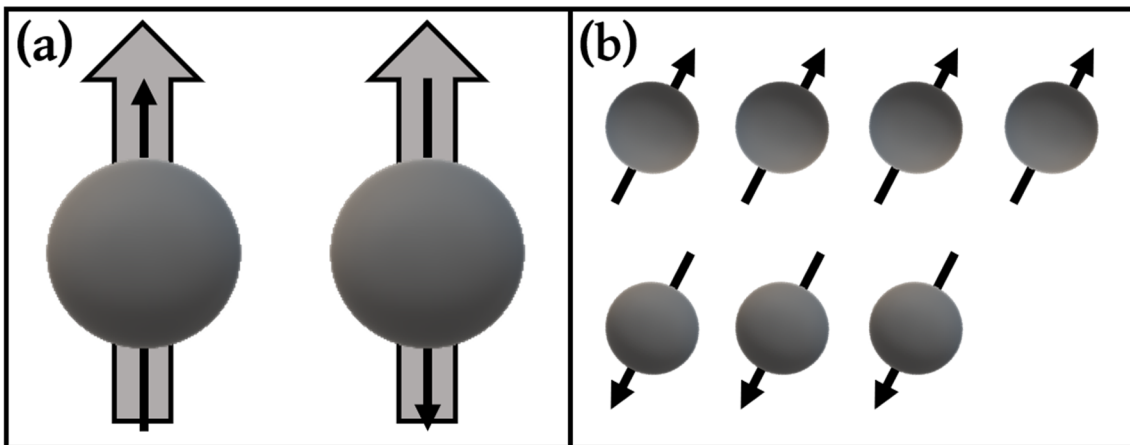


Fig. 40. Posibles formas de alineación de los protones ante la presencia de un campo magnético externo B_0 . a) Posición *up* y *down*. b) La distribución de los protones entre las posibles posiciones de alineamiento siendo más numerosa el estado del protón en posición paralela o *up*.

Cuando un protón se alinea con el campo magnético externo en paralelo y, otro protón lo hace en antiparalelo, se anulará el momento magnético de ambos. Así, para tener un momento magnético se requiere que exista cierta polarización, esto es, un número de spin diferente para la posición *up* y *down* (Fig. 40). La polarización va a determinar la

suma del campo magnético o suma de magnetización. Esta es conocida como magnetización longitudinal ya que se refiere a la magnetización que se produce en la dirección del campo magnético principal B_0 en el eje longitudinal (eje Z).

La precesión o el movimiento de precesión es el movimiento circular resultante de la interacción del momento magnético del protón y el campo magnético (Fig. 41a). El hecho de que los protones se alineen con B_0 conlleva a este movimiento particular que se adiciona al movimiento de rotación que produce el protón alrededor de su momento magnético (Fig. 41b).

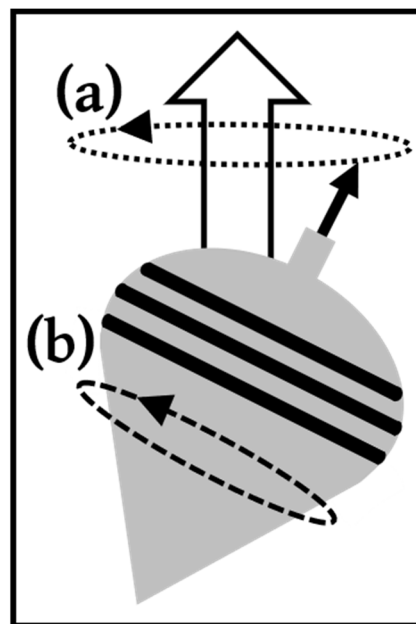


Fig. 41. Representación del movimiento de un protón ante la aplicación de un campo magnético. a) De forma similar al movimiento de cabeceo de una peonza debido a la influencia del campo magnético terrestre, cuando se le aplica B_0 a un protón, se produce un movimiento de precesión. b) El movimiento de precesión estará acompañado por el movimiento de rotación o giro propio del protón.

El movimiento de precesión se produce a una frecuencia conocida como frecuencia de Larmor o de resonancia, esto es, el número de veces que el protón gira por segundo y está determinado por la ecuación de Larmor (Ec. 22):

$$\omega_0 = \gamma B_0 \quad (22)$$

En RMI, la Ec. 22 determina que la frecuencia de Larmor (ω_0 ; MHz) va a estar influenciada por el cociente giromagnético nuclear (γ ; MHz/T) y B_0 (T). Puesto que el cociente giromagnético nuclear es igual para todos los protones de hidrógeno, se

establece una relación proporcional de la frecuencia de Larmor con la fuerza del campo magnético.

Ante la aplicación de un campo magnético se produce, debido a las singularidades del entorno bioquímico, una ligera diferencia entre las frecuencias de precesión de los protones. Lo que ocurre es que los núcleos de los átomos del entorno molecular del hidrógeno generarán pequeños campos magnéticos que van a influenciar levemente al núcleo del hidrógeno debido a que producen una pequeña alteración de la homogeneización de B_0 . Es por ello que los protones de una muestra van a encontrarse en desfase (302,306).

En la RMI, además de establecerse un campo magnético principal con los efectos sobre los átomos de hidrogeno de la muestra ya comentados, se presenta otro componente esencial, el gradiente de radiofrecuencia. Este componente va a generar pulsos de radiofrecuencia que se activan y se desactivan con el objetivo de alterar la orientación del campo magnético de los protones para que dejen de estar alineados con B_0 generando cambios en la polarización. Cuando el gradiente de radiofrecuencia es aplicado desde el plano transversal y emite a una frecuencia igual a la frecuencia de Larmor, los núcleos entran en resonancia (Fig. 42). Este es el fenómeno que le da el nombre a la técnica de RMI ya que genera los cambios suficientes para que se pueda detectar la señal que pueda ser transformada en información útil sobre la muestra. En concreto, la resonancia es el resultado de la absorción de energía por parte de los protones que se verá reflejado en un cambio de su comportamiento magnético. Por un lado, la adquisición de energía supondrá el paso de un estado paralelo (menor energía) a antiparalelo (mayor energía) (Fig. 42b). Esto va a hacer que la diferencia del número de protones entre ambos estados disminuya y, por consiguiente, también lo haga la suma de sus momentos magnéticos. Al igualarse los spines en posición *up* y *down* se llega a lo que se denomina estado de saturación. El segundo efecto que produce sobre los protones será sobre su movimiento de precesión. El fenómeno de resonancia va a corregir el desfase de los protones debido a que genera un efecto sobre su movimiento de precesión haciendo que estos presenten la misma dirección en el mismo momento (misma velocidad o frecuencia) alineándose, así, en la frecuencia de Larmor (Fig. 42c). El cambio de movimiento de los protones al entrar en resonancia supone una separación respecto a la posición de equilibrio, siendo la posición de equilibrio la alineación con B_0 . Entonces, la posición estará caracterizada por un ángulo de

inclinación respecto a este que dependerá de la potencia y del tiempo de emisión. Este cambio en la magnetización resultante se denomina magnetización transversal.

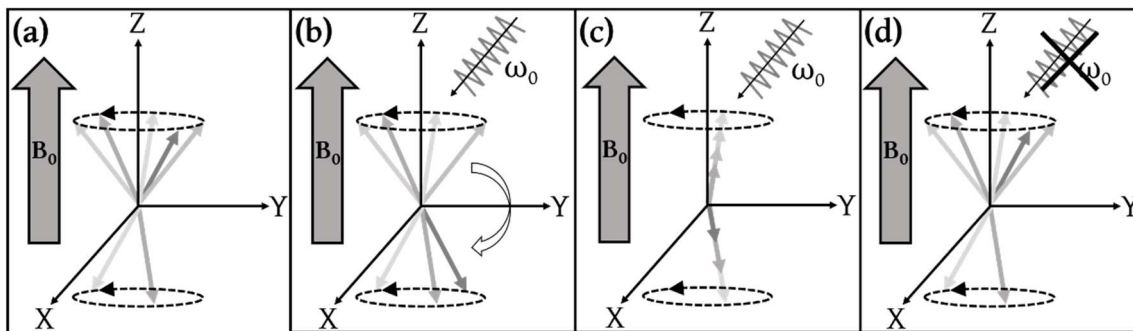


Fig. 42. Fenómeno de RMI. a) Protones ante la aplicación de un campo magnético B_0 caracterizados por diferente frecuencia de Larmor (desfase), mayor número en posición *up* que *down* y con una contribución de todos ellos a la magnetización longitudinal. b) Cuando se aplica un pulso de radiofrecuencia se va a generar la absorción de energía por parte de los protones dando lugar al salto del estado *up* de menor energía al estado *down* de mayor energía. c) Cuando se aplica un pulso de radiofrecuencia y este presenta una frecuencia igual a la frecuencia de Larmor, se va a inducir que los protones presenten una frecuencia igual a la de Larmor por lo que pasan a estar en fase. Estos cambios van a determinar su contribución a la magnetización longitudinal, pero también a la transversal. d) Protones ante la aplicación de un campo magnético B_0 tras la desactivación del pulso de radiofrecuencia cuando vuelven a entrar en desfase y se presentan con mayor probabilidad en una posición paralela o *up* respecto a B_0 . Las flechas grises simbolizan el comportamiento de los protones.

La magnetización longitudinal resulta de la aplicación de un campo magnético B_0 mientras que la magnetización transversal se da por la aplicación del pulso de radiofrecuencia. La magnetización transversal será esencial para la RMI ya que supone una corriente eléctrica que será recogida por una antena receptora y con la que se podrán obtener las imágenes. Sin embargo, la señal medible no será producto del paso al estado de mayor energía de los protones. Al contrario de esto, la vuelta al estado de equilibrio de menor energía que sigue a la desactivación del pulso de radiofrecuencia será el fenómeno determinante. La información resultante estará influenciada por la densidad de los núcleos de hidrógeno existentes, pero también por las características de su entorno histoquímico.

El proceso de retorno a la magnetización longitudinal de equilibrio tras la excitación en resonancia con un pulso de radiofrecuencia queda descrito por la constante de

relajación longitudinal o tiempo de relajación T_1 para un pulso de 90° siendo M_z la magnetización en el eje Z y M_0 el valor de la magnetización en equilibrio.

El intercambio energético del núcleo de hidrógeno con su entorno depende del tipo y la movilidad de las moléculas que lo componen. Debido a que la energía liberada será del mismo orden que la que utilizan las moléculas para producir su movimiento browniano, el intercambio energético estará correlacionado con el tipo y la cantidad de movimiento que éstas presenten. En otras palabras, el movimiento del ambiente molecular del protón determinará la capacidad de absorber la energía o, lo que es lo mismo, el grado de dificultad que este presentará para liberarla. Para ser más exactos, el T_1 equivale al tiempo transcurrido a partir del pulso de RF inicial hasta que se recupera un valor de $1-e^{-1}$ de la magnetización y es dependiente de la fuerza del campo magnético externo longitudinal (Fig. 43a). Por los motivos expuestos anteriormente, no todos los protones van a presentar la capacidad de hacerlo con la misma velocidad siendo entonces un proceso continuo cuya representación genera una curva exponencial de donde podemos obtener la constante que describe la rapidez del proceso, el tiempo de relajación longitudinal (T_1) y la tasa de relajación longitudinal ($1/T_1$).

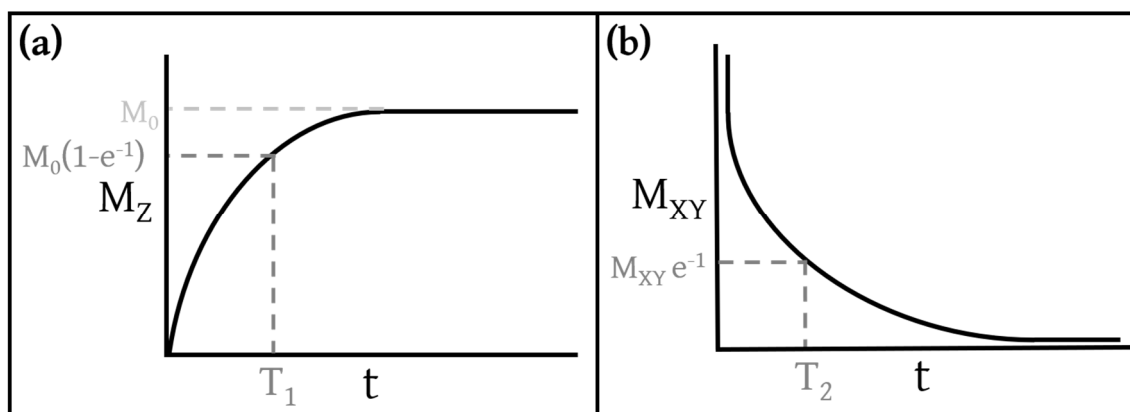


Fig. 43. Representación gráfica del tiempo de relajación longitudinal (T_1) y transversal (T_2). a) Curva de relajación longitudinal (T_1). b) Curva de relajación transversal (T_2).

La relajación T_1 que se produce como consecuencia de los cambios de magnetización longitudinales va a darse de forma simultánea a la relajación transversal (T_2). A diferencia de la T_1 y T_2 describe el proceso que sigue a la desactivación de la emisión del pulso de RF que producirá, en última instancia, la anulación de la magnetización transversal. Tal y como hemos visto, los protones de la muestra ante un campo

magnético externo principal y, por la afectación local de los pequeños campos magnéticos de los átomos de alrededor (interacción spin-spin), van a presentar una frecuencia ligeramente diferente a la de Larmor (desfase). Estas diferencias inducidas por el entorno local de cada protón hacen que se encuentren en desfase. Por el contrario, la aplicación de un pulso de RF a la frecuencia de Larmor, acabará con estas diferencias y, así, conseguirá la coherencia de fase. A pesar de que tras la aplicación del pulso de RF entran en fase, será inmediatamente después de su finalización cuando tenga lugar un desfase progresivo. En este, los protones liberarán la energía adquirida con el pulso de RF a una frecuencia que depende del campo magnético que percibe localmente. La magnetización transversal resultante sufrirá una evolución decreciente por un factor de e hasta llegar un momento en el que se anula (Ec. 23). La representación gráfica es, por tanto, una curva exponencial decreciente (Fig. 43b).

$$M_{XY} = M_{XY0} e^{-t/T_2} \quad (23)$$

A nivel experimental, se obtiene un tiempo de pérdida de magnetización transversal menor al esperado de forma teórica. De aquí que T_2 sea considerado como el parámetro teórico que no tiene en cuenta que el campo magnético principal no es absolutamente homogéneo. Existirán factores que afectarán a la homogeneidad del campo magnético que pueden ser propios o intrínsecos del campo magnético externo o bien de las influencias que produce el propio tejido u otros materiales localizados dentro del campo. Por lo tanto, será el parámetro de tiempo de relajación transversal experimental (T_2^*) el que sí tenga en cuenta los factores descritos (Ec. 24).

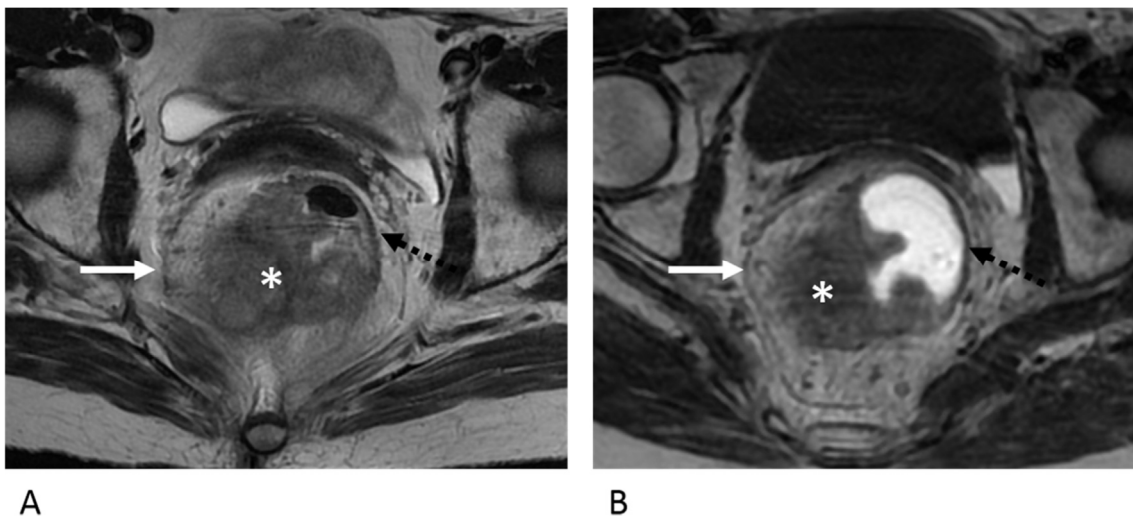
$$1/T_2^* = 1/T_2 + \gamma \Delta B_0 \quad (24)$$

Esta ecuación expone como T_2^* se diferencia de T_2 por un valor resultante a las heterogeneidades del campo magnético (ΔB_0) por el cociente giromagnético (γ) (302,305–307).

6.1.2. Agentes de Contraste en Resonancia Magnética de Imagen

Uno de los requisitos fundamentales para las técnicas de diagnóstico de imagen es el adecuado contraste. El contraste de MRI es el resultado de la contribución de parámetros extrínsecos como, por ejemplo, la fuerza del campo magnético B_0 e intrínsecos como T_1 , T_2 y T_2^* . Una mayor fuerza del campo magnético B_0 va a permitir una mayor sensibilidad debido a que contribuye a la mejora de la relación señal/ruido

y a la resolución espacial y temporal de las imágenes obtenidas. Los campos magnéticos que se utilizan actualmente en la clínica suelen ser de entre 1.5 y 3 T. Sin embargo, ya se ha aprobado el uso en la clínica de RMI con campos magnéticos de hasta 7 T. En estudios preclínicos ya se están usando sistemas de RMI con campos magnéticos de intensidad de hasta 10.5 T (308). En cuanto a los parámetros intrínsecos, estos últimos dependerán del agente de contraste (309). La técnica de RMI presenta como agente de contraste endógeno los protones del átomo de hidrógeno (305). En concreto, la relajación magnética nuclear de los protones será lo que determine la aparición de una señal característica para cada microambiente biológico (apartado 9.1.1.). Por ejemplo, las modificaciones en los valores de T_2 de la fisiología colorrectal son útiles para el diagnóstico y la estadificación del cáncer colorrectal. Pese a que las imágenes médicas obtenidas con RMI por sí sola son bastante detalladas, la realización de un diagnóstico basado únicamente en estas puede ser poco preciso debido a las escasas diferencias en el tiempo de relajación que presentan los tejidos patológicos de los sanos (Fig. 44)(310,311).



A **B**
Fig. 44. Imágenes T_2 obtenidas por RMI sin agentes de contraste exógenos. Tanto en la imagen A como en la imagen B se observa una masa tumoral rectal (flecha blanca) que se expande más allá de la pared rectal (flecha negra). Reproducido de Moreno y cols. 2017. Copyright Elsevier 2017.

No obstante, se pueden utilizar agentes de contrastes exógenos para aumentar las diferencias de intensidad de señal entre determinados tejidos mejorando considerablemente la sensibilidad de esta técnica y, proporcionando, así, un alto valor diagnóstico (311). Su mecanismo de acción depende de su interacción con los protones

de hidrógeno que les rodean. Concretamente, su eficacia dependerá de su relajatividad longitudinal (r_1) y transversal (r_2) que quedará definida por el aumento de relajación de los protones (Ec. 24 y 25) producida por $1 \text{ s}^{-1}\text{mmol}^{-1}\text{L}$.

$$r_1 = 1/T_1 \quad (24)$$

$$r_2 = 1/T_2 \quad (25)$$

Los valores de r_1 y r_2 dependerán de las características fisicoquímicas del agente de contraste además de la accesibilidad de los protones de hidrógeno al centro magnético (Ec. 26):

$$R_{i(\text{obs})} = 1/T_{i(\text{obs})} = 1/T_{i(\text{diam})} + r_i C; i = 1 \text{ o } 2 \quad (26)$$

siendo $R_{i(\text{obs})}$ y $1/T_{i(\text{obs})}$ la relajatividad total del medio (s^{-1}), $1/T_{i(\text{diam})}$ la relajatividad del medio previamente a la adición del agente de contraste, r_i y C la concentración del agente de contraste (mmol/L)(312).

Atendiendo a las propiedades magnéticas, los agentes de contraste se dividen en dos grupos principales: agentes de contraste paramagnéticos y agentes de contraste superparamagnéticos. Los agentes de contraste paramagnéticos modifican r_1 conduciendo a un aumento de la señal en imágenes ponderadas en T_1 preferentemente. Por esta razón son agentes de contraste positivos que producen una señal brillante. Por otro lado, los agentes de contraste superparamagnéticos de este tipo son capaces de modificar r_2 de forma que afectan predominantemente a las imágenes ponderadas en T_2 . Por ello, se les dominó agentes de contraste T_2 aunque desde entonces también se han sintetizado agentes de contraste superparamagnéticos como agentes de contraste T_1 y T_2 eficaces. Son agentes de contraste negativos por obtener imágenes oscuras (305,309,311).

Desde el establecimiento de esta técnica hasta la fecha ha existido siempre una intensa investigación enfocada al desarrollo de nuevos agentes de contraste (309). De hecho, desde finales de los años 80, se han comercializado más de 20 agentes de contraste exógenos de RMI (tabla 10). Los agentes de contraste convencionales son iones metálicos con carácter paramagnético debido a que presentan electrones desapareados con un cociente giromagnético muy superior al del protón. Ejemplos de estos son el manganeso (Mn^{2+} y Mn^{3+}) y el gadolinio (Gd^{3+}). Los agentes de contraste con gadolinio son los más abundantes y más utilizados en el ámbito clínico debido a que presenta el

mayor número de electrones desapareados (tabla 10). De hecho, el ácido gadopentético, comercializado en el año 1987, fue clave para el desarrollo de esta primera generación de agentes de contrastes (299).

Tabla 10. Agentes de contraste de RMI comercializados. SNC: sistema nervioso central. *Retirado del mercado

Nombre comercial	Composición química	Propiedades magnéticas	Contraste	Biodistribución	Indicación
Magnevist®*	gadopentetato de dimeglumina	Paramagnetismo	T ₁ , positivo	Extracelular	SNC y otras regiones corporales
Dotarem®	gadoterato de meglumina				
Prohance®	gadoteridol				
Omniscan®*	gadodiamida				
Gadovist®	gadobutrol				
Clariscan®	Ácido gadotérico				
Multihance®	gadobenato de dimeglumina				
Optimark®*	gadoversetamida				
Primovist®	Gadoxetato sódico				
Vasovist® / Ablavar®**	Gadofosveset trisodio				
Resovist®*	Ferucarbotran	Superparamagnetismo	T ₂ , negativo	Sistema fagocítico mononuclear	Nódulos linfáticos
Sinerem® / Combidex®*	Ferumoxtran				
Lumirem® / Gastromark®*	Ferumoxsil	Abdomen, pelvis y retroperitoneo			
Feridex®*	Ferumoxido				

La administración intravenosa de quelatos de Gd^{3+} favorece su eliminación vía renal por filtración glomerular pasiva. La mayoría de estos presentan una biodistribución extracelular que determina su corto $t_{1/2}$ deseado para evitar la alta toxicidad del Gd^{3+} en su forma libre. Además, como consecuencia de su bajo peso molecular, van a presentar una alta permeabilidad capilar que conduce a una acumulación inespecífica en tejidos fisiopatológicos. Esto ocurre especialmente en aquellos tejidos con permeabilidad aumentada tales como tejidos inflamados o neoplásicos, lo que intensifica su señal.

Existen quelatos de Gd^{3+} que constituyen lo que se conocen como agentes de contraste intravasculares o *blood pool*. Son agentes de contraste con una alta acumulación en sangre debido a mecanismos tales como una alta unión a la albúmina sérica. De esta forma, alcanzan un mayor $t_{1/2}$ que los de biodistribución extracelular. Esto permite la obtención de imágenes del sistema vascular por lo que son utilizados específicamente en angiografía por resonancia magnética (tabla 10)(304,305,311,313–316).

Estudios de farmacovigilancia concluyeron en 2017 que el riesgo de formación de depósitos de Gd^{3+} existe también con el uso de quelatos. En estos últimos estudios se han identificado acumulaciones principalmente a nivel cerebral que permanecen durante meses o incluso años. Pese a que las consecuencias exactas son aún desconocidas, la EMA ha limitado significativamente su uso y ha retirado del mercado numerosos agentes de contraste de este tipo (317). Puesto que estos constituían la inmensa mayoría de agentes de contrastes de RMI, el número de estos se ha visto drásticamente reducido dejando insuficientes opciones disponibles tal y como se puede observar en la tabla 10.

Como resultado del progreso en Nanotecnología, una segunda clase de agentes de contraste en RMI se ha desarrollado, las NPs de óxido de hierro. Mientras que los agentes de contraste de primera generación paramagnéticos no presentan magnetización en ausencia de un campo magnético, las NPs de óxido de hierro superparamagnético presentan una alta susceptibilidad magnética capaz de persistir incluso cuando el campo magnético ha sido retirado (309). En concreto, la alineación de los momentos magnéticos que ocurre en los iones de hierro en las NPs de óxido de hierro superparamagnéticas da como resultado un momento magnético significativamente mayor que el que se da en los iones de Gd^{3+} paramagnético. Esta diferencia de propiedades magnéticas determina la superior capacidad de relajación de

las NPs de óxido de hierro frente a la de los quelatos de Gd y, por lo tanto, la mayor sensibilidad que ofrecen (309,311).

El perfil de biodistribución de las NPs de óxido de hierro superparamagnéticas también difiere notablemente de los agentes de contraste paramagnéticos. Estos son internalizados por las células del SFM lo que permite el acceso selectivo al hígado, bazo, ganglios linfáticos, macrófagos asociados a tumores y la médula ósea (318).

Múltiples agentes de contraste superparamagnéticos de NPs de óxido de hierro han sido desarrollados y comercializados, pero actualmente muy pocos siguen estando disponibles (tabla 10). Aunque no se conocen los motivos exactos de la retirada de estos, varios autores apuntan a que los resultados de sensibilidad eran menores de los esperados y no satisfacen el gran esfuerzo económico realizado para su desarrollo (318,319).

Pese a estas limitaciones y como consecuencia de la reciente necesidad de nuevos agentes de contraste de RMI, las NPs de óxido de hierro siguen siendo ampliamente investigadas (110). En un amplio rango de dosis, carecen de toxicidad ya que constituye un nutriente esencial para el funcionamiento del organismo (véase capítulo Nanotoxicidad). Por ello, representan una potencial alternativa segura a los agentes de contraste paramagnético (320,321).

Los objetivos de los nuevos agentes de contraste formados por NPs de óxido de hierro teniendo en cuenta la gran experiencia que se posee en este campo (322), son los siguientes:

- a) Propiedades fisicoquímicas adecuadas para asegurar una alta sensibilidad (eficacia)
- b) Nula toxicidad y alta biocompatibilidad (seguridad)
- c) Biodistribución selectiva que asegure su acumulación exclusiva en el tejido patológico

6.1.3. Biodistribución de nanopartículas de óxido de hierro

Conocer el perfil de biodistribución de las NPs de óxido de hierro es esencial para evaluar la selectividad por la diana biológica y, así, poder predecir su eficacia. Por otro lado, también permite determinar el riesgo de aparición de posibles efectos secundarios e incluso posibles cuadros de toxicidad, es decir, su seguridad. La biodistribución de las

NPs va a ser el resultado de su extravasación a los órganos deseados y su aclaramiento plasmático.

Las NPs de óxido de hierro administrada por vía intravenosa va a estar dominada por el SFM, a no ser que sean diseñadas para evadirlo. El SFM está formado por monocitos y macrófagos de la circulación sanguínea y macrófagos localizados en diferentes órganos. Las células precursoras de macrófagos se forman a partir de células madre hematopoyéticas en la médula ósea que van a ser liberadas al torrente sanguíneo como monocitos. Después, los monocitos serán extravasados a través del endotelio y migran a tejidos donde se van a diferenciar en varios tipos de macrófagos. Dentro de los diversos macrófagos que se pueden formar se encuentran las células de Kupffer en el hígado, los macrófagos alveolares en los pulmones, los osteoclastos en los huesos, los histiocitos en tejidos conectivos intersticiales, macrófagos de órganos linfoides secundarios como el bazo y los ganglios linfáticos o macrófagos de los sitios inmunológicamente privilegiados como la microglía del cerebro, los ojos y los testículos. Puesto que el SFM forma parte de la respuesta inmunológica su papel principal será mantener al organismo libre de patógenos y sustancias extrañas como son las NPs (36,241).

El hígado y el riñón serán los órganos prioritarios donde acaben los macrófagos del SFM tras captar a las NPs constituyendo de esta forma las principales vías de eliminación de estas. Aunque esto ocurre en la mayoría de los casos, existe riesgo de que cuando las dosis administradas no pueden ser completamente atrapadas por los macrófagos del hígado y el hierro estas pueden ser acumuladas en otros tejidos ricos en macrófagos como los pulmones y el tejido adiposo (323).

El atrapamiento de las NPs por el SFM puede ser deseado o no en función de la indicación deseada. Es un mecanismo que favorece la acumulación de las NPs en tejidos tumorales incluyendo metástasis de cáncer de ganglios linfáticos. Sin embargo, en casos en los que se desee un largo $t_{1/2}$ en el organismo como es el caso de la angiografía vascular una baja captación por parte de los macrófagos es primordial (241).

El mecanismo por el cual los macrófagos son capaces de captar a las NPs viene determinado principalmente por el proceso de opsonización. Una vez que las NPs entran en contacto con fluidos biológicos van a interactuar con estos. Como consecuencia, serán modificadas superficialmente mediante la deposición de diferentes

proteínas lo que se conoce como formación de la corona proteica u opsonización. Va a dar lugar a un cambio significativo de las propiedades fisicoquímicas incluyendo tamaño, carga superficial y estado de agregación y, consecuentemente, a la identificación por parte de los macrófagos, pero también por las células diana. Por ello, diferentes estrategias están siendo utilizadas para reducir esta adsorción proteica y, así, aumentar el $t_{1/2}$ de las NPs (21). Es bien conocido que las características de la corona proteica van a depender de las características fisicoquímicas de las NPs pero también por otros numerosos factores ambientales (concentración de proteínas, temperatura, origen humano o murino, fuente -suero fetal, suero bovino o plasma bovino-, presencia de anticoagulante...) y del estado fisiopatológico del paciente (19,20).

6.2. Metodología y resultados

Todos los experimentos de biodistribución se realizaron en el Laboratorio de Resonancia Magnética Biomédica dirigido por la Dr. María Luisa García Martín en el Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología BIONAND.

6.2.1. Relajatividad *in vitro*

La r_2 de las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ se evaluó utilizando una dispersión acuosa de un rango de concentración de NPs con un contenido de hierro de entre 0.25 y 2.0 mM. Para la determinación del contenido de hierro de las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$, se utilizó el espectrómetro de masas de alta resolución de plasma acoplado inductivamente (ICP-HRMR) de doble enfoque con sector magnético y electrostático ICP-HRMS Element XR (Thermo Fisher, Estados Unidos) de los Servicios Centrales de Apoyo a la investigación (SCAI) de la Universidad de Málaga. Previamente, se realizó la digestión de la muestra en agua regia. El agua regia fue preparada utilizando tres partes de HNO_3 y una parte de HCl . Se adicionaron 2.5 mL de agua regia a 25 μL de una dispersión de NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$. Tras 12 horas en contacto, el volumen se completó con agua bidestilada hasta alcanzar un volumen de 25 mL.

El análisis de r_2 de las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ se realizó utilizando un sistema de resonancia magnética nuclear de dominio temporal (TD-NMR) Bruker Minispec MQ-60 (Bruker, Estados Unidos). Este equipo contaba con un campo magnético permanente de 1.4 T y operaba a una frecuencia de 60 MHz. Las medidas fueron obtenidas bajo condiciones de fisiológica mediante el uso de un medio de dispersión de solución salina

fisiológica y fijando la temperatura a 37 ± 0.5 °C. Las medidas fueron determinadas usando la secuencia Carl-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG).

La dispersión de NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ produjo relajatividades de $0.2 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $70.6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (fig. 45) para r_1 y r_2 , respectivamente utilizando concentraciones con un contenido de hierro de entre 0.25 y 2.0 mM. Esto resultó en un alto cociente r_2/r_1 . Todo esto confirma el uso de estas NPs como agentes de contraste T_2 .

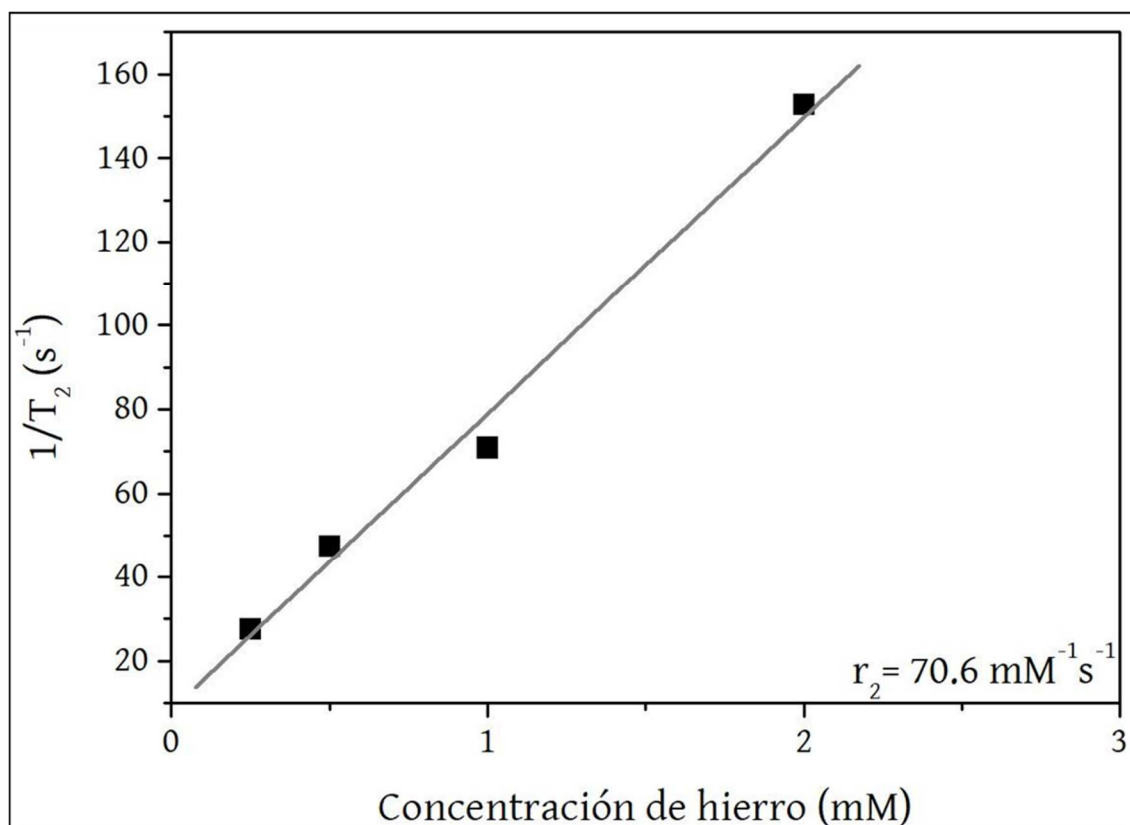


Fig. 45. Análisis de la relajatividad transversal de las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ *in vitro*. El valor de relajatividad r_2 de la dispersión de NPs fue calculado determinando los valores de relajatividad de la dispersión de NPs con concentración de hierro creciente usando un campo magnético de 1.4 T ($n = 3$).

La cubierta polimérica con PCL y la posterior funcionalización con CS confiere una gran variedad de ventajas a las nanoplataformas permitiendo una multitud de aplicaciones. En particular, la capacidad que presentan la nanomatriz de PCL de contener varios núcleos de Fe_3O_4 embebidos completamente en su interior probablemente contribuya al alto valor obtenido de r_2 con respecto al que presentarían las partículas de Fe_3O_4 de forma individual (328). Además, la funcionalización con CS determina la presencia de moléculas hidrófilas en la superficie de las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{Cs}$, lo que podría contribuir a la estabilización de moléculas de agua alrededor de estas nanoplataformas.

Estas hipótesis se corroboran con diferentes estudios de nanoplataformas de estructura similar donde núcleos superparamagnéticos de Fe_3O_4 estaban embebidos en una micela copolimérica de PCL y otro polímero de naturaleza hidrófila. Además, los resultados presentados por dichas investigaciones presentan una gran similitud con los obtenidos para las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$ a pesar de las ligeras diferencias experimentales que tienen lugar (329–332). Teniendo todo esto en consideración, se puede concluir que, una vez más, el diseño final de la nanoplataforma es determinante para su uso potencial como agente de contraste de RMI.

6.2.2. Resonancia magnética de imagen in vivo

Todos los experimentos in vivo fueron realizados en el Servicio de Experimentación Animal del Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología BIONAND, aprobados previamente por el Comité local de cuidado animal en conformidad con la legislación española de acuerdo con la Directiva de la Unión Europea UE 2010/63/UE (2010).. Se utilizaron ratones macho de la cepa Balb/c con un peso aproximado de 22 g (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Francia; $n = 3$). Los experimentos se realizaron en un equipo de RMI animal Bruker BioSpec 94/20 (Bruker, Estados Unidos) con una fuerza del campo magnético de 9.4 T, un gradiente de campo de 400 mT/m y un resonador de detección en cuadratura de 40 mm de diámetro a 298 K. Se siguió el protocolo descrito por Carlos Caro y cols. (311).

En primer lugar, el animal fue anestesiado por vía inhalatoria en una cámara de inducción con un flujo de aire fijado a 1-1,5 mL y 1% de isoflurano. Entonces, se realizó la canulación de la vena de la cola con un catéter de calibre de 26G y una solución salina con heparina (fig. 46b). Tras esto, se cambió el flujo de anestesia al soporte para animales del equipo de RMI (fig. 46a) y, rápidamente, se introdujo al animal previamente posicionado en la cama específica (fig. 46d). El ratón se colocó de forma que el abdomen se encontraba en el centro de la bobina de radiofrecuencia (fig. 46). La cama del ratón estaba dotada de un sistema de monitorización que controla la respiración y la temperatura corporal durante todo el experimento siendo esta última mantenida entre 36 y 37.5 ° C (*Small Animal Monitoring and Gating System*, acoplado al software PC-SAM 32 v8.02; fig.46d). Cuando los sensores de la respiración y la temperatura rectal estaban correctamente ajustados, se revisó la unidad de control. La anestesia fue ajustada durante todo el experimento para mantener el ritmo de la

respiración de 50 a 80 respiraciones por minuto. La dispersión de nanocompuestos (5 mg de hierro/Kg determinados por ICP-HRMS; ver apartado 9.3.1.) se administró por vía intravenosa.

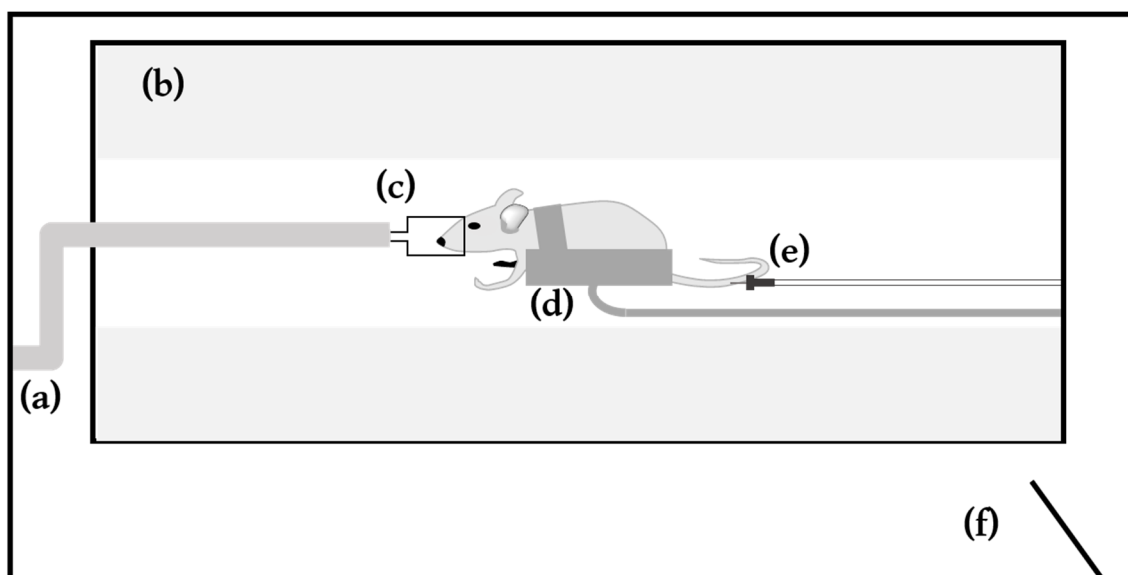


Fig. 46. Representación del experimento de RMI *in vivo*. a) Canal de entrada de aire. b) Equipo de RMI. c) Adaptador de flujo de anestesia. d) Cama con sistema de monitorización de respiración y temperatura corporal. e) Catéter. f) Puerta de acceso al área de RMI.

Una vez calibrado el equipo de RMI, se obtuvieron las imágenes de referencia (imágenes coronales ponderadas en T_2 y mapas de T_2). En concreto, en este tipo de estudio se escogieron imágenes ponderadas en T_2 y no en T_2^* porque estas últimas se ven más fácilmente interferidas por el movimiento, el aire, etc. Luego, se comenzó con el protocolo de obtención de imágenes para la cinética a tiempo corto basado en la obtención de imágenes cada 25 segundos con el fin de conocer el tiempo de aclaramiento plasmático de los nanocompuestos y su llegada a los órganos del SFM fundamentalmente el hígado y el riñón. Finalmente se obtuvo un mapa de relajatividad en T_2 y otra imagen coronal del abdomen ($t = 1h$).

Las imágenes de alta resolución ponderadas en T_2 fueron adquiridas mediante una secuencia dinámica turbo-RARE (*Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement*) con control de movimiento respiratorio de tiempo eco (TE) = 16 ms, tiempo de repetición (TR) = 1000 ms, 4 medias, 156 μm de resolución de plano y 1 mm de grosor de corte. Las medidas cuantitativas de T_2 fueron realizadas usando una secuencia eco de espín multi-eco TEs desde 7 ms a 448 ms, TR = 3500 ms, field of view (FOV) = 4cm, tamaño de matriz = 192 x 192, grosor de corte = 1 mm). Las cinéticas a tiempos cortos se siguieron usando una secuencia dinámica turbo-RARE con los mismos parámetros indicados antes, pero

con sólo una media por imagen mejorar la resolución temporal (1 imagen cada 30 segundos). El esquema de adquisición fue el siguiente: imagen ponderada en T_2 , T_2 cuantitativa, inyección intravenosa de la dispersión de nanocompuestos, cinética de 1 hora, T_2 cuantitativa y ponderada en T_2 . Al cabo de 35 minutos, las cinéticas fueron analizadas de forma semicuantitativa usando la siguiente expresión (Ec. 27):

$$RE = \left| \frac{I_t - I_0}{I_0} \times 100 \right| \quad (27)$$

donde RE es el módulo del incremento relativo de señal (*relative enhancement*), I_t es la intensidad de señal a tiempo determinado tras la inyección de las NPs, e I_0 es la intensidad de la señal antes de la inyección. Las cinéticas a largo plazo se midieron utilizando los mapas de T_2 cuantitativos a $t = 0h$, $t = 1h$ y $t = 24 h$. Todos los cálculos de cinéticas, a tiempo corto y largo, se hicieron a partir de los valores promedio dentro de regiones de interés (*region of interest*; ROIs) trazadas sobre hígado, riñón, bazo y músculo de forma similar a lo que se observa en la fig. 46.

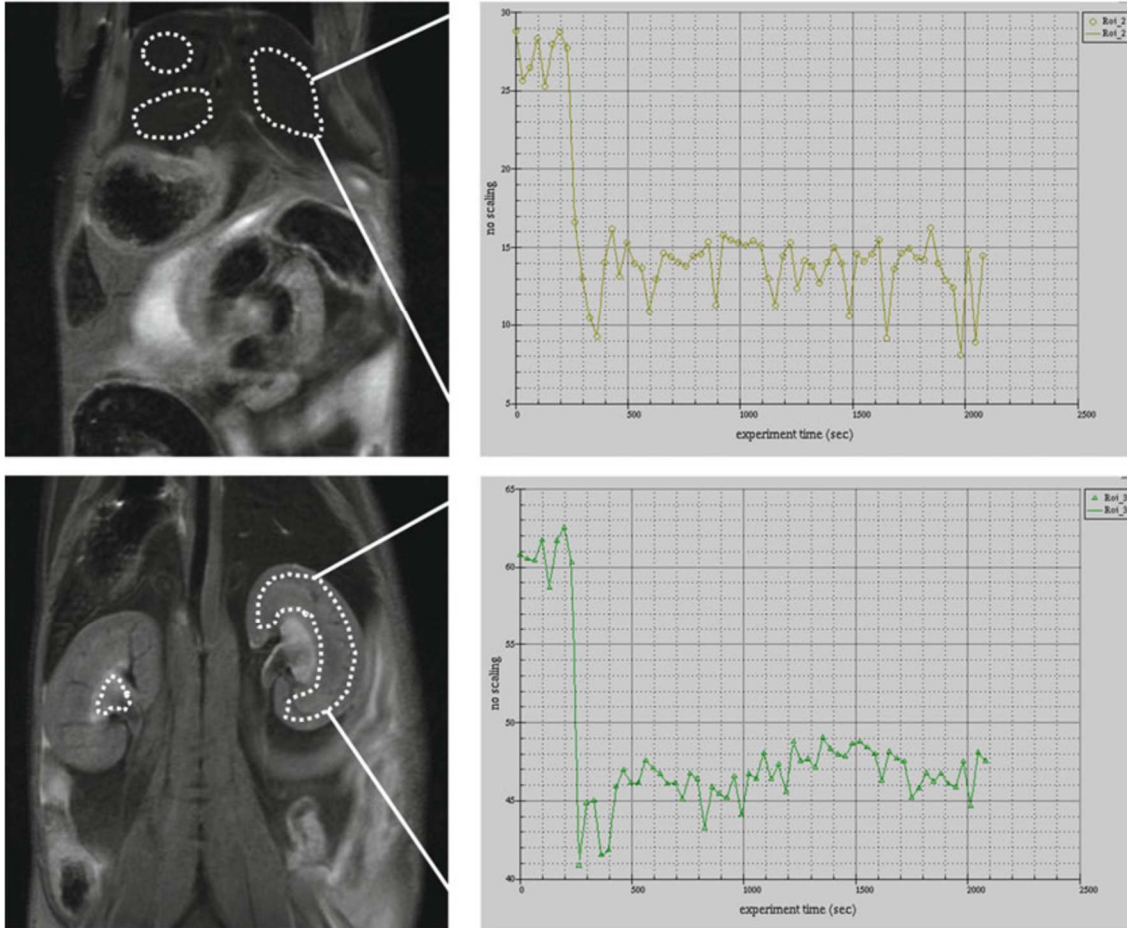


Fig. 46. Selección de las Regiones de interés (ROI). Imágenes de RMI ponderadas en T_2 donde se han determinado las ROI (señaladas con líneas blancas discontinuas) en el hígado (imagen superior) y la corteza renal (imagen inferior). A la derecha de cada una de las imágenes se encuentra representada la intensidad de la señal en unidades arbitrarias en función del tiempo desde que empieza el experimento en segundos de las ROI. Reproducido de Caro y cols. 2018. Copyright Springer 2018 (4963800100780).

Las ROIs fueron dibujadas en la primera imagen de la secuencia. La selección de las ROIs fue realizada cuidadosamente evitando el borde de los órganos y, así, una sobreestimación o subestimación de los valores reales. Esto podría ocurrir debido a que son imágenes dinámicas y no se corrige el movimiento. Una vez determinadas, se identificaron los promedios de los valores de intensidad en el tiempo. Entonces se normalizaron los valores de intensidad arbitrarios para obtener los valores relativos optimizados usando la ecuación 28 y 29:

$$M_z(t) = M_0(1 - e^{-TR/T_1}) \quad (28)$$

$$M_{XY}(t) = M_0 e^{-TE/T_2} \quad (29)$$

Donde la M_z y la M_{xy} son las señales de intensidad en TR o TE, y M_0 es la intensidad de señal en equilibrio.

Cuando terminó el experimento, el animal fue retirado del soporte. Se mantuvo en un lugar cálido unos 2-3 minutos hasta que se despertase momento en el cual se devolvió a su jaula.

El análisis estadístico de los valores de T_2 *in vivo* se realizó usando el paquete de SPSS (SPSS Inc., Chicago, Illinois). Se utilizó la prueba *t* de Student o el análisis de varianza bidireccional para determinar las diferencias significativas. El nivel de significación se fijó en $p < 0,05$.

Durante el primer periodo de evaluación de la cinética de los nanocompuestos mediante RMI se observó un aumento de la variación relativa de la señal en el hígado. En concreto, a los 5 minutos de que la suspensión de nanocompuestos fuera administrada, aumentó en un 30% y, a partir de aquí, aumentó hasta alcanzar un 40% tras lo que se mantuvo estable durante todo el experimento (Fig. 47). Probablemente, esto sea consecuencia a la actuación de SFM, concretamente al papel que juegan las células de Kupffer en el aclaramiento plasmático de los nanocompuestos (323,333). Por otro lado, en los riñones se produce un aumento drástico a los 5 minutos que después se mantiene (Fig. 47). Este comportamiento puede señalar la retención de nanocompuestos en este órgano durante esta primera evaluación de 35 minutos. Estos resultados sugieren que, tal y como se ha observado en otros estudios de NPs superparamagnéticas de óxido de hierro (241,334), de NPs superparamagnéticas con estructura *core-shell* funcionalizadas con CS (329,335), y en NPs poliméricas de CS (336), el SFM es el principal factor que determina la biodistribución de los nanocompuestos desarrollados.

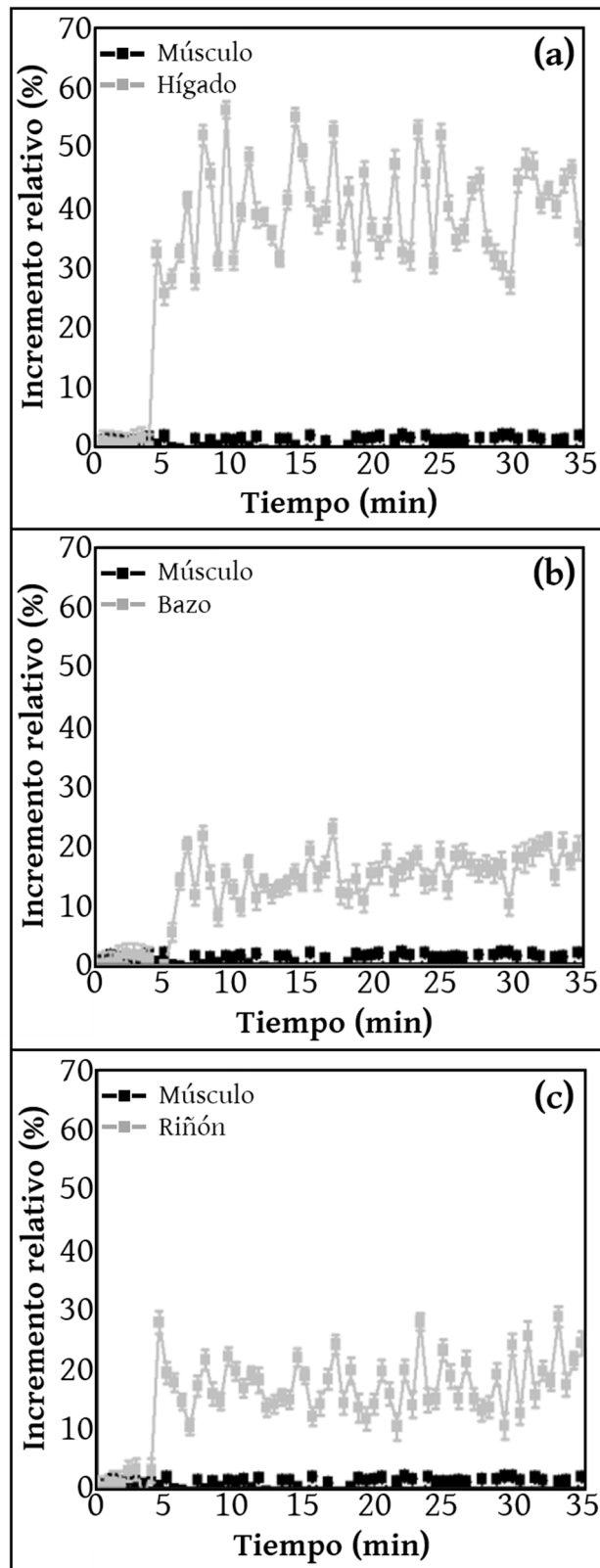


Fig. 47. Análisis semicuantitativo de la cinética *in vivo* de las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{Cs}$. Representación del incremento relativo de la señal en función del tiempo en (a) el músculo e hígado, (b) músculo y bazo y (c) músculo y riñón.

El análisis cualitativo de la farmacocinética realizado con las imágenes ponderadas en T_2 mostró un claro oscurecimiento a 1h y 24 h (fig. 48b y fig. 48c, respectivamente). Por otro lado, los mapas cuantitativos en T_2 revelaron el decaimiento estadísticamente significativo en hígado y riñones ($p < 0.05$), con 3,9 y 8 ms a $t = 1$ h, y 8,9 y 15,7 ms a $t = 24$ h, respectivamente (fig. 48d). Los cambios en T_2 en el bazo fueron menores. En el músculo no se observaron cambios significativos en todo el experimento lo que demuestra que los nanocompuestos no fueron acumulados en este y, por tanto, carecen de potenciales efectos tóxicos. Estos resultados demuestran la potencia de las NPs de $(Fe_3O_4/PCL)/CS$ como agentes de contraste T_2 con potencial aplicación en Biomedicina.

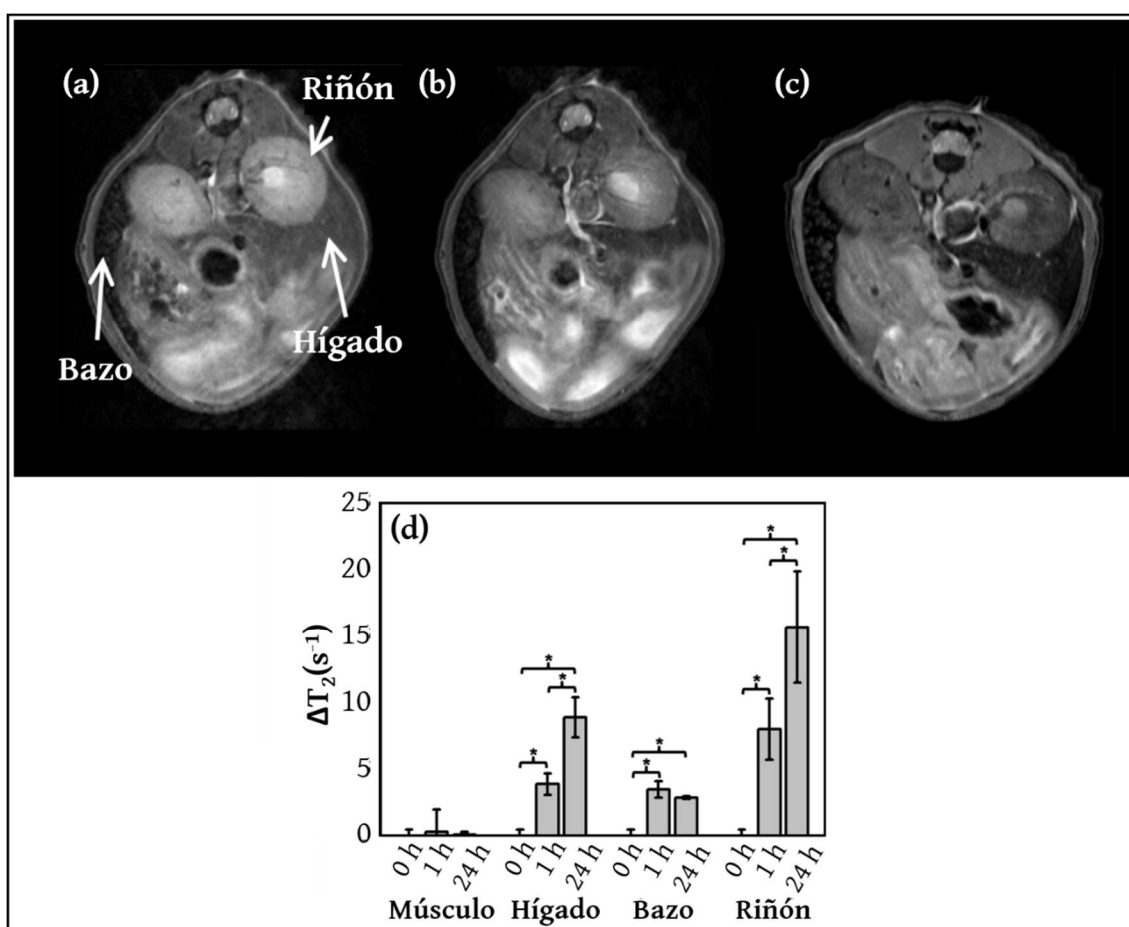


Fig. 48. Análisis cualitativo y cuantitativo de la farmacocinética *in vivo* de las NPs de $(Fe_3O_4/PCL)/CS$. (a) Imagen T_2 a $t = 0$ h, (b) imagen T_2 a $t = 1$ h y (c) imagen T_2 a $t = 24$ h. (d) Valor de ΔT_2 en músculo, hígado, bazo y riñón a $t = 0, 1$ y 24 h ($n = 3$).

6.2.3. Histología ex vivo

El análisis histológico se llevó a cabo a las 24 h de la administración intravenosa de la dispersión de nanocompuestos.

El animal fue anestesiado y posteriormente sacrificado. Se le extrajo para su posterior estudio el hígado, el riñón, el bazo, el pulmón y el corazón. Finalmente, se trataron las muestras para su posterior observación. El tratamiento consistió en la fijación en una solución de paraformaldehído al 4% p/v con tampón de pH 7 (Panreac, España) durante 48 h siendo renovada la solución fijadora a las 24 h. Entonces, las muestras fueron lavadas y deshidratadas pasando a través de una serie de soluciones de etanol de concentración creciente hasta alcanzar un 100%. Inmediatamente, fueron aclaradas con xileno y embebidas en parafina durante 2 h a una temperatura de 56 °C bajo agitación y en condiciones de vacío. Tras esto, se cortaron en un micrótopo con un grosor de 7 μm , se desparafinaron con xileno y deshidrataron con una serie de soluciones de etanol de concentración decreciente. Finalmente, fueron teñidas para permitir su examen con azul de Prusia y hematoxilina-eosina (HE) con el objetivo de identificar posibles depósitos de hierro y efectos de toxicidad en la estructura tisular, respectivamente.

6.2.3.1. Tinción de Azul de Prusia para la Detección Cualitativa de Hierro

Este ensayo permitió determinar la presencia de Fe^{3+} ya que estos reaccionan con ferrocianuro potásico en presencia de ácido clorhídrico. El producto de la reacción que confirmaría la presencia de éstos es el ferrocianuro férrico, una sal compleja insoluble de color azul. Con el fin de conseguir una identificación visual más precisa de los depósitos de hierro se realizó una contratinción con rojo nuclear sólido – sulfato de alumnio. Este colorante de contraste ácido permitió llevar a cabo una tinción nuclear sencilla en color rojo (324,325).

Concretamente, muestras de hígado, riñón y pulmón fueron teñidas con azul de Prusia y contrateñidas con rojo nuclear sólido. Primero, se sumergieron en una solución de ácido clorhídrico (20%, v/v) y ferrocianuro potásico (10%, p/v). A continuación, fueron lavadas con agua bidestilada y teñidas con rojo nuclear sólido. Para confirmar que el decaimiento de T_2 y, por tanto, el contraste conseguido en las imágenes se debía precisamente a la acumulación de las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$, se realizó una evaluación histológica utilizando la tinción de azul de Prusia. En concreto, se extrajeron muestras

de los órganos que habían presentado un mayor incremento relativo de la señal, el hígado y el riñón (fig. 49). Además, también se analizó la posible extravasación de las nanoplataformas finales al pulmón, que ya ha sido observada en previas investigaciones de NPs superparamagnéticas (323) y de NPs de CS (336) (fig. 50)

En las muestras de hígado y riñón (Fig. 49d y e) eran apreciables puntos de color azul intenso que correspondían a los depósitos de hierro. En el caso del hígado eran un poco más acentuados y todos ellos se situaban en los sinusoides hepáticos situados en la periferia de los hepatocitos, uno de los canales vasculares del hígado. Más concretamente, los depósitos de hierro se encontraban en el interior de las células de Kupffer**. Además, se puede confirmar que estos depósitos de hierro provenían de las NPs de (Fe₃O₄/PCL)/CS por su ausencia en las muestras extraídas de los ratones a los que no se le habían administrado (control) (fig. 49 a y b). Estas observaciones confirman los resultados obtenidos en el ensayo de biodistribución *in vivo*. Esta captación hepática ha sido también observada en un reciente estudio de NPs magnéticas recubiertas con CS. En este estudio se resalta que, a pesar de dicha captación hepática, la capacidad de contraste permanece durante 7 días (335).

La nula presencia de la tinción azul de Prusia en las secciones de pulmón permitió concluir que no se producía el transporte de las nanoplataformas a este órgano (fig. 49 c y f)(326,327).

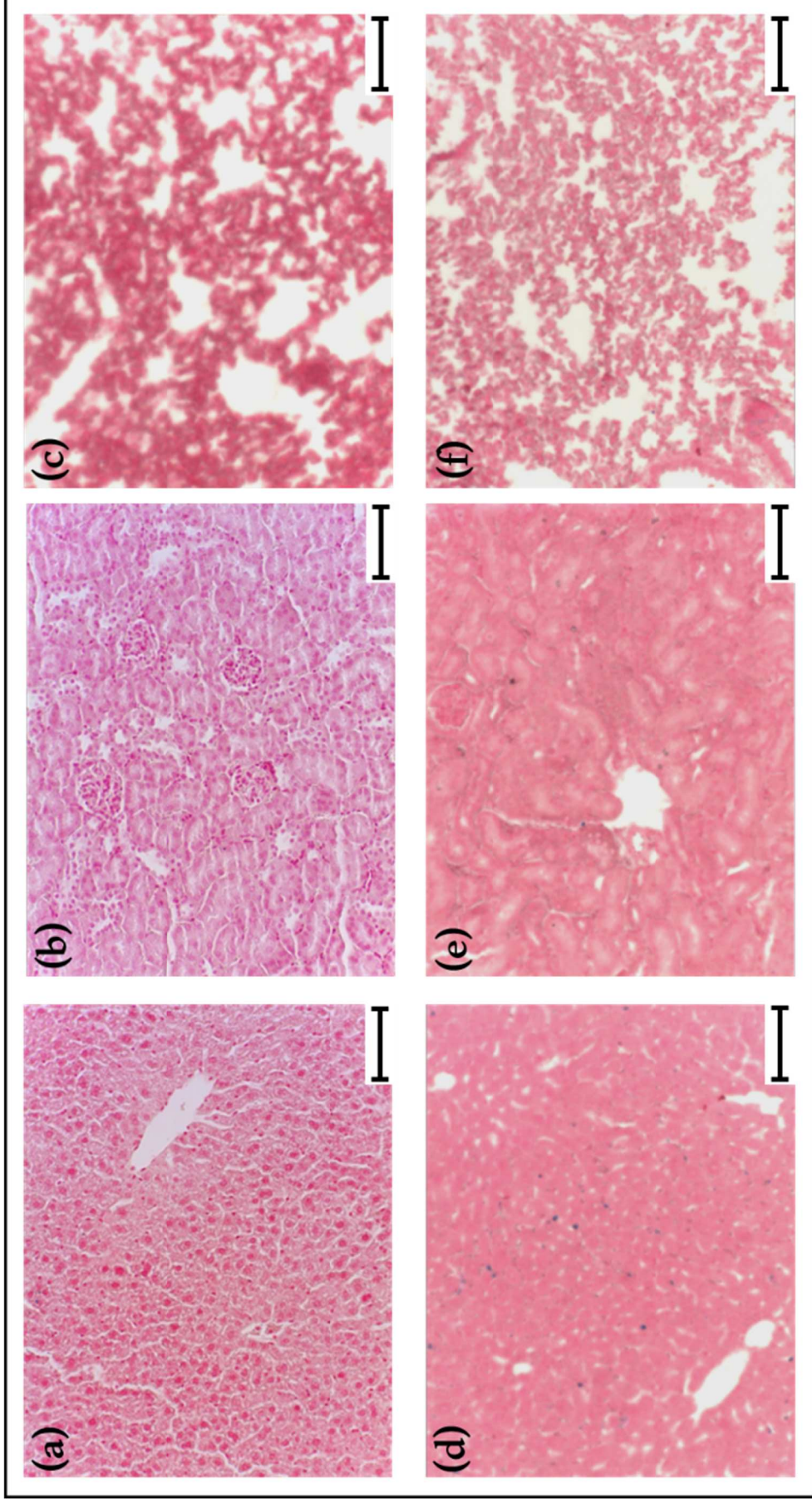


Fig. 49. Evaluación histológica con azul de Prusia. La parte superior muestra las imágenes de extracciones de hígado (a), riñón (b) y pulmón (c) de ratones control (sin administración de NPs). La parte inferior muestra imágenes de hígado (d), riñón (e), y pulmón (f) de ratones a las 24 h de haberles administrado las NPs. La longitud de la barra es de 100 μm en todas las imágenes.

6.2.3.2. Tinción de hematoxilina-eosina

La técnica de HE es una de las más utilizadas en preparados histológicos e histopatológicos. Está basada en el uso de hematoxilina como colorante principal y la eosina como colorante de contraste. La hematoxilina es un colorante básico capaz de teñir las estructuras ácidas en un tono violáceo como los núcleos (alto contenido en ADN). Al contrario, la eosina es un colorante ácido que tiñe las estructuras básicas de color entre rosa y rojo pálido como el citoplasma (alto contenido proteínas básicas) y componentes de la matriz extracelular (326,327).

Las muestras de hígado, bazo, riñón, pulmón y corazón fueron teñidas con HE. Primero se usó la hematoxilina, agua bidestilada para limpiarla y, después, la eosina.

A las 24 h de la administración de las NPs de $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL})/\text{CS}$, se extrajeron secciones de hígado, riñón, bazo, pulmón y corazón, se teñieron con HE y se analizaron con un microscopio óptico para evaluar la apariencia de efectos tóxicos potenciales. En ninguno de los órganos analizados aparecen señales de daño tisular (fig. 50). La figura 50f, que corresponde a una sección de tejido hepático, presenta en la parte inferior células de Kupffer situadas en los espacios sinusales y teñidas con hematoxilina. Esto confirma que los depósitos de hierro identificados con la tinción de azul de Prusia se encontraban internalizados en estas células y, por tanto, que éstas contribuyen a la aclaración plasmática de los nanocompuestos. Estos resultados han sido también obtenidos en previas investigaciones utilizando el CS como material de recubrimiento de NPs magnéticas (335).

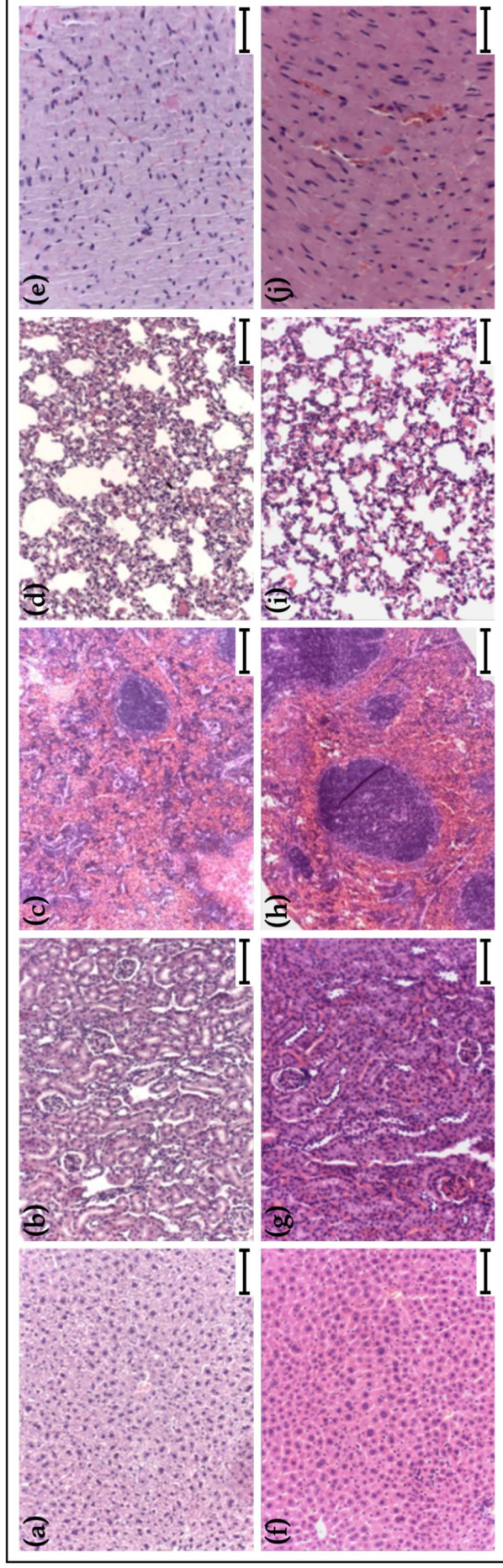


Fig. 50. Evaluación histológica con hematoxilina-eosina. La parte superior muestra las imágenes de extracciones de hígado (a), riñón (b), bazo (c), pulmón (d) y corazón (e) de ratones control (sin administración de NPs). La parte inferior muestra imágenes de hígado (f), riñón (g), bazo (h), pulmón (i) y corazón (j) de ratones a las 24 h de haberles administrado las NPs. La longitud de la barra es de 50 μm en (e) y (j), de 100 μm en (a), (b), (d), (f), (g) e (i), y de 200 μm en (c) y (h).

Capítulo 7

Conclusiones

En vista de los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación se concluye que las NPs ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$)/CS constituyen una herramienta biomédica multifuncional (quimioterapia optimizada + hipertermia + agente de contraste de RMI) de alto interés en el tratamiento del cáncer. Las principales aportaciones que conducen a esta conclusión se resumen en este capítulo.

En relación a la formulación, funcionalización y caracterización

Se ha diseñado y optimizado un procedimiento de obtención reproducible y de alto R de NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$. El tamaño de estas NPs fue estudiado mediante las técnicas de dispersión dinámica de luz y microscopía de transmisión de electrones de alta resolución y resultó ser altamente apropiado para la vía de administración parenteral (≈ 125 nm). La estabilidad coloidal de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ en términos de tamaño hidrodinámico, PDI y ζ puso en evidencia una temprana aglomeración de estas NPs. La posterior funcionalización de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ con CS permitió vencer dicha limitación y conferir una estabilidad adecuada in vitro a la vez que mantenía un adecuado tamaño (≈ 300 nm).

La evaluación de las propiedades eléctricas y termodinámicas superficiales confirmaba que los coloides magnéticos de Fe_3O_4 se encontraban embebidos completamente en la matriz polimérica de PCL. La determinación de la carga eléctrica superficial constituyó también una prueba cualitativa de la eficacia de la funcionalización con CS.

La estructura de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ funcionalizadas con CS fue extensamente caracterizada mediante EDX, FTIR y XRD.

Los espectros obtenidos por XRD de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ funcionalizadas con CS señalaban el mantenimiento de la estructura cristalina de Fe_3O_4 responsable de su adecuado carácter magnético que fue posteriormente validado mediante el estudio de su ciclo de histéresis. La adecuada capacidad de respuesta de la dispersión de ambos tipos de NPs desarrolladas fue comprobada mediante la aplicación de un campo magnético in vitro.

En relación a la nanotoxicidad

Las NPs desarrolladas de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ funcionalizadas con CS han demostrado una insignificante citotoxicidad per se en los ensayos de MTT de líneas celulares

normales (CCD-18) y tumorales (T-84). De esta forma, se presume su perfil biocompatible.

Los ensayos de hemólisis, activación de plaquetas, activación del sistema complemento y tiempo de recalcificación plasmática resultaron en una insignificante alteración de los parámetros fisiológicos por parte de las NPs desarrolladas de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ funcionalizadas con CS. Por tanto, se puede concluir que ambos nanosistemas son hemocompatibles y, así, aptos para ser administrados por la vía parenteral.

La alta biocompatibilidad de los nanocompuestos de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ funcionalizadas con CS fue estudiada confirmada mediante el estudio de proliferación y morfología de las células normales HFF-1 mediante MTT y análisis de imagen *high-content*.

En relación a la hipertermia magnética

La aplicación de un campo electromagnético a las dispersiones acuosa de NPs desarrolladas de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ funcionalizadas con CS resultaba en un aumento de la temperatura lo que determinaba la capacidad de hipertermia magnética de ambos tipos de nanoplateformas.

La citotoxicidad de la hipertermia magnética inducida por los nanocompuestos de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ funcionalizadas con CS se ensayó mediante MTT en líneas celulares cancerígenas de colon (T-84 y HT-29) y mama (MCF-7). En todos los casos, se observó una pronunciada reducción de la viabilidad celular relativa ($\approx 30\%$) lo que señala el potencial de estos nanosistemas para llevar a cabo tratamientos anticancerígenos basados en hipertermia magnética.

En relación a la vehiculización de GEM

La formulación de NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ cargadas con GEM fue optimizada en función de la concentración inicial de fármaco utilizada. La mayor concentración inicial de GEM utilizada en la formulación de estos nanosistemas resultó en los valores máximos de eficacia de atrapamiento y carga de fármaco. Para dicha optimización del proceso de formulación, se estudió la incorporación de fármaco en estos nanosistemas mediante la determinación de la cantidad tanto de forma directa e indirecta resultando la vía

directa la más apropiada. La medida de la cantidad de clorhidrato de GEM se llevó a cabo utilizando un método de espectrofotometría UV/Vis previamente validado.

La citotoxicidad de las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ cargadas con GEM fue determinada mediante MTT en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 y comparada con la del fármaco libre. La concentración inhibitoria 50 obtenida disminuía para la GEM cuando este era incorporado a las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ lo que señalaba el potencial de estas NPs para el transporte de este fármaco.

La cinética de liberación de la GEM desde las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ y de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ funcionalizadas con CS se examinó in vitro en diferentes condiciones que simulaban las condiciones fisiológicas, el microambiente tumoral y la hipertermia magnética. Los resultados obtenidos permiten predecir que ambos nanotransportadores constituyen sistemas de liberación de fármacos sostenidos en condiciones fisiológicas que pueden ser activados permitiendo una liberación más pronunciada en determinadas condiciones del microambiente tumoral como es el pH ácido y en condiciones de hipertermia (aumento de temperatura). De esta forma, estas NPs podrían mejorar el perfil farmacocinético de la GEM.

En vista de los resultados obtenidos en el presente capítulo y en el capítulo de hipertermia, sería interesante estudiar la sinergia de la hipertermia y quimioterapia producida por estos nanocompuestos tanto in vitro como in vivo.

En relación a la eficacia como agentes de contraste de RMI y al estudio de biodistribución in vivo

Los resultados del ensayo de relajatividad in vitro sugirieron el potencial de las nanoplataformas de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ funcionalizadas con CS como agentes de contraste T2 confirmado después con el experimento de biodistribución in vivo mediante RMI. El posterior análisis histológico ex vivo permitió corroborar el adecuado comportamiento cinético que presentaban las nanoplataformas desarrolladas. Además, éste demuestra la nula apariencia de daño tisular y, por tanto, confirman el perfil biocompatible y seguro estudiado en el capítulo de nanotoxicidad.

Chapter 7

Conclusions

Taking into consideration the results obtained in the current research work, it may be concluded that [magnetite/poly(ϵ -caprolactone)]/chitosan nanoparticles constitute a multifunctional biomedical tool (advanced chemotherapy + hyperthermia + magnetic resonance imaging contrast agent) with great interest in the treatment of cancer. Main contributions to that conclusion are summarize in this chapter.

Relating to formulation, functionalization and characterization

A reproducible and high production performance procedure has been designed for magnetite/poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles. Dynamic light scattering and high-resolution transmission electron microscope were used for nanoparticle size determination which resulted highly adequate for parenteral administration (\approx 125 nm). Magnetite/poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles colloidal stability assay was performed in terms of hydrodynamic size, polydispersity and zeta potential. It evidenced an early nanoparticle agglomeration phenomenon. Later functionalization of this nanoparticles with chitosan was appropriated to beat such limitation and to maintain in vitro stability at the same time that a moderate size increase took place (\approx 300 nm).

Magnetite colloids embedded into the polymer poly(ϵ -caprolactone) matrix was demonstrated by particles surface electrical charge and thermodynamic properties evaluation. In addition, surface electrical charge determination was valid to prove functionalization procedure efficacy.

Magnetite/poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles and magnetite/poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles functionalized with chitosan were extensively characterized by electron dispersive X-ray, Fourier-transform infrared spectroscopy and X-ray diffraction.

Magnetite/poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles and magnetite/poly(ϵ -caprolactone) functionalized with chitosan nanoparticles X-ray diffraction spectra revealed magnetite typical crystallinity responsible for its adequate magnetic character which was further validated by means of hysteresis cycle. Appropriate magnetic responsiveness of both nanocomposites was also proved in vitro by the application of a magnetic field.

Developed magnetite/poly(ϵ -caprolactone) functionalized with chitosan nanoparticles demonstrated negligible cytotoxicity when an MTT assay was performed with normal (CCD-18) and tumoural (T-84) cell lines. Therefore, it may be indicative for the biocompatible profile of both nanosystems.

Haemolysis, platelet activation, complement system activation and plasma clotting time assays magnetite/poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles and magnetite/poly(ϵ -caprolactone) functionalized with chitosan nanoparticles resulted in almost null modification of physiological parameter. Then, a high blood compatibility could be concluded for both nanoparticles and, therefore, high suitability for parenteral administration.

MTT and high-content imaging analysis were used for HFF-1 cells proliferation and morphology evaluation in the presence of magnetite/poly(ϵ -caprolactone) functionalized with chitosan nanoparticles. Those studies confirm the high biocompatibility of these nanoparticles.

Relating to magnetic hyperthermia

Submission of the aqueous dispersions of magnetite/poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles and magnetite/poly(ϵ -caprolactone) functionalized with chitosan nanoparticles to an applied electromagnetic field resulted in the temperature increment pointing out the magnetic hyperthermia capacity of both nanocomposites.

Magnetic hyperthermia cytotoxicity of magnetite/poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles and magnetite/poly(ϵ -caprolactone) functionalized with chitosan nanoparticles was evaluated by means of an MTT assay of colon (T-84 y HT-29) and breast (MCF-7) tumour cell lines. A significant reduction of cell viability was observed for all the tested ($\approx 30\%$) highlighting antitumoural magnetic hyperthermia capability of both designed nanosystems.

Relating to the gemcitabine vehiculization

Gemcitabine loaded Magnetite/poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles formulation procedure was optimized in terms of initial concentration of the drug used. Highest initial concentration of the gemcitabine hydrochloride used for the nanoparticle formulation gave the maximum values of entrapment efficiency and drug loading. For

that goal, drug incorporation in the nanoparticles was evaluated by means of an indirect and direct method. Direct method was found to be the most appropriate procedure for that analysis. Ultraviolet visible spectroscopy previously validated was used for the performance of these measurements.

Gemcitabine loaded magnetite/poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles cytotoxicity against MCF-7 breast cancer cell line was tested by means of an MTT assay and compared with free drug. Inhibitory concentration 50 obtained was lower for gemcitabine loaded in the nanoparticles in contrast to the free drug pointing out the value of the developed nanosystems for drug delivery.

Gemcitabine release kinetic from magnetite/poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles and magnetite/poly(ϵ -caprolactone) functionalized with chitosan was investigated in vitro in different conditions namely physiological conditions, tumoural microenvironment conditions and magnetic hyperthermia conditions. Gemcitabine release profiles resultant showed sustained drug delivery capacity of nanoparticles in physiological conditions. Drug leakage from nanoparticles could be stimulate in tumoural acid pH and hyperthermic temperature. Therefore, designed nanocomposites could improve gemcitabine pharmacokinetic profile.

Taking drug vehiculization and hyperthermic capabilities of the engineered nanoparticles altogether, it could be of high interest to study chemotherapy and hyperthermia combination for treating cancer both in vitro and in vivo.

Related to the efficacy as contrast agent for imaging magnetic resonance and in vivo biodistribution study

In vitro transversal relaxivity of magnetite/poly(ϵ -caprolactone) functionalized with chitosan suggested their capability as T2 contrast agents for magnetic resonance imaging. This magnetic behaviour was also demonstrated with an in vivo magnetic resonance experiment which also allowed to gain a deepest understanding of the biodistribution and safety profile of this nanoparticles. Histological ex vivo assessment corroborated the in vivo kinetic obtained for the developed nanoplatforms. Furthermore, it demonstrated negligible tissue damage confirming the biocompatible profile previously determined.

Capítulo 8

Bibliografía

1. Pilleron S, Soto-Perez-de-Celis E, Vignat J, Ferlay J, Soerjomataram I, Bray F, et al. Estimated global cancer incidence in the oldest adults in 2018 and projections to 2050. *Int J Cancer*. 2021;148(3):601–8.
2. INE. Instituto Nacional de Estadística. Fallecidos por cáncer en España. [Internet]. [Consultado en 10/01/2021]. Disponible en: https://www.ine.es/infografias/infografia_fallecidos_cancer.pdf
3. INE. Instituto Nacional de Estadística. Defunciones según la Causa de Muerte Avance enero-mayo de 2019 y de 2020. [Internet]. [Consultado en 10/01/2021]. Disponible en: https://www.ine.es/prensa/edcm_ene_may_19_20.pdf
4. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(2):81–94.
5. Lytle NK, Barber AG, Reya T. Stem cell fate in cancer growth, progression and therapy resistance. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(11):669–80.
6. Prados J, Melguizo C, Ortiz R, Velez C, J. Alvarez P, L. Arias J, et al. Doxorubicin-Loaded Nanoparticles: New Advances in Breast Cancer Therapy. *Anticancer Agents Med Chem*. 2012;12(9):1058–70.
7. Chabner BA, Roberts TG. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(1):65–72.
8. Kaufmann SH. Paul Ehrlich: Founder of chemotherapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(5):373.
9. Adams GP, Weiner LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol*. 2005;23(9):1147–57.
10. Couvreur P. Nanoparticles in drug delivery: Past, present and future. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(1):21–3.
11. Park K. Controlled drug delivery systems: Past forward and future back. *J Control Release*. 2014;190:3–8.
12. Oliver SE, Gargano JW, Marin M, Wallace M, Curran KG, Chamberland M, et al. The Advisory Committee on Immunization Practices' Interim Recommendation for Use of Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine — United states, December 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2020;69(50):1922–24.
13. Oliver SE, Gargano JW, Marin M, Wallace M, Curran KG, Chamberland M, et al. The Advisory Committee on Immunization Practices' Interim Recommendation for Use of Moderna COVID-19 Vaccine — United states, December 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2021;69(5152):1653–56.
14. Ulldemolins A, Seras-franzoso J, Andrade F, Rafael D, Abasolo I, Gener P. Perspectives of nano-carrier drug delivery systems to overcome cancer drug resistance in the clinics. *Cancer Drug Resist*. 2020;3:59.

15. He H, Liu L, Morin EE, Liu M, Schwendeman A. Survey of Clinical Translation of Cancer Nanomedicines - Lessons Learned from Successes and Failures. *Acc Chem Res.* 2019;52(9):2445–61.
16. Shi J, Kantoff PW, Wooster R, Farokhzad OC. Cancer nanomedicine: Progress, challenges and opportunities. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(1):20–37.
17. Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review. *J Control Release.* 2000;65(1–2):271–84.
18. L. Arias J. Drug Targeting Strategies in Cancer Treatment: An Overview. *Mini-Reviews Med Chem.* 2010;11(1):1–17.
19. Corbo C, Molinaro R, Tabatabaei M, Farokhzad OC, Mahmoudi M. Personalized protein corona on nanoparticles and its clinical implications. *Biomater Sci.* 2017;5(3):378–87.
20. Nguyen VH, Lee BJ. Protein corona: A new approach for nanomedicine design. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:3137–51.
21. Fam SY, Chee CF, Yong CY, Ho KL, Mariatulqabtiah AR, Tan WS. Stealth coating of Nanoparticles in drug-delivery systems. *Nanomaterials.* 2020;10(4):1–18.
22. Gabizon A, Shmeeda H, Barenholz Y. Pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin: Review of animal and human studies. *Clin Pharmacokinet.* 2003;42(5):419–36.
23. Nicolas J, Mura S, Brambilla D, Mackiewicz N, Couvreur P. Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. *Chem Soc Rev.* 2013;42(3):1147–235.
24. Silva CO, Pinho JO, Lopes JM, Almeida AJ, Gaspar MM, Reis C. Current trends in cancer nanotheranostics: Metallic, polymeric, and lipid-based systems. *Pharmaceutics.* 2019;11(1):22.
25. Jnaidi R, Almeida AJ, Gonçalves LM. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as smart drug delivery systems in the treatment of glioblastoma multiforme. *Pharmaceutics.* 2020;12(9):860.
26. Wolfram J, Zhu M, Yang Y, Shen J, Gentile E, Paolino D, et al. Safety of Nanoparticles in Medicine. *Curr Drug Targets.* 2015;16(14):1671–81.
27. Chatterjee K, Sarkar S, Jagajjani Rao K, Paria S. Core/shell nanoparticles in biomedical applications. *Adv Colloid Interface Sci.* 2014;209:8–39.
28. Mura S, Nicolas J, Couvreur P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nat Mater.* 2013;12(11):991–1003.

29. Koltai T. Cancer: Fundamentals behind pH targeting and the double-edged approach. *Onco Targets Ther.* 2016;9:6343–60.
30. Gang B, Samir M, Sheng T. Multifunctional nanoparticles for drug delivery and molecular imaging. *Annu Rev Biomed Eng.* 2013;15:253–82.
31. Kim D, Shin K, Kwon SG, Hyeon T. Synthesis and Biomedical Applications of Multifunctional Nanoparticles. *Adv Mater.* 2018;30(49): e1802309.
32. Majidi S, Sehrig FZ, Farkhani SM, Goloujeh MS, Akbarzadeh A. Current methods for synthesis of magnetic nanoparticles. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 2016;44(2):722–34.
33. Ali A, Zafar H, Zia M, ul Haq I, Phull AR, Ali JS, et al. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnol Sci Appl.* 2016;9:49–67.
34. Moreno R, Poyser S, Meilak D, Meo A, Jenkins S, Lazarov VK, et al. The role of faceting and elongation on the magnetic anisotropy of magnetite Fe₃O₄ nanocrystals. *Sci Rep.* 2020;10(1):2722.
35. Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials.* 2005;26(18):3995–4021.
36. Reddy LH, Arias JL, Nicolas J, Couvreur P. Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Chem Rev.* 2012;112(11):5818–78.
37. Arias JL. Evaluación de nanopartículas de poli(etil-2-cianoacrilato) con núcleo magnético como sistemas de liberación controlada del antineoplásico 5-fluorouracilo. [Doctor]. Universidad de Granada; 2003.
38. Clares B, Biedma-Ortiz RA, Sáez-Fernández E, Prados JC, Melguizo C, Cabeza L, et al. Nano-engineering of 5-fluorouracil-loaded magnetoliposomes for combined hyperthermia and chemotherapy against colon cancer. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013;85(3 Pt A):329–38.
39. El-Hammadi MM, Delgado ÁV, Melguizo C, Prados JC, Arias JL. Folic acid-decorated and PEGylated PLGA nanoparticles for improving the antitumour activity of 5-fluorouracil. *Int J Pharm.* 2017;516:61–70.
40. Unterweger H, Dézsi L, Matuszak J, Janko C, Poettler M, Jordan J, et al. Dextran-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging: Evaluation of size-dependent imaging properties, storage stability and safety. *Int J Nanomedicine.* 2018;13:1899–915.
41. Rahman MA, Matsumura Y, Yano S, Ochiai B. PH-Responsive Charge-Conversional and Hemolytic Activities of Magnetic Nanocomposite Particles for Cell-Targeted Hyperthermia. *ACS Omega.* 2018;3(1):961–72.

42. Massart R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE Trans Magn.* 1981;17(2):1247–8.
43. Blanco-Andujar C, Teran FJ, Ortega D. Current Outlook and Perspectives on Nanoparticle-Mediated Magnetic Hyperthermia. In: Mahmoudi M and Laurent S. *Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications*. Elsevier Ltd.; 2018. 197–245 p.
44. Avasthi A, Caro C, Pozo-Torres E, Leal MP, García-Martín ML. Magnetic Nanoparticles as MRI Contrast Agents. *Top Curr Chem (Cham)*. 2020;378(3):40.
45. Pohlmann AR, Fonseca FN, Paese K, Detoni CB, Coradini K, Beck RC, et al. Poly(ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2013;10(5):623–38.
46. Sinha VR, Bansal K, Kaushik R, Kumria R, Trehan A. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: An overview. *Int J Pharm.* 2004;278(1):1–23.
47. Dash TK, Konkimalla VB. Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *J Control Release.* 2012;158(1):15–33.
48. Dash TK, Konkimalla VB. Polymeric modification and its implication in drug delivery: Poly- ϵ -caprolactone (PCL) as a model polymer. *Mol Pharm.* 2012;9(9):2365–79.
49. Mota AH, Duarte N, Serra AT, Ferreira A, Bronze MR, Custódio L, et al. Further evidence of possible therapeutic uses of sambucus nigra l. Extracts by the assessment of the in vitro and in vivo anti-inflammatory properties of its plga and pcl-based nanoformulations. *Pharmaceutics.* 2020;12(12):1181.
50. Ahmed TA, Aljaeid BM. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. *Drug Des Devel Ther.* 2016;10:483–507.
51. Elgadir MA, Uddin MS, Ferdosh S, Adam A, Chowdhury AJK, Sarker MZI. Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: A review. *J Food Drug Anal.* 2015;23(4):619–29.
52. Wang W, Meng Q, Li Q, Liu J, Zhou M, Jin Z, et al. Chitosan derivatives and their application in biomedicine. *Int J Mol Sci.* 2020;21(2):487.
53. Doh KO, Yeo Y. Application of polysaccharides for surface modification of nanomedicines. *Ther Deliv.* 2012;3(12):1447–56.
54. 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 Surfaces B Biointerfaces.* 2010;75(1):204–8.
55. Cabeza L, Ortiz R, Prados J, Delgado Á V., Martín-Villena MJ, Clares B, et al.

- Improved antitumor activity and reduced toxicity of doxorubicin encapsulated in poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles in lung and breast cancer treatment: An in vitro and in vivo study. *Eur J Pharm Sci.* 2017;102:24–34.
56. Berthold A, Cremer K, Kreuter J. Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for anti-inflammatory drugs. *J Control Release.* 1996;39(1):17–25.
 57. Arias JL, Reddy LH, Couvreur P. Superior preclinical efficacy of gemcitabine developed as chitosan nanoparticulate system. *Biomacromolecules.* 2011;12(1):97–104.
 58. Sari RS, de Almeida AC, Cangussu ASR, Jorge E V., Mozzer OD, Santos HO, et al. Anti-botulism single-shot vaccine using chitosan for protein encapsulation by simple coacervation. *Anaerobe.* 2016;42:182–7.
 59. Arias JL, Reddy LH, Couvreur P. Fe_3O_4 /chitosan nanocomposite for magnetic drug targeting to cancer. *J Mater Chem.* 2012;22(15):7622–32.
 60. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J Control Release.* 2016;235:337–51.
 61. Hackley VA, Clogston JD, NIST-NCL Joint Assay Protocol, PCC-1: Measuring the Size of Nanoparticles in Aqueous Media Using Batch-Mode Dynamic Light Scattering. 2010. <https://ncl.cancer.gov/resources/assay-cascade-protocols> DOI:10.17917/3F5S-6728
 62. Moore TL, Rodriguez-Lorenzo L, Hirsch V, Balog S, Urban D, Jud C, et al. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. *Chem Soc Rev.* 2015;44(17):6287–305.
 63. Delgado A V., Rica RA, Arroyo FJ, Ahualli S, Jiménez ML. AC electrokinetics in concentrated suspensions. *Colloid Interface Chem Nanotechnol.* 2016;313–50.
 64. Carrique F, Ruiz-Reina E, Roa R, Arroyo FJ, Delgado Á V. General electrokinetic model for concentrated suspensions in aqueous electrolyte solutions: Electrophoretic mobility and electrical conductivity in static electric fields. *J Colloid Interface Sci.* 2015;455:46–54.
 65. Arias JL, Gallardo V, Gómez-Lopera SA, Plaza RC, Delgado A V. Synthesis and characterization of poly(ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core. *J Control Release.* 2001;77(3):309–21.
 66. Sperling RA, Liedl T, Duhr S, Kudera S, Zanella M, Lin CAJ, et al. Size determination of (bio)conjugated water-soluble colloidal nanoparticles: A comparison of different techniques. *J Phys Chem C.* 2007;111(31):11552–9.
 67. Favi PM, Gao M, Johana Sepúlveda Arango L, Ospina SP, Morales M, Pavon JJ, et al. Shape and surface effects on the cytotoxicity of nanoparticles: Gold

- nanospheres versus gold nanostars. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2015;103(11):3449–62.
68. Hamoudeh M, Fessi H. Preparation, characterization and surface study of poly-epsilon caprolactone magnetic microparticles. *J Colloid Interface Sci*. 2006;300(2):584–90.
 69. Park EK, Lee SB, Lee YM. Preparation and characterization of methoxy poly(ethylene glycol)/poly(epsilon-caprolactone) amphiphilic block copolymeric nanospheres for tumor-specific folate-mediated targeting of anticancer drugs. *Biomaterials*. 2005;26(9):1053–61.
 70. Nakatuka Y, Yoshida H, Fukui K, Matuzawa M. The effect of particle size distribution on effective zeta-potential by use of the sedimentation method. *Adv Powder Technol*. 2015;26(2):650–6.
 71. Plaza RC, Arias JL, Espín M, Jiménez ML, Delgado A V. Aging effects in the electrokinetics of colloidal iron oxides. *J Colloid Interface Sci*. 2002;245(1):86–90.
 72. Cózar-Bernal MJ, Holgado MA, Arias JL, Muñoz-Rubio I, Martín-Banderas L, Álvarez-Fuentes J, et al. Insulin-loaded PLGA microparticles: Flow focusing versus double emulsion/solvent evaporation. *J Microencapsul*. 2011;28(5):430–41.
 73. Clares B, Biedma-Ortiz RA, Sáez-Fernández E, Prados JC, Melguizo C, Cabeza L, et al. Nano-engineering of 5-fluorouracil-loaded magnetoliposomes for combined hyperthermia and chemotherapy against colon cancer. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013;85:329–38.
 74. Lorente C, Arias JL, Cabeza L, Ortiz R, Prados JC, Melguizo C, et al. Nano-engineering of biomedical prednisolone liposomes: evaluation of the cytotoxic effect on human colon carcinoma cell lines. *J Pharm Pharmacol*. 2018;70(4):488–97.
 75. Martínez NA, Fernández-Álvarez F, Delgado Á V., Badillo-García ML, Raba J, Cerutti SE, et al. First steps in the formulation of praziquantel nanosuspensions for pharmaceutical applications. *Pharm Dev Technol*. 2020;25(7):892–8.
 76. Jesus S, Bouchard G, Borges O. Freeze Dried Chitosan/Poly-epsilon-Caprolactone and Poly-epsilon-Caprolactone Nanoparticles: Evaluation of their Potential as DNA and Antigen Delivery Systems. *J Genet Syndr Gene Ther*. 2013;4:7.
 77. Ortiz R, Cabeza L, Arias JL, Melguizo C, Álvarez PJ, Vélez C, et al. Poly(butylcyanoacrylate) and Poly(epsilon-caprolactone) Nanoparticles Loaded with 5-Fluorouracil Increase the Cytotoxic Effect of the Drug in Experimental Colon Cancer. *AAPS J*. 2015;17(4):918–29.
 78. Lyklema, J. The role of surface conduction in the development of electrokinetics. In: Delgado, A.V. *Interfacial Electrokinetics and Electrophoresis*. Marcel Dekker:

New York, NY, USA, 2002; 87–97 p.

79. Muñoz de Escalona M, Sáez-Fernández E, Prados JC, Melguizo C, Arias JL. Magnetic solid lipid nanoparticles in hyperthermia against colon cancer. *Int J Pharm.* 2016;504(1-2):11–9.
80. Arias JL, López-Viota M, Ruiz MA, López-Viota J, Delgado A V. Development of carbonyl iron/ethylcellulose core/shell nanoparticles for biomedical applications. *Int J Pharm.* 2007;339(1-2):237–45.
81. Salimi M, Sarkar S, Saber R, Delavari H, Alizadeh AM, Mulder HT. Magnetic hyperthermia of breast cancer cells and MRI relaxometry with dendrimer-coated iron-oxide nanoparticles. *Cancer Nanotechnol.* 2018;9(1):7.
82. Mondal D, Griffith M, Venkatraman SS. Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery: Current scenario and challenges. *Int J Polym Mater Polym Biomater.* 2016;65(5):255–65.
83. Champion JA, Walker A, Mitragotri S. Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. *Pharm Res.* 2008;25(8):1815–21.
84. Megías R, Arco M, Ciriza J, Saenz Del Burgo L, Puras G, López-Viota M, Delgado ÁV, Dobson JP, Arias JL, Pedraz JL. Design and characterization of a magnetite/PEI multifunctional nanohybrid as non-viral vector and cell isolation system. *Int J Pharm.* 2017; 518(1-2):270–80.
85. Tucci ST, Seo JW, Kakwere H, Kheirrolomoom A, Ingham ES, Mahakian LM, et al. A scalable method for squalenylation and assembly of multifunctional⁶⁴cu-labeled squalenoylated gemcitabine nanoparticles. *Nanotheranostics.* 2018;2(4):387–402.
86. Liu J, Xu L, Liu C, Zhang D, Wang S, Deng Z, et al. Preparation and characterization of cationic curcumin nanoparticles for improvement of cellular uptake. *Carbohydr Polym.* 2012;90(1):16–22.
87. Goon IY, Lai LMH, Lim M, Munroe P, Gooding JJ, Amal R. Fabrication and dispersion of gold-shell-protected magnetite nanoparticles: Systematic control using polyethyleneimine. *Chem Mater.* 2009;21(4):673–81.
88. Hühn D, Kantner K, Geidel C, Brandholt S, De Cock I, Soenen SJH, et al. Polymer-coated nanoparticles interacting with proteins and cells: Focusing on the sign of the net charge. *ACS Nano.* 2013;7(4):3253–63.
89. Araki J. Electrostatic or steric-preparations and characterizations of well-dispersed systems containing rod-like nanowhiskers of crystalline polysaccharides. *Soft Matter.* 2013;9(16):4125–41.
90. Kurlyandskaya G V., Litvinova LS, Safronov AP, Schupletsova V V., Tyukova IS, Khaziakhmatova OG, et al. Water-Based suspensions of iron oxide nanoparticles

- with electrostatic or steric stabilization by chitosan: Fabrication, characterization and biocompatibility. *Sensors* (Switzerland). 2017;17(11).
91. Williams DB, Carter CB. *Transmission electron microscopy: A textbook for materials science*, 2nd. ed. Springer; 2009.
 92. Arias JL, Ruiz MA, Gallardo V, Delgado Á V. Tegafur loading and release properties of magnetite/poly(alkylcyanoacrylate) (core/shell) nanoparticles. *J Control Release*. 2008;125(1):50–8.
 93. Arias JL, Gallardo V, Ruiz MA, Delgado Á V. Magnetite/poly(alkylcyanoacrylate) (core/shell) nanoparticles as 5-Fluorouracil delivery systems for active targeting. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008;69(1):54–63.
 94. Santos DP, Ruiz MA, Gallardo V, Zanoni MVB, Arias JL. Multifunctional antitumor magnetite/chitosan-L-glutamic acid (core/shell) nanocomposites. *J Nanoparticle Res*. 2011;13(9):4311–23.
 95. Dutschk V, Marmur A. The contact angle as an analytical tool. *Colloid Interface Chem Nanotechnol*. 2016;255–70.
 96. van Oss CJ. *Interfacial forces in aqueous media*, 2nd. ed. *Interfacial Forces in Aqueous Media*. CRC Press; 2006.
 97. Hubbe MA. Why, After All, Are Chitosan Films Hydrophobic?. *BioResourcess*. 2019;14(4):7630–31.
 98. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. *Principios de Análisis Instrumental*. 5th ed. McGraw-Hill; 2001. p. 322-353.
 99. Steele IM. *Physical Methods in Determinative Mineralogy* . J. Zussman . *J Geol*. 1982;90(4):465–465.
 100. Gartstein E, Cohen JB, Mason TO. Defect agglomeration in wustite at high temperatures-II. An electrical conduction model. *J Phys Chem Solids*. 1986;47(8):775–81.
 101. Dou T, Wang J, Han C, Shao X, Zhang J, Lu W. Cellular uptake and transport characteristics of chitosan modified nanoparticles in Caco-2 cell monolayers. *Int J Biol Macromol*. 2019;138:791–9.
 102. Li F, Zhang X, Li H, Xiang L, Chen Y. Preparation of self-assembled nanoparticles of chitosan oligosaccharide-graftpolycaprolactone as a carrier of bovine serum albumin drug. *Biomed Mater Eng*. 2014;24(6):2041–8.
 103. Duan K, Zhang X, Tang X, Yu J, Liu S, Wang D, et al. Fabrication of cationic nanomicelle from chitosan-graft-polycaprolactone as the carrier of 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2010;76(2):475–82.
 104. Zussman J. *Physical Methods in Determinative Mineralogy*, 2nd edn. *J. Microsc.*

- 1979;115(3):299.
105. Glisoni RJ, Quintana L SS, Molina M, Calderón M, Moglioni AG, Sosnik A. Chitosan-g-oligo(epsilon-caprolactone) polymeric micelles: Microwave-assisted synthesis and physicochemical and cytocompatibility characterization. *J Mater Chem B*. 2015;3(24):4853–64.
 106. Marf AS, Abdullah RM, Aziz SB. Structural, morphological, electrical and electrochemical properties of PVA: CS-based proton-conducting polymer blend electrolytes. *Membranes (Basel)*. 2020;10(4):71.
 107. Baji A, Wong SC, Liu T, Li T, Srivatsan TS. Morphological and X-ray diffraction studies of crystalline hydroxyapatite-reinforced polycaprolactone. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2007;81(2):343–50.
 108. López-López MT, Gómez-Ramírez A, Rodríguez-Arco L, Durán JDG, Iskakova L, Zubarev A. Colloids on the frontier of ferrofluids. Rheological properties. *Langmuir*. 2012;28(15):6232–45.
 109. Fischer HC, Chan WC. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. *Curr Opin Biotechnol*. 2007;18(6):565–71.
 110. Aguilar ZP. Nanopharmacology. In: Aguilar ZP. *Nanomaterials for Medical Applications*. 2013. 293–360 p.
 111. Ding T, Sun J. Formation of Protein Corona on Nanoparticle Affects Different Complement Activation Pathways Mediated by C1q. *Pharm Res*. 2020;37(1):10.
 112. Lynch I, Cedervall T, Lundqvist M, Cabaleiro-Lago C, Linse S, Dawson KA. The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century. *Adv Colloid Interface Sci*. 2007;134–135:167–74.
 113. Tekie FSM, Hajiramezani M, Geramifar P, Raoufi M, Dinarvand R, Soleimani M, et al. Controlling evolution of protein corona: a prosperous approach to improve chitosan-based nanoparticle biodistribution and half-life. *Sci Rep*. 2020;10(1):9664.
 114. Tenzer S, Docter D, Rosfa S, Wlodarski A, Kuharev J, Rekić A, et al. Nanoparticle size is a critical physicochemical determinant of the human blood plasma corona: A comprehensive quantitative proteomic analysis. *ACS Nano*. 2011;5(9):7155–67.
 115. Falahati M, Attar F, Sharifi M, Haertlé T, Berret JF, Khan RH, Saboury AA. A health concern regarding the protein corona, aggregation and disaggregation. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2019;1863(5):971–991.
 116. Champion JA, Pustulka SM, Ling K, Pish SL. Protein nanoparticle charge and hydrophobicity govern protein corona and macrophage uptake. *ACS Appl Mater*

- Interfaces. 2020;12(43):48284–95.
117. Vidaurre-Agut C, Rivero-Buceta E, Romaní-Cubells E, Clemmets AM, Vera-Donoso CD, Landry CC, et al. Protein corona over mesoporous silica nanoparticles: Influence of the pore diameter on competitive adsorption and application to prostate cancer diagnostics. *ACS Omega*. 2019;4(5):8852–61.
 118. Partikel K, Korte R, Mulac D, Humpf HU, Langer K. Serum type and concentration both affect the protein-corona composition of PLGA nanoparticles. *Beilstein J Nanotechnol*. 2019;10:1002–15.
 119. Wolfram J, Yang Y, Shen J, Moten A, Chen C, Shen H, et al. The nano-plasma interface: Implications of the protein corona. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2014;124(11):17–24.
 120. Goy-López S, Juárez J, Alatorre-Meda M, Casals E, Puentes VF, Taboada P, et al. Physicochemical characteristics of protein-NP bioconjugates: The role of particle curvature and solution conditions on human serum albumin conformation and fibrillogenesis inhibition. *Langmuir*. 2012;28(24):9113–26.
 121. Deng ZJ, Liang M, Monteiro M, Toth I, Minchin RF. Nanoparticle-induced unfolding of fibrinogen promotes Mac-1 receptor activation and inflammation. *Nat Nanotechnol*. 2011;6(1):39–44.
 122. Tenzer S, Docter D, Kuharev J, Musyanovych A, Fetz V, Hecht R, et al. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat Nanotechnol*. 2013;8(10):772–81.
 123. Hachani R, Birchall MA, Lowdell MW, Kasparis G, Tung LD, Manshian BB, et al. Assessing cell-nanoparticle interactions by high content imaging of biocompatible iron oxide nanoparticles as potential contrast agents for magnetic resonance imaging. *Sci Rep*. 2017;7(1):7850.
 124. Tamayo I, Irache JM, Mansilla C, Ochoa-Repáraz J, Lasarte JJ, Gamazo C. Poly(anhydride) nanoparticles act as active Th1 adjuvants through toll-like receptor exploitation. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17(9):1356–62.
 125. Chanan-Khan A, Szebeni J, Savay S, Liebes L, Rafique NM, Alving CR, et al. Complement activation following first exposure to pegylated liposomal doxorubicin (Doxil®): Possible role in hypersensitivity reactions. *Ann Oncol*. 2003;14(9):1430–7.
 126. Tenzer S, Docter D, Kuharev J, Musyanovych A, Fetz V, Hecht R, et al. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat Nanotechnol*. 2013;8(10):772–81.
 127. Szebeni J. Complement activation-related pseudoallergy: A new class of drug-induced acute immune toxicity. *Toxicology*. 2005;216(2–3):106–21.

128. NIH: National Cancer Institute: NCL: Nanotechnology Characterization Laboratory. Assay cascade protocols. [Internet]. [Consultado en 10/12/2020]. Disponible: <https://ncl.cancer.gov/resources/assay-cascade-protocols>
129. FDA: Food and Drug Administration. Nanotechnology Guidance Documents. [Internet]. [Consultado en 10/12/2020]. Disponible: <https://www.fda.gov/science-research/nanotechnology-programsfda/nanotechnology-guidance-documents>
130. European Medicines Agency. Multidisciplinary: nanomedicines. [Internet]. [Consultado en 12/12/2020]. Disponible: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/scientific-guidelines/multidisciplinary/multidisciplinary-nanomedicines>
131. Asadi N, Annabi N, Mostafavi E, Anzabi M, Khalilov R, Saghfi S, et al. Synthesis, characterization and in vitro evaluation of magnetic nanoparticles modified with PCL-PEG-PCL for controlled delivery of 5FU. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 2018;46(sup1):938-45.
132. Lawen A, Lane DJR. Mammalian iron homeostasis in health and disease: Uptake, storage, transport, and molecular mechanisms of action. *Antioxidants Redox Signal.* 2013;18(18):2473-507.
133. Anderson GJ, Frazer DM. Current understanding of iron homeostasis. *Am J Clin Nutr.* 2017;106:1559S-1566S.
134. Jaganjac M, Sunjic SB, Zarkovic N. Utilizing iron for targeted lipid peroxidation as anticancer option of integrative biomedicine: A short review of nanosystems containing iron. *Antioxidants.* 2020;9(3):1-16.
135. Hirschhorn T, Stockwell BR. The development of the concept of ferroptosis. *Free Radic Biol Med.* 2019;133:130-43.
136. Qian X, Zhang J, Gu Z, Chen Y. Nanocatalysts-augmented Fenton chemical reaction for nanocatalytic tumor therapy. *Biomaterials.* 2019;211:1-13.
137. Clerc P, Jeanjean P, Hallalli N, Gougeon M, Pipy B, Carrey J, et al. Targeted Magnetic Intra-Lysosomal Hyperthermia produces lysosomal reactive oxygen species and causes Caspase-1 dependent cell death. *J Control Release.* 2018;270:120-34.
138. Wu H, Liu L, Song L, Ma M, Gu N, Zhang Y. Enhanced Tumor Synergistic Therapy by Injectable Magnetic Hydrogel Mediated Generation of Hyperthermia and Highly Toxic Reactive Oxygen Species. *ACS Nano.* 2019;13(12):14013-23.
139. Koskenkorva-Frank TS, Weiss G, Koppenol WH, Burckhardt S. The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: Insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative

- and nitrosative stress. *Free Radic Biol Med*. 2013;65:1174–94.
140. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019;43(6):582–92.
 141. Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015;93:52–79.
 142. L. Arias J. Drug Targeting Strategies in Cancer Treatment: An Overview. *Mini-Reviews Med Chem*. 2010;11(1):1–17.
 143. Du Y, Liu X, Liang Q, Liang XJ, Tian J. Optimization and Design of Magnetic Ferrite Nanoparticles with Uniform Tumor Distribution for Highly Sensitive MRI/MPI Performance and Improved Magnetic Hyperthermia Therapy. *Nano Lett*. 2019;19(6):3618–26.
 144. Yang B, Chen Y, Shi J. Reactive oxygen species (ROS)-based nanomedicine. *Chem Rev*. 2019;119(8):4881–985.
 145. Aguilar ZP. Nanotoxicology and Remediation. In: Aguilar ZP. *Nanomaterials for Medical Applications*. 2013. 361–408 p.
 146. Gorski CA, Nurmi JT, Tratnyek PG, Hofstetter TB, Scherer MM. Redox behavior of magnetite: Implications for contaminant reduction. *Environ Sci Technol*. 2010;44(1):55–60.
 147. Patil RM, Thorat ND, Shete PB, Bedge PA, Gavde S, Joshi MG, et al. Comprehensive cytotoxicity studies of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Biochem Biophys Reports*. 2018;13:63–72.
 148. Ning P, Zucker EJ, Wong P, Vasanawala SS. Hemodynamic safety and efficacy of ferumoxytol as an intravenous contrast agents in pediatric patients and young adults. *Magn Reson Imaging*. 2016;34(2):152–8.
 149. Aoki T, Saito M, Koseki H, Tsuji K, Tsuji A, Murata K, et al. Macrophage Imaging of Cerebral Aneurysms with Ferumoxytol: an Exploratory Study in an Animal Model and in Patients. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2017;26(10):2055–64.
 150. Maier-Hauff K, Rothe R, Scholz R, Gneveckow U, Wust P, Thiesen B, et al. Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: Results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*. 2007;81(1):53–60.
 151. Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62(1):3–11.
 152. Bobo D, Robinson KJ, Islam J, Thurecht KJ, Corrie SR. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm Res*. 2016;33(10):2373–87.

153. Pappalardo D, Mathisen T, Finne-Wistrand A. Biocompatibility of Resorbable Polymers: A Historical Perspective and Framework for the Future. *Biomacromolecules*. 2019;20(4):1465–77.
154. Sugarman BJ, Aggarwal BB, Hass PE, Figari IS, Palladino MA. Recombinant Human Tumor Necrosis Factor- α : Effects on Proliferation of Normal and Transformed Cells in Vitro. *Science*. 1985;230:943–5.
155. Murakami H, Masui H. Hormonal control of human colon carcinoma cell growth in serum-free medium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(6 I):3464–8.
156. Varan C, Bilensoy E. Cationic PEGylated polycaprolactone nanoparticles carrying post-operation docetaxel for glioma treatment. *Beilstein J Nanotechnol*. 2017;8(1):1446–56.
157. Nguyen THA, Nguyen VC. Formation of nanoparticles in aqueous solution from poly(ϵ -caprolactone)- poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone). *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol*. 2010;1(2):025012.
158. Nasr M, Hashem FM, Khairy A, Alqurshi A. In vitro cytotoxicity and transfection efficiency of pdna encoded p53 gene-loaded chitosan-sodium deoxycholate nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:4123–31.
159. Qi LF, Xu ZR, Li Y, Jiang X, Han XY. In vitro effects of chitosan nanoparticles on proliferation of human gastric carcinoma cell line MGC803 cells. *World J Gastroenterol*. 2005;11(33):5136–41.
160. Dash BC, Réthoré G, Monaghan M, Fitzgerald K, Gallagher W, Pandit A. The influence of size and charge of chitosan/polyglutamic acid hollow spheres on cellular internalization, viability and blood compatibility. *Biomaterials*. 2010;31(32):8188–97.
161. López-Viota M, El-Hammadi MM, Cabeza L, Prados J, Melguizo C, Ruiz Martinez MA, et al. Development and Characterization of Magnetite/Poly(butylcyanoacrylate) Nanoparticles for Magnetic Targeted Delivery of Cancer Drugs. *AAPS PharmSciTech*. 2017;18(8):3042–52.
162. Huang H, Lai W, Cui M, Liang L, Lin Y, Fang Q, et al. An Evaluation of Blood Compatibility of Silver Nanoparticles. *Sci Rep*. 2016;6:1–15.
163. Lu S, Duffin R, Poland C, Daly P, Murphy F, Drost E, et al. Efficacy of simple short-term in vitro assays for predicting the potential of metal oxide nanoparticles to cause pulmonary inflammation. *Environ Health Perspect*. 2009;117(2):241–7.
164. Bong H, Hyun MaBLGLG. A Simple and Reliable Test to Monitor Heparin Therapy. *Am J Clin Pathol*. 1975;65.
165. Ningombam GS, Ningthoujam RS, Kalkura SN, Singh NR. Induction Heating Efficiency of Water-Dispersible $Mn_{0.5}Fe_{2.5}O_4@YVO_4:Eu^{3+}$ Magnetic-Luminescent

- Nanocomposites in an Acceptable ac Magnetic Field: Hemocompatibility and Cytotoxicity Studies. *J Phys Chem B*. 2018;122(27):6862–71.
166. Huang H, Lai W, Cui M, Liang L, Lin Y, Fang Q, et al. An Evaluation of Blood Compatibility of Silver Nanoparticles. *Sci Rep*. 2016;6:1–15.
 167. Singhal JP, Ray AR. Synthesis of blood compatible polyamide block copolymers. *Biomaterials*. 2002;23(4):1139–45.
 168. Chen K, Xie K, Long Q, Deng L, Fu Z, Xiao H, et al. Fabrication of core-shell Ag@pDA@HAp nanoparticles with the ability for controlled release of Ag⁺ and superior hemocompatibility. *RSC Adv*. 2017;7(47):29368–77.
 169. Komath M, Varma HK. Development of a fully injectable calcium phosphate cement for orthopedic and dental applications. *Bull Mater Sci*. 2003;26(4):415–22.
 170. Uppal S, Kaur K, Kumar R, Kaur ND, Shukla G, Mehta SK. Chitosan nanoparticles as a biocompatible and efficient nanowagon for benzyl isothiocyanate. *Int J Biol Macromol*. 2018;115:18–28.
 171. Gao X, Wang BL, Wei XW, Rao W, Ai F, Zhao F, et al. Preparation, characterization and application of star-shaped PCL/PEG micelles for the delivery of doxorubicin in the treatment of colon cancer. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:971–82.
 172. Malikmammadov E, Tanir TE, Kiziltay A, Hasirci V, Hasirci N. PCL and PCL-based materials in biomedical applications. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2018;29(7-9):863–893.
 173. Chen D, Tang Q, Li X, Zhou X, Zang J, Xue WQ, et al. Biocompatibility of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles and their cytotoxic effect on MCF-7 cells. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:4973–82.
 174. Radomska A, Leszczyszyn J, Radomski MW. The nanopharmacology and nanotoxicology of nanomaterials: New opportunities and challenges. *Adv Clin Exp Med*. 2016;25(1):151–62.
 175. de la Harpe KM, Kondiah PPD, Choonara YE, Marimuthu T, du Toit LC, Pillay V. The Hemocompatibility of Nanoparticles: A Review of Cell-Nanoparticle Interactions and Hemostasis. *Cells*. 2019;8(10):1209.
 176. Hajtuch J, Hante N, Tomczyk E, Wojcik M, Radomski MW, Santos-Martinez MJ, et al. Effects of functionalized silver nanoparticles on aggregation of human blood platelets. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:7399–417.
 177. Bircher L, Theusinger OM, Locher S, Eugster P, Roth-Z'Graggen B, Schumacher CM, et al. Characterization of carbon-coated magnetic nanoparticles using clinical blood coagulation assays: Effect of PEG-functionalization and comparison to silica nanoparticles. *J Mater Chem B*. 2014;2(24):3753–8.
 178. Wang Q, Shen M, Zhao T, Xu Y, Lin J, Duan Y, Gu H. Low toxicity and long

- circulation time of polyampholyte-coated magnetic nanoparticles for blood pool contrast agents. *Sci Rep.* 2015;14;5:7774.
179. Amit M, Margulets V, Segev H, Shariki K, Laevsky I, Coleman R, et al. Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biol Reprod.* 2003;68(6):2150–6.
 180. Atale N, Gupta S, Yadav UCS, Rani V. Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. *J Microsc.* 2014;255(1):7–19.
 181. Suzuki T, Fujikura K, Higashiyama T, Takata K. DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. *J Histochem Cytochem.* 1997;45(1):49–53.
 182. Jonsson B, Liminga G, Csoka K, Fridborg H, Dhar S, Nygren P, et al. Cytotoxic activity of calcein acetoxymethyl ester (calcein/AM) on primary cultures of human haematological and solid tumours. *Eur J Cancer.* 1996;32(5):883–7.
 183. Attari E, Nosrati H, Danafar H, Kheiri Manjili H. Methotrexate anticancer drug delivery to breast cancer cell lines by iron oxide magnetic based nanocarrier. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2019;107(11):2492–500.
 184. Kirschning A, Kupracz L, Hartwig J. New synthetic opportunities in miniaturized flow reactors with inductive heating. *Chem Lett.* 2012;41(6):562–70.
 185. Blanco-Andujar C, Walter A, Cotin G, Bordeianu C, Mertz D, Felder-Flesch D, et al. Design of iron oxide-based nanoparticles for MRI and magnetic hyperthermia. *Nanomedicine.* 2016;11(14):1889–910.
 186. Laurent S, Dutz S, Häfeli UO, Mahmoudi M. Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Adv Colloid Interface Sci.* 2011;166(1–2):8–23.
 187. Gilchrist RK, Medal R, Shorey WD, Hanselman RC, Parrot JC, Taylor CB. Selective inductive heating of lymph nodes. *Ann Surg.* 1957;146(4):596–606.
 188. MagForce. Treatment of brain cancer in Europe: Treatment of intermediate risk prostate cancer in the USA. [Internet][Consultado en: 20/01/2021]. Disponible: https://www.magforce.com/fileadmin/user_upload/170630_eSHL_final_clean.pdf
 189. Chang D, Lim M, Goos JACM, Qiao R, Ng YY, Mansfeld FM, et al. Biologically targeted magnetic hyperthermia: Potential and limitations. *Front Pharmacol.* 2018;9:831.
 190. Hedayatnasab Z, Abnisa F, Daud WMAW. Review on magnetic nanoparticles for magnetic nanofluid hyperthermia application. *Mater Des.* 2017;123:174–96.
 191. Jordan A, Scholz R, Wust P, Fähling H, Felix R. Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. *J Magn Magn Mater.*

- 1999;201(1-3):413-9.
192. Hergt R, Dutz S. Magnetic particle hyperthermia-biophysical limitations of a visionary tumour therapy. *J Magn Magn Mater*. 2007;311:187-92.
 193. Iglesias GR, Reyes-Ortega F, Fernandez BLC, Delgado Á V. Hyperthermia-triggered gemcitabine release from polymer-coated magnetite nanoparticles. *Polymers (Basel)*. 2018;10(3):269.
 194. Mai BT, Balakrishnan PB, Barthel MJ, Piccardi F, Niculaes D, Marinaro F, et al. Thermoresponsive Iron Oxide Nanocubes for an Effective Clinical Translation of Magnetic Hyperthermia and Heat-Mediated Chemotherapy. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019;11(6):5727-5739.
 195. Herea DD, Danceanu C, Radu E, Labusca L, Lupu N, Chiriac H. Comparative effects of magnetic and water-based hyperthermia treatments on human osteosarcoma cells. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:5743-51.
 196. Wust P, Gneveckow U, Johannsen M, Böhmer D, Henkel T, Kahmann F, et al. Magnetic nanoparticles for interstitial thermotherapy - Feasibility, tolerance and achieved temperatures. *Int J Hyperth*. 2006;22(8):673-85.
 197. Mejías R, Hernández Flores P, Talelli M, Tajada-Herráiz JL, Brollo MEF, Portilla Y, et al. Cell-Promoted Nanoparticle Aggregation Decreases Nanoparticle-Induced Hyperthermia under an Alternating Magnetic Field Independently of Nanoparticle Coating, Core Size, and Subcellular Localization. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019;11(1):340-55.
 198. Soukup D, Moise S, Céspedes E, Dobson J, Telling ND. In situ measurement of magnetization relaxation of internalized nanoparticles in live cells. *ACS Nano*. 2015;9(1):231-40.
 199. De La Presa P, Luengo Y, Multigner M, Costo R, Morales MP, Rivero G, et al. Study of heating efficiency as a function of concentration, size, and applied field in γ -Fe₂O₃ nanoparticles. *J Phys Chem C*. 2012;116(48):25602-10.
 200. Patsula V, Moskvina M, Dutz S, Horák D. Size-dependent magnetic properties of iron oxide nanoparticles. *J Phys Chem Solids*. 2016;88:24-30.
 201. Gandia D, Gandarias L, Marcano L, Orue I, Gil-Cartón D, Alonso J, et al. Elucidating the role of shape anisotropy in faceted magnetic nanoparticles using biogenic magnetosomes as a model. *Nanoscale*. 2020;12(30):16081-90.
 202. Ortega D, Pankhurst QA. Magnetic hyperthermia. In: O'Brien P. *Nanoscience: Volume 1: Nanostructures through Chemistry 2012*;60-88 p.
 203. Salas G, Camarero J, Cabrera D, Takacs H, Varela M, Ludwig R, et al. Modulation of magnetic heating via dipolar magnetic interactions in monodisperse and crystalline iron oxide nanoparticles. *J Phys Chem C*. 2014;118(34):19985-94.

204. Serantes D, Baldomir D, Martinez-Boubeta C, Simeonidis K, Angelakeris M, Natividad E, et al. Influence of dipolar interactions on hyperthermia properties of ferromagnetic particles. *J Appl Phys.* 2010;108(7):073918.
205. Kandasamy G, Sudame A, Bhati P, Chakrabarty A, Kale SN, Maity D. Systematic magnetic fluid hyperthermia studies of carboxyl functionalized hydrophilic superparamagnetic iron oxide nanoparticles based ferrofluids. *J Colloid Interface Sci.* 2018;514:534–43.
206. Kandasamy G, Sudame A, Luthra T, Saini K, Maity D. Functionalized Hydrophilic Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Magnetic Fluid Hyperthermia Application in Liver Cancer Treatment. *ACS Omega.* 2018;3(4):3991–4005.
207. Chomoucka J, Drbohlavova J, Huska D, Adam V, Kizek R, Hubalek J. Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. *Pharmacol Res.* 2010;62(2):144–9.
208. Gutiérrez L, Costo R, Grüttner C, Westphal F, Gehrke N, Heinke D, et al. Synthesis methods to prepare single- and multi-core iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Dalt Trans.* 2015;44(7):2943–52.
209. Dutz S, Clement JH, Eberbeck D, Gelbrich T, Hergt R, Müller R, et al. Ferrofluids of magnetic multicore nanoparticles for biomedical applications. *J Magn Magn Mater.* 2009;321(10):1501–4.
210. Alphanéry E, Guyot F, Chebbi I. Preparation of chains of magnetosomes, isolated from *Magnetospirillum magneticum* strain AMB-1 magnetotactic bacteria, yielding efficient treatment of tumors using magnetic hyperthermia. *Int J Pharm.* 2012;434(1–2):444–52.
211. Sakellari D, Brintakis K, Kostopoulou A, Myrovali E, Simeonidis K, Lappas A, et al. Ferrimagnetic nanocrystal assemblies as versatile magnetic particle hyperthermia mediators. *Mater Sci Eng C.* 2016;58:187–93.
212. Montes Robles R. Diseño y desarrollo de sistemas electrónicos de hipertermia y liberación controlada para aplicaciones bioquímicas y farmacológicas. [Doctor]. Universidad Politécnica de Valencia; 2018.
213. Kallumadil M, Tada M, Nakagawa T, Abe M, Southern P, Pankhurst QA. Suitability of commercial colloids for magnetic hyperthermia. *J Magn Magn Mater.* 2009;321(10):1509–13.
214. Chandrasekharan P, Tay ZW, Hensley D, Zhou XY, Fung BKL, Colson C, et al. Using magnetic particle imaging systems to localize and guide magnetic hyperthermia treatment: Tracers, hardware, and future medical applications. *Theranostics.* 2020;10(7):2965–81.
215. Lepock JR, Borrelli MJ. How do cells respond to their thermal environment? *Int J Hyperth.* 2005;21(8):681–7.

216. Ahmed K, Zaidi SF, Mati-ur-Rehman, Rehman R, Kondo T. Hyperthermia and protein homeostasis: Cytoprotection and cell death. *J Therm Biol.* 2020;91:102615.
217. Cellai F, Munnia A, Viti J, Doumett S, Ravagli C, Ceni E, et al. Magnetic hyperthermia and oxidative damage to dna of human hepatocarcinoma cells. *Int J Mol Sci.* 2017;18(5):939.
218. Almanza A, Carlesso A, Chintha C, Creedican S, Doultosinos D, Leuzzi B, et al. Endoplasmic reticulum stress signalling – from basic mechanisms to clinical applications. *FEBS J.* 2019;286(2):241–78.
219. Richter K, Haslbeck M, Buchner J. The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. *Mol Cell.* 2010;40(2):253–66.
220. Sandre O, Genevois C, Garaio E, Adumeau L, Mornet S, Couillaud F. In vivo imaging of local gene expression induced by magnetic hyperthermia. *Genes (Basel).* 2017;8(2):61.
221. Oei AL, Vriend LEM, Crezee J, Franken NAP, Krawczyk PM. Effects of hyperthermia on DNA repair pathways: One treatment to inhibit them all. *Radiat Oncol.* 2015;10:165.
222. Yang R, Tang Q, Miao F, An Y, Li M, Han Y, et al. Inhibition of heat-shock protein 90 sensitizes liver cancer stem-like cells to magnetic hyperthermia and enhances anti-tumor effect on hepatocellular carcinoma-burdened nude mice. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:7345–58.
223. Adachi S, Kokura S, Okayama T, Ishikawa T, Takagi T, Handa O, et al. Effect of hyperthermia combined with gemcitabine on apoptotic cell death in cultured human pancreatic cancer cell lines. *Int J Hyperth.* 2009;25(3):210–9.
224. Kandasamy G, Sudame A, Bhati P, Chakrabarty A, Kale SN, Maity D. Systematic magnetic fluid hyperthermia studies of carboxyl functionalized hydrophilic superparamagnetic iron oxide nanoparticles based ferrofluids. *J Colloid Interface Sci.* 2018;514:534-543.
225. Landon C. Interaction Between Hyperthermia and Cisplatin Treatment. 2014;29(6):528–38.
226. Dunne M, Dou YN, Drake DM, Spence T, Gontijo SML, Wells PG, et al. Hyperthermia-mediated drug delivery induces biological effects at the tumor and molecular levels that improve cisplatin efficacy in triple negative breast cancer. *J Control Release.* 2018;282:35–45.
227. Khadir A, Verreault J, Averill DA. Inhibition of antioxidants and hyperthermia enhance bleomycin-induced cytotoxicity and lipid peroxidation in Chinese hamster ovary cells. *Arch Biochem Biophys.* 1999;370(2):163–75.

228. Li Z, Deng J, Sun J, Ma Y. Hyperthermia Targeting the Tumor Microenvironment Facilitates Immune Checkpoint Inhibitors. *Front Immunol.* 2020;11:595207.
229. Pan J, Hu P, Guo Y, Hao J, Ni D, Xu Y, et al. Combined Magnetic Hyperthermia and Immune Therapy for Primary and Metastatic Tumor Treatments. *ACS Nano.* 2020;14(1):1033–44.
230. Qiao G, Wang X, Zhou X, Morse MA, Wu J, Wang S, et al. Immune correlates of clinical benefit in a phase I study of hyperthermia with adoptive T cell immunotherapy in patients with solid tumors. *Int J Hyperth.* 2019;36(sup1):74–82.
231. Dutz S, Hergt R. Magnetic particle hyperthermia - A promising tumour therapy? *Nanotechnology.* 2014;25(45):452001.
232. Huber DL. Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small.* 2005;1(5):482–501.
233. Kettering M, Grau I, Pömpner N, Stapf M, Gajda M, Teichgräber U, et al. Means to increase the therapeutic efficiency of magnetic heating of tumors. *Biomed Tech.* 2015;60(5):505–17.
234. Gonzales M, Krishnan KM. Synthesis of magnetoliposomes with monodisperse iron oxide nanocrystal cores for hyperthermia. *J Magn Magn Mater.* 2005;293(1):265–70.
235. Grillo R, Gallo J, Stroppa DG, Carbó-Argibay E, Lima R, Fraceto LF, et al. Sub-Micrometer Magnetic Nanocomposites: Insights into the Effect of Magnetic Nanoparticles Interactions on the Optimization of SAR and MRI Performance. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8(39):25777–87.
236. Niiyama E, Uto K, Lee CM, Sakura K, Ebara M. Hyperthermia Nanofiber Platform Synergized by Sustained Release of Paclitaxel to Improve Antitumor Efficiency. *Adv Healthc Mater.* 2019;8(13):e1900102.
237. Hedayatnasab Z, Dabbagh A, Abnisa F, Wan Daud WMA. Polycaprolactone-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for in vitro magnetic hyperthermia therapy of cancer. *Eur Polym J.* 2020;133:109789.
238. Tsai MF, Lo YL, Huang YC, Yu CC, Wu YT, Su CH, et al. Multi-Stimuli-Responsive DOX Released from Magnetosome for Tumor Synergistic Theranostics. *Int J Nanomedicine.* 2020;15:8623–39.
239. Albarqi HA, Demessie AA, Sabei FY, Moses AS, Hansen MN, Dhagat P, Taratula OR, Taratula O. Systemically Delivered Magnetic Hyperthermia for Prostate Cancer Treatment. *Pharmaceutics.* 2020 Oct 25;12(11):1020.
240. Fantechi E, Innocenti C, Zanardelli M, Fittipaldi M, Falvo E, Carbo M, et al. A smart platform for hyperthermia application in cancer treatment: Cobalt-doped ferrite

- nanoparticles mineralized in human ferritin cages. *ACS Nano*. 2014;8(5):4705–19.
241. Arami H, Khandhar A, Liggitt D, Krishnan KM. In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles. *Chem Soc Rev*. 2015;44(23):8576–607.
 242. Nautiyal J, Kanwar SS, Yu Y, Majumdar APN. Combination of dasatinib and curcumin eliminates chemo-resistant colon cancer cells. *J Mol Signal*. 2011;6(1):7.
 243. Van Dijk MAJ, Floore AN, Kloppenborg KIM, Van't Veer LJ. A functional assay in yeast for the human estrogen receptor displays wild-type and variant estrogen receptor messenger RNAs present in breast carcinoma. *Cancer Res*. 1997;57(16):3478–85.
 244. Dabaghi M, Quaas R, Hilger I. The treatment of heterotopic human colon xenograft tumors in mice with 5-fluorouracil attached to magnetic nanoparticles in combination with magnetic hyperthermia is more efficient than either therapy alone. *Cancers (Basel)*. 2020;12(9):2562.
 245. Dutta B, Nema A, Shetake NG, Gupta J, Barick KC, Lawande MA, et al. Glutamic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles for tumor-targeted imaging and therapeutics. *Mater Sci Eng C*. 2020;112:110915.
 246. Estevanato LLC, Da Silva JR, Falqueiro AM, Mosiniewicz-Szablewska E, Suchocki P, Tedesco AC, et al. Co-nanoencapsulation of magnetic nanoparticles and selo for breast tumor treatment: In vitro evaluation of cytotoxicity and magnetohyperthermia efficacy. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:5287–99.
 247. Oltolina F, Peigneux A, Colangelo D, Clemente N, D'urso A, Valente G, et al. Biomimetic magnetite nanoparticles as targeted drug nanocarriers and mediators of hyperthermia in an experimental cancer model. *Cancers (Basel)*. 2020;12(9):2564.
 248. Alarifi S, Ali D, Alkahtani S, Alhader MS. Iron oxide nanoparticles induce oxidative stress, DNA damage, and caspase activation in the human breast cancer cell line. *Biol Trace Elem Res*. 2014;159(1–3):416–24.
 249. Matsuda A, Sasaki T. Antitumor activity of sugar-modified cytosine nucleosides. *Gann Monogr Cancer Res*. 2004;52(2):215–29.
 250. Reddy L, Couvreur P. Novel Approaches to Deliver Gemcitabine to Cancers. *Curr Pharm Des*. 2008;14(11):1124–37.
 251. Mini E, Nobili S, Caciagli B, Landini I, Mazzei T. Cellular pharmacology of gemcitabine. *Ann Oncol*. 2006;17(SUPPL. 5):v7–12.
 252. Paroha S, Verma J, Dubey RD, Dewangan RP, Molugulu N, Bapat RA, et al. Recent advances and prospects in gemcitabine drug delivery systems. *Int J Pharm*. 2020;592:120043.

253. Reddy L, Couvreur P. Novel Approaches to Deliver Gemcitabine to Cancers. *Curr Pharm Des.* 2008;14(11):1124–37.
254. De Sousa Cavalcante L, Monteiro G. Gemcitabine: Metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer. *Eur J Pharmacol.* 2014;741:8–16.
255. Mackey JR, Mani RS, Selner M, Mowles D, Young JD, Belt JA, et al. Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Res.* 1998;58(19):4349–57.
256. Okamura Y, Yasukawa S, Narimatsu H, Boku N, Fukutomi A, Konishi M, et al. Human equilibrative nucleoside transporter-1 expression is a predictor in patients with resected pancreatic cancer treated with adjuvant S-1 chemotherapy. *Cancer Sci.* 2020;111(2):548–60.
257. Bouffard DY, Laliberté J, Momparler RL. Kinetic studies on 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) with purified human deoxycytidine kinase and cytidine deaminase. *Biochem Pharmacol.* 1993;45(9):1857–61.
258. Jia Y, Xie J. Promising molecular mechanisms responsible for gemcitabine resistance in cancer. *Genes Dis.* 2015;2(4):299–306.
259. Plunkett W, Grindey GB, Plunkett W. Action of 2',2'-Difluorodeoxycytidine on DNA Synthesis. *Cancer Res.* 1991;51(22):6110–7.
260. Heinemann V, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W. Comparison of the Cellular Pharmacodynamics and Toxicity of 2',2'-Difluorodeoxycytidine and 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res.* 1988;48(14):4024–31.
261. Richter SN, Cartei G, Nadai M, Trestin A, Barzon L, Palumbo M, et al. In vitro basis for schedule-dependent interaction between gemcitabine and topoisomerase-targeted drugs in the treatment of colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2006;17(SUPPL. 5):20–4.
262. Heinemann V, Xu YZ, Chubb S, Sen A, Plunkett W, Hertel LW, et al. Cellular Elimination of 2',2'-Difluorodeoxycytidine 5'-Triphosphate: A Mechanism of Self-Potential. *Cancer Res.* 1992;52(3):533–9.
263. Chandler NM, Canete JJ, Callery MP. Caspase-3 drives apoptosis in pancreatic cancer cells after treatment with gemcitabine. *J Gastrointest Surg.* 2004;8(8):1072–8.
264. Habiro A, Tanno S, Koizumi K, Izawa T, Nakano Y, Osanai M, et al. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in gemcitabine-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;316(1):71–7.
265. Bergman AM, Eijk PP, Ruiz Van Haperen VWT, Smid K, Veerman G, Hubeek I, et al. In vivo induction of resistance to gemcitabine results in increased expression

- of ribonucleotide reductase subunit M1 as the major determinant. *Cancer Res.* 2005;65(20):9510–6.
266. Lotfi K, Månsson E, Chandra J, Wang Y, Xu D, Knaust E, et al. Pharmacological basis for cladribine resistance in a human acute T lymphoblastic leukaemia cell line selected for resistance to etoposide. *Br J Haematol.* 2001;113(2):339–46.
 267. Veltkamp SA, Pluim D, Van Eijndhoven MAJ, Bolijn MJ, Ong FHG, Govindarajan R, et al. New insights into the pharmacology and cytotoxicity of gemcitabine and 2',2'-difluorodeoxyuridine. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(8):2415–25.
 268. Honeywell RJ, Ruiz Van Haperen VWT, Veerman G, Smid K, Peters GJ. Inhibition of thymidylate synthase by 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine (Gemcitabine) and its metabolite 2',2'-difluoro-2'-deoxyuridine. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015;60:73–81.
 269. Derissen EJB, Huitema ADR, Rosing H, Schellens JHM, Beijnen JH. Intracellular pharmacokinetics of gemcitabine, its deaminated metabolite 2',2'-difluorodeoxyuridine and their nucleotides. *Br J Clin Pharmacol.* 2018;84(6):1279–89.
 270. CIMA: Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Gemcitabina Aurobitas. Ficha Técnica del medicamento. [Internet][Consultado en: 26/02/2021]. Disponible: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/72981/FT_72981.html
 271. Reid JM, Qu W, Safgren SL, Ames MM, Krailo MD, Seibel NL, et al. Phase I trial and pharmacokinetics of gemcitabine in children with advanced solid tumors. *J Clin Oncol.* 2004;22(12):2445–51.
 272. Gusella M, Pasini F, Bolzonella C, Meneghetti S, Barile C, Bononi A, et al. Equilibrative nucleoside transporter 1 genotype, cytidine deaminase activity and age predict gemcitabine plasma clearance in patients with solid tumours. *Br J Clin Pharmacol.* 2011;71(3):437–44.
 273. Green MR. Gemcitabine safety overview. *Semin Oncol.* 1996;23:32–5.
 274. Dubey RD, Saneja A, Gupta PK, Gupta PN. Recent advances in drug delivery strategies for improved therapeutic efficacy of gemcitabine. *Eur J Pharm Sci.* 2016;93:147–62.
 275. Sierra I, Pérez D, Morante S, Pérez Y, Ballesteros R, Sánchez A. Prácticas de análisis instrumental. Madrid: Dykinson; 2008. p. 25-35.
 276. Xu Q, Zhang Y, Trissel LA. Physical and chemical stability of gemcitabine hydrochloride solutions. *J Am Pharm Assoc (Wash).* 1999;39(4):509–13.
 277. Eli Lilly and Company. Material Safety and Data Sheet. Gemcitabine Hydrochloride for Injection. . [Internet][Consultado en 13/01/2021]. Disponible: http://ehs.lilly.com/msds/msds_gemcitabine_hydrochloride_for_injection.ht

[ml](#)

278. Pérez-Artacho Santos B. Diseño de nanomedicinas magnéticas como nueva herramienta antitumoral. [Doctor]. Universidad de Granada; 2012.
279. Daneshmand S, Golmohammadzadeh S, Jaafari MR, Movaffagh J, Rezaee M, Sahebkar A, et al. Encapsulation challenges, the substantial issue in solid lipid nanoparticles characterization. *J Cell Biochem.* 2018;119(6):4251–64.
280. Singh R, Lillard JW. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol.* 2009;86(3):215–23.
281. Nejati-Koshki K, Mesgari M, Ebrahimi E, Abbasalizadeh F, Aval SF, Khandaghi AA, et al. Synthesis and in vitro study of cisplatin-loaded Fe₃O₄ nanoparticles modified with PLGA-PEG6000 copolymers in treatment of lung cancer. *J Microencapsul.* 2014;31(8):815–23.
282. Ashour AE, Badran MM, Kumar A, Rishi AK, Yassin AE. Di-Block PLCL and Tri-Block PLCLG matrix polymeric nanoparticles enhanced the anticancer activity of loaded 5-fluorouracil. *IEEE Trans Nanobioscience.* 2016;15(7):739–47.
283. Ortiz R, Prados J, Melguizo C, Arias JL, Adolfin Ruiz M, Álvarez PJ, et al. 5-fluorouracil-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles combined with phage E gene therapy as a new strategy against colon cancer. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:95–107.
284. Devulapally R, Foygel K, Sekar T V., Willmann JK, Paulmurugan R. Gemcitabine and Antisense-microRNA Co-encapsulated PLGA-PEG Polymer Nanoparticles for Hepatocellular Carcinoma Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8(49):33412–22.
285. Arias JL, Reddy LH, Couvreur P. Polymeric nanoparticulate system augmented the anticancer therapeutic efficacy of gemcitabine. *J Drug Target.* 2009;17(8):586–98.
286. Martín-Banderas L, Sáez-Fernández E, Holgado MÁ, Durán-Lobato MM, Prados JC, Melguizo C, et al. Biocompatible gemcitabine-based nanomedicine engineered by Flow Focusing® for efficient antitumor activity. *Int J Pharm.* 2013;443(1–2):103–9.
287. Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: Relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(17):2873–96.
288. Donahue ND, Acar H, Wilhelm S. Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. *Adv Drug Deliv Rev.* 2019;143:68–96.
289. Blanco MD, Bernardo M V., Sastre RL, Olmo R, Muñoz E, Teijón JM. Preparation of bupivacaine-loaded poly(ϵ -caprolactone) microspheres by spray drying: Drug

- release studies and biocompatibility. *Eur J Pharm Biopharm.* 2003;55(2):229–36.
290. 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 Surfaces B Biointerfaces.* 2010;75(1):204–8.
 291. Dash TK, Konkimalla VB. Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *J Control Release.* 2012;158(1):15–33.
 292. Mora-Huertas CE, Garrigues O, Fessi H, Elaissari A. Nanocapsules prepared via nanoprecipitation and emulsification-diffusion methods: Comparative study. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012;80(1):235–9.
 293. Ghoroghchian PP, Li G, Levine DH, Davis KP, Bates FS, Hammer DA, et al. Bioresorbable vesicles formed through spontaneous self-assembly of amphiphilic poly(ethylene oxide)-block-polycaprolactone. *Macromolecules.* 2006;39(5):1673–5.
 294. Glover AL, Bennett JB, Pritchett JS, Nikles SM, Nikles DE, Nikles JA, et al. Magnetic Heating of Iron Oxide Nanoparticles and Magnetic Micelles for Cancer Therapy. *IEEE Trans Magn.* 2013;49(1):231-235.
 295. Kircher MF, Hricak H, Larson SM. Molecular imaging for personalized cancer care. *Mol Oncol.* 2012;6(2):182–95.
 296. Kircher MF, Willmann JK. Molecular body imaging: MR imaging, CT, and US. Part I. Principles. *Radiology.* 2012;263(3):633–43.
 297. Connor JPBO. Seminars in Cell & Developmental Biology Cancer heterogeneity and imaging. *Semin Cell Dev Biol.* 2017;64:48–57.
 298. Kircher MF, Willmann JK. molecular Body imaging - part II. 2012;264(2):349–68.
 299. Kinch MS, Woodard PK. Analysis of FDA-approved imaging agents. *Drug Discov Today.* 2017;22(7):1077–83.
 300. Thakor AS, Jokerst J V., Ghanouni P, Campbell JL, Mittra E, Gambhir SS. Clinically Approved Nanoparticle Imaging Agents. *J Nucl Med.* 2016;57(12):1833–7.
 301. Chen H, Zhang W, Zhu G, Xie J, Chen X. Rethinking cancer nanotheranostics. *Nat Rev Mater.* 2017;2:17024.
 302. Martinez G V. Introduction to MRI physics. *Methods Mol Biol.* 2018;1718:3–19.
 303. Panych LP, Madore B. The physics of MRI safety. *J Magn Reson Imaging.* 2018;47(1):28–43.
 304. Park SM, Aalipour A, Vermesh O, Yu JH, Gambhir SS. Towards clinically translatable in vivo nanodiagnosics. *Nat Rev Mater.* 2017;2(5):17014.

305. Waterton, JC. Chapter 1. Medical Imaging: Overview and the Importance of Contrast. In: Baddock M. Biomedical Imaging: The Chemistry of Labels, Probes and Contrast Agents. Royal Society of Chemistry; 2012. 1-20 p.
306. Plewes DB, Kucharczyk W. Physics of MRI: A primer. *J Magn Reson Imaging*. 2012;35(5):1038–54.
307. Currie S, Hoggard N, Craven IJ, Hadjivassiliou M, Wilkinson ID. Understanding MRI: Basic MR physics for physicians. *Postgrad Med J*. 2013;89(1050):209–23.
308. Moser E, Laistler E, Schmitt F, Kontaxis G. Ultra-high field NMR and MRI—the role of magnet technology to increase sensitivity and specificity. *Front Phys*. 2017;5:33.
309. Na H Bin, Song IC, Hyeon T. Inorganic nanoparticles for MRI contrast agents. *Adv Mater*. 2009;21(21):2133–48.
310. Moreno CC, Sullivan PS, Mittal PK. MRI Evaluation of Rectal Cancer: Staging and Restaging. *Curr Probl Diagn Radiol*. 2017;46(3):234–41.
311. Calle D, Navarro T. Basic Pulse Sequences in Magnetic Resonance Imaging. In: García-Martín ML, López-Larrubia P. Preclinical MRI: Methods and Protocols. Springer Protocols; 2018. 21-37 p.
312. Burtea C, Laurent S, Vander Elst L, Muller R.N. Contrast Agents: Magnetic Resonance. In: Semmler W., Schwaiger M. Molecular Imaging I. Handbook of Experimental Pharmacology. Springer; 2008. 135-65 p.
313. Bennett KM, Jo JI, Cabral H, Bakalova R, Aoki I. MR imaging techniques for nanopathophysiology and theranostics. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;74:75–94.
314. Ros LH, Marcuello T, Galbe R. Capítulo 9: Contrastes enterales. In: Martí-Bonmatí L, Pallardo-Calatayud Y. Monografía SERAM; Medios de Contraste en Radiología. Editorial Médica Panamericana; 2008. 91–102 p.
315. Xiao YD, Paudel R, Liu J, Ma C, Zhang ZS, Zhou SK. MRI contrast agents: Classification and application (Review). *Int J Mol Med*. 2016;38(5):1319-1326.
316. Silvio A, Peter C. Biodistribution of gadolinium-based contrast agents, including gadolinium deposition. *J Magn Reson Imaging*. 2009;30(6):1259–1267.
318. Wahsner J, Gale EM, Rodríguez-Rodríguez A, Caravan P. Chemistry of MRI Contrast Agents: Current Challenges and New Frontiers. *Chem Rev*. 2019;119(2):957-1057.
320. Siedek F, Muehe AM, Theruvath AJ, Avedian R, Pribnow A, Spunt SL, et al. Comparison of ferumoxytol- and gadolinium chelate-enhanced MRI for assessment of sarcomas in children and adolescents. *Eur Radiol*. 2020;30(3):1790–803.

321. Aghighi M, Theruvath AJ, Pareek A, Pisani LL, Alford R, Muehe AM, Sethi TK, Holdsworth SJ, Hazard FK, Gratzinger D, Luna-Fineman S, Advani R, Spunt SL, Daldrup-Link HE. Magnetic Resonance Imaging of Tumor-Associated Macrophages: Clinical Translation. *Clin Cancer Res.* 2018;24(17):4110-4118.
322. European Medicine Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Reflection paper on the data requirements for intravenous iron-based nano-colloidal products developed with reference to an innovator medicinal product. Ema/Chmp/Swp/620008/2012. 2015. [Internet][Consultado en: 26/12/2021]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-data-requirements-intravenous-iron-based-nano-colloidal-products-developed_en.pdf
323. Levy M, Luciani N, Alloyeau D, Elgrabli D, Deveaux V, Pechoux C, et al. Long term in vivo biotransformation of iron oxide nanoparticles. *Biomaterials.* 2011;32(16):3988-99.
324. Tsuchiya K, Nitta N, Sonoda A, Nitta-Seko A, Ohta S, Otani H, et al. Histological study of the biodynamics of iron oxide nanoparticles with different diameters. *Int J Nanomedicine.* 2011;6:1587-94.
325. van Duijn S, Nabuurs RJA, van Duinen SG, Natté R. Comparison of Histological Techniques to Visualize Iron in Paraffin-embedded Brain Tissue of Patients with Alzheimer's Disease. *J Histochem Cytochem.* 2013;61(11):785-92.
326. Deyno S, Abebe A, Tola MA, Hymete A, Bazira J, Makonnen E, et al. Acute and sub-acute toxicity of Echinops kebericho decoction in rats. *BMC Complement Med Ther.* 2020;20(1):2.
327. Peiro-Chamarro M, Ruiz de Gopegui-Miguelena P, Sampedro-Martín I, Callau-Calvo A, Martínez-Lamazares MT, Fuertes-Schott C. Disociación histo-radiológica en fibrosis pulmonar secundaria a infección por SARS-CoV-2. *Medicina Intensiva.* Elsevier. 2020.
328. Berret JF, Schonbeck N, Gazeau F, El Kharrat D, Sandre O, Vacher A, et al. Controlled clustering of superparamagnetic nanoparticles using block copolymers: Design of new contrast agents for magnetic resonance imaging. *J Am Chem Soc.* 2006;128(5):1755-61.
329. Lee SY, Yang CY, Peng CL, Wei MF, Chen KC, Yao CJ, et al. A theranostic micelleplex co-delivering SN-38 and VEGF siRNA for colorectal cancer therapy. *Biomaterials.* 2016 Apr 1;86:92-105.
330. Hannecart A, Stanicki D, Vander Elst L, Muller RN, Brûlet A, Sandre O, et al. Embedding of superparamagnetic iron oxide nanoparticles into membranes of well-defined poly(ethylene oxide)-: Block -poly(ϵ -caprolactone) nanoscale magnetovesicles as ultrasensitive MRI probes of membrane bio-degradation. *J Mater Chem B.* 2019;7(30):4692-705.

331. Wei J, Shuai X, Wang R, He X, Li Y, Ding M, et al. Clickable and imageable multiblock polymer micelles with magnetically guided and PEG-switched targeting and release property for precise tumor theranosis. *Biomaterials*. 2017;145:138–53.
332. Kim DH, Vitol EA, Liu J, Balasubramanian S, Gosztola DJ, Cohen EE, et al. Stimuli-responsive magnetic nanomicelles as multifunctional heat and cargo delivery vehicles. *Langmuir*. 2013;29(24):7425–32.
333. Pernia Leal M, Rivera-Fernández S, Franco JM, Pozo D, De La Fuente JM, García-Martín ML. Long-circulating PEGylated manganese ferrite nanoparticles for MRI-based molecular imaging. *Nanoscale*. 2015;7(5):2050–9.
334. Briley-Saebo K, Bjørnerud A, Grant D, Ahlstrom H, Berg T, Kindberg GM. Hepatic cellular distribution and degradation of iron oxide nanoparticles following single intravenous injection in rats: Implications for magnetic resonance imaging. *Cell Tissue Res*. 2004;316(3):315–23.
335. Kania G, Sternak M, Jaształ A, Chlopicki S, Błażejczyk A, Nasulewicz-Goldeman A, et al. Uptake and bioreactivity of charged chitosan-coated superparamagnetic nanoparticles as promising contrast agents for magnetic resonance imaging. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2018;14(1):131–40.
336. Sonin D, Pochkaeva E, Zhuravskii S, Postnov V, Korolev D, Vasina L, et al. Biological safety and biodistribution of chitosan nanoparticles. *Nanomaterials*. 2020;10(4):810.

