



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

**DESARROLLO DE NANOESTRUCTURAS
MAGNETOPOLIMÉRICAS CON
POTENCIAL APLICACIÓN EN
TERANOSIS ANTITUMORAL**

Tesis Doctoral

Programa de Doctorado en Farmacia

Escuela de Doctorado de Ciencias de la Salud

Fátima Fernández Álvarez

Director de Tesis Doctoral: Dr. José Luis Arias Mediano

Granada, julio de 2022

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Fátima Fernández Álvarez
ISBN: 978-84-1117-415-2
URI: <http://hdl.handle.net/10481/75979>

ÍNDICE

Resumen	1
Capítulo 1. Antecedentes, <i>state of the art</i>, hipótesis y justificación	4
1.1. Antecedentes del cáncer y la nanotecnología.....	5
1.1.1. Cáncer.....	5
1.1.2. Aplicación de la nanotecnología en cáncer	9
1.2. <i>State of the Art</i> , hipótesis y justificación.....	13
Capítulo 2. Objetivos	23
2.1. Objetivo principal.....	24
2.2. Objetivos específicos.....	24
Capítulo 3. Formulación de nanosistemas	29
3.1. Introducción.....	30
3.1.1. Maghemita.....	30
3.1.2. Ácido oléico: Funcionalización de maghemita	34
3.1.3. Poli(D,L-lactida- <i>co</i> -glicolida)	35
3.1.4. Quitosano.....	39
3.2. Formulación de nanosistemas	41
3.2.1. Núcleos magnéticos de maghemita.....	41
3.2.2. Nanopartículas poliméricas de poli(D,L-lactida- <i>co</i> -glicolida)	43
3.2.3. Nanopartículas poliméricas de quitosano.....	43
3.2.4. Nanopartículas maghemita/poli(D,L-lactida- <i>co</i> -glicolida) (<i>core/shell</i>).....	44
3.2.5. Nanopartículas (maghemita/poli(D,L-lactida- <i>co</i> -glicolida))/quitosano ((<i>core/shell</i>)/ <i>shell</i>): Funcionalización con quitosano.....	44
Capítulo 4. Caracterización física, química y fisicoquímica	47
4.1. Optimización del método de formulación de nanosistemas: tamaño de partícula, carga eléctrica superficial y rendimiento.....	48

4.1.1. Metodología.....	54
4.1.1.1. Tamaño de partícula	54
4.1.1.2. Carga eléctrica superficial	54
4.1.1.3. Rendimiento	55
4.1.2. Resultados y discusión.....	55
4.2. Estudio de la evolución de las propiedades eléctricas superficiales	58
4.2.1. Metodología.....	58
4.2.2. Resultados y discusión.....	59
4.3. Técnicas microscópicas.....	62
4.3.1. Metodología.....	65
4.3.2. Resultados y discusión.....	65
4.4. Propiedades termodinámicas superficiales	69
4.4.1. Metodología.....	70
4.4.2. Resultados y discusión.....	71
4.5. Estructura y composición química.....	72
4.5.1. Difractometría de rayos X.....	72
4.5.1.1. Metodología	74
4.5.1.2. Resultados y discusión.....	75
4.5.2. Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier.....	77
4.5.2.1. Metodología	79
4.5.2.2. Resultados y discusión.....	79
4.6. Propiedades magnéticas.....	82
4.6.1. Metodología.....	83
4.6.2. Resultados y discusión.....	84
Capítulo 5. Estabilidad	89
5.1. Introducción.....	90
5.2. Evaluación de la estabilidad coloidal	90

5.2.1. Metodología.....	90
5.2.2. Resultados y discusión.....	91
Capítulo 6. Biocompatibilidad y toxicidad de los nanosistemas	95
6.1. Introducción	96
6.2. Hemocompatibilidad	97
6.2.1. Metodología.....	98
6.2.2. Resultados y discusión.....	101
6.3. Citotoxicidad <i>in vitro</i>	103
6.3.1. Viabilidad celular relativa (%)	103
6.3.1.1. Metodología	103
6.3.1.2. Resultados y discusión.....	104
6.3.2. Fluorescencia <i>in vitro</i>	106
6.3.1.1. Metodología	107
6.3.1.2. Resultados y discusión.....	108
6.4. Toxicidad <i>in vivo</i>	110
6.4.1. Metodología.....	111
6.4.2. Resultados y discusión.....	112
Capítulo 7. Hipertermia de fluido magnético antitumoral	115
7.1. Introducción.....	116
7.1.1. Fundamentos de la hipertermia magnética.....	116
7.1.2. Hipertermia como tratamiento antitumoral	117
7.1.3. Sistema experimental de hipertermia magnética	119
7.2. Capacidad para la hipertermia magnética antitumoral	121
7.2.1. Metodología.....	121
7.2.2. Resultados y discusión.....	121
7.3. Eficacia <i>in vitro</i> : citotoxicidad por hipertermia de fluido magnético antitumoral	123
7.3.1. Metodología.....	123

7.3.2. Resultados y discusión.....	124
Capítulo 8. Vehiculización del fármaco cisplatino.....	127
8.1. Introducción.....	128
8.1.1. Nanosistemas con potencial aplicación en terapéutica	128
8.1.2. Cisplatino.....	128
8.1.3. Estrategias de diseño de nanotransportadores de fármacos: Carga de fármacos.....	131
8.1.4. Liberación de fármacos sensible a estímulos	132
8.2. Incorporación del fármaco cisplatino en nanopartículas maghemita/poli(D,L-lactida-co-glicolida)	132
8.3. Confirmación de la incorporación del fármaco cisplatino en la matriz del poli(D,L-lactida-co-glicolida)	133
8.3.1. Metodología.....	133
8.3.2. Resultados y discusión.....	133
8.4. Cuantificación <i>in vitro</i> de la incorporación del fármaco cisplatino	135
8.4.1. Metodología.....	135
8.4.2. Resultados y discusión.....	136
8.5. Liberación <i>in vitro</i> del fármaco cisplatino desde nanopartículas (maghemita/poli(D,L-lactida-co-glicolida))/quitosano	137
8.5.1. Metodología.....	137
8.5.2. Resultados y discusión.....	139
8.6. Eficacia terapéutica <i>in vitro</i> de nanopartículas (maghemita/poli(D,L-lactida-co-glicolida))/quitosano cargadas con cisplatino	142
8.6.1. Metodología.....	142
8.6.2. Resultados y discusión.....	143
Capítulo 9. Agentes de contraste en resonancia magnética de imagen: Ensayos de farmacocinética y biodistribución <i>in vivo</i>	146
9.1. Introducción.....	147
9.1.1. Fundamentos de la resonancia magnética de imagen	147

9.1.2. Contraste tisular y agentes de contraste en resonancia magnética de imagen.....	152
9.1.3. Aplicaciones de la resonancia magnética de imagen: Ensayos de farmacocinética y biodistribución <i>in vivo</i> de nanosistemas	157
9.2. Relajatividades	159
9.2.1. Metodología.....	159
9.2.2. Resultados y discusión.....	160
9.3. Resonancia magnética de imagen <i>in vivo</i>	161
9.3.1. Metodología.....	161
9.3.2. Resultados y discusión.....	163
9.4. Evaluación histológica <i>ex vivo</i> de depósitos de hierro	168
9.4.1. Metodología.....	168
9.4.2. Resultados y discusión.....	168
Capítulo 10. Conclusiones	171
Bibliografía	176

RESUMEN

El trabajo de investigación que constituye esta Tesis Doctoral tiene como objetivo el diseño, optimización y desarrollo de un sistema en la escala nanométrica con potencial aplicación en Biomedicina, concretamente en el diagnóstico y tratamiento del cáncer. El tratamiento actual de tumores sólidos y su diagnóstico temprano están ligeramente limitados, y la Ciencia que aporta soluciones a estos problemas es la Nanotecnología. En este contexto, se ha diseñado, optimizado y desarrollado de manera reproducible una nanoestructura híbrida ((inorgánica/orgánica)/orgánica) compuesta por núcleos magnéticos (maghemita) embebidos en una matriz polimérica (poli(D,L-lactida-co-glicolida) recubierta por un polímero hidrófilo y mucoadhesivo (quitosano). Concretamente, las nanopartículas (maghemita/polí(D,L-lactida-co-glicolida))/quitosano (*core/shell*)/*shell* (y las respectivas nanoestructuras básicas de referencia) han sido sometidas a una extensa caracterización, que incluye tamaño, propiedades eléctricas y termodinámicas superficiales, composición química y estructura cristalina y elemental, y propiedades magnéticas. La optimización de los procedimientos de formulación de las nanopartículas garantizó unas adecuadas características físicas, químicas y fisicoquímicas, que repercutieron en su estabilidad coloidal, biocompatibilidad, toxicidad, y en sus capacidades como agentes de contraste T_2 en resonancia magnética de imagen y agentes terapéuticos (quimioterapia dirigida e hipertermia magnética antitumoral). Estudios experimentales realizados confirmaron la inclusión de los núcleos de maghemita en la matriz de poli(D,L-lactida-co-glicolida y el recubrimiento de estas nanoestructuras maghemita/polí(D,L-lactida-co-glicolida (*core/shell*)) por quitosano (tamaño medio ≈ 330 nm, rendimiento $\approx 50\%$). Se realizaron determinaciones de tamaño y propiedades electrocinéticas que probaron una adecuada estabilidad a corto plazo del coloide, mientras que su adecuado magnetismo se demostró *in vitro* obteniendo el ciclo de histéresis de las nanoestructuras y visualizando su comportamiento microscópico y macroscópico frente a un campo magnético de 0.4T. El análisis de seguridad y biocompatibilidad de las nanopartículas se basó en estudios *in vitro* de hemocompatibilidad, estudios de citotoxicidad en las líneas de fibroblastos HFF-1 y CCD-18, y de células de adenocarcinoma de colon T-84; y en estudios *ex vivo* de toxicidad en muestras de tejido de ratones Balb/c. Las nanopartículas (maghemita/polí(D,L-lactida-co-glicolida))/quitosano contaron con valores de relajatividades transversales comparables a las de algunos agentes de contraste basados en óxidos de hierro, pudiendo ser adecuados agentes de contraste T_2 en resonancia magnética de imagen. El procedimiento de incorporación del antitumoral cisplatino en la matriz de poli(D,L-lactida-co-glicolida de las nanopartículas generó adecuados valores de carga ($\approx 15\%$), y se comprobó que las

nanopartículas presentaban unos perfiles de liberación de fármaco que respondían a cambios en el pH y a la temperatura (hipertermia): ≈ 4.7 veces más rápido a pH 5.0 y 45 °C en comparación con pH 7.4 y 37 °C. La concentración inhibitoria media (IC_{50}) de las nanopartículas cargadas con cisplatino fue ≈ 1.6 veces menor que la característica de este antitumoral en células tumorales A-549 de adenocarcinoma de pulmón. Por otro lado, se evaluó la capacidad para generar calor de las nanopartículas (maghemita/poli(D,L-lactida-co-glicolida))/quitosano cuando estas eran expuestas a un gradiente electromagnético alterno. Se comprobó como una dispersión acuosa de estas partículas alcanzaba una temperatura máxima constante de $\approx 46^{\circ}C$ en menos de 50 min. Ante estos resultados, se realizaron tests de hipertermia antitumoral en la línea celular T-84 de adenocarcinoma de colon humano, observándose una importante reducción en la viabilidad celular (hasta $\approx 39\%$) si se trataban con este coloide de partículas (*core/shell*)/*shell* y se empleaba este campo electromagnético. Finalmente, los resultados obtenidos en ensayos de resonancia magnética de imagen *in vivo* y en estudios histológicos *ex vivo* de determinaciones de depósitos de hierro permiten postular la eficacia del recubrimiento final de las nanopartículas con quitosano en la obtención de nanoestructuras con propiedades de circulación extendida (*long circulating nanoparticles*), que retardan el reconocimiento por el sistema fagocítico mononuclear. A la vista de los resultados obtenidos en este proyecto de investigación puede concluirse que se ha desarrollado una nanoplataforma (maghemita/poli(D,L-lactida-co-glicolida))/quitosano biocompatible y con propiedades de circulación extendida. Estas nanopartículas (*core/shell*)/*shell* presentan prometedoras aplicaciones teranósticas frente al cáncer. En concreto, la nanoestructura magnetopolimérica ha probado una más que adecuada capacidad para el transporte sensible a estímulos de fármacos antitumorales (magnetismo, pH y temperatura), la hipertermia magnética antitumoral, y para su uso en imagen biomédica (agentes de contraste T_2 en resonancia magnética de imagen).

CAPÍTULO 1

Antecedentes, state of the art,
hipótesis y justificación

1.1. Antecedentes del cáncer y la nanotecnología

Desde su introducción, la nanotecnología ha ido escalando puestos dentro de las diferentes áreas del conocimiento. En el área biomédica, la tecnología de los nanomateriales ha tenido durante décadas un enorme impacto que continúa en la actualidad. Concretamente, el diseño y desarrollo de nanosistemas particulados permite la introducción de nuevos tratamientos o estrategias de prevención, y técnicas de diagnóstico, o potenciación de los convencionales.

1.1.1. Cáncer

El cáncer engloba una serie de patologías en las que están implicadas células de distintos tejidos y órganos del organismo con habilidad para dividirse y multiplicarse de manera descontrolada [Miller M.E., 2018]. Según la American Cancer Society (ACS) el cáncer se inicia en el momento en el que algunas de las células de nuestro organismo comienzan a crecer y dividirse sin ningún tipo de control. En algún tipo de cáncer las células acaban formando masas de células malignas o masas tumorales malignas (tumores sólidos) provocando el desplazamiento de las células sanas e impidiendo el normal funcionamiento de los tejidos y órganos del organismo. Las células pueden diseminarse hacia otros tejidos u órganos vecinos dando lugar a metástasis, es decir una fase del cáncer más peligrosa [Miller M.E., 2018; American Cancer Society. ACS: Learn About Cancer. [Online].;2022]. El mecanismo por el cual se inician estos procesos no se conoce más que parcialmente, aunque sí se ha consensuado que tiene un origen genético [Bunz F. y Vogelstein B., 2018]. Alteraciones genéticas como translocaciones, deleciones, inserciones o duplicaciones cromosómicas o mutaciones puntuales en los genes encargados de controlar el crecimiento, la división y la diferenciación celular podrían ser las responsables del origen del cáncer [Hall J.E., 2011]. Estas alteraciones pueden ser consecuencia de una serie de errores aleatorios en la replicación, en la reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN) o exposición a agentes mutagénicos como radiaciones ionizantes, irritantes físicos o sustancias químicas, incluso por infecciones víricas [Bunz F. y Vogelstein B., 2018]. Finalmente, todo ello contribuye al desequilibrio del balance entre factores positivos de la regulación del ciclo celular y factores negativos del ciclo celular derivando en la pérdida total del control de la división celular y, por ende, las funciones celulares [peligrosa [Miller M.E., 2018]. Además, en el cáncer se promueve la invasión hística o metástasis y la angiogénesis, es decir la creación de nuevos vasos [Clark J.W. y Longo D.L., 2018] (Figura 1).

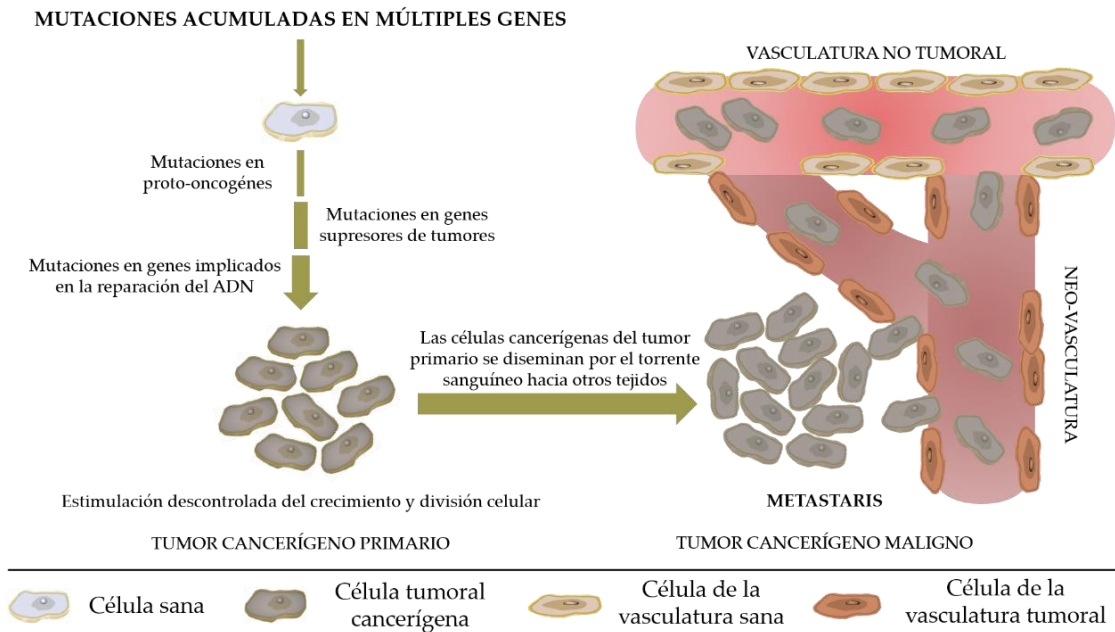


Figura 1. Desarrollo de un tumor cancerígeno, seguido del proceso de metástasis y angiogénesis (neovascularización). Reproducido de Miller M.E., 2018 y Clark J.W. y Longo D.L., 2018.

La transformación de una célula sana a una cancerígena únicamente se desencadena cuando las mutaciones se dan en determinados genes celulares: los proto-oncogénes y los genes supresores de tumores o anti-oncogénes [Hall J.E., 2011; Bunz F. y Vogelstein B., 2018; Miller M.E., 2018]. Los proto-oncogenes son capaces de, bajo ciertas circunstancias, mutar y convertirse en oncogenes capaces de estimular el crecimiento y división celular (reguladores positivos del ciclo celular), mientras que los genes supresores de tumores son los genes encargados de interrumpir o retrasar el proceso de división celular (reguladores negativos del ciclo celular) por medio de la supresión de la activación de los oncogenes. El desequilibrio entre estos factores desencadena una desregulación en el ciclo celular y finalmente, la generación de una masa tumoral que interacciona con el medio adyacente [Bunz F. y Vogelstein B., 2018; Miller M.E., 2018]. Para que una masa tumoral evolucione de benigna a cancerosa se requieren múltiples alteraciones acumulativas en estos genes clave, junto con mutaciones en genes asociados con la reparación del ADN [Bunz F. y Vogelstein B., 2018]. A medida que se acumulan, la masa tumoral se vuelve cada vez más agresiva, hasta el punto de diseminarse por circulación sanguínea o sistema linfático hacia otros tejidos u órganos formando nuevas masas tumorales en otras regiones del organismo. Las células de estas nuevas masas tumorales no reaccionan a las señales de inhibición de crecimiento tumoral y, por tanto, evaden la muerte por apoptosis [Miller M.E., 2018].

Las células tumorales cancerosas se rodean de un microambiente característico por su complejidad. El microambiente tumoral está constituido por otro tipo de células como las

estromales (fibroblastos y células inflamatorias), una matriz extracelular, un bajo drenaje linfático intratumoral y una vasculatura tumoral propia [Shetab Boushehri M.A. y cols., 2020; Aznavoorian S. y cols., 1990; Ohtani H., 1998; Talekar M. y cols., 2015]. Como se indica previamente, en algunos tipos de cáncer se producen unos factores especiales, denominados factores angiogénicos, que van a promover el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) en el microambiente tumoral a partir de los vasos ya existentes. Uno de los grupos más potentes de factores angiogénicos son los factores de crecimiento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factors*, VEGF). Los VEGF favorecen la proliferación y posterior migración de células endoteliales sanas hacia el microambiente tumoral. Esta nueva vasculatura (neovasculatura) aportará a la masa tumoral muchos más nutrientes, oxígeno y factores importantes para el crecimiento celular, favoreciendo aún más su supervivencia [Talekar M. y cols., 2015; Clark J.W. y Longo D.L., 2018]. La activación de la angiogénesis se desencadena cuando el equilibrio entre factores a favor de la angiogénesis y factores en contra de la angiogénesis se inclina por los primeros. Factores desencadenantes de la angiogénesis son la inflamación, la hipoxemia y alteraciones en los oncogenes o en los genes supresores de tumores [Talekar M. y cols., 2015].

La vasculatura del microambiente tumoral se diferencia de la sana en su arquitectura y flujo sanguíneo. Concretamente, el flujo sanguíneo tumoral es variable y los vasos sanguíneos tumorales se caracterizan por ser estructuras “defectuosas” con diámetros irregulares, muy ramificados, con fistulas u orificios y una membrana basal discontinua o inexistente. Estos defectos en la vasculatura del microambiente tumoral se deben a su rápido crecimiento [Hollis C.P. y cols., 2013]. Estas características suponen una alta permeabilidad de los vasos sanguíneos [Shetab Boushehri M.A. y cols., 2020; Clark J.W. y Longo D.L., 2018].

Las consecuencias del bajo drenaje linfático, vasculatura poco desarrollada y defectuosa, y un flujo sanguíneo variable se engloban dentro del denominado efecto de permeabilidad y retención aumentada (*enhanced permeability and retention*, EPR). El EPR generalmente se asocia con sustancias lipídicas y macromoléculas en tumores sólidos, y como se verá a continuación tiene un alto valor en el desarrollo de estrategias terapéuticas y diagnósticas [Maeda H. y cols., 2000].

La importancia de un diagnóstico precoz y un tratamiento seguro y eficaz está marcada por las cifras: el cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Según datos recogidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS ó *World Health Organization*, WHO), en 2018 el cáncer repitió puesto, siendo de nuevo la segunda causa de muerte a nivel mundial con una cifra aproximada de 9,6 millones de muertes (1/6 muertes es por cáncer). La OMS cifra en 5

los tipos de cáncer más comunes en los hombres: pulmón, próstata, colorrectal, estómago e hígado; y en otros 5 en mujeres: mama, el cáncer colorrectal, de pulmón, de cuello uterino y de tiroides. El cáncer de pulmón y colorrectal son los más habituales en ambos sexos [World Health Organization: WHO [Online]; 2022]. Esta misma tendencia se ve a nivel nacional, según el Instituto Nacional de Estadística las muertes por tumores fueron el segundo porcentaje más alto de muertes en 2019 y 2020 en España. Curiosamente, si se analizan las cifras por sexo, el cáncer en España es la primera causa de muerte en hombres [Instituto Nacional de Estadística. INE [Online]; 2021]. Estos datos ayudan a comprender el grado de importancia que tiene el cáncer en la sociedad actual y el porqué de la continua investigación en esta rama de la biomedicina.

El tratamiento del cáncer en los hospitales es de carácter multidisciplinar. Se trata de combinar una serie de terapias con el objetivo de aumentar la eficacia del tratamiento del cáncer. Algunas de las más empleadas son la quimioterapia, radioterapia y cirugía, además de la hormonoterapia, terapias con fármacos biológicos y terapias dirigidas [Asociación Española Contra el Cáncer. AECC. [Online].; 2021; WHO [Online]; 2022]. La cirugía es, de entre las tres terapias más habitualmente aplicadas, la más antigua y una técnica bastante eficaz en tumores muy localizados. Se realiza con tres objetivos: aliviar la sintomatología asociada a la presencia de la masa tumoral en el organismo (ejemplo: dolor), extirpar la masa tumoral por completo y en caso de no poder hacerlo en su totalidad, la cirugía puede emplearse como tratamiento coadyuvante reduciendo, previo al tratamiento complementario, el tamaño del tumor [National Institutes of Health. NIH [Online].; 2015a]. La radioterapia y quimioterapia también alivian la sintomatología del cáncer reduciendo el tamaño de la masa tumoral, pero además ralentizan el desarrollo de este. Como su nombre indica, la radioterapia implica la aplicación de altas dosis de radiación sobre regiones concretas del organismo con el fin de destruir células tumorales, mientras que la quimioterapia consiste en la administración de altas dosis de agentes terapéuticos capaces de inhibir la división celular en células de rápido crecimiento. Estas terapias están limitadas entre otras cosas por su baja especificidad provocando el deterioro de células sanas y efectos secundarios al tratamiento. En el caso concreto de la quimioterapia, las células de la médula ósea, del tracto gastrointestinal y del folículo piloso también pueden verse afectadas debido a que también presentan elevadas tasas de crecimiento celular [NIH [Online].; 2015b; Pérez-Herrero E. y Fernández-Medarde A., 2015].

La administración de fármacos quimioterápicos es a día de hoy, junto con el empleo de hormonas y terapias biológicas, la opción habitual para el tratamiento de cánceres metastásicos [Pérez-Herrero E. y Fernández-Medarde A., 2015], a pesar de la variedad de limitaciones que

presenta y que se indicarán más adelante en esta memoria (capítulo 8 “Vehiculización del fármaco cisplatino”). Por ello la quimioterapia supone un reto en el tratamiento convencional del cáncer.

Las técnicas actuales para el diagnóstico del cáncer son técnicas basadas en la generación de imágenes de áreas internas del organismo. Las imágenes se pueden obtener mediante la tomografía computarizada (TC), tomografía nuclear, tomografía por emisión de positrones (TEP), ecografía, rayos X, ultrasonidos, gammagrafía ósea y la resonancia magnética (RM) [Zhang Y. y cols., 2019]. Al igual que el tratamiento convencional, estas técnicas se ven también limitadas debido a la poca sensibilidad a la hora de detectar células cancerosas y, por ende, baja eficiencia para un diagnóstico precoz [Chinen A.B. y cols., 2015]. La introducción de emisores de señales o agentes de contraste como luminóforos, radionúclidos o agentes de contraste RM podrían suponer una mejora de la sensibilidad de las técnicas, pero al igual que los agentes terapéuticos también estén expuestos a las mismas limitaciones.

1.1.2. *Aplicación de la nanotecnología en cáncer*

El abordaje farmacoterapéutico, y en menor medida el diagnóstico, del cáncer se encuentran notablemente limitados por la capacidad de los fármacos antitumorales y/o agentes de diagnóstico de interactuar con la diana terapéutica o región a evaluar mediante el diagnóstico por imagen. Concretamente, se ha demostrado que a raíz de esto estos agentes se acumulan escasamente en el lugar de interés, además se ha visto que cada vez en más común la aparición de resistencias asociadas a estos agentes por las células [Wei G. y cols., 2021]. En el caso del tratamiento del cáncer, esto ha llegado a influir en la eficacia de las tan utilizadas quimioterapias combinadas, suponiendo un también un limitado tratamiento contra el cáncer. Las limitaciones de la terapia con fármacos quimioterápicos y beneficios de la terapia basada en aproximaciones nanotecnológicas están descritas con mayor detalle en el capítulo 8 de esta memoria (capítulo 8 “Vehiculización del fármaco cisplatino”). Como se indicaba anteriormente, en el caso de las técnicas de diagnóstico convencionales que emplean luminóforos, radionúclidos o agentes de contraste para RM, la baja sensibilidad a la hora de distinguir células cancerosas, la limitada eficacia para dar un diagnóstico precoz y un limitado seguimiento del cáncer también suponen un desafío. En el capítulo 9 “Agentes de contraste en resonancia magnética de imagen: Ensayos de farmacocinética y biodistribución *in vivo*” se exponen algunas de las limitaciones de los agentes de contraste convencionales y beneficios de las aproximaciones nanotecnológicas aplicadas al diagnóstico.

El empleo de aproximaciones nanotecnológicas busca superar las limitaciones asociadas al tratamiento y diagnóstico del cáncer [Zhang Y. y cols., 2019; Stephen B.J. y cols., 2020; Wei G. y cols., 2021]. Concretamente, uno de los objetivos del diseño de nanosistemas con fines biomédicos es optimizar la cantidad de agente terapéutico o de diagnóstico que alcanza y se acumula en la región diana. De esta forma se potencia la eficacia del tratamiento y se minimizan las reacciones adversas asociadas a una distribución indiscriminada por todo el organismo. El desarrollo de nanoestructuras con potencial aplicación en cáncer no solo se plantea para afrontar las limitaciones del tratamiento y diagnóstico convencionales, sino que también aportan otros beneficios o aplicaciones alternativas como la hipertermia de fluido magnético (HTFM) (ver capítulo 7 “Hipertermia de fluido magnético antitumoral”), terapia fototérmica o terapia fotodinámica [Hou X. y cols., 2018; Liu Y. y cols., 2018].

Los nanosistemas biomédicos con potencial aplicación en cáncer se pueden diseñar en base a dos estrategias de transporte distintas orientadas a la optimización de su llegada a la región diana: estrategia de transporte pasivo (*passive targeting*) y estrategia de transporte activo (*active targeting*) [El-Hammadi M.M. y Arias J.L., 2019; Brusini R. y cols., 2020] (Figura 2). Las estrategias de transporte pasivo se aprovechan del EPR aumentado y las características físico-químicas intrínsecas de las nanoestructuras. Estas son diseñadas con el fin de conseguir nanosistemas que logren permanecer un tiempo prolongado en la circulación sanguínea (propiedades *stealth*) y así propiciarles la posibilidad de llegar y acumularse en el lugar de acción aprovechando el EPR [Sebak A.A. y cols. 2021]. Las técnicas empleadas se resumen en recubrir superficialmente la nanoestructura básica con un polímero hidrófilo, como el ampliamente utilizado poli(etilenglicol) (PEG), para proteger al nanosistema del proceso de opsonización y posterior eliminación de la circulación sanguínea (ver capítulo 9 “Agentes de contraste en resonancia magnética de imagen: Ensayos de farmacocinética y biodistribución *in vivo*” para más información) [Gajbhiye K.R. y cols., 2020]. El EPR en tumores sólidos es una propiedad característica y específica de esta enfermedad, por ello, se ha convertido en una herramienta fundamental en el diseño de nanosistemas transportadores de agentes activos dirigidos hacia una masa tumoral [Maeda H. y cols., 2000]. Estos van a ver favorecida su acumulación en el microambiente tumoral gracias al EPR [Shetab Boushehri M.A. y cols., 2020], y esta a su vez, va a incrementar la concentración de agente activo en el microambiente tumoral [Wei G. y cols., 2021]. Concretamente, el EPR favorece la permeabilidad intratumoral de partículas con tamaños determinados, generalmente < 400 nm [Bazak R. y cols., 2014], y la retención de las partículas en la región tumoral debida, en parte, al pobre drenaje linfático [Shetab Boushehri M.A. y cols., 2020]. Destacar que, una administración repetida de nanoestructuras recubiertas superficialmente con PEG, concretamente liposomas

pegilados, se ha visto que puede resultar en un efecto rebote, es decir, en un aclaramiento plasmático acelerado debido a la producción de anticuerpos anti-PEG (inmunoglobulinas M anti-PEG) tras las primeras dosis [Ishida T. y Kiwada H., 2008; Nicolas J. y cols., 2013]. Esto hace patente la necesidad del refuerzo con las segundas estrategias de transporte de nanosistemas terapéuticos y/o diagnóstico. Las estrategias de transporte o direccionamiento activo se pueden clasificar en dos sub-estrategias: (a) direccionamiento mediado por ligandos: consiste en funcionalizar la superficie de las nanoestructuras al incorporar moléculas, o restos de ellas, capaces de interactuar con ligandos expresados únicamente por las células cancerosas diana [El-Hammadi M.M. y cols., 2017; Cho K.S. y cols., 2018]; y (b) direccionamiento mediado por estímulos: consiste en la inclusión de materiales sensibles a estímulos dentro del diseño del nanosistema, convirtiéndolo en un sistema con capacidad de respuesta a estímulos tanto internos (pH, fuerza iónica, temperatura) como externos (radiaciones, campos electromagnéticos). La respuesta a estímulos de un nanosistema supone alteraciones en su estructura y características fisicoquímicas. Si el nanosistema en cuestión transporta algún agente activo, este se liberará de manera controlada en respuesta al cambio en las condiciones del medio ambiente (estímulos) [Baker A. y cols., 2020; Majumder J. y Minko T., 2020], y lo hará únicamente en la región diana, en el caso concreto del cáncer, en la célula cancerosa [Kamaly N. y cols., 2016]. La combinación de ambas estrategias da lugar a la construcción de nanosistemas capaces de aunar una gran variedad de funcionalidades de transporte *in vivo* que repercuten en un diagnóstico más sensible y un tratamiento más eficaz [Arias J.L., 2013; Jain V. y cols., 2020; Li H. y cols., 2020].

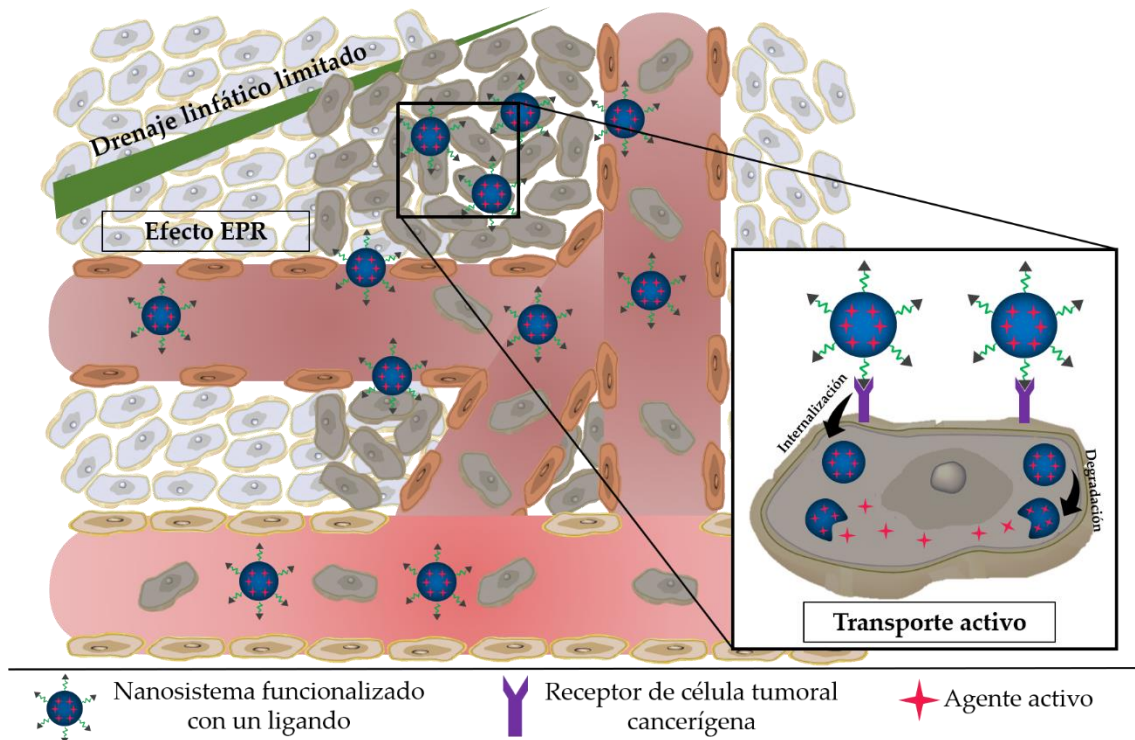


Figura 2. Representación de transporte pasivo y activo de nanosistemas. Las estrategias de transporte pasivo se basan en aprovechar el efecto EPR, mientras que las estrategias de transporte activo emplean ligandos que se unen a receptores específicos en las células tumorales favoreciendo la internalización del nanosistema en la célula y su posterior degradación y liberación del fármaco. Reproducido de Pérez-Herrero E. y Fernández-Medarde A., 2015.

La variedad de nanosistemas con potencial aplicación en biomedicina es inmensa: micelas, liposomas, quantum dots, nanopartículas (NPs) orgánicas como las poliméricas o lipídicas, e inorgánicas como las basadas en materiales magnéticos (óxidos de hierro), metales semiconductores, oro o plata, hidrogeles, dendrímeros o nanotubos de carbono [Conde J. y cols., 2014; Pérez-Herrero E. y Fernández-Medarde A., 2015; Nicolas J. y cols., 2013; Wei G. y cols., 2021], y el interés de todas ellas reside en sus propiedades físicas, químicas y fisicoquímicas únicas [Wei G. y cols., 2021], las cuales pueden ser modificadas en función de la aplicación que se le quiera otorgar al nanosistema. De forma general, todos los nanosistemas deben cumplir una serie de características básicas que hacen de ellos unos sistemas nanométricos ideales en biomedicina: ser biocompatibles y biodegradables, tener un tamaño nanométrico y propiedades superficiales adecuadas según la aplicación, elevada capacidad de incorporación de agentes activos, protección ante la degradación de los agentes activos y frente efectos nocivos de estos en el organismo, tiempos de circulación en sangre prolongados que permitan la posibilidad de

alcanzar los lugares de acción dentro del organismo y acumularse, y un metabolismo y eliminación correctos [Bertrand N. y cols., 2014].

Las NPs magnéticas de óxido de hierro (magnetita; Fe_3O_4 y maghemita; $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ [Reddy L.H. y cols., 2012]) constituyen una aproximación nanotecnológica muy prometedora puesto que pueden contribuir notablemente en la mejora del diagnóstico y tratamiento del cáncer, e incluso se ha llegado a postular la posibilidad de aunar ambas funciones en una sola, la teranosis [Arias J.L., 2011a; Arias J.L. y cols., 2011b; Reddy L.H. y cols., 2012; Dadfar S.M. y cols., 2019]. Se pueden definir como nanoplataformas avanzadas capaces de combinar su respuesta a diversos estímulos (campos magnéticos y electromagnéticos) dando lugar al direccionamiento magnético de agentes activos hacia el tumor y su liberación controlada y desencadenada por respuesta a estímulos [Durán J.D.G. y cols., 2008; Reddy L.H. y cols., 2012; El-Hammadi M.M. y Arias J.L., 2015; Lorente C. y cols., 2018; Curcio A. y cols., 2019; Benyettou F. 2020; Mansur, A.A.P. y cols., 2020; Dhas N. y col., 2021], con su poder como agentes en hipertermia magnética antitumoral [Kalber T.L. y cols., 2016; Das P. y cols., 2019; Mosiniewicz-Szablewska, E. y cols., 2020; Moskvin, M. y cols., 2021] y como agentes de contraste en resonancia magnética de imagen (RMI) [Bakhtary Z. y cols., 2016; de Gouw D.J.J.M. y cols., 2020; Sneha K.R. y cols., 2021; Xie Q. y cols., 2021], permitiendo no solo visualizar tejidos y masas tumorales, sino que también confirmar el perfil farmacocinético y de biodistribución, además de visualizar su acumulación en el lugar de acción [Xie Y. y cols., 2010]. Generalmente, el diseño de nanosistemas magnéticos comprende la inclusión de estas NPs de óxido de hierro en nanoestructuras orgánicas con una construcción de tipo núcleo/recubrimiento (*core/shell*). Como bien indica esta denominación, esta construcción implica un núcleo magnético y un recubrimiento matricial que habitualmente es de tipo polimérico [Arias J.L. y cols., 2012; García-García G. y cols., 2020] o lipídico [Muñoz de Escalona M. y cols., 2016; Lorente C. y cols., 2018]. Este recubrimiento no alterará su biocompatibilidad ni su inexistente toxicidad *per se* y sin embargo sí aportará estabilidad coloidal, seguridad, una semivida plasmática aumentada, una buena biodisponibilidad, carga de agentes activos y liberación controlada de estos [Aguilar Z.P., 2013].

1.2. *State of the Art*, hipótesis y justificación

Los primeros fármacos antitumorales fueron aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA) entre los años 40 y 50. A partir de aquí han ido sucediendo importantes descubrimientos y aplicaciones antitumorales como las quimioterapias combinadas, las terapias adyuvantes y la continuada

aprobación de fármacos quimioterápicos cada vez más potentes como el cisplatino (CDDP) y el paclitaxel (PTX) [Dasari S. y Tchounwou P.B. y cols., 2014; Pérez-Herrero E. y Fernández-Medarde A., 2015].

En la actualidad son varios los medicamentos basados en aproximaciones nanotecnológicas aprobados para su uso en clínica en el tratamiento del cáncer. En la Tabla 1 se indican los nanomedicamentos aprobados hoy en día por la FDA y la Agencia Europea de Medicamentos (*European Medicines Agency*, EMA). Además, una larga lista de nanomedicamentos con potencial en el tratamiento del cáncer están siendo evaluados en distintos ensayos clínicos y estando en distintas fases del proceso (Tabla 2). Para la elaboración de las tablas, además de referencias bibliográficas, se consultaron los buscadores de las páginas webs de la FDA, EMA y la página de ensayos clínicos a nivel mundial de la NIH de Estados Unidos: Clinical Trials.

Tabla 1. Nanosistemas aprobados por la FDA y/o EMA para el tratamiento del cáncer [Ullidemolins A. y cols., 2021; Wei G. y cols., 2021; Shetab Boushehri M.A. y cols., 2020; He H. y cols., 2019]

Nombre comercial	Nanosistema	Agente activo	Indicación	Función de la nanoestructura	Estado
Abraxane®	Albumina sérica humana	Paclitaxel (PTX)	Cáncer de mama metastático. Cáncer de pulmón (células no pequeñas; NSCLC).	<i>Targeting</i> pasivo	FDA 2005 EMA 2008
Apealea®	Micelas: Éster metílico del ácido N-retinoil-L-cisteico.	PTX	Cáncer de ovario.	Mejora de la solubilidad del fármaco.	EMA 2018
DaunoXome®	Liposomas	Daunorrubicina	Sarcoma de Kaposi.	Disminución de los efectos secundarios asociados al tratamiento convencional y mejora de la estabilidad <i>in vivo</i> .	FDA 1996
Doxil®/Caelyx®	Liposomas pegilados (HSPC, colesterol, MPEG-DSPE)	Doxorrubicina (DOX)	Cáncer de mama, ovario, mieloma múltiple, Sarcoma de Kaposi.	<i>Targeting</i> pasivo y liberación acelerada por niveles de amoníaco en región tumoral.	FDA 1995 EMA 1996
Eligard®	NPs poliméricas	Leuprorelina, acetato (hormona)	Cáncer de próstata avanzado.	Liberación sostenida.	FDA 2002
Hensify®	NPs metálicas	Óxido de hafnio	Sarcoma	Mejora de la eficacia de la radioterapia.	EMA 2019
Kadcyla®	Anticuerpo monoclonal	Trastuzumab emtansina	Cáncer metastático de mama. Cáncer de ovario.	<i>Targeting</i> pasivo y activo (anticuerpo anti-receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano) y capacidad de respuesta redox.	FDA 2013 EMA 2018

Tabla 1 (continuación). Nanosistemas aprobados por la FDA y/o EMA para el tratamiento del cáncer [Ulldemolins A. y cols., 2021; Wei G. y cols., 2021; Shetab Boushehri M.A. y cols., 2020; He H. y cols., 2019]

Nombre comercial	Nanosistema	Agente activo	Indicación	Función de la nanoestructura	Estado
Marqibo®	Liposomas: esfingomielina, colesterol	Vincristina, sulfato	Leucemia linfocítica aguda.	Targeting pasivo	FDA 2012
Mepact®	Liposomas: POPC, OOPS	Mifamurtida	Osteosarcoma.	Targeting al SFM	EMA 2009
Myocet®	Liposomas: fosfatidilcolina, colesterol	DOX	Cáncer metastático de mama.	Targeting al SFM y liberación lenta de fármaco.	EMA 2000
NanoTherm®	NPs metálicas (óxido de hierro superparamagnético) recubiertas de aminosilano	Óxidos de hierro superparamagnético	Glioblastoma, cáncer de próstata y de páncreas.	Ablación tumoral local bajo exposición a un campo magnético alterno (CMA).	EMA 2013
Oncaspar®	Conjugado pegilado de L-asparaginasa	L-asparaginasa	Leucemia linfoblástica aguda.	Mejora de la estabilidad de la proteína y aumento del tiempo de semivida plasmática.	FDA 1994 EMA 2016
Onivyde®	Liposomas: DSPC, colesterol, mPEG-DSPE	Irotescan	Cáncer de páncreas.	Targeting pasivo	FDA 2015 EMA 2016
Ontak®	Conjugado de proteína (denileukina)	Proteína de fusión recombinante del fragmento A de la toxina diftérica (difitox).	Linfoma cutáneo primario de células T.	Targeting intracelular y estrategia frente a captación lisosomal.	FDA 1999

Tabla 1 (continuación). Nanosistemas aprobados por la FDA y/o EMA para el tratamiento del cáncer [Ulldemolins A. y cols., 2021; Wei G. y cols., 2021; Shetab Boushehri M.A. y cols., 2020; He H. y cols., 2019]

Nombre comercial	Nanosistema	Agente activo	Indicación	Función de la nanoestructura	Estado
Opaxio®	NPs poliméricas	PTX	Glioma.	<i>Targeting</i> pasivo	FDA 2012
Somavert®	PEG	Pegvisomant	Leucemia aguda. linfocítica	Mejora de la estabilidad de la proteína y aumento del tiempo de semivida plasmática.	FDA 1994
Sylatron®	Conjugado proteico pegilado (PEG)	Interferon α -2b (IFN)	Melanoma.	Reducción del aclaramiento plasmático y aumento de tiempo de semivida plasmática. Reducción de la dosis administrada y frecuencia de administración en comparación con IFN libre.	FDA 2011
Vyxeos®	Liposomas: DSPC, DSPG, colesterol	Daunorrubicina y citarabina	Leucemia mieloide aguda.	<i>Targeting</i> pasivo	FDA 2017 EMA 2018
Zilretta®	Micropartículas poliméricas (nanoporos)	Triamcinolona, acetónido	Linfoma cutáneo primario de células T.	Liberación sostenida.	FDA 2017

Tabla 2. Nanosistemas para el tratamiento del cáncer que están actualmente en ensayos clínicos fase I/II, II, II/III, III [Wei G. y cols., 2021; Shetab Boushehri M.A. y cols., 2020].

Identificador	Nanosistema	Agente activo	Indicación	Función de la nanoestructura	Estado
Lipusu	Liposomas: lecitina/colesterol	PTX	Varias: cáncer de ovario, mama, NSCLC, gástrico, de cabeza y cuello.	Disminuir toxicidad asociada con tratamiento convencional de PTX.	Fase IV
ThermoDox	Liposomas termosensibles	DOX	Carcinoma hepatocelular inoperable.	Proporcionar un tratamiento combinado con ablación por radiofrecuencia.	Fase III
NC-6004	Micelas: PEG-b- poli(ácido L- glutámico)	CDDP	Cáncer de páncreas	<i>Targeting</i> al tumor.	Fase I/II
Lipoplatin	Liposomas: SPC/colesterol/DPPG/mPEGDSPE	CDDP	NSCLC no escamoso	Disminuir la toxicidad sistémica del CDDP.	Fase II/III
CRLX101	β -Ciclodextrina-PEG	CDDP	Varias: cáncer de pulmón, próstata, ovario, adenocarcinoma de estómago, etc.	Propiedades <i>stealth</i> aportadas por el PEG y liberación prolongada del fármaco.	Fase II
NKTR-102	PEG	Irotectan	Varias: cáncer de pulmón, cerebro, mama, glioblastoma, colorrectal, ovario, etc.	<i>Targeting</i> pasivo y aumento del tiempo de semivida plasmática.	Fase II o III según aplicación.

Tabla 2 (continuación). Nanosistemas para el tratamiento del cáncer que están actualmente en ensayos clínicos fase I/II, II, II/III, III [Wei G. y cols., 2021; Shetab Boushehri M.A. y cols., 2020].

Identificador	Nanosistema	Agente activo	Indicación	Función de la nanoestructura	Estado
DOTAP	N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propil]- N,N,N-trimethylamonio, cloruro (DOTAP): Colesterol	TUSC2	Cáncer de pulmón.	Mejora de la estabilidad <i>in vivo</i> reduciendo la interacción con proteínas.	Fase II
ABI-007	NPs estabilizadas con albumina	PTX	(a) Cáncer metastático de mama. (b) NSCLC	<i>Targeting</i> a tumores y mejora de la solubilidad de fármacos.	Fase II (a) Fase I y II (b)
BIND-014	NPs de PLA recubiertas de PEG	Docetaxel	Varias: cáncer de mama, pulmón, próstata, cervix, etc.	<i>Targeting</i> pasivo y activo, y mejora de la solubilidad del fármaco.	Fase I o II según aplicación.
CRLX101	Copolímeros de ciclodextrina- PEG	Camptotecina	Tumores sólidos como los distintos tipos de cáncer de pulmón	<i>Targeting</i> a tumores y mejora de la solubilidad de fármacos.	Fase II o I/II según aplicación.
Nab-paclitaxel	NPs estabilizadas con albumina	PTX	Varias: melanoma, cáncer de mama, de células escamosas, orofaríngeo, pulmón, ovarios, etc.	<i>Targeting</i> a tumores y mejora de la solubilidad de fármacos.	Fase II o III según aplicación.

Explorando esta información se puede ver como la gran mayoría de sistemas aprobados en clínica son de naturaleza lipídica y polimérica, además de micelas, NPs metálicas y ciclodextrinas. Destacar la introducción de NPs metálicas como los óxidos de hafnio y los óxidos de hierro superparamagnéticos. Concretamente, la nanoformulación NanoTherm® está constituida por NPs metálicas de óxido de hierro superparamagnético recubiertas de aminosilano. El recubrimiento aporta estabilidad a las NPs de óxido de hierro, pero, además, al presentar un grupo amino (-NH₂), este favorece la interacción con biomoléculas y células tumorales. El tratamiento del cáncer con NanoTherm® se basa en la hipertermia o ablación tumoral localizada cuando este nanomedicamento, una vez en el lugar de acción, se expone a un campo magnético e incrementa la temperatura intratumoral. Si el tiempo de exposición al campo magnético es bajo el incremento de temperatura sensibilizará las células tumorales para un posterior tratamiento quimioterápico (hipertermia), mientras que si el tiempo de exposición es alto el incremento de temperatura va a destruir directamente la masa tumoral (ablación térmica) [Weissig V. y cols., 2014].

La falta de nanosistemas magnetopoliméricos multifuncionales en clínica junto con la realidad de que una quimioterapia y técnicas de diagnóstico convencionales limitan en gran medida el tratamiento y diagnóstico de según qué tipo de cánceres, promueve nuevos proyectos de investigación en el área. En este contexto, las NPs magnéticas incorporadas en estructuras orgánicas como las poliméricas o lipídicas que pueden a su vez transportar otros agentes terapéuticos como los fármacos quimioterápicos y otros agentes de diagnóstico como luminóforos, radionúclidos y agentes de contraste para RMI, representan aproximaciones nanotecnológicas prometedoras con potencial en la medicina actual. La investigación en el área biomédica del cáncer es una investigación dinámica en constante avance. A pesar de esto son varios los aspectos asociados al desarrollo de nanoestructuras con potencial aplicación en esta área aún por estudiar. La completa optimización de nanocompuestos magnéticos que permitan la llegada efectiva de agentes activos y su máxima acumulación en la región diana es aún necesaria. La búsqueda bibliográfica de trabajos científicos relacionados corrobora la necesidad de una extensa caracterización fisicoquímica de los nanosistemas, base fundamental para entender su comportamiento *in vitro* e *in vivo*; de estudios toxicológicos en mayor profundidad; y de resultados significativos en cuanto a eficiencia terapéutica (efecto quimioterápico e hipertermia) combinada con técnicas de diagnóstico más sensibles (RMI), que den una idea sobre el potencial de los nanosistemas en la teranosis.

El diseño de nanosistemas multifuncionales comprende la inclusión de núcleos magnéticos capaces de dirigir magnéticamente al nanosistema hacia la región diana y una vez ahí poder

ejercer el efecto de hipertemia magnética (HTM), también descrito para el nanomedicamento NanoTherm®. Un recubrimiento polimérico o lipídico incrementa la estabilidad de los núcleos magnéticos y mejorar su biodistribución al dotar al nanosistema de una barrera frente a proteínas y aumentar el tiempo de circulación en sangre [Lee H. y cols., 2006; Aguilar Z.P., 2013 ; Badran M.M. y cols., 2018; Caban-Toktas S. 2020], pero también supone una nanoestructura capaz de incorporar agentes activos de distinta naturaleza (fármacos, material genético, péptidos, proteínas y anticuerpos [Diana Sousa y cols., 2019]). De esta forma, el nanosistema magnetopolimérico diseñado puede tratar un tumor cancerígeno mediante dos terapias distintas pero que se pueden combinar (tratamiento combinado). Finalmente, los núcleos magnéticos, agentes de contraste en resonancia magnética nuclear (RMN), incluidos en una nanoestructura polimérica o lipídica aportan al nanosistema la capacidad de poder aplicarse en el diagnóstico del cáncer por RMI [Blanco-Andujar C. y cols.,2018].

CAPÍTULO 2

Objetivos

2.1. Objetivo principal

El objetivo principal del trabajo de investigación propuesto como Tesis Doctoral es el desarrollo de una metodología reproducible para la formulación de nanoplataformas biodegradables y biocompatibles caracterizadas por una estructura mixta capaces de vehiculizar fármacos antitumorales. Esto es, núcleos de óxido de hierro superparamagnéticos (maghemita; $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) embebidos en una matriz polimérica de poli(D,L-lactida-co-glicolida (PLGA), y todo ello recubierto de otro polímero, el quitosano (QS): ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PLGA)/QS. Los núcleos magnéticos proporcionarán al nanocompuesto una eficiente respuesta a campos magnéticos externos y, por tanto, la posibilidad de ser guiados a la región diana mediante su exposición a un imán. Además, la naturaleza superparamagnética de estos óxidos de hierro aportará a la nanoestructura final la capacidad para la HTM antitumoral; esto es la destrucción de las células cancerosas mediante generación de calor bajo la influencia de un campo electromagnético alterno (CEMA). Esta propiedad de respuesta frente a la exposición a un CEMA (HTM) podría incluso aprovecharse para activar la liberación del agente terapéutico vehiculado (por degradación de la matriz copolimérica en la que está incorporado). Por otro lado, los óxidos de hierro como la maghemita son buenos agentes de contraste T₂ en RMI, propiedad a aprovechar en el diseño de una nanoherramienta para el diagnóstico por RMI. En cuanto al polímero PLGA su inclusión en el diseño del sistema nanométrico se requiere pues es en la matriz polimérica donde los agentes antitumorales se absorberán para ser vehiculizados. Además, una de las principales características del PLGA es que asegura una liberación prolongada de las moléculas de fármacos que porta. El tercer elemento de la nanoestructura, el QS, aportará una mayor estabilidad coloidal, un mayor control de la liberación de los agentes antitumorales y una potencial propiedad *stealth*, la cual favorece una adecuada biodistribución *in vivo*.

2.2. Objetivos específicos

Como objetivos específicos pueden destacarse los siguientes siete coincidiendo con los siete capítulos centrales del trabajo de investigación (capítulos 3 a 9):

1.- Definición de una metodología reproducible que permita la formulación de nanosistemas constituidos por núcleos superparamagnéticos de óxido de hierro (maghemita; $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) embebidos en una matriz de polimérica de PLGA [A. Bee y cols., 1995; B. Pérez-Artacho y cols., 2012; E. Pretel y cols., 2019], y toda esta estructura recubierta por el polímero QS [J.L. Arias y cols.,

2010; J.L. Arias , L.H. Reddy y cols., 2011; J.D. Unciti-Broceta y cols., 2015]. La elección de la partícula óptima, es decir, aquella que reúna una morfología, tamaño y propiedades superficiales adecuadas para la vía de administración parenteral, y que además se genere en cantidades razonables, constituye el primer y primordial paso del trabajo de investigación propuesto como Tesis Doctoral.

2.- Realización de una completa caracterización física, química y fisicoquímica que demuestre que efectivamente se obtienen las nanoestructuras propuestas, con las características deseadas. Esta caracterización consistirá en evaluar el tamaño de partícula (espectroscopia de correlación de fotones), estructura, composición y análisis elemental (microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM), microscopía electrónica de barrido-transmisión de campo oscuro anular de alto ángulo (HAADF-STEM), microscopía electrónica de barrido-transmisión de campo claro anular (ABF-STEM), espectroscopia de dispersión de energía de rayos X (EDX)), propiedades eléctricas superficiales (electroforesis), propiedades termodinámicas superficiales (goniometría y modelo de van Oss), estructura mineral o grado de cristalinidad (difracción de rayos X) y composición química (espectroscopia de infrarrojos por Transformada de Fourier; FTIR). Esta caracterización proporcionará información suficiente para predecir el comportamiento *in vitro* e *in vivo* del nanocompuesto, y para mejorar su diseño. Los nanosistemas intermedios (γ -Fe₂O₃, PLGA, QS y γ -Fe₂O₃/PLGA), serán utilizados como control cuando sea preciso. Parte de estos experimentos se realizarán en colaboración con el grupo de investigación "Física Aplicada y Sistemas Coloidales dirigido por el Dr. Fernando González Caballero de la Facultad de Ciencias, Universidad de Granada" y el "Centro de Instrumentación Científica del Campus Universitario de Fuente Nueva, Universidad de Granada". Dentro de este objetivo destaca la demostración de las propiedades magnéticas de las NPs. Una completa caracterización magnética es necesaria para demostrar que las partículas tienen una respuesta magnética eficiente que asegurará el guiado magnético de los agentes antitumorales hasta la región diana, la capacidad para la HTM y su potencial aplicación como agentes de contraste T₂ en RMI. La caracterización magnética consistirá en analizar su naturaleza superparamagnética (ciclo de histéresis), evaluar macroscópicamente y microscópicamente la respuesta magnética *in vitro* frente a un imán (0.4 T). Estas metodologías se seguirán gracias a la colaboración con el grupo de investigación "Física Aplicada y Sistemas Coloidales dirigido por el Dr. Fernando González Caballero de la Facultad de Ciencias, Universidad de Granada".

3.- Evaluación de la estabilidad de los sistemas coloidales con el tiempo. Esto es, analizar la evolución de propiedades físico-químicas relevantes con el tiempo y bajo unas determinadas condiciones de almacenamiento (pH 6; 4.0 ± 0.5 °C). Los parámetros considerados de referencia para evaluar la estabilidad coloidal son los siguientes: tamaño de partícula e índice de polidispersión (PDI), y las propiedades eléctricas superficiales (potencial zeta; ζ) [L.H. Reddy y cols., 2012]. Estos resultados se obtendrán mediante las técnicas de espectroscopia de correlación de fotones y electroforesis, respectivamente.

4.- Determinación de la biocompatibilidad y toxicidad de las nanoestructuras. Para ello, será necesaria la evaluación de la hemocompatibilidad de las partículas y la evaluación de su actividad tóxica *per se in vitro e in vivo*. La hemocompatibilidad de las partículas se determinará estudiando determinados parámetros implicados en los procesos de hemólisis, activación plaquetaria, activación del complemento y recalcificación plasmática o coagulación plasmática. La citotoxicidad de las partículas *per se* frente a líneas celulares sanas y tumorales se evaluará mediante el ensayo de bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) (ensayo de proliferación MTT) y la observación de fluorescencia mediante microscopía *High Content*. Por último, el estudio de la toxicidad de las partículas *per se* en cortes histológicos de ratones macho (cepa Balb/c) se llevará a cabo por el Servicio de Experimentación Animal del Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología (BIONAND) empleando tinción hematoxilina-eosina (H&E). Estas técnicas experimentales se realizarán 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” y el “Laboratorio de Resonancia Magnética Biomédica dirigido por la Dr. María Luisa García Martín en el Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología (BIONAND), Málaga”.

5.- Estudio de la capacidad para la HTM antitumoral de los nanocompuestos *in vitro*. En este punto, resulta fundamental demostrar si la nanoplataforma tiene capacidad para generar calor en la zona tumoral dentro de unos rangos determinados de temperatura bajo la influencia de un CEMA, y si esta acción hipertérmica se asocia a una eficacia anticancerosa en líneas celulares tumorales. La viabilidad celular se determinará mediante la aplicación del ensayo MTT.

6.- Análisis de la vehiculización del agente antitumoral CDDP por los nanocompuestos. Debe desarrollarse una metodología que permita la máxima carga del fármaco y, conjuntamente, una liberación sostenida y controlada de este. Se pondrá especial atención en estudiar la

liberación controlada por estímulos externos. El medio ácido característico del ambiente tumoral y las altas temperaturas asociadas a la capacidad para la hipertermia del nanocompuesto deberían facilitar la aceleración de la liberación del fármaco vehiculizado en el momento y lugar deseado (lugar de acción). La carga del agente antitumoral en los nanocompuestos debe suponer un beneficio respecto al agente antitumoral libre en cuanto a su actividad anticancerosa *in vitro*. Por ello, se demostrará que el CDDP cargado en los nanocompuestos desarrolla una eficaz actividad antitumoral en comparación con el fármaco libre (ensayo de viabilidad celular MTT; 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.- Investigación de la capacidad como agentes de imagen para RMI de las partículas magnetocopoliméricas. Estudios *in vitro* e *in vivo* son precisos para alcanzar este objetivo. Como prueba preliminar de su potencial en RMI, se deberán determinar los valores de las relajatividades longitudinal (r_1) y transversal (r_2) (campo magnético de 1.44 T). Tras comprobar que los valores de las relajatividades r_1 y r_2 para los nanocompuestos son adecuados, estos se evaluarán como agentes de contraste RMI en ratones macho (cepa Balb/c). Concretamente se analizarán los perfiles de su biodistribución *in vivo* a corto y largo plazo. Los ensayos de RMI se llevarán a cabo dentro de las instalaciones del “Laboratorio de Resonancia Magnética Biomédica dirigido por la Dr. María Luisa García Martín en el Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología (BIONAND), Málaga”.

CAPÍTULO 3

Formulación de nanosistemas

3.1. Introducción

3.1.1. *Maghemita*

La maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) es un óxido de hierro superparamagnético de importante relevancia en el diseño y formulación de nanosistemas avanzados de aplicación en biomedicina, concretamente en el tratamiento y/o diagnóstico del cáncer [Reddy L.H. y cols., 2012; El-Hammadi M.M. y cols., 2015; Mansur A.A.P. y cols., 2020; Taheri-Ledari R. y cols., 2020; Dhas N. y cols., 2021]. El carácter superparamagnético de este material dota a los sistemas coloidales de unas determinadas propiedades como lo son la posibilidad de dirigir selectivamente al nanosistema hacia la región diana en respuesta a un campo magnético (direccionamiento magnético) [Durán J.D.G. y cols., 2008; Reddy L.H. y cols., 2012; El-Hammadi M.M. y cols., 2015; Lorente C. y cols., 2018; Curcio A. y cols., 2019; Benyettou F. y cols., 2020] y con ello a los fármacos incorporados (vehiculización de fármacos) en su estructura, todo ello en combinación con su versatilidad como agentes tanto en hipertermia magnética antitumoral como en RMI (agentes de contraste T₂) [Bakhtary Z. y cols., 2016; de Gouw D.J.J.M. y cols., 2020]. La capacidad para la hipertermia magnética (HTM) puede desencadenar también la liberación de los fármacos incorporados en la estructura del nanosistema. Como consecuencia, la inclusión de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ en la estructura de un nanosistema con aplicación en el cáncer, se considera de gran interés cuando se diseñan NPs teranósticas contra el cáncer [Arias J.L., 2011a; Reddy L.H. y cols., 2012; Dadfar S.M. y cols., 2019]. Este diseño inteligente asegura la visualización de tejidos (ej. tejido tumoral) por contraste en RMI, la aplicación en HTM antitumoral y la capacidad de orientación magnética y entrega selectiva de fármacos. En vista de su aplicación *in vivo*, dentro de la categoría de materiales óxidos de hierro destacan la $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ y la magnetita (Fe_3O_4) por sus propiedades biodegradables y su biocompatibilidad [Durán J.D.G. y cols., 2008; Laurent S. y cols., 2008].

Todos los materiales presentan propiedades magnéticas pero su comportamiento frente a un campo magnético va a depender del comportamiento magnético de cada átomo, y este a su vez va a depender de la disposición de sus electrones en el último orbital. La estructura magnética más elemental es el momento magnético y éste está asociado con el momento angular del electrón (movimiento orbital del electrón en torno al núcleo del átomo) y con la rotación del espín del electrón. En vista de esta información podemos clasificar a los materiales en diamagnéticos, ferromagnéticos, ferrimagnéticos y paramagnéticos entre otros. En los materiales diamagnéticos (momento magnético resultante de cada átomo es = 0) cuando se aplica un campo magnético externo, se inducen en los átomos corrientes que crean un campo magnético en cada uno de los átomos que se opone al campo aplicado, es decir el momento magnético inducido se opone al

campo que lo induce. Los materiales diamagnéticos son repelidos por el campo magnético externo. Por el contrario, en los materiales ferromagnéticos hay un comportamiento colectivo en el que el momento magnético de cada átomo se alinea con el de los demás a través de un fenómeno denominado acoplamiento de intercambio [Reddy L.H. y cols., 2012]. Este fenómeno provoca la aparición de una magnetización en regiones macroscópicamente pequeñas y características del material ferromagnético, denominadas dominios. Esta magnetización global es nula, pero si se aplica un campo externo los diferentes dominios se alinean y producen una fuerte magnetización capaz de permanecer aun cuando el campo externo desaparece. De manera similar, en los materiales ferrimagnéticos, en donde se tiene más de un elemento distinto con momentos magnéticos $\neq 0$ y distintos para cada elemento, tiene lugar un fenómeno en el cual las contribuciones de estos momentos magnéticos desiguales se alinean de forma antiparalela [Cornell R.M y Schwertmann U, 2003]. La diferencia entre los módulos de los momentos magnéticos da lugar a un comportamiento similar al ferromagnetismo, es decir, a la aparición de una magnetización en los dominios. El paramagnetismo es característico de los materiales cuyos átomos presentan un momento magnético $\neq 0$. Antes de exponer el material al campo magnético externo, los momentos magnéticos de cada átomo apuntan en direcciones dispuestas al azar, pero al aplicar un campo magnético externo los momentos magnéticos se alinean con este, es decir, los materiales paramagnéticos se ven atraídos por el campo magnético externo. Como curiosidad, la magnetización es proporcional al campo magnético externo. En los materiales paramagnéticos, a diferencia de los ferrimagnéticos o ferromagnéticos en donde la magnetización es permanente, esta magnetización desaparece una vez que el material deja de estar expuesto al campo magnético externo [Reddy L.H. y cols., 2012]. Cuando un material ferromagnético o ferrimagnético es reducido a un tamaño de partícula nanométrico comparable con el del dominio magnético, este adquiere propiedades paramagnéticas. Por tanto, el tamaño de partícula influye en la facilidad de un material para magnetizarse y desmagnetizarse. Si el tamaño de partícula decrece por debajo del tamaño de dominio también lo hace el número de átomos, provocando la orientación de manera aleatoria de los momentos magnéticos restantes en ausencia de un campo magnético. Este fenómeno se conoce como superparamagnetismo y se caracteriza por la ausencia de remanencia y campo coercitivo, esto es la ausencia de un campo magnético necesario para que un material reduzca su imanación a cero después de haber sido magnetizado hasta saturación por la exposición a un campo magnético [Reddy L.H. y cols., 2012]. El superparamagnetismo ofrece una mayor capacidad de magnetización en comparación con el paramagnetismo [Reddy L.H. y cols., 2012]. De forma general, el desvanecimiento de la magnetización una vez suprimido el campo magnético es una propiedad esencial, que presentan los materiales paramagnéticos y

superparamagnéticos. para la aplicación de nanosistemas de óxido de hierro en biomedicina, ya que asegura su seguridad y por tanto su eficacia *in vivo*. Concretamente, esta propiedad evita la agregación de las partículas entre sí durante el almacenamiento y durante su administración *in vivo* intravenosa, factor importante a la hora de evitar aglomeraciones y la potencial embolización vascular [Neuberger T. y cols., 2005; Corot C. y cols., 2006; Reddy L.H. y cols., 2012; Perrillo E. y cols., 2017]. De forma adicional, el superparamagnetismo de las partículas nanométricas de óxido de hierro dotan a las nanoestructuras de otros beneficios, como la capacidad para generar calor (mecanismo de relajación de Néel y relajación browniana) cuando están expuestas a un CEMA (consultar el capítulo 7 “Hipertermia de fluido magnético antitumoral” para más detalles) [Schütt W. y cols., 1997; Neuberger T. y cols., 2005; Mejías R. y cols., 2019] y la mejora de los tiempo de relajación T_1 y T_2 en RMI (consultar el capítulo 9 “Agentes de contraste en resonancia magnética de imagen: Ensayos de farmacocinética y biodistribución *in vivo*” para más información) [Weissleder R. y cols., 1995; Hu F. y cols., 2011].

La estructura cristalina, o grado de cristalinidad, y el tamaño de los óxidos de hierro define sus propiedades magnéticas [Reddy L.H. y cols., 2012]. Las partículas de óxido de hierro (Fe_3O_4 y $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) se caracterizan por una estructura cristalina cúbica centrado en las caras de tipo espinela inversa en la cual los iones de oxígeno se encuentran formando una red cúbica compacta con los iones de hierro ubicados en los intersticios. La estructura de tipo espinela de la $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ presenta coordinación tetraédrica y octaédrica para los cationes trivalentes (Fe^{3+}). Los cationes en posiciones octaédricas interactúan a través de los oxígenos con los cationes en posiciones tetraédricas, alineando los momentos magnéticos de forma antiparalela a los momentos magnéticos de las posiciones tetraédricas y generando un comportamiento ferrimagnético [Cornell R.M y Schwertmann U, 2003] (Figura 3). Por tanto, se puede establecer una relación de la estructura de espinela inversa de estos óxidos de hierro (Fe_3O_4 y $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) con propiedades ferrimagnéticas [Spaldin N. A., 2011]. El término ferrimagnetismo fue propuesto por Louis Néel [Néel L., 1949]. Por otro lado, el tamaño de partícula influye en el momento magnético del material y por ende en la respuesta del material a un campo magnético. Si el tamaño de partícula decrece lo hace también su magnetización de saturación, esto es por un aumento del área superficial, lo que a su vez puede tener implicaciones en el carácter cristalino de las partículas y, en consecuencia, en su momento magnético [Reddy L.H. y cols., 2012] Esta es la razón de la extensa caracterización en cuanto a tamaño y estructura de las partículas de óxido de hierro.

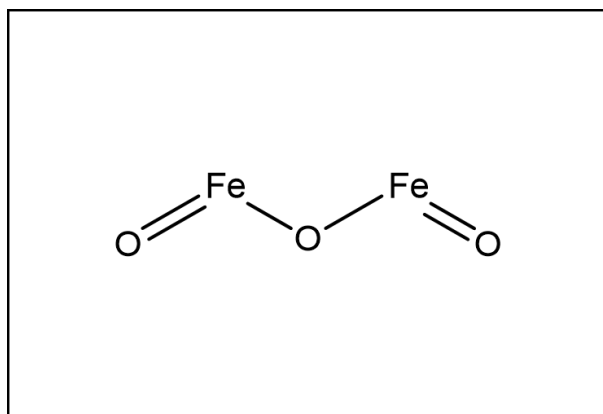


Figura 3. Estructura química de la Fe₂O₃

Las propiedades magnéticas de la γ -Fe₂O₃ se definen por la dependencia de la magnetización o inducción magnética (M) del campo magnético aplicado (H) [Reddy L.H. y cols., 2012]. Cuando un material es expuesto a un campo magnético H, este responde produciendo un campo conocido como imanación (M), esto sucede cuando los distintos momentos magnéticos se ordenan en la dirección más favorable para el material. Existe una relación lineal entre M y H (Ec. 1):

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

donde μ es la permeabilidad magnética de las partículas. El valor de μ determina si la γ -Fe₂O₃ exhibe un comportamiento paramagnético ($\mu > 1$) o diamagnético ($\mu < 1$) [Reddy L.H. y cols., 2012].

Otro parámetro importante en el magnetismo, y relacionado con μ , es la susceptibilidad magnética χ (E. 2):

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

, si $\chi > 0$ las partículas de γ -Fe₂O₃ son paramagnéticas y diamagnéticos si $\chi < 0$.

Las partículas de óxido de hierro superparamagnéticas una vez hayan cumplido su misión en el organismo tienen la capacidad de biotransformarse en hierro no superparamagnético. Estas formas no superparamagnéticas tienen la capacidad de almacenarse en tejidos como fuente de reserva de hierro para después emplearse en procesos biológicos [Lee N. y cols., 2015]. Por tanto, la transformación de las formas de óxido de hierro superparamagnético a formas de óxido de hierro no superparamagnético permite la eliminación de estas primeras [Mazuel F. y cols., 2016].

Los principales procedimientos de síntesis de óxidos de hierro se clasifican en métodos físicos, químicos y microbianos. La metodología de síntesis basada en reacciones químicas

permite un adecuado control del tamaño de partícula final. Por ello, para la síntesis de partículas de γ -Fe₂O₃ la coprecipitación química seguida de un proceso de oxidación es una elección adecuada.

El proceso de coprecipitación química para la obtención de partículas de Fe₃O₄ destaca por su sencillez y eficiencia, sintetizando coloides con diámetros medios inferiores a 50 nm [López-López, M. T. y cols., 2005; Viota, J. L. y cols., 2007]. Brevemente, esta metodología se basa en una reacción química: la precipitación de óxidos de hierro al adicionar sales de Fe (II) y Fe (III) sobre un medio alcalino (ej. NH₄OH). La reacción de co-precipitación, desarrollada originalmente por R. Massart, permite controlar tanto la formación de los núcleos de Fe₃O₄ como su tamaño y propiedades superficiales [Massart R., 1981; López-López, M.T. y cols., 2005; Viota, J.L.; 2007; Wu J.H. y cols.,2007]. Las condiciones experimentales por tanto tienen un gran peso en la capacidad de respuesta magnética de los coloides obtenidos [Massart R., 1981; Reddy L.H. y cols., 2012]. A continuación, se detalla esta reacción (Ec. 3):



La γ -Fe₂O₃, óxido de hierro (III), se obtiene por oxidación del Fe (II) de la Fe₃O₄, sintetizada por co-precipitación química, a Fe (III). Concretamente, el método de oxidación implica la oxidación parcial de las suspensiones de óxido de Fe (II) con diferentes agentes, como por ejemplo iones de nitrato [Plaza R.C. y cols., 2002; Amemiya Y. y cols.,2007; Vereda F. y cols., 2008]. Por tanto, la conversión total de Fe₃O₄ a γ -Fe₂O₃ se logra oxidando Fe₃O₄ a 90 °C en una solución de nitrato férrico [Bee A. y cols., 1995].

En definitiva, las partículas de γ -Fe₂O₃ superparamagnéticas combinan una alta susceptibilidad magnética para un comportamiento magnético óptimo, una pérdida de magnetización tras la desaparición del campo magnético externo y una segura biotransformación a depósitos de hierro.

3.1.2. *Ácido oleico: Funcionalización de maghemita*

Las partículas de óxido de hierro suelen someterse a un proceso de estabilización. Su objetivo es minimizar una serie de eventos que alteran la integridad de estos coloides: alta reactividad frente a agentes oxidantes y en presencia de agua o humedad [Reddy L.H. y cols., 2012], y, además, son propensos a la formación de agregados. La estabilización de los coloides magnéticos puede llevarse a cabo por métodos físicos y/o químicos, esta segunda es la que se logra con la incorporación del ácido oleico en la superficie de las partículas magnéticas.

El ácido oleico es un ácido graso monoinsaturado con un grupo carboxilo polar y una cadena hidrocarbonada no polar (Figura 4). Los ácidos carboxílicos como el ácido oleico se emplean ampliamente en la formulación de nanoplateformas como estabilizadores no poliméricos [Sun S. y cols., 2004; Woo K. y cols., 2005; Reddy L.H. y cols., 2012; Turcheniuk K. y cols., 2013]. La funcionalización de la superficie de NPs de óxido de hierro con moléculas de ácido oleico no sólo regula la estabilidad de los coloides magnéticos, sino que también permite la interacción de estos con polímeros, como el PLGA, y por tanto su inclusión en matrices de PLGA [Xu C. y Sun S., 2007; Reddy L.H. y cols., 2012; Ulbrich K., 2016]. Concretamente, la incorporación de las moléculas de ácido oleico sobre la superficie de óxidos de hierro (hidrófilos) se produce por interacción de las cabezas polares con esta superficie dejando libres las colas apolares (hidrófobas). Por tanto, la funcionalización de la superficie de los óxidos de hierro con moléculas anfifílicas de ácido oleico se produce una vez formulados los núcleos magnéticos [Kloust H. y cols., 2013; Li L. y cols., 2013] y va a permitir el cambio de las características superficiales de hidrófilas a hidrófobas, favoreciendo la inclusión de los núcleos magnéticos en la matriz polimérica (hidrófoba) en el proceso de formulación de nanoestructuras [Okassa L.N. y cols., 2007].

Adicionalmente, la funcionalización de los coloides magnéticos disminuye la interacción con componentes biológicos del organismo, es decir, el reconocimiento por parte del sistema Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) [Reddy L.H. y cols., 2012; Ulbrich K., 2016].

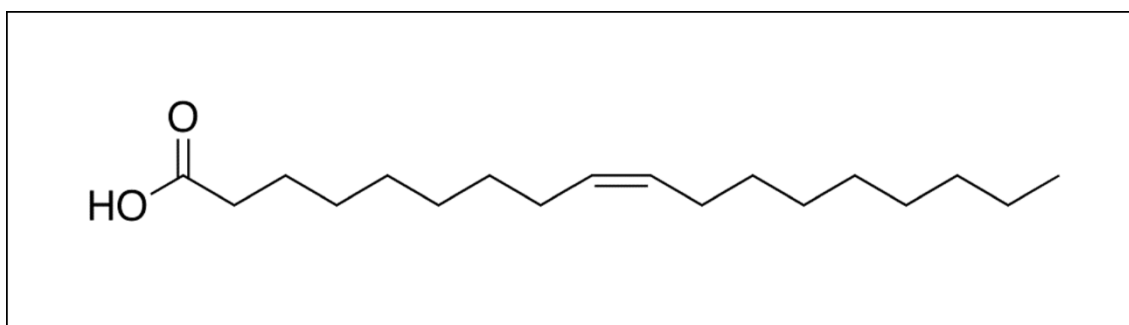


Figura 4. Estructura química del ácido oleico.

3.1.3. *Poli(D,L-lactida-co-glicolida)*

Las nanoplateformas desarrolladas para el transporte selectivo de agentes activos, ya sean fármacos y/o material genético, deben ser diseñadas con una estructura *core/shell* en la que los coloides magnéticos, responsables del guiado selectivo, están embebidos en una matriz, probablemente polimérica [Arias J.L. y cols., 2012; García-García G. y cols., 2020] o lipídica [Muñoz de Escalona M. y cols., 2016; Lorente C. y cols., 2018], por ejemplo. Además, esta

estructura aporta estabilidad coloidal adicional, vehiculización de los agentes terapéuticos y su liberación controlada; al igual que no altera la biocompatibilidad ni seguridad *in vivo*.

En este contexto, el poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLGA) es un copolímero tipo poliéster alifático lineal frecuentemente empleado en nanotecnología biomédica debido en parte a su aprobación por la FDA. El PLGA es sintetizado más frecuentemente por medio de un proceso de co-polimerización por apertura de anillo (*Ring Opening Polymerization*, ROP) en el que están implicados dímeros cíclicos del ácido láctico (lactida) y ácido glicólico (glicólida) (Figura 5) [Dechy C.O. y cols., 2004; Babiuch K. y cols., 2012]. Durante el proceso de síntesis los monómeros de la lactida (poli(D,L-lactida); PLA) y glicólida (poli(glicolida); PGA) tienden a unirse entre sí a través de enlaces de tipo éster. Esta reacción requiere de catalizadores como el 2-etilhexanoato de estaño (II).

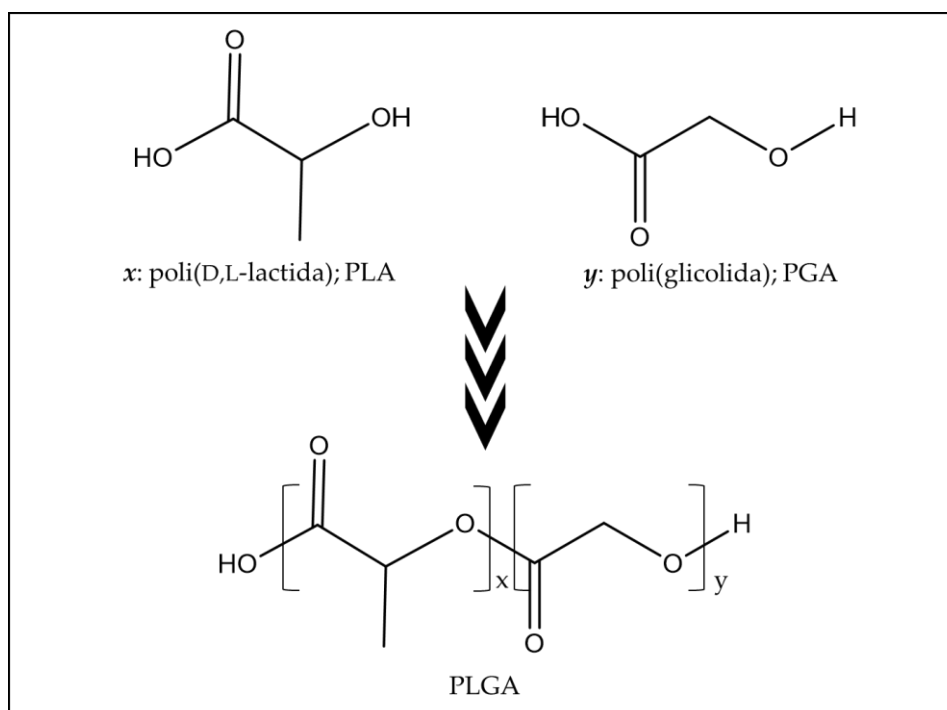


Figura 5. Estructuras químicas del PLA, PGA y PLGA.

El proceso de ROP influye entre otras cosas en el tipo y estructura del PLGA. En función de la relación molar y la estereoquímica (D- y/o L-) de los monómeros utilizados (PLA y PGA) para el proceso de ROP se obtienen distintos tipos de PLGA [Dechy C.O. y cols., 2004]. Por ejemplo, PLGA 50:50, el empleado en el presente trabajo de investigación y el elegido con mayor frecuencia en nanotecnología biomédica, está constituido por 50% de PLA y 50% de PGA [Tong R. y cols., 2012]. Además, su estructura puede variar desde una estructura completamente amorfa hasta una completamente cristalina. El grado de cristalinidad del copolímero depende también de la proporción molar de monómeros empleada en la reacción ROP [Jalil R. y Nixon J.R., 1990; Coco

R. y cols., 2013]. Concretamente, si el contenido en PGA es inferior al 70% el copolímero PLGA presenta una estructura amorfa.

Incorporar PLGA en la nanoestructura ha demostrado ser una estrategia ventajosa en la formulación de NPs magnéticas con aplicación en biomedicina. Concretamente, aporta biocompatibilidad, biodegradabilidad y capacidad para la vehiculización y liberación bifásica controlada de agentes terapéuticos [Pérez-Artacho B. y cols., 2012; Cui Y.N. y cols., 2017; Mosafer J. y cols., 2017; Chen H.A. y cols., 2020]. Esta última aportación a las características globales del nanosistema viene marcada por la capacidad de respuesta del PLGA a estímulos del medio que le rodea, como los cambios en el pH o en la temperatura del entorno. Por un lado, el polímero ve acelerada su degradación en ambientes ácidos, como el medio intratumoral, al acelerar el proceso de hidrólisis de los enlaces éster presentes en su estructura química [G.K. Jain y cols., 2010; R. Domínguez-Ríos y cols., 2019]. Por otro lado, el PLGA también es un polímero termosensible, lo que favorece la activación de la liberación por un aumento de la temperatura del medio, fenómeno habitual en la HTM localizada [Dunne M. y cols., 2000; Lappe D. y cols., 2017; Park K. y cols., 2021]. Concretamente, la generación de calor en el entorno de este polímero va a acelerar su degradación de las cadenas de PLGA, y lo hará exactamente a temperaturas superiores a la temperatura de transición vítrea (T_g) para este polímero ($\approx 40\text{ }^\circ\text{C}$) [Lappe D. y cols., 2017]. De hecho, siendo la temperatura un factor clave en la liberación de los agentes terapéuticos cargados, la inclusión de núcleos superparamagnéticos de óxido de hierro con capacidad para generar calor en los nanosistemas supone un acierto en el diseño de nanoplataformas de aplicación en terapéutica. La liberación de los agentes terapéuticos se aceleraría al exponer a este nanosistema a un CEMA de alta frecuencia que transformará estos núcleos magnéticos en generadores de calor que provocaría un aumento de temperatura por encima de los $40\text{ }^\circ\text{C}$, la T_g del polímero [Souza K.C. y cols., 2009; Reddy L.H. y cols., 2012; El-Hammadi M.M. y cols., 2015]. Una temperatura superior a la T_g del PLGA daría como resultado la rápida liberación de los agentes terapéuticos cargados en la matriz de PLGA debido a su degradación acelerada, y de forma simultánea, a la difusión de los agentes terapéuticos a través de la estructura del PLGA.

Es por todo lo anteriormente comentado que la incorporación de PLGA en la nanoestructura final queda justificada. Como resultado, la matriz de PLGA le proporcionaría sensibilidad a pHs ácidos y aumentos de temperatura (hipertermia), favoreciendo el suministro selectivo de moléculas terapéuticas (fármacos y/o material genético) a las células tumorales.

Finalmente, el PLGA es un material biodegradable dado que los productos resultantes de su degradación en un organismo vivo son monómeros, los cuales son metabolizados mediante el ciclo de Krebs y eliminados por la orina [Ma X. y cols., 2012].

Las principales metodologías de síntesis de nanosistemas poliméricos se clasifican en función de si se requiere o no una reacción previa de polimerización. En el caso del PLGA, este proceso no sería necesario. La formulación de NPs de PLGA se puede conseguir siguiendo diferentes metodologías: emulsificación con evaporación del disolvente, nanoprecipitación, deposición interfacial, emulsificación/difusión del disolvente, *Salting out*, etc. En base a trabajos de investigación previos [Pérez-Artacho B. y cols., 2012; Pretel E. y cols., 2017] y procesos de optimización de síntesis de NPs de PLGA, el procedimiento de síntesis basado en nanoprecipitación seguida de evaporación del disolvente es el más adecuado y uno de los más ampliamente utilizados [Nicolas J. y cols., 2013]. El también llamado método de desplazamiento de solvente fue desarrollado por Fessi y cols. en 1989 [Fessi H. y cols., 1989] y es uno de los procedimientos de síntesis de partículas poliméricas más sencillo, rápido, económico y con mayor éxito de reproducibilidad [Vauthier C. y Bouchemal K., 2009]. Se fundamenta en la precipitación de un polímero preformado, en este caso el PLGA, a partir de una solución orgánica y la difusión del disolvente orgánico en el medio acuoso, en donde el PLGA es insoluble, en presencia de un tensioactivo o agente estabilizante. El PLGA se disuelve en una solución orgánica fácil de eliminar posteriormente y miscible en agua (por ejemplo: acetona) que al entrar en contacto con un medio acuoso da lugar a la precipitación de nanoesferas de PLGA [Vauthier C. y Bouchemal K., 2009; Nicolas J. y cols., 2013]. El adiconamiento se realiza bajo agitación mecánica o magnética. Concretamente, a medida que se adiciona la solución orgánica sobre la solución acuosa se provoca la insolubilización del PLGA, el cual acaba precipitando en forma de NPs. Este fenómeno es instantáneo debido a una rápida difusión del disolvente orgánico al medio acuoso [Nicolas J. y cols., 2013]. La explicación fisicoquímica de la rápida formación de las NPs de PLGA se rige por el denominado “efecto Marangoni” que se basa en las “turbulencias interfaciales” que aparecen en la interfase entre el disolvente orgánico y el agua con la difusión violenta del disolvente orgánico, y que resultan de una serie de complejos fenómenos que implican al flujo, la difusión y las variaciones en la tensión superficial [Vauthier C. y Bouchemal K., 2009; Nicolas J. y cols., 2013]. Adicionalmente, los tensoactivos se adicionan a la síntesis de nanosistemas con el objetivo de ayudar a preservar la estabilidad de las suspensiones de las NPs resultantes evitando la agregación durante largos períodos de almacenamiento [Fessi H. y cols., 1989]. Posteriormente, el disolvente es eliminado de la suspensión de NPs por evaporación. La suspensión coloidal resultante presenta tamaños de partícula definidos y entorno a los 200 nm, diámetros mucho más pequeños que los obtenidos por medio de un procedimiento de emulsificación con evaporación del disolvente [Vauthier C. y Bouchemal K., 2009].

3.1.4. Quitosano

El quitosano (QS) es un polímero que también se ha utilizado muy frecuentemente en la formulación de nanosistemas magnéticos biodegradables y no tóxicos con aplicación en nanotecnología farmacéutica [Santos D.P. y cols., 2011; Arias J.L. y cols., 2012; Assa F. y cols., 2017; Arias L.S. y cols., 2020]. Al igual que el PLGA, el QS aporta estabilidad coloidal adicional, y una liberación controlada de los agentes terapéuticos cargados en su estructura. Adicionalmente, el uso de QS aporta propiedades mucoadhesivas y mejora la biodistribución *in vivo* de los nanosistemas.

El QS es un polímero tipo polisacárido lineal derivado de la desacetilación parcial de la quitina, un polímero natural formado por unidades de N-acetilglucosamina, derivado de la glucosa [Nicolas J. y cols., 2013; Unciti-Broceta J.D. y cols., 2015]. Industrialmente, se obtiene por hidrólisis termoalcalina de los grupos acetamida de la quitina natural. Por tanto, su estructura se basa en unidades tanto de N-acetilglucosamina ($C_8H_{15}NO_6$) como de glucosamina ($C_6H_{13}NO_5$) según *R* en la estructura química (Figura 6). El QS de bajo peso molecular es un polímero soluble en agua con grupos amino cargados positivamente [Vauthier C. y Bouchemal K., 2009]. El QS es sin duda uno de los polisacáridos más ampliamente utilizados en tecnología farmacéutica debido a los grupos amino primarios alifáticos de su estructura. Estos grupos pueden reaccionar con otros compuestos por medio de grupos éster, aldehído o carboxilo como, por ejemplo: ligandos, cadenas poliméricas u otros compuestos capaces de ajustar la solubilidad del QS [Nicolas J. y cols., 2013]. De igual manera, la carga positiva generada por estos grupos amino puede ser la responsable de la generación de fuerzas de interacción atractivas con compuestos cargados negativamente, como el PLGA [Li W. y cols., 2017]. Esta idea se ha aplicado a la producción de partículas magnetopoliméricas: $(Fe_3O_4/PLGA)/QS$ [Ibarra J. y cols., 2015; Li G. y cols., 2018] y $(\gamma-Fe_2O_3/PLGA)/QS$ [Fernández-Álvarez F. y cols., 2021a; Fernández-Álvarez F. y cols., 2021b].

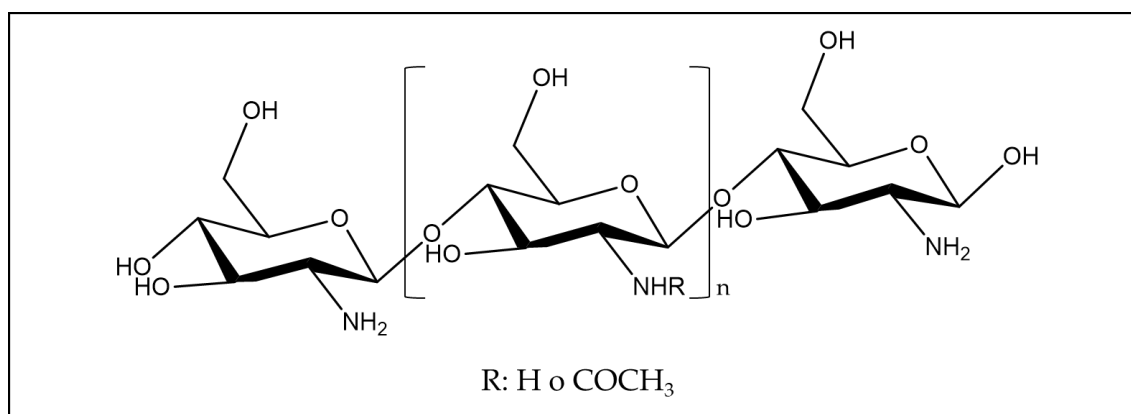


Figura 6. Estructura química del polisacárido QS. El QS está formado por unidades de glucosamina ($C_6H_{13}NO_5$) si $R=H$ y si $R=COCH_3$ también por unidades de N-acetilglucosamina ($C_8H_{15}NO_6$).

El QS presenta diferentes pesos moleculares que se agrupan en bajo, medio y alto peso molecular (50kDa a 1000 kDa) y viscosidad variable (< 2000 mPaS). Estas propiedades dependen en gran medida de la longitud de la cadena, de la densidad de carga y su distribución y del grado (entre 40% y 98%). Concretamente, si el QS presenta un grado de desacetilación bajo ($\approx 40\%$) este es soluble en agua ($\text{pH} < 9$), mientras que si presenta un grado de desacetilación mayor ($> 85\%$) es soluble en soluciones acuosas de hasta un $\text{pH} \approx 6,5$. De igual forma, la viscosidad del QS también depende del grado de desacetilación, y lo hace de forma proporcional.

Los nanosistemas basados en QS han demostrado presentar una capacidad de respuesta a pH ácidos [Arias J.L. y cols., 2011a; Taghavi S. y cols., 2017], dando lugar a una eficiente liberación de agentes terapéuticos. Por lo tanto, una funcionalización superficial con QS supone beneficios adicionales a los ya aportados por el PLGA en cuanto a capacidades de liberación sostenida de fármacos [Chen H. y cols., 2009; Kashyap S. y cols., 2019; Lu B. y cols., 2019], puesto que a mayores creará una barrera adicional para su difusión durante la liberación [Durán-Lobato M. y cols., 2014; Mansouri A. y cols., 2019]. Destacar que, incorporar QS a nanoestructuras con fines antitumorales supone una estrategia de liberación controlada de fármacos basada en la alta solubilidad del polímero a valores de ácidos de pH (valores de pH tumorales) [Arias J.L. y cols., 2011a; Taghavi S. y cols., 2017].

Recientemente, el QS se ha propuesto como una alternativa interesante a las cadenas de PEG como recubrimiento polimérico pensado para incrementar la vida media de circulación de los nanosistemas [Revia R.A. y cols., 2019]. La funcionalización de los nanosistemas con QS les proporciona un recubrimiento hidrófilo, biocompatible y propiedades *stealth*. Esta función tiene como objetivo camuflar a los nanosistemas del SFM evitando su eliminación prematura de la circulación sanguínea, lo que es lo mismo, aumentando su vida media en circulación [Sarmiento B. y cols., 2011; Abouelmagd S.A. y cols., 2015; Chirio D. y cols., 2018]. Por otro lado, la carga eléctrica superficial positiva proporcionada por el QS también podría estar relacionada con el incremento de la vida media en circulación sistémica ya que supone reducir o incluso inhibir la formación de corona de proteínas, minimizando y retrasando así el proceso de opsonización para evadir la fagocitosis [Aggarwal P. y cols., 2009; Ishak R.A. y cols., 2013; Chirio D. y cols., 2018; Pustulka S.M. y cols., 2020]. Además, los nanosistemas cargados positivamente tienen el beneficio de ser captados más fácilmente/favorablemente por las células diana [Tahara K. y cols., 2010; Yue Z.G. y cols., 2011; Voon S.H. y cols., 2016; Babu A. y cols., 2017].

Por tanto, la incorporación de QS al diseño de un nanosistema magnetopolimérico de aplicación en terapia anticancerígena queda debidamente justificada. La funcionalización con QS

de la superficie del nanosistema $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ cargado con moléculas de fármaco puede optimizar su biodistribución y los efectos terapéuticos [M.M. Badran y cols., 2018; S. Caban-Toktas y cols., 2020]. Como prueba de ello varios son los trabajos que describen una estructura similar con el fin de mejorar la biodistribución de los nanosistemas en el organismo [Cricchio V. y cols., 2017; Shanavas y cols., 2017; Li G. y cols., 2018].

De igual forma que para obtener NPs de PLGA, para formular NPs de QS no se requiere una reacción previa de polimerización. Existen varias metodologías de síntesis de NPs poliméricas, pero el método preferido cuando se emplean polímeros naturales como el QS es el proceso de desolvatación [Nicolas J. y cols., 2013]. Básicamente consiste en un proceso de precipitación mediado por un agente precipitante, en la mayoría de casos una sal: sulfato de sodio. El método implica la adición de la sal sulfato de sodio a una solución acuosa de QS resultando en una disminución de la solubilidad del polisacárido lo que llevó rápidamente a su precipitación como un derivado poco soluble, es decir NPs de QS [Arias J.L. y cols., 2011a]. La base de este fenómeno está en las interacciones entre las moléculas de disolvente y las del agente precipitante (enlaces intermoleculares que conducen a la coacervación) [Berthold A. y cols., 1996; Nicolas J. y cols., 2013]. La cantidad de sal requerida para la preparación de las NPs de QS depende del peso molecular del polímero y se controló mediante la observación de la turbidez de la solución de QS [Berthold A. y cols., 1996]. A diferencia de los otros métodos de síntesis de NPs de QS, este proceso de desolvatación evita el uso de disolventes orgánicos tóxicos y glutaraldehído, ampliamente utilizados en el resto de metodologías [Arias J.L. y cols., 2011a]. A pesar de emplearse como precipitante sulfato de sodio (iones sulfato), las NPs de QS obtenidas tras este proceso de formulación presentan carga eléctrica superficial positiva, lo que indica que solo parte de los grupos amino se neutralizan durante la formación de las NPs de QS [Berthold A. y cols., 1996].

3.2. Formulación de nanosistemas

3.2.1. Núcleos magnéticos de maghemita

Los coloides magnéticos de óxido de hierro ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) se obtuvieron a partir de un proceso de oxidación, concretamente de la oxidación de otro óxido de hierro, la Fe_3O_4 [Bee A. y cols., 1995], que a su vez se preparó siguiendo un método denominado co-precipitación química [Massart R., 1981]. En definitiva, la formulación de partículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ es un proceso bifásico. Brevemente,

el método co-precipitación química comienza con la adición simultánea y rápida de dos soluciones de dos sales de hierro distintas: (a) 10 mL de una solución de cloruro ferroso (FeCl_2) 2 M, en ácido clorhídrico 2M y (b) 40 mL de una solución de cloruro férrico (FeCl_3) 1 M, a una tercera solución de amoníaco 0.7 M (500 mL). Este proceso de mezclado se realizó a temperatura ambiente y bajo agitación mecánica (700 rpm; IKA® Eurostar 60 Digital Constant-Speed Mixer, Alemania) durante 30 minutos. Pasado este tiempo de reacción, las partículas de Fe_3O_4 obtenidas se limpiaron mediante separación magnética de la solución de amoníaco (imán de 0.4 T). Posteriormente se re-dispersaron en una solución de ácido perclórico 2 M (250 mL) sometiéndose así a un tratamiento de 12 horas para favorecer su estabilización. Tras 12 horas de contacto partículas – solución 2M de ácido perclórico, las partículas Fe_3O_4 se volvieron a limpiar (separación magnética; 0.4 T), para seguidamente ser oxidadas a $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ al ser re-dispersadas en una solución caliente (90°C) de nitrato férrico ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$) 0.34 M (600 mL). Este proceso de oxidación se alargó hasta los 30 min, tras los cuales las NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ se sometieron a ciclos repetidos de centrifugación (30 min a 8.500 rpm, Centrifuge 5804; Eppendorf Ibérica S.L.U., España) y de re-dispersión en agua bidestilada. Este proceso de limpieza se repitió hasta que la conductividad del sobrenadante fuese $\leq 10 \mu\text{S/cm}$ (Crison Microcm 2202 conductivity meter, Hach Lange Spain S.L.U., España). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado ($n = 3$).

La incorporación de moléculas de ácido oleico sobre la superficie de las NP de óxido de hierro se ha descrito en la literatura como un procedimiento importante a la hora de modificar las características superficiales de las partículas, en este caso, de hidrófilas a hidrófobas [Okassa L.N. y cols., 2007; Matshaya T.J. y cols., 2014]. Esta transformación superficial puede favorecer la incorporación de estas NPs magnéticas dentro de la matriz hidrófoba de PLGA durante la formulación de las partículas mixtas ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$; *core/shell*). Con este fin, se añadieron, bajo sonicación (frecuencia de sonicación: 42 kHz, potencia de salida: 100 W; baño ultrasónico Branson®; Branson Ultrasonics Corporation, EE. UU.), 3.5 mL de una solución etanólica de ácido oleico (1%, v/v) a unos 14.25 mg de núcleos de óxido de hierro (relación molar hierro: oleico 1: 1.25) [Ibarra J. y cols., 2015]. La sonicación continuó durante 60 min. Finalmente, los núcleos de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ tratados con ácido oleico se separaron magnéticamente de la solución etanólica (imán de 0.4 T) y se sometieron a un par de ciclos de lavado con acetona (1 mL). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado ($n = 3$).

3.2.2. *Nanopartículas poliméricas de poli(D,L-lactida-co-glicolida)*

La formulación de las partículas puras de PLGA se basó en la técnica de nanoprecipitación con evaporación del solvente, metodología extensamente empleada en la preparación de este tipo de NPs poliméricas [Holgado M.A. y cols., 2011; Martín-Banderas L. y cols., 2014; El-Hammadi M.M. y cols., 2017]. Concretamente, esta metodología comienza con la disolución de 19 mg del polímero PLGA en 5 mL de fase orgánica (acetona) y la preparación de 10 mL de una solución acuosa de acetato de polivinilo (PVA) al 1%, p/v. La reacción comienza con la adición de la fase orgánica sobre la fase acuosa bajo sonicación (Branson Sonifier 450, Emerson Electric Co., EE. UU.). La micropunta del sonicador Branson se sumergió en la fase acuosa dejando 1 cm de distancia con el fondo del vial de la muestra. Para minimizar la evaporación del líquido en el momento de la sonicación, la abertura del vial se cubrió con papel de aluminio. Las condiciones empleadas durante la sonicación se fijaron en: modo pulsado, con un ciclo de 40%, output de 20% y tiempo de sonicación de 1 min; las cuales además de generar partículas óptimas, evitaron la formación de espuma y permitieron un adecuado control de la temperatura. Este último punto también se promovió al sumergir el vial que contiene la muestra en un baño de hielo durante el proceso de sonicación. Finalmente, la acetona se evaporó para obtener una dispersión acuosa de NPs de PLGA (rotavapor Büchi Rotavapor®, Büchi, Suiza), la cual se limpió mediante varios ciclos repetidos de centrifugación (30 min a 9.000 rpm; centrífuga Centrikon T-124, Kontron, Francia) y re-dispersión en agua bidestilada, hasta que la conductividad del sobrenadante fue $\leq 10 \mu\text{S} / \text{cm}$. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado ($n = 3$).

3.2.3. *Nanopartículas poliméricas de quitosano*

Las partículas puras de QS se sintetizaron siguiendo el denominado método de coacervación, ampliamente utilizado en la formulación de estas NPs poliméricas [Arias J.L. y cols., 2010b; Arias J.L. y cols., 2011a; Unciti-Broceta J.D. y cols., 2015]. Inicialmente, 10.5 mg de QS se disolvieron progresivamente, y bajo agitación mecánica (1.000 rpm), en 25 ml de una solución acuosa de ácido acético (2%, v/v) que contenía Kolliphor® P-188 al 1% (p/v). Una vez disuelto el QS, se agregaron, gota a gota, 6.25 mL de una solución de sulfato de sodio (Na_2SO_4) al 20% (p/v) (1.25 mL/min) bajo sonicación (ciclo de 50%, output/salida de sonicación de 20% y tiempo de sonicación de 15 min) dando lugar a la reacción por la cual se obtuvo una dispersión acuosa de partículas de QS. Al igual que en el caso de las NPs puras de PLGA, las partículas puras de QS también se sometieron a ciclos repetidos de centrifugación (30 min a 9.500 rpm; centrífuga Centrikon T-124, Kontron, Francia) y re-dispersión en agua bidestilada para su limpieza, hasta

que la conductividad del sobrenadante fue $\leq 10 \mu\text{S} / \text{cm}$. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado ($n = 3$).

3.2.4. *Nanopartículas maghemita/poli(D,L-lactida-co-glicolida) (core/shell)*

La formulación de las partículas $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ (*core/shell*) se basó en la técnica anteriormente comentada para la síntesis de partículas de PLGA: nanoprecipitación con evaporación del solvente [Holgado M.A. y cols., 2011; Martín-Banderas L. y cols., 2014; El-Hammadi M.M. y cols., 2017]. Para la obtención de NPs mixtas, los coloides $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, tanto los hidrofílicos como los funcionalizados con ácido oleico, se incorporaron en la fase acuosa y fase orgánica, respectivamente. La incorporación de una fase sobre la otra se hace bajo sonicación (Branson Sonifier 450, Emerson Electric Co., EE. UU.) siguiendo la metodología anteriormente descrita en el apartado 3.2.2. “Nanopartículas poliméricas de poli(D,L-lactida-co-glicolida)” para la síntesis de NPs poliméricas puras de PLGA. Finalmente, la acetona se evaporó para obtener una dispersión acuosa de NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ (rotavapor Büchi Rotavapor®, Büchi, Suiza), la cual se limpió mediante varios ciclos de separación magnética (imán de 0.4 T) y re-dispersión en agua bidestilada, hasta que la conductividad del sobrenadante fue $\leq 10 \mu\text{S} / \text{cm}$.

Para determinar la influencia de las cantidades relativas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ y PLGA sobre las propiedades de las partículas mixtas $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$, el proceso de formulación se repitió con distintas proporciones $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$: PLGA (masa:masa): 2: 4, 3: 4, 4: 4, 4: 3, en el caso de emplear coloides $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ hidrofílicos o, 1: 1, 1: 4, 2: 4, 3: 4, en caso de emplear coloides $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ funcionalizados con ácido oleico. La valoración de las condiciones óptimas de formulación se basó en comparar: tamaño medio de partícula (nm), ζ (mV) y rendimiento de la síntesis (R, %). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado ($n = 3$).

3.2.5. *Nanopartículas (maghemita/poli(D,L-lactida-co-glicolida))/quitosano ((core/shell)/shell): Funcionalización con quitosano.*

Los nanocompuestos $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$ (*(core/shell)/shell*) se sintetizaron siguiendo el método de coacervación [Arias J.L. y cols., 2010b; Arias J.L. y cols., 2011a; Unciti-Broceta J.D. y cols., 2015], siguiendo los mismos pasos descritos en el apartado 3.2.3. “Nanopartículas poliméricas de quitosano” de este mismo capítulo para la síntesis de NPs poliméricas puras. En este caso, una vez disuelto el QS en la fase acuosa y previa agregación de la solución de Na_2SO_4 , 14 mg de NPs $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ se incorporaron homogéneamente en esta fase bajo agitación

mecánica (700 rpm). Tras ese momento, se agregaron, gota a gota, los 6.25 mL de la solución de Na_2SO_4 al 20% (p/v) (1.25 mL/min) bajo las mismas condiciones de sonicación anteriormente indicadas (apartado 3.2.3. “Nanopartículas poliméricas de quitosano” de este mismo capítulo). Finalmente, la dispersión acuosa obtenida de nanocompuestos ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$)/QS se sometieron a un proceso de limpieza mediante varios ciclos de separación magnética (imán de 0.4 T) y re-dispersión en agua bidestilada hasta que la conductividad del sobrenadante fue $\leq 10 \mu\text{S} / \text{cm}$. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado ($n = 3$).

CAPÍTULO 4

Caracterización física, química y
fisicoquímica

4.1. Optimización del método de formulación de nanosistemas: tamaño de partícula, carga eléctrica superficial y rendimiento

La caracterización fisicoquímica de los nanosistemas (tamaño de partícula (nm), carga eléctrica superficial (ζ ; mV) y el valor del rendimiento (R, %) de la síntesis de nanosistemas tiene como objetivo inicial, identificar la relación de masa:masa (γ -Fe₂O₃ : polímero) óptima capaz de lograr el mejor recubrimiento de los núcleos magnéticos por la cubierta polimérica. Se busca un tamaño de partícula y una carga superficial adecuados, y un alto valor de R (%).

La dispersión de la luz dinámica (DLS, *Dynamic Light Scattering*), también conocida como espectroscopia de correlación de fotones (PCS, *Photon Correlation Spectroscopy*), determina el tamaño hidrodinámico de las partículas en la región submicrónica. El diámetro hidrodinámico de una partícula se determina por DLS en función de la velocidad de difusión de una esfera hipotética que se difunde a la misma velocidad que la partícula que se investiga dentro de un fluido debido al movimiento browniano [Stetefeld J. y cols., 2016] (Figura 7), y se calcula a partir del coeficiente de difusión traslacional ($D\tau$) utilizando la ecuación de Stokes-Einstein (Ec. 4) [Pusey P.N., 1972]:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D\tau} \quad (4)$$

donde:

$d(H)$ = diámetro hidrodinámico

$D\tau$ = coeficiente de difusión traslacional

k = constante de Boltzmann

T = temperatura absoluta del medio

η = viscosidad del fluido

La constante k se indica como $1,380 \times 10^{-23} \text{ kg}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-2}\cdot\text{K}^{-1}$ [Stetefeld J. y cols., 2016]. El coeficiente $D\tau$ está relacionado con el tamaño hidrodinámico de las moléculas y se puede obtener analizando las fluctuaciones de intensidad de la luz dispersada a causa del movimiento browniano de las partículas en solución [Stetefeld J. y cols., 2016]. Su valor no solo depende del tamaño del núcleo de la partícula, sino también de cualquier otra estructura superficial, así como de la concentración y tipo de iones en el medio [Stetefeld J. y cols., 2016].

El sistema Zetasizer Nano-ZS brinda la capacidad de medir, entre otras características, el tamaño hidrodinámico por DLS y el índice de polidispersión (PDI). Concretamente, mide primero el movimiento browniano de las partículas en una muestra para luego relacionarlo con el tamaño empleando teorías establecidas. El movimiento browniano se puede definir como el movimiento

aleatorio de las partículas en un medio líquido debido al bombardeo de las moléculas de líquido que rodean las partículas. Brevemente, el Zetasizer Nano-ZS emite un haz de luz (láser) que incide sobre una partícula pequeña dispersando la luz en todas las direcciones. La velocidad a la que fluctúa la intensidad de la luz dispersada es analizada y depende del tamaño de partícula. Las partículas más pequeñas se mueven o difunden más rápidamente que las partículas más grandes y por ello también hacen que la intensidad de la luz fluctúe más rápidamente (Figura 7). Como las partículas están en constante movimiento, determinando cuanto se mueven en un corto intervalo de tiempo se puede calcular su tamaño hidrodinámico (relación velocidad de difusión - tamaño). La relación entre el tamaño hidrodinámico de una partícula y su velocidad de difusión debido al movimiento browniano se define en la ecuación de Stokes-Einstein, anteriormente definida.

El tamaño hidrodinámico puede indicarse de varias formas, pero la más importante y estable dada por la técnica de DLS es el diámetro promedio o “Z-Average” y consiste en un tamaño medio armónico ponderado por intensidad de la señal de la luz dispersada dada por el Zetasizer Nano-ZS. El PDI es una medida adimensional que refleja la anchura de la distribución de tamaño de partícula con respecto al valor medio, y puede variar entre 0 y 1. Un PDI cercano a 0 ($< 0,1$) indica que la muestra de partículas es monodispersa mientras que un PDI en torno a 1 se corresponde con una alta polidispersión. Las definiciones y cálculos de estos parámetros están definidos en el documento estándar ISO 22412:2017 [International Organization for Standardization, 2017]. Esta norma ISO 22412:2017 es la encargada de especificar la aplicación de la técnica de DLS a la determinación del tamaño hidrodinámico promedio de partícula y distribución de tamaño de partículas dispersas en líquidos, principalmente de tamaño submicrométrico.

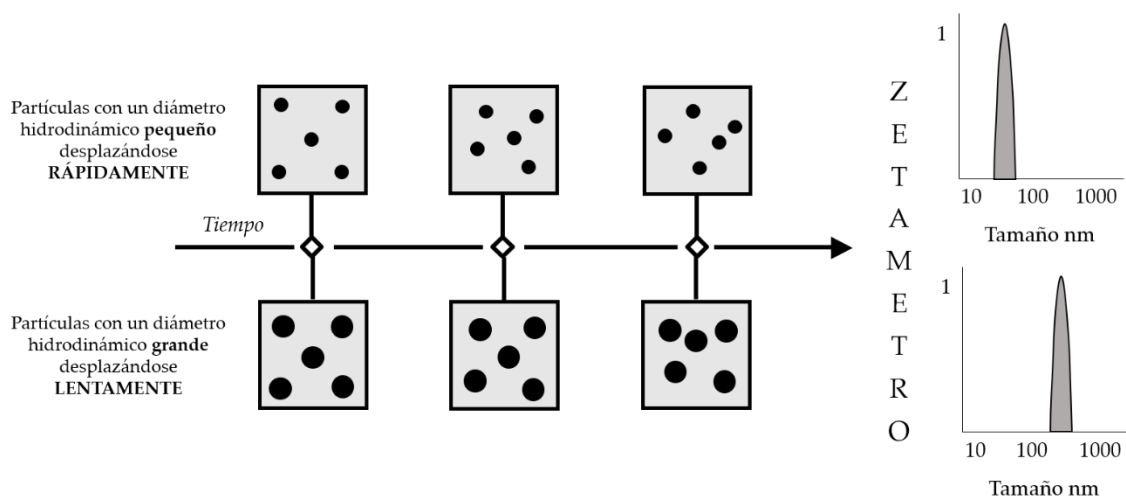


Figura 7. Representación de como el diámetro hidrodinámico de una partícula, medido por DLS (Zetametro), influye en la velocidad de difusión de esta.

La dispersión de luz es una excelente técnica para detectar agregados debido a su sensibilidad a partículas más grandes

La carga eléctrica neta presente en la superficie de una partícula afecta a la interfase entre esta partícula y la región líquida circundante. Concretamente, la concentración de contraiones, esto es iones de carga opuesta a la de la superficie de la partícula, aumenta cerca de la superficie de la partícula cuando esta se suspende en un líquido. El medio de la interfase se puede dividir en dos regiones: una más interna, o próxima a la superficie de la partícula, denominada *capa de Stern* y otra más externa y difusa (Figura 8). La *capa de Stern* contiene iones fuertemente unidos a la superficie de la partícula mientras que en la segunda capa los iones están débilmente unidos. De esta forma se puede entender que existe una doble capa eléctrica alrededor de cada partícula. La capa difusa se subdivide en otras dos regiones separadas por un límite teórico denominado plano de deslizamiento (en inglés, *Slipping plane*). Dentro de este límite los iones y la partícula forman una entidad tan estable que cuando la partícula se desplaza en el líquido estos iones se mueven con ella. Por el contrario, cualquier ion fuera del límite teórico permanecen en la posición inicial. Finalmente, el potencial que existe en este límite o plano de deslizamiento se conoce como potencial zeta (ζ ; mV) [Hunter R.J., 2001].

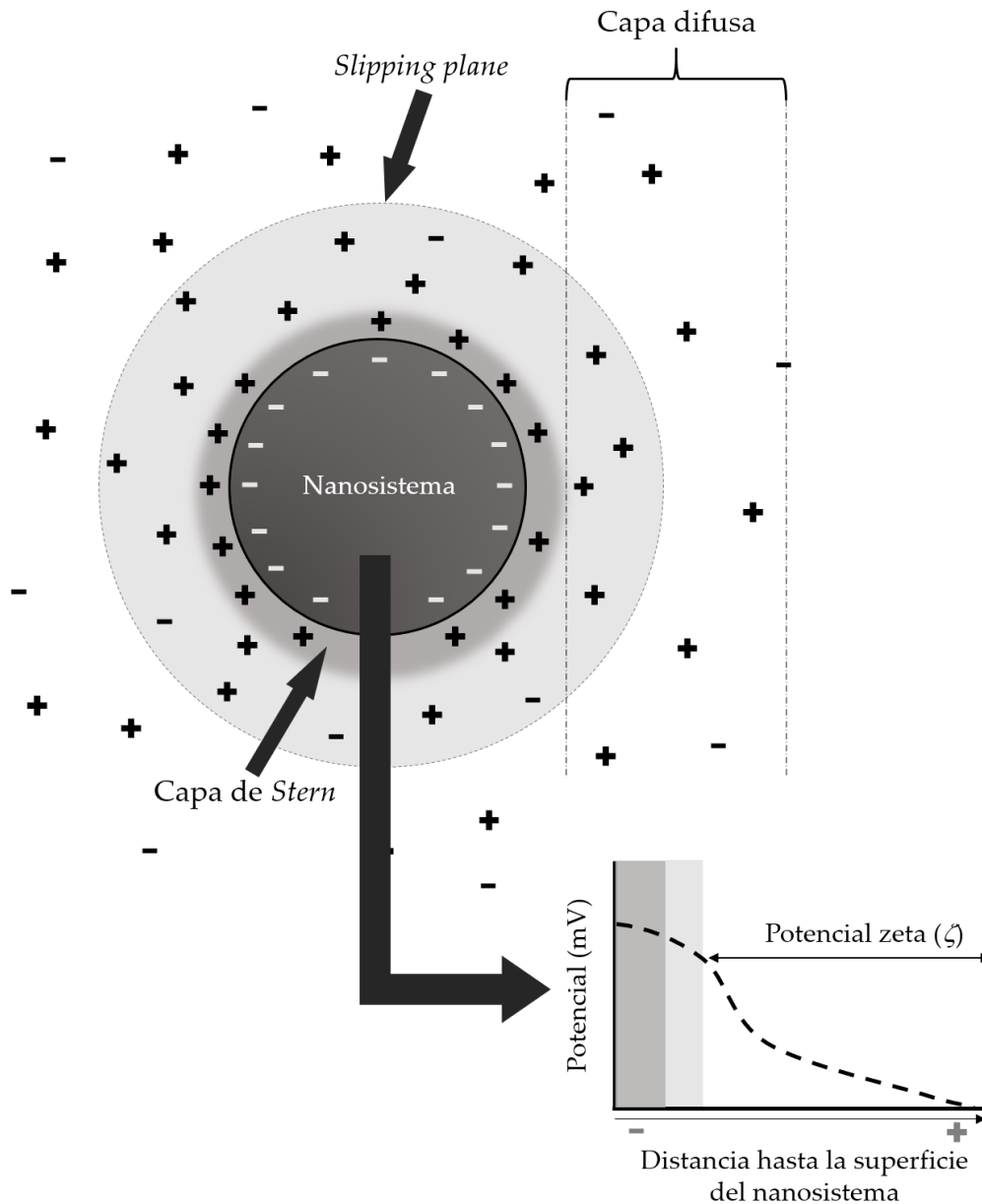


Figura 8. Representación de la doble capa eléctrica y determinación del potencial zeta (ζ). Reproducido de [Hunter R.J., 2001].

El ζ está relacionado con la estabilidad de un sistema coloidal (partículas dispersas en un líquido), y determina si las partículas tienden o no a la floculación, es decir, a agregar [López-León T. y cols., 2004]. Si estas partículas tienen un ζ neto alto, indistintamente de si es positivo o negativo, estas tienen a repelerse entre sí y la floculación no estará favorecida. Por el contrario, si el valor del ζ neto es bajo no se generan fuerzas de repulsión que eviten la tendencia a la floculación, por tanto, estas acabarán atrayéndose entre sí. Como se expondrá más adelante en esta memoria de tesis doctoral, uno de los factores más importantes que afectan al ζ es el pH del

medio. Un valor de $\zeta = 0$ se asocia al punto isoeléctrico o pH isoeléctrico (pHiep), punto de pH dentro de una curva ζ - pH donde el sistema coloidal es menos estable.

Al igual que el diámetro hidrodinámico, el ζ es un parámetro que se puede determinar por medio del sistema Zetasizer Nano-ZS. Se calcula determinando la movilidad electroforética seguido de la aplicación de la ecuación de Henry. La movilidad electroforética es la velocidad de una partícula en el medio de suspensión bajo la influencia de un campo eléctrico (se explica más adelante en este mismo capítulo), y se obtiene mediante una combinación de técnicas: electroforesis y técnica láser Doppler (LDV, *Laser Doppler Velocimetry*) [Delgado A.V. y cols., 2007]. La finalidad de ambas técnicas es medir la velocidad de las partículas en un líquido cuando son expuestas a un campo eléctrico [Delgado A.V. y cols., 2007]. La aplicación de estas técnicas se basa en que la existencia de cargas eléctricas en la superficie de las partículas hace que estas presenten cierto comportamiento bajo la influencia de campos eléctricos, este comportamiento se denomina efecto electrocinético. La electroforesis se clasifica dentro de este efecto electrocinético, y se basa en el movimiento de la partícula suspendida en un medio líquido [Hunter R.J., 2001].

La técnica de electroforesis supone aplicar un campo eléctrico a una suspensión de partículas en cuyo medio está presente un electrolito. Las partículas cargadas son atraídas hacia el electrodo de carga opuesta: partículas cargadas positivamente se desplazan hacia el cátodo (electrodo negativo) y las partículas cargadas negativamente se mueven hacia el ánodo (electrodo positivo). La velocidad del movimiento de las partículas hacia los distintos electrodos depende de una serie de factores entre los que destacan la fuerza del campo eléctrico, la constante dieléctrica del medio, la viscosidad del medio y el ζ . La viscosidad el medio es inversamente proporcional al movimiento, es decir las fuerzas del medio que actúan sobre las partículas tienen a oponerse al movimiento, pero cuando se alcanza un equilibrio las partículas se desplazan con una velocidad constante. La velocidad de una partícula en el medio de suspensión bajo la influencia de un campo eléctrico se denomina movilidad electroforética (μ_E ; $\mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{V}\cdot\text{s}$). Se calcula siguiendo esta ecuación (Ec.5) [Bikerman J.J., 1940]:

$$\mu_E = \frac{V}{E} \quad (5)$$

donde:

μ_E = Movilidad electroforética

V = Velocidad de la partícula

E = Fuerza del campo eléctrico

Conociendo los valores de movilidad electroforética podemos obtener el ζ de la partícula aplicando la ecuación de Henry (Ec.6) [Henry D.C., 1931; Lyklema J., 1995; Delgado A.V. y cols., 2007]:

$$\mu_E = \frac{2\varepsilon_r\varepsilon_0}{3\eta} \times \zeta f(K\alpha) \quad (6)$$

donde:

μ_E = Movilidad electroforética

ζ = Potencial zeta

ε_r = relación permitividad eléctrica relativa/ constante dieléctrica del medio

ε_0 = permitividad eléctrica de vacío

η = viscosidad del medio

$f(K\alpha)$ = Función Henry

Generalmente se utilizan dos valores como aproximaciones para la determinación de $f(K\alpha)$, 1,5 o 1,0, según el tamaño de las partículas [Delgado A.V. y cols., 2007]. La determinación electroforética del ζ de partículas de un tamaño mayor a 200 nm se realiza en medios acuosos y con una concentración de electrolito elevada ($> 10^{-3}$ M). En este caso $f(K\alpha) = 1,5$ y la ecuación de Henry pasa a denominarse aproximación de Smoluchowski [Von Smoluchowski M, 1918]. Por el contrario, para partículas más pequeñas dispersas en medios acuosos con una concentración moderada de electrolito el valor de $f(K\alpha)$ tornará a 1,0. Se le conoce como aproximación de Hückel [Hückel E., 1924]. Las mediciones en disoluciones no acuosas también usan esta aproximación.

Finalmente, la técnica utilizada para medir la velocidad de las partículas a través de un fluido en el experimento de electroforesis es la LDV [Malher E. y cols., 1982]. El haz de luz (láser) incide sobre la óptica para luego dispersarse en un ángulo de 17° . La luz dispersada se combina con el haz de referencia (parte del haz incidente) produciendo una señal de intensidad fluctuante. La tasa de fluctuación de esta señal es proporcional a la velocidad de las partículas en el medio [Malher E. y cols., 1982]. Esta relación viene marcada de la siguiente manera (Ec. 7):

$$\delta v = \frac{v_0 \times v}{c} \times (\cos \phi - \cos \theta) \quad (7)$$

donde δv representa este cambio de fluctuación, v_0 es la frecuencia del haz de luz incidente, v es la velocidad de la partícula, ϕ y θ son los ángulos definidos en la Figura 9.

Una vez determinada la movilidad electroforética se aplican la ecuación de Henry teniendo en cuenta las aproximaciones anteriormente citadas para obtener el ζ [Delgado A.V. y cols., 2007].

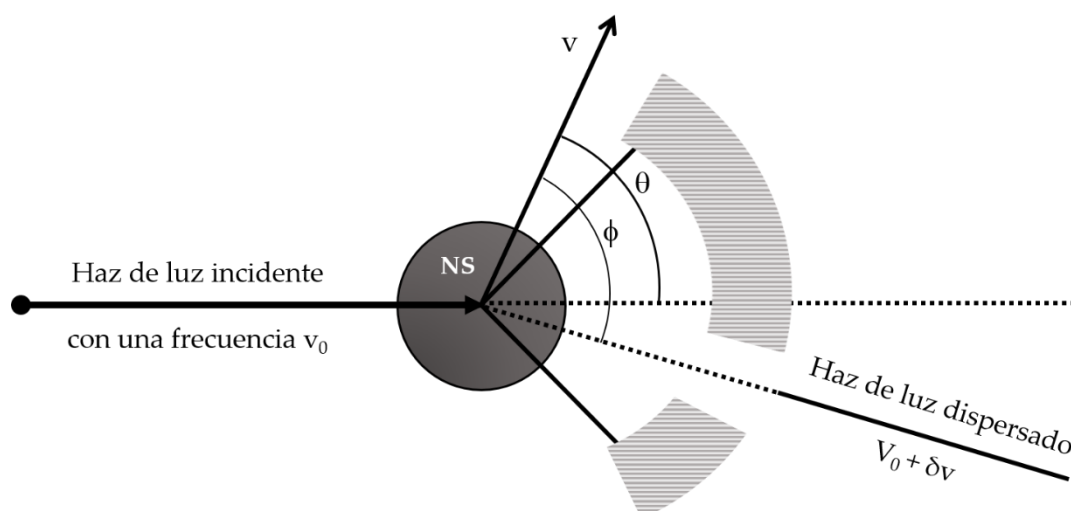


Figura 9. Representación de electroforesis y efecto Doppler sobre la luz dispersada por un nanosistema (NS) en movimiento. Reproducido de [Malher E. y cols., 1982].

El rendimiento (%) de una síntesis de NPs es el siguiente factor a tener en cuenta, junto con el tamaño de partícula (nm) y carga eléctrica superficial (ζ ; mV), a la hora de decantarse por unas condiciones u otras de formulación de nanosistemas. Estudiando el valor de R (%) se puede identificar la relación masa:masa (γ -Fe₂O₃ : polímero) que genere una cantidad adecuada de NPs.

4.1.1. Metodología

4.1.1.1. Tamaño

El tamaño medio (media \pm desviación estándar, DE) y el PDI (media \pm DE) de las NPs en dispersiones acuosas al 0.1% (p/v) se caracterizaron mediante DLS (Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido). Las mediciones se realizaron previa sonicación de las muestras (frecuencia de sonicación: 42 kHz, potencia de salida: 100 W; baño ultrasónico Bransonic®, Branson Ultrasonics Corporation, EE. UU.), a temperatura ambiente, pH \approx 6, empleando un ángulo de detección de 60° y por triplicado.

4.1.1.2. Carga eléctrica superficial

El ζ (mV) de dispersiones acuosas de NPs (0.1%, p/v) se analizó mediante determinaciones electrocinéticas empleando la electroforesis (Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido). Al igual que para la determinación del tamaño, las medidas de ζ se realizaron previa sonicación de las muestras (frecuencia de sonicación: 42 kHz, potencia de

salida: 100 W; baño ultrasónico Branson[®], Branson Ultrasonics Corporation, EE. UU.), a temperatura ambiente y por triplicado.

4.1.1.3. Rendimiento (%)

Todos los experimentos de síntesis de NPs se llevaron a cabo por triplicado ($n = 3$), y el rendimiento de producción de estas NPs (R , %) se determinó utilizando la siguiente ecuación (Ec. 8):

$$R (\%) = \left(\frac{\text{cantidad de NPs obtenidas (mg)}}{\text{cantidad de material total (mg) empleado en la síntesis de NPs}} \right) \times 100 \quad (8)$$

4.1.2. Resultados y discusión

Para poder analizar los resultados adecuadamente, se determinaron los valores de tamaño de partícula (nm) y ζ (mV) a pH natural (≈ 6) de partículas de γ -Fe₂O₃ y de PLGA. El tamaño medio (\pm DE) de los núcleos de γ -Fe₂O₃ y de las NP de PLGA puras fue de 172 ± 5 nm (9.1 ± 3.2 nm TEM) y 260 ± 10 nm, respectivamente (DLS). Los valores de ζ (mV) a pH natural (≈ 6) de los núcleos de γ -Fe₂O₃ y de las NP de PLGA puras fue de 29.5 ± 0.47 mV, para los núcleos no funcionalizados, de 8.9 ± 0.55 mV para los sí funcionalizados, y de -5.01 ± 1.02 mV para las partículas puras de PLGA (electroforesis).

Concretamente, se investigó la influencia de la relación masa:masa (γ -Fe₂O₃ no funcionalizada: PLGA) y (γ -Fe₂O₃ funcionalizada: PLGA) sobre el tamaño de partícula (nm), distribución de tamaño (Pdl) y ζ (mV) a pH natural (≈ 6) y R (%) (Tabla 3).

Tabla 3. Influencia de la relación masa:masa (γ -Fe₂O₃ funcionalizados y sin funcionalizar: PLGA) sobre las características de las NPs de γ -Fe₂O₃/PLGA cuyos núcleos no han sido funcionalizados con ácido oleico (γ -Fe₂O₃ sin funcionalizar/PLGA NPs) y de las NPs de γ -Fe₂O₃/PLGA cuyos núcleos sí han sido funcionalizados con ácido oleico (γ -Fe₂O₃ funcionalizados/PLGA NPs). Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar (DE) de los resultados obtenidos por triplicado.

Relación masa:masa	Tamaño (nm)	PdI	ζ (mV)	R (%)
γ-Fe₂O₃ sin funcionalizar/PLGA NPs				
2:4	281.5 \pm 13.05	0.469 \pm 0.068	-17.0 \pm 0.92	14.06
3:4	436.1 \pm 1.16	0.383 \pm 0.005	-18.8 \pm 0.71	10.97
4:4	461.2 \pm 14.42	0.486 \pm 0.008	-12.2 \pm 1.23	63.81
4:3	646.8 \pm 13.58	0.585 \pm 0.030	17.2 \pm 0.73	10.29
γ-Fe₂O₃ funcionalizados/PLGA NPs				
2:4	377.5 \pm 14.95	0.235 \pm 0.008	-12.7 \pm 0.17	74.53
3:4	270.7 \pm 3.51	0.165 \pm 0.020	-10.5 \pm 0.06	63.76
4:4	263.9 \pm 2.37	0.125 \pm 0.004	-11.9 \pm 0.15	48.67

Emplear una relación masa:masa 2: 4 (γ -Fe₂O₃ sin funcionalizar: PLGA) se vio que favorecía la obtención de NPs γ -Fe₂O₃ sin funcionalizar/PLGA con las mejores características fisicoquímicas, es decir, tamaño y ζ con valores similares a los valores de tamaño y ζ de las NPs de referencia (NPs puras de PLGA). Cabe señalar que, aunque el R (%) para una relación masa:masa 4:4 (γ -Fe₂O₃ sin funcionalizar: PLGA) es uno de los más elevados, el tamaño medio de partícula es bastante alto. En consecuencia, la relación masa:masa 4:4 (γ -Fe₂O₃ sin funcionalizar: PLGA) se señaló como contraindicada para la formulación de NPs de γ -Fe₂O₃ sin funcionalizar/PLGA. Curiosamente, en el caso de las NPs γ -Fe₂O₃ funcionalizados/PLGA, utilizar una relación masa:masa 3:4 (γ -Fe₂O₃ funcionalizados: PLGA) favoreció la producción de NPs con las mejores características fisicoquímicas: menor tamaño y PdI, buenos valores de ζ y un R (%) adecuado. De nuevo, los valores de tamaño y ζ de estas NPs fueron similares a los valores de tamaño y ζ de las NPs de referencia (NPs puras de PLGA).

De acuerdo con estos resultados, se pudo concluir que las condiciones de formulación que proporcionaron mejores características en cuanto a tamaño y propiedades eléctricas superficiales de NPs fueron la funcionalización de los núcleos magnéticos de γ -Fe₂O₃ y el empleo de una relación masa:masa de 3: 4 (γ -Fe₂O₃ funcionalizados: PLGA). Por un lado, la relación de masas favoreció la formulación de NPs γ -Fe₂O₃/PLGA con tamaños más pequeños y con adecuados

valores de ζ , γ , por otro lado, la funcionalización con ácido oleico de los núcleos magnéticos mejoró el R (%). Este incremento en los valores de R (%) se debió a que el proceso de funcionalización con ácido oleico de los núcleos $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ convirtió la superficie hidrófila de estos en una de naturaleza hidrófoba. Núcleos de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ hidrófobos facilitaron la incorporación de estos en la matriz hidrófoba de PLGA [Ibarra J. y cols., 2015]. La naturaleza hidrófoba del polímero PLGA limita la incorporación en su matriz de elementos hidrófilos como lo son los núcleos $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ sin funcionalizar [Okassa L.N. y cols., 2007]. En resumen, el recubrimiento con ácido oleico de los núcleos de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ mejora la afinidad de estos por la matriz de PLGA, fenómeno que podría explicarse por la existencia de interacciones de naturaleza hidrófoba entre estos dos materiales [Okassa L.N. y cols., 2007].

Finalmente, se comprobó que la funcionalización de las NPs $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PLGA con QS no aumentaba el tamaño final de los nanosistemas, siendo el tamaño de las partículas ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PLGA)/QS (relación masa:masa 4:3 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PLGA: CS) de 325.8 ± 8.5 nm (DLS), similar al de las partículas de referencia (NPs de QS puras; 353.4 ± 20.6 nm; DLS) y adecuado para la vía de administración parenteral. Estos diámetros podrían favorecer la acumulación de NPs en el sitio diana, concretamente en las zonas tumorales (espacios de hasta 600 nm entre las células endoteliales de la vasculatura) [Gaumet M. y cols., 2008; Reddy L.H. y cols., 2012]. Algunos estudios han informado que partículas de hasta 400 nm pueden extravasarse en el tejido tumoral, aprovechando el efecto EPR [Yuan F. y cols., 1995; Wang J. y cols., 2010; Schädlich A. y cols., 2011]. Por ejemplo, se ha descrito que partículas cargadas con CDDP con tamaños de entre 300 y 500 nm alcanzan la región tumoral e inhiben el crecimiento de estas células tras su administración intravenosa [Kim J.-H y cols., 2008; Moreno D. y cols., 2010]. La formulación de estas NPs ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PLGA)/QS reportó valores de R (%) ≈ 50 % y valores de ζ similares a los de referencia (23.3 ± 0.4 mV para partículas ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PLGA)/QS, y 23.5 ± 5.01 mV para las NPs de QS puras). El recubrimiento con QS sobre las partículas $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PLGA otorga a esta estructura una carga eléctrica superficial positiva y la propiedad *stealth*, cualidades que minimizan la eliminación prematura de las NPs ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PLGA)/QS de la circulación sistémica [Sarmiento B. y cols., 2011; Ishak R.A. y cols., 2013; Abouelmagd S.A. y cols., 2015; Chirio D. y cols., 2018] favoreciendo una semivida plasmática de eliminación apropiada para alcanzar la región diana y proporcionar concentraciones clínicamente relevantes del agente terapéutico vehiculizado en las NPs. Además, estos valores positivos de ζ pueden facilitar la internalización de las NPs (cargadas positivamente) por células cancerosas cuyas membranas se encuentran cargadas negativamente (interacciones electrostáticas). De esta forma se asegura una mayor interacción entre el agente

terapéutico y las dianas intracelulares [He C. y cols., 2010; Tahara K. y cols., 2010; Yue Z.G. y cols., 2011; Ishak R.A. y cols., 2013; Liu X. y cols., 2013; Voon S.H. y cols., 2016; Babu A. y cols., 2017].

4.2. Estudio de la evolución de las propiedades eléctricas superficiales

En base a lo comentado en el apartado 4.1. “Optimización del método de formulación de nanosistemas: tamaño de partícula, carga eléctrica superficial y rendimiento” de este mismo capítulo sobre la doble capa eléctrica y ζ , se puede afirmar que el ζ de las NPs puede variar en función de dos condiciones del medio de dispersión: la fuerza iónica, es decir, los electrolitos del medio, y el pH por la influencia de las fuerzas electrostáticas [Davis B.D. y Cohn E.J., 1939]. La variación en el pH del medio regula la presencia de grupos químicos ionizables (ácidos y básicos) en la superficie de las partículas, lo cual repercute en el valor del ζ de esas partículas [Mehrishi J.N. y Thomson A.E., 1968]. Por ejemplo, una partícula con ζ positivo en presencia de una concentración cada vez más elevada de un ácido (H^+), tiende a adquirir una carga aún más positiva; mientras que si se agrega a esta suspensión una base (OH^-), la carga positiva o ζ positivo de la partícula se neutralizará o se invertirá a valores negativos. De esta misma manera afecta a la movilidad electroforética la concentración de electrolitos en el medio.

4.2.1. Metodología

El ζ (mV) de dispersiones acuosas de NPs (0.1%, p/v) se analizó mediante determinaciones electrocinéticas empleando la electroforesis (Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido). Las medidas se realizaron a temperatura ambiente y por triplicado.

La electroforesis es una técnica muy sensible a pequeñas modificaciones en la superficie de las partículas [Plaza R.C. y cols., 2002; Reddy L.H. y cols., 2012]. Por esta razón, se empleó esta técnica para caracterizar la evolución de los valores de ζ de las NPs en función de dos condiciones del medio de dispersión: la fuerza iónica, fijada con el electrolito KNO_3 [Arias J.L. y cols., 2001; Arias J.L. y cols., 2006; García-García G. y cols., 2020], y del pH. Concretamente se estudiaron los valores de ζ de las NPs en dispersiones (0.1% (p/v)) con distinta fuerza iónica (a un pH 6 constante), y, por otro lado, a distintos pHs (valores de 3 a 9), en presencia de una concentración constante de KNO_3 , 10^{-3} M. Las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente ($n = 9$) y después de 24 h de contacto bajo agitación mecánica (200 rpm, agitador orbital universal Boeco OS-10, Boeco, Hamburgo, Alemania).

Esta técnica de electroforesis tiene como fin último, evaluar cualitativamente la cubierta polimérica sobre los núcleos de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ y el recubrimiento de QS sobre las partículas $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$.

Dadas las diferentes propiedades electrocinéticas de los coloides $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, de las partículas basadas en PLGA [Pérez-Artacho B. y cols., 2012] y las partículas basadas en QS, el método de electroforesis fue el elegido [Arias J.L. y cols., 2012] para confirmar cualitativamente la eficacia de recubrimiento de PLGA y de CS alrededor de las partículas $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ y $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$, respectivamente. Además, este estudio tiene otro objetivo, determinar si las NPs son sensibles a las condiciones del medio y cómo éstas les afecta.

4.2.2. Resultados y discusión

El estudio se centró primero en el efecto del pH del medio sobre la carga eléctrica superficial (valores ζ , mV) de las partículas en presencia de KNO_3 10^{-3} M (Figura 10a). Los distintos tipos de nanosistemas exhiben valores netos de ζ positivos o negativos según el rango de pH del medio. Los núcleos de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ presentaron un ζ neto positivo a pH ácidos y finalmente mostraron un pHiep a un $\text{pH} \approx 7$. El comportamiento de las partículas de PLGA fue bastante diferente, estos tienen un ζ neto negativo para todo el rango de pH con la excepción de los $\text{pH} < 3.6$ ($\text{pHiep} \approx 3.6$). Las partículas de QS se caracterizaron por valores ζ positivos para todo el rango de pH.

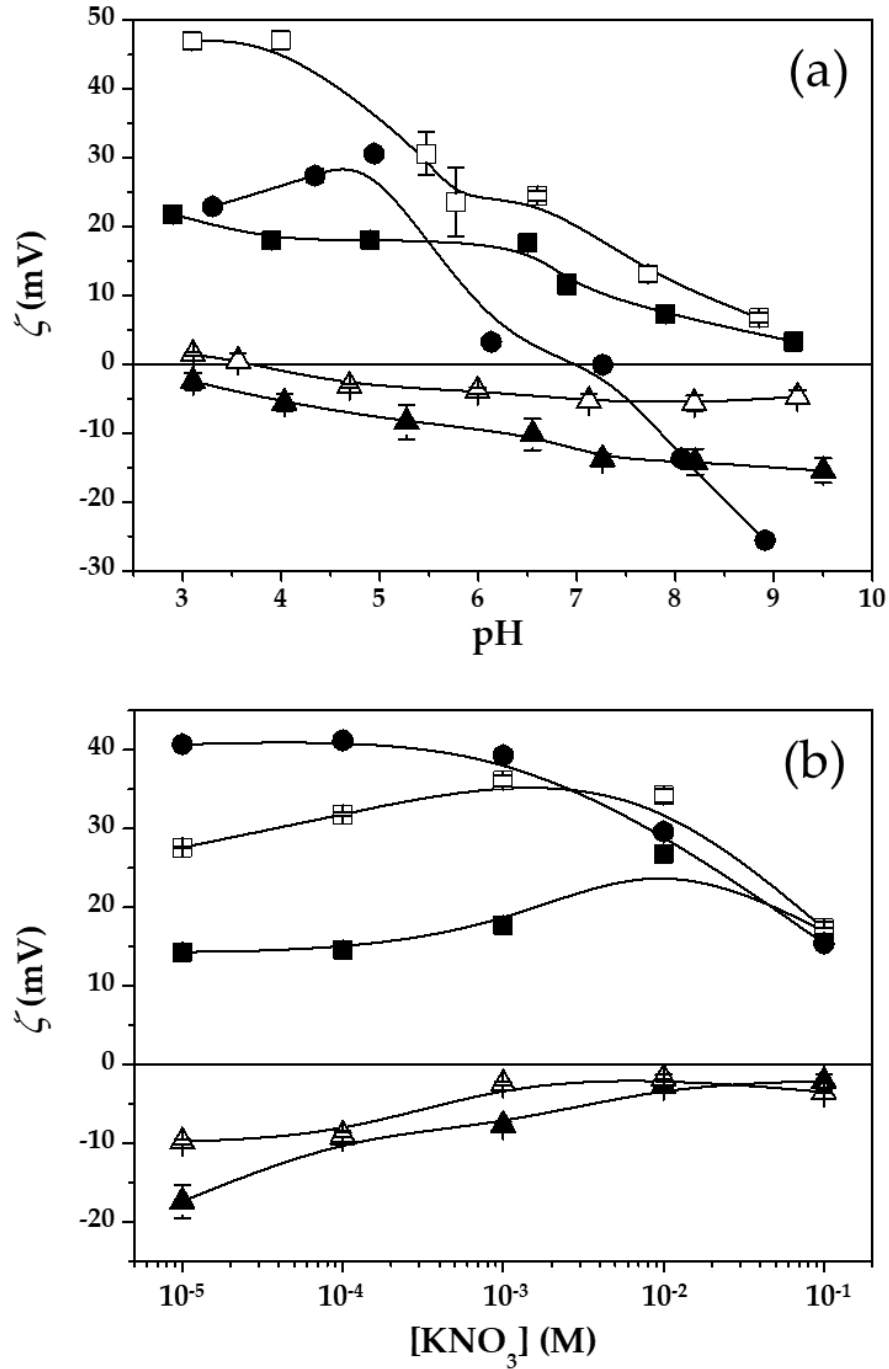


Figura 10. (a) Potencial zeta (ζ , mV) de las partículas de (●) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, (△) PLGA, (□) QS, (▲) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ y (■) $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$ en función del pH y en presencia de una concentración molar constante de KNO_3 (10^{-3} M). (b) Potencial zeta (ζ , mV) de las partículas de (●) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, (△) PLGA, (□) QS, (▲) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ y (■) $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$ en función de la concentración molar de KNO_3 , a un pH constante (pH \approx 6). Todos los datos se presentan como valor medio \pm DE (n = 9). Las líneas son una guía para el ojo.

En consecuencia, se observó un patrón similar en el perfil de NPs magnetopoliméricas (exhiben valores de carga superficial intermedios): es la carga negativa la que permanece en todo

el rango y solo a $\text{pH} \approx 4.96$ podría hipotetizarse un pH_{iep} . La Figura 10a demostró que la tendencia de ζ -pH de las NPs $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ y las NPs $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$ estaba dominada por la cubierta de PLGA y el recubrimiento con QS, respectivamente.

La carga superficial negativa (valores ζ negativos) de las partículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ puede provenir de grupos ácidos débilmente ionizados, probablemente grupos terminales carboxílicos [Holgado M.A. y cols., 2009; Pérez-Artacho B. y cols., 2012]. La disminución en los valores absolutos de ζ a medida que el pH se vuelve más ácido se asoció a la neutralización de las cargas superficiales negativas del polímero por adsorción de cantidades crecientes de H^+ . Por el contrario, valores de ζ cada vez más negativos pueden provenir del aumento de iones OH^- en el medio de dispersión, lo que podría tender a favorecer una ganancia de H^+ .

Por el contrario, las partículas de $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$ se caracterizaron por valores ζ positivos para todo el rango de pH. Los grupos amino residuales de QS podrían ser responsables de esta carga eléctrica positiva en la interfaz polímero-solución [Arias J.L. y cols., 2012; Di Corato R. y cols., 2018], a pesar del uso de SO_4^{2-} como precipitante e independientemente de los grupos negativos del tensoactivo Kolliphor® P-188 que podrían persistir en la superficie de partículas incluso después de la limpieza. El aumento en los valores absolutos de ζ a medida que el pH se vuelve más ácido se asoció al aumento de iones H^+ . Por el contrario, la disminución en los valores absolutos de ζ a medida que el pH se vuelve más básico puede provenir del aumento de iones OH^- en el medio de dispersión, los cuales neutralizan las cargas superficiales positivas del polímero.

Por otro lado, se determinó la carga eléctrica superficial (valores ζ , mV) de las distintas partículas a fuerzas iónicas predeterminadas (concentraciones molares de KNO_3) y a un pH fijo de 6, es decir, al pH “natural” de la muestra (Figura 10b). De nuevo, las similitudes entre los valores ζ de las partículas QS y $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$, y diferencias entre los valores de las NP de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ y $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$ se confirman bajo la influencia de la fuerza iónica (Figura 10b). Al igual que se ve en la Figura 10a, los valores de ζ de las partículas de PLGA y $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ para todo el rango indicado de concentración molar de KNO_3 son negativos (grupos carboxílicos de PLGA [Holgado M.A. y cols., 2011; Pérez-Artacho B. y cols., 2012]), mientras que los valores de ζ de las partículas de QS y $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$ para todo el rango indicado de concentración molar de KNO_3 son positivos (grupos amino residuales del QS [Arias J.L. y cols., 2011a; Arias J.L. y cols., 2010a]).

Por último, la disminución de los valores absolutos de ζ descritos por las NP bajo la influencia de altas concentraciones de KNO_3 (fuerzas iónicas elevadas) podría ser consecuencia

del mecanismo clásico de compresión de la doble capa eléctrica [Lyklema J., 2002; Arias J.L. y cols., 2010b]. De igual manera que en el caso de la Figura 10a, al observar la Figura 10b se puede ver cómo la tendencia de los valores de ζ frente a los valores de fuerza iónica de las partículas γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/ PLGA)/QS estaba dominada por la cubierta de PLGA y el recubrimiento con QS, respectivamente.

Por tanto, la Figura 10a y 10b, demostraron que el recubrimiento de las partículas (γ -Fe₂O₃/PLGA) por QS fue eficaz, lo que llevó a la obtención de una nanoestructura (*core/shell*)/*shell* consecuencia probablemente de la existencia de interacciones atractivas entre las partículas γ -Fe₂O₃/PLGA con carga negativa y el QS con carga positiva [Chronopoulou L. y cols., 2013; Li W. y cols., 2017]. Desde un punto de vista electrocinético, el nanosistema (γ -Fe₂O₃/ PLGA)/QS es cualitativamente similar a las partículas de QS.

4.3. Técnicas microscópicas

Las técnicas microscópicas de caracterización de la materia se adentran donde las técnicas de visualización ópticas tradicionales no pueden penetrar. La resolución de las técnicas de visualización ópticas está limitada por la longitud de onda de la luz, del haz de fotones, visible (400 – 800 nm). Sin embargo, las técnicas de microscopía electrónica emplean electrones altamente acelerados y el haz tiene una longitud de onda de varios ordenes de magnitud menor [Sorrivas de Lozano V. y cols., 2014]. Esto se basa en el principio de Huygens, el cual expone que, si el objeto observado es menor que el valor de la longitud de onda de la luz empleada para su visualización, ésta difractará alrededor del objeto. Por tanto, se necesita una radiación con una longitud de onda de menos de 400 nm para visualizar partículas nanométricas [Williams D.B. y Carter C.B., 2009]. Las partículas, como por ejemplo los electrones, se pueden comportar también como ondas según la física cuántica (dualidad onda partícula). La longitud de onda asociada a los electrones viene indicada según la relación de Broglie, y se relaciona con el momento lineal del electrón a partir de la constante de Plank. Por tanto, su longitud de onda estará controlada por la diferencia de potencial con la que se aceleran [De Broglie L., 1925]. Al ser los electrones partículas cargadas siguen la ley de Lorentz, por lo que es posible deflektarlos con campos electromagnéticos, o lo que es lo mismo, construir lentes y, por ende, microscopios [Kittel C., 2004; Petford-Long A.K. y Chapman J.M., 2005; Williams D.B. y Carter C.B., 2009].

El uso de microscopios electrónicos de barrido y de transmisión, de microscopios de fuerzas atómicas, microscopios ópticos avanzados y todas sus técnicas asociadas permiten la exploración del mundo nanométrico. Las que se desarrollarán en este capítulo son las siguientes: la

microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM; *High-resolution Transmission electron microscopy*), la microscopía electrónica de barrido-transmisión de campo oscuro anular de alto ángulo (HAADF-STEM; *High Angle Annular Dark Field Scanning transmission electron microscopy*), la microscopía electrónica de barrido-transmisión de campo claro anular (ABF-STEM; *Annular Bright Field Scanning transmission electron microscopy*) y la espectroscopia de dispersión de energía de rayos X (EDX; *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*).

La imagen en un microscopio TEM se obtiene de la siguiente manera: los electrones impactan contra la muestra de interés y los electrones resultantes del impacto son recolectados para formar una imagen TEM. En función del tipo de señal detectada tras el impacto del haz se obtendrá diferente información. Si tras atravesar el haz la muestra se selecciona una parte del plano de difracción que incluye el haz de electrones directo, se obtiene una imagen llamada de campo claro, donde las zonas en las que no hay muestra se visualizan más claras. En este caso se obtienen imágenes de la morfología general de la muestra. Un caso particular de TEM son las imágenes de alta resolución (HRTEM) [Kittel C., 2004; Williams D.B. y Carter C.B., 2009].

En un SEM (*Scanning electron microscopy*), la imagen es obtenida cuando un haz de electrones altamente enfocado de alta energía (100 V a 100 kV) se escanea sobre la superficie de la muestra (barrido o escaneo de trama) [Goldstein J., 2012]. En función de la composición de la muestra y la topografía de la superficie de la muestra se genera un número determinado de electrones secundarios y/o electrones retrodispersados que emergen de la muestra tras ser irradiada [Kittel C., 2004; Goldstein J., 2012]. Por un lado, los electrones secundarios al generarse cerca de la superficie de la muestra van a informar sobre la estructura topográfica de la muestra, mientras que los electrones retrodispersados van a ofrecer información sobre la composición de la muestra puesto que se generan al chocar con los átomos que la componen [Seoane J.R. y Llobet X., 2011]. Son estos electrones los que son reconocidos por un detector de electrones para formar una imagen basada en la ubicación del haz [Kittel C., 2004]. Como resultado del empleo de electrones secundarios y retrodispersados las imágenes SEM tienen apariencia tridimensional. El microscopio SEM permite examinar y caracterizar superficies y materiales tanto orgánicos como inorgánicos heterogéneos [Goldstein J., 2012].

Al contrario que en el TEM, donde el haz de electrones debe penetrar la muestra, en el SEM se pueden examinar estructuras en sustratos sólidos, pero generalmente el SEM tiene una resolución más baja (1 nm) que la técnica TEM. La resolución final (10 nm) es muy alta, pero es un proceso lento porque los patrones deben dibujarse píxel por píxel [Kittel C., 2004].

La técnica STEM combina los principios de las técnicas TEM y SEM. Concretamente, es un TEM que utiliza bobinas electromagnéticas de barrido adicionales capaces de controlar el haz de electrones [von Ardenne (1938); Williams D.B. y Carter C.B., 2009; Sorrivas de Lozano V. y cols., 2014]. De esta forma un haz finamente enfocado se desplaza secuencialmente barriendo la superficie de la muestra y formando pixel a pixel una imagen [Egerton R.F., 2009]. A diferencia del SEM, que emplea electrones secundarios, este haz está formado por electrones que sí han atravesado la muestra. En el microscopio STEM los detectores de electrones pueden ser de dos tipos: detector de campo claro y detector de campo oscuro. El primero recoge los electrones que no se han desviado al atravesar la muestra dando una imagen similar a la obtenida con un microscopio TEM de campo claro. El detector anular recoge los electrones que sí se han dispersado, en un ángulo elevado, al atravesar la muestra [Midgley P.A. y cols., 2002]. En función del tipo de detector de electrones se habla de microscopía electrónica de barrido-transmisión de campo claro anular o ABF-STEM y microscopía electrónica de barrido-transmisión de campo oscuro anular de alto ángulo o HAADF-STEM, respectivamente. La visualización de la muestra con la técnica HAADF-STEM permite evaluar su tomografía. El contraste en una imagen ABF-STEM varía según el número atómico (Z) de los elementos que forman la estructura de la muestra: cuanto más alto sea el valor de Z mayor será el contraste [Midgley P.A. y cols., 2002].

Respecto a la técnica SEM, el STEM proporciona una mejor resolución espacial. Aunque en el caso de imágenes ABF-STEM la resolución suele ser baja en comparación con imágenes TEM, se obtiene un mayor contraste [Williams D.B. y Carter C.B., 2009]. En el caso de imágenes HAADF-STEM, estas contienen menor ruido que si se obtuvieran por TEM [Williams D.B. y Carter C.B., 2009]. Por todo esto, el uso de STEM está indicado en aquellos casos en los que la visualización de contraste sea más importante que la resolución.

Finalmente, la microscopía electrónica analítica (AEM; *Analytical Electron Microscopy*) consiste en una técnica microscópica encargada de recopilar datos espectroscópicos en el microscopio electrónico de transmisión con unos detectores determinados. Mediante la AEM se leen señales generadas tras la interacción de electrones con la muestra, las cuales se emplean para identificar, cuantificar y mapear la distribución de los elementos que constituyen una determinada área de la muestra a estudiar [Newbury D.E., 2005; Seoane J.R. y Llobet X., 2011]. Una de las principales técnicas AEM se basa en la detección de señales de rayos X, y se conoce como EDX [Williams D.B. y Carter C.B., 2009]. Una de las ventajas de la técnica STEM frente a otras técnicas convencionales es que permite el uso de señales variadas: desde electrones

secundarios y/o electrones retrodispersados hasta rayos X característicos. En STEM, la técnica EDX detecta rayos X procedentes del bombardeo con electrones de la muestra y son característicos de la composición elemental de esta [Newbury D.E., 2005; Seoane J.R. y Llobet X., 2011]. Los rayos X se cuantifican y clasifican utilizando un detector EDX o espectrómetro EDX [Williams D.B. y Carter C.B., 2009].

4.3.1. Metodología

Las técnicas HRTEM, HAADF-STEM y ABF-STEM (microscopio Titan G2 60-300 FEI, Thermofisher Scientific Inc., EE. UU.; voltaje de aceleración de 300 kV) ayudaron a visualizar las distintas nanoestructuras y a evaluar el completo recubrimiento de los núcleos por las matrices poliméricas. Brevemente, previa visualización, las dispersiones acuosas de NPs (0.1%, p/v) se vertieron gota a gota sobre rejillas de cobre con película de formvar/carbón y se secaron en un horno de convección a una temperatura de 25.0 ± 0.5 ° C (24 h; Digitronic, J.P. Selecta, S.A., España). El análisis elemental de las NPs se llevó a cabo mediante EDX. Esta técnica se realizó durante las observaciones vía TEM utilizando un espectrómetro dispersivo de energía de rayos X (Bruker Nano GmbH, Alemania).

4.3.2. Resultados y discusión

Las fotografías HRTEM, HAADF-STEM y ABF-STEM tomadas de las preparaciones de NPs γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/PLGA) /QS evidenciaron que los núcleos de óxido de hierro (γ -Fe₂O₃) estaban embebidos en las matrices poliméricas (Figuras 11a-c y 12a-c), mientras que el mapeo del elemento Fe mediante EDX sobre estas muestras de NPs demostró la distribución homogénea de los núcleos γ -Fe₂O₃ dentro de la matriz polimérica de PLGA (asignación del elemento O) y de QS (asignación del elemento N) (Figuras 11d-f y 12d-e). El elemento N únicamente se identificó en las muestras de (γ -Fe₂O₃ /PLGA) /QS (Figura 12e). Esto último demostró la presencia de QS recubriendo uniformemente la nanoestructura γ -Fe₂O₃ /PLGA. En la Figura 11g se representa el espectro EDX realizado en un punto central de la partícula γ -Fe₂O₃ /PLGA, este muestra los elementos presentes en esta nanoplateforma: Fe, O y C. La cuantificación de Fe mediante este análisis confirma de nuevo la presencia de núcleos γ -Fe₂O₃ dentro de la matriz polimérica. De igual forma, las Figuras 12f y 12g muestran los espectros EDX tomados en distintos puntos de la NP (γ -Fe₂O₃ /PLGA) /QS: el elemento Fe solo se detectó cuando el espectro EDX se tomó en la zona central de las partículas (γ -Fe₂O₃ /PLGA) /QS (Figura 12f), por el contrario, el elemento N asociado a la funcionalización con QS se pudo detectar en cualquier región de la estructura de las

partículas (Figura 12g). El elemento N únicamente se cuantificó en las muestras de (γ -Fe₂O₃/PLGA) /QS (Figura 12f y 12g). Estas observaciones EDX (mapeos elementales y espectros), combinadas con datos de la caracterización electrocinética de las partículas (ver Figura 10), confirmaron cualitativamente la formación de las nanoestructuras γ -Fe₂O₃/PLGA núcleo / matriz y (γ -Fe₂O₃/PLGA) /QS (núcleo / matriz) / recubrimiento. Finalmente, la aparición de elementos Cu y Si en el análisis EDX podría deberse al uso de rejillas de cobre en la caracterización ME [García-García G. y cols., 2020] y la generación de una fluorescencia secundaria por el detector de fluorescencia (muestra de NP diluida) [Nasrazadani S. y Hassani S., 2016], respectivamente.

La agregación de las partículas observada en las Figuras 11 y 12 se asoció con el método de preparación de las muestras por secado para las observaciones de microscopía electrónica [Arias J.L. y cols., 2008a; Arias J.L. y cols., 2008c; Santos D.P. y cols., 2011; García-García G. y cols., 2020]. Este es un fenómeno descrito previamente para nanocompuestos magnéticos basados en QS [Santos D.P. y cols., 2011; Arias J.L. y cols., 2012], se determinó la imposibilidad de identificar la forma de una única NP.

El tamaño y la morfología de las NPs γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/PLGA) /QS se confirmaron mediante fotografías HRTEM y STEM (Figura 11a-c y 12a-c). Como puede comprobarse tras el análisis de los datos de microscopía electrónica y de DLS, los valores de tamaño de partícula obtenidos mediante DLS son generalmente más altos que los que se muestran en las imágenes de microscopía electrónica. Esto es debido a la existencia de la doble capa eléctrica, involucrada en este primer método de medición (DLS) [Easo S.L. y Mohanan P.V., 2013]. Un ejemplo de ello, es el tamaño de los núcleos de óxido de hierro: $\approx 9 \pm 3$ nm en las microfotografías de HRTEM, valores más pequeños de lo que realmente determina el DLS (172 ± 5 nm).

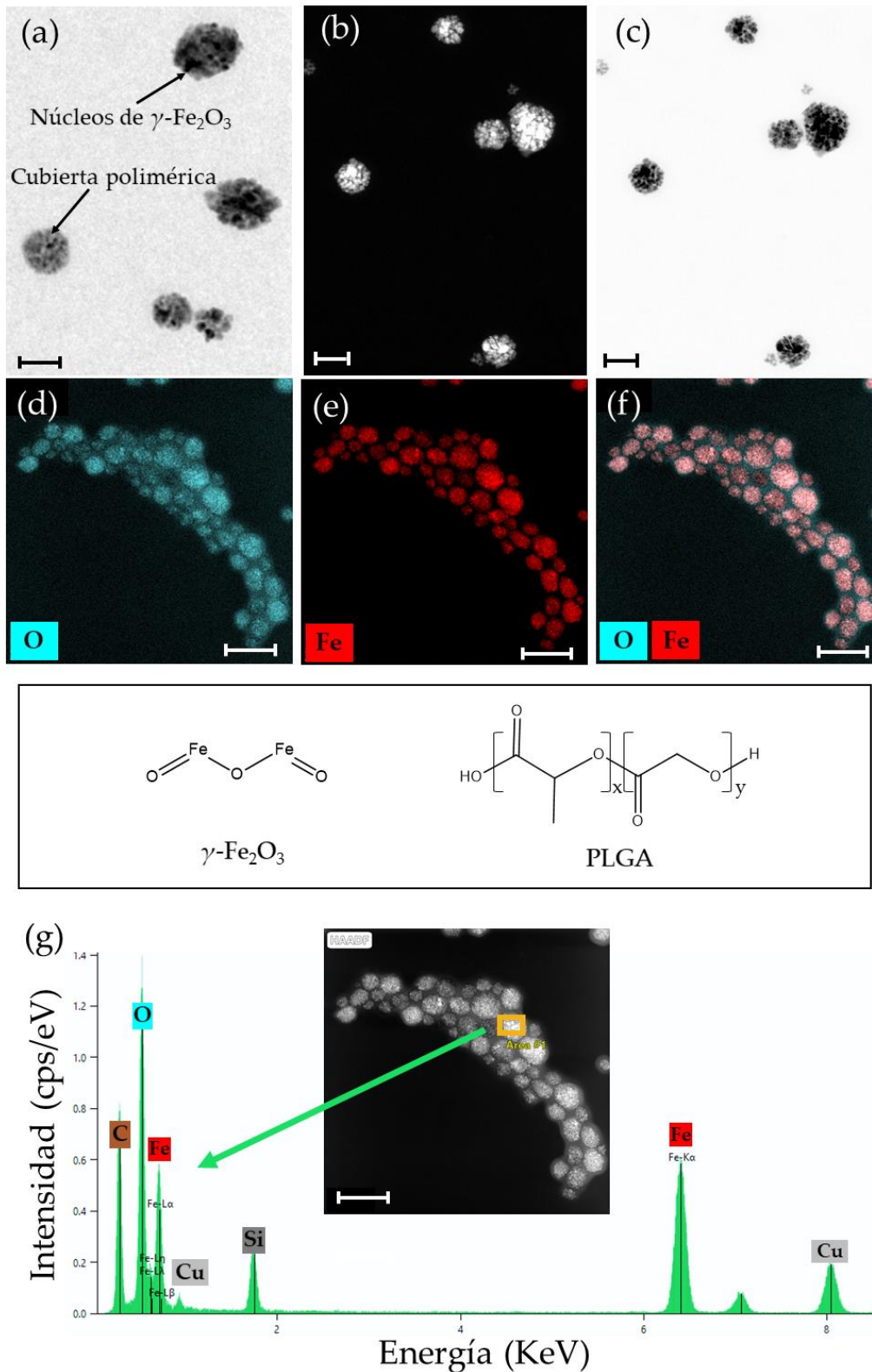


Figura 11. (a) HRTEM, (b) HAADF-STEM, y (c) ABF-STEM de las partículas $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$; Análisis EDX de los elementos (d) O, (e) Fe y (f) O y Fe en conjunto de la muestra. Longitud de barra: 100 nm (a, b y c) y 500 nm (d, e y f). Las flechas en (a) señalan a los núcleos de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ dentro de la estructura polimérica. Espectro EDX de la zona central de las NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ (Insertada imagen HAADF-STEM; Longitud de barra: 500 nm). Recuadro: estructura química de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ y PLGA.

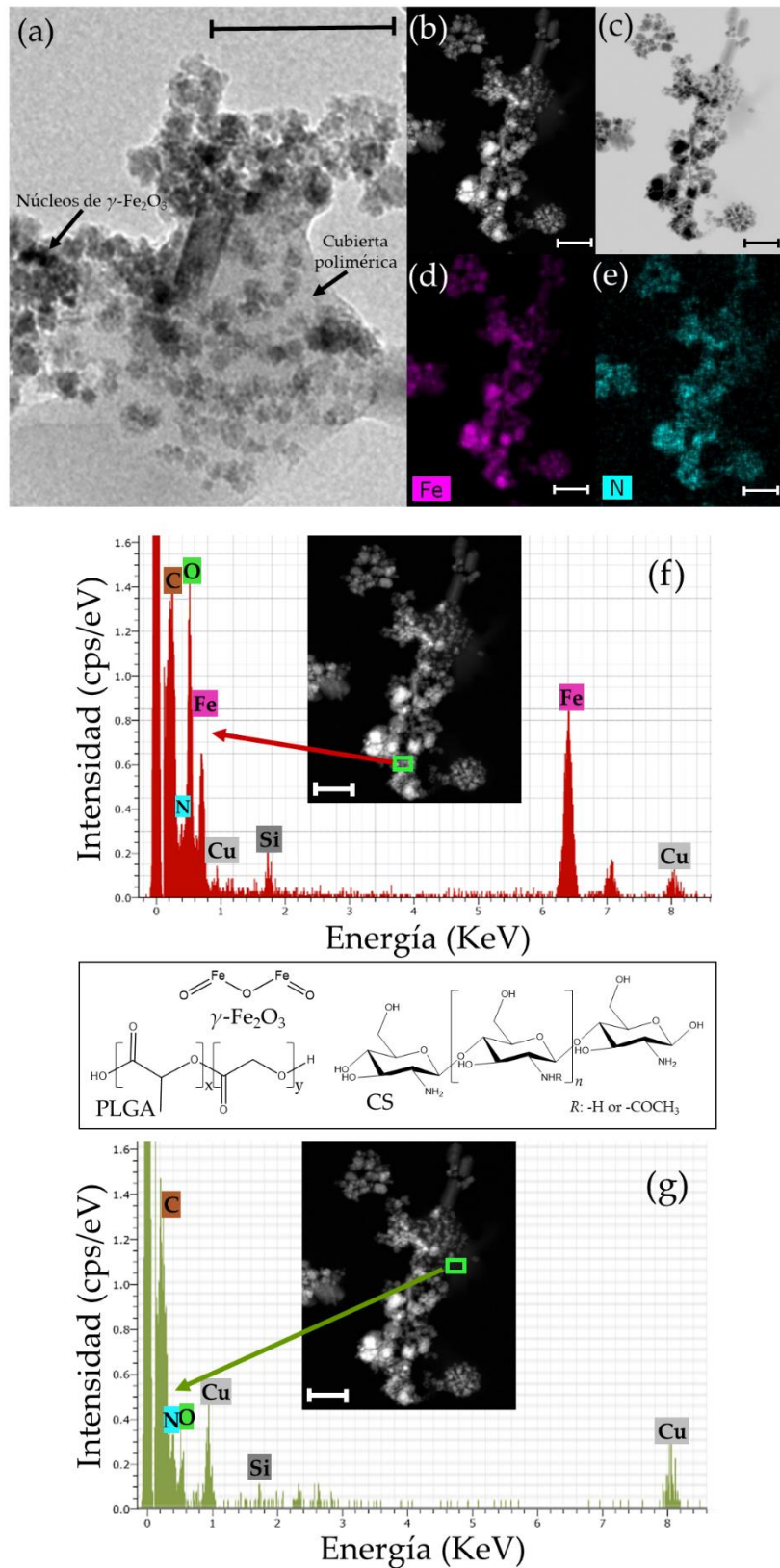


Figura 12. (a) HRTEM, (b) HAADF-STEM, y (c) ABF-STEM de las partículas ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PLGA)/QS; Análisis EDX de los elementos (d) Fe y (e) N de la muestra visualizada en (b) y (c). Longitud de barra: 100 nm (a, b, c, d y e). Las flechas en (a) señalan a los núcleos de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ dentro de la estructura polimérica. Espectros EDX de: (f) zona central y (g) zona periférica de las NPs de ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PLGA)/QS (Insertadas imágenes HAADF-STEM; Longitud de barra: 100 nm). Recuadro: estructuras químicas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, PLGA y QS.

4.4. Propiedades termodinámicas superficiales

Dentro de la termodinámica, la tensión superficial se define como un fenómeno físico-químico que tiene lugar en la interfase líquido-gas, líquido-sólido o líquido-líquido y que se puede traducir como la energía necesaria para aumentar en una unidad el área de una superficie. En el interior de un líquido, cada molécula está rodeada en todas direcciones de otras moléculas y las fuerzas de atracción que surgen entre ellas se anulan (moléculas con baja energía). Por el contrario, las moléculas próximas a la interfase se encuentran menos rodeadas de otras moléculas generándose una fuerza neta atractiva hacia el interior del líquido que hará que se forme una barrera en la superficie del líquido. La tensión superficial está gobernada por fuerzas de adhesión (F_A), que aparecen entre moléculas de una misma sustancia, y fuerzas de cohesión (F_C), presentes entre moléculas de distinta naturaleza. Concretamente, el origen de la tensión superficial está en el desequilibrio entre estas dos fuerzas: F_C con las moléculas del seno del líquido y F_A con las moléculas de la otra sustancia (gas, sólido u otro líquido).

Este fenómeno se puede parametrizar mediante la determinación del *ángulo de contacto* (θ , grados), descrito por primera vez por Thomas Young en 1805 [Van Oss C.J., 2007]. Determinar el ángulo de contacto consiste en determinar el ángulo que se forma entre una superficie sólida y la tangente a la superficie líquida de una gota en el punto de contacto entre ambas sustancias. Al depositar una gota de un líquido sobre una superficie sólida esta gota adopta una determinada forma en función de la relación entre las F_C del líquido y las F_A con el sólido sobre el que se está depositando. Por lo tanto, esta relación entre las diferentes fuerzas determina el valor del ángulo de contacto: si las $F_A > F_C$, el ángulo de contacto será $< 90^\circ$, mientras que si las $F_A < F_C$ el ángulo de contacto será $> 90^\circ$. Un ángulo de contacto $< 90^\circ$ indica que el líquido, por ejemplo agua, moja al sólido que es hidrófilo, mientras que un ángulo de contacto $> 90^\circ$ indica que el líquido no moja al sólido que por tanto es hidrófobo.

En definitiva, la determinación del ángulo de contacto mediante goteo revela información sobre la energía de interacción entre un líquido (L) y un sólido (S), como se detallará a continuación [Van Oss C.J., 2007].

Un parámetro importante de este fenómeno físico-químico es el coeficiente de tensión o energía superficial de un material i (γ_i). Según el modelo desarrollado por Van Oss [Van Oss C.J., 1994; Van Oss C.J., 2007] la tensión o energía superficial total de cualquier material i (γ_i^{TOT}) es igual a la suma de dos contribuciones denominadas componente Lifshitz-van der Waals (γ_i^{LW}) y componente ácido-base (γ_i^{AB}). Esta última está relacionada con la componente aceptor de electrones (γ_i^+) y componente donante de electrones (γ_i^-) [Durán J.D.G. y cols., 1996; Arias J.L. y cols., 2012; García-García G. y cols., 2020]. A continuación, se indica tal relación (Ec. 9):

$$\gamma_i^{TOT} = \gamma_i^{LW} + \gamma_i^{AB} = \gamma_i^{LW} + 2\sqrt{\gamma_i^+ \gamma_i^-} \quad (9)$$

La γ_i^{TOT} de un sólido (γ_S^{TOT}) y la de un líquido (γ_L^{TOT}) están relacionadas con la tensión o energía interfacial sólido/líquido (γ_{SL}^{TOT}) y, por ende, con sus componentes Lifshitz-van der Waals (γ_{SL}^{LW}) y ácido-base (γ_{SL}^{AB}) (Ec. 10):

$$\gamma_{SL}^{TOT} = \gamma_{SL}^{LW} + \gamma_{SL}^{AB} = \gamma_i^{LW} + 2\sqrt{\gamma_S^+ \gamma_S^-} + 2\sqrt{\gamma_S^- \gamma_S^+} - 2\sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} - 2\sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+} \quad (10)$$

Estos valores se pueden relacionar con el ángulo de contacto (θ) existente entre el líquido y el sólido, empleando la ecuación de Young (Ec. 11) [Adamson A.W. y Gast A.P., 1997]:

$$(1 + \cos \theta) \gamma_L^{TOT} = 2\sqrt{\gamma_S^{LW} \gamma_L^{LW}} + 2\sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} + 2\sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+} \quad (11)$$

Según esta ecuación, las tres incógnitas (γ_S^{LW} , γ_S^+ , γ_S^-) se determinan: primero midiendo y segundo sustituyendo en el sistema resultante de tres ecuaciones, los valores de los ángulos de contacto (θ) de tres líquidos diferentes. Los componentes γ_L^{LW} , γ_L^+ y γ_L^- para los tres líquidos tienen valores ya conocidos [Van Oss C.J., 1994; Van Oss C.J., 2007].

Finalmente, la evolución de la energía libre de la interacción sólido/líquido (ΔG_{SLS}^{TOT}) que viene definida por la siguiente relación (Ec. 12):

$$\Delta G_{SLS}^{TOT} = -2\gamma_{SL}^{TOT} \quad (12)$$

puede emplearse para comprobar la naturaleza hidrófila o hidrófoba del material estudiado [Van Oss C.J., 2007].

Tras el análisis de la literatura se puede concluir que la medición del ángulo de contacto (θ) y la aplicación del modelo de Van Oss son de gran utilidad en la caracterización de sistemas coloidales y suspensiones [García-García G. y cols., 2020]. Concretamente, se podrá evaluar la naturaleza hidrófila o hidrófoba de un material y con ello analizar la composición de la estructura nanométrica estudiada.

4.4.1. Metodología

Los ángulos de contacto (θ , grados) que forman las gotas de tres líquidos diferentes ($\approx 5 \mu\text{L}$): agua, formamida y diiodometano, se midieron sobre superficies sólidas, lisas y secas de NPs (telegoniómetro Ramé-Hart 100-00, Ramé-Hart, Succasunna, Nueva Jersey, EE. UU.) a 25.0 ± 0.1 °C ($n = 9$). Las muestras se obtuvieron mediante la deposición de dispersiones acuosas de los distintos nanosistemas ($\approx 10\%$, p/v) sobre portaobjetos de microscopio limpios y secos, y posterior desecación de los portaobjetos a 35.0 ± 0.5 °C en una estufa de desecación con circulación forzada

de aire (Digitronic, J.P. Selecta S.A., España). La obtención de superficies perfectamente uniformes y lisas se consiguió mediante la deposición en capas delgadas y uniformes de estas dispersiones acuosas de partículas. Se comprobó que un total de 10 mL de estas dispersiones era suficiente para conseguir una capa de material en la superficie del portaobjetos suficientemente gruesa. Las imágenes de las gotas depositadas suavemente sobre las superficies de los portaobjetos (micro-jeringa Gilmont, Gilmont, EE. UU.) se capturaron con una cámara CCD (Pixelink PL-A662, Canada) adaptada al telegoniómetro.

Una vez determinados los ángulos de contacto (θ , grados), estos datos se procesaron siguiendo el anteriormente comentado modelo de Van Oss para obtener valores de las tres componentes de la tensión o energía superficial de los materiales (γ_s^{LW} , γ_s^+ , γ^-). Finalmente, los resultados de la energía libre de la interacción sólido/líquido (ΔG_{SLS}) proporcionan una caracterización termodinámica superficial exhaustiva de los diferentes materiales (naturaleza hidrofílica/ hidrofóbica).

4.4.2. Resultados y discusión

Concretamente, el análisis de las componentes de la tensión o energía superficial (γ_s) de las partículas se utilizó para verificar la naturaleza hidrófila/hidrófoba de los materiales y verificar el recubrimiento del ácido oleico sobre los núcleos de γ -Fe₂O₃. El análisis termodinámico arroja además información sobre qué tipo de fuerzas están involucradas en la formulación de nanocompuestos. Demostrar la hidrocompatibilidad (interacciones hidrófobas) entre los núcleos γ -Fe₂O₃ y el PLGA es fundamental para confirmar la formulación de las partículas γ -Fe₂O₃/PLGA, base del nanosistema final ((γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS) [Okassa L.N. y cols., 2005; Okassa L.N. y cols., 2007].

Los valores de ángulo de contacto (θ , grados) de agua, formamida y diyodometano sobre superficies sólidas, lisas y secas de partículas γ -Fe₂O₃ y γ -Fe₂O₃ funcionalizadas (Figura 13b), los valores de γ_s^{LW} , γ_s^+ , γ^- (Figura 13c) y los valores de ΔG_{SLS} (Figura 13d) sugirieron diferencias significativas entre los distintos tipos de partículas a analizar. Valores negativos de ΔG_{SLS} se asociaron con materiales hidrófobos, mientras que valores positivos de ΔG_{SLS} se asociaron con materiales hidrófilos [Van Oss C.J., 2007; Arias J.L. y cols., 2008b]. De esta forma, y analizando la Figura 13, se puede observar como las partículas de óxido de hierro revierten su carácter hidrófilo a hidrófobo al ser tratadas superficialmente con moléculas de ácido oleico, justificando de esta forma el tratamiento eficaz de los núcleos γ -Fe₂O₃ con el ácido oleico.

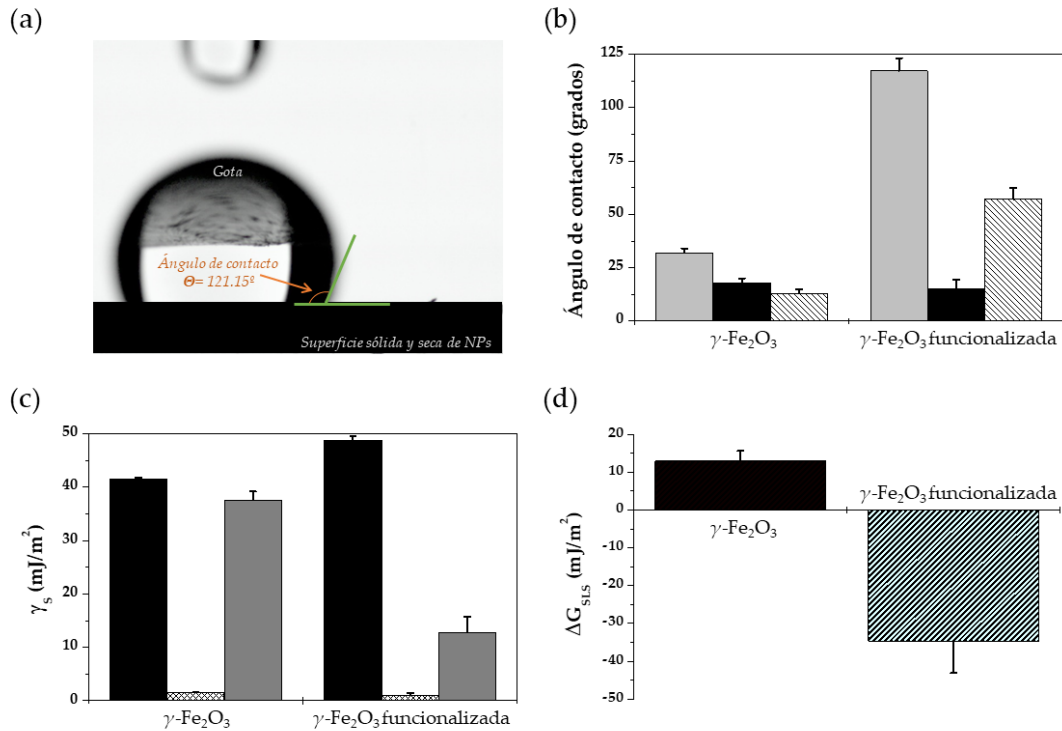


Figura 13. (a) Imagen representativa de un ángulo de contacto de agua sobre una superficie sólida, lisa y seca de partículas de γ -Fe₂O₃ funcionalizadas; (b) Ángulo de contacto (θ , grados) de agua (gris claro), formamida (negro) y diiodometano (rayas) sobre superficies sólidas, lisas y secas de partículas de γ -Fe₂O₃ y γ -Fe₂O₃ funcionalizadas; (c) componentes de la tensión o energía superficial (γ_s^{LW} en negro, γ_s^+ a rayas, γ_s^- en gris; mJ/m²) de estas partículas; y (d) energía libre de la interacción sólido/líquido (ΔG_{sLS} , mJ/m²) y carácter hidrofóbico / hidrofílico de estas partículas.

4.5. Estructura y composición química

4.5.1. Difractometría de rayos X

Junto con las determinaciones electroforéticas y las técnicas de microscopía electrónica, previamente comentadas en este capítulo, el estudio de los patrones de difracción de rayos X (difractometría de rayos X) es una técnica que va a permitir comprobar la composición de la nanoestructura, y por tanto confirmar la adecuada formulación de esta. La estructura química de las NPs magnéticas se considera un factor clave que define su carácter magnético [Di Marco M. y cols., 2007; Reddy L.H. y cols., 2012; Andersen H.L. y cols., 2018], y es por ello por lo que estudiar el grado de cristalinidad mineralógico del material magnético es tan importante. Esta característica estructural se puede evaluar mediante la difractometría de rayos, gracias a la ley de Bragg [Depeyrot J. y cols., 2002; Ling Y. y cols., 2014]. Cada material sólido tiene un patrón de difracción de rayos X único que permite su identificación [Brittain H.G. y cols., 1991].

Para entender la difracción de rayos X hay que comprender el fenómeno de difracción en el cual se basa esta técnica. Cuando una onda (electromagnética) incide e interacciona con una sustancia se produce el fenómeno de difracción o dispersión de los rayos incidentes obteniéndose los denominados patrones de difracción [Faraldos M. y Goberna C., 2011]. La ley de Bragg es la ley en la cual se basa la difracción de rayos X. Brevemente, una onda de una determinada longitud de onda (λ) incide sobre una sustancia con un determinado grado de cristalinidad. El ángulo con el cual la onda incide (θ) sobre los planos cristalinos de la sustancia puede variar y para un determinado valor se puede producir un determinado fenómeno: el haz difractado tras incidir la onda de rayos X en el plano o capa de átomos de la superficie (plano a) y el resto de haces difractados tras su interacción con el resto de planos o capas más internas (planos b y c) están en fase, este efecto acumulativo provoca un reforzamiento de las ondas difractadas produciendo una señal de rayos X muy intensa [Skoog D.A y cols., 2018] (Figura 14). Esta señal de rayos X es detectada con el detector adecuado e indica el ángulo al cual se produce la difracción.

Los requisitos para que se dé el fenómeno de difracción de rayos X en una muestra son que las capas de átomos estén separadas por una distancia con un valor similar al de la λ del haz incidente, y que los centros de dispersión o átomos con los cuales la radiación interacciona estén distribuidos de una forma regular [Skoog D.A y cols., 2018]. Por consiguiente, esto se cumple cuando:

$$n\lambda = 2d \times \sin \theta \quad (13)$$

λ = longitud de onda ($n\lambda$ = múltiplo de la longitud de onda) del haz

d = distancia interplanar

θ = ángulo del haz incidente

La d está relacionada con el parámetro de red (a) y los índices de Miller (h, k, l) del plano cristalino de la siguiente manera (Ec. 14) [Ling Y. y cols., 2014]:

$$d = \frac{a}{\sqrt{h^2 + k^2 + l^2}} \quad (14)$$

Los índices de Miller ayudan a identificar un sistema de planos cristalográficos [Faraldos M. y Goberna C., 2011].

En resumen, los rayos X son reflejados por la sustancia cristalina y detectados por un difractor de rayos X únicamente cuando el ángulo θ da lugar a una interferencia constructiva y cumple la condición antes vista (Ec. 15):

$$\sin \theta = \frac{n\lambda}{2d} \quad (25)$$

En el resto de casos, el ángulo producirá interferencias destructivas [Skoog D.A y cols., 2018].

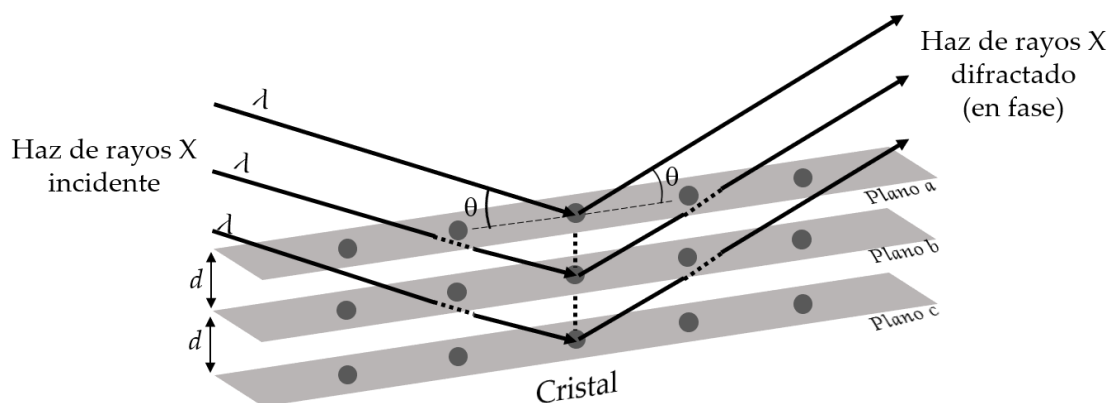


Figura 14. Proceso de difracción de rayos X sobre un material cristalino que sí cumple la ley de Bragg. Reproducido de Skoog D.A y cols., 2018.

En un difractómetro de rayos X la señal de rayos X difractados son recepcionados por un detector mientras se modifica ángulo θ y con ello, el ángulo de difracción. El resultado tras una difracción de rayos X consiste en diagramas o patrones de difracción de rayos X en donde la intensidad de los rayos X difractados se indica en función del ángulo 2θ (ángulo del haz incidente + ángulo del haz difractado). En cada uno de los patrones se pueden apreciar los distintos picos de los planos cristalinos que cumplen la ley de Bragg, es decir, los que producen difracción, y se relacionan con sus índices de Miller (h,k,l) [Faraldos M. y Goberna C., 2011].

Para que la ley de Bragg se cumpla en una estructura cúbica, como lo son los núcleos de óxido de hierro, estos deben cumplir una serie de requisitos en función del tipo de estructura cristalina. En el caso de un material con estructura cubica centrada en cuerpo, la suma de los 3 índices de Miller (h,k,l) de cada plano tiene que ser igual a un número par, mientras que en el caso de una estructura cubica centrada en caras, todos los índices de Miller para cada plano tienen que ser todos pares o todos impares (cero es considerado par). Estas indicaciones permiten distinguir entre los dos tipos de estructuras cristalinas de un material [Williams D.B. y Carter C.B., 2009].

4.5.1.1. Metodología

El grado de cristalinidad de las distintas partículas se evaluó mediante difracción de rayos X (difractómetro Philips PW1710, Holanda), utilizando el método Debye-Scherrer (radiación Cu-K α de $\lambda = 1.5405 \text{ \AA}$). Como ya se ha comentado, dado que cada material presenta un patrón de difracción de rayos X único, esta técnica permite su identificación [Brittain H.G. y cols., 1991]. Brevemente, las muestras empleadas se obtuvieron por desecación de las

correspondientes dispersiones acuosas de las distintas NPs (masa = 0.5 g) a 35.0 ± 0.5 °C en una estufa de desecación con circulación forzada de aire (Digitronic, J.P. Selecta S.A., España).

4.5.1.2. Resultados y discusión

Los patrones de difracción de rayos X de las partículas de γ -Fe₂O₃, PLGA, QS y (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS se representan en la Figura 15. El patrón obtenido para las partículas de γ -Fe₂O₃ (Figura 15b) coincide con el recogido por la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (*American Society for Testing and Materials*, ASTM) para este mismo material (ASTM No. 24-81; imagen insertada en la Figura 15a). De igual forma, los nanocompuestos (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS mostraron un patrón de difracción de rayos X que coincidía con este modelo ASTM (Figura 15e). Este resultado sugirió que, aún incluso después del recubrimiento por los polímeros PLGA y QS, los núcleos de γ -Fe₂O₃ mantuvieron su pureza mineralógica y su alta naturaleza cristalina. Estas son propiedades responsables de una capacidad de respuesta magnética apropiada y un comportamiento superparamagnético [Reddy L.H. y cols., 2012]. Los valores de 2θ (grados) de los núcleos γ -Fe₂O₃ incorporados en la nanoestructura final, (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS, fueron: 30.30 °, 35.64 °, 43.66 °, 54.10 °, 57.36 ° y 63.04 °, los cuales pueden asignarse a los planos (2 2 0), (3 1 1), (4 0 0), (4 2 2), (5 1 1) y (4 4 0) de estos óxidos de hierro, respectivamente [Depeyrot J. y cols., 2002; Ling Y. y cols., 2014; Narimani-Sabegh S. y Noroozian E., 2019]. En base a la información indicada anteriormente en este capítulo, se puede confirmar que los núcleos γ -Fe₂O₃ incorporados en la nanoestructura final presentan una estructura cubica centrada en caras.

Por otro lado, los difractogramas de PLGA y QS observados en la Figura 15c y 15d coinciden con los existentes en la literatura, lo que confirmó su correcta identificación [Geng Y. y cols., 2008; Zhang Q. y cols., 2019]. En estas Figura 15c y 15d se observaron picos no tan pronunciados para las partículas de PLGA y QS a valores de 2θ (grados) de 19.90 ° y 18.36 °, respectivamente. El “pico” indicado en el difractograma del QS estaría indexado al plano (1 1 0), que es característico de la quitina cristalina [Raut A.V. y cols., 2016; Soltani S. y cols., 2016; Zhang Q. y cols., 2019]. Estos picos menos pronunciados se integraron en el difractograma de rayos X de los nanocompuestos (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS, probablemente muestra de la eficiencia del procedimiento de preparación de esta nanoestructura (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS.

Por tanto, observando la Figura 15e se puede determinar como la aparición de los distintos picos representativos de los patrones de γ -Fe₂O₃, PLGA y QS en los nanosistemas finales, (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS, confirman la incorporación de los núcleos de γ -Fe₂O₃ en la matriz polimérica de PLGA recubierta por QS, y la exhibición de sus propiedades cristalinas tras el proceso de síntesis de los compuestos magnetopoliméricos.

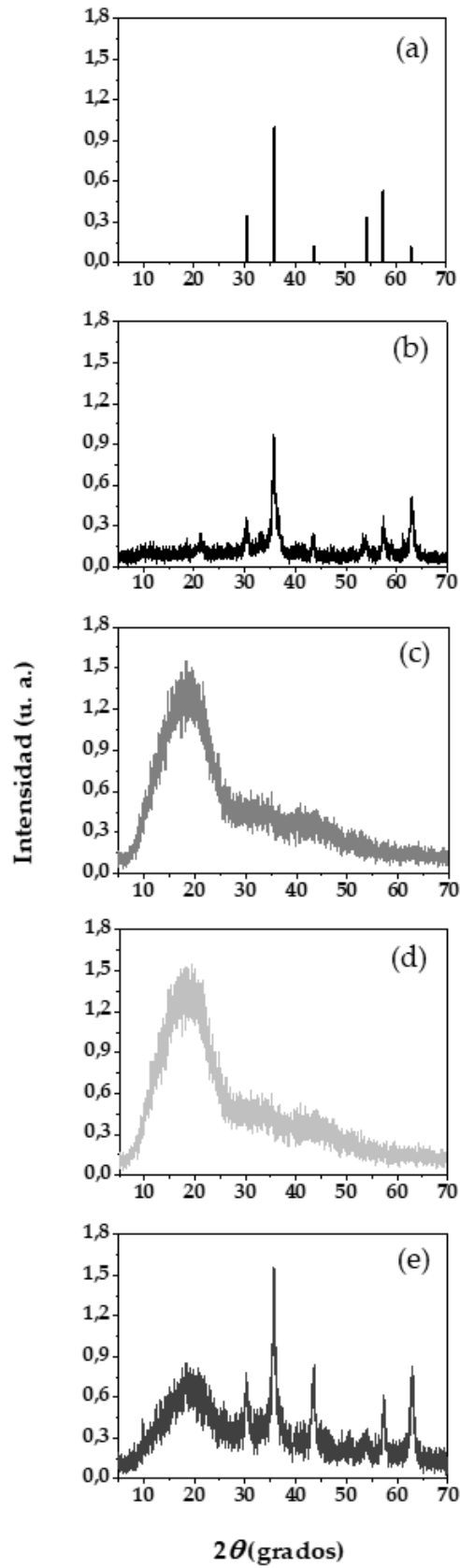


Figura 15. (a) Patrón de la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM) para γ -Fe₂O₃. Difractogramas de rayos X de las partículas de (b) γ -Fe₂O₃, (c) PLGA, (d) QS y (e) (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS. La intensidad está expresada en unidades arbitrarias (u.a.).

4.5.2. Espectroscopía de infrarrojos por Transformada de Fourier

La composición química de una estructura se puede caracterizar mediante espectroscopía de infrarrojos por Transformada de Fourier (FTIR) [Boyd R.N. y Morrison R.T., 1998]. Al igual que la electroforesis, la caracterización química de estas estructuras nanométricas por FTIR puede suponer de ayuda para evaluar cualitativamente la eficacia de la formulación de los distintos nanosistemas ya que de esta manera se puede identificar la estructura de cada material, por medio de bandas de infrarrojos (IR) significativas.

La región IR del espectro electromagnético comprende radiación con longitudes de onda que van desde los 0.78 a los 1000 μm , y con número de onda entre 12800 y 10 cm^{-1} . El espectro IR se puede dividir en tres regiones diferentes según estos parámetros: infrarrojo cercano, medio y lejano [Skoog D.A y cols., 2018]. Las mediciones FTIR se realizan en la región media del espectro de IR (2.5 – 50 μm ; 4000 – 200 cm^{-1}) [Carr G.L. y Williams G.P., 1997; Kowalskaa J. y Gajdab M., 2012; Skoog D.A y cols., 2018]. La radiación IR en la técnica FTIR va a hacer que los grupos moleculares de un compuesto se exciten y comiencen a vibrar de una determinada manera como respuesta a esta interacción con la radiación IR. La absorción de la luz IR genera cambios en las vibraciones de una molécula, concretamente en los enlaces de los grupos moleculares [Carr G.L. y Williams G.P., 1997; Boyd R.N. y Morrison R.T., 1998; Kowalskaa J. y Gajdab M., 2012]. Las vibraciones de los enlaces moleculares pueden clasificarse en vibraciones de estiramiento o tensión y vibraciones de flexión [Boyd R.N. y Morrison R.T., 1998; Skoog D.A y cols., 2018]. Cuando se dan vibraciones de estiramiento o tensión la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos se ve alterada, mientras que cuando se dan vibraciones de flexión es el ángulo entre los enlaces el que sufre la modificación. Las vibraciones de tensión pueden ser simétricas o asimétricas, y las vibraciones de flexión se pueden clasificar a su vez en cuatro tipos diferentes: de balanceo en el plano, tijereteo en el plano, aleteo fuera del plano y torsión fuera del plano (Figura 16) [Skoog D.A y cols., 2018].

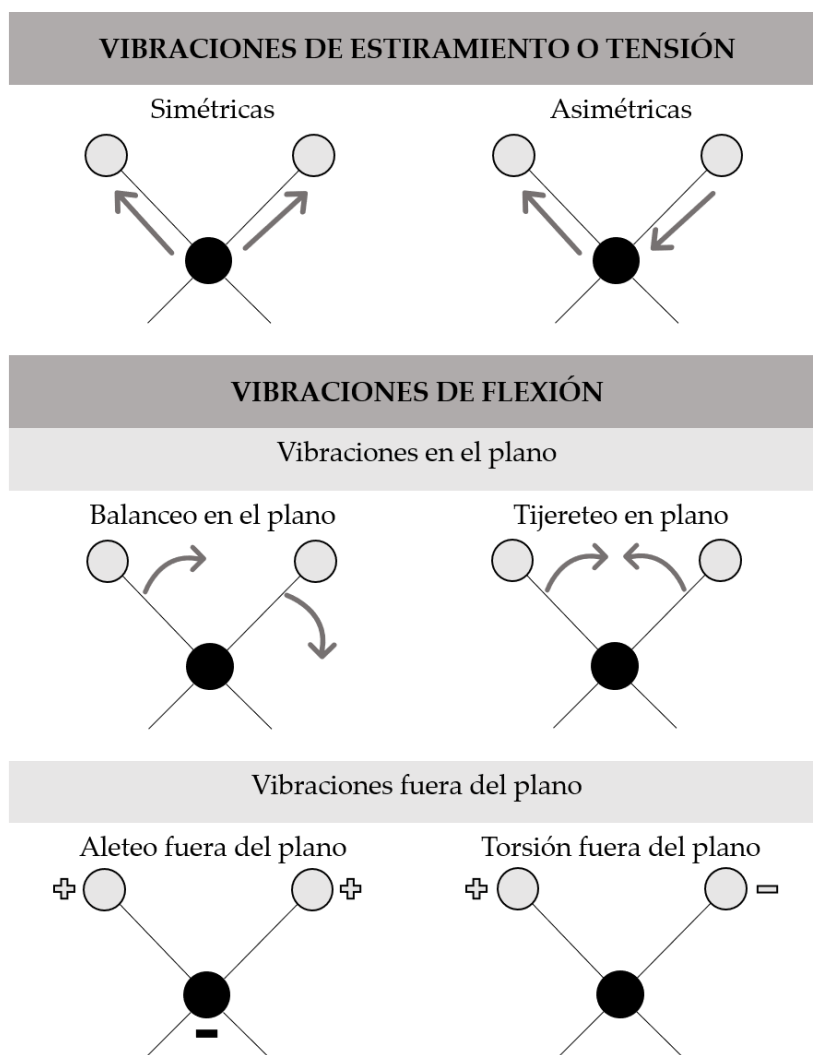


Figura 16. Clasificación de las vibraciones de los enlaces moleculares. El símbolo (+) indica que el movimiento del enlace tiene lugar desde el plano indicado en la página hacia fuera de la página, mientras que el símbolo (-) indica que el movimiento se realiza desde el plano indicado en la página hacia “dentro” de la página. Reproducido de Skoog D.A y cols., 2018.

El espectrómetro de transformada de Fourier es el instrumento más frecuentemente empleado en la actualidad para la medición de la absorción en el IR y la obtención de espectros IR. En un espectro IR cada banda de absorción corresponde a un grupo de átomos determinado, esto es porque cada enlace molecular absorbe luz de una frecuencia de onda determinada y esto es lo que se refleja en un espectro IR [Boyd R.N. y Morrison R.T., 1998]. La frecuencia de onda a la que absorbe un determinado grupo funcional, denominadas frecuencias de grupo, se puede calcular a partir de las masas de los átomos y de la constante de fuerza del enlace entre ellos [Skoog D.A y cols., 2018]. Por tanto, se pueden identificar compuestos a partir de la visualización y análisis de un espectro IR. Primero se debe identificar a los grupos funcionales que podrían

presentarse en la región de frecuencias de grupo en el espectro del compuesto problema (3600 cm^{-1} – 1250 cm^{-1} aproximadamente), para luego comparar esta información con la ofrecida por un espectro de referencia [Skoog D.A y cols., 2018]. Durante este proceso es importante prestar especial atención a una zona del espectro denominada huella dactilar, comprendida entre 1200 cm^{-1} y 600 cm^{-1} , puesto que pequeños cambios en la estructura molecular se reflejan en modificaciones importantes en las bandas (distribución y/o intensidad) presentes en esta región de huella dactilar (única para toda especie molecular). Aunque la mayoría de las frecuencias de grupo se encuentran entre los 3600 cm^{-1} y 1250 cm^{-1} como se ha indicado anteriormente, algunas aparecen en la región de huella dactilar. Huellas dactilares prácticamente idénticas entre compuestos señalan una similitud entre ellos [Matthäus C. y cols., 2008; Miller L.M. y Dumas P., 2010; Colagar A. H. y cols., 2011; Skoog D.A y cols., 2018]. Finalmente, a pesar de esta información, la interpretación de un espectro IR es bastante complicada, puesto que algunas bandas asociadas a determinados enlaces o grupos moleculares pueden verse enmascaradas por bandas de enlaces o grupos moleculares diferentes [Boyd R.N. y Morrison R.T., 1998].

4.5.2.1. Metodología

La composición química de las NPs se caracterizó mediante FTIR (espectrómetro FT/IR-6200, JASCO, Easton, MD, EE. UU.; resolución de $0,25\text{ cm}^{-1}$) y la identificación de bandas significativas de estas partículas y comparación con datos publicados. Brevemente, y de la misma manera que las muestras utilizadas en la difracción de rayos X, estas se obtuvieron también por medio de la desecación de las correspondientes dispersiones acuosas de las distintas NPs a $35.0 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una estufa de desecación con circulación forzada de aire (Digitronic, J.P. Selecta S.A., España) y posterior mezcla con bromuro de potasio en polvo (1 g de NPs secas por 100 mg de bromuro de potasio). Luego, la mezcla se prensó a 15000 kPa para obtener un disco transparente.

4.5.2.2. Resultados y discusión

Los espectros de IR de las NPs mixtas $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ y $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$, y de las partículas puras de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, PLGA y QS se recogen en la Figura 17. Todas las bandas características de los óxidos de hierro (Figura 17a), y polímeros PLGA (Figura 17b) y QS (Figura 17c) estaban presentes en los espectros de las partículas magnetopoliméricas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ (Figura 17d) y $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$ (Figura 17e), respectivamente. Estos datos demostraron que la cubierta polimérica observada alrededor de los núcleos magnéticos se

correspondía bien con las capas de PLGA y PLGA más QS en los núcleos de γ -Fe₂O₃, según fuesen NPs de γ -Fe₂O₃/PLGA o (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS.

Los grupos químicos identificados en el espectro de las NPs finales de (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS se indican en la Figura 17e y fueron : (A) vibraciones de estiramiento de enlaces N – H y O – H (superpuestas \approx 3400 cm⁻¹) [Xie D. y cols., 2010; Wang Y. y cols., 2013; Martín-Banderas L. y cols., 2014]; (B) vibración de estiramiento del enlace C – H de los grupos –CH, –CH₂ y –CH₃ (\approx 2850 cm⁻¹) [Xie D. y cols., 2010; Wang Y. y cols., 2013; Badran M.M. y cols.,2018]; (C) vibración de estiramiento del enlace C = O de un ácido carboxílico (\approx 1750 cm⁻¹), probablemente asociado al PLGA [Martín-Banderas L. y cols., 2014; Amin M.K. y cols., 2019; Haider M. y cols., 2020]; (D) vibración de estiramiento del enlace C = O de un grupo amida (\approx 1630 cm⁻¹), presumiblemente asociado al revestimiento de QS [Wang Y. y cols., 2013; Montha W. y cols., 2016; Badran M.M. y cols.,2018]; (E) vibración de flexión asimétrica de CH₂ (a 1450 cm⁻¹ y 1380 cm⁻¹) [Wang Y. y cols., 2013; Badran M.M. y cols.,2018; Amin M.K. y cols., 2019], y vibración de flexión del enlace O – H, probablemente del grupo carboxílico del PLGA (\approx 1420 cm⁻¹) [Pérez-Artacho B. y cols., 2012]; (F) vibración de estiramiento del enlace C – O de un grupo –OH (\approx 1280 cm⁻¹) [Thakur C.K. y cols., 2016]; (G) vibración de estiramiento del enlace C – O del grupo carboxílico en PLGA (\approx 1160 cm⁻¹) [Pérez-Artacho B. y cols., 2012; Thakur C.K. y cols., 2016]; (H) vibración de estiramiento del enlace C – O – C asociado al PLGA (\approx 1130 cm⁻¹ y 1080 cm⁻¹) [Pérez-Artacho B. y cols., 2012; Badran M.M. y cols.,2018; Gao P. y cols., 2018]; (I) banda de vibración característica de los alcanos (\approx 890 cm⁻¹) [Silverstein R.M., 1998]; (J) vibración de balanceo de C–H característico de los –CH de cadenas largas (\approx 800 cm⁻¹) [Pérez-Artacho B. y cols., 2012; Silverstein R.M., 1998]; y (K) vibración del enlace Fe-O característico de las partículas óxido de hierro (\approx 560 cm⁻¹) [Pérez-Artacho B. y cols., 2012; Lyon, R.J.P., 1967; Idris, M.I. y cols., 2019].

Las bandas características de los distintos materiales: γ -Fe₂O₃, PLGA y QS, identificadas en el espectro de los nanocompuestos finales, (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS, muestran una menor intensidad (valores de transmitancia bajos,%) debido a la pequeña cantidad relativa de estos materiales usados en la formulación final de las partículas (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS.

Tras el análisis del espectro de los nanocompuestos (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS, se puede declarar que los núcleos de γ -Fe₂O₃ forman parte de una estructura mixta constituida además por los polímeros PLGA y QS. De nuevo, se confirma la eficacia de la metodología de síntesis de partículas magnetopoliméricas.

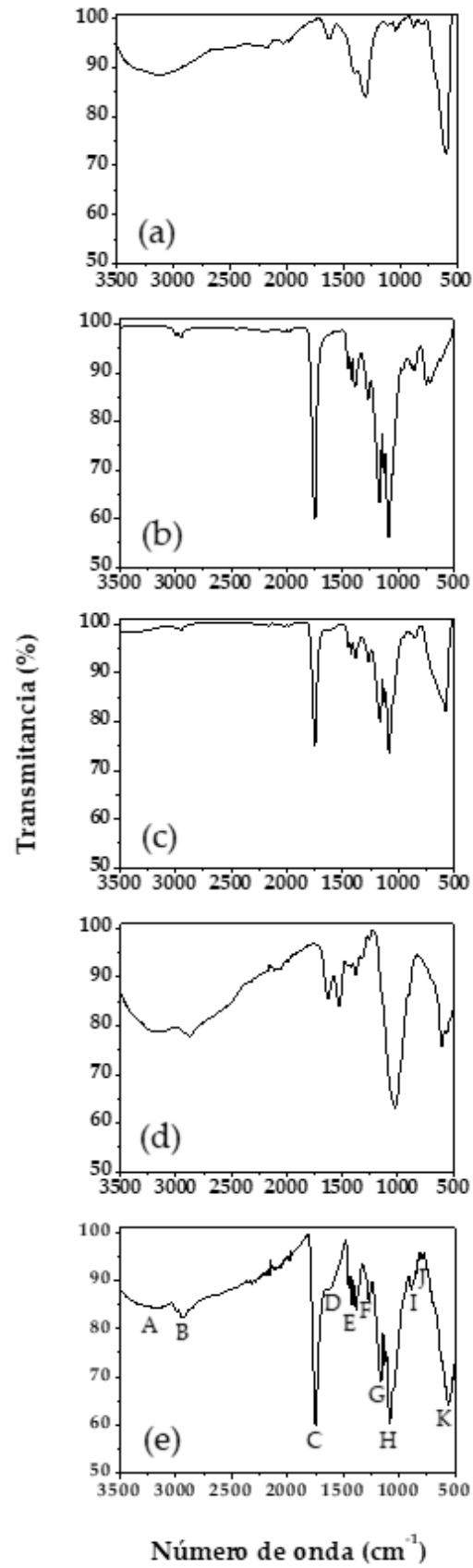


Figura 17. Espectros de infrarrojos por Transformada de Fourier de las partículas (a) γ -Fe₂O₃; (b) PLGA; (c) QS; (d) γ -Fe₂O₃/PLGA; y (e) (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS.

4.6. Propiedades magnéticas

Como se indica en el capítulo 3 “Formulación de nanosistemas” las propiedades magnéticas de la γ -Fe₂O₃ y de las nanoestructuras basadas en núcleos de este óxido de hierro se definen por la dependencia de la magnetización o inducción magnética (M) del campo magnético aplicado (H) [Reddy L.H. y cols., 2012]. Cuando un material es expuesto a un campo magnético H, este responde produciendo un campo conocido como imanación o magnetización (M), y esto es lo que se representa en una curva de magnetización o curva de histéresis, también denominado ciclo de histéresis [Sears F.W. y cols., 2004]. La caracterización del ciclo de histéresis de NPs magnéticas y magnetopoliméricas se usa ampliamente para definir su carácter magnético, es decir su capacidad de respuesta ante un campo magnético externo [Reddy L.H. y cols., 2012]. Definir su naturaleza magnética es importante de cara a evitar la agregación de las NPs en el paso posterior a la llegada de estas a la región diana. Para ello se busca que las NPs magnéticas cumplan una serie de requisitos, entre ellos presentar una magnetización remanente nula o despreciable ($M_r \approx 0$), requisito característico de partículas superparamagnéticas. Los materiales superparamagnéticos poseen un ciclo de histéresis estrecho y, como consecuencia, una $M_r \approx 0$ [Durán, J. D. y cols., 2008; Reddy L.H. y cols., 2012].

Cuando una muestra de material magnético se somete a un campo H este se magnetiza hasta la saturación (M_s). Cuando H se reduce a cero (H_0), se pueden dar varias situaciones según el tipo de material magnético sometido a H (Figura 18). En el caso de una partícula ferrimagnética o ferromagnética una reducción en H implica una magnetización remanente y un campo coercitivo que reduzca la magnetización a cero, este comportamiento se llama histéresis [Sears F.W. y cols., 2004]. Por el contrario, una partícula superparamagnética se caracteriza por la ausencia de remanencia y campo coercitivo [Reddy L.H. y cols., 2012]. De esta forma, en el ciclo de histéresis de un material superparamagnético se verá una relación entre la M y el H indiferente tanto cuando H está aumentando que cuando está disminuyendo, es decir, el ciclo de histéresis se mostrará prácticamente inexistente. La magnetización y desmagnetización de un material que presenta histéresis implica una disipación de energía, y la temperatura del material aumenta durante este proceso. De esta forma someter a un material superparamagnético a un campo H implica una pequeña cantidad de energía disipada y un aumento mínimo de la temperatura [Sears F.W. y cols., 2004].

Finalmente, el análisis de una curva de una curva de magnetización o curva de histéresis de un material superparamagnético, no solo va a generar el valor de M_s , sino que también se puede obtener la susceptibilidad magnética inicial (χ_i). Concretamente, es la derivada de la imanación o magnetización M respecto al campo H (capítulo 3 “Formulación de nanosistemas”).

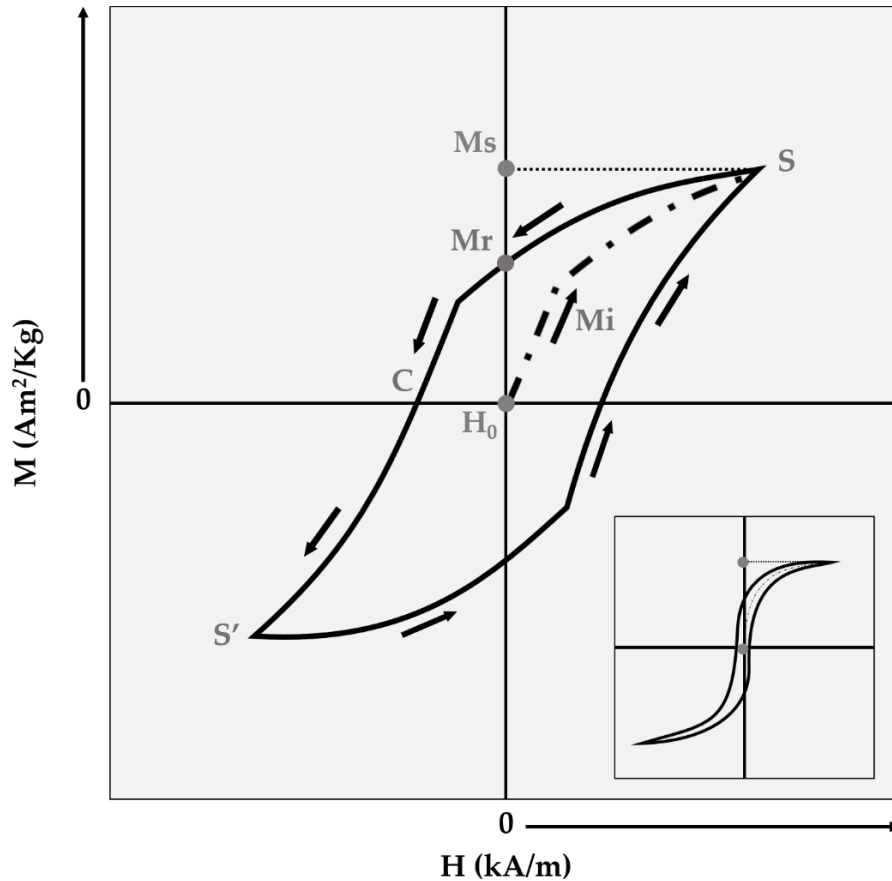


Figura 18. Representación del ciclo de histéresis de un material ferrimagnético o ferromagnético que tras la disminución de H a 0 este permanece fuertemente magnetizado. Insertado: la representación gráfica de un ciclo de histéresis prácticamente nulo. Reproducido de Sears F.W. y cols., 2004.

4.6.1. Metodología

Las propiedades magnéticas de las partículas $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ y $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$ se caracterizaron cuantitativamente analizando el ciclo de histéresis. Esta determinación se realizó bajo la influencia de un campo magnético de -4.000 a 4.000 kA/m (magnetómetro Manics DSM-8, Toulouse, Francia) a 25.0 ± 0.5 C.

Además, la respuesta a un campo magnético de una dispersión acuosa de NPs magnéticas 0.1% (p/v) se estudió cualitativamente. Por un lado, estas dispersiones de NPs, contenidas en un vial de vidrio, se colocaron cerca de un imán de 0.4 T y se esperó por su comportamiento ante este campo magnético. Por otro lado, el comportamiento de las dispersiones de NPs también se analizó mediante la visualización con microscopio óptico bajo la exposición a un imán de 0.4 T (microscopio Olympus BX40F4, Olympus Optical Co.Ltd., Japón). Brevemente, se utilizó una micropipeta ($10 - 100$ μL) para depositar suavemente una gota (≈ 10 μL) de la dispersión acuosa de NPs sobre un portaobjetos de vidrio de microscopio. El imán de 0.4 T se situó a una distancia

de 3 cm del centro de la gota, y luego se capturaron fotografías con una cámara en $t = 5$ s. Estos son experimentos *in vitro* ampliamente utilizados para evaluar la capacidad de respuesta magnética de un nanosistema, como se definió previamente en la literatura [Arias J.L. y cols., 2008b; Reddy L.H. y cols., 2012; García-García G. y cols., 2020].

4.6.2. Resultados y discusión

Los ciclos de histéresis de las NPs de naturaleza magnética, γ -Fe₂O₃, γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS, representados en la Figura 19, caracterizaron la capacidad de respuesta de estas partículas a un campo magnético.

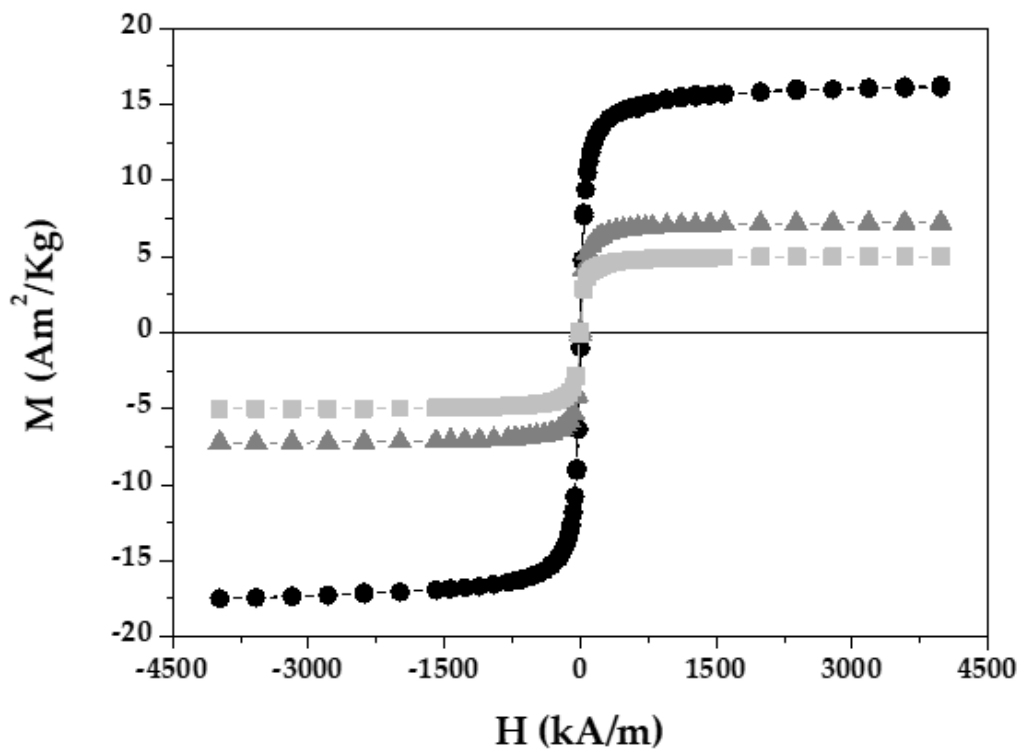


Figura 19. Ciclos de histéresis de las partículas γ -Fe₂O₃ y los nanocompuestos de γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS.

Estas partículas exhibieron un adecuado carácter magnético, y esto se deduce analizando las ramas del campo magnético ascendentes y descendentes del ciclo, las cuales fueron apenas perceptibles con la sensibilidad del instrumento utilizado/ comparten el mismo camino siendo casi indistinguible. A partir de las porciones lineales de las curvas (campo bajo) se calcularon los valores de la susceptibilidad inicial para γ -Fe₂O₃, γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS (Tabla 5), y la magnetización de saturación para estos tres coloides (Tabla 5).

Tabla 5. Propiedades magnéticas de las partículas γ -Fe₂O₃ y los nanocompuestos de γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS.

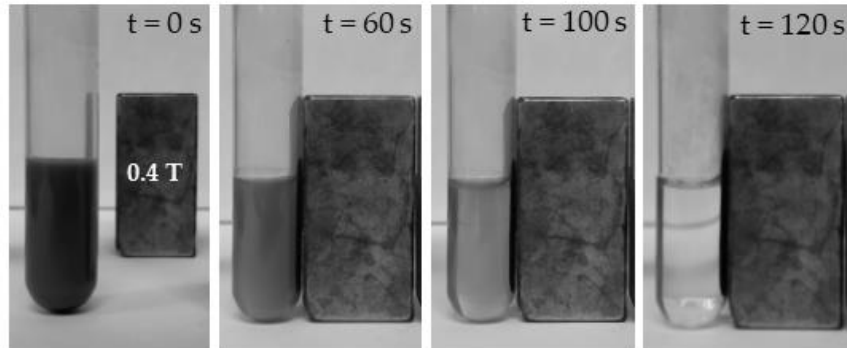
Partícula magnética	Susceptibilidad inicial (χ_i) (m ³ / Kg)	Magnetización de saturación (Am ² / Kg)
γ -Fe ₂ O ₃	$(0.218 \pm 0.034) \times 10^{-3}$	15.86 ± 0.77
γ -Fe ₂ O ₃ /PLGA	$(0.102 \pm 0.013) \times 10^{-3}$	7.18 ± 0.59
(γ -Fe ₂ O ₃ /PLGA)/QS	$(0.071 \pm 0.009) \times 10^{-3}$	4.98 ± 0.41

De acuerdo con estos datos, se pudo concluir que no existe ciclo de histéresis en ninguno de los tres casos, como se esperaba, dado el carácter superparamagnético de los núcleos de γ -Fe₂O₃. El comportamiento magnético de las partículas γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS fue bastante similar al de los núcleos de γ -Fe₂O₃, excepto que la capa de PLGA y el recubrimiento de QS redujeron ligeramente la magnetización de las muestras de NPs mixtas *core/shell* y (*core/shell*)/*shell*. Esto podría ser la consecuencia, a igual masa de muestra analizada, de la menor cantidad de núcleos γ -Fe₂O₃ contenidos dentro de las NPs mixtas de γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS en comparación con la muestra de partículas puras del óxido de hierro γ -Fe₂O₃. Además, y en consecuencia con pruebas anteriores, se confirma la presencia inalterada de estos núcleos de γ -Fe₂O₃ en los nanocompuestos mixtos de γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS. Las propiedades magnéticas de γ -Fe₂O₃ no se ven alteradas una vez recubiertas por los polímeros PLGA y QS.

El adecuado comportamiento magnético de las estructuras mixtas (γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS) se confirmó cualitativamente mediante la observación visual del comportamiento de los coloides bajo su exposición a un imán permanente (Figura 20a y Figura 20b, respectivamente): la atracción magnética completa de las NPs de γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS hacia el imán de 0.4 T se produjo en 120 s en ambos casos, dejando el sobrenadante completamente transparente. Además, de forma complementaria, la respuesta magnética de las NPs se evaluó cualitativamente también mediante la visualización con microscopio óptico de los coloides de nuevo bajo su exposición a un imán permanente (Figura 21a y Figura 21b, respectivamente). Concretamente, en las Figura 21a y Figura 21b, se pueden ver varios campos visuales de un microscopio óptico (aumento 20 \times) en las cuales se ve como las dispersiones acuosas de NPs γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS inicialmente homogéneas cambiaron notablemente produciéndose la formación de agregados en forma de cadenas paralelas a las líneas de campo magnético (imán de 0.4 T móvil). Por lo tanto, se puede ver claramente cómo varía la dirección del vector de magnetización (dirección de las cadenas) cuando cambia la posición del imán de 0.4 T. Esto podría resultar de la notable contribución de la

interacción magnética sobre las interacciones coloidales DLVO (por ejemplo, interacciones electrostáticas tipo Van der Waals y de hidratación o interacciones ácido-base).

(a)



(b)

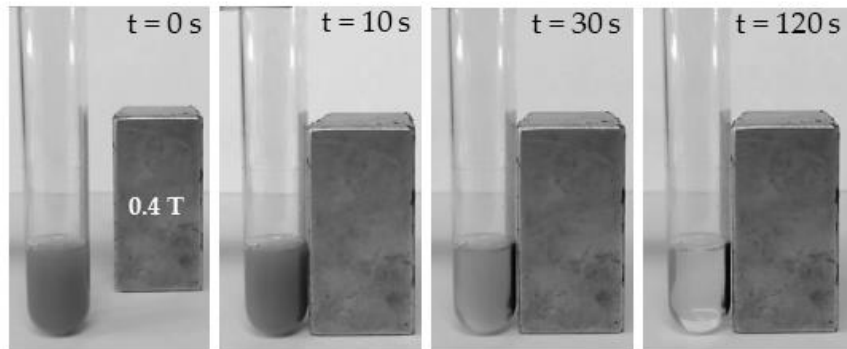


Figura 20. Visualización macroscópica de dispersiones de partículas (a) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ (0.1%, p/v) y (b) $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$ (0.1%, p/v) expuestas a la influencia de un imán permanente de 0.4 T. El imán se ubicó pegado a la superficie plana lateral derecha del vial de vidrio.

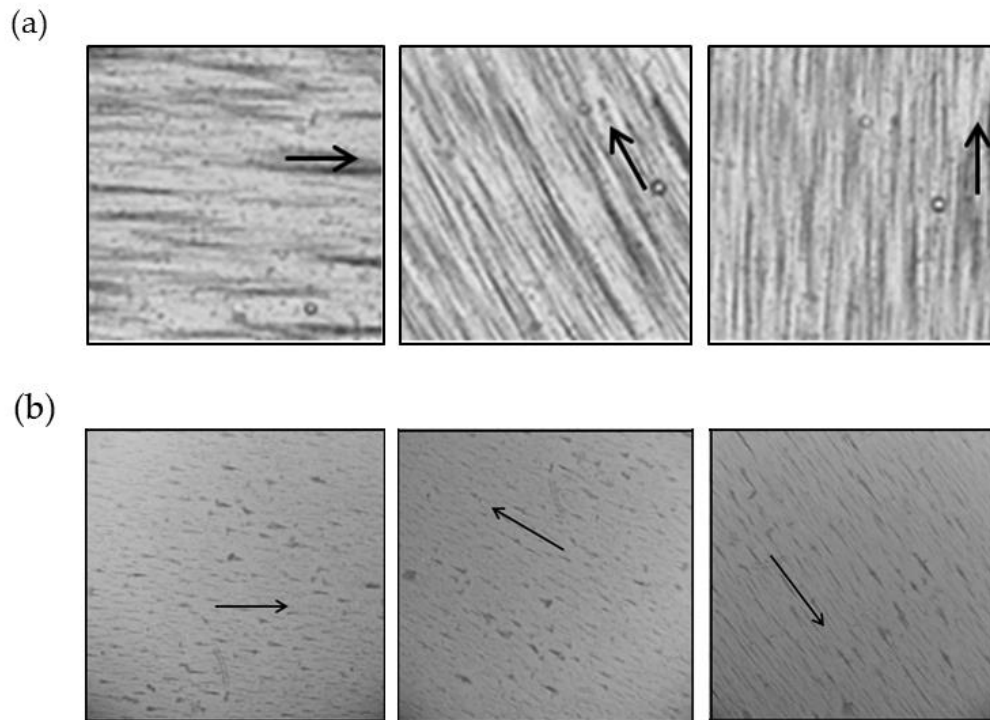


Figura 21. Microfotografías (aumento de 20 ×) de dispersiones de partículas (a) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ (0.1%, p/v) y (b) $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$ (0.1%, p/v) expuestas a la influencia de un campo magnético imán de (0.4 T) dirigido en la dirección de las flecha.

Finalmente, se pudo concluir que los nanocompuestos magnetopoliméticos, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ y $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$, debido a su estructura base de óxido de hierro ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), poseen un adecuado comportamiento magnético capaz de dirigirlos a sitios concretos del organismo mediante la aplicación de un campo magnético externo. Sin embargo, se deben realizar experimentos *in vivo* para definir correctamente si esta capacidad de respuesta magnética podría favorecer la acumulación de las partículas finales de $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$ en una región diana.

CAPÍTULO 5

Estabilidad

5.1. Introducción

El tamaño de partícula, el PDI y el ζ de las partículas son parámetros considerados de referencia para caracterizar una partícula y su estabilidad dentro de un sistema coloidal [Kumari A. y cols., 2010; Reddy L.H. y cols., 2012]. Como se ha comentado anteriormente en el capítulo 4 “Caracterización física, química y fisicoquímica”, el ζ determina la tendencia de las partículas a la agregación. Esta agregación se puede analizar mediante la técnica de DLS previamente comentada basándose en el estudio de la evolución del tamaño de partícula con el tiempo [López-León T. y cols., 2005; Reddy L.H. y cols., 2012].

Brevemente, los valores de ζ de las partículas determinan el tipo de fuerzas atractivas (interacciones dipolo-dipolo de van der Waals) y de fuerzas repulsivas (interacciones estéricas y electrostáticas) que actúan entre las partículas, y su equilibrio. De este equilibrio entre ambos tipos de fuerzas depende el fenómeno de agregación [Ortega-Vinuesa J.L. y cols., 1996; Romero-Cano M.S. y cols., 2001]. Por tanto, determinar los valores del ζ mediante electroforesis, también comentada previamente, permite relacionar este parámetro con la estabilidad coloidal del sistema [Ortega-Vinuesa, J. L. y cols., 2001]. De esta forma, la ausencia de sedimentación o agregación, cambios de tamaño y de propiedades eléctricas superficiales son indicadores de una buena estabilidad de una suspensión de NPs [Bouchemal K. y cols., 2006].

5.2. Evaluación de la estabilidad coloidal

5.2.1. Metodología

La estabilidad coloidal de dispersiones acuosas de NPs γ -Fe₂O₃/PLGA (1 mg/mL, pH 6) y de (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS (1 mg/mL, pH 6) se puso a prueba durante un periodo de tiempo relativamente corto y bajo condiciones de almacenamiento en frío (4.0 ± 0.5 °C). Se midió la evolución del tamaño de partícula, el PDI y el ζ de las partículas en función del tiempo. Las determinaciones se realizaron por triplicado y a 25.0 ± 0.5 °C (Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido). Por cada tiempo de muestreo se tomó una nueva muestra, y tras su medida, se descartó del ensayo.

Por otro lado, la interacción de los nanocompuestos finales (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS con las proteínas del suero humano, y por tanto, la posible formación de corona de proteínas, se analizó *in vitro*, siguiendo una metodología previamente detallada en la literatura [Almalik A. y cols., 2017; Krauss I.R. y cols., 2020]. Para ello, se incubaron 70 μ L de la dispersión del nanosistema (9.5 mg/mL) en 5 mL de PBS (concentración final de 130 g/mL de PBS) conteniendo 34 o 54 mg/mL de albúmina de suero bovino (BSA) durante 40 min a 37.0 ± 0.5 C. A continuación, las NPs fueron

retiradas del medio magnéticamente (imán de 0.4 T) y se re-dispersaron en agua (0.1%, p/v). Finalmente se determinó el tamaño de partícula y el PDI mediante DLS (Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido).

5.2.2. Resultados y discusión

Los resultados del ensayo de estabilidad se recopilan en la Tabla 6 (NPs γ -Fe₂O₃/PLGA) y en la Tabla 7 (NPs (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS). Se muestran valores de tamaño, PDI y ζ para cada uno de los tiempos de muestreo (días) y para cada una de los nanosistemas. En vista de la ausencia de cambios relevantes en estos valores, se podría postular que la técnica de formulación de cada una de las NPs mixtas genera unos sistemas estables nada propensos a cambios en sus características fisicoquímicas tras un mes de almacenamiento en frío (4.0 ± 0.5 °C). Concretamente, no se observó agregación de ninguno de los dos tipos de NPs estudiadas γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS, y las determinaciones por DLS no indicaron ningún cambio apreciable en el tamaño de partícula y en la carga eléctrica superficial de los nanocompuestos γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS después de 1 mes de almacenamiento a 4.0 ± 0.5 °C en agua. Los valores de PDI para las partículas (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS fueron de 0.5 durante todo el ensayo, cifras muy similares a las descritas previamente para NPs poliméricas de PLGA funcionalizadas con QS [Sanna V. y cols., 2012; Tong G.-F. y cols., 2017; Gao P. y cols., 2018]. Estos datos de PDI se consideran aceptables y característicos de dispersiones de NP relativamente homogéneas [Avadi M.R. y cols., 2010; Tzeyung A.S. y cols., 2019].

Tras la puesta en contacto de NPs (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS con distintas concentraciones de BSA, no se observaron efectos significativos sobre su tamaño. Concretamente, se obtuvieron tamaños de entorno a los 340 nm con un PDI de 0,335. Este cambio insignificante en el tamaño sugiere una mínima interacción con la proteína posiblemente debido a la naturaleza hidrófila del QS. De nuevo, los resultados determinan como un recubrimiento con QS podría minimizar la formación de la corona proteica y, por tanto, la agregación de NPs [Aggarwal P.y cols., 2009; Pustulka S.M. y cols., 2020].

Tabla 6. Evolución del tamaño (nm), índice de polidispersión (PdI) y potencial zeta (ζ , mV) de las partículas γ -Fe₂O₃/PLGA en función del tiempo (días). La dispersión acuosa de NP (1 mg/mL, pH 6) se almacenó a 4.0 ± 0.5 ° C.

Tiempo(días)	Tamaño (nm)	PdI	ζ (mV)
0	325.8 \pm 8.5	0.367 \pm 0.007	23.3 \pm 0.4
1	325.8 \pm 10.5	0.439 \pm 0.070	16.9 \pm 0.8
3	332.3 \pm 11.3	0.358 \pm 0.049	32.8 \pm 0.7
5	336.3 \pm 2.4	0.335 \pm 0.043	20.1 \pm 0.4
7	330.2 \pm 3.9	0.360 \pm 0.047	23.5 \pm 0.4
10	333.9 \pm 6.4	0.302 \pm 0.029	24.0 \pm 0.7
14	316.7 \pm 13.0	0.291 \pm 0.043	12.4 \pm 2.6
18	322.6 \pm 8.4	0.317 \pm 0.006	22.4 \pm 0.7
22	337.9 \pm 4.2	0.360 \pm 0.004	25.9 \pm 0.6
30	323.8 \pm 30.2	0.377 \pm 0.084	25.9 \pm 0.6

Tabla 7. Evolución del tamaño (nm), índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta (ζ , mV) de las partículas (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS en función del tiempo (días). La dispersión acuosa de NP (1 mg/mL, pH 6) se almacenó a 4.0 ± 0.5 ° C.

Tiempo(días)	Tamaño (nm)	PdI	ζ (mV)
0	299.3 \pm 4.2	0.200 \pm 0.xxx	-8.9 \pm 0.6
1	298.4 \pm 2.7	0.176 \pm	-7.3 \pm 0.3
3	304.3 \pm 5.4	0.186 \pm	-7.2 \pm 0.5
5	316.5 \pm 6.9	0.226 \pm	-9.4 \pm 0.2
7	314.6 \pm 6.9	0.194 \pm	-8.8 \pm 0.3
10	320.3 \pm 5.2	0.229 \pm	-12.7 \pm 0.3
14	307.5 \pm 4.5	0.200 \pm	-12.3 \pm 0.7
18	307.8 \pm 7.9	0.294 \pm	-11.1 \pm 0.4
22	311 \pm 6.8	0.202 \pm	-13.4 \pm 0.6
30	308.9 \pm 5.3	0.235 \pm	-12.8 \pm 0.2

CAPÍTULO 6

Biocompatibilidad y toxicidad de los
nanosistemas

6.1. Introducción

Las estructuras nanométricas poseen propiedades y aplicaciones interesantes debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas. A su vez, estas también son responsables de la aparición del término “nanotoxicología” en 2004 [Santamaria A., 2012]. Se refiere al análisis de las interacciones perjudiciales de estas estructuras nanométricas con el medio que las rodea. Concretamente, la nanotoxicología evalúa interacciones que impliquen un riesgo para el medio ambiente y la salud de los organismos vivos [Sutariya V.B. y Pathak Y., 2014]. La investigación nanotoxicológica sobre los efectos de las nanoestructuras en la salud comprende valorar la exposición dérmica y por inhalación, la ingestión de nanomateriales en los alimentos, el uso de nanomateriales en dispositivos médicos y como agentes terapéuticos y de diagnóstico [Santamarina A., 2012; Sutariya V.B. y Pathak Y., 2014].

La eficacia de la aplicación de un sistema nanométrico como agente terapéutico, de diagnóstico o teranóstico depende de su toxicidad *in vivo* [Dash B.C. y cols. 2010]. El tamaño, el área superficial, carga eléctrica superficial (ζ), composición y forma de las nanoestructuras son algunos de los puntos claves cuando se habla de nanotoxicidad, por ello, una adecuada caracterización fisicoquímica de los sistemas nanométricos es esencial [Alexis F. y cols., 2008; Dash B.C. y cols. 2010]. El tamaño de una partícula influye en la estabilidad *in vitro* de esta y en el proceso ADME (Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción) *in vivo*, además de alterar la captación celular. Debido a su pequeño tamaño, las NPs cuentan con una relación área superficial exponencialmente alta, y es por ello que una partícula de unos 20 nm tiende a ser más reactiva con el medio biológico que le rodea que una partícula con un diámetro 10 veces mayor. Además, esta relación superficial también puede conducir a la generación de especies reactivas de oxígeno (*Reactive oxygen species*, ROS). La carga eléctrica superficial determina la cinética de las partículas y determina la interacción celular. De la misma manera, la composición de las partículas, concretamente los recubrimientos y funcionalizaciones, también determinan la cinética, biodistribución e interacción celular. La forma de las partículas también es un punto relevante en nanotoxicidad, una forma esférica presenta una relación de aspecto más baja que por ejemplo una partícula en espiral o fibras. Una alta relación de aspecto aumenta las probabilidades de provocar efectos nocivos *in vivo* [Powers K.W. y cols., 2012; Sutariya V.B. y Pathak Y., 2014]. Aunque hasta la fecha ninguna nanoestructura empleada en biomedicina ha mostrado evidencias de elevada toxicidad, todo nanomaterial con potencial aplicación en esta área debe ser sometido a estudio [Aguilar Z.P., 2013].

La metodología experimental implicada concierne pruebas *in vitro*, como ensayos predictivos o de *screening* de los posibles efectos adversos de las partículas en el organismo, y

estudios *in vivo* [Reinek J. (ed.), 2012; Aguilar Z.P., 2013]. Concretamente, son habituales los análisis de hemotoxicidad o hemocompatibilidad y de citotoxicidad [Mayer A. y cols., 2009; Dash B.C. y cols. 2010; Love S.A. y cols., 2012], seguidos de un estudio de la toxicidad *in vivo* que será definitivo para evaluar la eficacia de una nanoestructura como agente terapéutico, de diagnóstico o teranóstico. De esta forma se está estudiando el efecto tóxico de las partículas a distintos niveles: molecular, celular y en tejidos u órganos [Sutariya V.B. y Pathak Y., 2014]. El principal mecanismo de toxicidad a nivel molecular es la inducción de estrés oxidativo debido a la formación de radicales libres [Lanone S. y Boczkowski J., 2006]. Este estado de estrés oxidativo favorecerá una regulación positiva de algunos factores de la inflamación, que puede inducir o aumentar este proceso de inflamación [Lanone S. y Boczkowski J., 2006]. Además, también puede afectar a órganos del SFM como el hígado o el bazo y a órganos con un elevado flujo sanguíneo como los riñones o los pulmones. Por otro lado, otros resultados de la interacción de las partículas con el medio que las rodea son la hemólisis, o destrucción de los eritrocitos, y trombosis, o formación de un coágulo en un vaso sanguíneo (arteria o vena). Otro fenómeno, la opsonización, por el cual una partícula extraña para el organismo es recubierta por proteínas formando una corona proteica, favorece la captación de la partícula por los macrófagos y la eliminación de esta de la sangre por el SFM [Owens D.E. 3rd y Peppas N.A., 2006]. Sin embargo, también existen estudios que demuestran que la corona proteica podría actuar como una capa estabilizadora de la partícula en sangre y como un método para favorecer la interacción con las células tumorales [Tenzer S. y cols., 2013; Caracciolo G. y cols., 2014]. A nivel celular, las partículas pueden provocar daños a nivel mitocondrial, daños en el ADN nuclear y despolarización de membranas celulares, junto con daño estructural. La interacción con la mitocondria y núcleo va a desencadenar la aparición de ROS que darán lugar a la apoptosis celular. Finalmente, el efecto toxicológico también se puede visualizar a nivel tisular, algunos ejemplos son los siguientes: inflamación pulmonar que deriva en proliferación celular, fibrosis y formación de tumores, formación y aparición de coágulos sanguíneos, daño de hepatocitos, acumulación de plaquetas en la microvasculatura de tejidos hepáticos y alteraciones en el tejido endotelial de esta microvasculatura.

6.2. Hemocompatibilidad

La administración parenteral de NPs conlleva el estudio de la interacción de estas partículas con los componentes de la sangre como los eritrocitos, las plaquetas y componentes del sistema del complemento, y el estudio del proceso de coagulación. [Dash B.C. y cols. 2010; Love S.A. y cols., 2012]. El contacto de las NPs con estos componentes puede provocar efectos adversos, como,

por ejemplo, la activación del sistema plaquetario y del complemento, junto con la lisis de los eritrocitos [Dash B.C. y cols. 2010; Reddy L.H. y cols., 2012]. El desencadenamiento de estos procesos puede dar lugar a una serie de consecuencias como la producción de anafilatoxinas, complicaciones trombóticas y una crisis hemolítica, que a su vez pueden activar el sistema inmunológico, y provocar daño renal y anemia [Fucharoen S. y Viprakasit V., 2009; Dash B.C. y cols. 2010]. La lisis de eritrocitos o hemólisis se traduce en hemoglobina libre que será medida por medio de técnicas espectrofotométricas. La hemoglobina se libera del eritrocito cuando su membrana se ve dañada o en casos extremos de toxicidad como la necrosis celular [Love S.A. y cols., 2012]. Las plaquetas están involucradas en el proceso de activación plaquetaria y el receptor P-selectina se expresa en la superficie de las plaquetas cuando se inicia este proceso. Mientras no haya razón para que el organismo inicie la activación plaquetaria, la P-selectina se encuentra inmovilizada en los gránulos alfa de las plaquetas [Panés J. y cols., 1999]. Tras el proceso de activación plaquetaria, la P-selectina se libera de la superficie y permanece libre en el plasma sanguíneo [Tedder T.F. y cols., 1995]. A la forma soluble libre en plasma se le denomina sP-selectina y es la forma del receptor medido en los estudios de toxicidad asociados a la activación plaquetaria. El sistema del complemento es un componente esencial del proceso de inflamación en el organismo y en la cascada de activación está implicado el componente C3 de este sistema. El componente C3 es activado y fragmentado, el péptido C3a-desArg es producto de esta escisión y promueve la inflamación. Este péptido se toma como marcador referencia de la activación del sistema del complemento [Dash B.C. y cols., 2010]. El proceso de coagulación de la sangre *in vitro* necesita la recalcificación del plasma, y esto ocurre cuando se agrega CaCl_2 a la muestra para iniciar la formación de fibrina, esto es el coagulo de fibrina. El tiempo de recalcificación, parámetro importante en el estudio del proceso de coagulación, es el que transcurre desde la adición del CaCl_2 hasta la formación de la primera hebra de fibrina [Dash B.C. y cols., 2010; Muñoz de Escalona M. y cols., 2016].

6.2.1. Metodología

Las consecuencias que la interacción de un sistema nanométrico con los componentes sanguíneos podría acarrear sobre los eritrocitos, el proceso de coagulación o el sistema del complemento, son aspectos a estudiar. La metodología que se siguió para este estudio ha sido detallada previamente en la literatura y se ha descrito como apropiada en la evaluación de formulaciones farmacéuticas nanométricas [Dash B.C. y cols., 2010; Muñoz de Escalona M. y cols., 2016; El-Hammadi M.M. y cols., 2017]. Los efectos estudiados fueron: hemólisis, activación plaquetaria, activación del sistema del complemento y tiempo de recalcificación plasmática.

Brevemente, las muestras de sangre, tomadas de tres adultos sanos (22, 26 y 43 años), se vertieron en matraces que contenían ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (antes de los ensayos: hemólisis y activación plaquetaria) o $\text{NaH}_2(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3)$ (antes de los experimentos: activación del complemento y tiempo de coagulación del plasma). Se empleó un tipo u otro de sustancia según el efecto a estudiar: EDTA para los ensayos en los que se pretendía observar hemólisis y activación plaquetaria, es decir la liberación de sP-selectina; o $\text{NaH}_2(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3)$ para los estudios de activación del complemento y de tiempo de recalcificación plasmática o coagulación plasmática. Las distintas partículas ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, PLGA, QS, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ y $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$) se mantuvieron en contacto con las muestras biológicas para evaluar su impacto sobre los eritrocitos, el proceso de coagulación y el sistema del complemento. Se utilizó PBS como control negativo. En el estudio se utilizó un método espectrofotométrico ultravioleta-visible (UV-Vis) validado (Lambda™ 25 UV/Vis spectrophotometer, PerkinElmer Inc., Waltham, MA, EE.UU.). Los experimentos se hicieron por triplicado.

La aprobación ética de este estudio fue otorgada por el Comité de Ética de la Universidad de Granada (España).

Para evaluar la toxicidad de los nanosistemas sobre los eritrocitos las muestras de sangre requirieron la presencia de EDTA, y se siguió el protocolo modificado de Evans y cols. (2013) basado en la detección de hemoglobina liberada (marcador del proceso de hemólisis) [Evans B.C. y cols., 2013; Lorente C. y cols., 2018]. Brevemente, las muestras de sangre se centrifugaron (5 min, 3000 rpm) para eliminar la fracción de suero e incorporar una solución de NaCl 150 mM a la fracción de interés (x2). El pellet resultante se resuspendió finalmente en tampón fosfato 100 mM (PBS) en una proporción de 1:10. Una vez preparada la muestra de sangre y conocida la concentración de eritrocitos (2×10^8 hematíes / mL), las NPs se incubaron durante 2 h (agitación suave ≈ 15 rpm; 37.0 ± 0.5 ° C) a una concentración final de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Una vez finalizado el tiempo de incubación, las muestras de sangre con la NPs se sometieron a un proceso de centrifugación (5 min, 3000 rpm). Finalmente, la absorbancia del sobrenadante resultante de esta última centrifugación se determinó mediante espectrofotometría UV-vis (545 nm) en busca de hemoglobina libre. Se utilizó PBS como control negativo y el agente tensioactivo Triton™ X-100 al 1% (p/v) como control positivo. El % de hemólisis (H%) se calculó siguiendo la presente ecuación [Dash B.C. y cols., 2010; Evans B.C. y cols., 2013; Lorente C. y cols., 2018] (Ec. 16):

$$H (\%) = \left(\frac{\text{Absorbancia muestra problema} - \text{Absorbancia control negativo}}{\text{Mayor valor de absorbancia control positivo}} \right) \times 100 \quad (16)$$

El efecto que tiene la interacción de los nanosistemas con las plaquetas se estudió agregando EDTA a las muestras sanguíneas [Martín-Banderas L. y cols., 2014; El-Hammadi M.M. y cols., 2017]. La concentración de P-selectina soluble (sP-selectina) libre en plasma se usó como marcador de la activación plaquetaria, y se midió usando un kit ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas). Estas determinaciones comenzaron con el tratamiento de las muestras de sangre: ciclos de centrifugación (20 min, 1000 rpm). Al final de estos se obtuvo plasma rico en plaquetas (PRP) y plasma pobre en plaquetas (PPP). Se empleó oxalato de amonio al 1% (p/v) para diluir, en una proporción de 1:100, el PRP hasta ajustar una concentración final de 6×10^8 plaquetas/mL. Un volumen de unos 300 μ l de este PRP se incubó con 40 μ g de NP durante 1 hora a 37.0 ± 0.5 °C. Finalmente, se centrifugó (10 min, 4220 rpm) y se analizó la concentración de sP-selectina del sobrenadante utilizando el kit ELISA [Dash B.C. y cols., 2010]. Se utilizó PBS como control negativo, y PRP y PPP como controles positivos.

Si bien los ensayos de hemólisis y activación plaquetaria requieren la presencia de EDTA, el citrato de sodio fue el anticoagulante empleado en el experimento de activación del sistema del complemento [Martín-Banderas L. y cols., 2014; El-Hammadi M.M. y cols., 2017]. Este estudio se basó en la aplicación de un kit ELISA C3a (BD Bioscience, EE.UU.), mediante el cual se midió, por duplicado, la concentración del péptido C3a-desArg, producto de la activación del complemento [Dash B.C. y cols., 2010]. Este péptido es resultado de la escisión del componente C3, y por ende marcador de la activación del sistema del complemento.

Brevemente, las muestras de sangre se centrifugaron para aislar el plasma que luego se incubó con un volumen igual de suspensión salina de NPs (40 μ g/mL) durante 1h a 37.0 ± 0.5 °C. Tras este tiempo de incubación, se siguió el procedimiento marcado para el análisis por kit ELISA. Finalmente, la señal de absorbancia se midió a 450 nm [Dash B.C. y cols., 2010; Muñoz de Escalona M. y cols., 2016].

Para determinar el perfil de recalcificación de plasma las muestras de sangre se recogieron en tubos de extracción de sangre que contenían citrato de sodio, y se siguió el método de Howell (1916) para cuantificar el tiempo de recalcificación plasmática (TRP) por medio del parámetro $T_{1/2\text{máx}}$ [Howell W.H., 1916; Gulliani G.L. y cols., 1976]. La muestra de sangre con citrato se centrifugó a 8.0 ± 0.1 °C (20 min, 3000 rpm) para obtener la fracción de PPP. 0.1 mL de este PPP se incubaron con 40 μ g de NPs dispersadas en PBS durante 5 min a 37.0 ± 0.5 °C (placa de 96 pocillos). Tras este tiempo de incubación se adicionaron 0.1 mL de solución de CaCl_2 0.025 M. Finalmente, el proceso de coagulación se controló sumergiendo un gancho de acero inoxidable

recubierto de silicona en la mezcla. De esta forma se puede detectar la formación de las primeras hebras de fibrina. El TRP es el tiempo que tarda la primera hebra de fibrina en formarse [Dash B.C. y cols., 2010; Muñoz de Escalona M. y cols., 2016].

Se empleó el método de Howell para cuantificar PRT, calculando el parámetro $T1 / 2 \text{ max.}$. Este parámetro puede definirse como el momento en el que se alcanzó la mitad de la absorbancia saturada [Dash B.C. y cols., 2010].

6.2.2. Resultados

Los resultados experimentales de los ensayos de compatibilidad sanguínea *ex vivo* de las partículas $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, PLGA, QS, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ y $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$ se recompilan en la Tabla 8. Examinando estos datos y comparando con la muestra control, se demostró un efecto insignificante de las partículas sobre la hemólisis (incluso después de 24 h), la activación plaquetaria, la activación del sistema del complemento y el tiempo de coagulación del plasma.

Específicamente, coloides con carga neta elevada tienen mayor porcentaje de **hemólisis** en tamaños de partícula más grandes, como $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ y $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$, que los más pequeños ($\approx 100 \text{ nm}$), como $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Sin embargo, los nanocompuestos $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ y $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$ mostraron un efecto insignificante sobre el % de hemólisis (incluso después de 24 h, $\approx 2\%$). La activación plaquetaria y del sistema del complemento tras la interacción de sus componentes con las NPs podrían conducir a complicaciones trombóticas y producción de anafilatoxinas, que podrían promover la activación del sistema inmunológico [B.C. Dash y cols., 2010], respectivamente. En estos casos, no se observó diferencia significativa entre los resultados de cada una de las muestras de NPs y tampoco cuando estos se compararon con los datos del control negativo. Por lo tanto, dado que los niveles del componente C3a se encuentran en sus rangos normales, no hay opsonización de NPs ni aclaramiento por parte del sistema reticuloendotelial. Finalmente, los valores del tiempo de recalcificación del plasma ($T_{1/2 \text{ máx.}}$) de todas las muestras de NPs son insignificanamente diferentes de los datos del control negativo.

Por tanto, teniendo en cuenta los resultados de la Tabla 8, se podría postular que los nanocompuestos finales, $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$, podrían caracterizarse por un margen de seguridad adecuado *in vivo*, siendo adecuados para la administración parenteral. Se han obtenido resultados semejantes en nanosistemas similares basados en óxidos de hierro [Pérez-Artacho B. y cols., 2012; Clares B. y cols., 2013; Muñoz de Escalona M. y cols., 2016; Lorente C. y cols., 2018].

Tabla 8. Hemocompatibilidad *in vitro* de las NPs γ -Fe₂O₃, PLGA, QS, γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS: hemólisis (%), activación plaquetaria (liberación de sP-selectina, ng/ml), activación del sistema complemento (liberación de C3a: C3a desArg, ng/ml) y tiempo de recalcificación del plasma (T_{1/2} máx, min). Los datos experimentales se expresan como medias \pm desviaciones estándar (n = 3).

Muestras	Hemólisis (%)				sP-selectina (ng/mL)	C3a desArg (ng/mL)	T _{1/2} máx (min)
	Tiempo de incubación (horas)						
	2	4	8	24			
NPs de γ -Fe ₂ O ₃	1.8 \pm 0.3	1.2 \pm 0.5	1.6 \pm 0.4	1.4 \pm 0.3	109 \pm 5	290 \pm 9	13.2 \pm 1.6
NPs de PLGA	2.1 \pm 0.6	2.5 \pm 0.5	2.2 \pm 0.6	1.9 \pm 0.9	108 \pm 13	305 \pm 9	13.7 \pm 1.6
NPs de QS	1.9 \pm 0.5	2.3 \pm 0.2	2.5 \pm 0.3	2.1 \pm 0.6	112 \pm 12	296 \pm 10	12.6 \pm 1.7
NPs de γ -Fe ₂ O ₃ /PLGA	2.5 \pm 0.6	2.5 \pm 0.9	2.3 \pm 0.8	2.5 \pm 0.5	110 \pm 8	305 \pm 9	14.2 \pm 1.1
NPs de (γ -Fe ₂ O ₃ /PLGA)/QS	2.6 \pm 0.8	2.9 \pm 0.4	2.6 \pm 0.3	2.8 \pm 0.6	114 \pm 8	306 \pm 10	14.3 \pm 0.9
Control (solución de PBS)	0	0	0	0	97 \pm 8	295 \pm 7	11.5 \pm 1.7

6.3. Citotoxicidad *in vitro*

6.3.1. Viabilidad celular relativa (%)

Los ensayos de viabilidad celular *in vitro* (%) son los experimentos más frecuentemente seguidos para acceder a una aproximación de la biocompatibilidad de los nanomateriales en un organismo vivo. Los resultados de la interacción de NPs con una población celular, lisis de la membrana celular, alteración del ciclo celular y apoptosis, terminan afectando a la actividad mitocondrial de las células expuestas. Por tanto, dentro de los ensayos de viabilidad celular *in vitro*, el ensayo basado en la evaluación de la actividad metabólica MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol] es uno de los más populares [Sutariya V.B. y Pathak Y., 2014].

6.3.1.1. Metodología

La citotoxicidad *in vitro* de las NPs se estudió en líneas celulares sanas, fibroblastos CCD-18 de colon humano y fibroblastos HFF-1 de prepucio humano; y en la línea tumoral T-84 de adenocarcinoma de colon humano. La línea CCD-18 fue suministrada por el Banco de Células del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, mientras que las líneas HFF-1 y T-84 fueron proporcionadas por la *American Type Culture Collection* (EE. UU.).

De acuerdo con la norma ISO-10993-5 [International Organization for Standardization, 2009], la viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de proliferación MTT, determinando la actividad deshidrogenasa mitocondrial. Estas determinaciones se hicieron por triplicado en el caso de células CCD-18 y T-84, y por cuadruplicado para los ensayos con células HFF-1. Esta metodología está descrita detalladamente en la literatura [Muñoz de Escalona M. y cols., 2016; El-Hammadi M.M. y cols., 2017]. El método MTT se basa en la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (compuesto hidrófilo amarillo) a formazán (sustancia hidrófoba azul) por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. De esta forma la concentración de formazán (medidas de absorbancia) es proporcional a la viabilidad celular, medida indirectamente como actividad enzimática [Muñoz de Escalona M. y cols., 2016].

Previo tratamiento con MTT, las células de las líneas CCD-18 y T-84 se cultivaron en el medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Sigma-Aldrich Chemical Co., EE. UU.) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico (HEPES) 15 mM, bicarbonato sódico 14 mM, L-glutamina 2 mM, 40 µg/mL de gentamicina y 500 µg / mL de ampicilina (Antibióticos SA, España). Posteriormente, y tras un recuento celular (cámara de Neubauer), las células se sembraron en cultivos monocapa en placas de 96 pocillos (6 x 10³ células/pocillo). Se mantuvieron durante 24 h a 37.0 ± 0.5 °C en una atmósfera humidificada al

5% de CO₂ (Incubador CO₂ MCO-19AIC (UV), Sanyo Electric, Japón). Una vez transcurrido este tiempo, el medio de cultivo fue retirado y sustituido por un medio nuevo con concentraciones de NPs, en un rango de 0.05 a 100 g/mL. Tras 48 y 72 horas (37.0 ± 0.5 °C, atmósfera humidificada al 5% de CO₂) (Incubador CO₂ MCO-19AIC (UV), Sanyo Electric, Japón) se determinó la viabilidad celular por MTT.

De igual modo, las células de la línea HFF-1 se cultivaron también en DMEM suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, L-glutamina 2 mM y los antibióticos penicilina-estreptomicina al 1%. Las condiciones de cultivo fueron las siguientes: 37.0 ± 0.5 °C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂ (Incubador CO₂ MCO-19AIC (UV), Sanyo Electric, Japón). Después del conteo celular (cámara de Neubauer), las células en fase de crecimiento exponencial se sembraron en placas de 96 pocillos (1 × 10⁴ células/pocillo) y se pre-incubaron durante 24 h a 37.0 ± 0.5 °C y al 5% de CO₂ (Incubador CO₂ MCO-19AIC (UV), Sanyo Electric, Japón). Tras este periodo de tiempo el medio de los pocillos se reemplazó con medio conteniendo NPs (concentración de hierro: 0.1 a 100 µg/mL). La viabilidad celular se analizó pasadas 24 h.

El estudio de la viabilidad celular por MTT comienza con la sustitución del medio de partida de cada pocillo por 200 µL de solución MTT en medio de cultivo nuevo (0.5 mg/mL). Después de un proceso de incubación de 2 h a 37.0 ± 0.5 °C y al 5% de CO₂ (Incubador CO₂ MCO-19AIC (UV), Sanyo Electric, Japón), el medio de cultivo se retiró el medio y los cristales de formazán resultantes se solubilizaron con 200 µL de DMSO. La absorbancia de este compuesto coloreado, que como se ha indicado anteriormente es proporcional al número de células viables (células metabólicamente activas), se midió a 550 nm utilizando un lector de microplacas Dynatech MR7000 (Dynatech Laboratories, Inc., EE. UU.). Se añadió Tritón X-100 (1%, v/v) a los pocillos control positivo. Los pocillos que no se incubaron con ningún rango de concentración de NPs se emplearon como control negativo.

La viabilidad celular relativa (RCV, %) se calculó mediante la siguiente ecuación (Ec. 17):

$$VCR (\%) = \left(\frac{\text{Densidad óptica células incubadas con NPs}}{\text{Densidad óptica células control}} \right) \times 100 \quad (17)$$

6.3.1.2. Resultados

Los resultados de evaluar la citotoxicidad de las partículas γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS en células sanas CCD-18 y HFF-1, y células tumorales T-84 se muestran en las Figuras 22, 23 y 24, respectivamente.

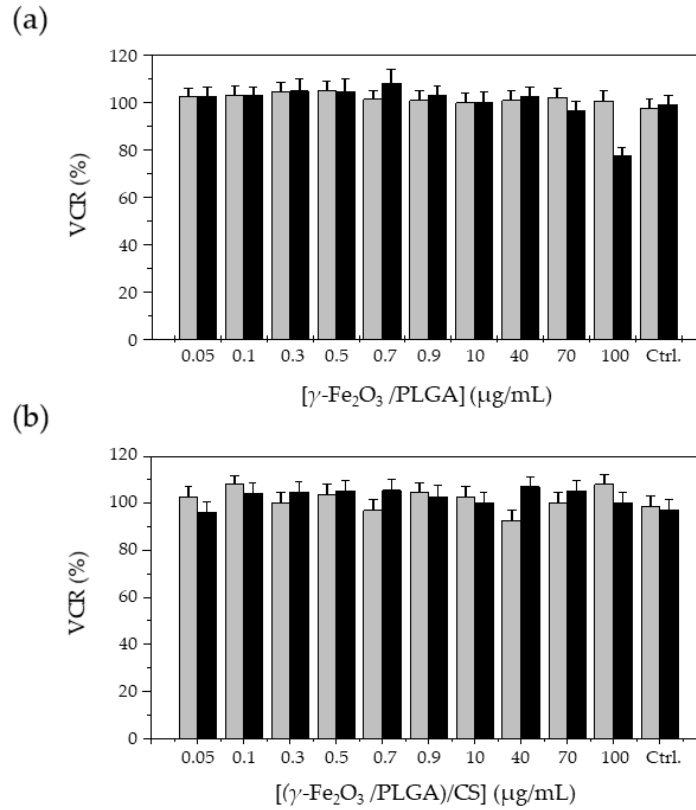


Figura 22. Citotoxicidad *in vitro* (VCR,%) de las NPs (a) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ y (b) $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$ en células CCD-18 a las 48 h (columnas grises) y 72 h (columnas negras). Estas células se mantuvieron en contacto con concentraciones de NPs, en un rango de 0.05 a 100 $\mu\text{g/mL}$.

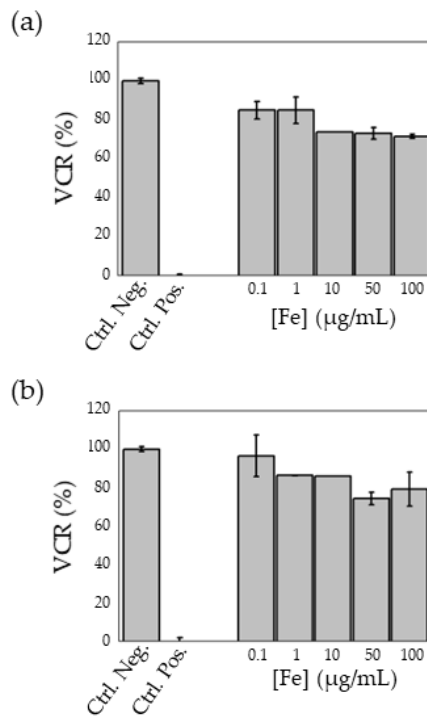


Figura 23. Citotoxicidad *in vitro* (VCR,%) de las NPs (a) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ y (b) $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$ en células HFF-1 a las 24 h. Estas células se mantuvieron en contacto con concentraciones de NPs, en un rango de 0.1 a 100 $\mu\text{g/mL}$ de hierro

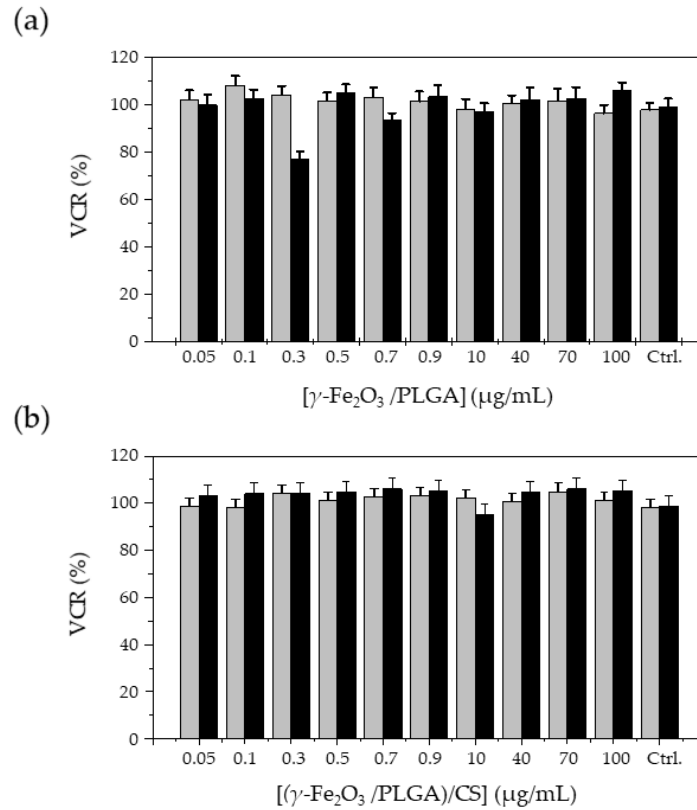


Figura 24. Citotoxicidad *in vitro* (VCR,%) de las NPs (a) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ y (b) $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$ en células T-84 a las 48 h (columnas grises) y 72 h (columnas negras). Estas células se mantuvieron en contacto con concentraciones de NPs, en un rango de 0.05 a 100 $\mu\text{g/mL}$.

En las Figuras 22 y 24 se ilustra cómo la viabilidad celular relativa (VCR, %) de ambas líneas celulares (CCD-18 y T-84) no se vio alterada por la incubación con las partículas $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})$ y $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$ incluso cuando la concentración de estas NPs se incrementó de 0.05 a 100 $\mu\text{g/mL}$. En la Figura 23 se observó cómo concentraciones crecientes, de 0.1 a 100 $\mu\text{g/mL}$ de hierro ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ y $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$), indujeron una toxicidad insignificante en la línea celular HFF-1. La VCR (%) de las células HFF-1 permaneció $\geq 75\%$, en comparación con los controles negativos, para cualquiera de las concentraciones de partículas $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ y $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$.

Según la ISO-10993-5 [International Organization for Standardization, 2009], los valores de VCR (%) representados en las Figuras 22,23 y 24 podrían considerarse razonables y no tóxicos.

6.3.2. Fluorescencia *in vitro*

Una de las principales técnicas de Microscopía Óptica Avanzada (MOA) es la microscopía confocal, la cual permite obtener imágenes de alta resolución y calidad ya que emplean la técnica

de detección de enfoque. Brevemente, a diferencia de los microscopios de fluorescencia convencionales (de campo amplio), la microscopía confocal utiliza un láser como fuente de luz para controlar la profundidad de campo y elimina la luz fuera del foco, esto es la luz desenfocada [Webb R., 1996; Harris J., 2020]. La metodología de esta técnica de fluorescencia cuenta con el uso de colorantes fluorescentes que tienen afinidad específica por cada una de las estructuras celulares [Suzuki T. y cols., 1997; Ploeger L.S. y cols., 2008], como por ejemplo los colorantes que tiñen el núcleo celular (afinidad específica por el ADN nuclear), mitocondrias, lisosomas, citoesqueleto, membranas, etc. El haz de luz (láser) con una longitud de onda determinada va a incidir sobre los cultivos celulares, los colorantes van a absorber esta energía y se van a excitar, los cuales emitirán un haz de luz con una mayor longitud de onda, que será detectado y analizado. La longitud de onda del haz emitido dependerá del tipo de colorante empleado [Ploeger L.S. y cols., 2008].

6.3.2.1. Metodología

Para los estudios de fluorescencia (realizados por quintuplicado) se empleó también la línea celular HFF-1, la cual se cultivó de manera similar a la descrita anteriormente en el apartado 6.3.1. “Viabilidad celular relativa (%)”. Las células HFF-1 se incubaron 24 h en contacto con las NPs γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/ PLGA)/QS (0.1 a 100 μ g/mL de concentración de hierro). Se añadió Tritón X-100 (1%, v/v) a los pocillos de control positivo (se dejó 15 min). A continuación, una serie de marcadores fluorescentes de ADN se adicionaron a todos los pocillos: 4',6-diamidino-2-fenilindo (DAPI; dilución 1: 3000) para marcar el núcleo celular, y yoduro TO-PRO[®]-3 (dilución 1: 1000) para marcar únicamente las células muertas. El marcador DAPI tiñe todas las células de una población debido a su gran permeabilidad celular, mientras que la tinción con TO-PRO[®]-3 es una excelente contra-tinción impermeable a las células vivas pero que sí penetra cuando la membrana se ve comprometida, característica de células muertas [Cummings B.S. y Schnellmann R.G., 2021]. Esta propiedad le convierte en un indicador útil de muerte celular.

Las placas se llevaron a analizar al sistema de imagen celular automático Operetta CLS [™] (Operetta CLS [™] High Content Imaging System, PerkinElmer, Inc., EE. UU.), instrumento capaz de proporcionar capacidades avanzadas de detección de alto contenido (*High-Content Screening*, HCS) o análisis de alto contenido (*High-Content Analysis*, HCA), lo cual permite obtener imágenes de mayor resolución. Un total de 10 campos de imágenes aleatorios fueron capturados por pocillo para cada condición: se tomaron imágenes de fluorescencia para DAPI y yoduro TO-PRO[®]-3, más una imagen de campo claro (lente objetivo 20× de magnificación que opera en un rango de largas distancias de trabajo, apertura numérica de 0.45; Operetta CLS [™]). La mortalidad celular (%) se

calculó automáticamente mediante el software Operetta® Harmony (PerkinElmer, Inc., EE. UU.). Se basó en la identificación de núcleos, tanto de células vivas como muertas, a partir de la tinción DAPI, junto con la determinación de células muertas (%) mediante su marcaje también con el colorante fluorescente yoduro TO-PRO®-3.

6.3.2.2. Resultados y discusión

El análisis de los resultados obtenidos tras aplicar los distintos marcadores fluorescentes confirmó que la incorporación de las partículas γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/ PLGA)/QS a las células HFF-1 no produjo cambios significativos en la morfología celular (Figura 25c y 26c). Las Figuras 25a y 26a representan los controles negativos (azul) para las partículas γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/ PLGA)/QS, respectivamente, mientras que las Figuras 25b y 26b representan los controles positivos (rojo) para las partículas γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/ PLGA)/QS, respectivamente. El color azul en las imágenes de microscopía óptica indica tinción únicamente con DAPI y ausencia de TO-PRO®-3, es decir, la existencia de una población celular sin alteraciones morfológicas; mientras que el color rojo (presencia de tinción TO-PRO®-3) en estas imágenes determina alteraciones en la integridad de la membrana celular, es decir, muerte celular. En las Figuras 25c y 26c claramente hay señal de DAPI (núcleo celular), pero no se aprecia con tanta intensidad la señal de TO-PRO®-3. Por lo que se concluye que la incubación de las células HFF-1 con las partículas γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/ PLGA)/QS no condujo a cambios significativos en la morfología celular. Tampoco se produjeron alteraciones en el número total de células HFF-1 (Figura 25d y 26d), ni se generó un aumento relevante en el porcentaje de muerte celular (Fig. 25e y 26e), en ninguna de las concentraciones investigadas de los dos tipos de NPs, γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/ PLGA)/QS.

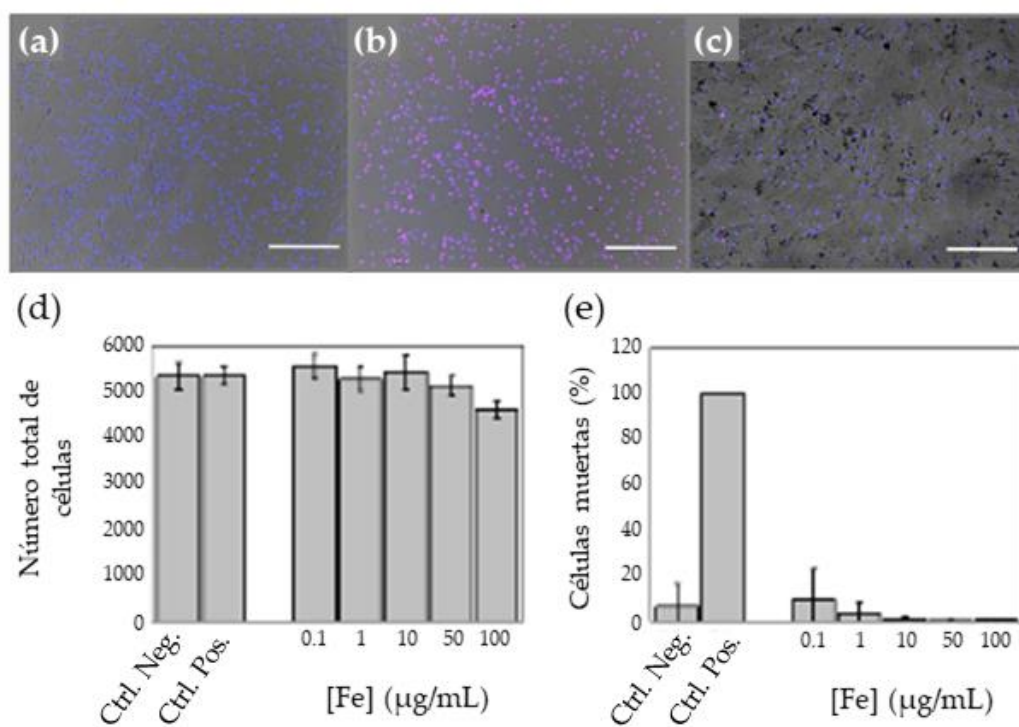


Figura 25. Imágenes de microscopía representativas de fibroblastos HFF-1: (a) control negativo para las partículas γ -Fe₂O₃/PLGA; (b) control positivo para las partículas γ -Fe₂O₃/PLGA; y (c) células HFF-1 tras su incubación con partículas γ -Fe₂O₃/PLGA (100 µg/mL de hierro). Estas imágenes muestran la fusión de fluorescencia DAPI (azul) y fluorescencia TO-PRO³ (rosa). Longitudes de barra: 100 µm. Representación gráfica del (d) número total de células HFF-1 por pocillo; y (e) células HFF-1 muertas (%), después de su incubación con concentraciones crecientes (0.1 a 100 µg/ml de hierro) de NPs γ -Fe₂O₃/PLGA.

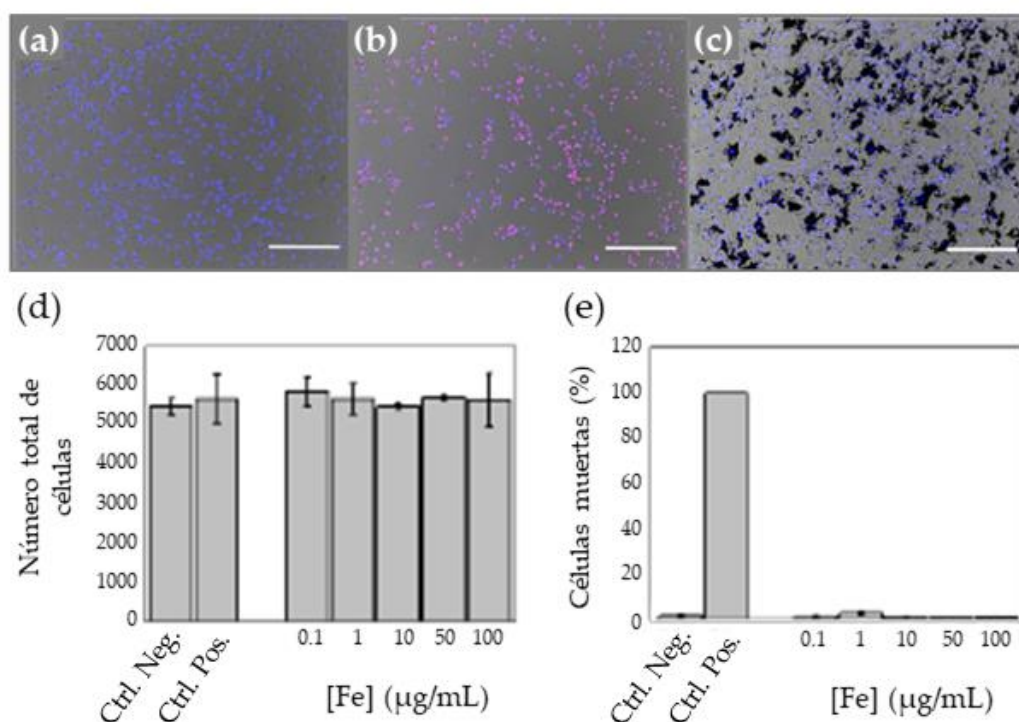


Figura 26. Imágenes de microscopía representativas de fibroblastos HFF-1: (a) control negativo para las partículas (γ -Fe₂O₃/ PLGA)/QS; (b) control positivo para las partículas (γ -Fe₂O₃/ PLGA)/QS; y (c) células HFF-1 tras su incubación con partículas (γ -Fe₂O₃/ PLGA)/QS (100 µg/mL de hierro). Estas imágenes muestran la fusión de fluorescencia DAPI (azul) y fluorescencia TO-PRO³ (rosa). Longitudes de barra: 100 µm. Representación gráfica del (d) número total de células HFF-1 por pocillo; y (e) células HFF-1 muertas (%), después de su incubación con concentraciones crecientes (0.1 a 100 µg/ml de hierro) de NPs (γ -Fe₂O₃/ PLGA)/QS

6.4. Toxicidad *in vivo*

Durante los estudios *in vivo* se suelen monitorizar los siguientes parámetros: respuesta postadministración destacando la respuesta neuronal, cardíaca, respiratoria y hematológica; cambios en el peso del animal (un cambio de > 10% en el peso de un roedor puede ser un indicador significativo de la aparición de efectos adversos); observación clínica mediante RMI (sistema cardiovascular, respiratorio, gastrointestinal...); finalmente se realiza una histología de los órganos del animal [Sutariya V.B. y Pathak Y., 2014]. Además del control de la respuesta postadministración y la observación clínica del animal mediante RMI, el último paso es el que se siguió para evaluar la toxicidad *in vivo* de las NPs γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/ PLGA)/QS.

6.4.1. Metodología

Los experimentos *in vivo* se realizaron en el Servicio de Experimentación Animal del Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología (BIONAND). Todos los ensayos con animales fueron aprobados por el Comité Local de Cuidado Animal en conformidad con la Directiva de la Unión Europea UE 2010/63/UE (2010) y la legislación española para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia (R.D. 53/2013).

Se emplearon tres ratones macho de la cepa Balb/c de 22 g de peso (Janvier Labs, Francia). Se anestesiaron vía inhalatoria con isoflurano al 1% (vaporizador en cámara de inducción anestésica; flujo fijado a 1–1.5 mL/min). Las partículas γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/ PLGA)/QS se inyectaron por vía intravenosa a través de una cánula venosa en la cola del ratón (concentración de hierro: 5 mg/kg). El análisis histológico de muestras de tejido se llevó a cabo mediante microscopía óptica convencional a las 24h de la administración intravenosa de las NPs. Los ratones anestesiados (vía inhalatoria con isoflurano al 1%; vaporizador en cámara de inducción anestésica; flujo fijado a 1–1.5 mL/min), se sacrificaron y se les extrajeron los siguientes órganos: hígado, riñón, bazo, pulmón y corazón.

Los tejidos se fijaron en solución acuosa de formaldehído (CH₂O) al 4% (p/v) (tamponada a pH 7.0 ± 0.5) durante 48 h. La solución fijadora se renovó a las 24 h. A continuación, las muestras de tejido se deshidrataron con una serie de soluciones de etanol de concentración creciente (hasta un 100%), y se remojaron en parafina (56.0 ± 0.5 °C, bajo agitación mecánica, condiciones de vacío) durante 2 h (Procesador de tejidos semi-cerrado LEICA TP 1020, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Alemania). Por último, las muestras se incrustaron en parafina (Centro Modular de Inclusión de Tejidos Leica EG1150, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Alemania) para luego cortar estos bloques de parafina en secciones de 7 µm con una cuchilla de micrótopo (Micrótopo Thermo Scientific™ HM 360, ThermoFisher Scientific Inc., EE. UU.). El tratamiento previo a la tinción (hematoxilina-eosina (H&E)) consistió en un proceso de desparafinación con xileno y rehidratación con una serie de soluciones de etanol de concentración decreciente (hasta un 70%).

Las muestras de tejido se tiñeron con H&E para evaluar la arquitectura/estructura del tejido. El proceso de tinción se llevó a cabo mediante la inmersión de las muestras durante 5 min en hematoxilina, el con agua bidestilada (x2) y la inmersión de las muestras de tejido en eosina durante 2 min. A continuación, los tejidos montados en los portaobjetos se deshidrataron con una serie de soluciones de etanol de concentración creciente (del 70 al 100%), se aclararon en xileno al 100% y se prepararon, usando cubreobjetos de vidrio, para su observación al microscopio óptico.

6.4.2. Resultados y discusión

Con el fin de evaluar más a fondo la toxicidad potencial de las NPs γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS, se analizaron los tejidos (teñidos con H&E) de hígado, riñón, bazo, pulmón y corazón a las 24 h tras la inyección de las partículas en ratones Balb/c. (Figura 27).

En las secciones de hígado no se encontraron detalles que implicasen inflamación y vacuolización citoplásmica de los hepatocitos, indicadores comunes de daño hepático. En los riñones se identificaron bordes en cepillo y glomérulos normales (incluida la cápsula de Bowman circundante). Tampoco se encontraron signos de toxicidad en el bazo, pulmones y corazón, independientemente del tipo de nanosistema administrado γ -Fe₂O₃/PLGA o (γ -Fe₂O₃/ PLGA)/QS.

Combinando estos datos con los resultados de las pruebas de hemocompatibilidad y citotoxicidad *in vitro* (ver apartados 6.2. "Hemocompatibilidad" y 6.3. "Citotoxicidad *in vitro*"), se puede concluir que los nanocompuestos γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/ PLGA)/QS presentan una biocompatibilidad y seguridad adecuadas para su aplicación en biomedicina.

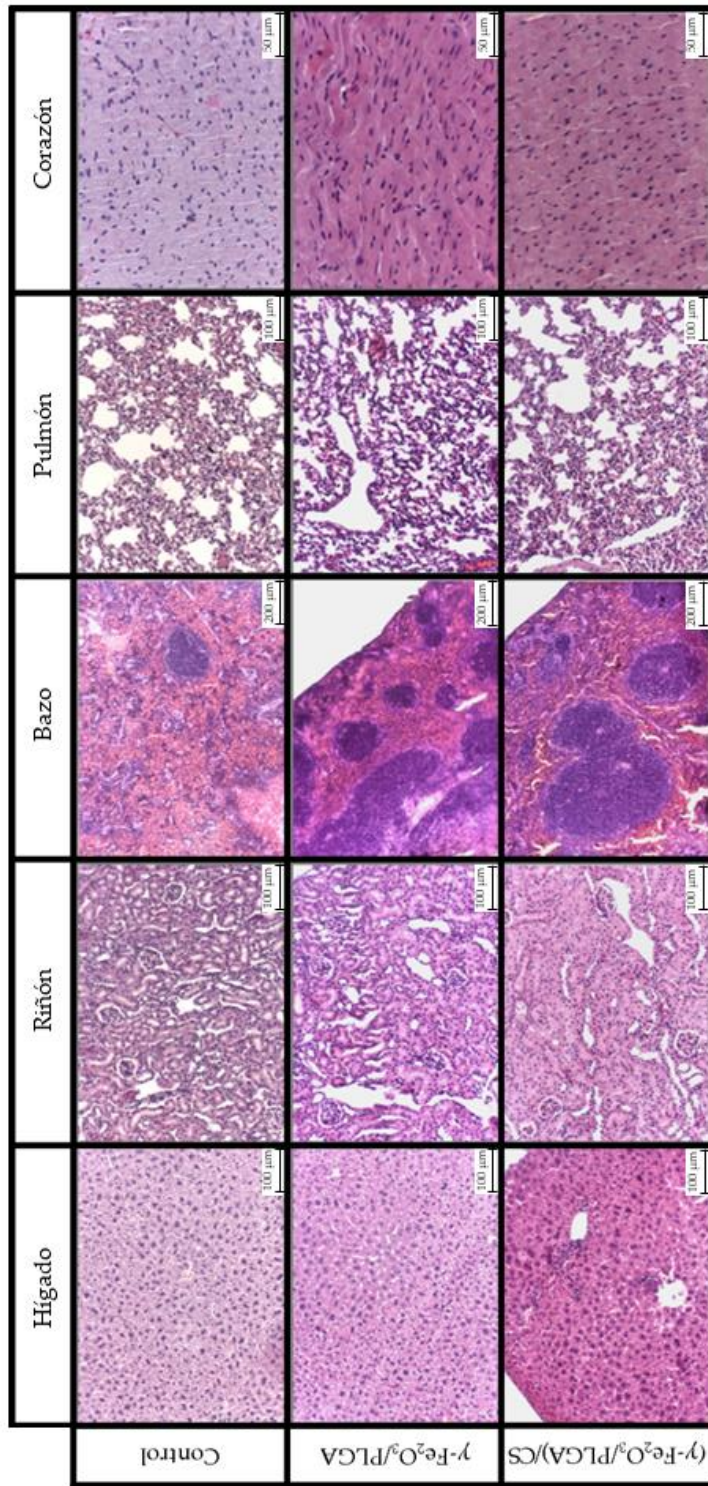


Figura 27. Tinción H&E de secciones histológicas representativas de hígado, riñón, bazo, pulmón y corazón a las 24 h tras la inyección intravenosa de NPs de γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/PLGA)/CS. Se comparan con tinciones H&E control de secciones histológicas de hígado, riñón, bazo, pulmón y corazón.

CAPÍTULO 7

Hipertermia de Fluido Magnético Antitumoral

7.1. Introducción

Las nanoestructuras basadas en óxidos de hierro superparamagnéticos suponen una herramienta de gran valor en biomedicina debido a sus excepcionales características fisicoquímicas y por tanto aplicaciones únicas [Fortin J.P. y cols., 2007]. La hipertermia magnética (HTM) proporciona un tratamiento adicional y mínimamente invasivo contra el cáncer [Sohail A. y cols., 2017; Jadhav S.V. y cols., 2019; Kang J.K. y cols., 2020] además de la posibilidad de una liberación controlada de los agentes terapéuticos cargados en las nanoestructuras [Fortin J.P. y cols., 2007; Reddy L.H. y cols., 2012; Oliveira H. y cols., 2013]. La técnica HTM que emplea nanosistemas magnéticos se conoce como hipertermia de fluido magnético (HTFM) [Hedayatnasab Z. y cols., 2015]. El uso de nanosistemas magnéticos en HTM se propuso por primera vez por Gilchrist y cols. en los años 50 [Gilchrist R.K. y cols., 1957]. El efecto de la HTFM sobre los tejidos tumorales y nanosistemas está basado en la generación de calor por parte de los núcleos de óxido de hierro superparamagnéticos cuando estos están expuestos a un campo electromagnético alterno (CEMA) [Jordan A. y cols., 1993].

7.1.1. Fundamentos de la Hipertermia magnética

El poder calorífico de los óxidos de hierro superparamagnéticos cuando son expuestos a un CEMA está relacionado con mecanismos de disipación de la energía magnética: relajación de Néel y relajación browniana [Fortin J.P. y cols., 2007; Jordan A. y cols., 2009; Reddy L.H. y cols., 2012; Oliveira H y cols., 2013]. Brevemente, los momentos magnéticos de las NPs basadas en óxidos de hierro superparamagnéticos de un único dominio sufren fluctuaciones que son responsables de la relajación de la magnetización tras la desaparición del CEMA [Fortin J.P. y cols., 2007]. Cuando las NPs son expuestas a un CEMA este les suministra energía que excita las fluctuaciones de los momentos magnéticos, convirtiendo la energía magnética en energía térmica [Fortin J.P. y cols., 2007]. Estas fluctuaciones son de dos tipos: las fluctuaciones brownianas de los momentos magnéticos hacen que la partícula rote de acuerdo al CEMA provocando una fricción mecánica (relajación browniana), y fluctuaciones internas del momento magnético dentro de la estructura cristalina (relajación de Néel) (Figura 28) [Hanson M., 1991; Fortin J.P. y cols., 2007; Jordan A. y cols., 2009]. Cada mecanismo de relajación se caracteriza por un tiempo de relajación: tiempo de relajación N (relajación de Néel) y tiempo de relajación B (relajación browniana) [Jordan A. y cols., 2009]. El poder calorífico de una NP magnética va a depender de sus características fisicoquímicas (ejemplos: tamaño, naturaleza del material y tasa de aglomeración) y las propiedades del medio de suspensión (ejemplo: viscosidad), ya que van a condicionar los

mecanismos de Néel y Brown, y el predominio de uno sobre otro [Rosensweig R.E., 2002; Ma M. y col., 2004; Garaio E. y cols., 2014]. Esto queda reflejado en las ecuaciones de los tiempos de relajación del componente N (τ_N ; mecanismo de Néel) (Ec. 18) y del componente B (τ_B ; mecanismo de Brown) (Ec. 19):

$$\tau_N = \tau_0 \exp\left(\frac{KV}{kT}\right) \quad (18)$$

$$\tau_B = \frac{3\eta V}{kT} \quad (19)$$

en donde K es la constante de anisotropía, V el volumen de partícula, k la constante de Boltzmann, T la temperatura y η la viscosidad del medio [Hanson M., 1991].

En base a esto, se seleccionan núcleos superparamagnéticos frente a otro tipo de núcleos magnéticos. Se ha demostrado que partículas de un único dominio absorben más energía cuando son expuestas a un CEMA de intensidad y frecuencia fisiológicamente relevantes que partículas de múltiples dominios [Jordan A. y cols., 1996; Alison E. y cols., 2014].

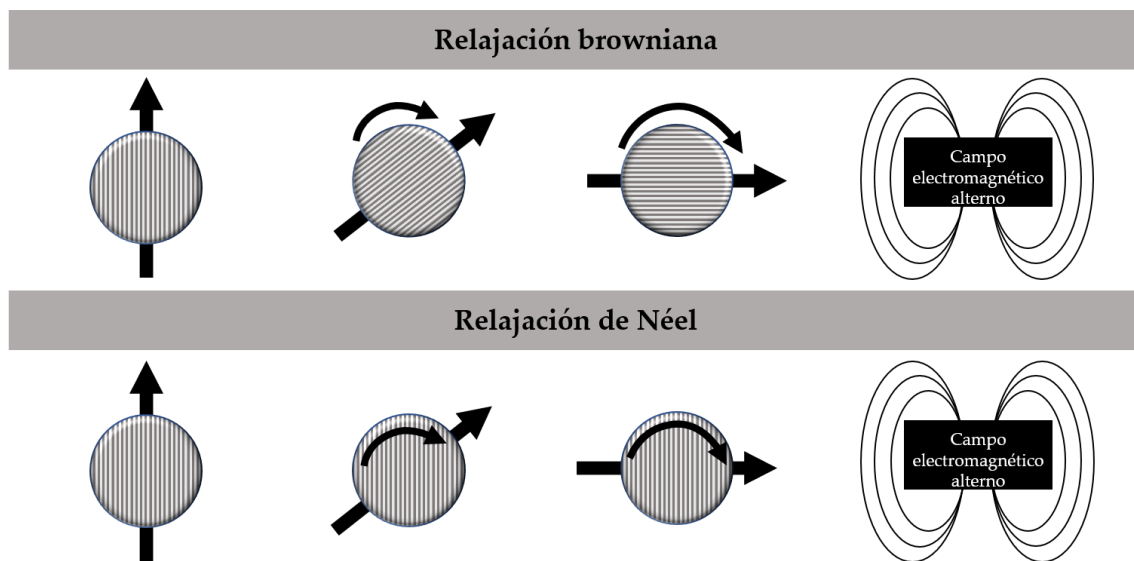


Figura 28. Representación de los movimientos del momento magnético durante la relajación browniana y la relajación de Néel. En el proceso de relajación browniana el momento magnético permanece fijo con respecto a la estructura cristalina, mientras en el proceso de relajación de Néel el momento magnético gira mientras la partícula permanece fija. Reproducido de [Alison E. y cols., 2014].

7.1.2. Hipertermia como tratamiento antitumoral

Las NPs basadas en óxidos de hierro superparamagnéticos son administradas en el organismo y mediante su capacidad de respuesta magnética a campos magnéticos externos

alcanzan la región diana dentro del organismo. Una vez ahí, generan calor bajo el efecto de un CEMA que luego se difundirá fuera de la partícula a las estructuras adyacentes ejerciendo su efecto citotóxico [Krishnan K.M. y cols., 2006; Fortin J.P. y cols., 2007; Reddy L.H. y cols., 2012; Tay Z.W. y cols., 2018]. El tratamiento de una masa tumoral mediante HTM es fructífero siempre y cuando se cumplan una serie de condiciones: aumento rápido de la temperatura que debe mantenerse dentro de unos límites de eficacia y toxicidad. De esta forma, no solo se asegura la eficacia del tratamiento sino también la seguridad, minimizando el daño al tejido sano adyacente [Jadhav S.V. y cols., 2019]. La temperatura de hipertermia oscila entre los 42 °C, temperatura mínima de hipertermia, y 48 °C, temperatura máxima tolerada para la hipertermia. Las células tumorales son más sensibles a la temperatura por lo que dentro de este rango de temperaturas estas células mueren mientras que los tejidos sanos permanecen prácticamente intactos hasta superar los 48 °C [Kumar C.S. y cols., 2011; Arachchige M.P. y cols., 2017 ; Iglesias G.R. y cols., 2018; Jadhav S.V. y cols., 2019].

El mecanismo de muerte celular desencadenado tras el tratamiento con HTM y HTFM es un mecanismo de muerte celular regulado o programado, y no un mecanismo de muerte celular accidental. La necrosis celular es un ejemplo de muerte celular accidental no programada resultado de un aumento descontrolado y muy elevado de la temperatura (> 55 °C). Este proceso provoca la destrucción de la estructura celular y la liberación descontrolada del contenido intracelular, desencadenando una respuesta inflamatoria y citotóxica no esperada con consecuencias graves en el paciente. Por ello es fundamental lograr un control de la temperatura corporal proporcionada por la HTM y HTFM, que desencadene mecanismos de muerte celular regulados. La apoptosis celular es un ejemplo de estos mecanismos, los cuales respetan la integridad de la membrana celular y, por ende, no inducen la respuesta inflamatoria anteriormente comentada. Concretamente, el tratamiento por HTFM puede desencadenar la inducción de la apoptosis y regulación de la transducción de señales. Otros efectos incluyen la desnaturalización, plegamiento y agregación de proteínas, y reticulación del ADN; lo que finalmente deriva en la alteración de funciones celulares [Goldstein L.S. y cols., 2003; Kumar C.S. y cols., 2011]. A nivel tisular la HTFM puede provocar cambios en las condiciones del microambiente tumoral (cambios de pH, perfusión y oxigenación de la zona) [Kumar C.S. y cols., 2011]. Por otro lado, los mecanismos de muerte celular, y las subsiguientes consecuencias, pueden verse condicionados no solo por la temperatura alcanzada por las NPs magnéticas, sino también por la cantidad de estas NPs que llega a penetrar en las células, la duración del tratamiento, es decir de exposición al CEMA, y las características de cada tumor [Kumar C.S. y cols., 2011; Beola

L. y cols., 2020]. Aún dicho esto, las diferentes vías involucradas en la muerte celular no han sido completamente descritas para cada uno de los estímulos desencadenantes [Beola L. y cols., 2020].

El potencial de la HTFM contra el cáncer, no solo reside en su poder citotóxico, sino que también presta ayuda frente a la destrucción tumoral al combinarla con otras aproximaciones terapéuticas (radioterapia, cirugía, quimioterapia, terapia génica e inmunoterapia) [Kumar C.S. y cols., 2011; Lee H. y cols., 2011; Ortega D. y Pankhurst Q.A, 2013; Iglesias G.R. y cols., 2018]. De esta forma, los nanosistemas funcionan como agentes terapéuticos multimodales. Una de las aproximaciones terapéuticas antitumorales con la que la HTFM se puede combinar, es la quimioterapia (ver capítulo 8 “Vehiculización del fármaco cisplatino en los nanosistemas finales”) [Kumar C.S. y cols., 2011; Alison E. y cols., 2014]. Esta asociación de técnicas terapéuticas comenzó a interesar en clínica en los años 70, cuando George Hahn demostró que un aumento de la temperatura en las inmediaciones de la zona de liberación del fármaco afectaba directamente a su eficacia citotóxica [Hahn G.M., 1979]. La HTFM va a potenciar la eficacia terapéutica de los agentes antitumorales cargados en los nanosistemas empleados en la HTFM. El aumento de la eficacia antitumoral de los fármacos se puede atribuir a varios procesos: (a) aumento de la citotoxicidad del fármaco por un incremento de la temperatura, (b) favorecimiento de la captación celular del fármaco (ejemplo: sensibilización de las células por un incremento de la temperatura) [Kumar C.S. y cols., 2011], (c) control de la liberación del fármaco (ejemplo: iniciar o acelerar la liberación del fármaco) (ver capítulo 8 “Vehiculización del fármaco cisplatino en los nanosistemas finales”) [Iglesias G.R. y cols., 2018] y/o (d) mejora de la administración del fármaco mediante el incremento del flujo sanguíneo y permeabilidad vascular por un aumento de la temperatura [Lee H. y cols., 2011].

7.1.3. Sistema experimental de hipertermia magnética

El experimento de HTFM *in vitro* consiste en evaluar la capacidad de los nanosistemas como agentes generadores de calor y como agentes hipertérmicos antitumorales en líneas celulares tumorales. Para llevar a cabo estos estudios se emplea un CEMA, en donde las fuerzas eléctricas y magnéticas son causadas por radiación electromagnética. Los CEMA aplican energía a las NPs dentro del organismo, la cual será absorbida y convertida en energía térmica. Para generar esta energía se utilizan corrientes eléctricas inducidas por ondas electromagnéticas [Jordan A. y cols., 1999; Garaio E. y cols., 2014].

Dos de los parámetros más importantes a tener en cuenta en la HTM y HTFM son: la frecuencia (f) y la intensidad o amplitud del campo magnético (H) [Ma M. y cols., 2004; Fortin J.P. y cols., 2007; Garaio E. y cols., 2014]. Los valores ideales para estos dos parámetros son a día de

hoy puntos de debate, puesto que no hay un consenso acerca de cuáles son realmente los límites de seguridad *in vivo*. En 1984 Atkinson, Brezovich y Chakraborty [Atkinson W.J. y cols., 1984] establecieron el límite de $H \times f$ en $4.85 \times 10^8 \text{ A} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ basándose en el umbral de tolerancia humana al dolor (1 hora de tratamiento). Posteriormente, los investigadores del *Institute for Physical High Technology* (Alemania) Hergt y Durtz ampliaron este límite hasta los $5 \times 10^9 \text{ A} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [Hergt R. y Durtz S., 2007]. La gran mayoría de los estudios de HTM y HTFM *in vivo* se realizan en condiciones intermedias dentro de estos dos límites [Guisasola E. y cols., 2018].

El ajuste de la frecuencia e intensidad del CEMA es un punto importante para la seguridad *in vivo* de la HTFM puesto que estos valores influyen en la tasa de energía absorbida por unidad de masa de NPs (*Specific Absorption Rate*, SAR), que finalmente determina la generación de calor [Rosenweig R.E., 2002; Ma M. y cols., 2004; Fortin J.P. y cols., 2007; Garaio E. y cols., 2014]. Además, el SAR también va a depender del tiempo de relajación de Brown-Neel (τ_R), como se demuestra a continuación (Ec. 20) [de la Presa P. y cols., 2012]:

$$\text{SAR} \propto M_s^2 V H_0^2 T^{-1} [\tau_R (2\pi f)^2 / (1 + (2\pi f \tau_R)^2)] \quad (20)$$

donde H_0 es la amplitud máxima (satisface $\mu_0 M_s V H_0 < k_B T$), f es la frecuencia, M_s es la saturación magnética, V el volumen de NPs y T la temperatura absoluta [de la Presa P. y cols., 2012].

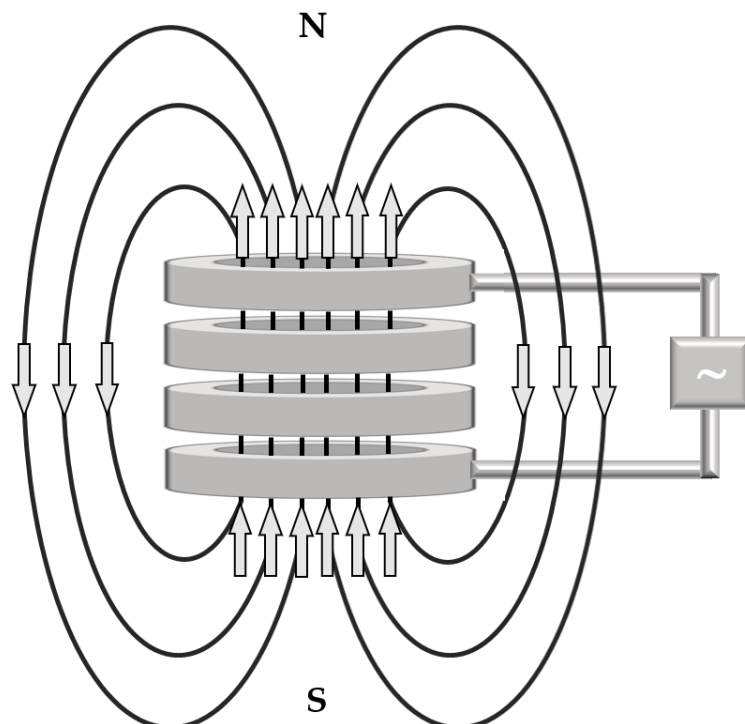


Figura 29. Representación esquemática de la base experimental de la HTM: CEMA inducido por una corriente alterna (~) aplicada a una fuente de campo magnético (bobina o solenoide en el centro de la imagen). Reproducido de Hedayatnasab Z. y cols., 2015

7.2. Capacidad para la hipertermia magnética antitumoral

7.2.1. Metodología

La aplicación de un nanosistema en HTFM antitumoral está en parte condicionada por la capacidad de los nanomateriales magnéticos de producir calor. El calentamiento *in vitro* de dispersiones acuosas de los nanosistemas γ -Fe₂O₃/PLGA (10 mg/mL, 5 mL) y (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS (10 mg/mL, 5 mL) expuestas a un CEMA fue investigado a una temperatura de 25.0 ± 0.5 °C (n = 3). Esta respuesta se comparó con la de una formulación control basada en un medio acuoso sin NPs. El CEMA empleado fue inducido por una fuente de alimentación equipada con un solenoide con las siguientes características: 20 mm de diámetro, 100 mm de longitud y 70 espirales. Los valores de frecuencia e intensidad de este campo magnético generado fueron 250 kHz y 4 kA/m, respectivamente, los cuales siempre estuvieron dentro del promedio fijado para realizar dicha caracterización [Arias J.L. y cols., 2012; Muñoz de Escalona M. y cols., 2016; Santos D.P. y cols., 2011; Clares B. y cols., 2013] y cumpliendo lo indicado por Atkinson, Brezovich y Chakraborty, y Hergt y Dutz [Atkinson W.J. y cols., 1984; Hergt R. y Dutz S., 2007]. En este caso, el producto $H \times f$ da un valor razonable de 1×10^9 A·m⁻¹·s⁻¹ lo que sitúa a este tratamiento por debajo del límite superior. Los datos de temperatura se registraron previa sonicación de las muestras (tiempo: 3 min, frecuencia de sonicación: 42 kHz, potencia de salida: 100 W; baño ultrasónico Bransonic®, Branson Ultrasonics Corporation, EE. UU.), y de forma continuada utilizando un sensor de temperatura constituido por una fibra óptica (monitorización durante 180 min).

7.2.2. Resultados y discusión

En base a que la HTFM antitumoral ha demostrado tener posibilidades más que prometedoras contra el cáncer [Reddy L.H. y cols., 2012; Soares P.I. y cols., 2012; Beola L. y cols., 2018; Gupta R. y Sharma D., 2019] se estudió la capacidad de calentamiento de los nanosistemas γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS expuestos a un CEMA (Figura 30a y Figura 30b, respectivamente).

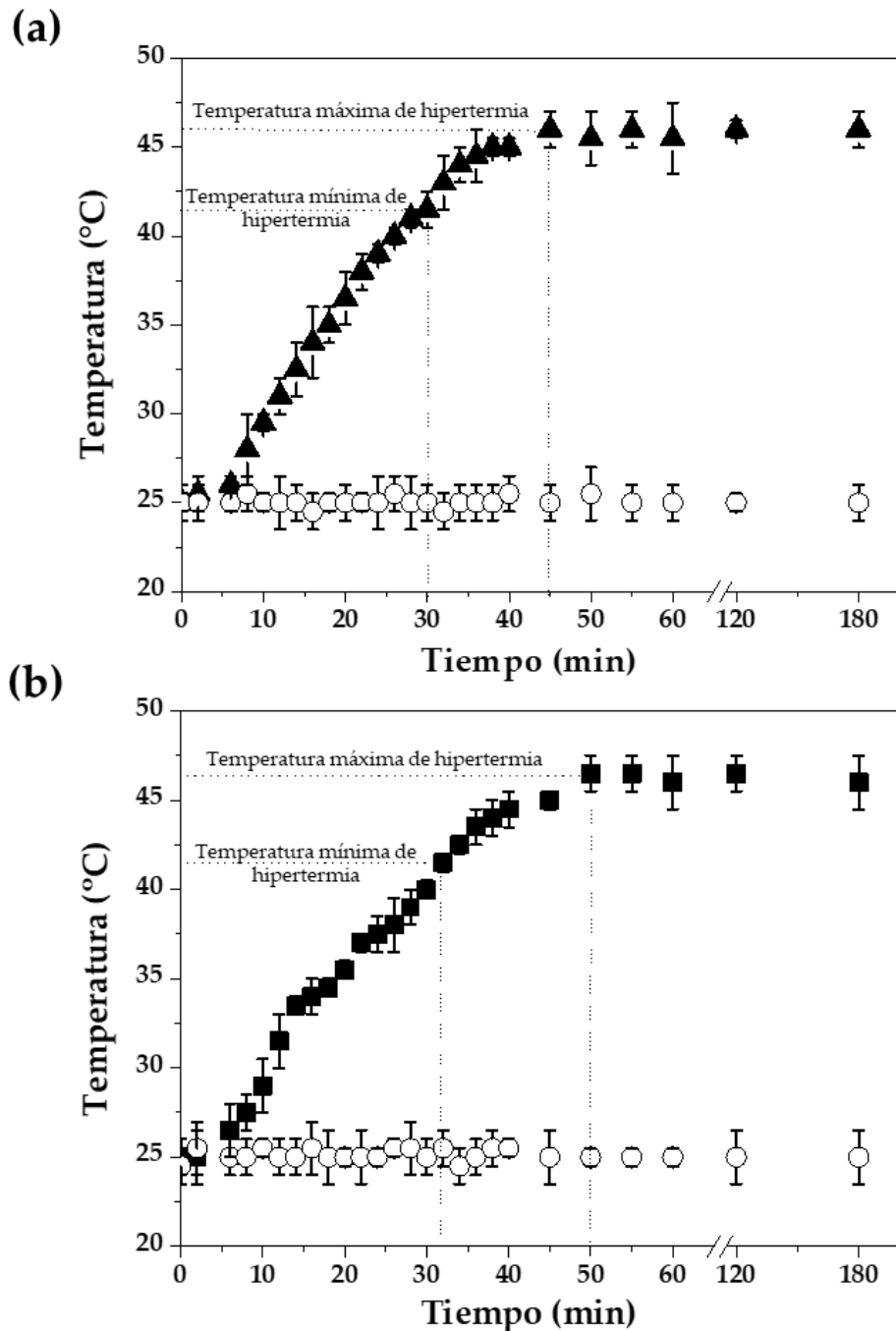


Figura 30. Curva de temperatura (°C) en función del tiempo (min) de una dispersión acuosa de nanocompuestos (a) γ -Fe₂O₃/PLGA (\blacktriangle , 10 mg/mL) y (b) $(\gamma$ -Fe₂O₃/PLGA)QS (\blacksquare , 10 mg/mL) expuestos a un CEMA (250 kHz, 4 kA/m), en comparación con los datos de un control (solución acuosa sin NPs, o).

Las NPs γ -Fe₂O₃/PLGA y $(\gamma$ -Fe₂O₃/PLGA)/QS se transformaron en agentes liberadores de calor, posiblemente gracias a la oscilación del momento magnético de γ -Fe₂O₃ y a la pérdida por histéresis magnética [Reddy L.H. y cols., 2012; Dutz S. y Hergt R., 2014]. Como consecuencia, la temperatura de ambos nanosistemas aumentó de 25 °C a la temperatura mínima de hipertermia, que fue de \approx 42 °C para ambos casos, en un tiempo $d \approx$ 30 min y \approx 32 min para las partículas γ -

$\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ y $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$, respectivamente. Se ha descrito que este tiempo de aproximadamente 30 min es suficiente para destruir una masa tumoral [Dutz S. y Hergt R., 2014; Kettering M. y cols., 2015]. La temperatura máxima alcanzada, $\approx 46^\circ\text{C}$ para ambos casos, se alcanzó después de ≈ 45 min y ≈ 50 min para las partículas $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ y $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$, respectivamente. Tras este máximo, la temperatura se estabilizó hasta el final de ambos experimentos (180 min). Es importante destacar que, si la temperatura del medio excede los 48°C , las células sanas que rodean la masa tumoral sólida también se verán dañadas [Reddy L.H. y cols., 2012; Easo S.L. y Mohanan P.V., 2013; Jadhav S.V. y cols., 2019]. Teniendo en cuenta todo esto, podría postularse un control apropiado sobre la temperatura y el flujo de calor generado por los nanosistemas $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ y $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$; requisito previo importante para la HTFM antitumoral.

7.3. Eficacia *in vitro*: citotoxicidad por hipertermia de fluido magnético antitumoral

7.3.1. Metodología

La eficacia de la capacidad para la HTFM antitumoral de las NPs $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ y $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$ se evaluó en la línea celular tumoral T-84 de adenocarcinoma de colon humano (suministrada por la *American Type Culture Collection*, EE. UU.) en cuatro grupos de muestras diferentes (1 grupo problema: grupo 1; y 3 grupos control: grupos 2, 3 y 4), mediante el ensayo colorimétrico de MTT de acuerdo con la norma ISO-10993-5 [International Organization for Standardization, 2009]. La descripción de esta metodología está detallada en el capítulo 6 “Biocompatibilidad y toxicidad de los nanosistemas”, apartado 6.3.1. “Viabilidad celular relativa (%)”, y se puede encontrar definida en la literatura [Muñoz de Escalona M. y cols., 2016; Khandhar A.P. y cols., 2012; Fantechi E. y cols., 2014].

Las células fueron cultivadas según lo indicado para la línea celular T-84 en el capítulo 6 “Biocompatibilidad y toxicidad de los nanosistemas”, apartado 6.3.1. “Viabilidad celular relativa (%)”. Posteriormente, y tras un recuento celular (cámara de Neubauer), se sembraron en placas de 24 pocillos (10^4 células / pocillo) y se incubaron durante 2 h en presencia (grupos 1 y 2) o ausencia (grupos 3 y 4) de las NP (0.4 %, p/p) ($37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$, atmósfera humidificada al 5% de CO_2) (Incubador CO_2 MCO-19AIC (UV), Sanyo Electric, Japón). A continuación, las suspensiones de células se centrifugaron (10 min, 4.000 rpm) y las NPs no unidas o débilmente unidas a las células, se descartaron. Los sedimentos celulares generados tras el proceso de centrifugado anterior se

resuspendieron en 200 μL de medio de cultivo nuevo. Finalmente, estas muestras celulares fueron expuestas (grupos 1 y 3) o no (grupos 2 y 4) al CEMA durante 1 h, tras la cual se incubaron durante 30 min (25.0 ± 0.5 °C). Después de este proceso, las suspensiones celulares se lavaron dos veces con PBS para volver a ser resuspendidas en medio de cultivo. Para completar el ensayo, las células se sembraron en placas de 24 pocillos (10^4 células/pocillo), se mantuvieron en condiciones de cultivo durante 48 h (37.0 ± 0.5 °C atmósfera humidificada al 5% de CO_2) (Incubador CO_2 MCO-19AIC (UV), Sanyo Electric, Japón), y finalmente, se evaluó la viabilidad celular mediante el anteriormente comentado ensayo colorimétrico de MTT (capítulo 6 “Biocompatibilidad y toxicidad de los nanosistemas”, apartado 6.3.1. “Viabilidad celular relativa (%)”) [Ma J. y cols., 2015; Melguizo y cols., 2015; Ortiz y cols., 2015]. Estas determinaciones se hicieron por triplicado.

En resumen, y como se mencionó anteriormente, las células T-84 se sometieron a diferentes tratamientos: (a) Grupo 1: células T-84 incubadas en presencia de NPs (0,4%, p/p) y bajo la influencia de un CEMA; (b) Grupo 2: células T-84 incubadas en presencia de NPs (0,4%, p/p) pero sin exposición a un CEMA (grupo control); (c) Grupo 3: células T-84 incubadas en ausencia de NPs pero expuestas a un CEMA (grupo control); y (d) Grupo 4: células T-84 incubadas en ausencia de NPs y sin aplicación de un CEMA (grupo de control).

7.3.2. Resultados y discusión

Después de determinar que los nanocompuestos $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ y $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$ son agentes productores/liberadores de calor adecuados para su aplicación en HTFM, se evaluó la eficacia hipertérmica de estas nanoestructuras en células tumorales, concretamente en la línea celular T-84. Estos resultados, expresados en VCR (%) de las células T-84, se encuentran recopilados en la Figura 31.

En comparación con los controles (grupos 2, 3 y 4), los datos experimentales demostraron que las NPs $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ y $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$ sometidas al efecto de un CEMA (250 kHz, 4 kA / m), pueden reducir significativamente la VCR (%) (hasta $\approx 43\%$ y $\approx 39\%$ para $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ y $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$, respectivamente; grupos 1) ($p < 0.05$), por lo que se postula que las partículas $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ y $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})/\text{QS}$ pueden ser unas nano-herramientas prometedoras para la HTFM antitumoral. Curiosamente, se ha evidenciado, por un lado, la falta de citotoxicidad *per se* de las NPs (sin aplicación de un CEMA; grupo 2) y por otro lado, la ausencia de toxicidad de un CEMA cuando se aplica sin la presencia de nanosistemas magnéticos (células incubadas en ausencia de NPs, grupo 3). Dado estos resultados se consideró que el uso en solitario de las NPs o del CEMA no suponía un efecto nocivo contra las células T-84.

Finalmente, los datos de eficacia hipertérmica *in vivo* de las partículas γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS ayudarán a definir claramente el efecto antitumoral de las nanoestructuras.

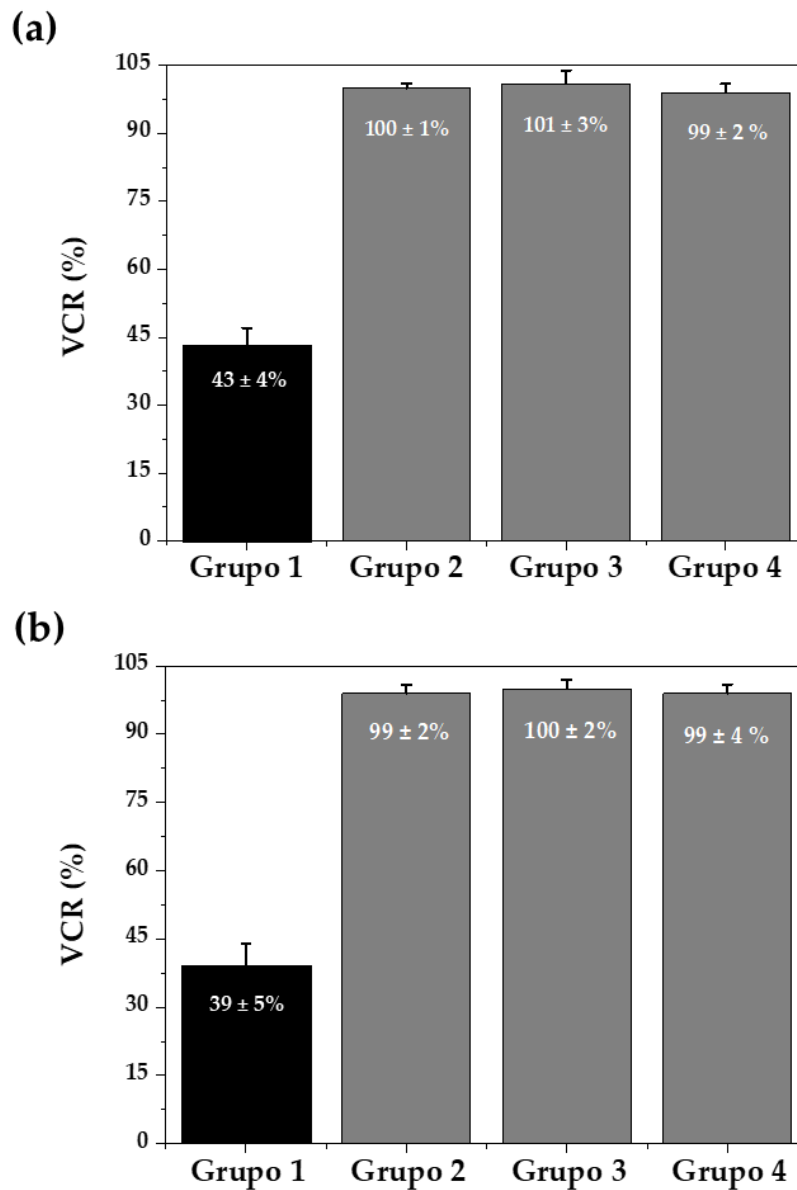


Figura 31. Eficacia hipertérmica *in vitro* de las NPs (a) γ -Fe₂O₃/PLGA, y (b) (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS sobre la VCR (%) de T-84. Los grupos experimentales son células T-84 incubadas en presencia de NPs (0.4%, p/p) y expuestas a un CEMA (250 kHz, 4 kA / m) (grupo 1), o sin exposición a un CEMA (grupo control 2); o, células T-84 incubadas en ausencia de NPs expuestas a un CEMA (250 kHz, 4 kA / m) (grupo de control 3), o sin exposición a un CEMA (grupo de control 4). Los datos experimentales se expresan como medias ± DE (n = 3).

CAPÍTULO 8

Vehiculización del fármaco cisplatino

8.1. Introducción

8.1.1. *Nanosistemas con potencial aplicación en terapéutica*

Tal como se ha indicado en capítulos anteriores, una de las aplicaciones de los nanosistemas en el campo de la biomedicina es actuar como agentes terapéuticos, esto es, sistemas transportadores de sustancias terapéuticas dirigidas a una región diana del organismo. Una vez en la región diana, las sustancias terapéuticas se acumulan ahí e interaccionan específicamente con las células [Torchilin V.P., 2000]. Una nanoestructura puede asociarse con diversas sustancias terapéuticas como fármacos, péptidos, proteínas, anticuerpos y material genético [Sousa D. y cols., 2019]. Los beneficios de esta asociación, en el caso concreto de la quimioterapia, son los siguientes: administración controlada y específica de las sustancias terapéuticas a la región diana [Li Z. y cols., 2017; Amreddy N. y cols., 2018], aumento de la eficacia terapéutica al favorecer la disminución de la dosis necesaria para ejercer el efecto terapéutico, aumento de la seguridad al disminuir los posibles efectos adversos asociados a una amplia biodistribución de la sustancia terapéutica (distribución no específica y extravasación en áreas no objetivo) y altas dosis administradas [Arias J.L., 2011b; Kotelevets L. y cols., 2016; Alshehri S. y cols., 2020; Kim K. y cols., 2020; Liu S. y cols., 2021], control de las características fisicoquímicas del sistema y mejora de las características farmacocinéticas de la sustancia terapéutica (metabolismo acelerado y semivida plasmática corta), y disminución de la susceptibilidad para inducir resistencias. Adicionalmente, asociar agentes quimioterápicos a nanosistemas puede contribuir a la introducción de nuevas estrategias terapéuticas que se combinan con la quimioterapia: quimioterapia y terapia fototérmica [Pei W. y cols., 2020], quimioterapia y terapia fotodinámica [Zhang Y. y cols., 2021] y quimioterapia e hipertermia [Yang, S.-J y cols., 2020].

Además de en el tratamiento del cáncer, la aplicación de nanosistemas como agentes terapéuticos o preventivos también se está estudiando para el abordaje de enfermedades de tipo vírico (VIH en el SIDA; virus SARS-CoV-2 en la COVID-19) [Gu J. y cols., 2017; Mandal S. y cols., 2019; Ansari M.A. y cols., 2020; Chung Y.H. y cols., 2020], enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson [Barcia E. y cols., 2017; Li A. y cols., 2021] y el Alzheimer [Wen M.M. y cols., 2017; Li A. y cols., 2021], y enfermedades de tipo inflamatorio intestinal, como la enfermedad de Crohn [Patel M.M. y cols., 2016; Rouco H. y cols., 2020], entre otras.

8.1.2. *Cisplatino*

El Cisplatino o cis-diaminodicloroplatino (II) (CDDP) es un fármaco antineoplásico de la familia de los compuestos de platino. Por tanto, en el centro de su estructura (complejo planar)

se encuentra el átomo de platino rodeado por cuatro enlaces dirigidos hacia cuatro esquinas donde se encuentran dos átomos de cloro y dos moléculas de amoníaco (NH_3) (Figura 32). El CDDP presenta funciones oncolíticas comparables con las de los agentes antineoplásicos alquilantes [Wellstein A.y cols., 2011 ; Centro de Información online de Medicamentos Autorizados de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (CIMA: AEMPS), 2022] Brevemente, el mecanismo de acción del CDDP radica en su capacidad para unirse covalentemente al ADN formando enlaces cruzados dentro y entre las cadenas provocando finalmente la inhibición de la síntesis de ADN [Iram y cols., 2017; CIMA: AEMPS, 2022]. El efecto antineoplásico parece que también está asociado con una ampliación de la inmunogenicidad tumoral alquilante [CIMA: AEMPS, 2022] y con varias vías de transducción de señales en las que participan proteínas quinasas activadas por mitógenos (*Mitogen Activated Protein Kinases*, MAPK), la proteína quinasa ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein*), que forma parte del mecanismo de respuesta al daño en el ADN, y los supresores de tumores p53 y p73 [López-Vega J.M. y Florez J., 2014]. El resultado final conduce a la muerte celular [Nejati-Koshki K. y cols., 2014; Iram y cols., 2017; Nejdl L. y cols., 2017].

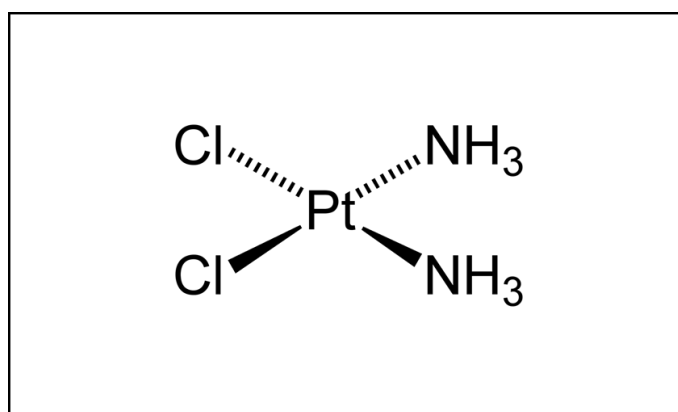


Figura 32. Estructura química del CDDP.

La actividad antineoplásica que parece predominar para el CDDP es la inhibición de la síntesis de ADN, y por ello se detalla más en profundidad a continuación. El CDDP atraviesa la membrana de la célula mediante de un transportador de Cu^{2+} (CTR1) y una vez dentro, donde la concentración de cloruros es más baja, los dos átomos de cloruro del CDDP son desplazados por moléculas de agua. El CDDP pasa de ser una molécula neutra a una cargada positivamente altamente reactiva capaz de interactuar con proteínas y el ADN cargado negativamente [Wellstein A.y cols., 2011; López-Vega J.M. y Florez J., 2014]. Como se adelantaba en líneas anteriores esta interacción consiste en enlaces covalentes irreversibles cruzados entre cadenas e intracatenarios. En el ataque nucleofílico, el CDDP tiene preferencia por la posición N-7 de la

guanina y la adenosina, formándose enlaces guanina-guanina en la misma hebra de ADN, o de guanina-adenina entre dos hebras distintas [López-Vega J.M. y Florez J., 2014; CIMA: AEMPS, 2022]. Concretamente, los enlaces formados entre el platino, la adenosina y la guanina conforma la estructura más citotóxica de todas. Como resultado, el CDDP provoca la inhibición de la replicación y transcripción del ADN, ruptura del material genético y errores en la codificación de una o ambas cadenas de ADN [Wellstein A. y cols., 2011; López-Vega J.M. y Florez J., 2014] y a la apoptosis si estos errores en el ADN son reconocidos por p53 y otras proteínas involucradas en esta vía de control [Wellstein A. y cols., 2011]. En clínica, el CDDP, administrado como único agente antitumoral o en terapia combinada, ha demostrado ser un importante y potente fármaco en quimioterapia contra tumores sólidos: cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de cerebro, cáncer de colon y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello [Wellstein A. y cols., 2011; Dasari S. y cols., 2014]. En concreto, el CDDP es uno de los fármacos antineoplásicos por excelencia empleados en el tratamiento del cáncer de pulmón, en especial, cáncer de pulmón de células pequeñas [Dasari S. y cols., 2014].

Pre y post- administración del fármaco CDDP, se debe seguir un régimen de hiperhidratación para favorecer la diuresis durante y después del tratamiento, esto hará que una de las reacciones adversas más importantes del CDDP, la nefrotoxicidad, se reduzca [Wellstein A. y cols., 2011; Dasari S. y cols., 2014; CIMA: AEMPS, 2022]. El CDDP se administra por vía intravenosa en una solución de cloruro sódico, importante para prevenir la degradación de las moléculas de fármaco. En el torrente sanguíneo estas moléculas de CDDP se pueden unir a proteínas mediante enlaces covalentes haciendo que la concentración libre en sangre disminuya, pero aumente su semivida plasmática. Además, su unión provocará la pérdida irreversible de la actividad biológica de las proteínas [López-Vega J.M. y Florez J., 2014]. El tiempo de semivida plasmática ($t_{1/2}$) del CDDP es de máximo 50 minutos [Wellstein A. y cols., 2011; López-Vega J.M. y Florez J., 2014]. El CDDP tiene una intensa fijación a los tejidos, específicamente, las moléculas de fármaco alcanzan concentraciones elevadas en los riñones, razón de la acción nefrotóxica del quimioterápico. Finalmente, el CDDP se elimina principalmente por la orina [Wellstein A. y cols., 2011].

La dosis de CDDP intravenoso (solución de cloruro sódico) administrada varía en función del tipo de cáncer a tratar y de la pauta a utilizar (monoterapia o combinado con otras terapias). En monoterapia se recomienda: (a) 50 - 120 mg/m² de superficie corporal cada 3-4 semanas o (b) 15 - 20 mg/m² de superficie corporal por día, durante 5 días, cada 3-4 semanas. En terapia combinada, la dosis de CDDP debe reducirse (\approx 20 mg/m² o más una vez cada 3-4 semanas)

[CIMA: AEMPS, 2022]. La dosis también debe ajustarse en caso de insuficiencia renal [López-Vega J.M. y Florez J., 2014].

La farmacocinética del CDDP pone de manifiesto las limitaciones de la quimioterapia convencional con: una rápida eliminación del torrente sanguíneo ($t_{1/2} < 1$ h), inactivación de proteínas plasmáticas y reacciones adversas probablemente asociadas a un direccionamiento inespecífico y altas dosis (nefrotoxicidad, ototoxicidad, mielosupresión, náuseas, vómitos intensos, hipomagnesemia, neuropatía periférica [Wellstein A. y cols., 2011; Nejati-Koshki K. y cols., 2014; Iram y cols., 2017]). Además, la aparición de resistencia al CDDP en algunos pacientes surge también como efecto no deseado [Nejati-Koshki K. y cols., 2014; Iram y cols., 2017; Morovati A. y cols., 2019]. Una de las razones que conducen al desarrollo de resistencias a fármacos de platino es la mayor actividad de los mecanismos intracelulares de reparación del ADN dañado, la reducción de la acumulación de los fármacos en las células, aumento de los niveles de antioxidantes como el glutatión que es capaz de desplazar al platino de su unión con el ADN e inactivación de la vía de apoptosis celular, entre otros muchos mecanismos de generación de resistencias [Wellstein A. y cols., 2011; Shen D.W. y cols., 2012; López-Vega J.M. y Florez J., 2014].

Para vencer todas estas limitaciones de la quimioterapia clásica, se recurre a nuevas formas farmacéuticas en donde se incluyen fármacos como el CDDP, estos son los sistemas coloidales.

8.1.3. Estrategias de diseño de nanotransportadores de fármacos: Carga de fármacos

La incorporación del fármaco CDDP en nanosistemas de transporte y liberación de fármacos con potencial aplicación en cáncer ya se ha propuesto para nanopartículas basadas en PLGA [Avgoustakis K. y cols., 2002; Mattheolabakis G. y cols., 2009] y basadas en QS [Kim, J.-H y cols., 2008; Morovati A. y cols., 2019]. La carga de un compuesto como el CDDP en una NP puede realizarse siguiendo dos metodologías de incorporación de fármacos: (a) absorción del fármaco dentro de la matriz de la nanoestructura (absorción matricial) o (b) adsorción del fármaco a la superficie de la nanoestructura (adsorción superficial). La metodología empleada para la incorporación del fármaco tendrá un efecto en su posterior liberación. El método de absorción matricial es el método principal empleado para la incorporación de fármacos en nanosistemas, y básicamente consiste en introducir el fármaco en la nanoestructura en el momento de la síntesis del nanosistema. Cuando el fármaco es incorporado dentro de la estructura y no en superficie, se espera una liberación controlada y más sostenida en el tiempo en comparación con la liberación de un fármaco adsorbido en la superficie del nanosistema. Esto se debe a que el perfil de liberación estará controlado por la composición de la nanopartícula [Avgoustakis K. y cols., 2002].

Esto se verá en detalle más adelante en este capítulo (apartado 8.1.4. *Liberación de fármacos sensible a estímulos*).

8.1.4. *Liberación de fármacos sensible a estímulos*

Un avance importante en el ámbito de la liberación controlada de agentes terapéuticos y específica de regiones diana se consigue con el uso de nanosistemas que responden a diversos estímulos, ya sean cambios en el medio que les rodea o estímulos externos [Prusty D.K. y cols., 2018]: pH, temperatura, campos electromagnéticos, ultrasonidos, luz, acción enzimática y acción de antioxidantes como el glutatión [Prusty D.K. y cols., 2018; Jiang X. y cols., 2019; Wu L. y cols., 2019]. Un nanosistema con potencial aplicación en cáncer puede diseñarse con unas determinadas características fisicoquímicas que hagan de él un nanotransportador sensible a las características fisiológicas típicas del microambiente tumoral como un pH ácido, una elevada concentración de glutatión y enzimas específicas [Cheng R. y cols., 2013; Jiang X. y cols., 2019]. Adicionalmente, cualquier nanotransportador diseñado adecuadamente puede responder a estímulos externos aplicados intencionadamente, como un campo electromagnético, ultrasonidos y fuente de luz. Concretamente, se han informado grandes beneficios en la ingeniería de nanotransportadores de fármacos sensibles al pH [Nejati-Koshki K. y cols., 2014; Domínguez-Ríos R. y cols., 2019] y/o al aumento de la temperatura producido por el efecto hipertérmico (campo electromagnético) [Babincova M. y cols. 2008; Souza K.C. y cols., 2009]. La liberación del fármaco incorporado en este tipo de nanosistemas se activa cuando este alcanza el intersticio tumoral ($\text{pH} \approx 5$) y/o cuando la zona tumoral diana se somete a la acción de un campo electromagnético alterno de alta frecuencia que provocará un aumento controlado y localizado de la temperatura en la zona tumoral basado en el efecto hipertérmico (ver capítulo 7 “Hipertermia de fluido magnético antitumoral”).

El CDDP ya se ha cargado previamente en nanosistemas basados en PLGA/QS [Babu A. y cols., 2017; Pina M.F. y cols., 2017] pero hasta ahora no se ha caracterizado la respuesta dual al pH y al calor desencadenado por hipertermia magnética.

8.2. **Incorporación del fármaco cisplatino en nanopartículas maghemita/poli(D,L-lactida-co-glicolida)**

La preparación de los nanocompuestos finales ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$)/QS cargados con moléculas de fármaco CDDP se llevó a cabo empleando en la formulación final NPs $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ cargadas

con CDDP con los valores de eficacia de atrapamiento (*Entrapment Efficiency*, EE%) y carga de fármaco (*Drug Loading*, DL%) más altos (es decir, 82 % y 16%, respectivamente; ver apartado 8.4. “Cuantificación *in vitro* de la incorporación del fármaco cisplatino” de este mismo capítulo) (n = 3).

La carga de CDDP en las NPs γ -Fe₂O₃/PLGA se produjo durante el proceso de formación de estas NPs *core/shell*, anteriormente comentado. En este caso, el CDDP se incorporó en los 10 mL de la solución acuosa de PVA (1%, p/v), antes de la adición de la fase orgánica. Se evaluaron diferentes concentraciones de fármaco: 1×10^{-5} , 5×10^{-5} , 1×10^{-4} , 5×10^{-4} y 1×10^{-3} M.

8.3. Confirmación de la incorporación del fármaco cisplatino en la matriz del poli(D,L-lactida-co-glicolida)

8.3.1. Metodología

Una vez incorporado el fármaco CDDP en las NPs γ -Fe₂O₃/PLGA, se comprobó que realmente las moléculas de fármaco estaban embebidas en la matriz polimérica de PLGA, y no adheridas a la superficie de las NPs γ -Fe₂O₃/PLGA. Para demostrar esta situación, suspensiones acuosas de NPs (0.1%, p/v) cargadas con CDDP se sometieron a un análisis electroforético (pH \approx 6; Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido). Las medidas de ζ (mV) se realizaron a diferentes concentraciones de KNO₃ (1×10^{-5} , 1×10^{-4} , 1×10^{-3} , 1×10^{-2} M y 1×10^{-1} (25.0 ± 0.1 °C; n = 3). La metodología está descrita en el capítulo 4 “Caracterización física, química y fisicoquímica”, apartado 4.2. “Estudio de la evolución de las propiedades eléctricas superficiales”.

La técnica de electroforesis es esencial para este tipo de estudios debido a su alta sensibilidad a cualquier cambio en la superficie de las partículas [Reddy L.H. y cols., 2012; Clares B. y cols., 2013].

8.3.2. Resultados y discusión

Las condiciones fijadas para la síntesis de NPs de γ -Fe₂O₃/PLGA cargadas con CDDP determinaron un atrapamiento mecánico adecuado del fármaco hidrófilo [Tian J. y cols., 2017] en la matriz de PLGA hidrófoba [Pérez-Artacho B. y cols., 2012]. Previamente se ha determinado la precipitación prácticamente instantánea de la matriz polimérica justo al entrar este polímero en contacto con la fase acuosa durante la síntesis de las NPs (técnica de nanoprecipitación con evaporación del disolvente) [Vauthier C. y cols., 2009; Holgado, M.A. y cols., 2011]. Como

consecuencia, el atrapamiento mecánico de las moléculas de fármaco dentro de la red polimérica se vio facilitado [Bilati U. y cols., 2005]. De forma complementaria, los agentes tensoactivos, como por ejemplo los poloxámeros o el PVA, pueden inducir la apertura de las cadenas del polímero para crear un espacio dentro de la matriz de PLGA donde se podrían incorporar las moléculas de fármaco [Soppimath, K.S. y cols., 2001; Vauthier C. y cols., 2009]. Además, la incorporación de CDDP en la matriz de PLGA podría ser la consecuencia de interacciones electrostáticas atractivas entre las moléculas de CDDP, cargadas positivamente cuando el grupo $-NH$ está protonado, y el polímero cargado negativamente (≈ -10 mV a pH natural 6). Las repulsiones electrostáticas entre las moléculas de CDDP, cargadas positivamente, y los núcleos de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ cargados positivamente ($\approx +20$ mV a pH natural 6) pueden prevenir la adsorción del fármaco en estos óxidos de hierro.

La incorporación del fármaco CDDP en la matriz de PLGA se confirmó al observar los resultados aportados por las mediciones electroforéticas (Figura 33).

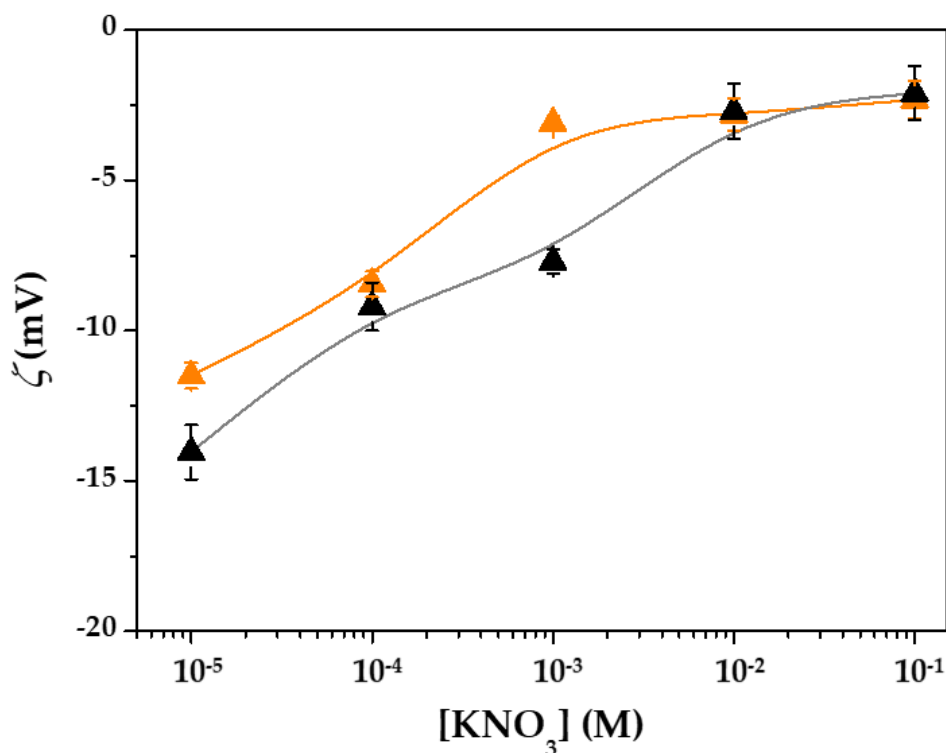


Figura 33. Potencial zeta (ζ , mV) de las partículas de (▲) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ "vacías" y (▲) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ cargadas con CDDP en función de la concentración molar de KNO_3 , a un pH constante (pH ≈ 6).

Los comportamientos (ζ , mV) de las partículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ no cargadas y de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ cargadas con CDDP fueron bastante similares entre sí. Este hallazgo determina que no existe ningún tipo de alteración en la superficie de las NPs cuando se cargaron con el agente quimioterápico, es decir, que no hay restos de moléculas de CDDP adheridas a la superficie de

las NPs, lo que puede sugerir una absorción eficiente de las moléculas de CDDP en los nanocompuestos γ -Fe₂O₃/PLGA.

8.4. Cuantificación *in vitro* de la incorporación del fármaco cisplatino

8.4.1. Metodología

La evaluación de la cantidad de agente antitumoral incorporada en las partículas γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS se realizó por triplicado mediante un procedimiento indirecto y otro directo, pero siempre siguiendo una metodología de detección basada en determinaciones espectrofotométricas UV-Vis de las moléculas de CDDP (espectrofotómetro UV-Vis Lambda™ 25, Perkin Elmer Inc., EE. UU.). El método directo se propuso como mejora de la determinación de la incorporación de CDDP en NPs de forma indirecta, que es el procedimiento clásico.

Por un lado, el método indirecto consiste en la determinación mediante espectroscopía UV-Vis de las moléculas de CDDP remanentes en el sobrenadante recogido después de varios procesos de limpieza de las NPs: separación magnética (imán de 0.4T) y centrifugación del sobrenadante recogido tras la separación magnética (60 min a 11.000 rpm, Centrifuge 5804; Eppendorf Ibérica S.L.U., España). De esta forma, la cantidad de CDDP incorporado en las NPs (mg) se determinó indirectamente calculando la diferencia entre la cantidad total de fármaco CDDP utilizado (mg) y la cantidad de fármaco CDDP determinado en los distintos sobrenadantes, es decir la cantidad de moléculas de CDDP no incorporadas en las NPs. La centrifugación de los sobrenadantes resultantes de la separación magnética tuvo como objetivo la eliminación de posibles partículas no magnéticas o con baja capacidad magnética.

Por otro lado, la cuantificación de la incorporación del fármaco CDDP en los nanocompuestos mediante el método directo consistió en la medición por espectroscopía UV-Vis de la concentración de CDDP en las muestras de NPs cargadas tratadas por medio de un proceso de digestión. Brevemente, suspensiones acuosas de NPs de γ -Fe₂O₃/PLGA cargadas con CDDP se aislaron del medio mediante la aplicación de un campo magnético (imán de 0.4T) y la posterior evaporación controlada del remanente acuoso en estufa a 35.0 ± 0.5 °C. Después, a esta muestra seca de NPs de γ -Fe₂O₃/PLGA cargadas con CDDP (21 mg de NPs) se le añadieron 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) para destruir la capa polimérica de PLGA [Fasehee y cols., 2017]. Las muestras de NPs en DMSO (4.2 mg/mL, 5 mL) se sonicaron (frecuencia de sonicación: 42 kHz, potencia de salida: 100 W; baño ultrasónico Bransonic®, Branson Ultrasonics Corporation, EE. UU.) durante 10 min, tras lo cual se dejaron en reposo durante la noche. Al día siguiente, estas mismas muestras se centrifugaron (2 ciclos de 20 min a 11.000 rpm, Centrifuge 5804; Eppendorf

Ibérica S.L.U., España), y el sobrenadante se rescató y se analizó para determinar la concentración de CDDP mediante espectroscopía de UV-Vis [Nassir A.M. y cols., 2018].

En todas estas cuantificaciones, se tuvieron en cuenta las contribuciones a la absorbancia de fuentes distintas a las variaciones en la concentración del fármaco, es decir, PVA, ácido acético y Kolliphor® P-188, restando la absorbancia del sobrenadante obtenido bajo las mismas condiciones anteriormente comentadas, pero sin la incorporación del fármaco CDDP en la síntesis de NPs.

Las medidas de absorción UV-Vis se realizaron a la longitud de onda de máxima absorbancia de este quimioterapéutico: 301 nm. El método fue previamente validado, verificándose su precisión, exactitud y linealidad. Se observó una buena linealidad a esta longitud de onda entre los datos de absorbancia y concentración del fármaco CDDP determinada por un coeficiente de correlación lineal ($r = 0,997$).

La incorporación del fármaco CDDP en las NPs de γ -Fe₂O₃/PLGA y, por ende en las NPs de (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS, se calculó en términos de EE (%) y DL (%) (Ec. 21 y Ec. 22):

$$EE (\%) = \left(\frac{\text{cantidad de CDDP (mg) cargado en las NPs}}{\text{cantidad total de CDDP utilizado (mg)}} \right) \times 100 \quad (21)$$

$$DL (\%) = \left(\frac{\text{cantidad de CDDP (mg) cargado en las NPs}}{\text{cantidad total de NPs cargadas con CDDP (mg)}} \right) \times 100 \quad (22)$$

La determinación directa e indirecta de los valores de EE% y DL% permite comparar ambas metodologías.

8.4.2. Resultados y discusión

Los valores de EE (%) y DL (%) del fármaco CDDP en los nanocompuestos γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS se recogen en la Tabla 9.

Tabla 9. Valores de EE (%) y DL (%) para CDDP en las partículas γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS.

Nanocompuestos	[CDDP] ($\mu\text{g/mL}$)	[CDDP] (M)	EE _i (%)	EE _d (%)	DL _i (%)	DL _d (%)
γ -Fe ₂ O ₃ /PLGA	3	10 ⁻⁵	13.399 ± 2.191	9.677 ± 0.406	0.021 ± 0.003	0.014 ± 0.001
	15	5 × 10 ⁻⁵	26.318 ± 0.259	25.456 ± 0.318	0.212 ± 0.079	0.205 ± 0.071
	30	10 ⁻⁴	64.166 ± 1.545	44.372 ± 1.019	0.995 ± 0.163	0.689 ± 0.138
	150	5 × 10 ⁻⁴	62.273 ± 4.048	58.111 ± 0.706	5.945 ± 0.364	5.732 ± 0.698
	300	10 ⁻³	81.555 ± 0.228	75.294 ± 0.304	16.057 ± 2.359	14.813 ± 2.176
(γ -Fe ₂ O ₃ /PLGA)/QS	300	10 ⁻³	81.311 ± 0.089	-	14.974 ± 3.025	-

Como se esperaba, la concentración de fármaco influyó positivamente en la absorción de este en la nanoestructura de γ -Fe₂O₃/PLGA. Además, no se observaron modificaciones relevantes en los valores de EE (%) y DL (%) cuando estas partículas se recubrieron con QS.

Por otro lado, se puede comprobar como el método directo e indirecto arrojaron valores de EE (%) y DL (%) para las NPs de γ -Fe₂O₃/PLGA bastante similares, lo que determinó la aplicación de un método indirecto para la cuantificación de la incorporación de CDDP en las partículas finales de (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS. Esta metodología fue preferible, a igualdad de valores de EE (%) y DL (%), debido a su menor complejidad y menor grado de manipulación de la muestra, es decir, no implicó la destrucción de las NPs.

La incorporación de CDDP en las partículas (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS reportó valores de EE (%) y DL (%) mayores (\approx 81% y 15%, respectivamente) a los previamente atribuidos a partículas no magnéticas basadas en PLGA/QS (EE \approx 44%; DL \approx 9%) [Babu A. y cols., 2017].

8.5. Liberación *in vitro* del fármaco cisplatino desde nanopartículas (maghemita/poli(D,L-lactida-co-glicolida))/quitosano

8.5.1. Metodología

El perfil de liberación de un fármaco desde los nanosistemas está determinado parcialmente por la sensibilidad del nanosistema a estímulos externos (por ejemplo, diferentes valores de pH o temperatura) [Arias J.L. y cols., 2012]. Los valores de pH del cuerpo humano difieren mucho según el órgano, tejido, célula o incluso orgánulo. Concretamente, el pH en la inmediación de los vasos sanguíneos y el pH extracelular en un tejido sano es de \approx 7.4 [Reshetnyak Y.K., 2015], mientras que los entornos endo- y liso-somales son levemente más ácidos (alrededor de 5.5 en células tumorales) [Sun Y. y cols., 2018]. Por otro lado, el pH extracelular y endo- / liso-somal en tejidos tumorales (alrededor de 5.5 en células tumorales) es más bajo que el pH respectivo en el tejido sano [Reshetnyak Y.K., 2015].

Los nanocompuestos sensibles a pHs ácidos ofrecen cinéticas de liberación aumentadas cuando estos son expuestos a medios ácidos como el ambiente ácido del tejido tumoral o el de los lisosomas (implica absorción celular). De esta forma, la concentración de fármaco en la zona de liberación se ve aumentada [Arias J.L. y cols., 2012].

Los experimentos de liberación del fármaco CDDP desde los nanocompuestos se basaron en el método de la bolsa de diálisis (n = 3), y se llevaron a cabo utilizando las partículas finales (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS con los valores de EE (%) y DL (%) más altos (81% y 15% para (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS); ver apartado 8.4. "Cuantificación *in vitro* de la incorporación del fármaco

cisplatino” de este mismo capítulo) alcanzados con la concentración mínima de fármaco (10^{-3} M) [Clares B. y cols., 2013; El-Hammadia M.M. y cols., 2017]. La bolsa de diálisis va a retener a las NPs dentro, permitiendo únicamente la salida del fármaco liberado de la NP al medio de liberación.

Los medios de liberación empleados fueron tampones a base de ácido cítrico-fosfato de sodio ($C_6H_8O_7-Na_2HPO_4$) o ácido cítrico-hidróxido de sodio ($C_6H_8O_7-NaOH$) que reproducen el pH del torrente sanguíneo ($pH 7.4 \pm 0.1$) o el microambiente ácido de un tumor ($pH 5.0 \pm 0.1$) [Chen D. y cols., 2016], respectivamente. Ambos se mantuvieron a la temperatura normal del cuerpo humano (normotermia o eutermia, 37.0 ± 0.5 C), o a la temperatura representativa de los experimentos de liberación de fármacos favorecida por el efecto de hipertermia magnética (45.0 ± 0.5 C) [Kim H.-C. y cols., 2015; Chen L. y cols., 2018; Amin M. y cols., 2020]. Esta última temperatura es también la temperatura máxima de hipertermia característica de los coloides magnéticos comúnmente utilizados como agentes de hipertermia magnética para el tratamiento del cáncer [Park J. y cols., 2019; Amin M. y cols., 2020.]. En total, fueron 4 los ensayos de liberación *in vitro* que se llevaron a cabo (n=3).

Concretamente, estos comenzaron con el tratamiento de las membranas de diálisis (2000 Da, Spectrum® Spectra / Por® 6, New Brunswick, EE. UU.): se sumergieron en agua a 25.0 ± 0.5 C durante 12 h. Después, 2 mL de la dispersión acuosa (pH de 7.4 ± 0.1 o pH de 5.0 ± 0.1) NPs de (γ - Fe_2O_3 /PLGA)/QS cargadas con CDDP (contenían 2.5 mg/mL de CDDP) se vertieron en la bolsa de diálisis con los dos extremos correctamente cerrados. Las bolsas de diálisis se colocaron en un vaso de precipitados de vidrio que contenía 0.1 L de medio de liberación y se agitaron a 100 rpm. A intervalos de tiempo prefijados, se extrajo un mL del medio para análisis espectrofotométrico UV-Vis del contenido en CDDP del medio (301 nm; procedimiento analítico detallado en el apartado 8.4 “Cuantificación *in vitro* de la incorporación del fármaco cisplatino” de este mismo capítulo para cuantificar la carga de fármaco). Tras el muestreo, se añadió un volumen igual del medio de liberación, también a 37.0 ± 0.5 o 45.0 ± 0.5 °C, para mantener las condiciones de los ensayos. La velocidad de agitación, la temperatura y el pH del medio de liberación se mantuvieron fijos durante todo el experimento.

Finalmente, los resultados de los ensayos de liberación *in vitro* del fármaco se expresaron como un porcentaje de fármaco liberado (%) en función del tiempo. El % de fármaco liberado se determinó mediante la siguiente ecuación (Ec. 23) [El-Hammadia M.M. y cols., 2017]:

$$CDDP \text{ liberado } (\%) = \left(\frac{\text{Cantidad de CDDP liberado (mg)}}{\text{Cantidad de CDDP incorporado en las NPs (mg)}} \right) \times 100 \quad (23)$$

8.5.2. Resultados y discusión

La liberación sensible al pH de CDDP de las NPs (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS se evaluó a 37.0 ± 0.5 °C empleando distintos medios de liberación que reproducen el pH 7.4 del torrente sanguíneo o el microambiente ácido tumoral (pH ≈ 5.0) (Figura 34). Se identificó un perfil de liberación bifásico, que es característico de las partículas de PLGA [Avgoustakis K. y cols., 2002; El-Hammadi M.M. y cols., 2017] y QS [Kim J.-H. y cols., 2008; Arias J.L. y cols., 2011a], y que se ha visto también para nanoestructuras mixtas de PLGA/QS cargadas con paclitaxel [Babu A. y cols., 2017] e itraconazol [Alhakamy N.A. y cols., 2019]. En detalle, el proceso comenzó con una liberación rápida de fármaco, que tuvo lugar en las 6 primeras horas: se alcanzó un 21% a pH 7.4 y un 39% a pH 5.0. Después, el CDDP restante se liberó lentamente durante aproximadamente las siguientes 154 horas, a pH 7.4, y 66 horas, a pH 5.0. Este característico perfil bifásico de liberación podría atribuirse inicialmente a la difusión del fármaco CDDP a través de la arquitectura de la estructura de PLGA/QS y posteriormente a la degradación/erosión de estas matrices poliméricas durante la fase final de liberación del fármaco [Durán-Lobato M. y cols., 2014; El-Hammadi M.M. y cols., 2017; Pretel E. y cols., 2017]. Esto puede sugerir que la mayor parte de las moléculas de CDDP se encontraban atrapadas en la matriz polimérica de PLGA. El comportamiento de liberación de CDDP sensible al pH se identificó en la Figura 34, concretamente la liberación de las moléculas del fármaco CDDP es 1.4 veces más rápida a pH 5.0 en comparación con la velocidad de la liberación a pH 7.4 ($p < 0.05$). En comparación con el comportamiento de liberación en el medio que simula el ambiente sanguíneo, la rápida liberación del fármaco al pH ácido intratumoral puede ser consecuencia de la mayor solubilidad del QS a valores de pH más bajos [Arias J.L. y cols., 2011a; Taghavi S. y cols., 2017] y la degradación acelerada del PLGA por el aumento de la hidrólisis de los enlaces éster de su estructura química [Jain G.K. y cols., 2010; Domínguez-Ríos R. y cols., 2019]. La presencia del recubrimiento hidrófilo que aporta el QS a la matriz de PLGA podría mejorar la interacción de las NPs con el medio acuoso ácido que las rodea, facilitando así una degradación del PLGA por hidrólisis más rápida y, en consecuencia, una liberación de CDDP más rápida en comparación con lo que se vio que ocurría a pH 7.4 [Jain G.K. y cols., 2010].

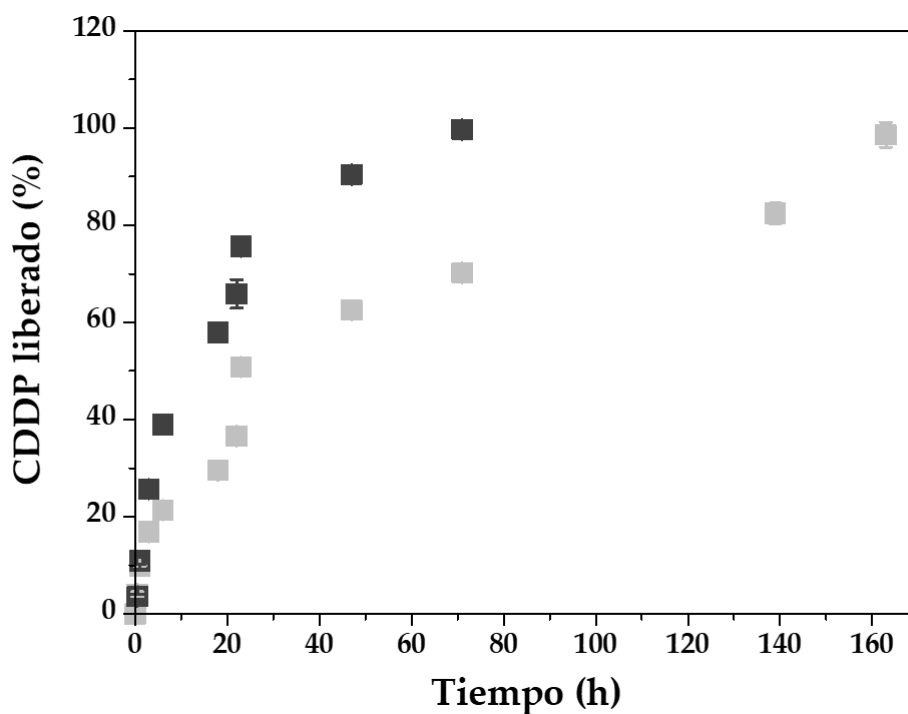


Figura 34. Comportamiento de liberación *in vitro* de CDDP (%) desde las NPs (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS en función del tiempo de incubación (h) a 37.0 ± 0.5 °C y a pH 7.4 ± 0.1 (■) o pH 5.0 ± 0.1 (■). Los datos se presentan como valor medio y desviaciones estándar (DE) (n = 3).

La liberación *in vitro* de las moléculas del fármaco CDDP se vio aumentada de forma considerable cuando las NPs (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS se mantuvieron a la temperatura comúnmente establecida en la hipertermia magnética (45.0 ± 0.5 °C), a partir de la cual se desencadena la liberación del fármaco [Baeza A. y cols., 2012; Kim H.-C. y cols., 2015; Chen L. y cols., 2018; Amin M. y cols., 2020]. A esta temperatura de hipertermia (45.0 ± 0.5 °C), el proceso de liberación de CDDP fue muy rápido (Figura 35), en comparación con el de la liberación a un pH fisiológico de 7.4 ± 0.1 . Concretamente, la liberación total del fármaco CDDP se completó en 10 h, a 7.4 ± 0.1 , y en 6 h, a pH 5.0 ± 0.1 . La rápida liberación de CDDP desde las NPs (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS podría ser el resultado de la degradación mediada por calor [Dunne M. y cols., 2000] y la permeabilidad mejorada del PLGA a temperaturas superiores a la Tg (≈ 40 °C) [Park K. y cols., 2021].

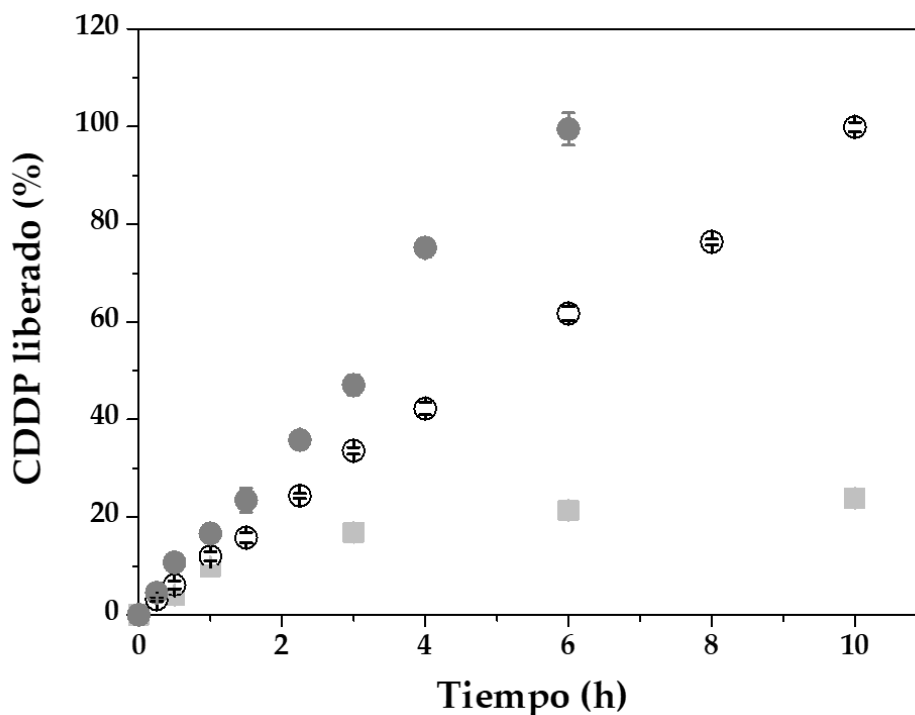


Figura 35. Comportamiento de liberación *in vitro* de CDDP (%) desde las NPs (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS en función del tiempo de incubación (h) a pH 7.4 ± 0.1 y 37.0 ± 0.5 °C (■), pH 7.4 ± 0.1 y 45.0 ± 0.5 °C (○), y pH 5.0 ± 0.1 y 45.0 ± 0.5 °C (●). Los datos se presentan como valor medio y desviaciones estándar (DE) (n = 3).

Analizando los resultados mostrados en las Figuras 34 y 35, se podría postular que los nanocompuestos de (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS pueden mostrar un comportamiento de liberación de CDDP sensible al pH y al calor del medio que les rodea. Esto da lugar a un proceso de liberación del fármaco quimioterápico 4.7 veces más rápido a un pH 5.0 ± 0.1 y a una temperatura de 45 °C en comparación con las condiciones fisiológicas de pH 7.4 ± 0.1 y temperatura 37 °C (p < 0.05). El valor de 4.7 se estimó para el tiempo = 6 h, momento en que el 100% de las moléculas de fármaco se liberaron a pH 5.0 ± 0.1 y 45 °C, mientras que solo el 21% de las moléculas de CDDP se liberó a pH 7.4 ± 0.1 y 37 °C. Finalmente, y observando también las Figuras 8 y 9, se podría concluir que las partículas funcionalizadas con QS podrían considerarse nanosistemas sensibles a un campo magnético, al pH y al calor (hipertermia), comportamientos que probablemente vayan a facilitar la acumulación selectiva *in vivo* de moléculas de CDDP en la zona del intersticio tumoral o incluso intracelularmente, esto es, dentro de los lisosomas tras la captación celular [Schmaljohann D. y cols., 2006; Kalhapure R.S. y cols., 2018; Mai B.T. y cols., 2018].

8.6. Eficacia terapéutica *in vitro* de nanopartículas (maghemita/poli(D,L-lactida-co-glicolida))/quitosano cargadas con cisplatino.

8.6.1. Metodología

La capacidad citotóxica del fármaco CDDP encapsulado en las NPs (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS se evaluó mediante el ensayo MTT (ver capítulo 6 “Biocompatibilidad y toxicidad de los nanosistemas”, apartado 6.3.1. “Viabilidad celular relativa (%)”) utilizando la línea celular A-549 de adenocarcinoma de pulmón humano (*American Type Culture Collection*, EE. UU.). La metodología relacionada con el cultivo de la línea celular también está descrita en el capítulo 6 “Biocompatibilidad y toxicidad de los nanosistemas”, apartado 6.3.1. “Viabilidad celular relativa (%)”. En este caso, se compararon los datos del CDDP cargado en las NPs (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS con los obtenidos al exponer a las células a moléculas de CDDP libre (n = 3).

Previo al análisis MTT, la línea celular A-549 se cultivó en DMEM (Sigma-Aldrich Chemical Co., EE. UU.) suplementado con FBS inactivado por calor al 10% (Gibco, Madrid, España), y una mezcla de antibióticos penicilina-estreptomicina al 1%. (Antibióticos SA, España). Las condiciones de cultivo fueron las siguientes: 37.0 ± 0.5 °C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5% (Incubador CO₂ MCO-19AIC (UV), Sanyo Electric, Japón). A continuación, se realizó un recuento celular empleando la cámara de Neubauer para después sembrar en placas de 24 pocillos 5.5 × 10³ células/pocillo. Se incubaron durante la noche a 37.0 ± 0.5 °C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂ (Incubador CO₂ MCO-19AIC (UV), Sanyo Electric, Japón). Al día siguiente, el medio de cultivo se sustituyó, por un lado, por un medio nuevo con un determinado rango de concentraciones de NPs cargadas con CDDP y por otro, con CDDP libre. La concentración equivalente de CDDP empleada osciló entre 1 y 20 g/mL (concentración de NPs: entre 6.5 y 130 g/mL). Tras 72 horas de incubación a 37.0 ± 0.5 °C y atmósfera humidificada al 5% de CO₂ (Incubador CO₂ MCO-19AIC (UV), Sanyo Electric, Japón) se llevó a cabo el ensayo MTT siguiendo el protocolo recogido en el capítulo 6 “Biocompatibilidad y toxicidad de los nanosistemas”, apartado 6.3.1. “Viabilidad celular relativa (%)”.

La viabilidad celular relativa (RCV, %) se calculó mediante una variante de la ecuación 17 indicada en el capítulo 6 “Biocompatibilidad y toxicidad de los nanosistemas”, apartado 6.3.1. “Viabilidad celular relativa (%)”.

$$VCR (\%) = \left(\frac{\text{Densidad óptica células tratadas}}{\text{Densidad óptica células control}} \right) \times 100 \quad (24)$$

Finalmente, la concentración de fármaco capaz de provocar el 50% de la inhibición celular (IC₅₀) se estimó mediante un análisis de regresión no lineal (GraphPad Prism 9.1.0, GraphPad

Software Inc., CA, EE. UU.). Esta determinación se realizó con el objetivo de favorecer la comparación de la potencia citotóxica del fármaco CDDP libre con la del fármaco asociado a las NPs (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS.

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el paquete de software IBM® SPSS® Statistics (versión 26.0; IBM Corporation, EE. UU.). Se empleó la prueba *t-Student* para comparar los resultados considerando un intervalo de confianza del 95%. Los datos experimentales se expresaron como valor medio \pm DE (n =3), y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $p < 0.05$, o altamente significativas a $p < 0.01$

8.6.2. Resultados y discusión

En la Figura 36 se puede observar la relación existente entre la dosis de distintas formulaciones de CDDP y la inhibición del crecimiento de células cancerosas A-549. A concentraciones de CDDP equivalentes de 3 a 20 g/mL (esto es: concentraciones de NPs de 20 a 130 g/mL), se observó un aumento muy significativo de la actividad antitumoral del fármaco cuando este se cargó en los nanosistemas (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS ($p < 0.01$ de 3 a 10 g/mL; y $p < 0.001$ de 10 a 20 g/mL). Estas NPs de (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS cargadas con CDDP se consideran por tanto herramientas con potencial citotóxico, según la norma ISO-10993-5 (valores VCR < 70%) [International Organization for Standardization, 2009]. Además, el valor de IC₅₀ de las NPs (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS cargadas con CDDP (4.57 ± 0.33 g/mL) fue 1.6 veces menor que la de este fármaco libre (7.48 ± 0.37 g/mL) ($p < 0.05$).

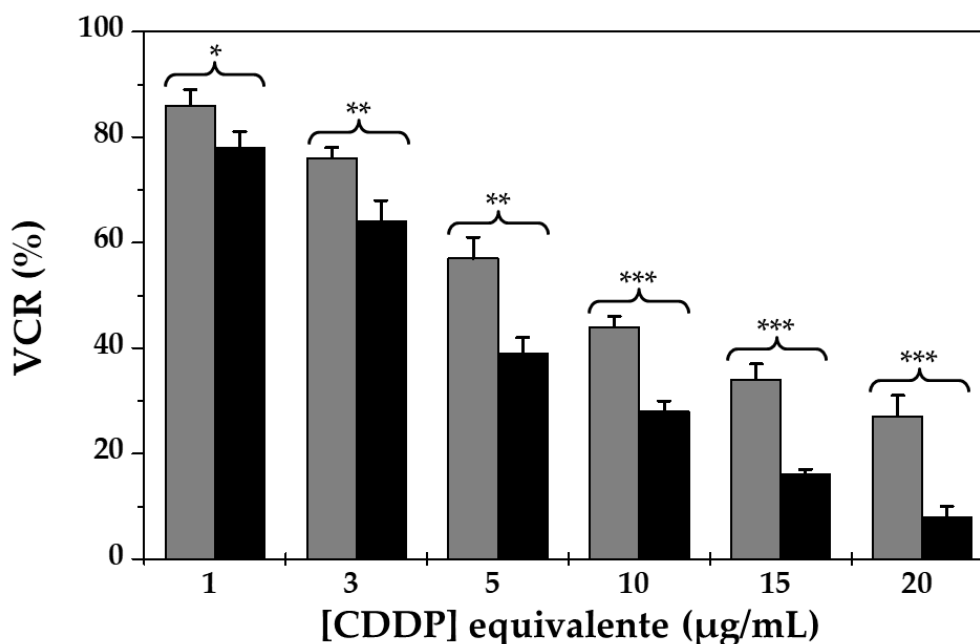


Figura 36. Citotoxicidad *in vitro* (VCR, %) del fármaco CDDP cargado en NPs de (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS (columna negra) y del fármaco CDDP libre (columna gris claro) en células A-549 de adenocarcinoma de pulmón humano, después de 72 h de exposición a una amplia gama de concentraciones de CDDP (rango de 1 g/mL a 20 g/mL de concentración equivalente de CDDP). La prueba estadística t-Student (intervalo de confianza = 95%) fue significativa (* p < 0.05) o muy significativa (** p < 0.01, *** p < 0.001), en comparación con el grupo tratado con CDDP libre.

Esta mayor actividad citotóxica *in vitro* de las NPs (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS cargadas con CDDP en comparación con la actividad citotóxica *in vitro* del fármaco libre, concuerda con investigaciones anteriores en las que se postula que la carga de CDDP en nanosistemas permite una mayor captación celular del fármaco en tejidos tumorales [Huang Y. y cols., 2013; Ghafari M. y cols., 2020]. Estos resultados se podrían complementar para proporcionar una mayor evidencia del éxito de administrar CDDP cargado en nanosistemas a las células tumorales, y por tanto del éxito en el tratamiento contra el cáncer de pulmón. Algunas de las pruebas *in vitro* a realizar serían: ensayo de apoptosis que implica la tinción con anexina V/yoduro de propidio; experimento de tinción con cristal violeta para determinar la viabilidad celular; y ensayos de formación de colonias y migración celular para caracterizar la competencia proliferativa de las células tumorales al ser expuestas a las NPs cargadas con fármaco. Además de experimentos *in vitro*, se necesitarían ensayos *in vivo*, concretamente en ratones portadores de tumores, para definir claramente el efecto anticancerígeno de los nanocompuestos (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS cargados con CDDP.

CAPÍTULO 9

Agentes de contraste en resonancia
magnética de imagen:

Ensayos de farmacocinética y
biodistribución *in vivo*

9.1. Introducción

9.1.1. Fundamentos de la resonancia magnética de imagen

La RMI es una técnica no invasiva basada en los principios de la RMN que permite obtener información sobre determinadas moléculas de un organismo vivo y formar una imagen de sus órganos internos. El sistema de RMI cuenta con un potente imán (campo magnético externo), un emisor-receptor de ondas de radiofrecuencia (RF; radiación no ionizante) y la base de toda esta técnica, átomos de hidrógeno (^1H) presentes en el organismo vivo expuesto al campo magnético y a las ondas de RF [Burtea C. y cols., 2008; Cuesta Pérez J.J. y Cano Durán A.J., 2015]

La base de la RM está en los átomos con un número impar de protones, además estos átomos deben estar repartidos por todo el organismo y en abundancia. El átomo de H cumple a la perfección con esta descripción: tiene un único protón en su núcleo y es el átomo más abundante en el cuerpo humano. De forma general, los protones giran constantemente sobre si mismos alrededor de su propio eje generando una carga eléctrica, base del magnetismo de un átomo (momento magnético). Este movimiento típico del protón se denomina espín [Corbalán Sevilla M.T. y Sánchez Reyes J.M., 2015]. Los vectores de los espines o movimiento de rotación de los protones de los átomos de ^1H se encuentran orientados de manera aleatoria en un tejido, es decir, en todas las direcciones. Esto resulta en un momento magnético global nulo [Corbalán Sevilla M.T. y Sánchez Reyes J.M., 2015]. Sin embargo, cuando son expuestos a un campo magnético externo, estos espines se orientan en dirección del campo magnético y en sentido del campo magnético (espines paralelos) o en sentido contrario al campo magnético (espines antiparalelos). Esto resulta en un momento magnético orientado en dirección del campo magnético y por tanto en una magnetización neta a lo largo de esta dirección [Pretorius E.S. y Solomon J.A., 2006]. Una mayoría de espines paralelos dan lugar a un estado de energía menor mientras que una mayoría de espines antiparalelos resultan en un estado energético mayor. El sistema siempre tiende a un estado energético menor o reposo [Corbalán Sevilla M.T. y Sánchez Reyes J.M., 2015].

La exposición a un campo magnético externo también va a provocar un movimiento de precesión en los espines de los protones, es decir, un movimiento cónico similar al de una peonza [Corbalán Sevilla M.T. y Sánchez Reyes J.M., 2015]. Los protones de los átomos de ^1H precesan a una determinada frecuencia, que viene determinada por la intensidad del campo magnético externo por la ecuación de Larmor, de ahí que se hable de frecuencia de Larmor [Corbalán Sevilla M.T. y Sánchez Reyes J.M., 2015]. La frecuencia de precesión o frecuencia de Larmor se define como el número de veces que un protón gira por segundo al estar expuesto a un campo magnético. La frecuencia de Larmor también está determinada por el tipo de tejido en donde se encuentren los átomos de ^1H (agua, grasa, musculo, hueso, etc). Establecer la frecuencia de

Larmor es importante ya que las ondas de RF empleadas en RM deben tener la misma frecuencia que la frecuencia de precesión de los protones. Esto permite el intercambio de energía, fenómeno que se conoce como RMN. La aplicación de ondas de RF es necesaria para poder cuantificar la magnetización anteriormente comentada, es decir, para obtener una señal de los átomos de ^1H .

Otros tres conceptos importantes en RMI son: el tiempo de repetición (TR), el tiempo de Eco (TE) y la secuencia de pulso. El TR es el tiempo que transcurre entre la aplicación de un pulso de RF y otro pulso de RF, es decir, es el tiempo que transcurre durante un ciclo completo de excitación/relajación. El TE es el tiempo transcurrido entre el pulso de RF y la generación de una señal o eco a partir de los protones excitados al relajarse [Pretorius E.S. y Solomon J.A., 2006; Zauner i Jakubik M., 2007; Calle D. y Navarro T., 2018]. Finalmente, la secuencia de pulso consiste en la repetición de una serie de indicaciones lo cual permite crear una imagen en RM por medio de la acumulación de datos. Las secuencias más utilizadas en RMI son: la secuencia Eco de Espín (*Spin-Echo*; SE) y secuencia turbo-RARE (*Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement*), también llamada turbo SE. La secuencia de pulsos determinará la clase de señal que obtenemos de un tejido y el tipo de imagen generada [Pretorius E.S. y Solomon J.A., 2006].

El experimento de RMI comienza con dos procesos distintos: (a) la magnetización de los átomos de ^1H , es decir, la orientación de los momentos magnéticos con el campo magnético, también llamada magnetización longitudinal, y (b) precesión incoherente. Este fenómeno de precesión se dice que es incoherente cuando todos los átomos de ^1H precesan en distintas fases, es decir, no comienzan a precesar al mismo tiempo. En resumen, los protones de los átomos de ^1H expuestos a un campo magnético externo están magnetizados (sus espines están alineados con el campo magnético) y comienzan a precesar incoherentemente (Figura 37).

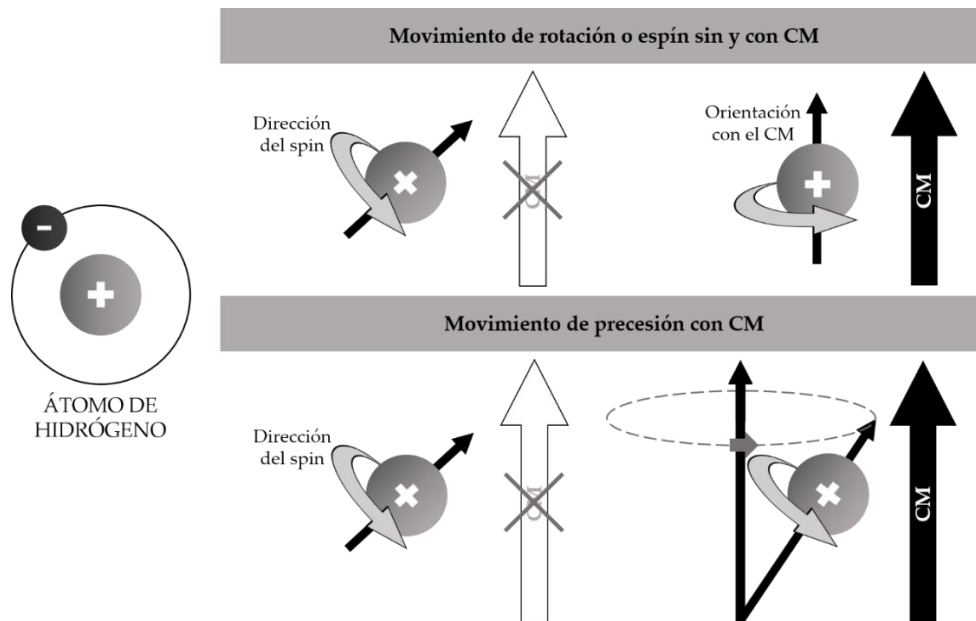


Figura 37. Representación de los movimientos del protón del átomo de hidrógeno ante la ausencia o presencia de un campo magnético (CM).

La “segunda fase” del experimento consiste en aplicar ondas de RF con la misma frecuencia que la frecuencia de precesión de los protones. Esta exposición desencadena un cambio de estado energético provocado por el cambio de sentido de los espines (igualándose el número de espines hacia un sentido y otro) y por la precesión coherente o en fase de los protones. Este fenómeno se describe como magnetización transversal. Se denomina de esta forma dado que la aplicación de RF con la misma frecuencia que la frecuencia de precesión de los protones modifica la magnetización longitudinal (plano o vector longitudinal) hacia el plano transversal (magnetización transversal) [Corbalán Sevilla M.T. y Sánchez Reyes J.M., 2015]. El movimiento de precesión de todos los protones de átomos de ^1H se sincroniza, es decir, los protones comienzan a precesar todos en la misma fase. Ambos procesos tienen lugar gracias al aporte de energía de las ondas de RF. Las ondas de RF transmiten energía a los protones de los átomos de ^1H (intercambio de energía) dando lugar a la RMN. Es necesaria la aplicación de uno o más pulsos de RF (ciclo de pulsos). La aplicación de ondas de RF supone un paso de un estado energético menor a uno mayor y la interrupción de esta aplicación supone justo lo contrario. El paso de un estado energético mayor a un estado energético menor implica una liberación de energía, a esto se le denomina relajación [Zauner i Jakubik M., 2007]. Esta relajación puede ser longitudinal (proceso de retorno a la magnetización longitudinal) o transversal (proceso que deriva en última instancia a la desaparición de la magnetización transversal) [Chen M. Y. M. y cols., 2006].

Por tanto, se busca que la última fase de un experimento de RMI consista en la suspensión de las ondas de RF pasando de un estado energético alto a un estado de reposo. A nivel atómico,

los vectores de los espines de los protones de los átomos de ^1H rotan de nuevo para alinearse de nuevo con el campo magnético y lo hacen liberando energía (relajación longitudinal/relajación en T_1 /relajación spin-red; T_1). De la misma forma, los movimientos de precesión de todos los protones de átomos de ^1H se desfasan, volviendo a un proceso de precesión incoherente y liberando E (relajación transversal/relajación en T_2 /relajación espín-espín; T_2) [Corbalán Sevilla M.T. y Sánchez Reyes J.M., 2015]. La figura 38 resume esquemáticamente el proceso de la RMI.

La recuperación de la magnetización longitudinal (T_1) y la desaparición de la magnetización en el plano transversal (T_2) son procesos simultáneos (Figura 39) [Lafuente Martínez J. y Ramón Botella E., 2006].

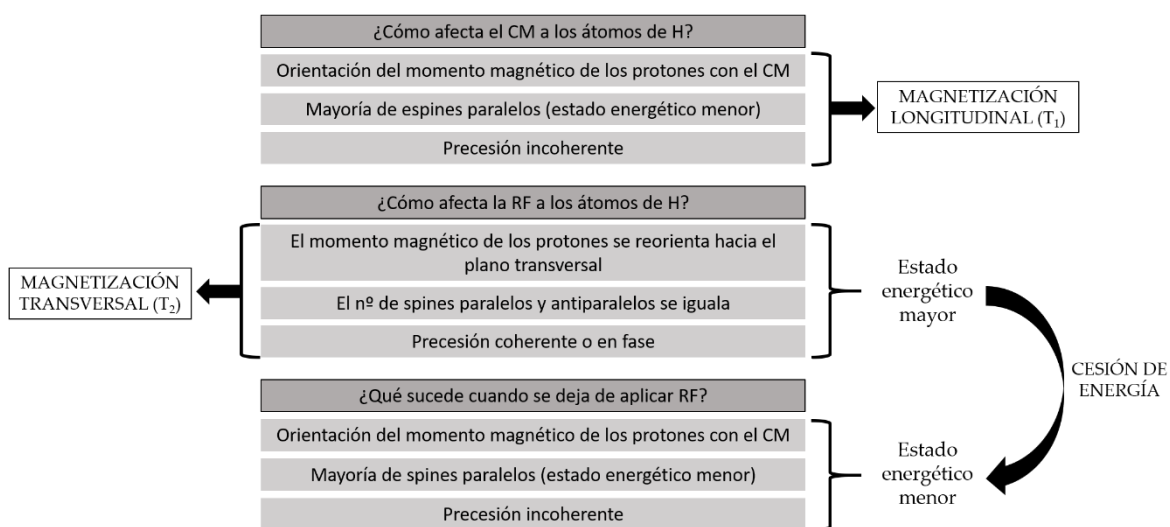


Figura 38. Resumen del proceso de RMI.

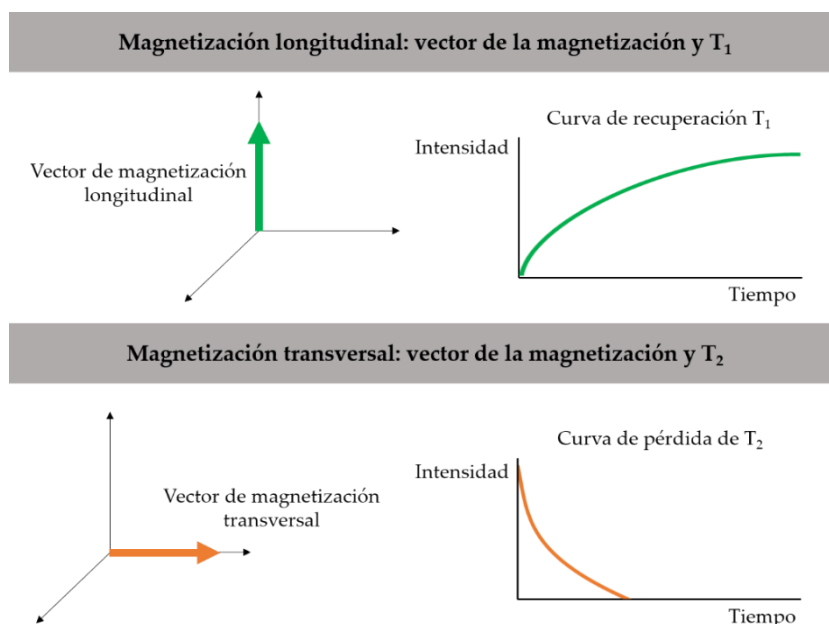


Figura 39. Representación de la recuperación de la magnetización longitudinal (T_1) y la pérdida de magnetización transversal (T_2). Ambos procesos se producen de manera simultánea. En la figura también se muestran los vectores de magnetización longitudinal y transversal en verde y naranja, respectivamente.

Los procesos de cesión de energía denominados procesos de relajación están caracterizados por tiempos de relajación. La relajación longitudinal, relajación en T_1 o relajación spin-red está caracterizada por el tiempo de relajación longitudinal o T_1 , y la relajación transversal, relajación en T_2 o relajación espín-espín está caracterizada por el tiempo de relajación transversal o T_2 . La relajación en T_1 describe el proceso por el cual los protones se realinean en paralelo con el plano longitudinal (z) recuperando la magnetización longitudinal, mientras que la relajación en T_2 describe el fenómeno por el cual se libera energía en el plano xy cuando los protones vuelven a desfasarse [Corbalán Sevilla M.T. y Sánchez Reyes J.M., 2015]. El tiempo de relajación T_1 de un tejido es el tiempo que emplea la magnetización longitudinal en recuperarse al 63%. Un tejido con un T_1 corto se visualiza hiperintenso ya que los protones de los átomos de ^1H de ese tejido tardan menos en volver al estado de equilibrio, es decir, recuperar su magnetización longitudinal. El tiempo de relajación T_2 de un tejido se define como el tiempo que emplea la magnetización transversal en recuperarse al 37%, o lo que es lo mismo, el tiempo que tarda en perder el 63% de su valor inicial. En otras palabras, el tiempo de relajación T_2 se relaciona con el tiempo que los protones de los átomos de ^1H de un tejido siguen precesando en fase aun después de aplicar un pulso de RF. El tiempo de relajación T_2 depende de la distancia entre los distintos átomos, y por ende sus protones, de las moléculas de H_2O : a mayor distancia entre protones, menor interacción entre los campos magnéticos generados. Es por esto que el H_2O tiene un tiempo de relajación T_2 largo, es decir, un tiempo de relajación en T_2 más lento que se traduce en una mayor señal y en hiperintensidad. Los tejidos con mayor cantidad de moléculas de H_2O se verán hiperintensos [Lafuente Martínez J. y Ramón Botella E., 2006; Corbalán Sevilla M.T. y Sánchez Reyes J.M., 2015; Calle D. y Navarro T., 2018].

La obtención de la imagen en RMI se basa en la recolección de la E liberada en los procesos de relajación longitudinal y transversal [Pretorius E.S. y Solomon J.A., 2006]. Por tanto, la tasa de energía liberada está determinada por las propiedades de relajación de cada tejido, el cual está caracterizado por los tiempos de relajación T_1 y T_2 . De esta forma se puede hablar de imagen en señal T_1 (imagen potenciada en T_1) y en señal T_2 y T_2^* (imagen potenciada en T_2 y T_2^*) [Pretorius E.S. y Solomon J.A., 2006].

Las señales derivadas de los procesos de relajación longitudinal y transversal son: las señales T_1 del propio tejido y las señales T_2 y T_2^* . La señal T_2 proviene del propio tejido estudiado mientras que la señal T_2^* procede del efecto del campo magnético externo. Esta señal T_2^* enmascara a la señal T_2 , por lo que esta señal debe ser filtrada.

Todas estas señales dan lugar a imágenes: imagen potenciada en T_1 e imagen potenciada en T_2 y T_2^* . La interpretación de las imágenes de RM se rige por la intensidad de la señal y color. La intensidad en una imagen de RM está definida por la duración de los tiempos T_1 y T_2 para cada uno de los tejidos, entre otras cosas. Cuando la señal emitida es muy energética, es decir, muy intensa, se traduce en la imagen como zonas de hiperintensidad (zonas más claras), mientras que si la señal emitida es de una menor intensidad esta es traducida en la imagen como zonas de hipointensidad (zona oscura). Por ejemplo, los líquidos del organismo son sustancias con un T_1 largo y por tanto se mostrarán como zonas oscuras en las imágenes potenciadas en T_1 , mientras que la grasa, que es una sustancia con un T_1 corto, se mostrará como zona de hiperintensidad (zona clara). Por otro lado, los líquidos del organismo son sustancias con un T_2 largo y por ello se verán zonas brillantes en las imágenes potenciadas en T_2 .

Las imágenes potenciadas en T_1 y T_2 se pueden definir por los tiempos TR y TE en secuencias SE. Concretamente, una imagen potenciada en T_1 tiene un TR corto y un TE también corto, mientras que una imagen potenciada en T_2 tiene un TR y un TE largos [Pretorius E.S. y Solomon J.A., 2006].

9.1.2. Contraste tisular y agentes de contraste en resonancia magnética de imagen

La RMI aprovecha que cada tejido tiene unas características determinadas y únicas, como el valor de T_1 y T_2 característico, densidad de protones, flujo, difusión y perfusión, para generar contraste entre ellos y diferenciarlos en imágenes de RM [Burtea C. y cols., 2008]. A este contraste, o diferencia de intensidad, propio de los tejidos se le denomina contraste intrínseco [Calle D. y cols., 2018]. Es importante indicar, que un tejido dañado presenta alteraciones en algunas de las propiedades anteriormente comentadas y, por tanto, en la intensidad de señal generada [Berral Santana A. y López Rodríguez M.E., 2015].

El contraste de una imagen en RM también depende de una serie de parámetros extrínsecos que se pueden modificar para encontrar un equilibrio adecuado entre el contraste y la resolución espacial. Algunos de estos factores extrínsecos son los siguientes: (a) TR, (b) TE, (c) ángulo de inclinación o giro (α) que es el ángulo en el que rota el vector de magnetización longitudinal cuando se aplica el pulso de RF, y (d) campo de imagen seleccionado (*field of view*, FOV), entre otros [Calle D. y Navarro T., 2018]. Además, el contraste intrínseco se puede mejorar empleando agentes de contraste (AC) que alteren las propiedades magnéticas de los tejidos. Los AC generan un contraste extrínseco que ayuda a mejorar el diagnóstico por RMI [Calle D. y cols., 2018], necesario en casos concretos de diferenciación tisular donde algunos tejidos, como por ejemplo tumorales (malignos vs. benignos), tienen constantes de tiempo prácticamente indistinguibles

[Weinmann H.J. y cols.,1984]. Por tanto, el objetivo de la administración de AC consiste en incrementar la intensidad de señal entre tejidos con propiedades magnéticas similares (Figura 40).

Los AC para RM deben cumplir una serie de requisitos entre los que destaca la susceptibilidad magnética intrínseca del propio AC, es decir su propiedad para ser magnetizado bajo la influencia de un campo magnético externo. Según el carácter magnético los AC puede ser paramagnéticos, ferromagnéticos o superparamagnéticos. Todos ellos tienen en común la presencia de electrones no apareados en la capa más externa de los átomos que lo componen, los cuales interactúan con los protones de los átomos de ^1H de los tejidos. Este mecanismo de acción tiene como resultado el acortamiento de los tiempos de relajación T_1 y T_2 de los protones de H_2O de los tejidos adyacentes [Chen, M. Y. M. y cols., 2006; Pretorius E.S. y Solomon J.A., 2006; Burtea C. y cols., 2008]. Existen dos tipos de AC clasificados según el tiempo de relajación alterado: AC T_1 y AC T_2 . Los AC T_1 se dice que son AC positivos dado que reducen el tiempo de relajación T_1 dando lugar a un aumento de la señal o a una señal hiperintensa (realce de T_1), mientras que los AC T_2 son AC negativos dado que reducen el tiempo de relajación T_2 dando lugar a una pérdida de señal o señal hipointensa (realce de T_2) [Burtea C. y cols., 2008; Reddy L.H. y cols., 2012; Calle D. y Navarro T., 2018]. Cuando los AC son administrados al organismo, la captación condicionada por el tipo de tejido incrementa aún más la diferencia entre las señales de los distintos tejidos, favoreciendo la diferenciación tisular y diagnóstico (Figura 40).

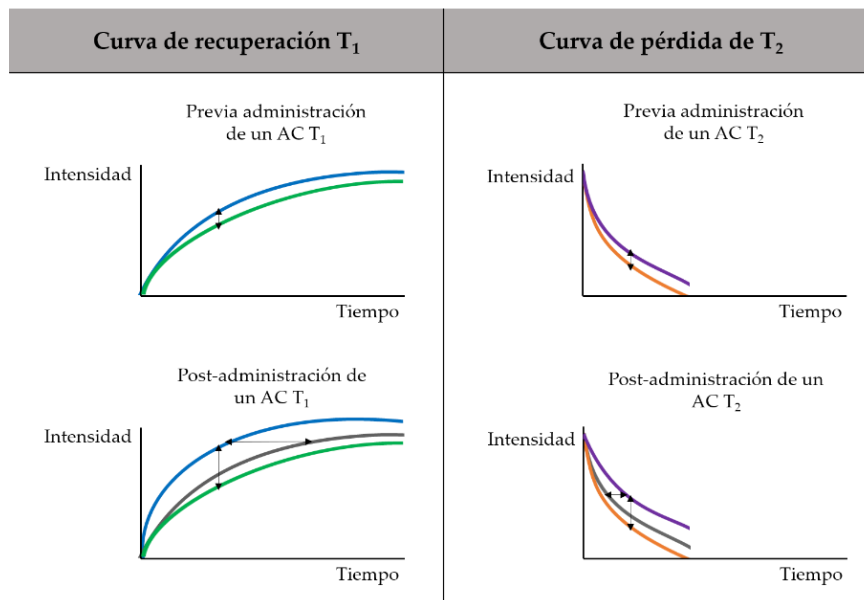


Figura 40. Representación de la mejoría en la intensidad de las señales T_1 y T_2 tras la administración de AC T_1 y AC T_2 , respectivamente. Previa administración de los AC la diferencia de señal apreciada entre los tejidos (verde y azul en T_1 ; naranja y violeta en T_2) es pequeña, mientras que tras la administración de los AC la diferencia entre las señales de los distintos tejidos se ve incrementada.

La eficiencia de un AC en RMI está condicionada por su relajación, caracterizada por la relajatividad longitudinal (r_1) o relajatividad transversal (r_2). La relajación de un AC está definida como el aumento de la tasa de relajación ($R_i = 1/T_i$: $R_1 = 1/T_1$ y $R_2 = 1/T_2$) producido por 1 mmol por litro de CA (expresado en $s^{-1} \text{ mmol}^{-1} \text{ l}$). Los parámetros fisicoquímicos r_1 y r_2 dependen principalmente del tamaño y estructura química del material magnético del AC, pero también de la accesibilidad de las moléculas de H_2O a este centro magnético, a un mismo campo magnético [Burtea C. y cols., 2008]. A su vez, esta relajación está ligada a los movimientos moleculares ya las propiedades intrínsecas de los núcleos (momento magnético, espín, etc.) [Burtea C. y cols., 2008].

Los AC se administran vía parenteral, y de la sangre difunden a los tejidos circundantes. En el caso concreto del cáncer, la vasculatura tumoral permite una extravasación mayor de los AC hacia los tejidos tumorales y, por tanto, una mayor concentración de AC [Calle D. y Navarro T., 2018]. La concentración de AC está linealmente relaciona con la tasa de relajación tisular tal y como se describe a continuación (Ec. 25) [Burtea C. y cols., 2008; Zhou Z. y Lu Z.R., 2013]:

$$R_{i(\text{obs})} = \frac{1}{T_{i(\text{obs})}} = \frac{1}{T_{i(\text{diam})}} + r_i \cdot C \quad (25)$$

donde $R_{i(\text{obs})}$ y $1/T_{i(\text{obs})}$ se definen como la tasa de relajación global del sistema acuoso (s^{-1}); $T_{i(\text{diam})}$ es el tiempo de relajación del sistema antes de la administración del AC (s); C es la concentración del centro magnético (mmol l^{-1}); r_i se refiere a la relajatividad del AC (longitudinal (r_1) o transversal (r_2)) ($s^{-1} \text{ mmol}^{-1} \text{ l}$).

A pesar de esta relación, destacar que la concentración tisular del centro magnético del AC no es el único factor que contribuye a la eficacia del AC, como se ha visto previamente, existen características intrínsecas tisulares que contribuyen significativamente en mejorar la señal de intensidad [Burtea C. y cols., 2008].

La mayoría de los AC basados en materiales paramagnéticos son AC T_1 . El primer AC con núcleo paramagnético se introdujo en 1978 y estaba constituido por iones manganeso (Mn^{2+}) [Lauterbur y cols., 1978; Burtea C. y cols., 2008]. En la actualidad, los AC T_1 por excelencia en clínica involucran al gadolinio (Gd III), un metal también paramagnético con propiedades magnéticas favorables en RMI [Caravan P. y cols., 1999]. El Gd es un elemento pesado cuya toxicidad *in vivo* está reconocida. Con el objetivo de reducir esta toxicidad en el organismo, el Gd se administra formando complejos con sustancias quelantes (ejemplo: ligandos de poli(aminocarboxilato) hidrofílicos) [Burtea C. y cols., 2008; Calle D. y Navarro T., 2018]. Los AC Gd-DTPA, de las siglas en inglés diethylenetriaminepentaacetic acid, o Magnevist® y Gd-DOTA,

de las siglas en inglés tetraazacyclododecanetetraacetic acid, o Dotarem® representar a una generación de complejos de Gd con baja toxicidad, alta termodinámica y estabilidad cinética. Dada la alta osmolaridad que presentan, más tarde se diseñaron complejos de Gd no iónicos, es decir neutros, para solventar esta desventaja: Gd-DTPA-BMA o Omniscan®, Gd-HPDO3A o ProHance® y Gd-DO3A-butrol o Gadovist®. Con el tiempo los complejos de Gd se han ido refinando y focalizando en según qué aplicaciones, por ejemplo, el Gd-BOPTA o MultiHance®, GdEOB-DTPA o Primovist® y Gd-DTPA-BMEA o OptiMARK® se emplean como AC hepato biliares en RMI y el MS-325/Gadofosveset o Vasovist® se emplea para visualizar los vasos sanguíneos [Burtea C. y cols., 2008].

En 2017 la EMA emitió un comunicado consecuencia de estudios de farmacovigilancia que incluían a los AC basados en Gd [European Medicines Agency (EMA), 2017]. Concretamente, en 2017 la EMA restringía el uso de algunos AC basados en Gd y suspendía el uso de los intravenosos que incluyeran gadodiamida, ácido gadopentético y gadoversetamida como el Omniscan® o el OptiMARK®. Se vio que el Gd se depositaba en los tejidos cerebrales tras el uso de AC basados en Gd. De todas formas, la acumulación de Gd a nivel cerebral no parece estar relacionada con daños importantes en los pacientes, aún así la medida de la EMA se impuso con el fin de prevenir cualquier tipo de riesgo asociado con la acumulación de Gd en el cerebro.

Un material superparamagnético es la base de un AC T₂ [Calle D. y Navarro T., 2018]. El comportamiento superparamagnético proporciona un aumento de la señal T₂ y, por consiguiente, un contraste negativo o hipointenso [Reddy L.H. y cols., 2012; Bakhtiar Z. y cols., 2016; de Gouw D.J.J.M. y cols., 2020; Dhas N. y cols., 2021]. Concretamente, sus propiedades magnéticas inducen una fuerte susceptibilidad magnética en los protones de H₂O de los tejidos circundantes [Qiao, R. y cols., 2009; Reddy L.H. y cols., 2012]. Los óxidos de hierro superparamagnéticos como la Fe₃O₄ o la γ -Fe₂O₃ son un ejemplo excelente de materiales para constituir AC T₂, y además aportan una mejoría en la capacidad de relajación (valores de relajación mayores) en comparación con los AC de tipo paramagnético, lo que permite un aumento significativo en la sensibilidad para la detección de MRI [Calle D. y Navarro T., 2018]. Cuando los óxidos de hierro son expuestos a un campo magnético externo presentan una gran magnetización que puede alterar la homogeneidad del campo magnético tisular activando el desfase de los protones. La activación del desfase de los momentos magnéticos del protón, resulta en el acortamiento de los tiempos de relajación T₂ y T₂* de las regiones colindantes [Burtea C. y cols., 2008; Na HB y cols., 2009]. La diferencia entre AC paramagnéticos (Gd) y superparamagnéticos (óxidos de hierro) reside en que estos últimos se caracterizan por momentos magnéticos significativamente mayores [Calle D. y Navarro T., 2018].

Los núcleos de óxidos de hierro superparamagnéticos empleados en biomedicina suelen recubrirse por pequeñas moléculas como el citrato o el ácido oleico, polímeros o lípidos con el objetivo de mejorar su estabilidad coloidal en el medio acuoso [Burtea C. y cols., 2008; Calle D. y Navarro T., 2018]. Estos son algunos de los AC T₂ basados en óxidos de hierro superparamagnéticos que se han desarrollado y empleado en clínica hasta la fecha: Sinerem® (<100nm), Endorem® (>200nm), Resovist® (100-200nm), Lumirem® (≈ 300 nm), Ferropharm y Ferumoxytol [Burtea C. y cols., 2008; Reddy L.H. y cols., 2012].

Las propiedades fisicoquímicas de las partículas basadas en óxidos de hierro superparamagnéticos permiten modular la biodistribución del AC ofreciendo una fuerte ventaja frente a los AC químicos convencionales [Na H.B. y cols., 2009]. Además, la composición de estos AC particulados se caracteriza por ser biocompatible y biodegradable. El hierro, centro magnético del AC, puede ser almacenado en el organismo como fuente natural de hierro y reutilizado mediante vías bioquímicas partícipes en el metabolismo del hierro [Burtea C. y cols., 2008]. El recubrimiento empleado como estrategia para incrementar la estabilidad de los núcleos magnéticos permite no solo este aumento en la estabilidad coloidal, sino que también la vehiculización selectiva del AC hacia el tejido diana [Corot y cols., 2006; Burtea C. y cols., 2008]. Por el contrario, uno de los principales inconvenientes es su fácil interacción con proteínas plasmáticas (ej.: opsoninas), lo que conduce a su retirada del sistema sanguíneo por el SFM [Burtea C. y cols., 2008].

Todo agente externo que se administre a un organismo vivo con el fin de prevenir, tratar y/o diagnosticar debe cumplir una serie de requisitos. Un AC adecuado para la vía de administración parenteral debe presentar una máxima actividad, esto es efectos en relajación y susceptibilidad magnética adecuados, tolerancia, una baja o nula toxicidad, contar con una adecuada farmacocinética, biodistribución selectiva, eliminación completa del sistema, alta estabilidad coloidal [Burtea C. y cols., 2008]. Todos estos factores son en ocasiones limitantes y definitorios de una baja sensibilidad de las técnicas de imagen actuales, las cuales se potencian con la aplicación de la nanotecnología en el diagnóstico por RMI [Zhang Y. y cols., 2019; Stephen B.J. y cols., 2020].

Algunas de las aplicaciones de las partículas de óxido de hierro como AC en RMI consisten en: destacar estructuras vasculares con el fin de obtener imágenes de placas de ateroma (aterosclerosis), destacar la estructura de los ganglios linfáticos en busca de alteraciones benignas, ayudar a caracterizar zonas de inflamación que puedan aparecer como respuesta a trastornos del sistema nervioso central (SNC), ayudar a caracterizar los tumores y obtener imágenes de la

infiltración de macrófagos en distintas regiones del organismo como articulaciones o en órganos trasplantados [Reddy L.H. y cols., 2012].

9.1.3. Aplicaciones de la resonancia magnética de imagen: Ensayos de farmacocinética y biodistribución *in vivo* de NPs

La RMI es una de las técnicas de obtención de imagen no invasiva dada la ausencia de radiaciones ionizantes capaz de generar imágenes con una elevada resolución de contraste y espacial, y alta resolución [Chen, Michael Y. M. y cols., 2006]. Es una de las principales opciones en la evaluación y diagnóstico de alteraciones en tejidos blandos o cartílagos debido al gran contraste que se consigue entre ellos. Finalmente, permite diferenciar entre tejidos sano y dañados o malignos [Reddy L.H. y cols., 2012; Calle D. y Navarro T., 2018]. A pesar de ser esta su aplicación principal, la RMI permite el importante estudio del comportamiento *in vivo* de partículas constituidas por núcleos magnéticos. La caracterización de la farmacocinética y biodistribución de una NP supone un aspecto crítico para su diseño como potencial herramienta en biomedicina. La incorporación de núcleos de óxido de hierro en el diseño de NPs va a permitir este análisis por RMI aprovechando las propiedades magnéticas de los núcleos [Calle D. y Navarro T., 2018; Caro C. y cols., 2018].

Como ya se ha visto en este y anteriores capítulos, la distribución *in vivo* de agentes terapéuticos y AC es una de las principales limitaciones a abordar con la aplicación de la nanotecnología. La distribución inespecífica de agentes terapéuticos y AC, y la captación por el sistema de defensa innato del organismo, el denominado SFM, limita la eficacia del tratamiento y diagnóstico por RMI [Wang B. y cols., 2013; Caro C. y cols., 2018]. El abordaje nanotecnológico se enfoca en mejorar los tiempos de circulación sanguínea de las NPs impidiendo la captación de estas por el SFM, favoreciendo la posibilidad de su direccionamiento selectivo hacia tejidos diana. Existen distintas metodologías pensadas en evadir al SFM y todas ellas basadas en la modificación de las características fisicoquímicas del nanosistema como el tamaño y las propiedades eléctricas y termodinámicas superficiales [Yoo J.W. y cols., 2010; Pernia Leal M. y cols., 2015; Lachowicz D. y cols., 2017]. Como se introducía en el capítulo 6 “Biocompatibilidad y toxicidad de los nanosistemas” la interacción de las proteínas plasmáticas con los nanosistemas favorece, entre otras cosas, la captación por el SFM [Kumari A. y cols., 2012]. Esta pérdida de identidad se define como pérdida de las propiedades *stealth* o de sigilo [Gustafson H.H. y cols., 2015; Caro C. y cols., 2018]. Potenciar las propiedades *stealth* de las NPs es una de las estrategias desarrolladas para mejorar sus tiempos de circulación sanguínea minimizando las interacciones con proteínas y SFM, es decir mejorar su biodistribución *in vivo*.

Por lo general, cuanto menor sea el tamaño de las NPs menor será la probabilidad de ser detectadas y capturadas por el SFM y exhibirán tiempos más largos de circulación sanguínea. Las NPs que logren escapar del SFM podrán extravasarse de la circulación sanguínea hacia los tejidos [Reddy L.H. y cols., 2012]. La relación entre existente entre el reconocimiento por las proteínas plasmáticas y la carga superficial de las NPs es controvertida. Una carga superficial neutra o una carga neta muy baja minimiza la adsorción de estas proteínas y por ende el reconocimiento por el SFM [Ishak R.A. y cols., 2013]. El recubrimiento de núcleos de óxido de hierro por polímeros de naturaleza hidrofílica como el frecuentemente empleado PEG modifica la naturaleza termodinámica de la superficie de las partículas magnéticas ejerciendo de camuflaje (barrera (impedimento estérico)) con capacidad para repeler a las proteínas plasmáticas (opsoninas) y evitar su eliminación prematura de la circulación sanguínea por fagocitosis (Figura 41) [Gajbhiye K.R. y cols., 2020].

Brevemente, las células fundamentales que constituyen el SFM son los monocitos sanguíneos circulantes y los macrófagos de los tejidos y órganos, como por ejemplo las células de Kupffer en el hígado, la microglía del cerebro, los osteoclastos en los huesos, las células de Langerhans en la piel, los histiocitos en tejidos conectivos, los macrófagos alveolares en los pulmones, las células dendríticas en los ganglios linfáticos y los macrófagos esplénicos del bazo [Arami H. y cols., 2015]. Las células del SFM tienen como característica la capacidad de detectar, fagocitar y eliminar agentes extraños al organismo como mecanismo de defensa inmune innata. Una vez en el torrente sanguíneo, las NPs están expuestas al reconocimiento por las células del SFM mediado por proteínas plasmáticas u opsonización. Concretamente, en él las proteínas plasmáticas u opsoninas tienden a interactuar con estos agentes externos uniéndose a ellos y formando una corona proteína. Este marcaje es el que activará el reconocimiento por el SFM y la fagocitosis de las NPs por las células del SFM. De este modo, las NPs serán destruidas y eliminadas rápidamente antes de poder ejercer su acción en el organismo (Figura 41) [Kumari A. y cols., 2010; Fam S.Y. y cols., 2020]. Destacar que el mecanismo por el cual las opsoninas se unen a las partículas ajenas al organismo no está completamente dilucidado debido a las complicadas vías de activación [Fam S.Y. y cols., 2020]. La fagocitosis se inicia gracias a un cambio conformacional de las opsoninas cuando estas se unen a las partículas. El reconocimiento de las partículas por los fagocitos también puede estar mediado por la activación del sistema del complemento [Fam S.Y. y cols., 2020]. Finalmente, la eliminación de las partículas se produce por ingestión a través de endocitosis en la que participan enzimas y los factores químicos oxidativos-reactivos secretados por los fagocitos [Fam S.Y. y cols., 2020].

Las partículas de óxido de hierro son frecuentemente captadas por el hígado y bazo, los órganos por excelencia del SFM, siendo estos las principales vías de eliminación o aclaramiento de los óxidos de hierro. También se han visto en el tejido pulmonar, aunque en menor medida [Arami H. y cols., 2015].

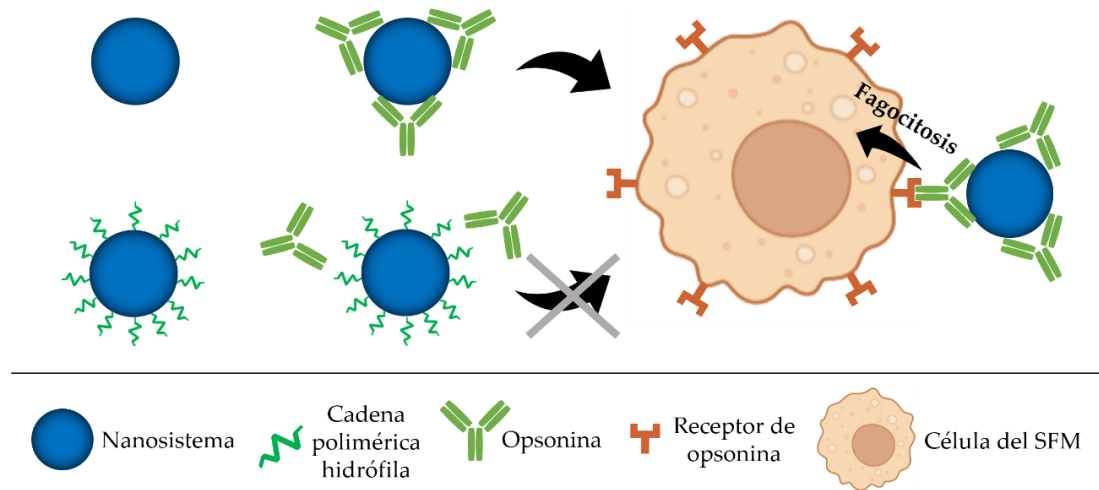


Figura 41. Representación del proceso de opsonización y fagocitosis de un nanosistema sin y con cadenas poliméricas hidrófilas. Las cadenas poliméricas hidrófilas van a prevenir la opsonización, y, por ende, reducir la fagocitosis de estos nanosistemas funcionalizados por las células del SFM.

Según la aplicación de las NPs la opsonización y rápido reconocimiento por el SFM puede suponer una ventaja, como por ejemplo en el tratamiento o diagnóstico de lesiones cerebrales, evaluación de la existencia o no de rechazo a trasplantes o injertos y tratamiento o diagnóstico de otras enfermedades mediadas por inflamación [Arami H. y cols., 2015].

9.2. Relajatividades

9.2.1. Metodología

Los valores de r_1 y r_2 de las NPs γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS se determinaron *in vitro* bajo un campo magnético de 1.44 T y a 37.0 ± 0.5 °C (Bruker Minispec MQ -60 espectrómetro, Bruker BioSpin, Alemania), [Nica V. y cols., 2020]. Se emplearon concentraciones de hierro desde 0.25 a 2.00 mM. La concentración de hierro en una dispersión de NPs se determinó mediante espectrometría de masas de alta resolución de plasma acoplado inductivamente (ICP-HRMS; sistema ICP-MS de alta resolución Element XR, ThermoFisher Scientific Inc., EE. UU.) [Pernia

Leal M. y cols., 2017]. Previo al análisis, las partículas γ -Fe₂O₃/PLGA y las (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS se sometieron a un tratamiento con agua regia añadiendo 2.5 mL de esta (relación molar de HNO₃: HCl 3:1) a 25 μ L de una dispersión acuosa de NPs al 0.1% (p/v). Tras 12 h de contacto, se añadió agua hasta un volumen final de 25 mL.

Los valores del tiempo de relajación T₂ se obtuvieron usando la secuencia Carl-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG), mientras que el tiempo de relajación T₁ se midió utilizando la secuencia de pulsos inversión - recuperación.

9.2.2. Resultados y discusión

Este estudio *in vitro* se realizó como prueba preliminar del uso potencial de los nanocompuestos mixtos γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS como AC en RMI. Los valores de r₁ y r₂ para las partículas de γ -Fe₂O₃/PLGA fueron de 0.2 y 48.5 mM⁻¹ × s⁻¹ (Figura 42a), respectivamente; mientras que, los valores de r₁ y r₂ para las partículas de (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS fueron de 0.4 y 61.4 mM⁻¹ × s⁻¹ (Figura 42b), respectivamente. Estos valores de relajatividades son comparables a los detallados anteriormente en la literatura para nanoestructuras similares, [Arias J.L y cols., 2010a] y para AC en RMI basados en óxidos de hierro, como por ejemplo: Sinerem® o Ferumoxytol [I. Berry y cols., 1996; S. Laurent y cols., 2008; G.B. Toth y cols., 2017]. Las relaciones r₂/r₁ para γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS fueron de 243.5 y 153.5, respectivamente, lo que sugiere la posible aplicación de estos dos tipos de NPs como AC T₂. [Caravan P. y cols., 1999; Pandey A. y cols., 2020].

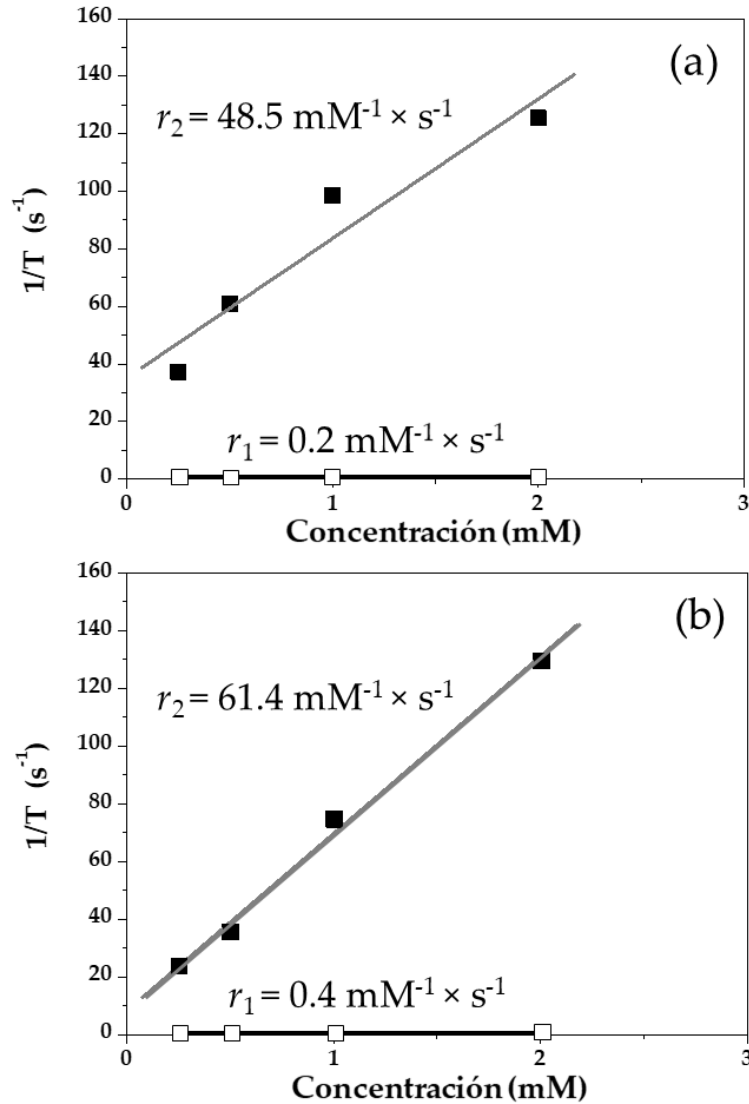


Figura 42. Relajatividades longitudinal (\square , $1/T_1$, s^{-1}) y transversal (\blacksquare , $1/T_2$, s^{-1}) en función de la concentración de Fe (mM) en partículas: (a) γ -Fe₂O₃/PLGA y (b) (γ -Fe₂O₃/PLGA)/QS. Mediciones a 1.44 T.

9.3. Resonancia Magnética de Imagen *in vivo*

9.3.1. Metodología

Al igual que se indica en el apartado 6.4. “Toxicidad *in vivo*” del capítulo 6 “Biocompatibilidad y toxicidad de los nanosistemas”, todos los experimentos *in vivo* se realizaron en el Servicio de Experimentación BIONAND. Fueron aprobados por el Comité Local de Cuidado Animal y realizados en cumplimiento de la Directiva de la Unión Europea UE 2010/63/UE (2010) y la legislación española para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia (R.D. 53/2013).

Tres ratones macho de la cepa Balb/c de 22 g de peso (Janvier Labs, Francia) se anestesiaron vía inhalatoria con isoflurano al 1% (vaporizador en cámara de inducción anestésica; flujo fijado a 1–1.5 mL/min) y se canularon las venas de la cola. Una vez hecho esto, los ratones se llevaron a la cama específica de ratones del Sistema de Imagen y Espectroscopía Multinuclear Bruker BioSpec® 9.4 T USR (sistema de resonancia magnética animal BioSpec 94/20 USR, Bruker BioSpin, Alemania) con un gradiente de 400 mT/m y un resonador de detección en cuadratura de 40 mm de diámetro. A partir de este momento, la respiración y la temperatura corporal (entre 36.0 - 37.5 °C) se controlaron durante todo el experimento (*Small Animal Monitoring and Gating Systems*, acoplado al software PC-SAM 32 v8.02). Las partículas γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/ PLGA)/QS se inyectaron por vía intravenosa a través de la cánula en la cola del ratón a una concentración de hierro de 5 mg/kg. El estudio se realizó por triplicado.

Se adquirieron imágenes ponderadas en T₂ de alta resolución empleando una secuencia turbo-RARE con control del movimiento respiratorio o *gating* (el concepto del *gating*, sincronización o «control» del movimiento periódico) (TE = 16 ms; TR = 1000 ms; promedios: 4; resolución en el plano: 156 μ m; y grosor de corte: 1 mm). Las mediciones cuantitativas de T₂ se realizaron utilizando una secuencia SE multienco (TEs que varían desde 7 a 448 ms, TR = 3500 ms, FOV = 4 cm, tamaño de matriz: 128 \times 128 y grosor de corte: 1 mm). Las cinéticas a tiempos cortos se siguieron utilizando una secuencia turbo-RARE con los parámetros indicados anteriormente, excepto por 1 y no 4 promedios, es decir una única medida por imagen, de esta forma se mejoró la resolución temporal (1 imagen cada 30 s). El esquema de adquisición fue el siguiente: imagen ponderada en T₂, mapa T₂ cuantitativo, inyección intravenosa de las NPs, cinética de 35 min, imagen ponderada en T₂ y mapa T₂ cuantitativo. Los primeros 35 min se analizaron semi-cuantitativamente usando la siguiente ecuación (Ec. 26):

$$RE (\%) = \left(\frac{I_t - I_0}{I_0} \right) \times 100 \quad (26)$$

donde RE (*Relative Enhancement*) es el módulo del aumento relativo de la señal, I_t es la intensidad de la señal en un tiempo determinado (tiempo = t) después de la inyección de las NPs, e I_0 es la intensidad de la señal antes de la inyección de las NPs (tiempo = 0).

El estudio de la biodistribución (*long-term pharmacokinetics*) se caracterizó por un mapeo T₂ cuantitativo a distintos tiempos: t = 0, t = 1 y t = 24 h.

Tanto para el ensayo de cinética a tiempos cortos como a largo plazo (biodistribución), los valores promedio de T₂ se calcularon dentro de diferentes regiones de interés (*region of interest*, ROIs) dibujadas sobre imágenes del hígado, el bazo, los riñones y el músculo, como se describió anteriormente en la literatura [Caro C. y cols., 2018; Caro C. y cols., 2019]. Estas ROIs se trazaron

sobre la primera imagen de la secuencia de imágenes, y los valores de intensidad se identificaron y ajustaron a las Ecuaciones 27 y 28 para obtener los valores relativos:

$$M_Z(t) = M_0 \left(1 - e^{-\left(\frac{TR}{T_1}\right)} \right) \quad (27)$$

$$M_{XY}(t) = M_0 e^{-\left(\frac{TE}{T_2}\right)} \quad (18)$$

En estas ecuaciones M_Z (magnetización longitudinal) y M_{XY} (magnetización transversal) son las intensidades de señal en TR y TE, respectivamente; M_0 es la intensidad de la señal en equilibrio; T_1 es el valor del tiempo de relajación longitudinal; y T_2 es el valor del tiempo de relajación transversal.

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el paquete de software IBM SPSS Statistics (versión 26.0; IBM Corporation, EE. UU.). Los datos experimentales se expresaron como valor medio \pm SD ($n=3$). Concretamente, la prueba *t-Student* o el análisis de varianza bidireccional se emplearon para comparar los resultados considerando un intervalo de confianza del 95%. Las diferencias entre los valores obtenidos se consideraron estadísticamente significativas a $p < 0.05$

9.3.2. Resultados y discusión

El análisis semi-cuantitativo de la farmacocinética a corto plazo (primeros 35 min de ensayo) de las NPs γ -Fe₂O₃/PLGA se representa en la Figura 43. La cinética de estas NPs se siguió mediante resonancia magnética dinámica después de la inyección intravenosa en ratones Balb/c. Durante este primer periodo de evaluación de la cinética se detectó una rápida captación de partículas por el hígado y el bazo (Figura 43a y 43b, respectivamente). Concretamente, en el hígado (Figura 43a) se puede observar un incremento brusco de la señal de $\approx 30\%$ (intensidad relativa de la señal (%)) en ≈ 5 min, y en el bazo (Figura 43b) este incremento inicial fue ligeramente más progresivo. Por el contrario, la retención de NPs por parte de los riñones podría considerarse casi insignificante, dado que el aumento de intensidad relativa (%) que se aprecia al inicio del ensayo fue inmediatamente seguido por una disminución de la intensidad relativa (%) a la línea basal (Figura 43c). A modo de control, la cinética de las NPs en el músculo fue también analizada semi-cuantitativamente: no se observó ningún cambio en la intensidad relativa de la señal (%). Inicialmente, estos resultados sugieren un rápido reconocimiento de las partículas γ -Fe₂O₃/PLGA por el SFM, seguido de una probable rápida eliminación del torrente sanguíneo por parte de los macrófagos esplénicos y del hígado, como las células de Kupffer.

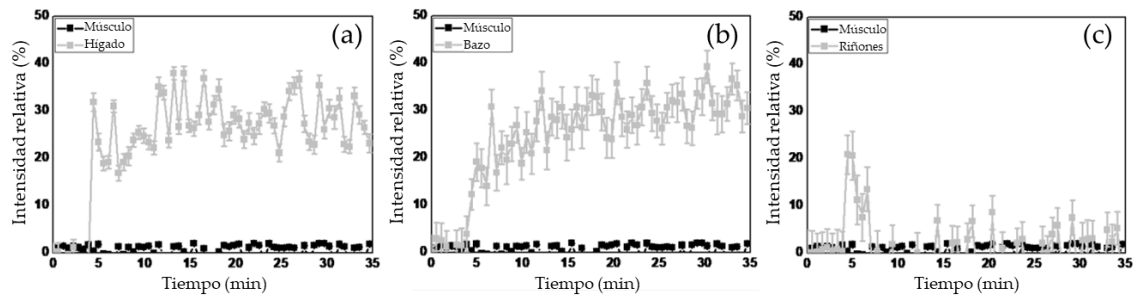


Figura 43. Cinéticas *in vivo* de las NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ después de la inyección intravenosa en ratones Balb/c: (a) hígado (gris) y músculo (negro); (b) bazo (gris) y músculo (negro); y, (c) riñón (gris) y músculo (negro).

Las imágenes ponderadas en T_2 sirvieron para evaluar cualitativamente la biodistribución *in vivo* de las NPs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ hasta 24 h (Figura 44a, 44b y 44c). Las imágenes del hígado y el bazo mostraron áreas claras de hipointensidad, que se traduce en oscurecimiento de la zona, a los tiempos de 1 h y 24 h tras la inyección de las partículas $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ (Figura 44b y 44c, respectivamente). Por el contrario, no se observaron cambios significativos en los riñones para ninguno de los tiempos. Por otro lado, la biodistribución *in vivo* de estas partículas también se evaluó cuantitativamente mediante mapas T_2 (Figura 44d). Estos mapas cuantitativos en T_2 revelaron una disminución significativa en T_2 para el hígado ($|\Delta T_2| \approx 4$ ms) y el bazo ($|\Delta T_2| \approx 5$ ms) 1 hora después de la inyección ($p < 0.05$). A las 24 h tras la inyección, el valor absoluto de ΔT_2 aumentó aún más en el caso del hígado ($|\Delta T_2| \approx 5.4$ ms; $p < 0.05$), mientras que se recuperó parcialmente en el bazo ($|\Delta T_2| \approx 2.2$ ms; $p < 0.05$). Finalmente, durante todo el experimento no se detectaron cambios significativos de ΔT_2 en riñones o músculo.

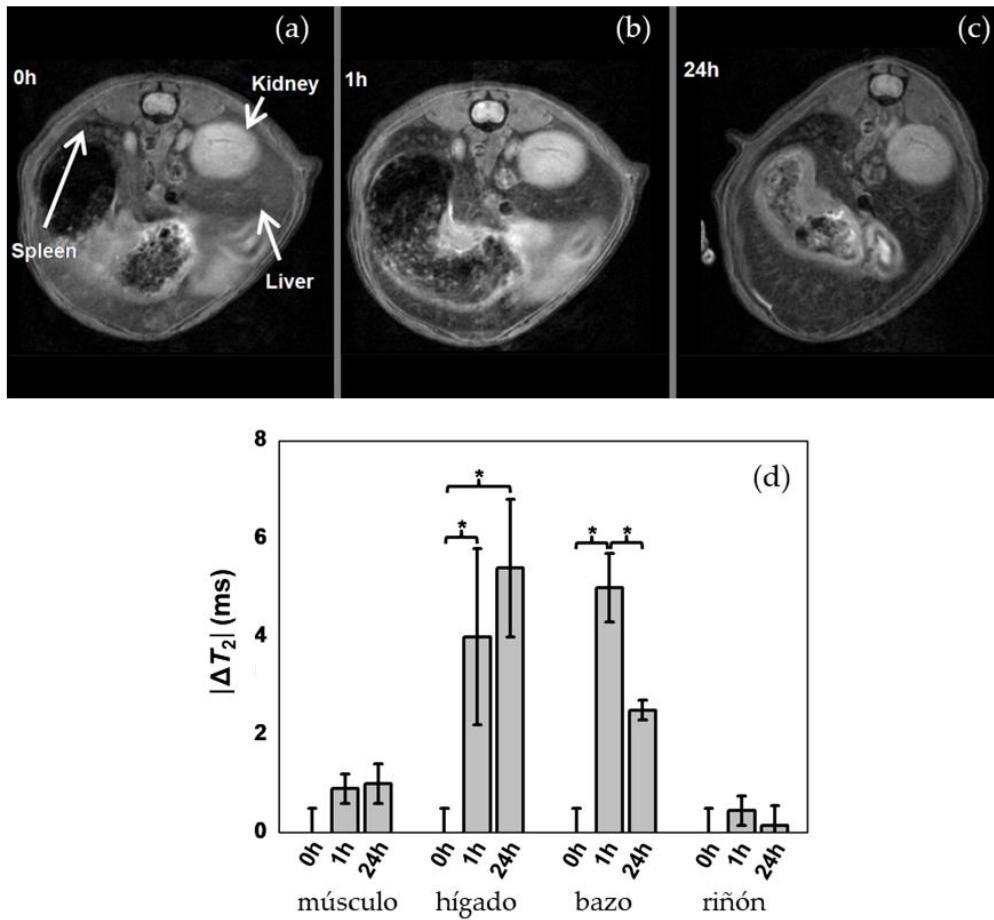


Figura 44. Imágenes de RM ponderadas en T₂ representativas de riñón, bazo e hígado después de la inyección de las NPs γ -Fe₂O₃/PLGA, tomadas en los tiempos: (a) 0 h, (b) 1 h y (c) 24 h. (d) Valores absolutos de ΔT_2 (ms) en función del tiempo (horas) en músculo, hígado, bazo y riñón después de la inyección de las NPs γ -Fe₂O₃/PLGA. Los datos experimentales se expresan como media \pm DE (n = 3). La prueba estadística fue significativa para datos con * (p < 0.05).

El análisis semi-cuantitativo de la farmacocinética de las NPs de (γ -Fe₂O₃/ PLGA)/QS en los primeros 35 min de ensayo se representa en la Figura 45. Al igual que en el caso de las partículas γ -Fe₂O₃/ PLGA, la cinética de estas NPs de (γ -Fe₂O₃/ PLGA)/QS se siguió mediante resonancia magnética dinámica después de la inyección intravenosa en ratones Balb/c. Se encontró que la cinética de las partículas de (γ -Fe₂O₃/ PLGA)/QS durante el primer periodo de ensayo era bastante diferente a lo descrito para las NPs de γ -Fe₂O₃/ PLGA. La captación por el hígado de los nanosistemas γ -Fe₂O₃/ PLGA recubiertos con QS (Figura 45a) fue menor que la observada para las partículas de γ -Fe₂O₃/ PLGA sin recubrir (Figura 43a). Concretamente se puede observar como en este caso, (γ -Fe₂O₃/ PLGA)/QS, los incrementos en la intensidad relativa de la señal (%) fueron menores, aun cuando el valor de r₂ para (γ -Fe₂O₃/ PLGA)/QS fue del \approx 30% mayor y la cantidad

inyectada fue idéntica en ambos casos. En el caso del bazo (Figura 45b) el recubrimiento con QS de las partículas $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ favoreció también una captación prácticamente nula. Al igual que en el caso de las partículas $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$, no se observó ningún cambio significativo en la intensidad relativa de la señal (%) en los riñones y el músculo tras la inyección intravenosa de estas NPs (Figura 45c). Tras analizar los resultados, se podría postular que la presencia de QS en la nanoestructura final le proporcionó adecuadas propiedades tipo *stealth* [Sarmiento B. y cols., 2011; Ishak R.A. y cols., 2013; Abouelmagd S.A. y cols., 2015; Chirio D. y cols., 2018]. El efecto *stealth* podría implicar el incremento del tiempo de circulación sanguínea de estas nanoplateformas, una característica importante para su aplicación en biomedicina.

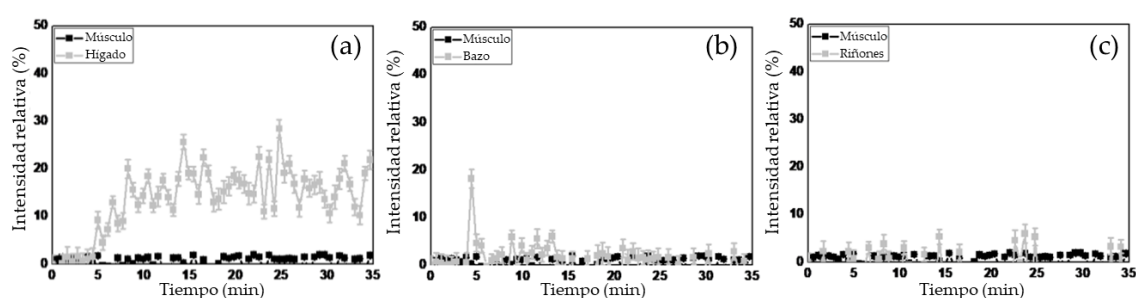


Figura 45. Cinéticas *in vivo* de las NPs de $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})\text{QS}$ después de la inyección intravenosa en ratones Balb/c: (a) hígado (gris) y músculo (negro); (b) bazo (gris) y músculo (negro); y, (c) riñón (gris) y músculo (negro).

Los resultados obtenidos de biodistribución *in vivo* corroboraron los hallazgos de las primeras cinéticas (Figura 46a, 46b, 46c y 46d). Analizando conjuntamente las imágenes ponderadas en T_2 y el mapeo cuantitativo de T_2 para las partículas $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})\text{QS}$, se encontró que los incrementos en el valor absoluto de ΔT_2 en el hígado (hasta ≈ 1.9 ms, $p < 0.05$, Figura 46d) eran más pequeños que los inducidos por las partículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ (hasta ≈ 5.4 ms, Figura 44d) a las 24h. Estos datos ratificarían la menor captación de las partículas $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ recubiertas por QS, en comparación con las no recubiertas. La captación de las partículas $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})\text{QS}$ fue insignificante en el bazo y en el músculo, tal y como se percibía ya en la Figura 45b, dejando entrever una probable interacción casi nula de estas partículas con los macrófagos esplénicos. Finalmente, se observaron cambios significativos tanto en las imágenes ponderadas en T_2 como en el valor absoluto de ΔT_2 en riñones ($p < 0.05$), aumentando hasta ≈ 6.1 ms a las 24 h postinyección.

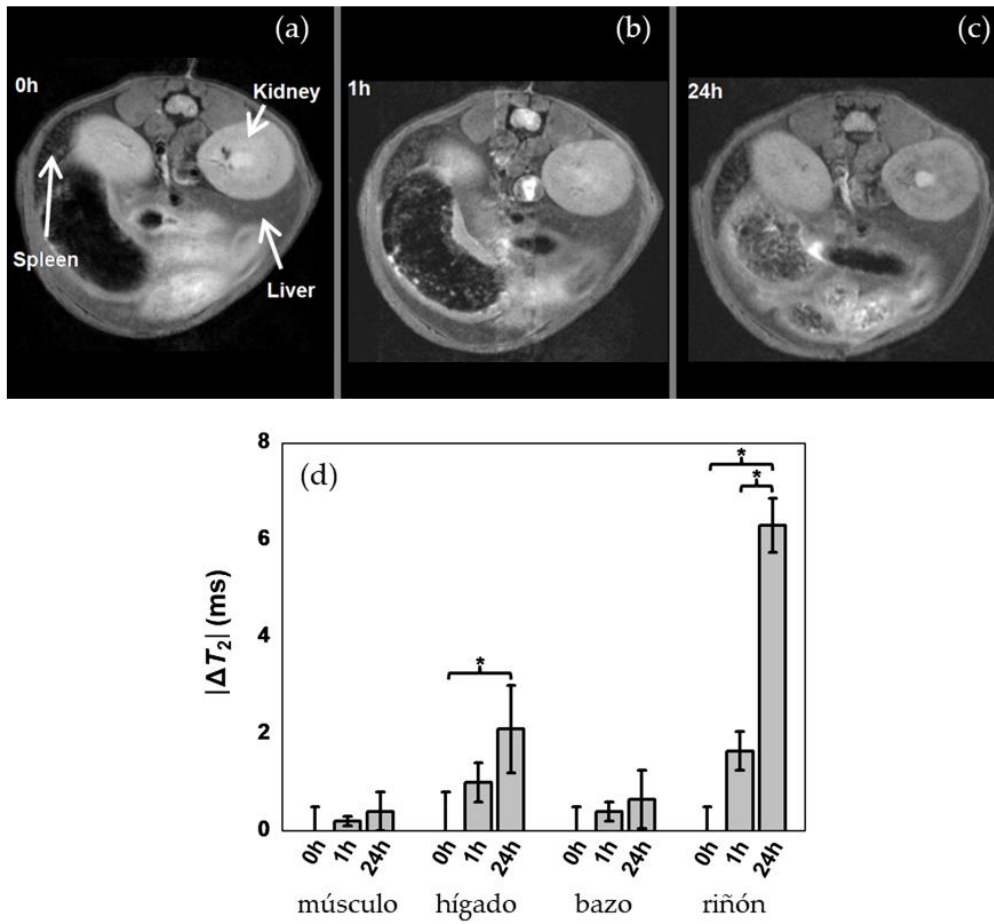


Figura 46. Imágenes de RM ponderadas en T₂ representativas de riñón, bazo e hígado después de la inyección de las NPs (γ -Fe₂O₃/PLGA)QS, tomadas en los tiempos: (a) 0 h, (b) 1 h y (c) 24 h. (d) Valores absolutos de ΔT_2 (ms) en función del tiempo (horas) en músculo, hígado, bazo y riñón después de la inyección de las NPs (γ -Fe₂O₃/PLGA)QS. Los datos experimentales se expresan como media \pm DE (n = 3). La prueba estadística fue significativa para datos con * ($p < 0.05$).

Los resultados de distribución *in vivo* destacan el prometedor empleo de nanosistemas de (γ -Fe₂O₃/PLGA)QS en biomedicina debido a sus potenciales propiedades tipo *stealth*. A pesar de ello, serían necesarios más experimentos *in vivo*, concretamente en ratones portadores de tumores. De esta forma, se podría definir adecuadamente el éxito de un direccionamiento guiado magnéticamente en la acumulación selectiva de nanosistemas en la masa tumoral.

9.4. Evaluación histológica *ex vivo* de depósitos de hierro

9.4.1. Metodología

La metodología de los experimentos de la evaluación histológica *ex vivo* de depósitos de hierro está indicada en el capítulo 6 “Biocompatibilidad y toxicidad de los nanosistemas” apartado 6.4. “Toxicidad *in vivo*”. Concretamente, en ese apartado se detalla el tratamiento previo a la tinción de las muestras, que es el mismo para este experimento. En este caso, la única diferencia en el procedimiento está en la fase de tinción de los tejidos, tinción de azul de Prusia (prussian blue; PB) en vez de H&E.

Brevemente, las muestras de tejido se tiñeron con PB para visualizar los posibles depósitos de hierro en los tejidos. Concretamente, las secciones de tejidos montadas sobre portaobjetos se sumergieron durante 30 minutos en la mezcla preparada a partes iguales de ácido clorhídrico (20%, v/v) y ferrocianuro potásico (10%, p/v), mezcla conocida como *azul de prusia*. A continuación, se lavaron tres veces en agua bidestilada y se tiñeron con rojo nuclear sólido (5 min). Finalmente, las muestras se lavaron (agua destilada, etanol al 100% y xileno al 100%), y se prepararon para su observación bajo un microscopio óptico.

9.4.2. Resultados y discusión

La Figura 47 recopila las imágenes histológicas tras la tinción con PB de varios tejidos: hígado, riñón y pulmón. La histología de estos tejidos se realizó a las 24 h tras la inyección de NPs γ -Fe₂O₃/PLGA y (γ -Fe₂O₃/PLGA)QS en ratones Balb/c. Observando los cortes histológicos de hígado después de la administración de las partículas γ -Fe₂O₃/PLGA, se pudieron ver depósitos de hierro (zonas de color azul), principalmente en las células de Kupffer. Tras esta misma administración, y a las 24h, no se detectaron depósitos de hierro en los riñones y pulmones. Por el contrario, con respecto a los nanocompuestos (γ -Fe₂O₃/PLGA)QS, sí se encontraron depósitos de hierro en los riñones y los pulmones, además de en el hígado. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los ensayos *in vivo* de RM (ver Figuras 43-46). Por tanto, estos nuevos hallazgos quieren apoyar la hipótesis anteriormente planteada en este mismo capítulo: la presencia de QS en la nanoestructura diseñada aporta ciertas propiedades que probablemente favorecerán una circulación sanguínea más prolongada en el tiempo [Sarmiento B. y cols., 2011; Ishak R.A. y cols., 2013; Abouelmagd S.A. y cols., 2015; Chirio D. y cols., 2018]. Resaltar que, una modificación superficial del nanosistema con QS parece favorecer una biodistribución más extensa, como, por ejemplo, llegando al tejido pulmonar [Lee S.Y. y cols., 2016].

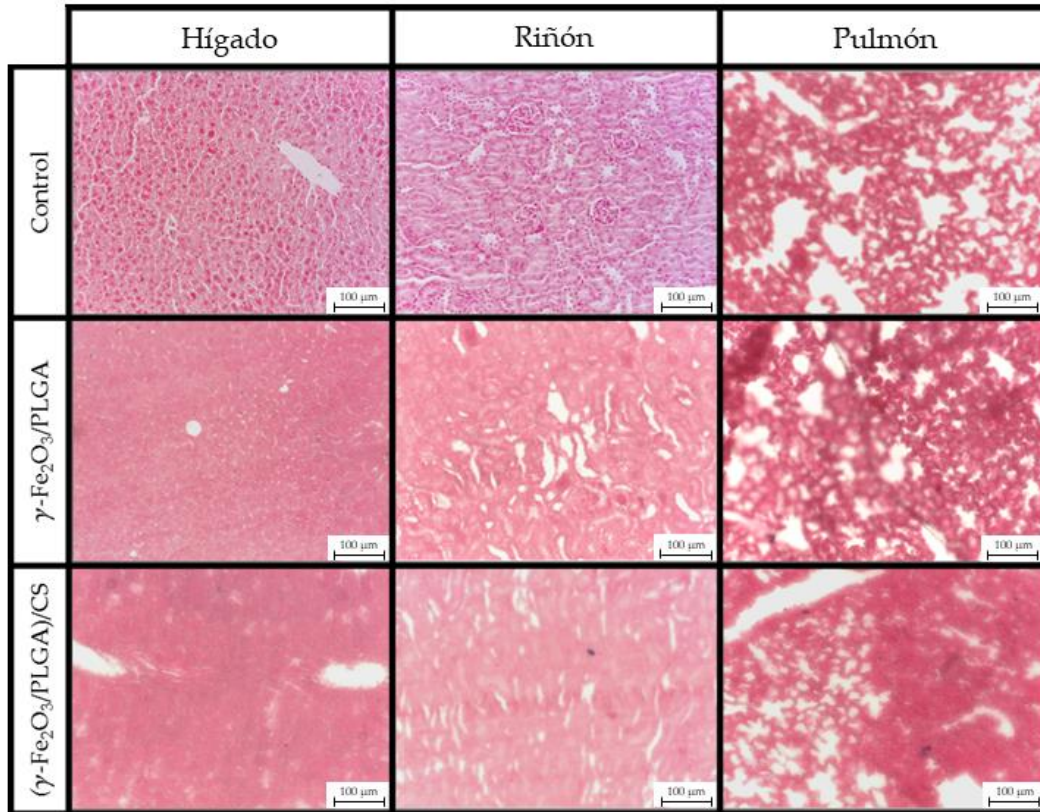


Figura 47. Tinción con PB de secciones histológicas representativas de hígado, riñón y pulmón a las 24 h después de la inyección intravenosa de partículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ y $(\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA})\text{QS}$. Se comparan con tinciones PB control de secciones histológicas de hígado, riñón y pulmón. Longitud de barras: 100 μm .

CAPÍTULO 10

Conclusiones

Las principales aportaciones obtenidas de este trabajo de investigación pueden resumirse en las siguientes 7 conclusiones, tantas como objetivos fijados al inicio de este trabajo:

1.- Se ha desarrollado una metodología reproducible y óptima de formulación de nanosistemas magnetopoliméricos basados en núcleos de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) embebidos en una matriz de poli(D,L-lactida-co-glicolida (PLGA) recubierta a su vez por quitosano. Un tamaño de partícula entorno a los 330 nm y un rendimiento de síntesis de entorno al 50% confirmaron la aplicación de condiciones óptimas de síntesis de sistemas coloidales aptos para la vía de administración parenteral.

2.- La correcta formación de esta nanoestructura se caracterizó física, química y fisicoquímicamente y su estructura se confirmó mediante microscopía electrónica, espectroscopia de dispersión de energía de rayos X, estudios electroforéticos y goniométricos, difracción de rayos X y espectroscopia de infrarrojos por Transformada de Fourier. Esta extensa caracterización confirmó la presencia de cada uno de los componentes de los nanocompuestos formulados: los núcleos de maghemita se encuentran embebidos dentro de la matriz de poli(D,L-lactida-co-glicolida y el quitosano recubre eficazmente toda la nanoplateforma. A mayores, los resultados obtenidos del análisis de los difractogramas de rayos X arrojaron información interesante acerca de la naturaleza cristalina de los núcleos de maghemita incorporados en el nanosistema. El mantenimiento de esta condición dentro del nanosistema posiblemente confiere a éste propiedades magnéticas ante un campo magnético, ya que una alta cristalinidad está relacionada con una adecuada respuesta magnética. Las propiedades magnéticas de las nanopartículas fueron posteriormente validadas mediante el estudio de su ciclo de histéresis y su respuesta magnética macro- y microscópica *in vitro* frente a un imán de 0.4 T. Se demostró que los nanocompuestos poseían un comportamiento magnético adecuado capaz de responder a campos magnéticos externos, lo que podría asegurar un eficiente guiado magnético hacia regiones diana del organismo. Finalmente, un mayor número de experimentos *in vivo* son necesarios para relacionar esta capacidad de respuesta magnética con una mayor acumulación de las partículas finales en la región diana.

3.- La estabilidad de los sistemas coloidales almacenados en frío (pH 6; 4.0 ± 0.5 °C) en función del tiempo se confirmó al no observar ningún cambio significativo en la evolución temporal de propiedades físico-químicas (tamaño de partícula e índice de polidispersión, y potencial zeta a corto plazo. De esta forma, se podría postular que la técnica de formulación de

las nanopartículas mixtas genera unos sistemas estables en el tiempo (pH 6; 4.0 ± 0.5 °C) poco propensos a la agregación.

4.- La evaluación de la citotoxicidad y compatibilidad sanguínea *in vitro* y la toxicidad *in vivo* de las nanoestructuras postularon una clara biocompatibilidad y seguridad para uso biomédico. Concretamente, la viabilidad celular (células sanas y tumorales) inalterada y la inexistencia de cambios en la morfología de los fibroblastos HFF-1 de prepucio humano junto con las pruebas de hemocompatibilidad concluyeron que los nanocompuestos se podrían caracterizar por un margen de seguridad adecuado *in vivo*, siendo adecuados para la administración parenteral. Esta afirmación se confirmó finalmente con pruebas de toxicidad *in vivo*.

5.- La constancia de la capacidad para la hipertermia magnética de los nanocompuestos, esto es, la capacidad para generar calor en la zona diana dentro de unos rangos determinados de temperatura bajo la influencia de un campo electromagnético alterno y la capacidad para reducir la viabilidad celular en líneas celulares tumorales (efecto antitumoral) bajo la influencia de un campo electromagnético alterno, respaldó la idea de un uso potencial de estos nanocompuestos como agentes en la hipertermia magnética antitumoral.

6.- La metodología de formulación desarrollada permitió una absorción eficiente del fármaco cisplatino en la matriz polimérica y la máxima carga del fármaco en las partículas reportando valores de eficacia de atrapamiento y carga de fármaco mayores ($\approx 81\%$ y 15% , respectivamente) a los previamente atribuidos a partículas no magnéticas basadas en poli(D,L-lactida-co-glicolida)/quitosano. Además, la incorporación del fármaco cisplatino en esta nanoestructura dio lugar a una liberación del fármaco sostenida y controlada. Estos nanocompuestos constituyen nanosistemas de liberación dual de fármacos sensibles a estímulos como el pH y la temperatura (temperatura de hipertermia). La velocidad de liberación de cisplatino fue 4.7 veces más rápida a pH ácido (medio tumoral) y a la temperatura máxima de hipertermia (hipertermia magnética) en comparación con la velocidad a condiciones fisiológicas estándar, información que da pie a postular que asociar fármacos con nanosistemas mejora el perfil farmacocinético de estos. Para finalizar, la incorporación del fármaco cisplatino en las nanoestructuras supuso un beneficio respecto al agente antitumoral libre en cuanto a su actividad anticancerosa *in vitro*. Las partículas cargadas con cisplatino demostraron una mayor citotoxicidad que las moléculas de cisplatino libres frente a células A-549 de adenocarcinoma de pulmón humano en ausencia de un campo

magnético aplicado y un valor de concentración de fármaco capaz de provocar el 50% de la inhibición celular (IC_{50}) 1.6 veces menor que la del quimioterápico libre.

7.- La determinación de los valores de las relajatividades longitudinal y transversal (campo magnético de 1.44 T) sirvieron como prueba preliminar del potencial de los nanocompuestos como agentes de contraste T_2 en resonancia magnética de imagen. Finalmente, los estudios de distribución en resonancia magnética de imagen *in vivo* (ratones macho cepa Balb/c) y la determinación histológica *ex vivo* de los depósitos de hierro reforzaron la hipótesis sobre el uso ventajoso del quitosano en la nanoestructura para proporcionar propiedades tipo *stealth* al nanosistema. Propiedades que podrían ayudar a retrasar el reconocimiento del sistema por parte del sistema fagocítico mononuclear y favorecer una circulación sanguínea más prolongada en el tiempo. La presencia de quitosano en la estructura nanométrica también podría favorecer una biodistribución específica hacia el tejido pulmonar. Resalta que serían necesarios más experimentos *in vivo* para confirmar la relación entre un direccionamiento guiado magnéticamente y la acumulación selectiva del nanocompuesto en la región diana.

En conjunto, estas nanoplataformas mixtas biocompatibles, sensibles a estímulos externos, con propiedades magnéticas y propiedades *stealth*, y con potencial como agentes en hipertermia magnética antitumoral y como agentes de contraste T_2 pueden constituir un candidato potencial para aplicaciones teranósticas dentro de la biomedicina, y concretamente en el cáncer de pulmón. Experimentos adicionales *in vitro* e *in vivo* contribuirán a definir si un direccionamiento guiado magnéticamente podría hacer posible la acumulación selectiva de partículas de [maghemita/poli(D,L-lactida-co-glicolida)]/quitosano en la masa tumoral y la eficacia terapéutica de esta nanoplataforma en la terapia contra el cáncer (quimioterapia e hipertermia magnética antitumoral).

BIBLIOGRAFÍA

Abouelmagd SA, Ku YJ, Yeo Y. Low molecular weight chitosan-coated polymeric nanoparticles for sustained and pH-sensitive delivery of paclitaxel. *J Drug Target*. 2015;23(7-8):725-35. doi: 10.3109/1061186X.2015.1054829.

Adamson AW, Gast AP. *Physical Chemistry of Surfaces*. 6th edn. New York: John Wiley & Sons, Inc; 1997.

Aggarwal P, Hall JB, McLeland CB, Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61(6):428-37. doi: 10.1016/j.addr.2009.03.009.

Aguilar ZP. *Nanomaterials for medical applications*. Amsterdam: Elsevier; 2013.

Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol Pharm* 2008;5(4):505e15

Alhakamy NA, Md S. Repurposing Itraconazole Loaded PLGA Nanoparticles for Improved Antitumor Efficacy in Non-Small Cell Lung Cancers. *Pharmaceutics*. 2019;11(12):685. doi: 10.3390/pharmaceutics11120685.

Alison E. Deatsch, Benjamin A. Evans. Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2014; 354: 163-172. doi: 10.1016/j.jmmm.2013.11.006.

Alshehri S, Imam SS, Rizwanullah M, Akhter S, Mahdi W, Kazi M, Ahmad J. Progress of Cancer Nanotechnology as Diagnostics, Therapeutics, and Theranostics Nanomedicine: Preclinical Promise and Translational Challenges. *Pharmaceutics*. 2020;13(1):24. doi: 10.3390/pharmaceutics13010024.

Amemiya Y, Arakaki A, Staniland SS, Tanaka T, Matsunaga T. Controlled formation of magnetite crystal by partial oxidation of ferrous hydroxide in the presence of recombinant

magnetotactic bacterial protein Mms6. *Biomaterials*. 2007;28 (35): 5381 - 5389. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.051

American Cancer Society. ACS: Learn About Cancer. [Online].;2022 [consultado el 2 de abril de 2022]. Disponible: <https://www.cancer.org/treatment/understanding-your-diagnosis/what-is-cancer.html>

Amin M, Huang W, Seynhaeve ALB, Ten Hagen TLM. Hyperthermia and Temperature-Sensitive Nanomaterials for Spatiotemporal Drug Delivery to Solid Tumors. *Pharmaceutics*. 2020; 12(11):1007. doi: 10.3390/pharmaceutics12111007.

Amin MK, Boateng JS. Comparison and process optimization of PLGA, chitosan and silica nanoparticles for potential oral vaccine delivery. *Ther Deliv*. 2019;10(8):493-514. doi: 10.4155/tde-2019-0038. Epub 2019 Sep 9. PMID: 31496377.

Amreddy N, Babu A, Muralidharan R, Panneerselvam J, Srivastava A, Ahmed R, Mehta M, Munshi A, Ramesh R. Recent Advances in Nanoparticle-Based Cancer Drug and Gene Delivery. *Adv Cancer Res*. 2018;137:115 – 170. doi: 10.1016/bs.acr.2017.11.003

Andersen HL, Saura-Múzquiz M, Granados-Miralles C, Canévet E, Lock N, Christensen M. Crystalline and magnetic structure-property relationship in spinel ferrite nanoparticles. *Nanoscale*. 2018;10(31):14902-14914. doi: 10.1039/c8nr01534a

Ansari MA, Almatroudi A, Alzohairy MA, AlYahya S, Alomary MN, Al-Dossary HA, Alghamdi S. Lipid-based nano delivery of Tat-peptide conjugated drug or vaccine-promising therapeutic strategy for SARS-CoV-2 treatment. *Expert Opin Drug Deliv*. 2020;17(12):1671-1674. doi: 10.1080/17425247.2020.1813712

Arachchige MP, Naik VM, Vaishnava PP, Jena BP, Naik R. Gd-doped superparamagnetic magnetite nanoparticles for potential cancer theranostics. En: Seehra M.S. *Nanostructured Materials*. IntechOpen; 2017. doi: 10.5772/intechopen.68219.

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. doi: 10.1039/c5cs00541h.

Arias JL, Gallardo V, Gómez-Lopera SA, Plaza RC, Delgado AV. Synthesis and characterization of poly(ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core. *J. Control. Release* 2001; 77: 309–321. doi: 10.1016/S0168-3659(01)00519-3

Arias JL, Gallardo V, Linares-Molinero F, Delgado AV. Preparation and characterization of carbonyl iron/poly(butylcyanoacrylate) core/shell nanoparticles. *J Colloid Interface Sci.* 2006;299(2):599-607. doi: 10.1016/j.jcis.2006.03.005.

Arias JL, Gallardo V, Ruiz MA, Delgado AV. Magnetite/poly(alkylcyanoacrylate) (core/shell) nanoparticles as 5-Fluorouracil delivery systems for active targeting. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008a; 69(1):54-63. doi: 10.1016/j.ejpb.2007.11.002

Arias JL, Reddy LH, Couvreur P. Magneto-responsive squalenoyl gemcitabine composite nanoparticles for cancer active targeting. *Langmuir.* 2008b;24(14):7512-9. doi: 10.1021/la800547s

Arias JL, Ruiz M, Gallardo V, Delgado AV. Tegafur loading and release properties of magnetite/poly(alkylcyanoacrylate) (core/shell) nanoparticles. *J Control Release.* 2008c;125(1):50-8. doi: 10.1016/j.jconrel.2007.09.008.

Arias JL, López-Viota M, Gallardo V, Adolfin Ruiz M. Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the chemotherapy agent tegafur. *Drug Dev Ind Pharm.* 2010a; 36(6):744-50. doi: 10.3109/03639040903517914.

Arias JL, Martínez-Soler GI, López-Viota M, Ruiz MA. Formulation of chitosan nanoparticles loaded with metronidazole for the treatment of infectious diseases. *Lett. Drug Des. Discov.* 2010b; 7, 70–78.

Arias JL, Reddy LH, Couvreur P. Superior preclinical efficacy of gemcitabine developed as chitosan nanoparticulate system. *Biomacromolecules.* 2011a;12(1):97-104. doi: 10.1021/bm101044h.

Arias JL, Reddy LH, Othman M, Gillet B, Desmaële D, Zouhiri F, Dosio F, Gref R, Couvreur P. Squalene based nanocomposites: a new platform for the design of multifunctional pharmaceutical theragnostics. *ACS Nano*. **2011b**;5(2):1513-21. doi: 10.1021/nn1034197.

Arias JL. Advanced methodologies to formulate nanotheragnostic agents for combined drug delivery and imaging. *Expert Opin Drug Deliv*. **2011a**;8(12):1589-608. doi: 10.1517/17425247.2012.634794.

Arias JL. Drug targeting strategies in cancer treatment: an overview. *Mini Rev Med Chem*. **2011b**;11(1):1-17. doi: 10.2174/138955711793564024.

Arias JL, Reddy LH, Couvreur P. Fe₃O₄/chitosan nanocomposite for magnetic drug targeting to cancer, *J. Mater. Chem.*, **2012**; 22: 7622–7632. doi: 10.1039/C2JM15339D

Arias JL. Liposomes in drug delivery: a patent review (2007 - present). *Expert Opin Ther Pat*. **2013**;23(11):1399-414. doi: 10.1517/13543776.2013.828035.

Arias LS, Pessan JP, de Souza Neto FN, Lima BHR, de Camargo ER, Ramage G, Delbem ACB, Monteiro DR. Novel nanocarrier of miconazole based on chitosan-coated iron oxide nanoparticles as a nanotherapy to fight *Candida* biofilms. *Colloids Surf B Biointerfaces*. **2020**;192:111080. doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.111080.

Assa F, Jafarizadeh-Malmiri H, Ajamein H, Vaghari H, Anarjan N, Ahmadi O, Berenjian A. Chitosan magnetic nanoparticles for drug delivery systems. *Crit Rev Biotechnol*. **2017**;37(4):492-509. doi: 10.1080/07388551.2016.1185389.

Asociación Española Contra el Cáncer. AECC. [Online].; 2021 [consultado el 6 de abril de 2022]. Disponible: <https://www.contraelcancer.es/es/todo-sobre-cancer/tratamientos>

Atkinson WJ, Brezovich IA, Chakraborty DP. Usable frequencies in hyperthermia with thermal seeds. *IEEE Trans Biomed Eng*. **1984**;31(1):70-5. doi: 10.1109/TBME.1984.325372

Avadi MR, Sadeghi AMM, Mohammadpour N, Abedin S, Atyabi F, Dinarvand R, Rafiee-Tehrani M. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. *Nanomedicine*. **2010**;6(1):58-63. doi: 10.1016/j.nano.2009.04.007.

Avgoustakis K, Beletsi A, Panagi Z, Klepetsanis P, Karydas AG, Ithakissios DS. PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. *J Control Release*. 2002;79(1-3):123-35. doi: 10.1016/s0168-3659(01)00530-2.

Aznavoorian S, Stracke ML, Krutzsch H, Schiffmann E, Liotta LA. Signal transduction for chemotaxis and haptotaxis by matrix molecules in tumor cells. *J Cell Biol*. 1990;110(4):1427-38. doi: 10.1083/jcb.110.4.1427.

Badran MM, Alomrani AH, Harisa GI, Ashour AE, Kumar A, Yassin AE. Novel docetaxel chitosan-coated PLGA/PCL nanoparticles with magnified cytotoxicity and bioavailability. *Biomed Pharmacother*. 2018;106:1461-1468. doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.102.

Babincov M, Altanerov V, Altaner C, Bergemann C, Babinec P. In vitro analysis of cisplatin functionalized magnetic nanoparticles in combined cancer chemotherapy and electromagnetic hyperthermia. *IEEE Trans Nanobioscience*. 2008;7(1):15-9. doi: 10.1109/TNB.2008.2000145.

Babiuch K, Gottschaldt M, Werz O, Schubert US. Particulate transepithelial drug carriers: barriers and functional polymers. *RSC Advances*. 2012; 2(28): 10427-10465.

Babu A, Amreddy N, Muralidharan R, Pathuri G, Gali H, Chen A, Zhao YD, Munshi A, Ramesh R. Chemodrug delivery using integrin-targeted PLGA-Chitosan nanoparticle for lung cancer therapy. *Sci Rep*. 2017;7(1):14674. doi: 10.1038/s41598-017-15012-5.

Baeza A, Guisasola E, Ruiz-Hernández E, Vallet-Regí M. Magnetically triggered multidrug release by hybrid mesoporous silica nanoparticles. *Chem. Mater*. 2012; 24: 517-524. doi: 10.1021/cm203000u.

Baker A, Khan MS, Iqbal MZ, Khan MS. Tumor-targeted Drug Delivery by Nanocomposites. *Curr Drug Metab*. 2020;21(8):599-613. doi: 10.2174/1389200221666200520092333

Bakhtiary Z, Saei AA, Hajipour MJ, Raoufi M, Vermesh O, Mahmoudi M. Targeted superparamagnetic iron oxide nanoparticles for early detection of cancer: Possibilities and challenges. *Nanomedicine*. 2016;12(2):287-307. doi: 10.1016/j.nano.2015.10.019.

Barcia E, Boeva L, García-García L, Slowing K, Fernández-Carballido A, Casanova Y, Negro S. Nanotechnology-based drug delivery of ropinirole for Parkinson's disease. *Drug Deliv* 2017;24:1112e23. doi: 10.1080/10717544.2017.1359862

Bazak R, Hourri M, Achy SE, Hussein W, Refaat T. Passive targeting of nanoparticles to cancer: A comprehensive review of the literature. *Mol Clin Oncol*. 2014;2(6):904-908. doi: 10.3892/mco.2014.356

Bee A, Massart R, Neveu S. Synthesis of very fine maghemite particles. *J. Magn. Magn. Mater.* 1995; 149: 6–9. doi: 10.1016/0304-8853(95)00317-7.

Benyettou F, Das G, Nair AR, Prakasam T, Shinde DB, Sharma SK, Whelan J, Lalatonne Y, Traboulsi H, Pasricha R, Abdullah O, Jagannathan R, Lai Z, Motte L, Gándara F, Sadler KC, Trabolsi A. Covalent Organic Framework Embedded with Magnetic Nanoparticles for MRI and Chemo-Thermotherapy. *J Am Chem Soc*. 2020;142(44):18782-18794. doi: 10.1021/jacs.0c05381.

Beola L, Asín L, Fratila RM, Herrero V, de la Fuente JM, Grazú V, Gutiérrez L. Dual Role of Magnetic Nanoparticles as Intracellular Hotspots and Extracellular Matrix Disruptors Triggered by Magnetic Hyperthermia in 3D Cell Culture Models. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10(51):44301-44313. doi: 10.1021/acsami.8b18270

Beola L, Asín L, Roma-Rodrigues C, Fernández-Afonso Y, Fratila RM, Serantes D, Ruta S, Chantrell RW, Fernandes AR, Baptista PV, de la Fuente JM, Grazú V, Gutiérrez L. The Intracellular Number of Magnetic Nanoparticles Modulates the Apoptotic Death Pathway after Magnetic Hyperthermia Treatment. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020;12(39):43474-43487. doi: 10.1021/acsami.0c12900. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acsami.0c12900>

Berral Santana A, López Rodríguez ME. Contraste tisular (capítulo 2). En: Costa Subías J., Soria Jerez J.A. *Resonancia magnética dirigida a técnicos superiores en imagen para el diagnóstico*. 2a edn. Madrid: Elsevier; 2015. 13 – 20.

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; 39:17–25.

Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad OC. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014;66:2-25. doi: 10.1016/j.addr.2013.11.009

Bikerman JJ. Electrokinetic equations and surface conductance: A survey of the diffuse double layer theory of colloidal solutions. *Trans. Faraday Soc.* 1940; 36: 154 – 160.

Bilati U, Allémann E, Doelker E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2005; 24: 67–75. doi: 10.1016/j.ejps.2004.09.011.

Blanco-Andujar C, Teran FJ, Ortega D. Chapter 8 - Current Outlook and Perspectives on Nanoparticle-Mediated Magnetic Hyperthermia. En: Mahmoudi M., Laurent S. *Metal Oxides, Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications.* Elsevier; 2018. 197–245. doi: 10.1016/B978-0-08-101925-2.00007-3.

Boyd RN, Morrison RT. *Organic Chemistry.* 5ta. Boston: Allyn and Bacon, Inc.; 1997.

Bouchemal K, Briançon S, Couenne F, Fessi H, Tayakout M. Stability studies on colloidal suspensions of polyurethane nanocapsules. *J Nanosci Nanotechnol.* 2006;6(9-10):3187-92. doi: 10.1166/jnn.2006.468

Bunz F, Vogelstein B. Capítulo 67: Bases genéticas del cáncer. En: Jameson J.L. Harrison: *principios de medicina interna.* 20a edn. México: McGraw Hill; 2018

Burtea C, Laurent S, Vander Elst L, Muller RN. Contrast Agents: Magnetic Resonance. En: Semmler W., Schwaiger M. *Molecular Imaging I. Handbook of Experimental Pharmacology.* Springer; 2008. 135 – 165. ISSN 0171-2004

Brittain HG, Bogdanowich SJ, Bugay DE, DeVincentis J, Lewen G, Newman AW. Physical characterization of pharmaceutical solids. *Pharm Res.* 1991;8(8):963-73. doi: 10.1023/a:1015888520352.

Brusini R, Varna M, Couvreur P. Advanced nanomedicines for the treatment of inflammatory diseases. *Adv Drug Deliv Rev.* 2020;157:161-178. doi: 10.1016/j.addr.2020.07.010.

Caban-Toktas S, Sahin A, Lule S, Esendagli G, Vural I, Karlı Oguz K, Soylemezoglu F, Mut M, Dalkara T, Khan M, Capan Y. Combination of Paclitaxel and R-flurbiprofen loaded PLGA nanoparticles suppresses glioblastoma growth on systemic administration. *Int J Pharm.* 2020 ;578:119076. doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119076.

Calle D, Ballesteros P, Cerdán S. Advanced Contrast Agents for Multimodal Biomedical Imaging Based on Nanotechnology. En: García-Martín M. L., López-Larrubia P. *Preclinical MRI: methods and protocols. Methods in molecular biology.* New York, USA: Springer; 2018. 441 – 457. doi: 10.1007/978-1-4939-7531-0

Calle D, Navarro T. Basic Pulse Sequences in Magnetic Resonance Imaging. En: García-Martín M. L., López-Larrubia P. *Preclinical MRI: methods and protocols. Methods in molecular biology.* New York, USA: Springer; 2018. 21 – 37. doi: 10.1007/978-1-4939-7531-0

Caracciolo G, Pozzi D, Capriotti AL , Cavaliere C , Piovesana S , La Barbera G , Amici A , Laganà A . The liposome-protein corona in mice and humans and its implications for in vivo delivery. *J Mater Chem B.* 2014 Nov 14;2(42):7419-7428. doi: 10.1039/c4tb01316f

Caravan P, Ellison JJ, McMurry TJ, Lauffer RB (1999) Gadolinium (III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics, and applications. *Chem Rev* 99(9):2293–2352

Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000;407(6801):249–57

Caro C, Muñoz-Hernández MC, Pernia Leal M, García-Martín ML. In Vivo Pharmacokinetics of Magnetic Nanoparticles. En: García-Martín ML, López-Larrubia P. *Preclinical MRI: methods and protocols. Methods in molecular biology.* New York, USA: Springer; 2018. 409 – 419. doi: 10.1007/978-1-4939-7531-0

Caro C, Egea-Benavente D, Polvillo R, Royo JL, Pernia Leal M, García-Martín ML. Comprehensive Toxicity Assessment of PEGylated Magnetic Nanoparticles for in vivo

applications. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019 May 1;177:253-259. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.01.051.

Carr GL, Williams GP. Infrared Microspectroscopy with Synchrotron Radiation source point. En: Williams GP, Dumas P. *Accelerator-Based Infrared Sources and Applications*. SPIE Conference Proceedings; 1997. p. 51.

Clares B, Biedma-Ortiz RA, Sáez-Fernández E, Prados JC, Melguizo C, Cabeza L, Ortiz R, Arias JL. Nano-engineering of 5-fluorouracil-loaded magnetoliposomes for combined hyperthermia and chemotherapy against colon cancer. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013 Nov;85(3 Pt A):329-38. doi: 10.1016/j.ejpb.2013.01.028.

Clark JW, Longo DL. Capítulo 68: Biología de la célula cancerosa. IN: J. Larry Jameson [editores]. *Harrison: principios de medicina interna*. 20a edn. México: McGraw Hill; 2018

Chen D, Lian S, Sun J, Liu Z, Zhao F, Jiang Y, Gao M, Sun K, Liu W, Fu F. Design of novel multifunctional targeting nano-carrier drug delivery system based on CD44 receptor and tumor microenvironment pH condition. *Drug Deliv*. 2016;23(3):808-13. doi: 10.3109/10717544.2014.917130

Cheng R, Meng F, Deng C, Klok HA, Zhong Z. Dual and multi-stimuli responsive polymeric nanoparticles for programmed site-specific drug delivery. *Biomaterials*. 2013;34(14):3647-57. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.01.084

Chen HA, Ma YH, Hsu TY, Chen JP. Preparation of Peptide and Recombinant Tissue Plasminogen Activator Conjugated Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) (PLGA) Magnetic Nanoparticles for Dual Targeted Thrombolytic Therapy. *Int J Mol Sci*. 2020;21(8):2690. doi: 10.3390/ijms21082690. PMID: 32294917

Chen H, Yang W, Chen H, Liu L, Gao F, Yang X, Jiang Q, Zhang Q, Wang Y. Surface modification of mitoxantrone-loaded PLGA nanospheres with chitosan. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2009;73(2):212-8. doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.05.020.

Chen L, Zhang H, Zheng J, Yu S, Du J, Yang Y, Liu X. Thermo-sensitively and magnetically ordered mesoporous carbon nanospheres for targeted controlled drug release and hyperthermia application. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2018 Mar 1;84:21-31. doi: 10.1016/j.msec.2017.11.033

Chen MYM, MD. Pope Jr. TL, Ott DJ. *Radiología básica*. Madrid: McGraw-Hill – Interamericana; 2006.

Chinen AB, Guan CM, Ferrer JR, Barnaby SN, Merkel TJ, Mirkin CA. Nanoparticle Probes for the Detection of Cancer Biomarkers, Cells, and Tissues by Fluorescence. *Chem Rev*. 2015 Oct 14;115(19):10530-74. doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00321

Chirio D, Peira E, Sapino S, Dianzani C, Barge A, Muntoni E, Morel S, Gallarate M. Stearoyl-Chitosan Coated Nanoparticles Obtained by Microemulsion Cold Dilution Technique. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12):3833. doi: 10.3390/ijms19123833.

Cho KS, Hong SJ, Ahn MH, Pal S, Choung PH, Sangshetti J, Arote RB. Targeted Delivery of siRNA Therapeutics using Ligand Mediated Biodegradable Polymeric Nanocarriers. *Curr Pharm Des*. 2018;24(16):1788-1800. doi: 10.2174/1381612824666180702113345.

Chronopoulou L, Massimi M, Giardi MF, Cametti C, Devirgiliis LC, Dentini M, Palocci C. Chitosan-coated PLGA nanoparticles: a sustained drug release strategy for cell cultures. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013;103:310-7. doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.10.063.

Chung YH, Beiss V, Fiering SN, Steinmetz NF. COVID-19 Vaccine Frontrunners and Their Nanotechnology Design. *ACS Nano*. 2020 Oct 27;14(10):12522-12537. doi: 10.1021/acsnano.0c07197

CIMA: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Ficha técnica del medicamento: Cisplatino Farmacia 1 mg/ml concentrado para solución para perfusión EFG. [Internet] [Consultado el 23/03/2022]. Disponible: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/62107/FT_62107.html#1-nombre-del-medicamento

Coco R, Plapied L, Pourcelle V, Jérôme C, Brayden DJ, Schneider YJ, Prémat V. Drug delivery to inflamed colon by nanoparticles: comparison of different strategies. *Int J Pharm.* 2013 Jan 2;440(1):3-12. doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.07.017

Colagar AH, Chaichi MJ, Khadjvand T. Fourier transform infrared microspectroscopy as a diagnostic tool for distinguishing between normal and malignant human gastric tissue. *J Biosci.* 2011 Sep;36(4):669-77. doi: 10.1007/s12038-011-9090-5.

Conde J, Dias JT, Grazú V, Moros M, Baptista PV, de la Fuente JM. Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine. *Front Chem.* 2014 Jul 15;2:48. doi: 10.3389/fchem.2014.00048.

Corbalán Sevilla MT, Sánchez Reyes JM. Fundamentos de la RM (capítulo 1). En: Costa Subías J., Soria Jerez J.A. Resonancia magnética dirigida a técnicos superiores en imagen para el diagnóstico. 2a edn. Madrid: Elsevier; 2015. 2 – 12

Cornell RM, Schwertmann U. *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses.* 2a edn. :Wheinheim: Wiley-Vch. 2003.

Corot C, Robert P, Idée JM, Port M. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58(14):1471-504. doi: 10.1016/j.addr.2006.09.013.

Cricchio V, Best M, Reverchon E, Maffulli N, Phillips G, Santin M, Della Porta G. Novel Superparamagnetic Microdevices Based on Magnetized PLGA/PLA Microparticles Obtained by Supercritical Fluid Emulsion and Coating by Carboxybetaine-Functionalized Chitosan Allowing the Tuneable Release of Therapeutics. *J Pharm Sci.* 2017;106(8):2097-2105. doi: 10.1016/j.xphs.2017.05.005.

Cuesta Pérez JJ, Cano Durán AJ. Sistema de RM: equipo y centro de control. Sala de RM (capítulo 3). En: Costa Subías J, Soria Jerez JA. Resonancia magnética dirigida a técnicos superiores en imagen para el diagnóstico. 2a edn. Madrid: Elsevier; 2015. 21 – 30

Cui YN, Xu QX, Davoodi P, Wang DP, Wang CH. Enhanced intracellular delivery and controlled drug release of magnetic PLGA nanoparticles modified with transferrin. *Acta Pharmacol Sin.* 2017;38(6):943-953. doi: 10.1038/aps.2017.45

Cummings BS, Schnellmann RG. Measurement of Cell Death in Mammalian Cells. *Curr Protoc.* 2021 Aug;1(8):e210. doi: 10.1002/cpz1.210

Curcio A, Silva AKA, Cabana S, Espinosa A, Baptiste B, Menguy N, Wilhelm C, Abou-Hassan A. Iron Oxide Nanoflowers @ CuS Hybrids for Cancer Tri-Therapy: Interplay of Photothermal Therapy, Magnetic Hyperthermia and Photodynamic Therapy. *Theranostics.* 2019 Feb 12;9(5):1288-1302. doi: 10.7150/thno.30238.

Dadfar SM, Roemhild K, Drude NI, von Stillfried S, Knüchel R, Kiessling F, Lammers T. Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2019 Jan 1;138:302-325. doi: 10.1016/j.addr.2019.01.005

Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014; 740: 364-378. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025

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. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.07.067

Das P, Colombo M, Prosperi D. Recent advances in magnetic fluid hyperthermia for cancer therapy. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2019 Feb 1;174:42-55. doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.10.051.

Davis BD, Cohn EJ. The Influence of Ionic Strength and pH on Electrophoretic Mobility. *J. Am. Chem. Soc.* 1939, 61, 8, 2092–2098. doi:10.1021/ja01877a036

De Broglie L. Recherches sur la Theorie des Quanta (Researches on the Quantum Theory) *Ann. Phys.* 1925;3: 22–128.

Dechy-Cabaret O, Martin-Vaca B, Bourissou D. Controlled ring-opening polymerization of lactide and glycolide. *Chem Rev.* 2004;104(12):6147-76. doi: 10.1021/cr040002s.

De Gouw DJJM, Maas MC, Slagt C, Mühling J, Nakamoto A, Klarenbeek BR, Rosman C, Hermans JJ, Scheenen TWJ. Controlled mechanical ventilation to detect regional lymph node metastases in esophageal cancer using USPIO-enhanced MRI; comparison of image quality. *Magn Reson Imaging.* 2020;74:258-265. doi: 10.1016/j.mri.2020.09.020.

De la Presa P, Luengo Y, Multigner M, Costo R, Morales MP, Rivero G, Hernando A. Study of Heating Efficiency as a Function of Concentration, Size, and Applied Field in γ -Fe₂O₃ Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C.* 2012; 116 (48): 25602-25610. doi: 10.1021/jp310771p

Delgado AV, González-Caballero F, Hunter RJ, Koopal LK, Lyklema J; International Union of Pure and Applied Chemistry, Physical and Biophysical Chemistry Division IUPAC Technical Report. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. *J Colloid Interface Sci.* 2007 May 15;309(2):194-224. doi: 10.1016/j.jcis.2006.12.075

Depeyrot J, Sousa EC, Aquino R, Tourinho FA, Dubois E, Bacri J-C, Perzynski R. Rare earth doped maghemite EDL-MF: A perspective for nanoradiotherapy? *J. Magn. Mater.* 2002; 252: 375–377. doi: 10.1016/S0304-8853(02)00623-6

Dhas N, Kudarha R, Pandey A, Nikam AN, Sharma S, Singh A, Garkal A, Hariharan K, Singh A, Bangar P, Yadhav D, Parikh D, Sawant K, Mutalik S, Garg N, Mehta T. Stimuli responsive and receptor targeted iron oxide based nanoplatfoms for multimodal therapy and imaging of cancer: Conjugation chemistry and alternative therapeutic strategies. *J Control Release.* 2021 May 10;333:188-245. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.03.021

Di Corato R, Aloisi A, Rella S, Greneche JM, Pugliese G, Pellegrino T, Malitesta C, Rinaldi R. Maghemite Nanoparticles with Enhanced Magnetic Properties: One-Pot Preparation and Ultrastable Dextran Shell. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018;10(24):20271-20280. doi: 10.1021/acsami.7b18411.

Di Marco M, Sadun C, Port M, Guilbert I, Couvreur P, Dubernet C. Physicochemical characterization of ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles (USPIO) for biomedical application as MRI contrast agents. *Int J Nanomedicine*. 2007;2(4):609-22.

Domínguez-Ríos R, Sánchez-Ramírez DR, Ruiz-Saray K, Ocegüera-Basurto PE, Almada M, Juárez J, Zepeda-Moreno A, Del Toro-Arreola A, Topete A, Daneri-Navarro A. Cisplatin-loaded PLGA nanoparticles for HER2 targeted ovarian cancer therapy. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019; 178: 199-207. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.03.011.

Dunne M, Corrigan I, Ramtoola Z. Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles. *Biomaterials*. 2000;21(16):1659-68. doi: 10.1016/s0142-9612(00)00040-5.

Durán JDG, Ontiveros A, Delgado AV, González-Caballero F, Chibowski EJ. A study on the adhesion of calcium carbonate to glass: energy balance in the deposition process. *Adhesion Sci. Technol*. 1996; 10: 847–868.

Durán JDG, Arias JL, Gallardo V, Delgado AV. Magnetic colloids as drug vehicles. *J Pharm Sci*. 2008;97(8):2948-83. doi: 10.1002/jps.21249

Durán-Lobato M, Muñoz-Rubio I, Holgado MA, Alvarez-Fuentes J, Fernández-Arévalo M, Martín-Banderas L. Enhanced cellular uptake and biodistribution of a synthetic cannabinoid loaded in surface-modified poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles. *J Biomed Nanotechnol*. 2014;10(6):1068-79. doi: 10.1166/jbn.2014.1806.

Dutz S, Hergt R. Magnetic particle hyperthermia--a promising tumour therapy? *Nanotechnology*. 2014;25(45):452001. doi: 10.1088/0957-4484/25/45/452001.

Easo SL, Mohanan PV. Dextran stabilized iron oxide nanoparticles: synthesis, characterization and in vitro studies. *Carbohydr Polym*. 2013 Jan 30;92(1):726-32. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.09.098.

El-Hammadi MM, Arias JL. Iron oxide-based multifunctional nanoparticulate systems for biomedical applications: a patent review (2008 - present). *Expert Opin Ther Pat.* 2015;25(6):691-709. doi: 10.1517/13543776.2015.1028358.

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 Jan 10;516(1-2):61-70. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.11.012

El-Hammadi MM, Arias JL. An update on liposomes in drug delivery: a patent review (2014-2018). *Expert Opin Ther Pat.* 2019 Nov;29(11):891-907. doi: 10.1080/13543776.2019.1679767.

Egerton RF. Electron energy-loss spectroscopy in the TEM. *Reports on Progress in Physics.* 2009.; 72: 016502.

European Medicines Agency (EMA). Gadolinium-containing contrast agents. [Online].;2017 [consultado el 4 de abril de 2022. Disponible: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/referrals/gadolinium-containing-contrast-agents>

Evans BC, Nelson CE, Yu SS, Beavers KR, Kim AJ, Li H, Nelson HM, Giorgio TD, Duvall CL. Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. *J Vis Exp.* 2013;(73):e50166. doi: 10.3791/50166.

Fam SY, Chee CF, Yong CY, Ho KL, Mariatulqabtiah AR, Tan WS. Stealth Coating of Nanoparticles in Drug-Delivery Systems. *Nanomaterials (Basel).* 2020 Apr 20;10(4):787. doi: 10.3390/nano10040787.

Fantechi E, Innocenti C, Zanardelli M, Fittipaldi M, Falvo E, Carbo M, Shullani V, Di Cesare Mannelli L, Ghelardini C, Ferretti AM, Ponti A, Sangregorio C, Ceci P. 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. doi: 10.1021/nn500454n.

Faraldos M, Goberna C. Técnicas de análisis y caracterización de materiales. 2a. edn. Editorial CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas; 2011.

Fernández-Álvarez F, Caro C, García-García G, García-Martín ML, Arias JL. Engineering of stealth (maghemite/PLGA)/chitosan (core/shell)/shell nanocomposites with potential applications for combined MRI and hyperthermia against cancer. *J Mater Chem B*. 2021a;9(24):4963-4980. doi: 10.1039/d1tb00354b

Fernández-Álvarez F, García-García G, Arias JL. A Tri-Stimuli Responsive (Maghemite/PLGA)/Chitosan Nanostructure with Promising Applications in Lung Cancer. *Pharmaceutics*. 2021b;13(8):1232. doi: 10.3390/pharmaceutics13081232.

Fessi H, Puisieux F, Devissaguet J-P, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* 55:R1–R4 (1989). doi:10.1016/0378-5173(89)90281-0

Fortin JP, Wilhelm C, Servais J, Ménager C, Bacri JC, Gazeau F. Size-sorted anionic iron oxide nanomagnets as colloidal mediators for magnetic hyperthermia. *J Am Chem Soc*. 2007 Mar 7;129(9):2628-35. doi: 10.1021/ja067457e

Fucharoen S, Viprakasit V. Hb H disease: clinical course and disease modifiers, *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. 2009: 26–34.

Gajbhiye KR, Pawar A, Mahadik KR, Gajbhiye V. PEGylated nanocarriers: A promising tool for targeted delivery to the brain. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2020;187:110770. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110770.

Gao P, Mei C, He L, Xiao Z, Chan L, Zhang D, Shi C, Chen T, Luo L. Designing multifunctional cancer-targeted nanosystem for magnetic resonance molecular imaging-guided theranostics of lung cancer. *Drug Deliv*. 2018;25(1):1811-1825. doi: 10.1080/10717544.2018.1494224.

Garaio E, Collantes J M, Plazaola F, Garcia JA, Castellanos-Rubio I. A multifrequency electromagnetic applicator with an integrated AC magnetometer for magnetic hyperthermia experiments. *Measurement Science and Technology*. 2014; 25.

García-García G, Fernández-Álvarez F, Cabeza L, Delgado ÁV, Melguizo C, Prados JC, Arias JL. Gemcitabine-Loaded Magnetically Responsive Poly(ϵ -caprolactone) Nanoparticles against Breast Cancer. *Polymers (Basel)*. 2020 Nov 25;12(12):2790. doi: 10.3390/polym12122790

Gaumet M, Vargas A, Gurny R, Delie F. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008;69(1):1-9. doi: 10.1016/j.ejpb.2007.08.001.

Geng Y, Yuan W, Wu F, Chen J, He M, Jin T. Formulating erythropoietin-loaded sustained-release PLGA microspheres without protein aggregation. *J Control Release* 2008, 130(3), 259-65. doi: 10.1016/j.jconrel.2008.06.011.

Ghafari M, Haghirsadat F, Khanamani Falahati-Pour S, Zavar Reza J. Development of a novel liposomal nanoparticle formulation of cisplatin to breast cancer therapy. *J Cell Biochem*. 2020;121(7):3584-3592. doi: 10.1002/jcb.29651.

Gilchrist RK, Medal R, Shorey WD, Hanselman RC, Parrott JC, Taylor CB. Selective inductive heating of lymph nodes. *Ann Surg*. 1957;146(4):596-606. doi: 10.1097/00000658-195710000-00007.

Goldstein JI, Newbury DE, Echlin P, Joy DC, Romig Jr AD, Lyman CE, Fiori C, Lifshin E. *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis: A Text for Biologists, Materials Scientist, and Geologists*. 2a edn. Nueva York: Springer; 2012.

Goldstein LS, Dewhirst MW, Repacholi M, Kheifets L. Summary, conclusions and recommendations: adverse temperature levels in the human body. *Int J Hyperthermia*. 2003 May-Jun;19(3):373-84. doi: 10.1080/0265673031000090701

Guisasola E, Asín L, Beola L, de la Fuente JM, Baeza A, Vallet-Regí M. Beyond Traditional Hyperthermia: In Vivo Cancer Treatment with Magnetic-Responsive Mesoporous Silica Nanocarriers. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018 Apr 18;10(15):12518-12525. doi: 10.1021/acsami.8b02398

Gu J, Al-Bayati K, Ho EA. Development of antibody-modified chitosan nanoparticles for the targeted delivery of siRNA across the blood-brain barrier as a strategy for inhibiting HIV replication in astrocytes. *Drug Deliv Transl Res* 2017;7:497e506. doi: 10.1007/s13346-017-0368-5

Gulliani GL, Hyun BH, Litten MB. Blood recalcification time. A simple and reliable test to monitor heparin therapy. *Am J Clin Pathol.* 1976, 65 (3), 390-396. doi: 10.1093/ajcp/65.3.390

Gupta R, Sharma D. Biofunctionalization of magnetite nanoparticles with stevioside: effect on the size and thermal behaviour for use in hyperthermia applications. *Int J Hyperthermia.* 2019;36(1):302-312. doi: 10.1080/02656736.2019.1565787.

Gustafson HH, Holt-Casper D, Grainger DW, Ghandehari H (2015) Nanoparticle uptake: the phagocyte problem. *Nano Today* 10 (4):487–510. doi: 10.1016/j.nantod.2015.06.006.

Hahn GM. Potential for therapy of drugs and hyperthermia. *Cancer Research.* 1979; 39: 2264-2268.

Haider M, Elsherbeny A, Jagal J, Hubatová-Vacková A, Saad Ahmed I. Optimization and Evaluation of Poly(lactide-co-glycolide) Nanoparticles for Enhanced Cellular Uptake and Efficacy of Paclitaxel in the Treatment of Head and Neck Cancer. *Pharmaceutics.* 2020;12(9):828. doi: 10.3390/pharmaceutics12090828.

Hall JE. Control genético de la síntesis proteica, las funciones de la célula y la reproducción celular. En: Guyton y Hall Tratado de fisiología médica. 12a edn. España: Elsevier S.L.; 2011. 27-42.

Hanson M. The frequency dependence of the complex susceptibility of magnetic fluids. *J Magn Magn Mater.* 1991;96.

Harris J. Staining MIF in Cells for Confocal Microscopy. *Methods Mol Biol.* 2020;2080:85-91. doi: 10.1007/978-1-4939-9936-1_8

He C, Hu Y, Yin L, Tang C, Yin C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*. 2010;31(13):3657-66. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.065.

Hedayatnasab Z, Abnisa F, Daud WMAW. Review on magnetic nanoparticles for magnetic nanofluid hyperthermia application. *Materials & Design*. 2017; 23: 174-196. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2017.03.036>

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 Sep 17;52(9):2445-2461. doi: 10.1021/acs.accounts.9b00228

Hergt R, Dutz S. Magnetic particle hyperthermia-biophysical limitations of a visionary tumour therapy. *J. Magn. Magn. Mater*. 2007; 311: 187. doi: 10.1016/j.jmmm.2006.10.1156

Henry DC. *Proc. R. Soc. London Ser. A*. 1931; 133:106.

Holgado MA, Alvarez-Fuentes J, Fernández-Arévalo M, Arias JL. Possibilities of poly(D,L-lactide-co-glycolide) in the formulation of nanomedicines against cancer. *Curr Drug Targets*. 2011;12(8):1096-111. doi: 10.2174/138945011795906606

Hollis CP, Weiss HL, Leggas M, Evers BM, Gemeinhart RA, Li T. Biodistribution and bioimaging studies of hybrid paclitaxel nanocrystals: lessons learned of the EPR effect and image-guided drug delivery. *J Control Release*. 2013 Nov 28;172(1):12-21. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.06.039

Hou X, Tao Y, Pang Y, Li X, Jiang G, Liu Y. Nanoparticle-based photothermal and photodynamic immunotherapy for tumor treatment. *Int J Cancer*. 2018 Dec 15;143(12):3050-3060. doi: 10.1002/ijc.31717.

Howell WH. Structure of the fibrin-gel and theories of gel-formation. *Am. J. Physiol*. 1916; 40, 526 – 546.

Huang Y, Tang Z, Zhang X, Yu H, Sun H, Pang X, Chen X. pH-Triggered charge-reversal polypeptide nanoparticles for cisplatin delivery: preparation and in vitro evaluation. *Biomacromolecules*. 2013;14(6):2023-32. doi: 10.1021/bm400358z.

Hückel E. The Cataphoresis of the Sphere. *Phys Z*. 1924; 25: 204.

Hu F, Jia Q, Li Y, Gao M. Facile synthesis of ultrasmall PEGylated iron oxide nanoparticles for dual-contrast T1- and T2-weighted magnetic resonance imaging. *Nanotechnology*. 2011; 22

Hunter RJ. *Foundations of colloid science*. 2a edn. Oxford: Oxford University Press; 2001.

Ibarra J, Melendres J, Almada M, Burboa M.G., Taboada P, Juárez J, Valdez MA. Synthesis and characterization of magnetite/PLGA/chitosan nanoparticles. *Mater. Res. Express* 2015, 2, 095010. doi: 10.1088/2053-1591/2/9/095010

Idris MI, Zaloga J, Detsch R, Roether JA, Unterweger H, Alexiou C, Boccaccini AR. Surface Modification of SPIONs in PHBV Microspheres for Biomedical Applications. *Sci Rep*. 2018 ;8(1):7286. doi: 10.1038/s41598-018-25243-9.

Iglesias GR, Reyes-Ortega F, Checa Fernandez BL, Delgado ÁV. Hyperthermia-Triggered Gemcitabine Release from Polymer-Coated Magnetite Nanoparticles. *Polymers (Basel)*. 2018 Mar 6;10(3):269. doi: 10.3390/polym10030269.

International Organization for Standardization. *Biological Evaluation of Medical Devices — Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity (ISO 10993-5:2009)*. 2009.

International Organization for Standardization. *Particle size analysis — Dynamic light scattering (DLS) (ISO 22412:2017)*. 2017.

Instituto Nacional de Estadística. INE: Estadística de Defunciones según la Causa de Muerte. [Online].; 2021 [consultado el 6 de abril de 2022. Disponible: <https://www.ine.es/dynt3/inebase/index.htm?padre=8084&capsel=8099>

Instituto Nacional del Cáncer. NIH: Tipos de tratamiento, cirugía para tratar el cáncer. [Online].; 2015a [consultado el 6 de abril de 2022. Disponible: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/cirugia>

Instituto Nacional del Cáncer. NIH: Tipos de tratamiento, radioterapia para tratar el cáncer. [Online].; 2015b [consultado el 6 de abril de 2022. Disponible: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/radioterapia>

Iram S, Zahera M, Khan S, Khan I, Syed A, Ansary AA, Ameen F, Shair OHM, Khan MS. Gold nanoconjugates reinforce the potency of conjugated cisplatin and doxorubicin. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017; 160: 254-264. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.09.017.

Ishak RA, Awad GA, Zaki NM, El-Shamy Ael-H, Mortada ND. A comparative study of chitosan shielding effect on nano-carriers hydrophilicity and biodistribution. *Carbohydr Polym*. 2013 Apr 15;94(1):669-76. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.01.072

Ishida T, Kiwada H. Accelerated blood clearance (ABC) phenomenon upon repeated injection of PEGylated liposomes. *Int J Pharm*. 2008 Apr 16;354(1-2):56-62. doi: 10.1016/j.ijpharm.2007.11.005.

Jadhav SV, Shewale PS, Shin BC, Patil MP, Kim GD, Rokade AA, Park SS, Bohara RA, Yu YS. Study of structural and magnetic properties and heat induction of gadolinium-substituted manganese zinc ferrite nanoparticles for in vitro magnetic fluid hyperthermia. *J Colloid Interface Sci*. 2019; 541:192-203. doi: 10.1016/j.jcis.2019.01.063

Jain GK, Pathan SA, Akhter S, Ahmad N, Jain N, Talegaonkar S, Khar RK, Ahmad FJ. Mechanistic study of hydrolytic erosion and drug release behaviour of PLGA nanoparticles: Influence of chitosan. *Polym. Degrad. Stab*. 2010; 95: 2360–2366. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2010.08.015

Jain V, Kumar H, Anod HV, Chand P, Gupta NV, Dey S, Kesharwani SS. A review of nanotechnology-based approaches for breast cancer and triple-negative breast cancer. *J Control Release*. 2020 Oct 10;326:628-647. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.07.003.

Jain RK, Martin JD, Stylianopoulos T. The role of mechanical forces in tumor growth and therapy. *Annu Rev Biomed Eng.* 2014 Jul 11;16:321-46. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071813-105259

Jalil R, Nixon JR. Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties. *J Microencapsul.* 1990 Jul-Sep;7(3):297-325. doi: 10.3109/02652049009021842

Jiang X, Fan X, Xu W, Zhao C, Wu H, Zhang R, Wu G. Self-assembled peptide nanoparticles responsive to multiple tumor microenvironment triggers provide highly efficient targeted delivery and release of antitumor drug. *J Control Release.* 2019 Dec 28;316:196-207. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.10.031.

Jordan A, Wust P, Fähling H, John W, Hinz A, Felix R. Inductive heating of ferrimagnetic particles and magnetic fluids: physical evaluation of their potential for hyperthermia. *Int J Hyperthermia.* 1993; 9(1): 51-68. doi: 10.3109/02656739309061478.

Jordan A, Wust P, Scholz R, Tesche B, Fahling H, Mitrovics T, Vogl T, CervosNavarro J, Felix R. Cellular uptake of magnetic fluid particles and their effects on human adenocarcinoma cells exposed to AC magnetic fields in vitro. *Int. J. Hyperth.* **1996**; 12: 705-722

Jordan A, Scholz R, Wust P, Fähling H and Felix R. Magneticfluid hyperthermia (mfh): cancer treatment with ac magneticfield induced excitation of biocompatible superparamagneticnanoparticles *J. Magn. Magn. Mater.* 1999; 201: 413-419.

Jordan A, Wust P, Fähling H, John W, Hinz A, Felix R. Inductive heating of ferrimagnetic particles and magnetic fluids: physical evaluation of their potential for hyperthermia. *Int J Hyperthermia.* **2009**;25(7):499-511. doi: 10.3109/02656730903287790.

Kalber TL, Ordidge KL, Southern P, Loebinger MR, Kyrtatos PG, Pankhurst QA, Lythgoe MF, Janes SM. Hyperthermia treatment of tumors by mesenchymal stem cell-delivered superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2016; 11: 1973-83. doi: 10.2147/IJN.S94255

Kalhapure RS, Renukuntla J. Thermo- and pH dual responsive polymeric micelles and nanoparticles. *Chem Biol Interact.* 2018; 295:20-37. doi: 10.1016/j.cbi.2018.07.016.

Kamaly N, Yameen B, Wu J, Farokhzad OC. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chem Rev.* 2016 Feb 24;116(4):2602-63. doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00346

Kang JK, Kim JC, Shin Y, Han SM, Won WR, Her J, Park JY, Oh KT. Principles and applications of nanomaterial-based hyperthermia in cancer therapy. *Arch Pharm Res.* 2020; 43(1):46-57. doi: 10.1007/s12272-020-01206-5.

Kashyap S, Singh A, Mishra A, Singh V. Enhanced sustained release of furosemide in long circulating chitosan-conjugated PLGA nanoparticles. *Res Pharm Sci.* 2019;14(2):93-106. doi: 10.4103/1735-5362.253356.

Kettering M, Grau I, Pömpner N, Stapf M, Gajda M, Teichgräber U, Hilger I. Means to increase the therapeutic efficiency of magnetic heating of tumors. *Biomed Tech (Berl).* 2015;60(5):505-17. doi: 10.1515/bmt-2015-0052.

Khandhar AP, Ferguson RM, Simon JA, Krishnan KM. Tailored magnetic nanoparticles for optimizing magnetic fluid hyperthermia. *J Biomed Mater Res A.* 2012;100(3):728-37. doi: 10.1002/jbm.a.34011.

Kim HC, Kim E, Jeong SW, Ha TL, Park SI, Lee SG, Lee SJ, Lee SW. Magnetic nanoparticle-conjugated polymeric micelles for combined hyperthermia and chemotherapy. *Nanoscale.* 2015;7(39):16470-80. doi: 10.1039/c5nr04130a.

Kim JH, Kim YS, Park K, Lee S, Nam HY, Min KH, Jo HG, Park JH, Choi K, Jeong SY, Park RW, Kim IS, Kim K, Kwon IC. Antitumor efficacy of cisplatin-loaded glycol chitosan nanoparticles in tumor-bearing mice. *J Control Release.* 2008;127(1):41-9. doi: 10.1016/j.jconrel.2007.12.014.

Kim K, Khang D. Past, present, and future of anticancer nanomedicine. *Int. J. Nanomed.* 2020; 15: 5719–5743.

Kittel C. Introduction to Solid State Physics. 8a edn. Nueva York: John Wiley & Sons, Inc.; 2004

Kloust H, Schmidtke C, Feld A, Schotten T, Eggers R, Fittschen UE, Schulz F, Pöselt E, Ostermann J, Bastús NG, Weller H. In situ functionalization and PEO coating of iron oxide nanocrystals using seeded emulsion polymerization. *Langmuir*. 2013 Apr 16;29(15):4915-21. doi: 10.1021/la400713p.

Kotelevets L, Chastre E, Desmaële D, Couvreur P. Nanotechnologies for the treatment of colon cancer: From old drugs to new hope. *Int J Pharm*. 2016;514(1):24-40. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.06.005.

Kowalskaa J, Gajdab M. Chemical Composition of Atherosclerotic Plaques of apoE/LDLR-Double Knockout Mice by Synchrotron Radiation FTIR Microspectroscopy. *Acta physica polonica*. 2012; 121(2): 555-560.

Krishnan KM, Pakhomov AB, Bao Y, Blomqvist P, Chun Y, Gonzales M, Griffin K, Ji X, Roberts BK. Nanomagnetism and spin electronics: materials, microstructure and novel properties. *J Mater Sci*. 2006; 41(3): 793-815. doi: 10.1007/s10853-006-6564-1 (243).

Kumar CS, Mohammad F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011 Aug 14;63(9):789-808. doi: 10.1016/j.addr.2011.03.008

Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010 Jan 1;75(1):1-18. doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.09.001

Lachowicz D, Szpak A, Malek-Zietek KE, Kepczynski M, Muller RN, Laurent S, Nowakowska M, Zapotoczny S. Biocompatible and fluorescent superparamagnetic iron oxide nanoparticles with superior magnetic properties coated with charged polysaccharide derivatives. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017 Feb 1;150:402-407. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.11.003.

Lafuente Martínez J, Ramón Botella E. Módulo VII. Resonancia Magnética (Capítulo 55). En: SERAM (Sociedad Española de Radiología Médica): Azpeitia J, Puig J, Soler R. Manual para Técnico Superior en Imagen para el Diagnóstico y Medicina Nuclear. 1a edm. Madrid: Médica Panamericana; 2016. ISBN: 9788491100836.

Lanone S, Boczkowski J. Biomedical applications and potential health risks of nanomaterials: molecular mechanisms. *Curr Mol Med*. 2006 Sep;6(6):651-63. doi: 10.2174/156652406778195026

Lappe S, Mulac D, Langer K. Polymeric nanoparticles - Influence of the glass transition temperature on drug release. *Int J Pharm*. 2017 Jan 30;517(1-2):338-347. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.12.025.

Lauterbur PC, Mendonça-Dias MH, Rudin AM. Augmentation of tissue water proton spinlattice relaxation rates by *in-vivo* addition of paramagnetic ions. En: Dutton P.O., Leigh J., Scarpa A. *Frontiers of Biological Energetics*. New York: Academic Press; 1978. 752-759.

Lee H, Lee E, Kim DK, Jang NK, Jeong YY, Jon S. Antibiofouling polymer-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles as potential magnetic resonance contrast agents for *in vivo* cancer imaging. *J Am Chem Soc*. 2006 Jun 7;128(22):7383-9. doi: 10.1021/ja061529k

Lee H, Kim S, Choi BH, Park MT, Lee J, Jeong SY, Choi EK, Lim BU, Kim C, Park HJ. Hyperthermia improves therapeutic efficacy of doxorubicin carried by mesoporous silica nanocontainers in human lung cancer cells. *Int J Hyperthermia*. 2011;27(7):698-707. doi: 10.3109/02656736.2011.608217

Lee N, Yoo D, Ling D, Cho MH, Hyeon T, Cheon J. Iron Oxide Based Nanoparticles for Multimodal Imaging and Magneto-responsive Therapy. *Chem Rev*. 2015;115(19):10637-89. doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00112

Lee SY, Jung E, Park JH, Park JW, Shim CK, Kim DD, Yoon IS, Cho HJ. Transient aggregation of chitosan-modified poly(d,l-lactic-co-glycolic) acid nanoparticles in the blood stream and improved lung targeting efficiency. *J Colloid Interface Sci*. 2016; 480:102-108. doi: 10.1016/j.jcis.2016.07.006

Li A, Tyson J, Patel S, Patel M, Katakam S, Mao X, He W. Emerging Nanotechnology for Treatment of Alzheimer's and Parkinson's Disease. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021 May 25;9:672594. doi: 10.3389/fbioe.2021.672594

Li G, Wang Y, Tan G. The construction of EpCAM/vimentin-PLGA/lipid immunomagnetic microspheres and the isolation of circulating tumor cells from lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2018; 11(12):5561-5570.

Li H, Sun J, Zhu H, Wu H, Zhang H, Gu Z, Luo K. Recent advances in development of dendritic polymer-based nanomedicines for cancer diagnosis. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2021;13(2):e1670. doi: 10.1002/wnan.1670.

Li L, Jiang W, Luo K, Song H, Lan F, Wu Y, Gu Z. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as MRI contrast agents for non-invasive stem cell labeling and tracking. *Theranostics.* 2013; 3(8):595-615. doi: 10.7150/thno.5366.

Ling Y, Long M, Hu P, Chen Y, Huang J. Magnetically separable core-shell structural γ -Fe₂O₃@Cu/Al-MCM-41 nanocomposite and its performance in heterogeneous Fenton catalysis. *J Hazard Mater.* 2014; 264:195-202. doi: 10.1016/j.jhazmat.2013.11.008

Liu S, Khan AR, Yang X, Dong B, Ji J, Zhai G. The reversal of chemotherapy-induced multidrug resistance by nanomedicine for cancer therapy. *J Control Release.* 2021; 335:1-20. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.05.012.

Liu X, Huang N, Li H, Jin Q, Ji J. Surface and size effects on cell interaction of gold nanoparticles with both phagocytic and nonphagocytic cells. *Langmuir.* 2013;29(29):9138-48. doi: 10.1021/la401556k.

Liu Y, Crawford BM, Vo-Dinh T. Gold nanoparticles mediated photothermal therapy and immunotherapy. *Immunotherapy.* 2018; 10: 1175–1188. doi: 10.2217/imt-2018-0029.

Li W, Yalcin M, Lin Q, Ardawi MM, Mousa SA. Self-assembly of green tea catechin derivatives in nanoparticles for oral lycopene delivery. *J Control Release.* 2017; 248:117-124. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.01.009.

Li Z, Tan S, Li S, Shen Q, Wang K. Cancer drug delivery in the nano era: An overview and perspectives (Review). *Oncol Rep.* 2017;38(2):611-624. doi: 10.3892/or.2017.5718.

López-León T, Carvalho EL, Seijo B, Ortega-Vinuesa JL, Bastos-González D. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. *J. Colloid Interf. Sci.* 283(2):344–351 (2005). doi:10.1016/j.jcis.2004.08.186

López-López MT, Durán JD, Delgado AV, González-Caballero F. Stability and magnetic characterization of oleate-covered magnetite ferrofluids in different nonpolar carriers. *J Colloid Interface Sci.* 2005;291(1):144-51. doi: 10.1016/j.jcis.2005.04.099.

López-Vega JM, Flórez J. Quimioterapia antineoplásica (capítulo 59). En: Flórez J., Armijo J.A., Mediavilla A. *Farmacología humana*. 6ª edn. Barcelona: Elsevier Masson; 2014. 905-941.

Lorente C, Cabeza L, Clares B, Ortiz R, Halbaut L, Delgado ÁV, Perazzoli G, Prados J, Arias JL, Melguizo C. Formulation and in vitro evaluation of magnetoliposomes as a potential nanotool in colorectal cancer therapy. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2018 Nov 1;171:553-565. doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.07.070

Love SA, Maurer-Jones MA, Thompson JW, Lin YS, Haynes CL. Assessing nanoparticle toxicity. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif).* 2012;5:181-205. doi: 10.1146/annurev-anchem-062011-143134

Lu B, Lv X, Le Y. Chitosan-Modified PLGA Nanoparticles for Control-Released Drug Delivery. *Polymers (Basel).* 2019;11(2):304. doi: 10.3390/polym11020304.

Lyklema J. *Fundamentals of interface and colloid science.* Academic Press; 1995. 3-208.

Lyon RJP. Infrared absorption spectroscopy. En: Zussman J. *Physical Methods, in determinative Mineralogy.* London, UK: Academic Press. 1967: 371–399.

Ma J, Zhang Z, Zhang Z, Huang J, Qin Y, Li X, Liu H, Yang K, Wu G. Magnetic nanoparticle clusters radiosensitise human nasopharyngeal and lung cancer cells after alternating magnetic field treatment. *Int J Hyperthermia.* 2015;31(7):800-12. doi: 10.3109/02656736.2015.1063168.

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. doi: 10.1016/s0168-3659(99)00248-5.

Mai BT, Fernandes S, Balakrishnan PB, Pellegrino T. Nanosystems Based on Magnetic Nanoparticles and Thermo- or pH-Responsive Polymers: An Update and Future Perspectives. *Acc Chem Res*. 2018; 51(5):999-1013. doi: 10.1021/acs.accounts.7b00549.

Majumder J, Minko T. Multifunctional and stimuli-responsive nanocarriers for targeted therapeutic delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2021;18(2):205-227. doi: 10.1080/17425247.2021.

Malher E, Martin D, Duvivier C, Volochine B, Stoltz JF. New device for determination of cell electrophoretic mobility using doppler velocimetry. *Biorheology*. 1982;19(5):647-54. doi: 10.3233/bir-1982-19506

Ma M, Wu Y, Zhou J, Sun Y, Zhang Y and Gu N 2004 Sizedependence of specific power absorption of fe₃o₄ particles in a magnetic field *J. Magn. Mater*. 268 33–9

Mandal S, Prathipati PK, Belshan M, Destache CJ. A potential long-acting bictegravir loaded nano-drug delivery system for HIV-1 infection: A proof-of-concept study. *Antiviral Res*. 2019 Jul;167:83-88. doi: 10.1016/j.antiviral.2019.04.007

Mansouri A, Abnous K, Alibolandi M, Taghdisi SM, Ramezani M. Targeted delivery of tacrolimus to T cells by pH-responsive aptamer-chitosan- poly(lactic-co-glycolic acid) nanocomplex. *J Cell Physiol*. 2019;234(10):18262-18271. doi: 10.1002/jcp.28458.

Mansur AAP, Mansur HS, Leonel AG, Carvalho IC, Lage MCG, Carvalho SM, Krambrock K, Lobato ZIP. Supramolecular magnetonanohybrids for multimodal targeted therapy of triple-negative breast cancer cells. *J Mater Chem B*. 2020;8(32):7166-7188. doi: 10.1039/d0tb01175d.

Martín-Banderas L, Muñoz-Rubio I, Álvarez-Fuentes J, Durán-Lobato M, Arias JL, Holgado MÁ, Fernández-Arévalo M. Engineering of Δ^9 -tetrahydrocannabinol delivery systems based on surface modified-PLGA nanoplatfoms. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014; 123: 114-22. doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.09.002.

Massart R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE Trans. Magn.* 1981; 17: 1247–1248.

Matthäus C, Bird B, Miljković M, Chernenko T, Romeo M, Diem M. Chapter 10: Infrared and Raman microscopy in cell biology. *Methods Cell Biol.* 2008;89:275-308. doi: 10.1016/S0091-679X(08)00610-9.

Matheolabakis G, Taoufik E, Haralambous S, Roberts ML, Avgoustakis K. In vivo investigation of tolerance and antitumor activity of cisplatin-loaded PLGA-mPEG nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009; 71(2):190-5. doi: 10.1016/j.ejpb.2008.09.011.

Matshaya TJ, Lanterna AE, Granados AM, Krause RW, Maggio B, Vico RV. Distinctive interactions of oleic acid covered magnetic nanoparticles with saturated and unsaturated phospholipids in Langmuir monolayers. *Langmuir.* 2014;30(20):5888-96. doi: 10.1021/la500903m.

Ma X, Oyamada S, Wu T, et al. In vitro and in vivo degradation of poly(D, L-lactide-co-glycolide)/amorphous calcium phosphate copolymer coated on metal stents. *J Biomed Mater Res A.* 2011;96(4):632-638. doi:10.1002/jbm.a.33016

Mayer A, Vadon M, Rinner B, Novak A, Wintersteiger R, Fröhlich E. The role of nanoparticle size in hemocompatibility. *Toxicology.* 2009 Apr 28;258(2-3):139-47. doi: 10.1016/j.tox.2009.01.015;

Mazuel F, Espinosa A, Luciani N, Reffay M, Le Borgne R, Motte L, Desboeufs K, Michel A, Pellegrino T, Lalatonne Y, Wilhelm C. Massive Intracellular Biodegradation of Iron Oxide Nanoparticles Evidenced Magnetically at Single-Endosome and Tissue Levels. *ACS Nano.* 2016; 10(8):7627-38. doi: 10.1021/acs.nano.6b02876

Mehrishi JN, Thomson AE. Relationship between pH and electrophoretic mobility for lymphocytes circulating in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature.* 1968; 219(5158):1080-1. doi: 10.1038/2191080a0

Mejías R, Hernández Flores P, Talelli M, Tajada-Herráiz JL, Brollo MEF, Portilla Y, Morales MP, Barber DF. 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):340-355. doi: 10.1021/acsami.8b18451

Melguizo C, Cabeza L, Prados J, Ortiz R, Caba O, Rama AR, Delgado ÁV, Arias JL. Enhanced antitumoral activity of doxorubicin against lung cancer cells using biodegradable poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles. *Drug Des Devel Ther*. 2015; 9:6433-44. doi: 10.2147/DDDT.S92273.

Midgley PA, Weyland M. 3D electron microscopy in the physical sciences: the development of Z-contrast and EFTEM tomography. *Ultramicroscopy*. 2003; 96(3-4):413-31. doi: 10.1016/S0304-3991(03)00105-0.

Miller LM, Dumas P. From structure to cellular mechanism with infrared microspectroscopy. *Curr Opin Struct Biol*. 2010;20(5):649-56. doi: 10.1016/j.sbi.2010.07.007.

Miller ME. Cancer. En: Campbell A.M. *Human Diseases and Conditions Collection*. 1a edn. New York: Momentum Press; 2018.

Montha W, Maneeprakorn W, Buatong N, Tang IM, Pon-On W. Synthesis of doxorubicin-PLGA loaded chitosan stabilized (Mn, Zn)Fe₂O₄ nanoparticles: Biological activity and pH-responsive drug release. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016; 59:235-240. doi: 10.1016/j.msec.2015.09.098.

Moreno D, Zalba S, Navarro I, Tros de Ilarduya C, Garrido MJ. Pharmacodynamics of cisplatin-loaded PLGA nanoparticles administered to tumor-bearing mice. *Eur J Pharm Biopharm*. 2010;74(2):265-74. doi: 10.1016/j.ejpb.2009.10.005.

Morovati A, Ahmadian S, Jafary H. Cytotoxic effects and apoptosis induction of cisplatin-loaded iron oxide nanoparticles modified with chitosan in human breast cancer cells. *Mol Biol Rep*. 2019; 46(5):5033-5039. doi: 10.1007/s11033-019-04954-w.

Mosafer J, Teymouri M, Abnous K, Tafaghodi M, Ramezani M. Study and evaluation of nucleolin-targeted delivery of magnetic PLGA-PEG nanospheres loaded with doxorubicin to C6

glioma cells compared with low nucleolin-expressing L929 cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017; 72:123-133. doi: 10.1016/j.msec.2016.11.053.

Mosiniewicz-Szablewska E, Tedesco AC, Suchocki P, Morais PC. Magnetic studies of polylactic-co-glycolic acid nanocapsules loaded with selol and $\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2020; 22: 21042–21058. doi:10.1039/D0CP02706E.

Moskvin M, Huntošová V, Herynek V, Matouš P, Michalcová A, Lobaz V, Zasońska B, Šlouf M, Seliga R, Horák D. In vitro cellular activity of maghemite/cerium oxide magnetic nanoparticles with antioxidant properties. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2021; 204:111824. doi: 10.1016/j.colsurfb.2021.111824.

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 May 17;504(1-2):11-9. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.03.005.

Na HB, Song IC, Hyeon T (2009) Inorganic nanoparticles for MRI contrast agents. *Adv Mater* 21(21):2133–2148. DOI: 10.1002/adma.200802366

Narimani-Sabegh S, Noroozian E. Magnetic solid-phase extraction and determination of ultra-trace amounts of antimony in aqueous solutions using maghemite nanoparticles. *Food Chem.* 2019 ;287:382-389. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.02.112

Nasrazadani S, Hassani S. Modern analytical techniques in failure analysis of aerospace, chemical, and oil and gas industries. En: Makhoulf ASH, Aliofkhaezrai M. *Handbook of Materials Failure Analysis with Case Studies from the Oil and Gas Industry.* Oxford: Butterworth-Heinemann, 2016; 39–54.

Nassir AM, Shahzad N, Ibrahim IAA, Ahmad I, Md S, Ain MR. Resveratrol-loaded PLGA nanoparticles mediated programmed cell death in prostate cancer cells. *Saudi Pharm J.* 2018 Sep;26(6):876-885. doi: 10.1016/j.jsps.2018.03.009.

Nejati-Koshki K, Mesgari M, Ebrahimi E, Abbasalizadeh F, Fekri Aval S, Khandaghi AA, Abasi M, Akbarzadeh A. Synthesis and in vitro study of cisplatin-loaded Fe_3O_4 nanoparticles

modified with PLGA-PEG6000 copolymers in treatment of lung cancer. *J Microencapsul.* 2014;31(8):815-23. doi: 10.3109/02652048.2014.940011.

Nejdl L, Kudr J, Moulick A, Hegerova D, Ruttkay-Nedecky B, Gumulec J, Cihalova K, Smerkova K, Dostalova S, Krizkova S, Novotna M, Kopel P, Adam V. Platinum nanoparticles induce damage to DNA and inhibit DNA replication. *PLoS One.* 2017; 12(7):e0180798. doi: 10.1371/journal.pone.0180798.

Néel L. Théorie du traînage magnétique des ferromagnétiques en grains fins avec application aux terres cuites. *Ann. Geophys.* 1949; 5: 99-136.

Neuberger T, Schöpf B, Hotmann H, Hofmann M, von Rechenberg B. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *J. Magn. Magn. Mater.* 2005; 293: 483 – 496.

Newbury DE. Misidentification of major constituents by automatic qualitative energy dispersive X-ray microanalysis: a problem that threatens the credibility of the analytical community. *Microsc Microanal.* 2005 Dec;11(6):545-61. doi: 10.1017/S1431927605050531

Nica V, Caro C, Páez-Muñoz JM, Leal MP, Garcia-Martin ML. Bi-Magnetic Core-Shell CoFe₂O₄@MnFe₂O₄ Nanoparticles for In Vivo Theranostics. *Nanomaterials (Basel).* 2020;10(5):907. doi:10.3390/nano10050907

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 Feb 7;42(3):1147-235. doi: 10.1039/c2cs35265f.

Ohtani H. Stromal reaction in cancer tissue: pathophysiologic significance of the expression of matrix-degrading enzymes in relation to matrix turnover and immune/inflammatory reactions. *Pathol Int.* 1998;48(1):1-9. doi: 10.1111/j.1440-1827.1998.tb03820.x.

Okassa LN, Marchais H, Douziech-Eyrolles L, Cohen-Jonathan S, Soucé M, Dubois P, Chourpa I. Development and characterization of sub-micron poly(D,L-lactide-co-glycolide)

particles loaded with magnetite/maghemite nanoparticles. *Int J Pharm.* 2005;302(1-2):187-96. doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.06.024.

Okassa LN, Marchais H, Douziech-Eyrolles L, Hervé K, Cohen-Jonathan S, Munnier E, Soucé M, Linassier C, Dubois P, Chourpa I. Optimization of iron oxide nanoparticles encapsulation within poly(d,l-lactide-co-glycolide) sub-micron particles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007;67(1):31-8. doi: 10.1016/j.ejpb.2006.12.020.

Oliveira H, Pérez-Andrés E, Thevenot J, Sandre O, Berra E, Lecommandoux S. Magnetic field triggered drug release from polymersomes for cancer therapeutics. *J Control Release.* 2013 Aug 10;169(3):165-70. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.01.013

Ortega D, Pankhurst QA. Magnetic hyperthermia. En: O'Brien P. *Nanoscience: Volume 1: Nanostructures through Chemistry.* Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2013. 60-88. doi:10.1039/9781849734844-00060

Ortega-Vinuesa JL, Martín-Rodríguez A, Hidalgo-Álvarez R. Colloidal Stability of Polymer Colloids with Different Interfacial Properties: Mechanisms. *J Colloid Interface Sci.* 1996; 184(1):259-67. doi: 10.1006/jcis.1996.0619

Ortega-Vinuesa JL, Bastos-González D. A review of factors affecting the performances of latex agglutination tests. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2001;12(4):379-408. doi: 10.1163/156856201750195289.

Ortiz R, Cabeza L, Arias JL, Melguizo C, Álvarez PJ, Vélez C, Clares B, Áranega A, Prados J. Poly(butylcyanoacrylate) and Poly(ϵ -caprolactone) Nanoparticles Loaded with 5-Fluorouracil Increase the Cytotoxic Effect of the Drug in Experimental Colon Cancer. *AAPS J.* 2015;17(4):918-29. doi: 10.1208/s12248-015-9761-5.

Owens DE 3rd, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm.* 2006;307(1):93-102. doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.10.010

Pandey A, Dhas N, Deshmukh P, Caro C, Patil P, García-Martín ML, Padya B, Nikam A, Mehta T, Mutalik S. Heterogeneous surface architected metal-organic frameworks for cancer therapy, imaging, and biosensing: a state-of-the-art review. *Coord. Chem. Rev.* 2020; 409: 213212.

Panés J. Moléculas de adhesión: su papel en la fisiopatología y tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterol Hepatol.* 1999 Dec;22(10):514-24.

Park J, Park J, Castanares MA, Collins DS, Yeo Y. Magnetophoretic Delivery of a Tumor-Priming Agent for Chemotherapy of Metastatic Murine Breast Cancer. *Mol Pharm.* 2019;16(5):1864-1873. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b01148.

Park K, Otte A, Sharifi F, Garner J, Skidmore S, Park H, Jhon YK, Qin B, Wang Y. Potential Roles of the Glass Transition Temperature of PLGA Microparticles in Drug Release Kinetics. *Mol Pharm.* 2021;18(1):18-32. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c01089.

Patel MM. Micro/nano-particulate drug delivery systems: a boon for the treatment of inflammatory bowel disease. *Expert Opin Drug Deliv* 2016;13:1e5. doi: 10.1517/17425247.2016.1166203

Pei W, Huang B, Chen S, Wang L, Xu Y, Niu C. Platelet-Mimicking Drug Delivery Nanoparticles for Enhanced Chemo-Photothermal Therapy of Breast Cancer. *Int J Nanomedicine.* 2020;15:10151-10167. doi: 10.2147/IJN.S285952.

Pérez-Artacho B, Gallardo V, Ruiz MA, Arias JL. Maghemite/poly(D,L-lactide-co-glycolide) composite nanoplatform for therapeutic applications. *J. Nanoparticle Res.* 2012, 14, 1–10. doi: 10.1007/s11051-012-0768-x.

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. doi: 10.1016/j.ejpb.2015.03.018

Pernia Leal M, Rivera-Fernandez S, Franco JM, Pozo D, de la Fuente JM, Garcia-Martin ML. Long-circulating PEGylated manganese ferrite nanoparticles for MRI-based molecular imaging. *Nanoscale.* 2015; 7 (5): 2050–2059. <https://doi.org/10.1039/c4nr05781c>

Pernia Leal M, Caro C, García-Martín ML. Shedding light on zwitterionic magnetic nanoparticles: limitations for in vivo applications. *Nanoscale*. 2017 ;9(24):8176-8184. doi: 10.1039/c7nr01607g. PMID: 28581000.

Perillo E, Hervé-Aubert K, Allard-Vannier E, Falanga A, Galdiero S, Chourpa I. Synthesis and in vitro evaluation of fluorescent and magnetic nanoparticles functionalized with a cell penetrating peptide for cancer theranosis. *J Colloid Interface Sci*. 2017;499:209-217. doi: 10.1016/j.jcis.2017.03.106

Petford-Long AK, Chapman JM. Lorentz Microscopy. En: Hopster H., Oepen H.P. *Magnetic Microscopy of Nanostructures*. New York, Berlin: Springer; 2005. 67–86.

Pina MF, Lau W, Scherer K, Parhizkar M, Edirisinghe M, Craig D. The generation of compartmentalized nanoparticles containing siRNA and cisplatin using a multi-needle electrohydrodynamic strategy. *Nanoscale*. 2017;9(18):5975-5985. doi: 10.1039/c7nr01002h.

Plaza RC, Arias JL, Espín M, Jiménez ML, Delgado AV. Aging effects in the electrokinetics of colloidal iron oxides. *J Colloid Interface Sci*. 2002;245(1):86-90. doi: 10.1006/jcis.2001.7964.

Ploeger LS, Dullens HF, Huisman A, van Diest PJ. Fluorescent stains for quantification of DNA by confocal laser scanning microscopy in 3-D. *Biotech Histochem*. 2008 Apr;83(2):63-9. doi: 10.1080/10520290802127586

Powers KW, Carpinone PL, Siebein KN. Characterization of Nanomaterials for Toxicological Studies. En: Reinek, J. *Nanotoxicity, Methods and Protocols*. New York, Heidelberg, Dordrecht, London: Humana Press (Springer); 2012. 13 – 32. doi: 10.1007/978-1-62703-002-1

Pretel E, Arias JL, Cabeza L, Melguizo C, Prados J, Mallandrich M, Suñer J, Clares B. Development of biomedical 5-fluorouracil nanoplatfoms for colon cancer chemotherapy: Influence of process and formulation parameters. *Int J Pharm*. 2017;530(1-2):155-164. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.07.055.

Pretorius ES, Solomon JA. *Radiology secrets*. 2a edn. Londres: Elsevier; 2006.

Prusty DK, Adam V, Zadegan RM, Irsen S, Famulok M. Supramolecular aptamer nano-constructs for receptor-mediated targeting and light-triggered release of chemotherapeutics into cancer cells. *Nat Commun.* 2018 Feb 7;9(1):535. doi: 10.1038/s41467-018-02929-2

Pusey PN. Correlation and light beating spectroscopy. En: Cummings H.Z., Pike E.R. *Photon correlation and light beating spectroscopy.* New York: Plenum; 1972. 387–428.

Pustulka SM, Ling K, Pish SL, Champion JA. Protein Nanoparticle Charge and Hydrophobicity Govern Protein Corona and Macrophage Uptake. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2020;12(43):48284-48295. doi: 10.1021/acsami.0c12341.

Qiao R, Yang C, Gao M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: from preparations to in vivo MRI applications. *J. Mater. Chem.* 2009; 19: 6274. doi: 10.1039/B902394A

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. doi: 10.1021/cr300068p.

Reshetnyak YK. Imaging Tumor Acidity: pH-Low Insertion Peptide Probe for Optoacoustic Tomography. *Clin Cancer Res.* 2015;21(20):4502 – 4504. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1502.

Revia RA, Stephen ZR, Zhang M. Theranostic Nanoparticles for RNA-Based Cancer Treatment. *Acc Chem Res.* 2019;52(6):1496-1506. doi: 10.1021/acs.accounts.9b00101

Romero-Cano MS, Martín-Rodríguez A, de las Nieves FJ. Electrosteric Stabilization of Polymer Colloids with Different Functionality. *Langmuir* 2001; 17 (11): 3505-3511. doi: 10.1021/la001659l

Rosensweig RE. Heating magnetic fluid with alternating magnetic field. *J. Magn. Magn. Mater.* 2002; 252: 370–374. doi.org/10.1016/S0304-8853(02)00706-0

Rouco H, Diaz-Rodriguez P, Gaspar DP, Gonçalves LMD, Cuerva M, Remuñán-López C, Almeida AJ, Landin M. Rifabutin-Loaded Nanostructured Lipid Carriers as a Tool in Oral Anti-

Mycobacterial Treatment of Crohn's Disease. *Nanomaterials (Basel)*. 2020;10(11):2138. doi: 10.3390/nano10112138

Sanna V, Roggio AM, Siliani S, Piccinini M, Marceddu S, Mariani A, Sechi M. Development of novel cationic chitosan-and anionic alginate-coated poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for controlled release and light protection of resveratrol. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:5501-16. doi: 10.2147/IJN.S36684.

Santamaria A. Historical Overview of Nanotechnology and Nanotoxicology. En: Reinek, J. *Nanotoxicity, Methods and Protocols*. New York, Heidelberg, Dordrecht, London: Humana Press (Springer); 2012. 1 – 12. doi: 10.1007/978-1-62703-002-1

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: 4311–4323. doi: 10.1007/s11051-011-0378-z

Sarmiento B, Mazzaglia D, Bonferoni MC, Neto AP, do Céu Monteiro M, Seabra V. Effect of chitosan coating in overcoming the phagocytosis of insulin loaded solid lipid nanoparticles by mononuclear phagocyte system. *Carbohydr. Polym.* 2011; 84: 919-925. doi: 10.1016/j.carbpol.2010.12.042

Schädlich A, Caysa H, Mueller T, Tenambergen F, Rose C, Göpferich A, Kuntsche J, Mäder K. Tumor accumulation of NIR fluorescent PEG-PLA nanoparticles: impact of particle size and human xenograft tumor model. *ACS Nano*. 2011;5(11):8710-20. doi: 10.1021/nn2026353.

Schmaljohann D. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006;58(15):1655-70. doi: 10.1016/j.addr.2006.09.020.

Schütt W, Grüttner C, Häfeli U, Zborowski M, Teller J, Putzar H, Schümichen C. Applications of magnetic targeting in diagnosis and therapy--possibilities and limitations: a mini-review. *Hybridoma*. 1997;16(1):109-17. doi: 10.1089/hyb.1997.16.109.

Sears FW, Zemansky MW, Young HD, Freedman RA. *Física universitaria*. 11a edn. México, D. F.: Pearson Educación; 2004. v II.

Sebak AA, El-Shenawy BM, El-Safy S, El-Shazly M. From Passive Targeting to Personalized Nanomedicine: Multidimensional Insights on Nanoparticles' Interaction with the Tumor Microenvironment. *Curr Pharm Biotechnol.* 2021;22(11):1444-1465. doi: 10.2174/1389201021666201211103856

Seoane JR, Llobet X. Handbook of instrumental techniques for materials, chemical and biosciences research. Digital edition. Universitat de Barcelona: Centres Científics i Tecnològics Universitat de Barcelona; 2012.

Shanavas A, Sasidharan S, Bahadur D, Srivastava R. Magnetic core-shell hybrid nanoparticles for receptor targeted anti-cancer therapy and magnetic resonance imaging. *J Colloid Interface Sci.* 2017; 486:112-120. doi: 10.1016/j.jcis.2016.09.060.

Shen DW, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacol Rev.* 2012;64(3):706-721. doi:10.1124/pr.111.005637

Shetab Boushehri MA, Dietrich D, Lamprecht A. Nanotechnology as a Platform for the Development of Injectable Parenteral Formulations: A Comprehensive Review of the Know-Hows and State of the Art. *Pharmaceutics.* 2020;12(6):510. doi: 10.3390/pharmaceutics12060510.

Silverstein RM, Webster FX. Spectrometric Identification of Organic Compounds. 6a edn. New York: John Wiley & Sons; 1998.

Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A. Principles of Instrumental Analysis. 7a edn. Belmont: Brooks Cole; 2018.

Sneha KR, Sreeja S, Sailaja GS. Radiopacity endowed magnetic nanocomposite with hyperthermia and in vitro mineralization potential: A combinatorial therapeutic system for osteosarcoma. *Biomed. Mater.* 2021; 16: 045029. doi: 10.1088/1748-605X/ac01af.

Soares PI, Ferreira IM, Igreja RA, Novo CM, Borges JP. Application of hyperthermia for cancer treatment: recent patents review. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2012;7(1):64-73. doi: 10.2174/157489212798358038.

Sohail A, Ahmad Z, Bég OA, Arshad S, Sherin L. A review on hyperthermia via nanoparticle-mediated therapy. *Bull Cancer*. 2017;104(5):452-461. doi: 10.1016/j.bulcan.2017.02.003.

Soltani S, Ebrahimian-Hosseinabadi M, Zargar Kharazi A. Chitosan/graphene and poly(D, L-lactic-co-glycolic acid)/graphene nano-composites for nerve tissue engineering. *Tissue Eng Regen Med*. 2016;13(6):684-690. doi: 10.1007/s13770-016-9130-1.

Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release*. 2001;70(1-2):1-20. doi: 10.1016/s0168-3659(00)00339-4.

Sorrivas de Lozano V, Morales A, Yañez MJ. Principios y práctica de la Microscopía Electrónica. 1a edn. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). E-book; 2014.

Sousa D, Ferreira D, Rodrigues JL, Rodrigues LR. Chapter 14 - Nanotechnology in Targeted Drug Delivery and Therapeutics. En: Mohapatra SS, Ranjan S, Dasgupta N, Mishra RK, Thomas S. *Micro and Nano Technologies, Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems*. Elsevier; 2019. 357-409. doi: 10.1016/B978-0-12-814029-1.00014-4

Souza KC, Ardisson JD, Sousa EM. Study of mesoporous silica/magnetite systems in drug controlled release. *J Mater Sci Mater Med*. 2009; 20(2):507-12. doi: 10.1007/s10856-008-3592-1.

Spaldin NA. *Magnetic Materials: Fundamentals and Applications*. 2a edn. Cambridge, New York : Cambridge University Press. 2011.

Stephen BJ, Suchanti S, Mishra R, Singh A. Cancer Nanotechnology in Medicine: A Promising Approach for Cancer Detection and Diagnosis. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2020;37(4):375-405. doi: 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2020032634

Stetefeld J, McKenna SA, Patel TR. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev*. 2016;8(4):409-427. doi: 10.1007/s12551-016-0218-

Sun S, Zeng H, Robinson DB, Raoux S, Rice PM, Wang SX, Li G. Monodisperse MFe₂O₄ (M = Fe, Co, Mn) nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 2004 Jan 14;126(1):273-9. doi: 10.1021/ja0380852.

Sun Y, Bao Y, Jiang X, Tan S, Yin M, Yang C, Zhou L, Zhang Z. pH-sensitive micelles with charge-reversible property for tumor growth inhibition and anti-metastasis. *J Mater Chem B.* 2018;6(3):458-468. doi: 10.1039/c7tb02439h.

Sutariya VB, Pathak Y. *Biointeractions of nanomaterials.* 1a edn. Londres, Nueva York: Boca Raton: Taylor & Francis; 2014.

Suzuki T, Fujikura K, Higashiyama T, Takata K. DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. *J Histochem Cytochem.* 1997;45(1):49-53. doi: 10.1177/002215549704500107

Taghavi S, Ramezani M, Alibolandi M, Abnous K, Taghdisi SM. Chitosan-modified PLGA nanoparticles tagged with 5TR1 aptamer for in vivo tumor-targeted drug delivery. *Cancer Lett.* 2017;400:1-8. doi: 10.1016/j.canlet.2017.04.008.

Tahara K, Yamamoto H, Hirashima N, Kawashima Y. Chitosan-modified poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres for improving siRNA delivery and gene-silencing effects. *Eur J Pharm Biopharm.* 2010;74(3):421-6. doi: 10.1016/j.ejpb.2009.12.007.

Taheri-Ledari R, Zhang W, Radmanesh M, Mirmohammadi SS, Maleki A, Cathcart N, Kitaev V. Multi-Stimuli Nanocomposite Therapeutic: Docetaxel Targeted Delivery and Synergies in Treatment of Human Breast Cancer Tumor. *Small.* 2020; 16(41):e2002733. doi: 10.1002/smll.202002733.

Thakur CK, Thotakura N, Kumar R, Kumar P, Singh B, Chitkara D, Raza K. Chitosan-modified PLGA polymeric nanocarriers with better delivery potential for tamoxifen. *Int J Biol Macromol.* 2016; 93(Pt A):381-389. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.08.080.

Talekar M, Tran TH, Amiji M. *Translational Nano-Medicines: Targeted Therapeutic Delivery for Cancer and Inflammatory Diseases.* *AAPS J.* 2015;17(4):813-27. doi: 10.1208/s12248-015-9772-2.

Tay ZW, Chandrasekharan P, Chiu-Lam A, Hensley DW, Dhavalikar R, Zhou XY, Yu EY, Goodwill PW, Zheng B, Rinaldi C, Conolly SM. Magnetic Particle Imaging-Guided Heating in Vivo Using Gradient Fields for Arbitrary Localization of Magnetic Hyperthermia Therapy. *ACS Nano*. 2018 Apr 24;12(4):3699-3713. doi: 10.1021/acsnano.8b00893.

Tian J, Min Y, Rodgers Z, Wan X, Qiu H, Mi Y, Tian X, Wagner KT, Caster JM, Qi Y, Roche K, Zhang T, Cheng J, Wang AZ. Nanoparticle delivery of chemotherapy combination regimen improves the therapeutic efficacy in mouse models of lung cancer. *Nanomedicine*. 2017;13(3):1301-1307. doi: 10.1016/j.nano.2016.11.007.

Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J*. 1995;9(10):866-73. PMID: 7542213

Tenzer S, Docter D, Kuharev J, Musyanovych A, Fetz V, Hecht R, Schlenk F, Fischer D, Kiouptsi K, Reinhardt C, Landfester K, Schild H, Maskos M, Knauer SK, Stauber RH. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat Nanotechnol*. 2013;8(10):772-81. doi: 10.1038/nnano.2013.181

Tong GF, Qin N, Sun LW. Development and evaluation of Desvenlafaxine loaded PLGA-chitosan nanoparticles for brain delivery. *Saudi Pharm J*. 2017;25(6):844-851. doi: 10.1016/j.jsps.2016.12.003.

Tong R, Gabrielson NP, Fan TM, Cheng J. Polymeric Nanomedicines Based on Poly(lactide) and Poly(lactide-co-glycolide). *Curr Opin Solid State Mater Sci*. 2012;16(6):323-332. doi:10.1016/j.cossms.2013.01.001

Tong S, Hou S, Zheng Z, Zhou J, Bao G. Coating optimization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles for high T2 relaxivity. *Nano Lett*. 2010; 10(11):4607-4613

Torchilin VP. Drug targeting. *Eur J Pharm Sci*. 2000;11(Suppl. 2):S81e91

Turcheniuk K, Tarasevych AV, Kukhar VP, Boukherroub R, Szunerits S. Recent advances in surface chemistry strategies for the fabrication of functional iron oxide based magnetic nanoparticles. *Nanoscale*. 2013;5(22):10729-52. doi: 10.1039/c3nr04131j.

Tzeyung AS, Md S, Bhattamisra SK, Madheswaran T, Alhakamy NA, Aldawsari HM, Radhakrishnan AK. Fabrication, Optimization, and Evaluation of Rotigotine-Loaded Chitosan Nanoparticles for Nose-To-Brain Delivery. *Pharmaceutics*. 2019;11(1):26. doi: 10.3390/pharmaceutics11010026.

Ulbrich K. Targeted Drug Delivery with Polymers and Magnetic Nanoparticles: Covalent and Noncovalent Approaches, Release Control, and Clinical Studies. *Chem. Rev.* 2016; 116, 5338–5431. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00589.

Ulldemolins A, Seras-Franzoso J, Andrade F, Rafael D, Abasolo I, Gener P, Schwartz Jr. S. Perspectives of nano-carrier drug delivery systems to overcome cancer drug resistance in the clinics. *Cancer Drug Resist.* 2021; 19;4:44–68. doi: 10.20517/cdr.2020.59.

Unciti-Broceta JD, Arias JL, Maceira J, Soriano M, Ortiz-González M, Hernández-Quero J, Muñoz-Torres M, de Koning HP, Magez S, Garcia-Salcedo JA. Specific Cell Targeting Therapy Bypasses Drug Resistance Mechanisms in African Trypanosomiasis. *PLoS Pathog.* 2015;11(6):e1004942. doi: 10.1371/journal.ppat.1004942.

Van Oss CJ. *Interfacial Forces in Aqueous Media*. New York: Marcel Dekker Inc.; 1994.

Van Oss CJ. Development and applications of the interfacial tension between water and organic or biological surfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2007;54(1):2-9. doi: 10.1016/j.colsurfb.2006.05.024.

Vauthier C, Bouchemal K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharm Res.* 2009;26(5):1025-58. doi: 10.1007/s11095-008-9800-3

Vereda F, Rodríguez-González B, de Vicente J, Hidalgo-Alvarez R. Evidence of direct crystal growth and presence of hollow microspheres in magnetite particles prepared by oxidation of Fe(OH)₂. *J Colloid Interface Sci.* 2008;318(2):520-4. doi: 10.1016/j.jcis.2007.11.003.

Viota JL, González-Caballero F, Durán JD, Delgado AV. Study of the colloidal stability of concentrated bimodal magnetic fluids. *J Colloid Interface Sci.* 2007;309(1):135-9. doi: 10.1016/j.jcis.2007.01.066.

Von Smoluchowski M. Towards a mathematical theory of the coagulation kinetics of colloidal solutions. *Z Phys Chem*. 1918; 92: 129 – 168.

Voon SH, Tiew SX, Kue CS, Lee HB, Kiew LV, Misran M, Kamkaew A, Burgess K, Chung LY. Chitosan-Coated Poly(lactic-co-glycolic acid)-Diiodinated boron-Dipyrromethene Nanoparticles Improve Tumor Selectivity and Stealth Properties in Photodynamic Cancer Therapy. *J Biomed Nanotechnol*. 2016;12(7):1431-52. doi: 10.1166/jbn.2016.2263.

Wang B, He X, Zhang Z, Zhao Y, Feng W. Metabolism of nanomaterials in vivo: blood circulation and organ clearance. *Acc Chem Res*. 2013; 46(3):761–769.

Wang J, Sui M, Fan W. Nanoparticles for tumor targeted therapies and their pharmacokinetics. *Curr Drug Metab*. 2010;11(2):129-41. doi: 10.2174/138920010791110827.

Wang Y, Li P, Kong L. Chitosan-modified PLGA nanoparticles with versatile surface for improved drug delivery. *AAPS PharmSciTech*. 2013;14(2):585-92. doi: 10.1208/s12249-013-9943-3.

Webb R. Confocal optical microscopy. *Rpts. Prog. Phys*. 1996; 59: 427-471.

Wei G, Wang Y, Yang G, Wang Y, Ju R. Recent progress in nanomedicine for enhanced cancer chemotherapy. *Theranostics*. 2021;11(13):6370-6392. doi: 10.7150/thno.57828.

Weinmann HJ, Brasch RC, Press WR, Wesbey GE. Characteristics of gadolinium-DTPA complex: a potential NMR contrast agent. *AJR Am J Roentgenol*. 1984;142(3):619-24. doi: 10.2214/ajr.142.3.619

Weissig V, Pettinger TK, Murdock N. Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:4357-73. doi: 10.2147/IJN.S46900

Weissleder R, Bogdanov A, Neuwelt EA, Papisov M. Long-circulating iron oxides for MR imaging. *Adv. Drug Delivery Rev*. 1995; 16: 321 – 334. doi: 10.1016/0169-409X(95)00033-4

Wellstein A, Giuseppe G, Atkins MB, Sausville EA. Capítulo 66: Fármacos citotóxicos. En: Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 13a edn. McGraw-Hill; 2011.

Wen MM, El-Salamouni NS, El-Refai WM, Hazzah HA, Ali MM, Tosi G, Farid RM, Blanco-Prieto MJ, Billa N, Hanafy AS. Nanotechnology-based drug delivery systems for Alzheimer's disease management: technical, industrial, and clinical challenges. *J Control Release* 2017;245:95e107. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.11.025

Williams DB, Carter CB. *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science*. New York: Springer Verlag, Inc.; 2009.

Woo K, Hong J, Ahn JP. Synthesis and surface modification of hydrophobic magnetite to processible magnetite@silica-propylamine. *J Magn. Magn. Mater.* 2005; 293: 177–181. doi:10.1016/j.jmmm.2005.01.058

World Health Organization:WHO. WHO. [Online].; 2022 [consultado el 6 de abril de 2022]. Disponible: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1

Wu JH, Ko SP, Liu HL, Kim S, Ju JS, Kim YK. Sub 5 nm magnetite nanoparticles: Synthesis, microstructure, and magnetic properties. *Mater. Lett.* 2007; 61: 3124–3129.

Wu L, Zong L, Ni H, Liu X, Wen W, Feng L, Cao J, Qi X, Ge Y, Shen S. Magnetic thermosensitive micelles with upper critical solution temperature for NIR triggered drug release. *Biomater Sci.* 2019;7(5):2134-2143. doi: 10.1039/c8bm01672k

Xie D, Huang H, Blackwood K, MacNeil S. A novel route for the production of chitosan/poly(lactide-co-glycolide) graft copolymers for electrospinning. *Biomed Mater.* 2010;5(6):065016. doi: 10.1088/1748-6041/5/6/065016.

Xie Q, Wen T, Yang A, Zhang X, Chen B, Meng J, Liu J, Gu N, Xu H. A Contrast Examination of Proinflammatory Effects on Kidney Function for γ -Fe₂O₃ NP and Gadolinium Dimeglumine. *Int J Nanomedicine.* 2021;16:2271-2282. doi: 10.2147/IJN.S299004.

Xie Y, Rubenstein EM, Matt T, Hochstrasser M. SUMO-independent in vivo activity of a SUMO-targeted ubiquitin ligase toward a short-lived transcription factor. *Genes Dev.* 2010;24(9):893-903. doi: 10.1101/gad.1906510.

Xu CJ, Sun SH. Monodisperse magnetic nanoparticles for biomedical applications. *Polym. Int.* 2007; 56: 821-826. doi: 10.1002/pi.2251.

Yang SJ, Huang CH, Wang CH, Shieh MJ, Chen KC. The Synergistic Effect of Hyperthermia and Chemotherapy in Magnetite Nanomedicine-Based Lung Cancer Treatment. *Int J Nanomedicine.* 2020;15:10331-10347. doi: 10.2147/IJN.S281029.

Yoo JW, Chambers E, Mitragotri S. Factors that control the circulation time of nanoparticles in blood: Challenges, solutions and future prospects. *Curr Pharm Des.* 2010; 16 (21):2298–2307.

Yue ZG, Wei W, Lv PP, Yue H, Wang LY, Su ZG, Ma GH. Surface charge affects cellular uptake and intracellular trafficking of chitosan-based nanoparticles. *Biomacromolecules.* 2011 ;12(7):2440-6. doi: 10.1021/bm101482r.

Yuan F, Dellian M, Fukumura D, Leunig M, Berk DA, Torchilin VP, Jain RK. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res.* 1995;55(17):3752-6.

Zauner i Jakubik M. Contraste en resonancia magnética. En: Oleaga Zufiría L., Lafuente Martínez J. Monografía SERAM Aprendiendo los fundamentos de la resonancia magnética. Madrid: Médica Panamericana S.A.; 2007. 11 – 16. ISBN-10: 8479038993; ISBN-13: 978-8479038991.

Zhang Q, Zhao D, Feng S, Wang Y, Jin J, Alsaedi A, Hayat T, Chen C. Synthesis of nanoscale zero-valent iron loaded chitosan for synergistically enhanced removal of U(VI) based on adsorption and reduction. *J Colloid Interface Sci.* 2019; 552:735-743. doi: 10.1016/j.jcis.2019.05.109.

Zhang Y, Li M, Gao X, Chen Y, Liu T. Nanotechnology in cancer diagnosis: progress, challenges and opportunities. *J Hematol Oncol.* 2019;12(1):137. doi: 10.1186/s13045-019-0833-3

Zhang Y, He Z, Li Y, Xia Q, Li Z, Hou X, Feng N. Tumor cell membrane-derived nano-Trojan horses encapsulating phototherapy and chemotherapy are accepted by homologous tumor cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2021; 120:111670. doi: 10.1016/j.msec.2020.111670.

Zhou Z, Lu ZR. Gadolinium-based contrast agents for magnetic resonance cancer imaging. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2013;5(1):1-18. doi: 10.1002/wnan.1198

