

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Preparación, caracterización y evaluación biológica
de nanopartículas poliméricas para la liberación
controlada del paclitaxel**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Patricia López Gasco

Directoras

**Juana Benedí González
María Dolores Blanco Gaitán
Irene Iglesias Peinado**

Madrid, 2011

ISBN: 978-84-695-0752-0

© Patricia López Gasco, 2011

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



FACULTAD DE FARMACIA

PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y
EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS PARA LA LIBERACIÓN
CONTROLADA DEL PACLITAXEL

TESIS DOCTORAL

PATRICIA LÓPEZ GASCO

Madrid, 2011

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



FACULTAD DE FARMACIA

Preparación, caracterización y evaluación biológica de
nanopartículas poliméricas para la liberación controlada
del Paclitaxel

TESIS DOCTORAL

Bajo la dirección de

Dra. Juana Benedí González

Dra. María Dolores Blanco Gaitán

Dra. Irene Iglesias Peinado

PATRICIA LÓPEZ GASCO

Madrid, 2011



JUANA BENEDÍ GONZÁLEZ, Profesora Titular del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

MARIA DOLORES BLANCO GAITÁN, Profesora Titular de l D epartamento de Bioquímica y B iología Molecular III de la Facultad d e M edicina de la U niversidad Complutense de Madrid.

IRENE IGLESIAS PEINADO, Profesora Titular del D epartamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICAN:

Que el presente Trabajo titulado: “Preparación, caracterización y evaluación biológica de nanopartículas poliméricas para la liberación controlada del Paclitaxel” y llevado a cabo por D^{ÑA}. **PATRICIA LÓPEZ GASCO** ha sido realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento.

Creemos que e l m encionado T rabajo r eúne l as car acterísticas necesarias para ser definido ante un Tribunal para la obtención del grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, firmamos el presente certificado en Madrid a 24 de Marzo de 2011.

Fdo:

Dra. Juana Benedí Gonzalez

Fdo:

Dra. M^aDolores Blanco Gaitán

Fdo:

Dra. Irene Iglesias Peinado

A mis padres, Francisco y María del Carmen

A mis hermanos, Enrique y Ricardo

Durante estos últimos cuatro años han surgido muchas aventuras para que esta Tesis Doctoral se haya podido realizar. Han sido muchas personas las que me han ayudado y apoyado y a las que quiero expresar mi más sincero agradecimiento. Pero antes, un breve paréntesis para todos esos momentos en los que la realización de una Tesis Doctoral te hace experimentar numerosos sentimientos tanto alegres como tristes; momentos estresantes pero luego que se recuerdan como simples anécdotas como cuando saltaban los fusibles en el departamento y llevabas un buen rato “pinchando” en el HPLC; esas bajadas de tensión que provocaban que las neveras y los -80 ° C se descongelasen; y esas contaminaciones fantasmas en la campana que te hacían volver a repetir algún que otro experimento. Son sin duda momentos que te hacen comprender que lo importante es seguir con ánimo a lo largo de toda esta experiencia y que te endurece tanto profesional como personalmente.

Es para mí un gran motivo de alegría poder ver finalizado un trabajo que me ha exigido mucha dedicación, perseverancia y esfuerzo, y no siempre mostrando lo mejor de mí misma. Me gustaría agradecer a todas aquellas personas que de una forma u otra han influido en mi formación científica y personal, y aquellas que, aparte de permitirme la realización de esta Tesis, han contribuido a que guarde un buen recuerdo de este tiempo transcurrido.

En primer lugar quiero dar las gracias a la Directora del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia, Dra. Paulina Bermejo, por haberme facilitado la incorporación a este departamento y ofrecerme su ayuda siempre y cuando lo necesitase. También darle las gracias al Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III de la Facultad de Medicina, Dr. José María Teijón, por su apoyo, su generosidad y su continua perseverancia, ya que sin él una gran parte de esta Tesis no hubiese sido posible.

Expresar mi más sincero agradecimiento a mis queridas directoras Dra. María Dolores Blanco, Dra. Juana Benedí y Dra. Irene Iglesias, por brindarme la oportunidad de trabajar con ellas, proporcionarme la formación científica y dirigir esta Tesis. Gracias Lola por tu confianza, tu infinita paciencia y conocimientos científicos. Gracias Juana por tu exigencia, cariño y continuo apoyo. Gracias Irene por tus consejos y ayuda incondicional.

Gracias a la Fundación Rafael Folch y a sus integrantes, por otorgarme una beca y poder hacer realidad esta Tesis; en especial al secretario de la Fundación Dr. Carlos Honduvilla.

Gracias a todos los Profesores del Departamento de Farmacología, en especial a la Dra. Sagrario Martín-Aragón y a la Dra. Paloma Bermejo por vuestra disposición y ayuda en los cultivos celulares. Gracias a Luismi por su buen humor, su energía y por toda la ayuda que me ha facilitado.

Gracias al personal y técnicos del Departamento de Farma: Rosa, Azucena, Jesús y Nieves, por sus alegrías, sus conversaciones y que el día al día en el laboratorio no se hiciese a veces tan rutinario.

A todos mis compañeros del Departamento, Irene, María, Ana, Adri, Tarek I, Tarek II, Karim, Virginia, Andrea, Eva, Tania, Eva, Luis, Estefanía, Mavi, Iria, Alba, Conchi e Izaskun con los que he compartido el estrés, las dudas, las risas y los cafés de media mañana. En especial gracias a Adil por enseñarme a dar los primeros pasos con los cultivos celulares; a Sara por enseñarme los truquillos de la campana, sitio donde he compartido muchos buenos momentos con todos mis compañeros de trabajo; a Natalia y a Pilar, por su paciencia, conocimientos y consejos en todo momento, y a Elena por todo lo que hemos compartido juntas. Gracias a Ismael por el programa fabuloso de estadística, sin él no lo hubiese conseguido. Gracias a Loli por su tiempo. Gracias a los Erasmus que han pasado por este departamento, por esa forma de trabajar y vivir: Nicolás, Fede, Sandra, Pasquale, Niní, Judith y Mustafa.

Gracias a Rosa, a César y a Clara, por vuestro apoyo, vuestro cariño y siempre dispuestos a ayudar. Gracias a Sandra por ser mi mentora en la técnica del Spray Dryer. Gracias a las chicas: a Ana y Anita por esos momentos pasados en los congresos; a Marta por sus consejos con las células; y a Elena por toda su ayuda. Gracias a todos por hacerme sentir como en casa.

Gracias a mis compañeros más queridos, los cuales estos últimos años nos han unido una gran amistad. En especial a M^a Angeles, por su amistad, por sus aventuras y desventuras con su tesis, su paciencia, nuestras canciones y risas, nuestras tertulias, gracias por animarme y darme fuerzas a seguir adelante. Gracias Laura por ser como eres, una maravillosa persona, estando disponible en cualquier momento y ser tan buena amiga. Gracias Miguel por esas bromas, por los buenos y malos momentos, por

estar ahí, siempre viendo el lado positivo y animando. Gracias Raúl por sus charlas de política y de Venezuela, haciéndome reír por la forma de ver las cosas y por todo su apoyo.

Mi más caluroso agradecimiento a mis buenos amigos: Sergio, Mika, Rubén, Josemi y Juanda, gracias por vuestro continuo apoyo y por estar siempre a mi lado en lo bueno y en lo malo. Gracias a mi gente de Dénia, en especial a Silvia e Irene.

Gracias a toda la gente que han pasado por mi vida en estos últimos años y han contribuido con su apoyo y su presencia para alcanzar esta meta: Riccardo, Fernando, Lorenzo, Irini, Natalia, Pablo, Jorge, Giorgio, Isabel, Belén, Isa, Irene y Miguel.

Y por último, quiero agradecerse a toda mi familia. En especial a mis padres quienes sin ellos, no creo que hubiese terminado el doctorado. Gracias por enseñarme como funciona el ámbito sanitario y universitario, gracias por vuestra dedicación, sacrificio, paciencia y amor. Gracias por darme valor y enseñarme a afrontar las dificultades del día a día. Gracias por darme las fuerzas necesarias para continuar y siempre con la cabeza alta. Gracias a mis hermanos por todo lo que compartimos y por los pequeños empujones de fuerzas que siempre me envían. Gracias a mi sobri, por sus numerosos abrazos. A mis tíos, por su cariño y dedicación.

A todos mil gracias.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIF	Factor inductor de la apoptosis
Apaf-1	Factor activador de proteasas apoptoticas
ATP	Adenosina trifosfato
BB	Tampón de unión
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato
CV	Coefficiente de variación
CrEL	Cremophor EL
DCM	Diclorometano
DD	Dominio de muerte
DLPC	Dilauril fosfatidilcolina
DMEM	Medio modificado Dulbecco's Eagle's
DMSO	Dimetilsufóxido
DPPC	Dipalmitoil-fosfatidilcolina
EGTA	Ácido etilen-bis tetra acético
EE	Eficiencia de encapsulación
FE	Factor de extracción
FBS	Suero fetal bovino
FEG-SEM	Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo
FS	Fosfatidilserina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IP	Yoduro de Propidio
MDR	Resistencia múltiple a fármacos
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
MTs	Microtúbulos

NP(s)	Nanopartículas
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
PBS	Tampón fosfato
PCL	Poli (ϵ -caprolactona)
PEG	Polietilenglicol
PLA	Poli (ácido láctico)
PGA	Poli (ácido glicólico)
PLGA	Poli (láctico-co-glicólico)
PTX	Paclitaxel
PVA	Polivinil alcohol
RES	Sistema retículo-endotelial
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TNFR	Receptor de TNF
TRAIL-R	Receptor del ligando inductor de apoptosis debida a TNF
TPGS	Succinato ácido del polietileno glycol1000 del D- α -tocoferol
TGA	Termogravimetría

ÍNDICE

Introducción	1
I. El cáncer	5
I.1. Situación actual del cáncer en España	8
I.1.1.a. Incidencia	8
I.1.1.b. Prevalencia	9
I.1.1.c. Mortalidad	9
II. Biomateriales	10
II.1. Materiales biodegradables	11
II.1.2. Biomateriales sintéticos	13
II.1.2.a. Poli (ácido láctico) y poli (ácido glicólico)	13
II.1.2.b. Copolímeros de ácido glicólico y ácido láctico	15
II.1.2.c. Poli (ϵ -caprolactona)	17
II.2. Biocompatibilidad de los biomateriales	18
II.3. Mecanismos de biodegradación	20
III. Sistemas de liberación controlada de fármacos	22
III.1. Sistemas poliméricos de liberación de fármacos	24
III.2. Tipos de sistemas poliméricos de liberación de fármacos	25
III.3. Sistemas poliméricos en el mercado farmacéutico	31
III.4. Aplicación de modelos matemáticos en los sistemas de liberación controlada de fármacos	33
IV. Preparación de los sistemas de liberación	39
IV.1. Técnicas de microencapsulación	39
IV.1.1. Método de evaporación y extracción del disolvente	40
IV.1.2. Método de atomización y secado	43

V. Regulación de la proliferación celular	48
V.1. Muerte celular. Conceptos generales	48
V.2. Ciclo celular. Conceptos generales	54
VI. Paclitaxel	57
VI.1. Origen	57
VI.2. Formulación del Paclitaxel	58
VI.3. Clínica del Paclitaxel	61
VI.4. Características química y físicas del Paclitaxel	61
VI.5. Mecanismo de acción	62
Objetivos	71
Material y Métodos	75
I. Preparación de las nanopartículas	79
I.1. Atomización y secado	79
I.2. Extracción y evaporación del disolvente (doble emulsión)	82
II. Caracterización de las nanopartículas	83
II.1. Morfología y tamaño	83
II.2. Eficiencia de encapsulación	84
II.3. Termogravimetría	86
II.4. Liberación <i>in vitro</i>	88
II.5. Cinética y modelos matemáticos	89
III. Ensayos <i>in vitro</i> en la línea celular MCF-7	90
III.1. Internalización celular de las nanopartículas	90
III.1.1. Estudios de fluorescencia	90
III.1.1.a. Preparación de las nanopartículas con 6-cumarina	91

III.1.1.b. Estudio cualitativo	91
III.1.1.c. Estudio cuantitativo	92
III.2. Ensayo de viabilidad celular	93
III.3. Estudio de la muerte celular	95
III.3.1. Morfología celular	95
III.3.2. Estudio de la apoptosis con Anexina V- FITC y Yoduro de Propidio	96
III.3.3. Análisis del ciclo celular	97
IV. Análisis estadístico	98
Resultados	99
I. Caracterización de las nanopartículas	101
I.1. Estudios morfológicos	101
I.1.1. Nanopartículas obtenidas por atomización y secado	101
I.1.2. Nanopartículas obtenidas por doble emulsión	107
I.2. Eficiencia de encapsulación	110
I.3. Termogravimetría	111
I.4. Liberación <i>in vitro</i>	114
I.5. Modelos matemáticos	117
I.6. Estudios morfológicos post-liberación	119
II. Ensayos <i>in vitro</i> en células MCF-7	121
II.1. Internalización celular de las nanopartículas	121
II.1.1. Estudio cualitativo	121
II.1.2. Estudio cuantitativo	125
II.2. Ensayo de viabilidad celular	127
II.2.1. Viabilidad celular en presencia del Paclitaxel en disolución	127

Índice

II.2.2. Viabilidad celular en presencia de las NPs obtenidas por Spray Dryer	129
II.2.3. Viabilidad celular en presencia de las NPs obtenidas por doble emulsión	131
II.3. Estudio de la muerte celular	133
II.3.1. Morfología celular	133
II.3.2. Estudio de la apoptosis con Anexina V- FITC y Yoduro de Propidio	137
II.3.3. Análisis del ciclo celular	140
<i>Discusión</i>	147
<i>Conclusiones</i>	168
<i>Bibliografía</i>	173
<i>Anexo</i>	193

INTRODUCCIÓN

Fue en 1959 cuando se habló por primera vez de los conceptos de nanociencia y nanotecnología por Richard Feynman, premio Nobel de Física en 1965, en una conferencia celebrada en el Instituto de Tecnología de California (CalTech), con su juego de palabras “There is a plenty of room at the bottom”. Propuso la idea de fabricar productos a partir de un reordenamiento de los átomos y de las moléculas, haciendo posibles nuevos materiales más duros, resistentes y rápidos (Feynman, 1960; Riehemann y cols, 2009). Sin embargo, no fue hasta 30 años después, cuando científicos del laboratorio de IBM de Zürich, Heinrich Rohrer y Gerd Binnig, idearon un microscopio de efecto túnel, *Scanning Tunneling Microscope* (STM) o microscopio ciego, que permitiría visualizar superficies a escala del átomo.

El término de nanotecnología se refería inicialmente a una escala nanométrica aplicada a materiales, considerando que un nano alude a algo de muy pequeño tamaño. Un nanómetro es una milésima de una millonésima de metro, es decir, una milmillonésima de metro. En un nanómetro caben entre tres y cinco átomos (Rodgers, 2010). Aunque en el universo hay cosas más pequeñas que los átomos, se trata ya de partículas que no se pueden manipular con los instrumentos actualmente disponibles.

Muchos de los organismos y procesos del cuerpo humano funcionan a una escala nano, siendo vitales para la vida. En esta reducción mínima del tamaño que se alcanza con la nanotecnología, la principal consecuencia es que se eleva el número de átomos que están en la superficie del material, aumentando la reactividad química de éste; además, desde el punto de vista de la mecánica cuántica, se sabe que estas partículas tan pequeñas pasan a comportarse como ondas. La nanociencia alude a una realidad tan amplia como la nanotecnología, incluyendo áreas tales como la biología, la química, la física, la medicina, la ingeniería o las ciencias sociales (Silva, 2004; Sahoo y cols, 2007; Alexis y cols, 2008).

Hoy en día, se han sugerido cuatro criterios que son esenciales para una definición de nanotecnología (Miele y cols, 2009):

1. el tamaño nano de los dispositivos
2. el carácter artificial
3. las propiedades conectadas con las dimensiones nanoscópicas

4. la habilidad para un apropiado modelo matemático que predice específicamente su comportamiento

Existen básicamente cinco campos en los que se centra principalmente la nanotecnología (Rodgers, 2010):

- desarrollo de nuevos materiales: más fuertes, resistentes y ligeros
- tecnología de información/comunicación: procesamiento de datos; en medicina: diagnóstico y tratamiento de enfermedades
- energía: con el fin de ahorrar
- alimentación: riesgos que podría producir este tipo de tecnología en la salud

Por tanto, se podría definir la nanotecnología como el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia a nanoescala, y la explotación de fenómenos y propiedades de la materia en términos nanométricos.

Hace una década comenzó el despegue de este nuevo campo, y hoy existen miles de productos generados por la nanotecnología aplicados a campos tan diversos como la medicina, la agricultura, la industria aeroespacial o las telecomunicaciones. Su impacto en la vida aún parece una historia de ciencia ficción para muchos: fármacos que funcionan a nivel atómico, microchips que diagnostican enfermedades, generación de fuentes de energía inagotable o combate de plagas; son sólo algunos de los campos con un potencial revolucionario.

El término de nanomedicina se ha propuesto recientemente por diversas organizaciones del ámbito de la salud, el Nacional Institute of Health de Estados Unidos, refiriéndose a las aplicaciones de la nanotecnología en el tratamiento, diagnóstico, monitorización y control de los sistemas biológicos.

La nanotecnología ha permitido la posibilidad de disponer de una medicina más predictiva, preventiva y específica, y en definitiva, de ofrecer a cada paciente el tratamiento más adecuado en la dosis justa. A nivel mundial, Estados Unidos es el país que ha apostado más por la nanotecnología, elevándose en los últimos años no sólo el número de artículos científicos e investigaciones que se llevan a cabo en este campo,

sino también el número de patentes relacionadas con nanofármacos (Ferrari, 2010). Existen tres grupos en los cuales se engloban los nanofármacos:

La **primera generación** agrupa sobre todas las formulaciones liposomales. En este grupo no existen órganos dianas. Los primeros en comercializarse fueron formulaciones de liposomas, como Caelix®, clorhidrato de doxorubicina encapsulado en liposomas con metoxipolietilenglicol (MPEG), utilizado para el tratamiento del cáncer de ovario y de mama. En la clínica están teniendo mucho éxito y se estima que este mercado supone unos 5 billones de dólares.

La **segunda generación** de nanofármacos, incluyen dianas moleculares. El objetivo es liberar altas concentraciones de fármaco en los tejidos patológicos con el fin de aumentar su efecto en el tumor y también reducir su posible toxicidad (Miele y cols, 2009). De hecho, hay miles de nanopartículas “inteligentes”, con capacidad de reconocimiento molecular de células cancerígenas que están en distintas fases de investigación y desarrollo, y que se irán incorporando a la práctica clínica en los próximos años.

La **tercera generación** de nanofármacos se encuentra en desarrollo. Consiste en múltiples partículas (y no de una sola) que trabajarán y actuarán en equipo, por lo que sus capacidades funcionales serían enormes (Tasciotti y cols, 2008).

I. El cáncer

En cuanto al tratamiento del cáncer, resulta que es un buen modelo para utilizar la nanotecnología, es incluso una de las principales áreas de investigación y aplicación de la medicina individualizada, que se ha mencionado anteriormente.

Un único marcador sanguíneo no puede informar por sí solo sobre la existencia de un cáncer en un individuo concreto; sino que se requieren muchos de ellos para poder ofrecer un diagnóstico exacto y certero, ya que el cáncer es una enfermedad en la que se sobreexpresan y/o infraexpresan determinadas moléculas, de manera que es preciso evaluar cientos de miles de proteínas en el cuerpo humano para determinar, con

fiabilidad, la presencia o no de un tumor. La detección precoz del cáncer, a nivel molecular, es uno de los objetivos de la nanotecnología en medicina (Ferrari, 2010).

En las mujeres occidentales, el cáncer de mama es el tumor más frecuente estimándose que en los países de la Unión Europea, la probabilidad de desarrollar un cáncer de mama antes de los 75 años es del 8 %. Los programas de detección precoz junto con los avances diagnósticos y terapéuticos se han traducido en un incremento de la supervivencia. En general, la mortalidad por cáncer de mama ha disminuido en todo el mundo desarrollado. En España, la mortalidad por cáncer de mama comienza a descender desde el año 1992 a un ritmo del 2 % anual.

El cáncer de mama muestra una gran influencia hormonal. Muchos de los factores de riesgo establecidos como menarquía temprana, menopausia tardía, nuliparidad, edad tardía del primer parto y obesidad en mujeres posmenopáusicas, suponen una mayor exposición de la glándula mamaria a los estrógenos circulantes. Por otra parte la terapia hormonal posmenopáusica incrementa ligeramente el riesgo. Otras exposiciones de riesgo investigadas en la literatura incluyen el sedentarismo, la exposición precoz a altas dosis de radiaciones ionizantes, el consumo de alcohol, los anticonceptivos orales, el alto consumo de grasa, el menor consumo de folatos, la exposición a plaguicidas organoclorados, el tabaco y los campos electromagnéticos de muy baja frecuencia. La distribución de estos factores en relación al nivel socioeconómico podría explicar la mayor incidencia observada en las mujeres de clase social más elevada. Determinadas profesiones como profesoras, farmacéuticas, trabajadoras sanitarias, empleadas de la industria química, trabajadoras de telefonía y radio, y peluqueras, muestran también una incidencia mayor, aunque es difícil deslindar la influencia de factores específicamente ocupacionales. Los antecedentes familiares suponen un considerable aumento del riesgo. Las mujeres con alteraciones en alguno de los dos principales genes de susceptibilidad, BRCA1 y BRCA2, tienen una probabilidad entre 60 % y 80 % de desarrollar cáncer de mama a lo largo de la vida.

Hoy en día, el cáncer es uno de los mayores retos, y por ello la nanotecnología se va integrando en el campo del tratamiento del cáncer con las búsquedas de nuevos sistemas de liberación de escala nanométrica como liposomas, micelas o nanopartículas (NPs). La eficacia de estos sistemas viene determinada por su pequeño tamaño, reducción de la toxicidad del propio fármaco, liberación controlada del fármaco,

modificación de la farmacocinética y biodistribución del fármaco (Suri y cols, 2007). Por tanto, el uso de micro/nanoesferas de polímeros biodegradables para la liberación controlada de fármacos antineoplásicos ha generado un gran interés en el mundo de la oncología teniendo como ventaja aumentar los efectos terapéuticos y reducir los efectos adversos sistémicos (Feng y Huang, 2001).

A pesar de los nuevos avances en la liberación controlada de fármacos anticancerosos desde sistemas poliméricos, existe un gran inconveniente por parte del tumor, y es la posibilidad de que éste desarrolle mecanismos de resistencias múltiples a fármacos (MDR). Estos mecanismos se manifiestan como alteraciones enzimáticas específicas, regulación de la apoptosis o mecanismos de transporte como la Glicoproteína-P. La glicoproteína-P es una proteína de membrana, producto del gen MDR-1, que actúa como bomba expulsora de diversos fármacos, se encarga de liberar a la célula de sustancias tóxicas. Se ha demostrado que actúa como una bomba dependiente de energía (ATP), que saca el fármaco al exterior de la célula evitando su acumulación y su actuación en el interior de la célula, lo que conlleva a una pérdida total de la eficacia del tratamiento. La quimioterapia suele fallar puesto que las células cancerosas pueden desarrollar una resistencia expresada mediante la glicoproteína-P, que tiene como función echar el fármaco anticanceroso de la célula. Por tanto sería interesante identificar novedosos inhibidores de los microtúbulos que pudiesen superar estas resistencias y mejorar así los perfiles farmacológicos (Cheung y cols, 2009).

Nuevos estudios muestran que las NPs o las microesferas, por su pequeño tamaño pueden transportar el fármaco a las células cancerosas sin activar la acción de la Glicoproteína-P, y así superar o disminuir la MDR de algunas células cancerosas expresado en su fenotipo (Koziara y cols, 2004). Además, se ha demostrado que las NPs pueden reducir el MDR incrementando el contenido de fármaco en las células cancerosa. En el caso de la encapsulación de un fármaco como el Paclitaxel (PTX), podría ayudar a aumentar su eficacia en células que hayan adquirido tal resistencia (Bilensoy y cols, 2008).

I.1. Situación actual del cáncer en España

El centro nacional de epidemiología del Instituto de Salud Carlos III realizó un estudio donde se agrupó “La situación de cáncer en España 1975 - 2006”, publicado en 2009 (Domenech y cols, 2009). En él, se recoge los datos de incidencia, mortalidad y prevalencia de las muertes por cáncer en España y en la Unión Europea.

I.1.1.a. Incidencia

La incidencia o mortalidad observada en una determinada población se calcula dividiendo el número de casos producidos en un año por la población de riesgo (población a mitad de periodo).

A nivel de incidencia, se destaca que en los hombres los tumores más frecuentes son:

- cáncer de próstata en Albacete, País Vasco, Canarias, Cuenca, Girona y Navarra
- cáncer de pulmón en Asturias, Granada, Murcia y Zaragoza

Estos dos tipos de cáncer, además del cáncer de vejiga constituyen los tres tumores más frecuentes en todos los registros españoles puesto que suponen entre el 56 % y el 62 % del total.

En cuanto a las mujeres, se registran las tasas de incidencia más altas en Girona, Granada, Murcia, Navarra y Tarragona; y las más bajas en Albacete y Cuenca. La incidencia de cáncer de mama es más elevada en cinco comunidades autónomas: Girona, Navarra, Tarragona, País Vasco y Canarias. En todos los registros españoles, el cáncer de mama es el tumor más frecuente en mujeres, responsable de más del 25 % de los casos de cáncer, seguido del cáncer de colon y de cuerpo del útero.

Respecto a la incidencia de cáncer en los países de nuestro entorno, en hombres: los tres países con más incidencias son (tasa ajustada por cada 100.000 habitantes): Hungría con 598,80; Bélgica con 543,30; Francia con 527,50. España con unas tasas ajustadas inferiores a 416,90 a las del promedio de la UE, ocupa el vigésimo lugar. En mujeres, los tres países con más incidencias son: Dinamarca con 413,60; Hungría con 408,70; Irlanda con 382,20. España, junto con Grecia, presenta las tasas de incidencia más bajas con 263,40.

I.1.1.b. Prevalencia

La prevalencia hace referencia al número de pacientes con cáncer en una determinada población, independientemente del momento en que fueron diagnosticados. La prevalencia depende de la frecuencia de aparición de la enfermedad (incidencia) y de la letalidad de la misma (supervivencia).

La fuente sistematizada y homogénea de información existente en Europa que permite la interpretación de los resultados y la comparación entre países se llama EURO CARE (Berrino y cols, 2001).

En cuanto a la supervivencia en Europa a los cánceres colorrectal, pulmón, mama, ovario y próstata (Berrino y cols, 2007):

- alta : en los países nórdicos (excepto Dinamarca) y Europa central
- intermedia: en el sur de Europa
- baja: en el Reino Unido e Irlanda
- muy baja en Europa del este

En España, en relación con periodos anteriores, la supervivencia de los cánceres de mama, colorrectal, melanoma, ovario, próstata, testículo y enfermedad de Hodgkin, ha aumentado de forma significativa.

I.1.1.c. Mortalidad

Según la edad prevalece en gente joven (1 a 39 años) la muerte por accidentes como primera causa de muerte y muerte por cáncer como la segunda. En personas de 40 años y más, la primera causa de muerte es el cáncer y la segunda las enfermedades del corazón.

En España, en el año 2006, se registraron 98.000 muertes por cáncer, siendo por tanto 3 de cada 1.000 hombres (61.000) y 2 de cada 1.000 mujeres (37.000). El cáncer de mama fue responsable de casi 6.000 muertes en ese año que corresponden al 16 % del total de muertes por cáncer en mujeres. Las tasas de mortalidad por tumores mamarios se sitúan entre las más bajas de Europa, y en la década estudiada disminuyeron a un ritmo de 1,8 % anual. Esta reducción de las tasas de mortalidad por

cáncer de mama se pone de manifiesto en la mayoría de los países desarrollados, y se ha atribuido a la eficacia de los programas de cribado que resultan en una detección más temprana de los tumores, así como a las grandes mejoras de los tratamientos (Ferlay y cols, 2007; Karim-Kos y cols, 2008). En los hombres, los cinco tumores responsables de más muertes fueron el cáncer de pulmón, el colorrectal, el de próstata, el de vejiga y el de estómago.

Estos patrones de mortalidad son parecidos en el resto de países europeos. Las tasas de mortalidad por cáncer de pulmón siguen tres patrones diferentes en función de la región de Europa que están estrechamente relacionadas con la prevalencia del consumo de tabaco. En Europa del Este, la mortalidad por cáncer de pulmón alcanzó su punto máximo en los años 90, mientras que en las regiones de Europa del Norte y del Oeste se observó una tendencia decreciente desde finales de los años 70, y en los países mediterráneos a partir de los 90 (Karim-Kos y cols, 2008).

Respecto a la mortalidad en algunos países europeos (Ferlay y cols, 2007): en hombres, se observa que los tres países con más mortalidad por cáncer de estómago, colorrectal, pulmón y próstata son (tasa ajustada por cada 100.000 habitantes): Hungría con una tasa de 364,50, República Checa con 309,20 y Letonia con 297,30 y el que menos es Suecia con 173,10. España se encuentra con una tasa de 237,00, siendo el cáncer de pulmón el más mortal. En las mujeres, los tres países europeos con más mortalidad en cánceres de estómago, colorrectal, pulmón, mama y útero son: Dinamarca con una tasa de 196,20; Hungría con 187 y República Checa con 172,20. España se encuentra con una tasa de 106,50.

II. Biomateriales

Se emplea el término biomateriales para designar aquellos materiales inocuos para el organismo, y que en algunas circunstancias, son necesarios en el mismo para llevar a cabo determinadas funciones. Se pueden clasificar en biotolerados, cuando son tolerados por el huésped; en bioinertes, cuando no desencadenan respuesta local en el huésped; y bioactivos, aquellos que inducen respuesta deseada en el huésped.

En la práctica, los biomateriales se utilizan cada vez más en el campo de la medicina, por ejemplo, en implantes dentales u óseos, en la preparación de dispositivos de uso médico como marcapasos cardíacos, biosensores o matrices para la liberación controlada de fármacos.

Atendiendo a su origen, se pueden diferenciar los biomateriales sintéticos o artificiales (los metales, las cerámicas y los polímeros) y los biomateriales de origen natural o biológico (proteínas: colágeno o elastina; polisacáridos: quitosano o ácido hialurónico).

II.1. Materiales biodegradables

Los materiales biodegradables pueden ser de origen natural o sintético. Sus aplicaciones más frecuentes son: suturas y fibras, implantes macroscópicos totalmente biodegradables, dispositivos porosos y sistemas de dosificación controlada.

II.1.1. Biomateriales de origen natural

En este grupo se encuentra el Catgut, el colágeno reconstituido, la celulosa, el quitosano y la quitina.

El **Catgut** fue durante décadas el único elemento de suturas absorbibles y aún se utiliza por su relativo coste. Aunque ha sido prácticamente sustituido por sistemas sintéticos de mejores propiedades y tolerancia. El principal sustituyente del Catgut es el colágeno aislado del tejido fibroso de la submucosa intestinal de oveja, o bien del tejido conjuntivo del intestino de ganado vacuno.

Las fibras de **colágeno reconstituido** se preparan, normalmente, a partir de tendones o pieles de ganado. La materia prima se descompone parcialmente en medio alcalino y posteriormente se hincha en ácido acético. Su resistencia a la hidrólisis enzimática *in vivo* se mejora sensiblemente mediante un recubrimiento con polivinil alcohol (PVA) e incluso puede mejorarse su resistencia por entrecruzamiento con glutaraldehído o con hexametileno diisocianato antes del proceso de trenzado.

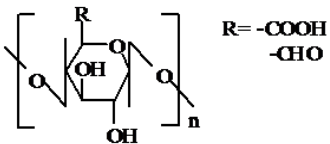
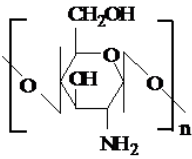
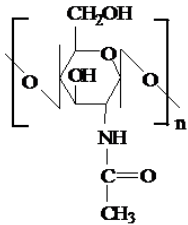
La **celulosa** (Tabla 1) constituye el componente principal del algodón, generalmente utilizado como suturas bioestables. Igualmente, se ha demostrado que la

oxidación controlada de la celulosa da lugar a sistemas biodegradables que pueden ser utilizados como materiales absorbibles (Devi y cols, 1986; Bernkop-Schnürch y Walker 2001).

La **quitina** (Tabla 1) es un homopolisacárido formado por anillos de N-acetil-D-glucosamina enlazados mediante uniones β (1 \rightarrow 4) glucosídicas. Se presenta en tres formas polimórficas α , β y γ que difieren en la disposición de sus cadenas macromoleculares. La “Quitina α ” es la forma más cristalina y se encuentra en los organismos vivos en forma de fibrillas, que pueden sufrir hidrólisis enzimática para dar N-acetilglucosamina por acción de dos enzimas hidrolíticas o hidrolasas: Quitinasa y Quitobiosa (Roberts, 1992; Muzzarelli, 1999).

El **quitosano** (Tabla 1) se presenta en animales conjuntamente con la quitina, siendo el homopolisacárido homólogo desacetilado; por lo tanto puede prepararse por desacetilación controlada de la quitina en medio alcalino. Es soluble en disolución ácida pero insoluble a pH > 6,5 y en la mayoría de los disolventes orgánicos. Se disuelve con relativa facilidad en una mezcla de ácido acético y urea. Puede procesarse en solución concentrada o en forma de gel, para formar fibras biodegradables con buenas propiedades mecánicas (Domard y Domard, 2001; Kato y cols, 2003).

Tabla 1. Estructuras químicas de los biomateriales de origen natural o biológico.

	 <p style="text-align: right; margin-right: 20px;">R= -COOH -CHO</p>	carboxi- celulosa
Quitosano		poli(D-glucosamina)
Quitina		poli(N-acetil-D-Glucosamina)

II.1.2. Biomateriales sintéticos

Para que un material pueda ser empleado con total seguridad como implante en el organismo humano tienen que poseer una serie de requisitos así como sus metabolitos de degradación. Por lo tanto:

- no deben de ser mutágenos, carcinógenos, antigénicos, tóxicos, ni teratógenos
- han de ser esterilizables y biocompatibles con el tejido receptor
- provocar siempre la mínima reacción posible y que los productos degradados sean solubles en el medio fisiológico

Los biomateriales de origen natural no suelen cumplir ninguno de estos requisitos que son imprescindibles para poder ser utilizados en el organismo humano. Por ello, la investigación en este campo está orientada en la preparación y desarrollo de sistemas biodegradables con buena resistencia y tolerados por el organismo receptor.

Los polímeros sintéticos que cumplen tales características suelen ser biocompatibles y bioestables, pero la condición de biodegradable reduce la relación de polímeros posibles. Los enlaces químicos potencialmente degradables en el organismo vivo son acetales, ésteres, orto-ésteres, amidas y enlaces glucosídicos. Entre los polímeros sintéticos biodegradables destacan el poli (ácido láctico), el poli (ácido glicólico) y sus copolímeros.

II.1.2.a. Poli (ácido láctico) y poli (ácido glicólico)

Se trata de los polímeros biodegradables sintéticos de mayor uso.

Poli (ácido glicólico) (PGA) (Figura 1) es un poliéster simple lineal alifático. Es altamente cristalino (45-55 %) con un alto punto de fusión (220-225°C), una temperatura de transición vítrea de 35-40°C y baja solubilidad en disolventes orgánicos. Carece de grupo metilo por lo que le hace más hidrófilo y es por tanto más susceptible a la hidrólisis. Fue utilizado en el desarrollo del primer tipo de sutura sintética totalmente absorbible creada por American Cyanamid (Frazza y Schmitt 1971). Desde 1970, se han comercializado las suturas de PGA de nombre DexonTM. Debido a la naturaleza hidrófila del PGA, estas suturas tienden a perder su fuerza mecánica sobre un periodo de 2 a 4 semanas tras la implantación (Reed y Gilding, 1981).

Poli (ácido láctico) (PLA) (Figura 1) es de alto peso molecular. Se prepara de forma similar a la del PGA, mediante la síntesis del correspondiente dímero heterocíclico y la posterior apertura del derivado de 1,4-dioxano-2,5-diona. Es por tanto más hidrófobo que el PGA por tener el grupo metilo en la molécula del ácido láctico. El ser más hidrófobo hace que se limite la absorción de agua de los implantes fabricado con este material y reduce la velocidad de hidrólisis en comparación con el PGA. Se destaca que el PLA es más soluble en disolventes orgánicos. Debido a que la molécula de ácido láctico es quiral, existen dos formas esteroisoméricas que dan lugar a cuatro polímeros morfológicamente distintos:

- D-PLA y L-PLA son estereoregulares
- DL-PLA es el polímero racémico que se obtiene a partir de la mezcla de D- y L-ácido láctico
- meso-PLA se obtiene desde D,L-láctico

Los polímeros derivados de los monómeros D y L son materiales semicristalinos. Generalmente, L-PLA se emplea con más frecuencia que D-PLA ya que la hidrólisis de L-PLA conduce a L (+) ácido láctico que es el estereoisómero natural del ácido láctico. Las diferencias en la cristalinidad de D,L-PLA y L-PLA conllevan a un empleo distinto. Dado que D, L-PLA es un polímero amorfo, se suele emplear en dispositivos de liberación de fármaco donde es importante tener una dispersión homogénea de las especies activas dentro de una matriz monofásica. Por otra parte, el semicristalino L-PLA es más adecuado en aplicaciones en las que se requiere alta fuerza mecánica y dureza, por ejemplo en suturas y dispositivos ortopédicos (Christel y cols, 1980).

El proceso biodegradativo del poli (ácido láctico) *in vivo*, supone la hidrólisis de las cadenas del polímero, para dar lugar al ácido láctico que es metabolizado a través del ciclo del ácido tricarbóxico con previa transformación en ácido pirúvico por la lactato deshidrogenasa (LDH) (Figura 3). Finalmente es eliminado del organismo como anhídrido carbónico (CO₂) por vía pulmonar.

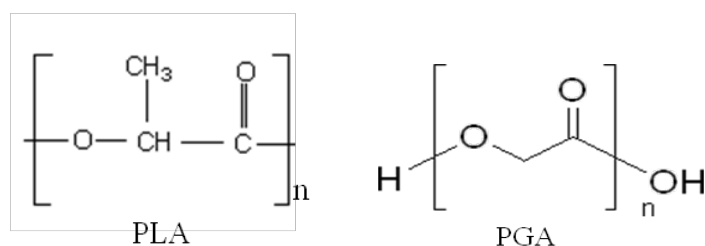


Figura 1. Estructura química del poli (ácido láctico) (PLA) y del poli (ácido glicólico) (PGA).

II.1.2.b. Copolímeros de ácido glicólico y ácido láctico

Existe toda una gama de copolímeros de ácido glicólico y ácido láctico: poli (láctico-co-glicólico) (PLGA) (Figura 2). Se obtienen por policondensación o por polimerización por apertura del anillo de los correspondientes dímeros heterocíclicos láctico y glicólico.

Se ha detectado que el ácido glicólico reacciona a mayor velocidad por lo que se incorpora de forma más rápida a las cadenas en crecimiento del copolímero (Cowsar y cols, 1985). En general, se ha observado experimentalmente que los copolímeros de ácido glicólico/ácido láctico se degradan a mayor velocidad que los propios homopolímeros. Una de las ventajas del PLGA es que se puede regular su degradación variando el peso molecular y la composición. En este estudio, se trabajó con dos composiciones distintas: PLGA 50:50 donde existe 50 % de unidades de ácido láctico y 50 % de ácido glicólico; y PLGA 75:25 donde hay 75 % de unidades de ácido láctico y 25 % de ácido glicólico. La composición que más se utiliza en las investigaciones es la de PLGA 50:50 puesto que se degrada más rápido, entre 50 y 60 días (Mundargi y cols, 2008).

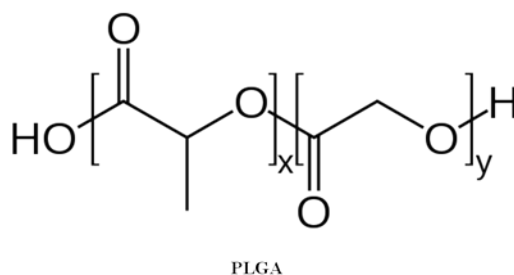


Figura 2. Estructura química del poli (ácido-co-glicólico) (PLGA).

Los nanosistemas creados con PLGA son uno de los más satisfactorios para el desarrollo en la nanomedicina por su hidrólisis en el cuerpo humano y la producción de metabolitos de monómeros biodegradables, ácido láctico y ácido glicólico, que son expulsados del cuerpo por la vía del ácido cítrico (Figura 3) (Panyam y cols, 2003). Este copolímero está aprobado por la USFDA (US Food y Drug Administration) para el uso humano y nanomédico. Se ha utilizado para encapsular con éxito fármacos como la doxorubicina, el cisplatino, el 5-fluorouracilo o la dexametasona (Kumari y cols, 2010). El fármaco que se encuentra en una matriz de PLGA se libera de forma prolongada por difusión y por degradación de la matriz polimérica (Panyam y cols, 2003).

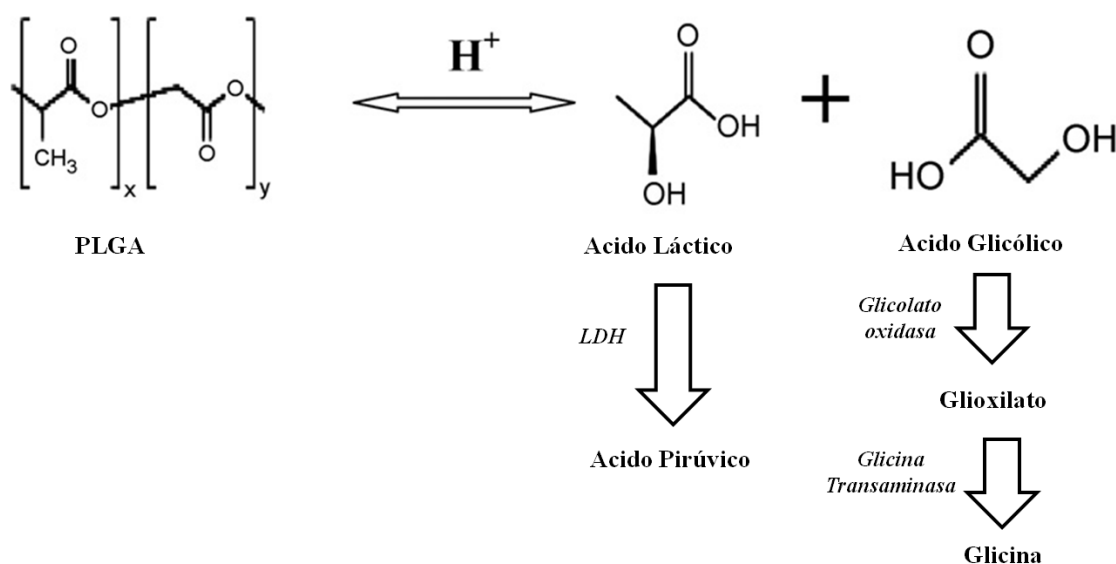


Figura 3. Hidrólisis del PLGA en ácido láctico y ácido glicólico; y sus respectivas vías de degradación. El ácido láctico en ácido pirúvico y el ácido glicólico en glicina.

Las técnicas más utilizadas en la investigación para la obtención de partículas de PLGA son la técnica de emulsión por su buena reproducibilidad, su alta capacidad de encapsular el fármaco y alta estabilidad; de nanoprecipitación y de deposición interfacial (Dong y Feng, 2007).

II.1.2.c. Poli (ϵ -caprolactona)

La primera vez que se identificó las propiedades de la poli (ϵ -caprolactona) (PCL) fue por el año 1973 (Figura 4). Se sintetiza por polimerización aniónica, catiónica o de coordinación de ϵ -caprolactona.

Es un polímero poliéster semicristalino con una temperatura de transición vítrea muy baja (- 60 °C) y una temperatura de fusión cristalina de unos 62 °C. Su alta solubilidad y su baja temperatura de fusión (59 – 64 °C) son adecuadas para la aplicación como biomaterial. A temperatura ambiente, es soluble en cloroformo, diclorometano (DCM), hidrocarburos aromáticos, ciclohexanona y 2-nitropropano e insoluble en hidrocarburos alifáticos, éter dietílico y alcoholes.

Tiene carácter hidrófobo, buena estabilidad *in vitro* y es de bajo coste. Es un polímero biodegradable y biocompatible. Las ventajas de la PCL incluyen por tanto una alta permeabilidad a moléculas pequeñas de fármacos. A diferencia de los polímeros PLA/PGA no genera en su degradación un medio ácido y posee una habilidad excepcional en formar mezclas con otros polímeros. Su degradación es mucho más lenta que el PLGA, siendo de especial interés en la preparación de dispositivos en implantes de larga duración (Sinha y cols, 2004).

Su buena permeabilidad y su ausencia de toxicidad hacen de este polímero una gran utilidad en las aplicaciones médicas (Hiljanen y cols, 1996). Por ello, varios tipos de fármacos como el ketoprofeno, colchicina, gentamicina, cisplatino, ciclosporina o heparina han sido encapsulados en nano/microesferas de PCL por su efectiva liberación. Estas nano/microesferas pueden ser solo de PCL o de copolímeros de PCL o uniones de PCL con otros polímeros (Sinha y cols, 2004). Los sistemas de liberación de PCL se pueden obtener por técnicas de nanoprecipitación, emulsión, por atomización y secado, por diálisis o por método interfacial (Sinha y cols, 2004; Mei y cols, 2009; Kumari y cols, 2010).

La degradación de la PCL tiene lugar por la enzima gluconolactonasa que la cataboliza transformándola en 6-hidroxihexanoato. Esta enzima se encuentra presente en distintos tipos de bacterias como en *Xanthomonas campestris* (bacteria patógena de plantas) o *Brucella melitensis* (bacteria patógena intracelular que produce la fiebre de Malta en humanos) formando parte de la vía de las Pentosas Fosfato. La ruta metabólica

continúa con la formación de semialdehído adípico, adipato, y finalmente en CO₂ (Figura 4).

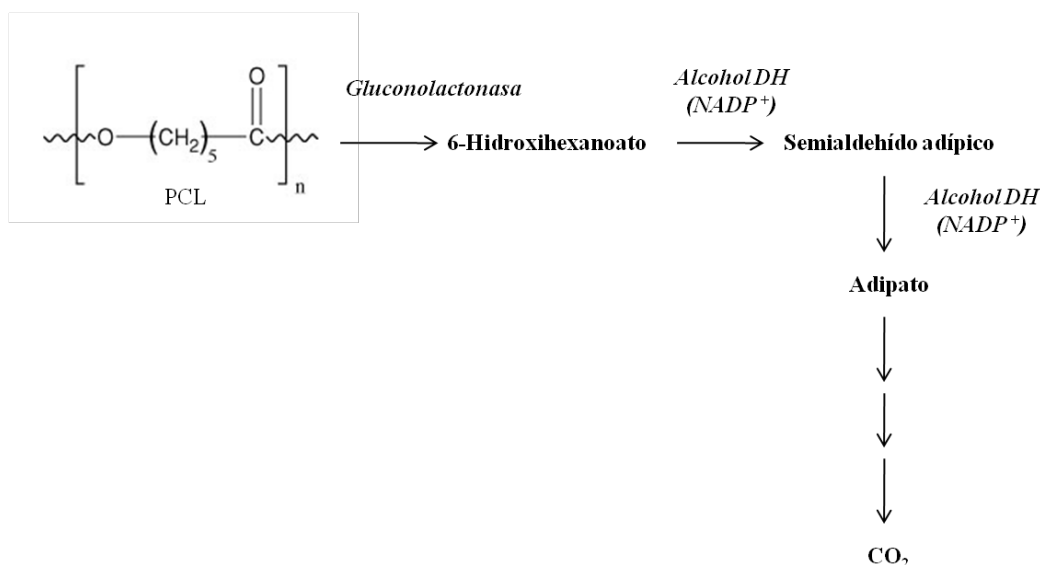


Figura 4. Estructura química de la poli (ε –caprolactona) (PCL), y vía de degradación de la PCL en CO₂ por enzimas presentes en algunas bacterias.

II.2. Biocompatibilidad de los biomateriales

Una de las características más importante de los biomateriales es la biocompatibilidad. La biocompatibilidad exige que el sistema implantado no sea agresivo y por tanto que no sea rechazado por el organismo vivo, dicho de otro modo, que como cualquier sistema no inerte, que sea capaz de desencadenar una reacción inmunológica en la interacción sistema-organismo pero que dicha reacción sea predecible y controlada (Figura 5) (Fournier y cols, 2003).

Los biomateriales empleados en medicina son numerosos y difieren entre sí en cuanto a su naturaleza química, grado y condiciones de polimerización, peso molecular, presencia de aditivos e impurezas. También es muy importante la forma, estructura, textura, rigidez o flexibilidad del implante. Cada uno de estos factores varía de un tipo de implante a otro y la interacción con el tejido receptor puede ser muy diferente. Dentro de las manifestaciones más comunes que pueden aparecer, cuando se implantan este tipo de materiales, cabe destacar los procesos inflamatorios, la formación de cápsulas fibrosas o los procesos infecciosos.

La inflamación es la respuesta del organismo a la agresión de un agente externo. La operación quirúrgica de implantación de prótesis y dispositivos biomédicos va acompañada siempre de una serie de procesos interdependientes, que comienzan con cambios hemodinámicos, seguido de alteraciones en la permeabilidad vascular de la zona afectada. El aumento de la permeabilidad promueve el transporte de un fluido inflamatorio rico en proteínas al tejido extravascular y zona herida. Simultáneamente, los leucocitos, por efecto de determinados factores de estimulación, tienden a adherirse al endotelio de los vasos sanguíneos para, seguidamente, atravesar las paredes de los vasos hasta llegar al tejido extravascular que rodea al implante (Figura 5).

La intensidad y duración de tal respuesta está controlada por el tamaño y naturaleza del material implantado, la zona del organismo donde se ha efectuado el implante y la capacidad reactiva del receptor.

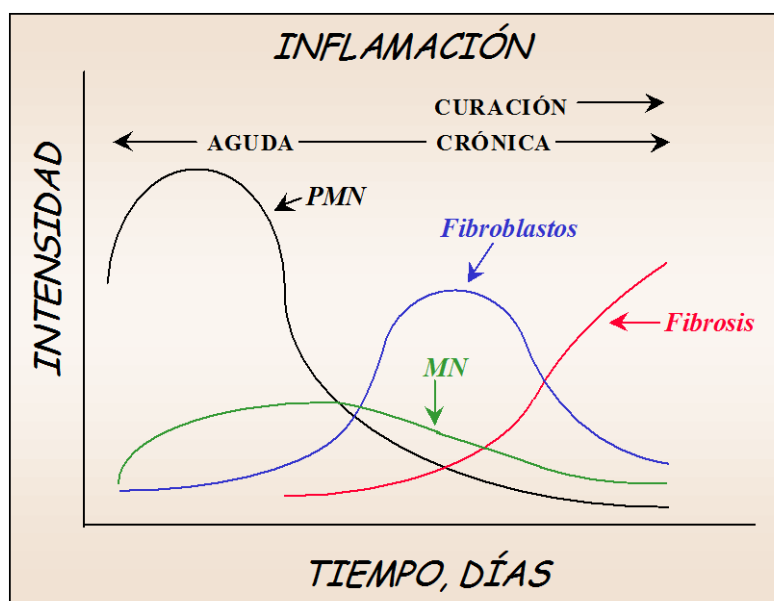


Figura 5. Respuesta inflamatoria del organismo humano ante la implantación de un dispositivo o cuerpo extraño. PMN: leucocitos polimorfonucleares y MN: leucocitos mononucleares.

Una respuesta, o reacción a nivel celular, relativamente breve y de poca intensidad es un buen síntoma de compatibilidad con el tejido o tejidos en contacto con el dispositivo implantado (Rihová, 1996; Babéense y cols, 1998; Rihová, 2000).

En circunstancias favorables, el proceso inflamatorio agudo debe remitir en pocos días, observándose claros síntomas histológicos de regeneración celular y formación de tejido en la zona afectada. El resultado más positivo sería lograr una completa restauración de la estructura normal y de las funciones de la zona lesionada.

Una respuesta inflamatoria crónica, supone la presencia continua de un agente lesivo y se caracteriza, siempre, por una abundancia de leucocitos mononucleados en la zona afectada (Figura 5). Puede estar provocada, no sólo por la propia naturaleza, forma y tamaño del implante, sino además porque el dispositivo implantado desprenda agentes citotóxicos, o simplemente como consecuencia de irritaciones producidas por el rozamiento físico con los tejidos que le rodean, infecciones o factores inherentes del receptor, como pueden ser un riego sanguíneo insuficiente o incluso factores de nutrición.

II.3. Mecanismos de biodegradación

La mayor parte de los sistemas poliméricos conocidos son susceptibles de degradación en condiciones más o menos severas, que pueden variar substancialmente de unos sistemas a otros. De forma general se pueden considerar dos tipos de procesos:

1. Aquellos que se inician mediante la absorción de algún tipo de energía, lo que origina el desarrollo y propagación de la degradación molecular mediante reacciones secundarias.
2. Mecanismos puramente hidrolíticos que dan lugar a la fragmentación de las cadenas macromoleculares, lo que normalmente ocurre con polímeros portadores de heteroátomos en la cadena principal, de tal forma que en varios sistemas se puede considerar como el proceso inverso a una policondensación.

El entorno del medio fisiológico del organismo humano no ofrece ninguna de las condiciones necesarias para que se produzcan los procesos catalogados en el primer grupo, sin embargo el medio fisiológico humano reúne las condiciones apropiadas para que se puedan producir con facilidad procesos hidrolíticos. Para ello, el polímero debe

poseer enlaces hidrolíticamente inestables, debe ser hidrófilo, para que el proceso biodegradativo se produzca en un tiempo razonable y la hidrólisis debe poder realizarse bajo condiciones de pH fisiológico (entre 7 y 7,4). Los sistemas poliméricos con heteroátomos en la cadena polimérica principal, como los poliésteres, poli (α -aminoácidos), algunas poliamidas y poliuretanos, son susceptibles de hidrólisis en condiciones fisiológicas (Smith y cols, 1987; Williams, 1992).

El agua interacciona eficazmente con los polímeros no hidrófobos, dando lugar a fenómenos de hinchamiento y disolución, por lo que puede ser el agente responsable de la biodegradación de polímeros en el organismo humano. En cuanto a los diferentes electrolitos (aniones y cationes salinos en solución), así como la acidez y basicidad del medio, pueden tener un efecto importante tanto en la degradación hidrolítica como en la oxidativa (Emanuel y cols, 1984; Moiseev y Zaikov, 1985). La interacción de sales con los polímeros implantados en el organismo, depende de la solubilidad del propio polímero en la solución salina isotónica.

En cuanto a las enzimas, se puede decir que son capaces de contribuir considerablemente a la degradación de polímeros en el organismo humano (Williams, 1980; Smith y cols, 1987). Debido a su gran tamaño molecular, las enzimas, normalmente, no pueden penetrar y difundirse en un implante polimérico, por lo que su actividad se desarrolla en la superficie o cuando se ha producido la fragmentación del implante. Los fragmentos de pequeño tamaño pueden ser fagocitados por los macrófagos, formando vacuolas digestivas, que son atacadas por las enzimas de los lisosomas de gran actividad, tales como hidrolasas y oxidasas, que destruyen fácilmente a los polímeros (Salthouse, 1976; Li y cols, 2001). Está claramente demostrado que la biodegradación de implantes introducidos en el organismo humano, se produce, tanto por la actividad de los componentes del medio fisiológico extracelular, como por la actividad celular (Bostman y Pihlajamaki, 2001).

La degradación del implante, normalmente acompañada de fragmentación y formación de tejido fibroso, es la respuesta característica del organismo ante la presencia de un cuerpo extraño (Behling y Spector, 1986). El grado y alcance de esta respuesta depende de factores tales como la composición química del implante (Bakker y cols, 1988), la textura superficial (Hunt y cols, 1996), la forma y el tamaño del propio

implante y también de algunas variables como son la especie animal, o incluso del lugar donde ha sido colocado el implante (Hench, 1998; Li y cols, 2001). De esta forma, la aplicación de biomateriales que puedan ser degradados en condiciones fisiológicas en el campo de la cirugía experimental está creciendo incesantemente a medida que se van experimentando nuevos materiales con carácter biocompatible y adecuadas propiedades mecánicas.

La vía de administración más ventajosa para sistemas microencapsulados poliméricos de liberación controlada es la parenteral: intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular. Una vez suministradas, las partículas pueden actuar como pequeños sistemas de reserva liberando lentamente el fármaco. El perfil de cesión depende de numerosos parámetros: tamaño, distribución, porosidad, degradabilidad, permeabilidad del polímero, etc. Por tanto, los materiales más adecuados para esta vía de administración son los biodegradables (como el poliláctico, policianoacrilatos de alquilo, diversos polímeros naturales, polianhídridos, etc), ya que van a ser eliminados por el organismo a través de la formación de productos de degradación biocompatibles que se transforman en CO_2 y H_2O por las vías metabólicas usuales.

III. Sistemas de liberación controlada de fármacos

La eficacia del principio activo de un producto farmacéutico depende, en gran medida, de su forma de dosificación. Actualmente, se acepta, de forma general, que la actividad farmacológica de un compuesto no es suficiente para asegurar una buena terapia, sino que depende del desarrollo de sistemas de dosificación adecuados, del tipo de formulación y de la selección de un sistema de liberación específico para el fármaco, para conseguir un efecto terapéutico óptimo (Mainardes y Silva, 2004).

Los sistemas de liberación controlada permiten la liberación de un fármaco durante un periodo dilatado de tiempo o en un momento específico del tratamiento (Si-Shen y Shu, 2003).

Para formar los sistemas de liberación controlada, es necesario que una sustancia activa (fármaco) pueda ser encapsulada, adjuntada, incorporada o mezclada con una sustancia transportadora. El fármaco es por tanto liberado sistemáticamente de forma

continua y a concentraciones terapéuticas, pudiendo establecerse un patrón de liberación durante determinados periodos de tiempo. Esto permite que los efectos no deseados y tóxicos producidos por la administración convencional de algunos fármacos sean reducidos (Minko y cols, 2000).

La eficacia de un fármaco, en una aplicación específica, está en función de unos niveles de concentraciones plasmáticas adecuados durante un periodo de tiempo más o menos prolongado. Sin embargo, la administración convencional origina variaciones en las concentraciones plasmáticas del fármaco una vez administradas la dosis. Los sistemas convencionales de administración puedan dar lugar a períodos alternativos de ineficacia o de toxicidad (Figura 6), hecho que es particularmente problemático si están muy próximos los niveles mínimos de toxicidad y de inefectividad (Vert, 1986; Freiberg y Zhu, 2004).

Estos inconvenientes han exigido el desarrollo de nuevas técnicas de administración de compuestos bioactivos, encaminadas a conseguir que con una única dosis, la concentración de fármaco en el organismo se mantenga fuera de los límites extremos de ineficacia y de toxicidad durante el tiempo necesario. En el caso ideal, este objetivo debe conducir a la existencia de una concentración uniforme de esta sustancia activa a la utilización de dosis más pequeñas y a lograr la ausencia de efectos secundarios (Langer y Peppas, 1981; Yasukawa y cols, 2004).

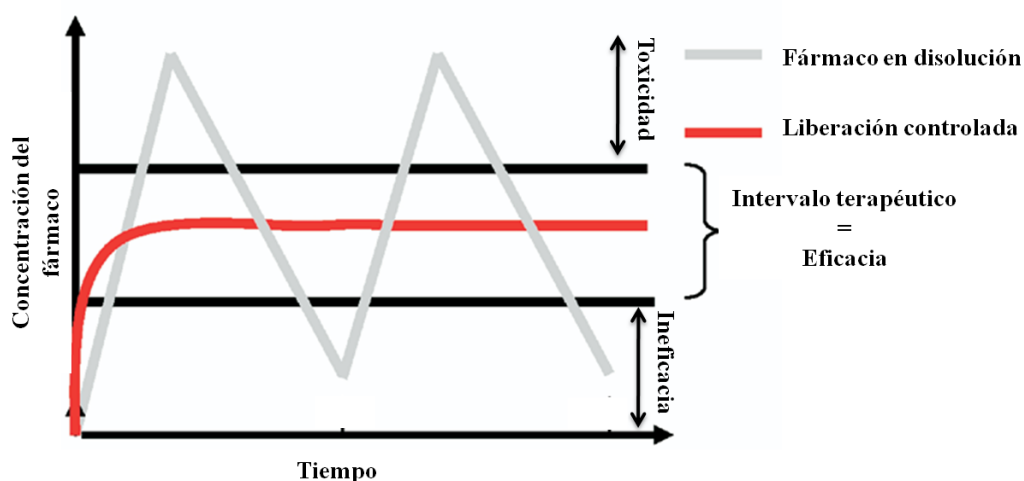


Figura 6. Comparación de los niveles plasmáticos de un fármaco administrado mediante un sistema de liberación controlada y mediante unas dosis consecutivas de un fármaco en disolución.

III.1. Sistemas poliméricos de liberación de fármacos

El diseño y aplicación de sistemas de dosificación controlada de medicamentos y los sistemas de vectorización o de dirección localizada de actividad de un determinado fármaco, es uno de los aspectos de mayor relevancia en el desarrollo de nuevas formas de medicación. Los avances que se producen en este campo de la tecnología farmacéutica se apoyan, fundamentalmente, en el comportamiento y propiedades de sistemas poliméricos biocompatibles, ya sean de origen natural o sintético.

En un sistema de liberación controlada, el agente bioactivo se encuentra incorporado a un soporte que, generalmente, es un material polimérico o una combinación de ellos (Fassihi y Ritschel, 1993; Chien y Lin, 2002). La velocidad de liberación de la sustancia activa desde dicho sistema al medio que le rodea viene determinada, principalmente, por las propiedades del propio polímero y en menor medida, de los factores ambientales como pueden ser el pH, la temperatura y el tipo de fluidos del organismo (Bae y cols, 1991; Blanco y cols, 2002). Por ello, los sistemas de liberación controlada deben ser capaces de permitir la administración de sustancias bioactivas de una forma lenta y continua durante periodos dilatados de tiempo (Blanco y cols, 2000; Gómez y cols, 2004).

Por tanto, el diseño adecuado de un dispositivo de liberación de fármacos para una aplicación biomédica, debe tener en cuenta que las propiedades físicas y mecánicas del polímero sean las apropiadas, ya que el fallo de estos sistemas, a menudo, tiene su origen en una inadecuada resistencia mecánica. Los parámetros más importantes que han de ser considerados son las propiedades elásticas, el grado de hinchamiento, la resistencia a la tracción y a la compresión, a la cizalla bajo cargas estáticas y dinámicas, así como la resistencia al desgarre y a la fatiga.

La geometría del polímero, en cuanto a su tamaño y forma, es otro factor fundamental que hay que considerar cuando éste va a ser aplicado en implantes, ya que las condiciones biomecánicas creadas por el soporte, en los tejidos adyacentes, son directamente dependientes de ambas propiedades (Blanco y cols, 2002; Hung y cols, 2004).

Los requisitos de tipo biológico están relacionados con la aplicación específica del sistema de liberación del fármaco. En general, y desde un punto de vista ideal, los

polímeros deben estar libres de aditivos, impurezas, estabilizadores, residuos de catalizador y emulsionantes. Los materiales poliméricos a utilizar no deben inducir, en general, fenómenos cancerígenos, tóxicos o nocivos. El problema de la toxicidad, normalmente, está relacionado con la liberación de pequeñas cantidades de monómeros residuales u otros aditivos. En los sistemas bioerosionables, las propiedades físicas, químicas y mecánicas de los polímeros no deben modificarse por la acción del medio biológico (Kim y cols, 2002).

III.2. Tipos de sistemas poliméricos de liberación de fármacos

Los sistemas poliméricos se pueden clasificar según la forma de incorporación del fármaco, distinguiéndose transportadores químicos y físicos (Ringsdorf, 1975).

Dosificación controlada a través de uniones físicas

Para sistemas con uniones físicas entre el polímero y el principio activo, los tipos más representativos, en función del mecanismo de actuación son los sistemas controlados por difusión, bien en depósitos o reservorios (membranas) o bien en matrices (monolíticos); y los controlados por hinchamiento (Laurencin y Langer, 1987; Peppas y cols, 2000).

Los **sistemas depósito** consisten en un núcleo de un principio activo rodeado por una membrana delgada, homogénea y no porosa (Korsmeyer y Peppas, 1981). El principio activo está contenido dentro de una capa de polímero que controla la velocidad de salida (Figura 7a). El transporte del fármaco, desde el depósito interno hasta el medio exterior, tiene lugar mediante un mecanismo de disolución del soluto en la interfase soluto-polímero. Su posterior difusión molecular hacia el exterior tiene lugar a través de los segmentos macromoleculares y bajo la influencia de un gradiente de concentración. Este fenómeno puede describirse por la Primera Ley de Fick. La liberación o salida del soluto es proporcional al tiempo y puede controlarse ajustando la geometría del sistema empleado (cápsulas, microcápsulas, fibras huecas, liposomas, membranas, etc), el espesor de la membrana, la diferencia de concentración a través de la membrana, las características termodinámicas del sistema (coeficiente de partición) y la estructura del polímero (coeficiente de difusión del soluto).

En los **sistemas matrices** (dispositivos monolíticos), el principio activo se encuentra uniformemente distribuido en un soporte polimérico sólido. El fármaco puede encontrarse disuelto en la matriz polimérica o bien quedar disperso, en el caso de no ser soluble en el medio polimérico, o si su contenido es más elevado que el límite de solubilidad (Figura 7b). En ambos casos, la migración del soluto al medio que rodea el sistema se produce por difusión molecular a través del soporte, o por difusión por microporos existentes en la matriz polimérica. Esto hace que la solubilidad del soluto en el polímero sea un factor importante en el control de la migración (Peppas y Gurny, 1983). Este fenómeno podría ser interpretado por la Segunda Ley de Fick.

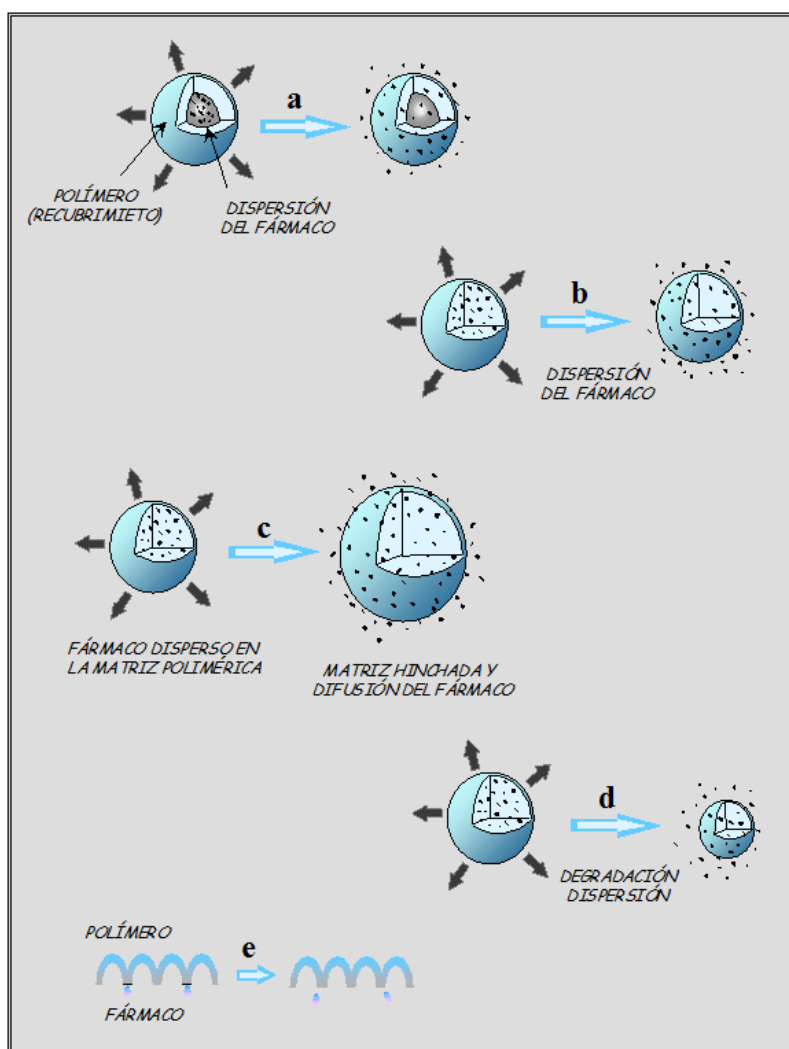


Figura 7. Representación de sistemas de liberación de fármacos: a) Sistema depósito, con un núcleo interno de agente bioactivo, b) Sistema matriz o monolítico, c) Sistema de liberación controlada por hinchamiento, d) Sistema bioerosionable, e) Sistema de liberación controlada mediante enlace fármaco-polímero.

En los **sistemas controlados por hinchamiento**, el principio activo se encuentra disuelto o disperso en un soporte polimérico hidrófilo, entrecruzado o no, el cual se hincha, sin disolverse, cuando se pone en contacto con un medio acuoso (Figura 7c). La liberación del principio activo al medio acuoso desde un sistema de esta naturaleza, implica un proceso de absorción de agua y otro simultáneo de desorción del principio activo, mediante un mecanismo de difusión controlado por el hinchamiento que sufre el polímero. Cuando el agua penetra en la matriz hidrófila, el polímero, que presenta inicialmente un estado vítreo se hincha, y su temperatura de transición vítrea puede alcanzar valores inferiores a la temperatura del medio que le rodea, pasando por ello a un estado tipo elastomérico. En estas condiciones, el soluto difunde desde las regiones hinchadas al medio externo (Peppas y cols, 2000).

Dosificación controlada a través de uniones químicas

Este grupo incluye los sistemas en los cuales la liberación del fármaco se lleva a cabo por la degradación del sistema polímero/fármaco. El proceso de liberación controlado “químicamente” incluye los sistemas poliméricos transportadores, en los cuales, el fármaco está unido covalentemente al polímero a través de un enlace que puede romperse enzimáticamente o por hidrólisis (Figura 7e) (Liso y cols, 1995; Elvira y San Román, 1997).

En este caso, la liberación del principio activo se produce mediante una reacción química, que suele ser un ataque hidrolítico o enzimático a un enlace débil. Para ello, el enlace covalente que se produce entre el fármaco y el sistema polimérico debe realizarse a través de grupos funcionales que puedan ser degradados en un medio fisiológico. Con un estudio acertado de los grupos funcionales se podría lograr un cierto control sobre algunas propiedades de los sistemas como la biodegradación, la solubilidad y la liberación del fármaco. De esta forma, sería posible regular la liberación del fármaco en determinadas zonas del organismo o frente a determinadas respuestas fisiológicas del mismo (Parejo y cols, 1996).

Los **sistemas bioerosionables** se encuentran en una situación intermedia de una liberación bajo uniones físicas y uniones químicas. La liberación del fármaco está controlada por la velocidad de degradación del polímero. En estos sistemas, el fármaco se dispersa uniformemente en un material polimérico, de forma similar a como se

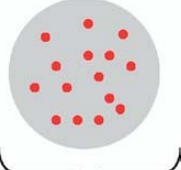

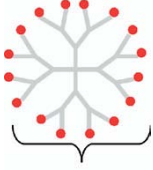
realiza en los dispositivos monolíticos; pero en estos sistemas, la fase polimérica va desapareciendo con el tiempo. Por tanto, cuando se produce la erosión del polímero que rodea al fármaco tiene lugar su liberación (Figura 7d).

Cualquiera de estos sistemas puede estar preparado a partir de materiales poliméricos no degradables, en cuyo caso el sistema soporte tendría que ser extraído una vez liberado el fármaco. Igualmente, pueden estar constituidos por materiales biodegradables, que pueden degradarse después de la liberación del principio activo, aunque el proceso de liberación estará, en todos los casos, gobernado por un proceso de difusión (Bodmeier y cols, 1989; Bennet y cols, 1991). Esta característica ofrece una ventaja en muchas aplicaciones, en comparación con los sistemas que no actúan por erosión, debido a que los polímeros biodegradables son gradualmente absorbidos por el organismo, sin que haya necesidad de una eliminación quirúrgica posterior. Sin embargo, esta ventaja puede verse afectada por los posibles inconvenientes derivados de la naturaleza de los productos de absorción que se van liberando de la degradación del polímero y que pueden ser tóxicos, inmunogénicos o cancerígenos (Solheim y cols, 1992; Hostyn y cols, 1996; Miyamoto y cols, 1997).

Tipos de sistemas depósito en la investigación

Los principales sistemas de liberación que se han estudiado y de los cuales se tienen más resultados son los liposomas (Rivera, 2003), los dendrímeros (Cloninger, 2002; Pan y cols, 2007) y las partículas poliméricas (Tabla 2). En estos últimos años, la nanotecnología ha ido desarrollándose eficazmente estudiando nuevos sistemas micro/nanoparticulados como son las NPs superparamagnéticas (Oyewumi, 2002), las nanoenvolturas de oro (Hirsch y cols, 2003; Loo y cols, 2005), los nanocristales (Yong y cols, 2007) y las NPs de silicio y sílice (Yan y cols, 2003; Martin y cols, 2005; Peng y cols, 2006).

Tabla 2. Representación de las nanopartículas (NPs), liposomas y dendrímeros, con ejemplos.

Partículas	Material	Estructura
Nanopartículas	Poli(láctico-co-glicólido) Poli (láctico) Poli (caprolactona) Poli (ortoester) Poli (anhídrido) Poli (beta-aminoester)	 60-250 nm
Liposomas	Doxil®/Caelyx®: PEG-DSPE:HSPC/Colesterol (5:56:39) DaunoXome®:DSPC/Colesterol (2:1)	 20-250 nm
Dendrímeros	Poli (amidoamina) Poli (etilenimina) Poli (péptido)	 5-200 nm

Los liposomas (Tabla 2) son vesículas esféricas que se caracterizan por ser de origen de compuestos naturales y no tóxicos, tienen una parte hidrófila (la cabeza) y la otra hidrófoba (la cola) (Fetterly y cols, 2003; Liu y cols, 2010). Los liposomas están formados de bicapas lipídicas por medio de interacciones hidrofóbicas y son capaces de transportar simultáneamente moléculas hidrófilas o hidrófobas. Se emplean en cosmética por su facilidad en absorberse; y también en la terapia génica, dado su habilidad en atravesar las barreras lipídicas y las membranas celulares (Sahoo y cols, 2007; Alexis y cols, 2008). Se han usado también como sistemas de liberación de fármacos por su biocompatibilidad, buena farmacocinética y facilidad en modificar la superficie. En estos últimos años, se han aprobado numerosas formas liposomales para uso clínico tal es el caso de Mycet[®] (doxorubicina liposomal), Doxil[®] (doxorubicina en PEG-liposomas) liposomas de 100 nm de diámetro aprobado por la FDA en 1995 con potente actividad antineoplásica incluido el Sarcoma de Kaposi y el cáncer de ovario; DaunoXome[®] (daunorrubicina liposomal), de tamaño 45 nm, para el tratamiento del

sarcoma de Kaposi. También, se ha incorporado fármacos antineoplásicos como el PTX (Figura 8). Sin embargo, los sistemas liposomales padecen desventajas en la liberación del fármaco que incluyen una incorporación insuficiente del fármaco, una rápida liberación e una inestabilidad de fármacos hidrófobos. Por ello, se investigan el desarrollo de liposomas estables y pH sensibles que puedan encapsular fármacos en medios ácidos.

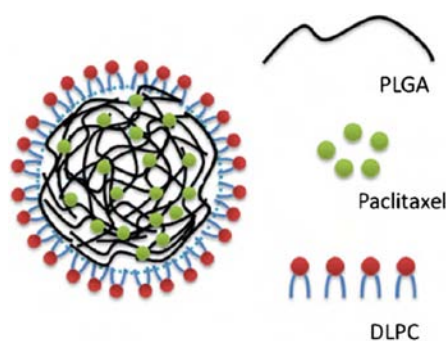


Figura 8. Ejemplo de liposoma: con PTX, PLGA y DLPC (dilauroil fosfatidilcolina) (lípido) (Liu y cols, 2010).

Las nanopartículas (NPs) (Tabla 2), por su pequeño tamaño, tienen como ventaja el poder cruzar barreras fisiológicas como la barrera gastrointestinal o la barrera hematoencefálica (Feng y cols, 2004). Su objetivo es transportar un fármaco poco soluble al lugar patológico y mejorar así su captación por parte de las células enfermas. Además, en estos últimos años, han sido un punto clave en el tratamiento del cáncer, y por tanto, se podrían decir que constituyen una quimioterapia (Feng y cols, 2004):

- personalizada: farmacocinética bajo control según las necesidades del paciente
- localizada: liberación del fármaco en el órgano diana
- continua: no MDR
- atraviesa la barrera hematoencefálica
- se realice en casa: vía oral u otras vías como la vía nasal u ocular, donde el paciente pueda tratarse a si mismo

Las NPs son mejor captadas por las células que las micromoléculas, y por tanto se trata de un transporte efectivo para la liberación del fármaco. Tienen como ventajas el pequeño tamaño, la posibilidad de encapsular fármacos poco solubles y permeable, una alta semivida biológica y liberación controlada del fármaco.

Se han obtenido exitosos resultados de fármacos anticancerosos (PTX, doxorubicina, 5-fluorouracilo o la dexametasona) formulados con nanomateriales; tal es el caso de la dexametasona, un glucocorticoide con acción intracelular, que se encapsuló con los polímeros PLGA y PLA, y así consiguieron aumentar su liberación durante tiempos prolongados y ejercer su acción inhibitoria de la proliferación vascular de células del musculo liso (Panyam y cols, 2004).

Recientemente, Abraxane[®] (Abraxis Bioscience and AstraZeneca), NPs de albúmina con PTX de un diámetro de 130 nm libre de cualquier tipo de disolvente ha sido aprobado por la FDA para el pretratamiento metastásico del cáncer de mama (Sparreboom y cols, 2005; Micha y cols, 2006). La administración de antineoplásicos poco solubles en sistemas particulados tienen como ventaja su pequeño tamaño (< 400 nm) y debido a ello, les permite escapar de su recaptación por el sistema reticuloendotelial y facilitar la extravasación a través de la propia red vascularizada porosa del tumor. Esto reduce los efectos adversos y aumenta la eficacia terapéutica, mientras que la biodistribución y la farmacocinética del fármaco no se ven alteradas (Bilensoy y cols, 2008).

III.3. Sistemas poliméricos en el mercado farmacéutico

El sector del mercado farmacéutico que incluye la tecnología de liberación controlada de fármacos está valorado en una cantidad de al menos 45 billones de dólares y muestra un crecimiento del 15 - 20 % anual. Este mercado puede dividirse en cuatro áreas tecnológicas: sistemas inyectables, de inhalación, orales y otros (transdermales) (Winnips, 2000).

Mayoritariamente, los sistemas orales representan la mayor parte del mercado, puesto que es la vía de administración preferida por el personal médico. Existen numerosos ejemplos de dispositivos orales que generan una liberación sostenida, migraciones más rápidas, cinéticas de orden cero, liberaciones retardadas o incluso una

combinación de algunas de ellas, con liberaciones vectorizadas en el lugar de acción deseado, ateniéndose a los diferentes ambientes fisiológicos con que se encuentra un comprimido a lo largo de su recorrido por el tracto gastrointestinal (Winnips 2000). Muchos de estos sistemas se han establecido con gran éxito dentro del amplio mercado farmacéutico como es el caso de ProcardiaXL[®] (nifedipino) para el tratamiento de la angina de pecho; y de CardizemCD[®] (diltiazem) para el tratamiento de la angina de pecho y de la hipertensión arterial.

Los sistemas inhalables no tardaron en introducirse con el fin de liberar fármacos con acción localizada a sitios profundos como los pulmones para tratar enfermedades como el asma o la bronquitis crónica. En este caso se puede encontrar: Symbicort[®] Turbuhaler (budesonida y fumarato de formoterol dihidrato) para el tratamiento de la EPOC y del asma; Seretide accuhaler (salmeterol y fluticasona) para el tratamiento del asma.

Los sistemas transdermales permiten una liberación en el flujo sanguíneo por la piel, evitando así el efecto de primer paso, liberándose durante un periodo de tiempo y con buena aceptación por parte del paciente. Se han desarrollado sistemas eficaces con hormonas, nitroglicerina y nicotina; algunos ejemplos son: Transtec[®] (buprenorfina) para el tratamiento del dolor, Minitran[®] (nitroglicerina) para el tratamiento de la angina de pecho.

Los sistemas inyectables es una vía sofisticada para liberar fármacos de manera tiempo dependiente en pequeños depósitos de lípidos o polímeros; como algunos ejemplos: Depocyte[®] (citarabina) para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica, linfomas no Hodgkin y Síndrome mielodisplásico; Urbason inyectable (metilprednisolona) en situaciones que requieran un tratamiento corticoide inmediato en casos graves o cuando la administración por vía oral no es posible (shock anafiláctico, brotes agudos de esclerosis múltiple, edema cerebral, tratamiento del rechazo agudo de trasplantes de órganos, como coadyuvante en quimioterapia...).

III.4. Aplicación de los modelos matemáticos en los sistemas de liberación controlada de fármacos

El mecanismo de liberación del fármaco desde las partículas depende del tipo de polímero empleado. Los principales mecanismos son el de difusión y el de erosión. En el mecanismo de difusión, el medio acuoso penetra en el interior del sistema y disuelve el fármaco y se difunde a través del material polimérico creando poros por los cuales se libera el fármaco.

El mecanismo de erosión se encuentra determinado por la biodegradabilidad del polímero y también por las propiedades del medio de disolución en el que se encuentra. La erosión conlleva un cambio constante de la geometría del sistema y por tanto la liberación del fármaco. La degradación consta de tres etapas:

1. liberación inicial del fármaco que se encuentra en la superficie de la matriz polimérica
2. liberación difusional del fármaco a través de la matriz del polímero y a través de los poros durante la degradación de la matriz
3. liberación erosional del fármaco por desintegración de la matriz polimérica y disolución

Existen factores que afectan a la liberación del fármaco desde las partículas como la composición y masa molecular del polímero, las propiedades físico-químicas del fármaco, y el tamaño y porosidad de las partículas.

La liberación de los principios activos por mecanismos de hinchamiento controlado de un polímero está relacionada con la difusión de éste desde y a través de dicho polímero. Los modelos matemáticos permiten conocer los distintos perfiles de liberación que puedan existir desde un sistema de liberación. Son de considerable importancia en la predicción del comportamiento de liberación y en el estudio de los parámetros estructurales que puedan afectar a estos procesos.

El padre de los modelos matemáticos para la liberación de los fármacos fue sin duda el Profesor Takeru Higuchi en 1961. Numerosos modelos matemáticos empírico/semi empíricos han sido propuestos desde entonces. Los modelos matemáticos

aplicados en la liberación del fármaco permiten evaluar y comparar los distintos perfiles de liberación.

Existen diversos modelos matemáticos, modelo-dependiente y modelo-independiente, que pueden ser utilizados para describir el perfil de una disolución. Los modelos-dependientes se basan en ecuaciones matemáticas, en este grupo se encuentran los modelos de orden cero, de primer orden, de Higuchi, de Hixson-Crowell, de Korsmeyer-Peppas, de Baker-Lonsdale, de Weibull, de Hopfenberg y de Gompertz (Dash y cols, 2010). A continuación se exponen brevemente junto con sus fórmulas algunos modelos matemáticos.

El **modelo de orden cero** es utilizado para los sistemas que no se disgregan y liberan el fármaco lentamente, por ejemplo, en algunos sistemas transdermales:

$$Q_0 - Q_t = K_0 t$$

Donde Q_t es la cantidad disuelta del fármaco a tiempo t ; Q_0 la cantidad inicial de fármaco (la mayoría de las veces $Q_0 = 0$); K_0 la constante de liberación de orden 0 expresada en unidades de concentración/tiempo.

El **modelo de primer orden** puede ser utilizado para describir la absorción o eliminación de algunos fármacos, por ejemplo, en sistemas de matrices porosas con fármacos solubles:

$$\ln(C_0/C_t) = K t$$

Donde C_0 y C_t corresponden a la concentración de fármaco inicial y a tiempo t , respectivamente; K es la constante de velocidad de primer orden.

El **modelo de Hixson-Crowell** (1931) considera que el área de las partículas es proporcional a la raíz cubica del volumen:

$$W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = K^{1/3} t$$

Donde W_0 y W_t es la cantidad de fármaco a tiempo 0 y a tiempo t.

El **modelo de Baker-Lonsdale** (1974) proviene del modelo de Higuchi y describe la liberación del fármaco desde matrices esféricas. Se puede dar en microcápsulas y microesferas:

$$f_1 = 3/2 [1 - (1 - M_t/M_\infty)^{2/3}] M_t/M = Kt$$

Donde M_t corresponde a la cantidad de fármaco a tiempo t y K la constante de velocidad que corresponde a la pendiente.

El **modelo de Weibull** puede describir distintos procesos de disolución del fármaco. Este modelo suele aplicarse con el fin de comparar perfiles de liberación de fármacos de matrices poliméricas:

$$M = M_0 [1 - e^{-(t-T)^{b/a}}]$$

M es la cantidad de fármaco disuelto en función del tiempo, M_0 es la cantidad total del fármaco liberado, T es el intervalo de tiempo medido en el proceso. Los parámetros “a” y “b” son la escala dependiente del tiempo y la forma de la curva de disolución, respectivamente.

El **modelo de Gompertz** se aplica para comparar perfiles de liberación de fármacos con buena solubilidad y de velocidades de liberación intermedias. Se aplica la siguiente ecuación simplificada:

$$X_{(t)} = X_{\max} \exp [-\alpha e^{\beta \log t}]$$

Donde $X_{(t)}$ es el porcentaje disuelto a tiempo t dividido por 100, X_{\max} es el máximo disuelto, α representa la porción no disuelta a tiempo $t = 1$; y β es la velocidad de disolución por unidad de tiempo .

De entre todos los modelos matemáticos, destacamos algunos de uso general en el estudio de liberación de fármacos desde distintos sistemas de transporte, y que son los modelos aplicados en este trabajo: el modelo de Higuchi, modelo de Korsmeyer-Peppas

y modelo de Hopfenberg. A continuación, se explican las bases de cada uno de estos modelos.

Modelo de Higuchi

Se basa en la teoría de la difusión del fármaco. Fue en 1961, cuando el Profesor Takeru Higuchi, estableció una relación entre la raíz cuadrada del tiempo y la cantidad de fármaco total liberada desde una capa fina oleosa que contenía un exceso de fármaco, basándose en la teoría de difusión (Higuchi, 1961 a-b). La relación propuesta por Higuchi queda expresada en la siguiente ecuación:

$$\frac{M_t}{A} = \sqrt{D(2C_0 - C_s)C_s t}$$

M_t : cantidad total acumulada de fármaco liberado a tiempo t

A: área superficial de la película expuesta

D: difusibilidad del fármaco por el material

C_0 : concentración inicial de fármaco

C_s : la solubilidad del mismo en el transportador.

Esta ecuación se basa en las siguientes hipótesis:

- La concentración inicial (C_0) en el sistema ha de ser superior a la solubilidad del fármaco
- La difusión del fármaco se realiza sólo en una única dimensión (efecto de los bordes han de ser insignificantes)
- El tamaño de las partículas es más pequeño que el grosor del sistema
- La matriz no se disuelve ni se hincha
- La difusión del fármaco es constante
- Se mantienen condiciones “sink” en todo el experimento, es decir que la máxima concentración del fármaco en el medio es menor o igual al 10 % de su solubilidad en el mismo

La ecuación anterior es válida la mayoría del tiempo, salvo cuando la totalidad del fármaco se halla en el sistema terapéutico.

Con el fin de estudiar una disolución desde un sistema de matriz heterogéneo, donde la concentración del fármaco en el sistema es menor que su solubilidad y la liberación tiene lugar a través de poros del sistema, se utiliza la siguiente ecuación:

$$Q = \sqrt{\frac{D\delta}{\tau} (2C_0 - \delta C_s) C_s t}$$

D: coeficiente de difusión del fármaco en el solvente

δ : porosidad de la matriz

τ : tortuosidad de la matriz

Generalmente, la ecuación de Higuchi se encuentra simplificada:

$$M_t = K \times t^{1/2}$$

Donde M_t es la cantidad total acumulada de fármaco liberado, K es la constante de velocidad y t es el tiempo al cual se considera la cantidad liberada.

Se tiene en cuenta que el hecho de que la cantidad de fármaco liberado por el sistema sea proporcional a la raíz cuadrada del tiempo no implica necesariamente que el único mecanismo de liberación del fármaco sea el de difusión.

Modelo de Korsmeyer-Peppas

Explica el mecanismo de liberación del fármaco en función de la geometría del sistema y del exponente de difusión “n”, determinando si tiene lugar o no un proceso de difusión que obedezca la Ley de Fick.

Este modelo es uno de los más sencillos y más fáciles a la hora de su aplicación (Peppas, 1985):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n$$

M_t : cantidad absoluta acumulada de fármaco liberado a tiempo t

M_∞ : cantidad absoluta acumulada de fármaco liberado a tiempo infinito

K : constante que incorpora las características estructurales y geométricas de los sistemas

n : exponente de liberación que indica el mecanismo por el cual se ha llevado a cabo la liberación

Nicholas Peppas fue el primero en introducir esta ecuación en el campo de los sistemas de liberación controlada. La ecuación de Peppas se aproxima a la clásica ecuación de Higuchi simplificada ($M_t = K \times t^{1/2}$), que describe una breve aproximación de la Segunda Ley de Fick para capas delgadas donde la concentración inicial del fármaco es inferior a su solubilidad cuando el valor del exponente n es igual a 0,5. Por tanto, un exponente igual a 0,5 indica una liberación de fármaco por difusión, pero solo si se trata de capas delgadas, para el resto de formas geométricas se usan los valores de que se muestran en la siguiente Tabla 3 (Ritger y Peppas, 1987 a-b). Así si $n = 0,5$ indica que la difusión controla la liberación del fármaco, siempre y cuando se cumplan una serie de suposiciones relacionadas con la geometría de la película, los coeficientes de difusión (independientes del tiempo y la posición), la matriz debe ser insoluble y no hinchable (condiciones del modelo de Higuchi), entre otras.

Tabla 3. Exponente n de la ecuación de Peppas y mecanismo asignado a la liberación del fármaco, a partir de sistemas poliméricos de liberación controlada de diferente forma geométrica.

Capa delgada	Cilindro	Esfera	Mecanismo de liberación
0,5	0,45	0,43	Difusión "Fickiana"
$0,5 < n < 1,0$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Transporte anómalo
1,0	0,89	0,85	Transporte tipo II

Modelo de Hopfenberg

El modelo de Hopfenberg se basa en la erosión del polímero (Hopfenberg, 1976). Hopfenberg propone un interesante modelo semi-empírico permitiendo una descripción cuantitativa de la liberación del fármaco desde sistemas degradables donde la velocidad de liberación es tiempo-dependiente y proporcional a la superficie del sistema (Siepman y Siepman, 2008). Toda masa transferida está implicada en un control de liberación del fármaco que rige un proceso de orden 0, caracterizado por una constante de velocidad K_0 , limitado a la superficie del sistema.

Este proceso de orden 0 puede corresponder a un simple fenómeno físico o químico, pero también puede resultar de la superposición de varios procesos como disolución, hinchamiento, y segmentación de la cadena polimérica. El modelo de Hopfenberg puede ser aplicado a la erosión de la superficie de las matrices poliméricas, para lo cual, el paso limitante de la liberación es el desprendimiento del fármaco de la superficie que sigue un proceso de orden 0.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left(1 - \frac{K_0 t}{C_0 a}\right)^n$$

M_t y M_∞ representan la concentración máxima de fármaco liberado hasta el tiempo t y tiempo infinito respectivamente. C_0 denota la concentración inicial de fármaco, y “ a ” es el radio del cilindro o esfera o de la parte más ancha (en el caso de tener una morfología amorfa). “ n ” es el factor de forma de las partículas, siendo esférico cuando $n= 3$, cilíndrico cuando $n= 2$, geometría amorfa cuando $n= 1$. Este modelo ignora los efectos de los bordes.

IV. Preparación de los sistemas de liberación

IV.1. Técnicas de microencapsulación

Existen distintas técnicas de microencapsulación de un principio activo y la selección de una técnica específica se basa fundamentalmente, en las características

físico-químicas del polímero y del principio activo. Han de tenerse en cuenta los siguientes requisitos:

- Obtener un rendimiento alto en el intervalo de tamaño de partícula deseado
- Conseguir una alta eficacia de encapsulación
- El principio activo debe mantener todas sus actividades biológicas durante el proceso de encapsulación
- Que sea una técnica reproducible y que la liberación del principio activo sea la deseada
- Poder ajustar mediante la composición y las variables del proceso el perfil de liberación
- Las partículas obtenidas no deben agregarse

Existen diversos métodos a la hora de encapsular el principio activo. En este estudio, se eligieron las siguientes técnicas para preparar las nanopartículas:

- Técnica de evaporación y extracción del disolvente: técnica de la doble emulsión
- Método de atomización y secado (Spray Dryer)

IV.1.1. Método de evaporación y extracción del disolvente

Este método incluye todos los procesos donde tiene lugar la eliminación del disolvente, en el que está disuelto el polímero, ya sea por evaporación o por extracción de este; en todos los casos, tiene que formarse una emulsión (Ramos y cols, 2001). Las emulsiones que se pueden obtener son las siguientes:

- Aceite en agua (o/w)
- **Agua en aceite en agua (emulsión múltiple o doble emulsión) (w/o/w)**
- Aceite en aceite (o/o)
- Agua en aceite agua en aceite (w/o/w/o)
- Agua en aceite en aceite (w/o/o)
- Agua en aceite en aceite en aceite (w/o/o/o)

A continuación se detallan los tipos de emulsiones más sencillos, de los cuales se suelen escoger como referencia, tal es el caso de la emulsión aceite en agua y de la emulsión aceite en aceite.

En la emulsión o/w o emulsión simple, la fase orgánica que contiene el polímero y el principio activo, se emulsionan en una fase acuosa que contiene un tensioactivo. Posteriormente, las gotas orgánicas (polímero mas principio activo) emulsionadas son endurecidas como microesferas por eliminación del disolvente orgánico. Esta técnica tiene como ventaja que se puede utilizar ampliamente para la encapsulación de principios activos liposolubles, ya que se consigue una alta eficacia de incorporación. También se obtiene un amplio intervalo de tamaños (desde grandes hasta pequeños) que son controlados por la velocidad y las condiciones de agitación. Las partículas obtenidas tendrán propiedades superficiales hidrofílicas, lo que permite su resuspensión sin agregación. En cuanto a sus desventajas, se podría mencionar que la incorporación de principios activos solubles en agua es muy baja debido a la repartición del principio activo en la fase acuosa externa de la emulsión.

La emulsión o/o es una modificación de la emulsión simple (o/w). En este caso, la fase continua está formada por un líquido orgánico como el aceite mineral y se forma la emulsión o/o. Es utilizada para obtener una encapsulación eficaz de principios activos solubles. No obstante, es difícil la obtención de pequeñas partículas (menores de 50 μm), y las partículas obtenidas tienden a agregarse cuando se resuspenden en vehículos acuosos debido a la naturaleza hidrófoba de la superficie y la ausencia de un estabilizador hidrofílico.

En la técnica utilizada en este trabajo para la obtención de las partículas de PLGA 50:50, PLGA 75:25 y PCL se utilizó el método de la emulsión agua en aceite en agua (w/o/w) o emulsión múltiple o doble emulsión. Este método es una modificación de la emulsión simple (o/w). En este proceso el principio activo está disuelto o disperso en una disolución del polímero disuelta en un disolvente orgánico. Esta disolución es emulsionada en un medio acuoso como en una disolución acuosa de polivinil alcohol (PVA) para formar las microgotas, y se repite esta acción para conseguir la doble emulsión. Finalmente, las partículas se obtienen cuando el disolvente orgánico se ha evaporado, se filtran y se secan por estufa de vacío o por liofilizador (Bodmeier y cols, 1987). Este método es muy útil y eficaz para trabajar con fármacos insolubles en agua.

Es un método reproducible respecto al rendimiento y a la distribución de tamaños. El tamaño de las partículas puede ser controlado por la potencia de agitación del sonicador utilizado entre la primera y segunda emulsión. El proceso tiene que ser realizado a baja temperatura, en un baño de hielo, para minimizar la activación del principio activo (Chiba y cols, 1997; Kim y cols, 2008).

Muchas variables interfieren en las características y propiedades de las partículas que se desean obtener (Wakiyama y cols, 1982; Suzuki y Price, 1985; Tice y Gilley, 1985; Benoît y cols, 1986):

- Disolvente orgánico
- Naturaleza y cantidad de emulsificante
- Naturaleza y solubilidad del principio activo
- Temperatura de evaporación del disolvente
- Relación de volumen de la fase orgánica y acuosa
- Relación principio activo y polímero
- Estructura y masa molecular del polímero
- Tipo y velocidad de agitación

A continuación, se detalla algunas de estas variables. El disolvente utilizado debe ser inmisible o ligeramente soluble en el medio de suspensión (acuoso u oleoso) en el caso por ejemplo del polímero de ácido láctico/glicólico. El punto de ebullición del disolvente ha de ser inferior que el del medio de suspensión si éste se elimina por evaporación. Los disolventes más utilizados son el acetato de etilo y el DCM, por su baja toxicidad, su rápida evaporación y su excelente habilidad para disolver polímeros.

Los emulsificantes cubren la superficie de las gotas emulsionada, de esta forma disminuyen la coalescencia, la coagulación y estabilizan el sistema. En el proceso de eliminación del disolvente, el emulsificante mantiene las gotas de aceite en su configuración esférica y las previene de la agregación hasta que el disolvente se elimina completamente y las microesferas se endurecen como partículas individuales. Los más empleados son el PVA, la gelatina, la metilcelulosa, el polisorbato, el spam y la lecitina. La concentración requerida y la efectividad de cada emulsificante es diferente, y el mejor emulsificante para una aplicación en particular se determina experimentalmente.

Las propiedades físico-químicas, las propiedades estructurales y la concentración del emulsificante influyen en las características de las partículas, igualmente se emplean también en la alimentación, cosmética, ya que entre otras propiedades aumentan la duración de almacenamiento.

En este estudio se utilizó como emulsificante macromolecular el PVA. Es extensamente usado en la fabricación de nano/microesferas por su alta viscosidad en el medio acuoso, su fuerte absorción alrededor de las gotas de emulsión, y su fuerte propiedad de estabilizador de la emulsión ya que forma pequeñas y uniformes partículas y se dispersa con facilidad en el medio acuoso. Sin embargo, no es fácil deshacerse en los lavados del emulsificante, lo que puede causar problemas en la purificación del producto y en las propiedades de formación de las nano/microesferas (Feng y Huang, 2001).

Para la preparación de NPs de PLGA, el PVA es el emulsificante mas utilizado. Se ha observado que si las NPs tienen una gran cantidad de PVA son más hidrófilas y reducen la internalización celular. Por tanto, las propiedades físicas y de internalización celular pueden ser moduladas con la variación de la cantidad de PVA (Panyam y Labhasetwar, 2003a). Además, cuando se añade PVA a la formulación, las NPs resultantes tienen un potencial Z negativo, que es importante porque influye en la estabilidad de la partícula y en la internalización celular (Kim y cols, 2008).

IV.1.2. Método de atomización y secado

Desde los años 40, la técnica de atomización y secado o también llamada técnica del Spray Dryer es usada en la industria farmacéutica por ser una técnica adecuada para el secado de productos farmacéuticos sensible al calor con una pérdida mínima de la actividad (Broadhead y cols, 1992). A parte de ser utilizada en la industria farmacéutica, también se halla en la industria química, alimentaria y bioquímica.

A la hora de sintetizar sistemas encapsulados mediante el método del Spray Dryer, se pueden emplear una variedad de polímeros hidrófobos o hidrófilos de origen natural, sintético o semisintético. En cuanto al fármaco, puede ser termoresistente o termosensible, ya que esta técnica es aplicable a cualquier tipo de fármaco. Esto conduce a la gran importancia para el desarrollo en la industria farmacéutica sobre todo

en la liberación de fármacos hidrófobos que representan uno de los mayores desafíos en el campo de la liberación de nuevos fármacos y de sus vías de administración (Mu y cols, 2005).

La porosidad que presentan las partículas obtenidas por Spray Dryer es una característica importante que permite que el agua penetre en la partícula y así aumentar la velocidad de liberación del fármaco. Este tipo de partículas porosas ofrecen ventajas sobre las partículas no porosas, presentan efectos beneficiosos en la liberación del fármaco, por ejemplo, en el tracto respiratorio por vía inhalatoria, y así mejoran la eficacia de administración (Healy y cols, 2008).

Las características de las partículas, como el tamaño, la densidad y la forma se puede controlar con los parámetros del Spray Dryer: temperatura de entrada, viscosidad, atomizador y concentración de la disolución (Healy y cols, 2008). El secado rápido puede llevar a la producción de material amorfo y puede ser un inconveniente en el rendimiento biofarmacéutico de la formulación obtenida.

Una de las síntesis de las NPs obtenidas en este trabajo se llevó a cabo mediante esta técnica que convierte en un solo paso un líquido en un polvo. La atomización de principio activo, previamente disperso o disuelto en una solución polimérica, es arrastrado en el seno de una corriente de aire caliente hasta un colector. En este recorrido, el disolvente es eliminado, debido a las altas temperaturas de esta corriente de aire, y se forman instantáneamente las nano/micropartículas, que se recogen en el colector.

Este proceso puede resumirse en cuatro etapas fundamentales (Broadhead, 1992; Giunchedi y cols, 1995):

1. Atomización del material
2. Contacto con el aire caliente
3. Secado de las gotas atomizadas a través del aire caliente
4. Recogida del producto sólido obtenido que se ha separado en el ciclón

En el presente trabajo, se utilizó un atomizador de la casa Büchi, modelo Mini Spray Dryer B-191, Büchi, Switzerland, el cual consta de las siguientes partes como muestra la Figura 8:

- Sistema de alimentación (1): comunica el depósito donde se encuentra la solución polimérica, que debe tener una viscosidad tal que asegure la dispersión uniforme del principio activo, con el sistema atomizador propiamente dicho, mediante una bomba peristáltica.

-Boquilla atomizadora (2)

-Cámara de secado (3): donde el producto atomizado se somete a una corriente de aire caliente, por medio del cual el disolvente polimérico se evapora, de forma que el polímero se deposita alrededor de los núcleos del principio activo, formándose así las micropartículas.

-Cámara de separación (4): su misión es separar los gases efluentes de las micropartículas a través de una corriente de aire de tipo ciclón. Esta cámara está conectada con un sistema de filtración para así evitar la salida al exterior de partículas y gases.

-Cámara de recogida de nano/micropartículas (5)



1. Sistema de alimentación
2. Boquilla atomizadora
3. Cámara de secado
4. Cámara de separación
5. Cámara de recogida

Figura 8. Mini Spray Dryer B-191 de la casa Büchi.

La principal desventaja de este método es el alto coste que tiene para muchas de sus aplicaciones, originado, fundamentalmente, por el bajo rendimiento en condiciones experimentales de laboratorio que presenta cuando no se trabaja con temperaturas de secado muy altas. A pesar de ello, presenta numerosas ventajas frente a los métodos tradicionales:

1. rápido y sencillo
2. no requiere el uso de disolventes adicionales o fase oleosa, al contrario que ocurre con los métodos de emulsificación tradicionales
3. permite la obtención de grandes lotes de productos
4. no importan los parámetros de solubilidad del fármaco y del polímero para diseñar el método de obtención del encapsulado
5. disminución de los residuos orgánicos

Este método suele generar productos formados por partículas esféricas y con una estrecha distribución de tamaños. No obstante, variando las condiciones de trabajo se pueden modificar muchas propiedades de los sistemas obtenidos (apariencia, tamaño de partícula y distribución, porosidad, contenido en humedad, estabilidad, fluidez, friabilidad, etc), por lo que previamente sería necesario llevar a cabo diferentes experimentos, modificando los distintos parámetros del sistema, hasta poder optimizar el proceso de obtención. Los parámetros indispensables a la hora de preparar las nano/micropartículas son los siguientes:

Temperatura de aire de entrada (inlet): se define como la temperatura de aire seco que fluye a través del instrumento con la ayuda del aspirador. Temperatura que deberá ser superior a la temperatura de ebullición del disolvente empleado. En nuestro caso, es el DCM cuya temperatura de ebullición es 39,8 °C.

Temperatura de aire de salida (outlet): corresponde a la corriente de aire que contiene las partículas solidas antes de entrar en el ciclón. Este valor no es arbitrario y es el resultado de la temperatura de entrada y de calor necesario para la evaporación del disolvente y es indicativo del grado de humedad del producto final así como de la eficacia de la atomización.

Aspirador: se encarga de recoger y aspirar el aire seco simultáneamente produciendo un vacío parcial que ayuda al ciclón, responsable de la separación y morfología del

producto final. La potencia del mismo vendrá determinada por el tipo de producto. Si es demasiado potente, puede absorber y llevarse partículas pequeñas, pero si es débil no forma bien el ciclón y da lugar a turbulencias indeseables que deforman las partículas. En este trabajo, se optimizó esta variable al 70 % impidiendo la pérdida de partículas por aspiración y favoreciendo la formación de un ciclón sin turbulencias.

Bomba: la función de la bomba incorporada es alimentar la solución para ser secada dentro del aparato. El ajuste de la alimentación de la bomba está íntimamente relacionado con la temperatura de entrada y salida. Cuanto mayor sea la velocidad de bombeo mayor será la diferencia de temperaturas entre la de entrada y salida. Seleccionar uno u otro valor para la bomba depende de varios factores como la viscosidad de la disolución a bombear y el diámetro del tubo. Las condiciones que se han establecido para la bomba son de 5 % (1,5 ml/min) y 16 % (5 ml/min); lo que se considera una velocidad de bombeo baja, ya que se busca conseguir unas partículas con un tamaño lo más pequeño posible.

Flujo de aire: se define como la cantidad de aire sobrecomprimido necesaria para la pulverización de la solución, emulsión o dispersión. A mayor flujo de pulverización menor es el tamaño de partícula del producto final. El flujo de aire también interviene en el tamaño de la partícula final, siendo a mayor flujo, menor el tamaño de la partícula obtenida. En este estudio se utilizaron flujos de aire de 700 y 800 NI/h.

Concentración de disolución: la concentración influye en el tamaño de las partículas de la siguiente forma: una baja concentración de la disolución inicial produce partículas deshinchadas y de aspecto rugoso; sin embargo, una mayor concentración da lugar a partículas más esféricas y lisas. Se estudiaron concentraciones de polímero en el intervalo de 1-2 %.

Volumen de disolución: diversos estudios muestran que existe un significativo aumento del rendimiento al aumentar el volumen de la disolución que pasa por el atomizador (Guerrero, 2004).

V. Regulación de la proliferación celular

V.1. Muerte celular. Conceptos generales

La muerte celular es un acontecimiento esencial para la homeostasis de las células que tiene lugar durante el desarrollo embrionario y postembrionario. No es sólo importante para el desarrollo normal sino también para la vida adulta de muchos tipos de organismos. Se distinguen dos procesos principales que llevan a la muerte celular: la apoptosis o muerte celular programada y la necrosis (Liao y Lieu, 2005).

Existen otros procesos alternativos en la muerte celular programada que incluye la autofagia, la paraptosis y la catástrofe mitótica (Figura 9). Estas alternativas suelen ser vías caspasas-independientes (Bröker y cols, 2005).

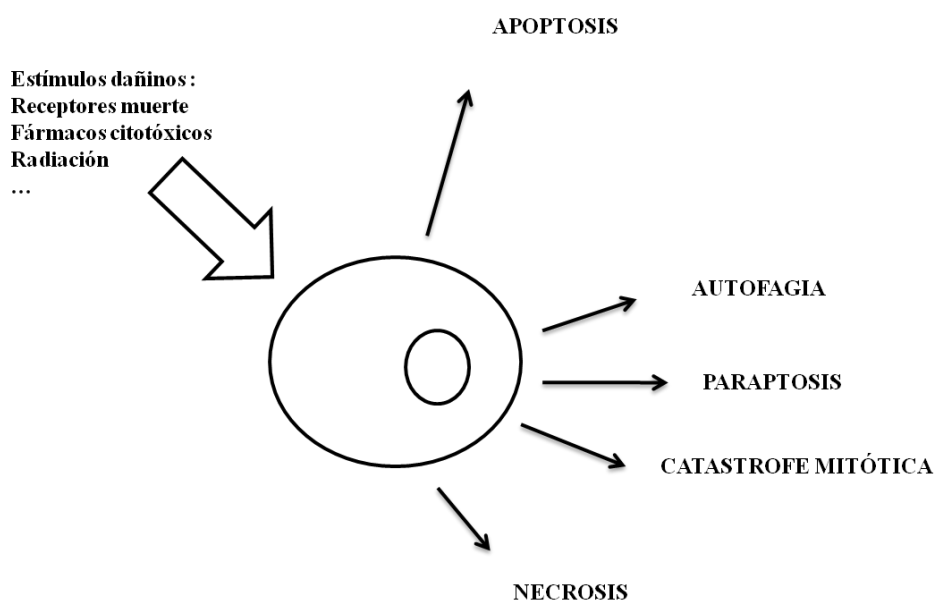


Figura 9. Distintos modelos de muerte celular: autofagia, paraptosis, catástrofe mitótica y necrosis.

La **autofagia** es la captura de material citoplasmático y organelas por vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas, y su posterior degradación por el sistema

lisosomal. En este proceso de muerte celular programada no interviene la activación de las caspasas.

La **paraptosis**, definida en algunos estudios con PTX en células de cáncer de pulmón ASTC-a-1 (Chen y cols, 2008), se caracteriza por una vacuolización citoplasmática que empieza con un proceso progresivo de inflamación de la mitocondria y del retículo endoplasmático, todo ello en ausencia de la activación de caspasa. Podría estar mediada por las proteínas quinasas activadas por mitógenos y desencadenada por miembros de la familia TNF (TAJ/TROY) y del factor de crecimiento tipo insulina 1.

La **catástrofe mitótica** se desencadena tras un fallo en la mitosis del ciclo celular, en algún punto de control del ciclo celular y el desarrollo de células aneuploides condenadas a morir. Se puede desencadenar por daño al ADN o por estabilización/desestabilización de los microtúbulos causada por los fármacos. Este proceso mata a las células por uno de los estadios de la mitosis (metafase) de una forma p53-independiente, o puede suceder también de forma p53-dependiente tras un fallo en la mitosis por activación del punto de control poliploide. Algunos autores manifiestan que la catástrofe mitótica se acompaña de una permeabilización de la membrana de la mitocondria y su posterior activación de las caspasas; sin embargo otros, expresan que es distinto al proceso apoptótico puesto que la sobreexpresión de Bcl-2 o la inhibición de las caspasas no previenen la mitosis catastrófica ni el desarrollo de células gigantes multinucleadas (Bröker y cols, 2005).

La **apoptosis** es un proceso fisiológico esencial para el organismo ya que desempeña un papel importante en el desarrollo celular y en el mantenimiento de la homeostasis de tejidos. Se encuentra también implicada en un gran número de situaciones patológicas que pueden originarse por un desequilibrio en los procesos de proliferación y muerte celular que regulan el número de células de un organismo. Frente al cáncer es uno de los mecanismos de defensa, y en células cancerígenas la muerte natural por apoptosis suele estar inhibida; por ello, las terapias anticancerosas (la quimioterapia) trata de activar o restaurar la apoptosis como medio de lucha contra las células cancerígenas (Haanen y Vermes, 1995). La apoptosis es inducida por varios estímulos entre los que se incluyen la unión de ligandos a receptores específicos de superficie, daño al ADN por diversos factores como fármacos, radiaciones, estrés celular...etc. Las células que mueren por apoptosis muestran cambios morfológicos y

bioquímicos que les permite diferenciarse de las células necróticas. A diferencia de la necrosis, las células apoptóticas al ser eliminadas mediante fagocitosis evitan que se vierta su contenido al exterior, y por tanto que se produzca una reacción inflamatoria.

Se suele diferenciar la apoptosis temprana y la apoptosis tardía; la temprana se caracteriza por una reducción del tamaño celular, fragmentación del ADN en dos tipos de fragmentos (cortos 200 nbp y largos 50-300 kbp), y una membrana citoplasmática intacta que contiene gránulos citoplasmáticos y fragmentos nucleares (Saunders y cols, 1997). En esta etapa, hay que destacar algunos procesos importantes como la exposición a la fosfatidilserina y la activación de la familia de las caspasas. En la apoptosis tardía, se desintegran todo los gránulos citoplasmáticos y fragmentos nucleares.

La **necrosis** se caracteriza por el hinchamiento del citoplasma y de las organelas citoplasmáticas, dilatación de la mitocondria y aumento de la permeabilidad de la membrana. Este proceso produce una alteración de la membrana plasmática dando lugar a su fragmentación y a la salida del contenido celular al espacio extracelular desarrollándose en el tejido adyacente una reacción inflamatoria en respuesta a la liberación de los desechos celulares. La necrosis puede darse también en enfermedades neurodegenerativas, autoinmunes y en el cáncer.

El proceso apoptótico, en términos generales, tiene lugar mediante dos vías que dependen del tipo de señal que ponga en marcha el proceso (Figura 10):

- la vía extrínseca (vía de los receptores de muerte)
- la vía intrínseca (vía mitocondrial)

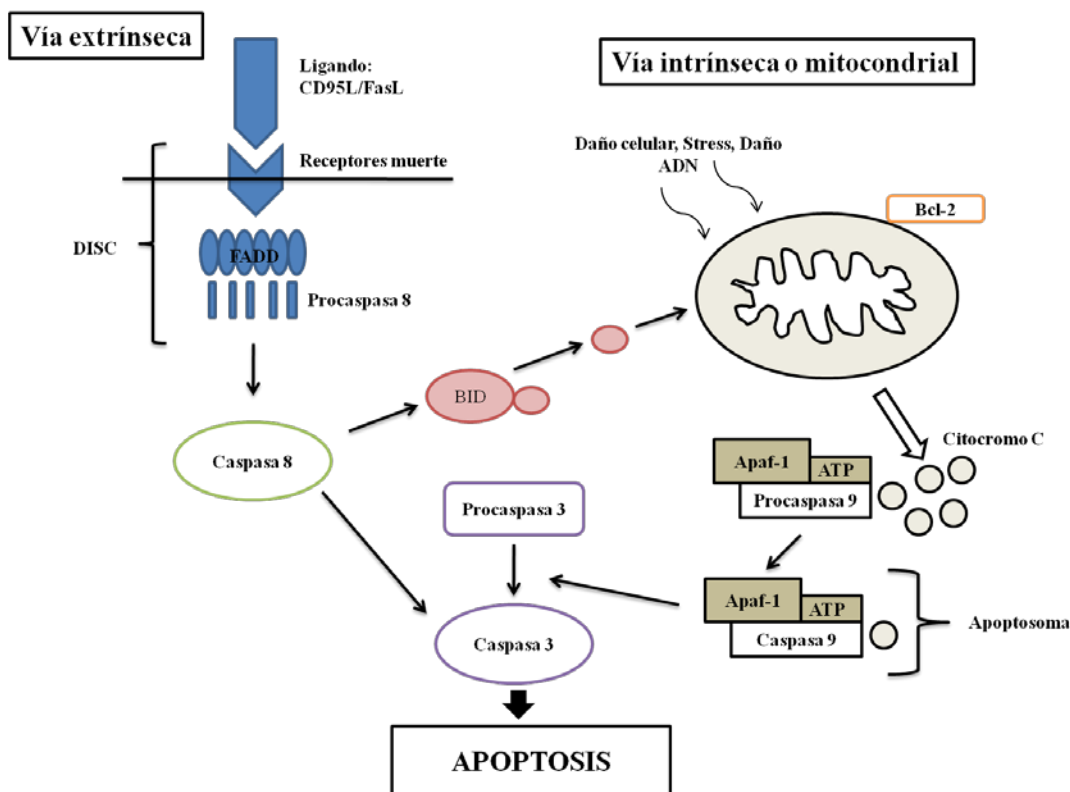


Figura 10. Principales vías apoptóticas y activación de las caspasas. El proceso de apoptosis tiene lugar a través de dos vías: la vía extrínseca (vía de receptores de muerte) o la vía intrínseca (vía mitocondrial). Ambas vías convergen en la activación de la caspasa 3.

Para que el proceso apoptótico tenga lugar, existe un componente indispensable, se trata de la familia de las caspasas, que son cistein-proteasas intracelulares que se compone de unos 14 miembros. Se pueden dividir en caspasas iniciadoras: caspasa -2, -8, -9 y -10, las cuales se ocupan de activar a las caspasas ejecutoras: caspasa -3, -6 y -7, y éstas son responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis como la reorganización del citoesqueleto, condensación nuclear y fragmentación del ADN (Denault y Salvesen, 2002; McGee y cols, 2002).

La **vía intrínseca** se desencadena por cualquier estímulo apoptótico como por ejemplo el daño celular o el estrés. En respuesta a estos estímulos, la mitocondria, que contiene proteínas como el citocromo c o el AIF (factor inductor de la apoptosis), libera estas proteínas al exterior mitocondrial. Por tanto, el citocromo c liberado al citosol se une al ATP y al factor activador de proteasas apoptóticas (Apaf-1) formando un

complejo heptamérico protéico denominado apoptosoma que provoca la autoactivación de la procaspasa 9 que a su vez activa a otras caspasas (Denault y Salvesen, 2008).

La **vía extrínseca** se pone en marcha a través de la unión de ligandos externos a receptores de membrana denominados receptores de muerte (Death receptor), los cuales son proteínas de membrana que presentan varios dominios ricos en cisteína y son parte de la familia de TNF (TNFR), que incluyen: TNFR1, Fas (CD95) y los receptores del ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF (TNF-related apoptosis-inducing ligand) TRAIL/Apo-2L (TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5). Los receptores de muerte también poseen un dominio intracelular en el C-terminal del receptor denominado dominio de muerte (DD).

Se forma un complejo receptor-adaptador-caspasas llamado DISC (death-inducing signaling complex). Las moléculas adaptadoras como FADD (Fas-associated death domain protein) son necesarias para el reclutamiento y activación de las caspasas. Todo ello activará la procaspasa 8, que a su vez puede activar a otros miembros de la familia como las caspasas -3, -6 ó -7, o inducir la fragmentación de un miembro de la familia pro-apoptótica Bcl-2 (BID) que se transloca a la mitocondria y pondría en marcha la otra vía (Hengarter, 2000; Denault y Salvesen, 2008; Taylor y cols, 2008).

El solapamiento y la integración de las dos vías se deben a BID, un miembro proapoptótico de la familia de Bcl-2. La caspasa-8 media la ruptura de BID incrementando enormemente su actividad proapoptótica que resulta en su translocación a la mitocondria donde promueve la liberación del citocromo c. Hay que tener en cuenta que en la mayoría de las condiciones este solapamiento es mínimo y las dos vías operan de manera independiente (Gross, 1999).

Microtúbulos

El citoesqueleto es una estructura tridimensional dinámica que se extiende a través del citoplasma, da estabilidad a la célula e interviene en el movimiento celular. Por los años 60, se identificaron tres sistemas de fibras que se encuentran en el interior del citoplasma: microfilamentos, microtúbulos y filamentos intermedios.

- Los microfilamentos son las fibras más delgadas de 3-6 nm y están formados por la actina.

- Los filamentos intermedios tienen 10 nm de diámetro y provocan una resistencia mecánica a la célula. Según el tipo celular varían sus proteínas constitutivas. Podemos decir que existen seis tipos de filamentos intermedios.
- Los microtúbulos (MTs), componente más importante para nuestro estudio, son tubos cilíndricos de 20 - 25 nm de diámetro y están formados por un heterodímero de α y β tubulina (Figura 11).

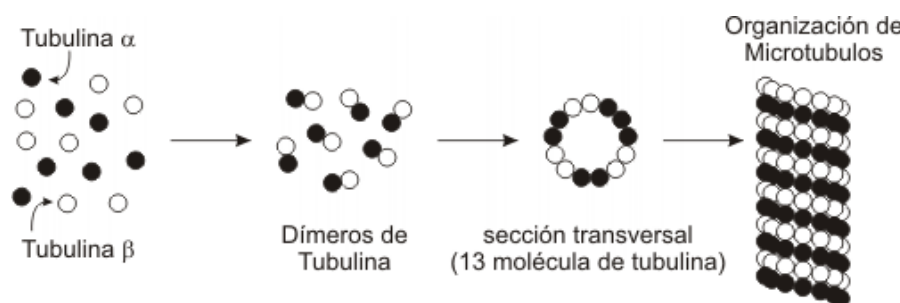


Figura 11. Dímeros de tubulina en la formación de los microtúbulos (MTs).

Ejercen un papel fundamental en la división celular, motilidad celular, transporte celular, movimiento de orgánulos, transporte intracelular de sustancias, señalización celular y en la orientación y segregación de los cromosomas durante la mitosis (Manfredi y Horwitz, 1984). También constituyen la estructura interna de los cilios y flagelos. Cada MT posee una polaridad: un extremo positivo (+) y uno negativo (-). El extremo (+) orientado hacia el cinetocoro y el extremo (-) orientado al lado contrario.

La polimerización de los MTs es un proceso complejo el cual involucra el ensamblaje de las subunidades α β tubulina seguido de una hidrólisis de GTP. Cada subunidad de heterodímero de tubulina está unido a una molécula de GTP. La subunidad α se une al GTP de forma irreversible mientras que la unión con la subunidad β es intercambiable y se hidroliza durante la polimerización. La polimerización de los MTs ocurre a través de 2 etapas: nucleación (crecimiento) y elongación. Inicialmente, en la etapa de nucleación se forma un oligómero de 6 a 12 dímeros de α β tubulina. El GTP se une a los dímeros α β de tubulina y se suman en el núcleo y lleva a cabo la

elongación y la formación de los protofilamentos. Tras una fase rápida de elongación, el ensamblaje de los MTs alcanza la fase estacionaria, donde la suma y la disociación de las subunidades de tubulina se equilibran. Resumiendo, el ensamblaje de los MTs consta de tres fases:

- nucleación: es la formación de pequeños MTs
- elongación: suma de los dímeros individuales de tubulina
- estado estacionario: equilibrio dinámico donde hay una constante suma o pérdida de tubulina del MT

Los MTs se alargan y se acortan mediante la adición y eliminación de subunidades en sus extremos. La alternancia entre polimerización y despolimerización, es lo que se llama inestabilidad dinámica (Sorger y cols, 1997).

V.2. Ciclo celular. Conceptos generales.

El ciclo celular es una secuencia cíclica de las etapas en la vida de las células eucariotas, por la cual pasa de una división a la siguiente. Consta de dos fases principales: la interfase y la fase M.

La interfase, se divide en las fases G_1 , S y G_2 . Esta fase corresponde a la fase de crecimiento celular donde se sintetiza el ADN, se produce el RNA y existen numerosas reacciones bioquímicas necesarias para la división celular. Cuando la célula alcanza la fase G_2 está lista para dividirse y entrar en la fase M (Figura 12).

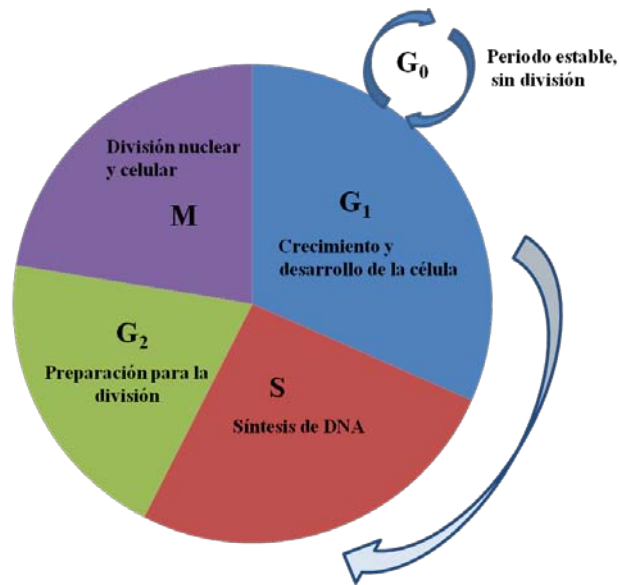


Figura 12. Esquema simplificado de las etapas del ciclo celular de las células eucariotas. Interfase (fase G_1 , S y G_2) y fase M.

La fase M es la fase de división nuclear y celular. Esta fase presenta 6 estadios: los 5 estadios de la mitosis: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase; y la citocinesis, que se detallan a continuación:

- **Profase:** los cromosomas se condensan y se forma el huso mitótico
- **Prometafase:** se desintegra la envoltura nuclear y los MTs del huso se fijan a los cinetocoros
- **Metafase:** los cromosomas se alinean sobre el punto de control del ensamblaje del huso (Figura 14)
- **Anafase:** las cromátidas hermanas se separan y se convierten en cromosomas individuales que migran hacia los polos del huso
- **Telofase:** los cromosomas alcanzan los polos del huso, la envoltura nuclear se forma nuevamente y los cromosomas condensados se relajan
- **Citocinesis:** el citoplasma se divide

De modo general, lo que se produce en que cada estadio se muestra en la siguiente figura (Figura 13):

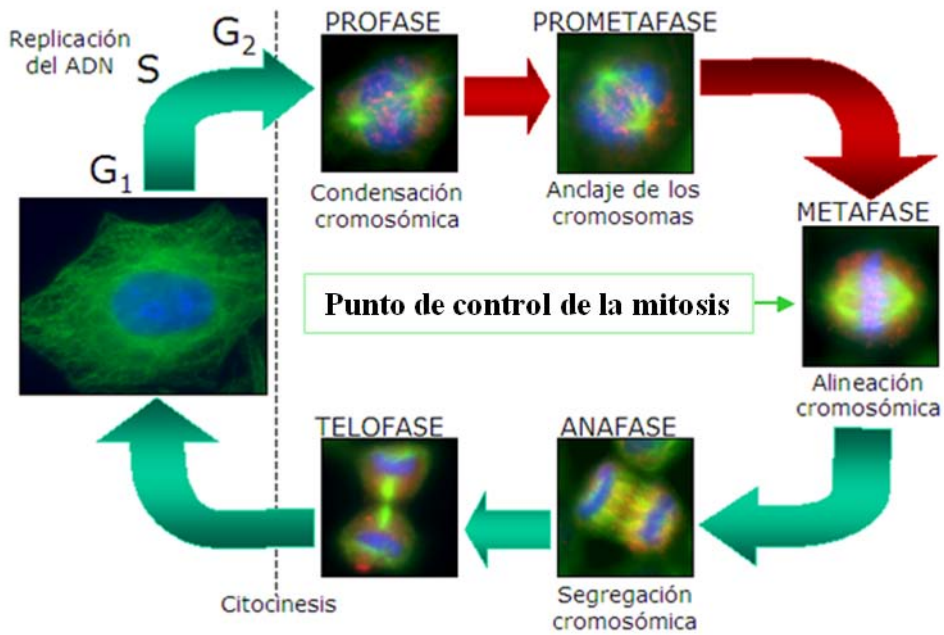


Figura 13. Fases del ciclo celular con los 5 estadios de la mitosis y la citocinesis, con vista a la estructura de los MTs. Los MTs se muestran en verde (formando el huso mitótico), los cromosomas en azul en el ecuador del huso y los cinetocoros en rojo.

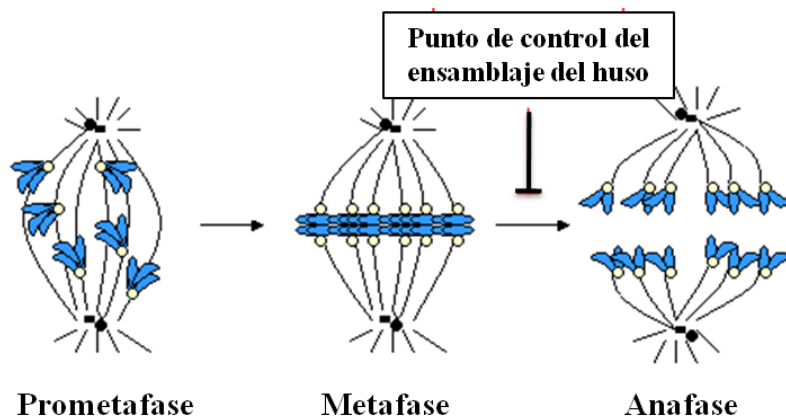


Figura 14. Los tres primeros estadios de la mitosis. Se muestra donde se sitúa el punto de control de la mitosis, el responsable del ensamblaje de los husos de los MTs.

VI. Paclitaxel

VI.1. Origen

El Paclitaxel (PTX) se obtiene de la corteza del Tejo del Pacífico, *Taxus brevifolia* Nutt., familia Taxaceae (Figura 15). Existen varios tipos de tejo, entre los que se incluyen el tejo inglés o el europeo (*Taxus baccata*), el tejo del pacífico (*Taxus brevifolia*) y el tejo japonés (*Taxus cuspidata*). *Taxus brevifolia* es una conífera nativa del noroeste del Pacífico en Norteamérica. Es un árbol perenne de tamaño pequeño a medio, que crece hasta los 10 - 15 metros de alto con un tronco de 50 cm de diámetro. Las hojas son lanceoladas, planas, de color verde oscuro, 1 - 3 cm de largo y 2 - 3 mm de ancho.



Figura 15. Corteza del *Taxus brevifolia*.

El departamento de Agricultura botánica de los EEUU lo recolectó por primera vez en 1962 con el fin de realizar una investigación sobre la actividad anticancerosa usando la línea celular KB; la citotoxicidad que contenía la corteza fue confirmada en 1963 sobre estas mismas células. Su recolección definitiva fue llevada a cabo en 1965 por el Dr. Monroe Wall del RTI (Research Triangle Institute) en el norte de California, y desde ese momento empezaron todos los descubrimientos de este novedoso fármaco antineoplásico, el PTX (Kingston, 2007).

La actividad del tejo *in vivo* en leucemia de ratón fue confirmada en 1966, pero este descubrimiento no fue muy destacado. No obstante, se siguió trabajando en el RTI y no fue hasta 1969 cuando se consiguió aislar el PTX puro con un rendimiento de 0,01 % de la corteza. Este rendimiento obtenido era muy bajo, y nuevos métodos de

extracción mediante cloroformo en columna simple reversa consiguieron aumentarlo hasta 0,04 % (p/p) (Panchagnula, 1998). Hoy en día, se necesita 2 g para el tratamiento quimioterapéutico de un solo paciente, equivalente a un sacrificio de cuatro árboles (Singla y cols, 2002).

En 1971, la estructura del PTX fue publicada por Wall y Wani (Wani y cols, 1971). En 1979, Susan Horwitz descubrió el mecanismo de acción del PTX que promueve la polimerización de los MTs (Schiff y cols, 1979); pero hasta el año 1992 no fue aprobado por la FDA de EEUU para el tratamiento de cáncer de ovario y en 1994 para el tratamiento de cáncer de mama.

El PTX presenta actividad anticancerosa frente a los siguientes tipos de cánceres (Fu y cols, 2009):

- cáncer de ovario /neoplasia maligna de ovario
- cáncer de mama/neoplasia maligna de mama metastásico o no metastásico
- neoplasia maligna de pulmón microcítico metastásico o no metastásico
- Sarcoma de Kaposi
- neoplasia maligna de cabeza y cuello
- neoplasia maligna de esófago
- neoplasia maligna de endometrio
- neoplasia maligna de vejiga
- neoplasia maligna de cérvix
- neoplasia maligna de próstata

VI.2. Formulación del Paclitaxel

El PTX se encuentra formulado y comercializado bajo el nombre de Taxol[®] (Laboratorio Bristol-Myers Squibb, S.L). En dicha formulación, el PTX se encuentra disuelto en una mezcla de Cremophor EL (aceite de castor polietoxilado) y alcohol deshidratado (1:1; v/v). Los viales de Taxol[®] contienen 6 mg de PTX por ml de dicha mezcla. Previa a la administración que tiene lugar por vía intravenosa, se diluye de 5 a 20 veces (Kim y cols, 2001; Singla y cols, 2002). Para ello, se emplea una solución de cloruro de sodio al 0,9 %, o solución de dextrosa al 5 %, o una mezcla de dextrosa 5 %

y solución salina 0,9 %, o solución Ringer para inyección con dextrosa 5 % hasta llegar a una concentración final entre 0,3 y 1,2 mg/ml. Las soluciones preparadas para perfusión permanecen estables durante 27 h a 25 °C y no se deben refrigerar. Como sucede con todos los fármacos citostáticos, se debe manipular con precaución y las diluciones se llevarán a cabo en condiciones de asepsia por personal experimentado y en un área específica.

Para minimizar la exposición al DEHP (dietilhexilfalato) que puede formarse por lixiviación del plástico PVC presente en bolsas, equipos de perfusión o demás instrumentos médicos, las soluciones diluidas deben conservarse en envases no-PVC (vidrio, polipropileno), o bolsas plásticas (polipropileno, poliolefina) y administrarse con un equipo de polietileno (Singla y cols, 2002).

El Cremophor EL (CrEL) es un surfactante no iónico que se obtiene de la reacción del aceite de castor con óxido de etileno en un ratio molar de 1:35. El aceite de castor o aceite de ricino es un aceite incoloro que se obtiene a partir de las semillas del *Ricinus communis*, que presenta un alto contenido en glicéridos del ácido ricinoleico, isoricinoleico, esteárico y dihidroxiesteárico. El CrEL tiene por tanto una composición muy variable presentando una mayor proporción de oxalatos de triglicéridos del ácido ricinoleico (polietilenglicol ricinoleato 35). Se usa como vehículo para solubilizar una gran variedad de fármacos hidrófobos como anestésicos (propofol), antineoplásicos (PTX, teniposido, clafenur), inmunosupresores (ciclosporina A), ansiolítico (diazepam) y fotosensibilizantes (C8KC). La cantidad de CrEL que se administra con estos fármacos se encuentra en el intervalo de 1,5 - 10,3 ml, sin embargo, con el PTX se necesita una cantidad mayor, alrededor de 26 ml, lo cual conlleva graves consecuencias, como son los efectos adversos que se producen a la hora de su administración (Rowinsky y Donehower, 1995; Gelderblom y cols, 2001).

Como efectos adversos, el más importante son las reacciones de hipersensibilidad similares a las del tipo I que aparecen a los 10 min de la administración intravenosa, se acompañan con hipotensión, disnea, urticaria, dolor de pecho. Para evitar tales efectos los pacientes deben recibir una premedicación (Rowinsky y cols, 1990):

- Corticoesteroides: Dexametasona 20 mg vía oral, unas 6 a 12 h antes del tratamiento.
- Antihistamínicos: Difenhidramina 50 mg vía intravenosa, de 30 a 60 min antes del tratamiento.
- Antagonistas H₂: Cimetidina o Ranitidina 300 mg vía intravenosa, de 30 a 60 min antes del tratamiento.

Se han identificado también por parte del CrEL otros efectos secundarios como (Gelderblom y cols, 2001):

- Neurotoxicidad: neuropatía periférica caracterizada con parestesia y entumecimiento. Aunque el desarrollo de síntomas graves no es habitual.
- Trastornos cardíacos como bradicardias, aunque también se ha dado el caso de isquemias, taquicardias ventriculares e infartos de miocardio.
- Hiperlipidemia, agregación de eritrocitos.

Como cualquier fármaco antineoplásico, el PTX también causa algunos efectos secundarios (Rowinsky y Donehower, 1995), que suelen ser efectos comunes a los producidos en una quimioterapia:

- Neutropenia: es la toxicidad limitante de dosis, y se deberá por tanto, realizar recuentos sanguíneos con frecuencia
- Alopecia
- Trastornos gastrointestinales: vómitos y diarreas
- Otros: mucositis, íleo paralítico, mialgias y fotopsias

Otras formulaciones

El mayor obstáculo para una quimioterapia efectiva con el PTX son los efectos tóxicos por el uso de surfactantes y su limitada disponibilidad. Por tanto, su eficacia en quimioterapia está unido al desarrollo de nuevas formulaciones farmacéuticas, ya que es poco soluble en agua y no se absorbe por la barrera G1 por presentar MDR (Kim y cols, 2001). Se han realizado numerosos estudios en nuevas formulaciones farmacéuticas, que incorporan el PTX para evitar el uso del CrEL. Estas nuevas alternativas de dosificación incluyen liposomas, micelas, emulsiones parenterales, conjugados de

albúmina, nanocápsulas, complejos de ciclodextrina. Algunas de estas formulaciones pueden disolver suficiente PTX y mejorar los efectos anti-tumorales en modelos animales (Feng y Huang, 2001; Mu y Feng, 2001).

VI.3. Clínica del Paclitaxel

La dosis más utilizada es de 175 mg/m² en perfusión de 3 horas cada 3 semanas. Después de su administración intravenosa, el PTX presenta una disminución bifásica de sus concentraciones plasmáticas. La farmacocinética se determinó con dosis de 135 mg/m² y 175 mg/m² en dosis continuas de 3 a 24 h. El valor medio estimado del aclaramiento corporal osciló entre 3 a 52,7 h. Mas del 90 % del fármaco se fija a proteínas plasmáticas. El metabolismo hepático y el aclaramiento biliar son las principales vías de eliminación. El fármaco se metaboliza por vía hepática, por las enzimas del citocromo P-450, y menos del 10 % del fármaco se elimina por la orina, siendo la mayoría por heces (Panchagnula, 1998; Singla y cols, 2002).

VI.4. Características química y físicas del Paclitaxel

El PTX es un polvo cristalino, entre el color blanco y el color hueso. Es altamente lipofílico, insoluble en agua y funde a una temperatura de 216-217 °C. Aunque sea poco soluble en medios acuosos, se disuelve bien en disolventes orgánicos. Se puede preparar en concentraciones milimolares de distintos alcoholes, como metanol, etanol y en dimetilsulfóxido (DMSO). A nivel de uso farmacéutico, como carece de grupos funcionales ionizables, no sería posible la manipulación del pH, y por tanto, no se aumentaría su solubilidad, al igual que tampoco daría lugar a la formación de sales (Singla y cols, 2002).

El PTX es un diterpenoide pseudoalcaloide con una fórmula molecular C₄₇H₅₁N₀O₁₄ de peso molecular 853,9 g.mol⁻¹. El nombre según la IUPAC del PTX es el (2 α , 4 α , 5 β , 7 β , 10 β , 13 α) - 4,10-bis (acetiloxi) - benzoato oxi de 13- {(2R, 3S) - 3 (benzoylamino) - 2-hidroxi-3-fenilpropanoil}}-1.7 dihidroxi-9-oxo-5,20-epoxitax-11-en-2-il (Figura 16). Aunque la síntesis química se haya conseguido realizar (Nicolau y cols, 1994 -1995; Holton y cols, 1994), sería difícil a nivel industrial y muy cara llevarla a cabo. Existe un compuesto cada vez más importante para la semi-síntesis, se trata del

10-DAB-III (10-deacetilbaccatin III) que se ha aislado con un alto rendimiento de las agujas del *Taxus baccata* en 1981 y de la corteza del *Taxus brevifolia* en 1982 (Chauvière y cols, 1981).

El factor limitante que existe para la síntesis del PTX es la formación del anillo 1,3-epoxipropano y la cadena ester homoquiral que se encuentra en el C₁₃. Numerosos estudios han demostrado que para mantener la actividad citotóxica es necesario la presencia de la cadena ester y que el anillo de los taxanos quede intacto (Kingston, 1994). Por otro lado, la presencia del grupo hidroxilo libre en la posición 2' de la cadena ester es importante para aumentar tal actividad (Figura 16) (Kingston, 2001; Fu y cols, 2009). Sin embargo, la posición 7-OH no es tan importante para la actividad, puesto que puede ser esterificada, epimerizada o incluso excluida sin pérdida significativa en la actividad. No obstante, existen estudios que muestran que el tamaño del sustituto a esa posición puede influir en la actividad de polimerización (Rao y cols, 1999).

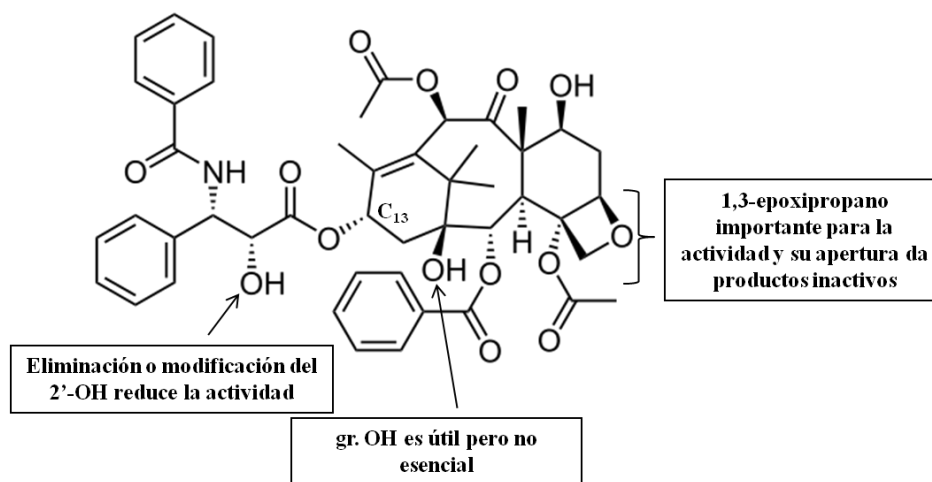


Figura 16. Estructura química del Paclitaxel (PTX). Se señala los grupos funcionales más importantes para la actividad antitumoral.

VI.5. Mecanismo de acción

Los MTs representan un papel importante en la regulación del aparato mitótico, por ello, su interrupción puede inducir a una parada en la fase M del ciclo celular, a la formación de husos mitóticos anormales o finalmente a la conducción de señales

apoptóticas. En estos últimos años, el descubrimiento de la actividad citotóxica de varios compuestos que interfieren en el aparato mitótico ha atraído la atención, y los MTs se han convertido, por tanto, en una diana farmacológica importante para el cáncer. Compuestos anti-microtubulares como la familia de los Taxanos, Paclitaxel (Taxol[®]) y Docetaxel (Taxotere[®]) que estabilizan los MTs y la familia de los alcaloides de la Vinca, Vincristina y Vinblastina, que desestabilizan los MTs; han mostrado su eficacia en las principales neoplasias sólidas (McGrogan y cols, 2008; Cheung y cols, 2009).

Los MTs se encuentran en un estado de equilibrio continuo con sus subunidades, y tras la unión del PTX, de forma específica en los residuos de amino ácidos 217-233 de la subunidad β -tubulina (Panchagnula, 1998; Snyder y cols, 2000; McGrogan y cols, 2008) (Figura 17), se produce una alteración de los MTs, transformándolos en MTs estables y disfuncionales, y por tanto, bloqueando las células en la fase G₂/M del ciclo celular e inhibiendo por tanto la replicación celular (Horwitz, 1992; Jin y cols, 2007).

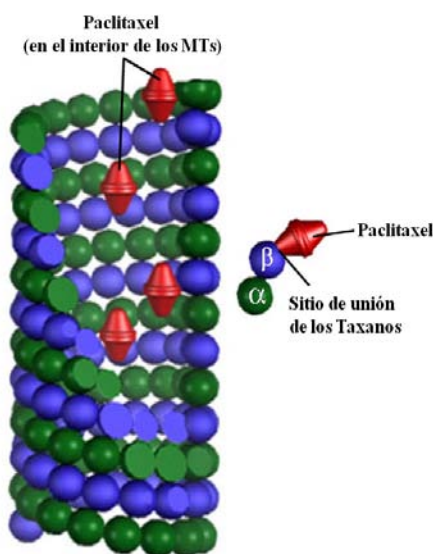


Figura 17. Unión del Paclitaxel con los microtúbulos (MTs). El PTX está unido en la cara interna de los MTs.

En 1993, se propuso la apoptosis como mecanismo de citotoxicidad del PTX en células humanas de leucemia linfoide, siendo confirmado en estudios con otros tipos celulares como células de próstata, de carcinoma de ovario, de cabeza y cuello, de glioma y gástricas. La consiguiente detención en la fase mitótica del ciclo celular ha

sido considerada como una de las formas por la cual el PTX produce citotoxicidad (Wang y cols, 2000). Se ha visto también que inhibe la angiogénesis de los tumores, aumenta la expresión de la TNF- α y aumenta la actividad de la cinasa jun N-terminal (Blajeski y cols, 2001).

En cuanto al mecanismo de acción, existen distintas hipótesis propuestas en diversos estudios, de las cuales algunas se han confirmado y otras siguen en desarrollo. Para poder establecer un mecanismo de acción, hay que tener en cuenta la concentración a la cual se trabaja, que puede ser baja (≤ 200 nM) o alta (hasta 30 μ M o más), y la línea celular en la que se trabaja, ya que algunas pueden ofrecer resistencia al fármaco.

Concentraciones bajas (≤ 200 nM)

A bajas concentraciones, Horwitz y cols (1993) expresaron que el PTX es un potente inhibidor de la replicación celular eucariota, y bloquea las células en la fase G₂/M del ciclo celular. Tras un estudio con células de ovario SKOV-3 tratadas con PTX 1 μ M durante 5 h, observaron la formación de haces estables de MTs. Esto fue confirmado más adelante, sugiriendo que al unirse el PTX con la tubulina, se inhibe la dinámica de los MTs, provocando la despolimerización, pero sin afectar al citoesqueleto (Sorger y cols, 1997; Wang y cols, 2000; Blajeski y cols, 2001; Westedt y cols, 2007).

Diversos estudios han demostrado que bajas concentraciones son suficientes para inhibir la proliferación en las células de carcinoma humano de cérvix, HeLa, estabilizando los husos durante la mitosis, bloqueándola e inhibiendo así la replicación celular, lo que conduce a la apoptosis (Yeung y cols, 1999).

Esta interrupción en los MTs trae como consecuencia una detención del ciclo celular, más exactamente, a nivel del punto de control del ensamblaje del huso. Se trata de una vía de señalización que une el cinetocoro a un sensor, ésta monitoriza una buena conexión entre husos mitóticos y cromosomas a una salida que detiene el ciclo celular; y por tanto provoca una acumulación de células en la fase G₂/M del ciclo celular (Blajeski y cols, 2001; Holstein, 2001). Al bloquear las células en la fase G₂/M del ciclo celular, Yeung y cols (1999), muestran que se induce la fosforilación del Bcl-2 (proteína anti-apoptótica) en células de leucemia, líneas celulares de próstata y líneas celulares de mama por la vía de la c-Raf-1 y de las proteínas cinasas activadas por mitógenos. Se han

identificado numerosos genes que pueden ejercer funciones en el punto de control del huso: MAD2, BUB1, BUB3, PP2A y MAPK. El principio de la apoptosis puede estar también asociado con la activación de p34^{cdc2}, Cdc2 cinasa y otros ciclinas-cinasas dependientes (CDKs) (Figura 18) (Wang y cols, 2000; Henley y cols, 2007; Danhier y cols, 2009). Diversos estudios demuestran que la vía apoptótica del PTX es p53-independiente.

Algunos autores sugieren que el PTX a bajas dosis impone un paro mitótico. Por definición, el paro mitótico suele ser reversible puesto que las células podrán llevarlo a cabo de forma natural para reparar una mitosis que cursa de forma anormal. Existen signos donde las células tratadas con bajas concentraciones de PTX avanzan de la fase M y se acumulan en la fase G₁, pero también se ha dado el caso, donde a 100 nM más del 80 % de células MCF-7 estaban muertas tras 72 h de tratamiento. Por tanto, el término de paro mitótico tendría que ser un fenómeno irreversible ya que avanza inevitablemente hacia la apoptosis; es por tanto preferible usar el término de bloqueo mitótico para describirlo (Henley y cols, 2007).

Si las células no son destinadas a una muerte por apoptosis, existen estudios que demuestran, como define Henley y cols (2007), que las células avanzan en el ciclo celular, superan la mitosis y se acumulan en la fase G₁, con bajos niveles de p34^{cdc2}, dando lugar a cuerpos multinucleados (Sorger y cols, 1997). La relación entre el estado multinucleado y la inducción de la muerte por PTX sigue aun en estudio. Sin embargo, según algunos autores, las células que fallan en la citocinesis y siguen el curso del ciclo, a pesar del paro mitótico provocado por el daño al ADN o el daño a los husos, se dirigen a un estado no-apoptótico conocido como catástrofe mitótica. Las células que se dirigen a tal catástrofe son llamadas multinucleadas y carecen de las características propias de la apoptosis como la degradación del ADN (Sorgers y cols, 1997; Blajeski y cols, 2001). La presencia de cuerpos multinucleados es un indicador de anomalías cromosomales que no son reparadas hasta la finalización de la mitosis, lo que conlleva finalmente a la muerte celular (Figura 18). Esta forma de muerte en mitosis ha sido elegido como efecto del tratamiento del PTX (Michalides y cols, 2002).

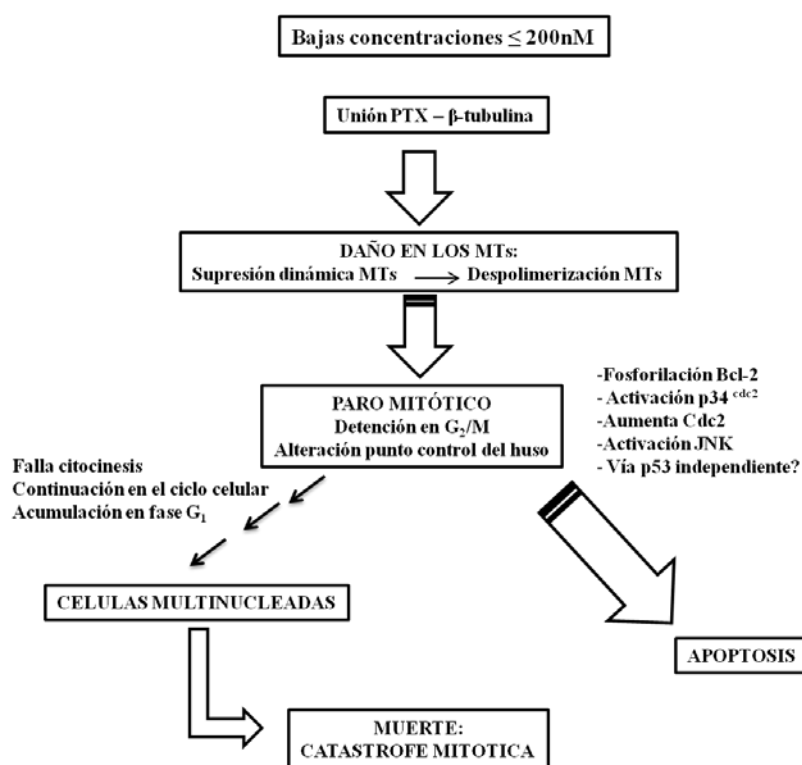


Figura 18. Posibles eventos que llevan a la apoptosis a células tratadas con concentraciones bajas de PTX. El paro mitótico es el principal evento causado a bajas concentraciones puesto que los husos mitóticos son los más sensibles. MTs: microtúbulos.

Concentraciones altas (> 200 nM)

A altas concentraciones, el PTX induce la polimerización de los MTs (Blajeski y cols, 2001). En las células incubadas con concentraciones micromolares de PTX se observa una reorganización de los MTs; que conduce a un daño masivo del huso, una regulación en la expresión de genes, activación de las cinasas como JNK/SAPK, p34^{cdc2} y otros. En esta vía, no tendría que existir paro mitótico puesto que la apoptosis podría ocurrir en cualquier parte del ciclo celular (Wang y cols, 2000). La estabilización de los MTs y por tanto su disfuncionalidad provoca igual que a concentraciones bajas, una detención en la fase G_2/M del ciclo celular y por tanto la inhibición de la división celular (Figura 19) (Rao y cols, 1999).

Este daño masivo, puede terminar en apoptosis p53-independiente sin pasar por tanto, por un estado multinucleado (Sorger y cols, 1997). Otros estudios han demostrado que a concentraciones micromolares, al PTX aumenta la polimerización de los MTs e

inhibe la progresión del ciclo celular hacia la fase S. Esta inhibición es el resultado de una muerte celular por necrosis (Yeung y cols, 1999). Aunque hay que tener en cuenta que la necrosis no es el solo mecanismo de muerte inducido por el PTX, ya que se ha visto que en líneas celulares de mama a concentraciones nanomolares causa apoptosis.

Diversos autores demostraron como el PTX ejerce un efecto necrótico a concentraciones altas, pero el conocimiento del mecanismo está aun en investigación. Hicieron un estudio en línea celular de mama, MCF-7, donde tras un tratamiento de 48 h con 5 mg/ml de PTX, existía una pequeña población de células con el núcleo fragmentado y la presencia de cuerpos apoptóticos; además el ADN no se encontraba fragmentado. Estos signos sugerían entonces que el efecto citotóxico mayoritario del PTX era la muerte por necrosis y en menor parte, por apoptosis (Figura 19) (El-Refaei y cols, 2002). Además, en células de cáncer de cérvix HeLa, trataron con concentraciones micromolares de PTX durante 2 h y observaron la muerte por necrosis en la mayoría de las células (Michalakakis y cols, 2005).

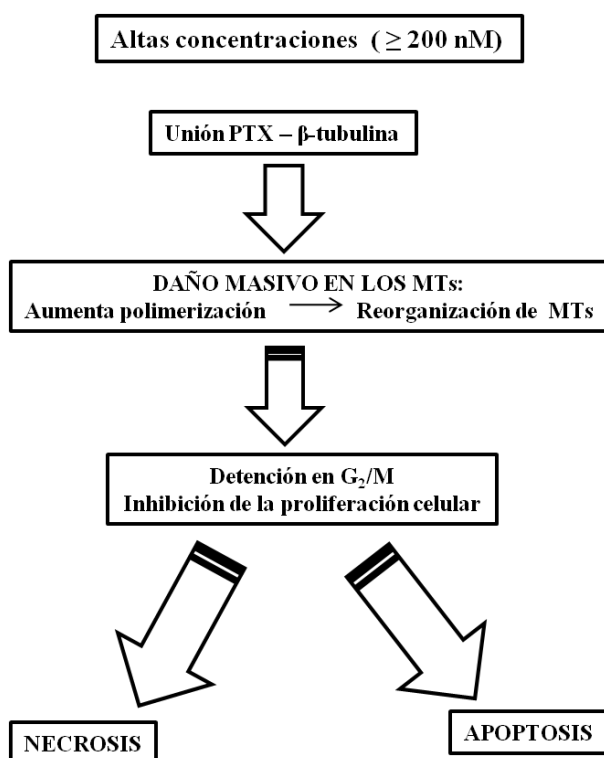


Figura 19. Posibles eventos que llevan a la apoptosis a células tratadas con altas concentraciones de PTX. Existe un daño masivo microtubular como principal evento. Las JNK/SAPK puede actuar con otras ciclinas que siguen en estudio; el paro mitótico no es requerido para estos eventos sugiriendo así que la apoptosis puede ocurrir en cualquier fase del ciclo celular.

MCF-7 como modelo experimental del cáncer de mama

Las líneas celulares de cáncer han sido desde hace décadas de gran importancia para la investigación siendo usadas como excelentes modelos experimentales para mejorar la eficacia de distintas terapias.

En este estudio se ha escogido trabajar con la línea celular de carcinoma humano de mama MCF-7, desarrollada a partir de un derrame pleural de un carcinoma humano de mama por Herbert Soule y cols (1973).

Se caracteriza por su alta presencia de receptores estrogénicos α positivos y por expresar la proteína p53 en su estado normal (wild type gene; wt) (Alkhalaf y EL-Mowafy, 2003). Sin embargo, esta línea celular no expresa la proteína caspasa 3 por una supresión en el par de la base 47 del exón 3 del gen CASP-3 (Jänicke, 2009).

Esta línea celular es escogida para estudios de fármacos antineoplásicos y para estudios sobre el mecanismo de acción de receptores estrogénicos (Farabegoli y cols, 2007), incluso es ampliamente utilizada para el estudio de componentes implicados en la apoptosis. Algunos autores manifiestan que el PTX mata a células con más eficacia si poseen una mutación en la proteína p53 que si poseen el p53wt, y por ello, las células MCF-7 ofrecerían mayor resistencia al PTX (Wang y cols, 2000).

En estudios *in vitro*, se determinó la apoptosis bajo criterio morfológico, donde se observó que las células MCF-7 apoptóticas presentaban fragmentos largos de ADN en mayor proporción que fragmentos cortos; esto podría ser debido a la proteína c-myc, perteneciente a la familia de los protooncogenes. La proteína p53 detiene las células en G₁ o G₂ hasta que el daño del ADN sea reparado. La rotura de las hélices del ADN provocado por el PTX en las MCF-7 conlleva a un aumento de la expresión de p53, que en algunos sistemas está conectado a la apoptosis. De hecho, el PTX ha demostrado aumentar la expresión del p53 en células de melanoma B16 (Henley y cols, 2007).

Se necesitan más estudios para demostrar si la apoptosis inducida en células MCF-7 por el PTX es p53 dependiente o independiente. Aproximadamente un 60 % de las células tratadas con PTX abandonan la fase de la mitosis, no inician la apoptosis y crecen detenidas en las fase G₂/M. Se supone que una parte de las células dentro del ciclo celular llegan a la apoptosis y otra se detiene en la fase G₂/M (Saunders y cols, 1997). Otros estudios, mostraron que a una concentración alta (25 μ M) la mayoría de

las células se paran en la interfase, sin embargo, en las células MCF-7, el núcleo se hincha y el contenido en ADN disminuye con el tiempo, lo que indica necrosis (Yeung y cols, 1999.)

No obstante, es importante destacar que la apoptosis es célula-dependiente, y que los estudios en células MCF-7, puede llevar a variaciones en los resultados entre los distintos laboratorios (El-Refaei y cols, 2002).

El PTX ejerce un efecto distinto según la línea celular y la concentración utilizada, tal son los ejemplos, en células de leucemia humana HL-60, con concentraciones de 20 nM durante 1 h, el PTX induce un bloqueo mitótico reversible sin apoptosis; mientras que con 60 nM durante 1 h o 10 nM durante 12 h, induce apoptosis. En cambio en las células HeLa, se necesita una concentración superior a 8 nM para bloquear la mitosis, y superior a 330 nM para estabilizar la polimerización de los MTs. Sin embargo, en estudios donde el PTX tiene distintas acciones a parte de la detención mitótica, las concentraciones usadas están en el intervalo de 200 nM a 30 μ M (Wang y cols, 2000).

Finalmente, existen estudios *in vitro* donde se ha demostrado que las células cancerígenas pueden volverse resistentes al PTX a través de varios mecanismos (Wang y cols, 2000):

- a. Aumento del flujo de membrana de la Glicoproteína P regulada por el gen MDR-1.
- b. Mutación en los residuos de los amino ácidos de la β -tubulina impidiendo la unión con el PTX
- c. Mutaciones en las caspasas como en las células de cáncer de próstata PC3 o en las MCF-7
- d. Sobregulación de los miembros de la familia antiapoptótica Bcl-2 (Bcl-2 y Bcl-X_L) y/o baja regulación del gen pro-apoptótico Bax.

OBJETIVOS

Los nuevos sistemas de liberación controlada de fármacos se pueden definir como formas de presentación y aplicación de medicamentos, capaces de ceder el principio activo en un punto concreto del organismo a un ritmo y durante un periodo de tiempo predeterminado, con una finalidad de acción sistémica o específica en un órgano.

Los sistemas de liberación controlada deben estar constituidos por materiales biocompatibles con el organismo. En este sentido, los polímeros tienen una amplia aplicación en el desarrollo de estos sistemas. El fin que se desea conseguir con el diseño de nuevos sistemas poliméricos como soportes de fármacos, es lograr, tras su implantación, una liberación del medicamento de una forma sostenida. La velocidad de difusión de los fármacos desde las matrices, junto con su biocompatibilidad son, probablemente, los criterios más importantes a la hora de elegir o desarrollar una determinada matriz. El uso de soportes biodegradables en los que el fármaco se dispersa uniformemente en un material polimérico, que al erosionarse produce la liberación del mismo, ofrecen la ventaja adicional de que posteriormente no existe la necesidad de eliminación quirúrgica. Entre todas las formas de liberación, las nanopartículas presentan ciertas ventajas gracias a su tamaño reducido.

El Paclitaxel, un fármaco antineoplásico, usado en numerosas terapias contra el cáncer, presenta como inconveniente su solubilidad. Al ser un fármaco hidrófobo, su solubilidad se aumenta al diluirlo con una mezcla de Cremophor EL y etanol. Esta mezcla le confiere numerosos efectos adversos como reacciones de hipersensibilidad. Con el fin de poder evitar los efectos adversos a la hora de su administración, causados por el surfactante y también poder mejorar los efectos terapéuticos del fármaco, liberándolo de forma continua y a concentraciones adecuadas, en un lugar de acción determinado, en la presente Tesis Doctoral, se pretende hallar una nueva formulación farmacéutica que sea apta *in vitro* para su futuro estudio *in vivo*.

Por tanto, el **objetivo principal** del presente estudio es el diseño y caracterización de sistemas poliméricos biodegradables para su aplicación a la liberación controlada de Paclitaxel.

Como objetivos específicos se proponen:

1. Optimizar los sistemas nanoparticulados en cuanto a tamaño, morfología, distribución de tamaños, degradación y perfil de liberación *in vitro*.
2. Valorar la internalización celular de las nanopartículas en la línea celular de carcinoma humano de mama MCF-7.
3. Evaluar la citocompatibilidad de las nanopartículas *per se* sobre esta línea celular.
4. Evaluar la acción citotóxica del Paclitaxel encapsulado en las nanopartículas, y analizar su efecto sobre el ciclo celular.

MATERIAL Y MÉTODOS



Reactivos utilizados

Acetonitrilo: Panreac

Agua destilada: Millipore

Agua Mili Q: Millipore

CHAPS (3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato): Sigma-Aldrich

6-Cumarina: Sigma-Aldrich

Diclorometano (DCM): Panreac

DMEM (medio modificado Dulbecco Eagle): Lonza

Dimetilsulfóxido (DMSO): Sigma-Aldrich

EGTA (ácido glicol éter diamino tetraacético): Sigma-Aldrich

Estreptomina (50 µg/ml) / Penicilina (50 U/ml): Gibco Invitrogen

Gentamicina (50 µg/ml): Sigma-Aldrich

Glicerol: Sigma- Aldrich

L-Glutamina 200 mM: Gibco Invitrogen

Kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection: BD PharmingenTM (Biosciences)

β-mercaptoetanol: Sigma-Aldrich

MgCl₂: Merck

MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol): Sigma-Aldrich

NaOH: Panreac

Paclitaxel (PTX) (pureza 99 %): Sigma-Aldrich y Tocris Biosciences

PBS (sin Ca ni Mg): Gibco Invitrogen

Poli (láctico-co-glicólico) (PLGA 50:50 y PLGA 75:25): Sigma-Aldrich

Poli (ϵ -caprolactona) (PCL): Sigma-Aldrich

Polivinil alcohol (PVA): Sigma-Aldrich

RNA-asa A: Roche Farma

Suero Fetal Bovino (FBS): Gibco Invitrogen

Tripsina-EDTA: Invitrogen

TRIS Sigma 7-9[®]: Sigma-Aldrich

Tritón X-100: Bio-Rad

Tween 80: Sigma-Aldrich

Yoduro de Propidio (IP): Sigma-Aldrich

I. Preparación de las nanopartículas

Para la microencapsulación del Paclitaxel se utilizaron los siguientes polímeros:

- Poli (D,L-láctico-co-glicólico) de dos formulaciones: 50:50 y 75:25:

PLGA 50:50 ($M_n = 21700$)

PLGA 75:25 ($M_n = 36100$)

- Poli (ϵ -caprolactona) (PCL) ($M_n = 33400$)

Todos los recipientes que iban a contener el PTX, al tratarse de un fármaco fotosensible, se protegieron de la luz con papel aluminio o se guardaron en recipientes opacos. El disolvente empleado en ambos casos fue el diclorometano (DCM), debido a las buenas propiedades de solubilidad que presentan en él los polímeros y el fármaco, y a su bajo punto de evaporación (39,8 °C).

Se prepararon NPs con y sin PTX por medio de dos técnicas:

- atomización y secado (Spray Dryer)
- extracción y evaporación del disolvente: doble emulsión

I.1. Atomización y secado

Previo a la encapsulación del fármaco, se prepararon partículas sin fármaco para poder establecer los parámetros óptimos del equipo del Spray Dryer (Bain y cols, 1999b; Fu y cols, 2001; Wang y Wang, 2003; Blanco y cols, 2005; Guerrero y cols, 2008).

Para ello, se prepararon un total de nueve síntesis poliméricas, en las que el polímero se disolvió en 50 ml de DCM, modificando distintas variables del sistema, con la finalidad de obtener partículas del menor tamaño posible y con una morfología adecuada.

Se realizaron tres pruebas para cada uno de los polímeros estudiados. En las Tabla 4 a 6, se indican las variables utilizadas en la optimización de los sistemas constituidos por PCL, PLGA 50:50 y PLGA 75:25, respectivamente.

Al acabar la síntesis, se pesó el contenido recogido para conocer el rendimiento y se almacenaron en unos recipientes opacos protegidos de la luz y alejados del calor.

Tabla 4. Parámetros para la optimización del Spray Dryer, en las partículas de PCL sin fármaco.

Parámetros para las NPs de PCL	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3
Temperatura de entrada (°C)	42	42	42
Temperatura de salida (°C)	29	29	29
Flujo de Aire (NI/h)	700	800	800
Bomba (%)	16	16	5
Aspirador (%)	70	70	70
Concentración (% p/v)	1	1	1
Rendimiento (%)	56,32	48	37,20
Tamaño (µm)	0,91	0,75	0,88

Tabla 5. Parámetros para la optimización del Spray Dryer, en las partículas de PLGA 50:50 sin fármaco.

Parámetros para las NPs de PLGA 50:50	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3
Temperatura de entrada (°C)	60	60	60
Temperatura de salida (°C)	42	42	42
Flujo de Aire (NI/h)	700	800	800
Bomba (%)	16	16	5
Aspirador (%)	70	70	70
Concentración (% p/v)	1	2	2
Rendimiento (%)	9,70	16,44	25,95
Tamaño (µm)	0,77	0,74	0,69

Tabla 6. Parámetros para la optimización del Spray Dryer, en las partículas de PLGA 75:25 sin fármaco.

Parámetros para las NPs de PLGA 75:25	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3
Temperatura de entrada (°C)	60	60	60
Temperatura de salida (°C)	42	42	42
Flujo de Aire (NI/h)	700	800	800
Bomba (%)	16	16	5
Aspirador (%)	70	70	70
Concentración (% p/v)	1	2	2
Rendimiento (%)	10,77	36,63	29,46
Tamaño (µm)	0,87	0,75	0,78

En el caso de la PCL (Tabla 4) se seleccionó una concentración polimérica del 1 % (p/v), y se modificaron el flujo de aire del equipo y el porcentaje de la bomba. Otros parámetros del sistema ya habían sido optimizados previamente por nuestro grupo de investigación en anteriores estudios.

En el caso de los PLGA (Tabla 5 y Tabla 6), además de las variables arriba indicadas, también se escogió la concentración polimérica de la disolución.

Se consideró el tamaño de las partículas, su morfología y el rendimiento del sistema a la hora de seleccionar las variables del equipo. Los sistemas seleccionados fueron los siguientes:

- PCL con PTX según los parámetros de la prueba 2
- PLGA 50:50 con PTX según los parámetros de la prueba 3
- PLGA 75:25 con PTX según los parámetros de la prueba 3

Una vez seleccionadas las condiciones de preparación de las NPs, se pasó a incorporar el fármaco, PTX, a una concentración inicial del 1 % (p/v) y se disolvió junto al polímero en una solución de 50 ml de DCM.

I.2. Extracción y evaporación del disolvente (doble emulsión)

Se sintetizaron NPs de PCL, PLGA 50:50 y PLGA 75:25 con y sin fármaco, usando el método de la doble emulsión como muestra la Figura 20 (Kim y cols, 2008). El PTX se encuentra disuelto a una concentración del 5 % (p/v) en la disolución polimérica. Todas las siguientes etapas se realizaron en un baño de hielo para evitar la degradación de los polímeros así como la posible pérdida de actividad del fármaco por el aumento de la temperatura a la hora de sonicar.

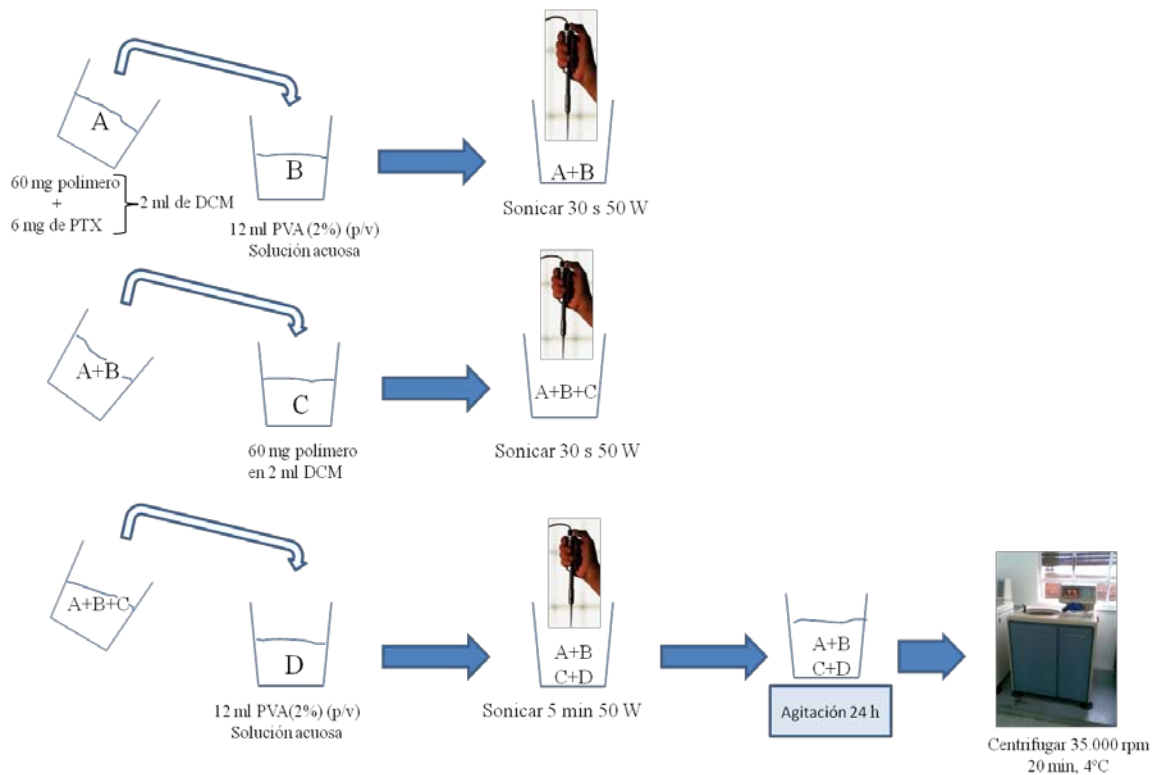


Figura 20. Método de la doble emulsión. Todos los procesos se realizan en baño de hielo.

Se disolvieron 60 mg de polímero y 6 mg de PTX en 2 ml de DCM mediante agitación magnética. Una vez alcanzada la completa disolución, se pipeteó gota a gota

sobre un volumen de 12 ml de PVA al 2 % (p/v) en agua. La mezcla obtenida se sonicó durante 30 segundos a 50 W en el sonicador (Branson 450).

La emulsión resultante se pipeteó gota a gota sobre la disolución de la misma mezcla polimérica (60 mg de polímeros en 2 ml de DCM) para llevar a cabo una nueva emulsión. Después de una nueva sonicación durante 30 segundos a 50 W, la emulsión final se volcó sobre 12 ml de PVA al 2 % (p/v) en agua; finalmente se sonicó durante 5 minutos a 50 W.

La emulsión final se dejó en agitación magnética permanente durante 24 h hasta la evaporación total del DCM. A continuación, se recuperaron las NPs mediante ultracentrifugación a 35.000 rpm durante 20 min a 4 °C (ultracentrífuga Beckman Coulter L-100XP), lavándose dos veces con agua destilada. Finalmente se llevaron las NPs para su secado a una estufa de vacío (Bioblock Scientifics) a 200 mBar y 27 ° C. Posteriormente, se pesó el contenido recogido después de cada síntesis para conocer el rendimiento de la técnica empleada y se almacenó en recipientes opaco y alejados del calor.

II. Caracterización de las nanopartículas

II.1. Morfología y tamaño

Con el fin de analizar la morfología de las NPs, se realizó el mismo procedimiento para ambas técnicas. Se usó el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FEG) (FEG-SEM; Jeol JSM-6330F microscopio electrónico del Centro de Microscopía Electrónica, UCM). Las muestras se fijaron en un soporte adhesivo y se metalizaron previamente antes de su visualización.

Se determinó el tamaño de al menos 250 partículas mediante fotografías obtenidas por el FEG-SEM. Se calculó el diámetro promedio en número (D_n), el diámetro promedio en peso (D_w) y el índice de polidispersidad (U) con las siguientes ecuaciones (Limé e Irgun, 2007):

$$\text{Diámetro promedio en número:} \quad D_n = \frac{\sum N_i D_i}{\sum N_i}$$

$$\text{Diámetro promedio en peso:} \quad D_w = \frac{\sum N_i D_i^4}{\sum N_i D_i^3}$$

$$\text{Índice de polidispersidad:} \quad U = \frac{D_w}{D_n}$$

Donde N_i es el número de partícula medida; D_i diámetro de partícula medida. Se considera la distribución de las partículas monodispersa cuando el índice de polidispersidad se halla comprendido entre 1,0 y 1,1 (Liu y cols, 1997).

II.2. Eficiencia de encapsulación

La cantidad de PTX en las NPs obtenidas por ambas formulaciones fue determinada por triplicado por HPLC (bomba Spectra-Physics SP8800 HPLC, detector de absorbancia SP 100 UV y un programa informático de análisis de datos Chromquest 4.2 (Thermo)). Mediante la siguiente ecuación, se determinó la EE (Eficiencia de Encapsulación):

$$EE (\%) = \frac{\text{cantidad práctica del PTX en las NP}}{\text{cantidad teórica del PTX en las NP}} \times 100$$

Para ello, se disolvieron 3 mg de NPs de PTX en 1 ml de DCM. Se llevó a evaporación a temperatura ambiente, y cuando se evaporó se añadió 1 ml de acetonitrilo-agua (60:40; v/v) agitándose vigorosamente durante 5 min. El fármaco es soluble en esta mezcla, mientras que no lo son los polímeros. La solución se guardó en un vial opaco hasta su lectura en el HPLC (Lee y cols, 1999).

La cuantificación del PTX se realizó por la técnica del HPLC (High Performance Liquid Chromatography, Cromatografía Líquida de Alta Resolución). El

HPLC es un tipo de cromatografía en columna ampliamente utilizada en la actualidad para separar, identificar y cuantificar los componentes de una mezcla en función de la polaridad y las interacciones establecidas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. Las condiciones de elución del PTX en el HPLC consistieron en una fase estacionaria con una columna de Spherisorb ODS2, C₁₈, 5 µm (25 x 0,46 cm; Waters); una fase móvil de una mezcla de acetonitrilo y agua (60:40; v/v). El flujo se estableció a 1,3 ml/min y la longitud de onda de lectura fue de 227 nm. Se inyectó 20 µl de muestra.

La validación y reproducibilidad del método por HPLC fue valorada por medio del coeficiente de variación (CV) intradía e interdía. Para que el método sea válido el CV de las distintas concentraciones ha de ser inferior a 12 % o 15 %.

Para el CV intradía se prepararon tres disoluciones de PTX en acetonitrilo /agua (60:40, v/v) a las siguientes concentraciones: 500 ng/ml, 2.500 ng/ml y 10.000 ng/ml que se inyectaron por triplicado en el mismo día. Para el CV interdía, se prepararon las mismas concentraciones de PTX (500 ng/ml, 2.500 ng/ml y 10.000 ng/ml), que se inyectaron en días alternos por triplicado (Tabla 7). Se obtuvo un CV medio intradía de $2,46 \pm 0,34$ %; y un CV medio interdía de $4,76 \pm 0,91$ %.

Tabla 7. Valores de los coeficientes de variación (CV) interdía e intradía obtenidos, necesarios para la validación del método de HPLC.

Concentración (ng/ml)	CV INTRADIA (%)	CV INTERDIA (%)
500	2,90	6,37
2.500	1,78	4,68
10.000	2,70	3,24
MEDIA	$2,46 \pm 0,34$	$4,76 \pm 0,91$

Para cuantificar las concentraciones de PTX de las muestras problema, se realizó una curva de calibrado del PTX con concentraciones de 25 a 50.000 ng/ml en acetonitrilo-agua (60:40; v/v) con un coeficiente de correlación de $r^2 = 0,999$ (Figura 21). El tiempo de retención del PTX se situó a $7,9 \pm 0,1$ min a 27 °C (Figura 22).

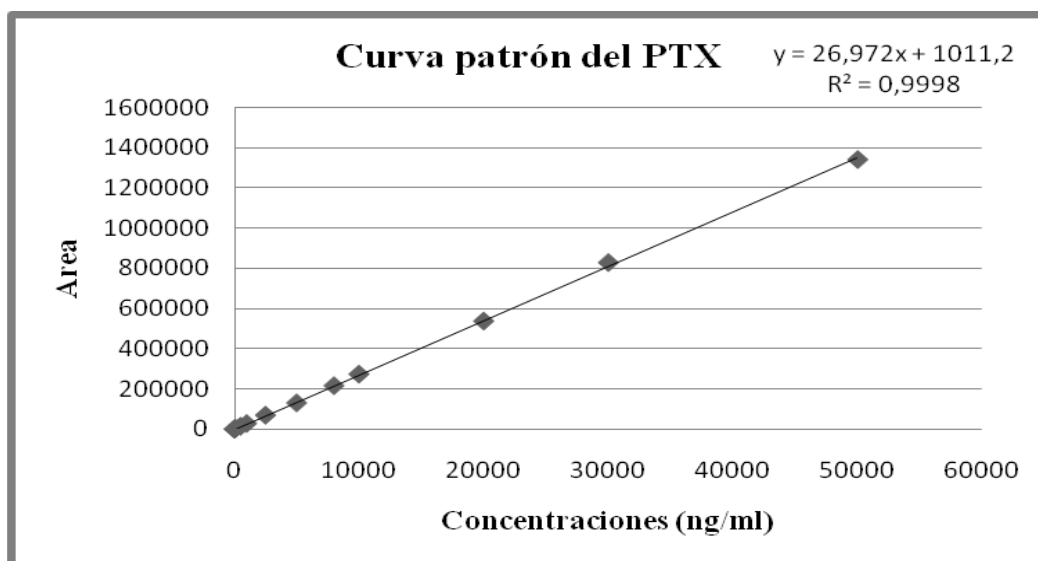


Figura 21. Curva de calibrado del Paclitaxel. Concentraciones de 25 a 50.000 ng/ml en acetonitrilo-agua (60:40; v/v) con un coeficiente de correlación de $r^2 = 0,999$.

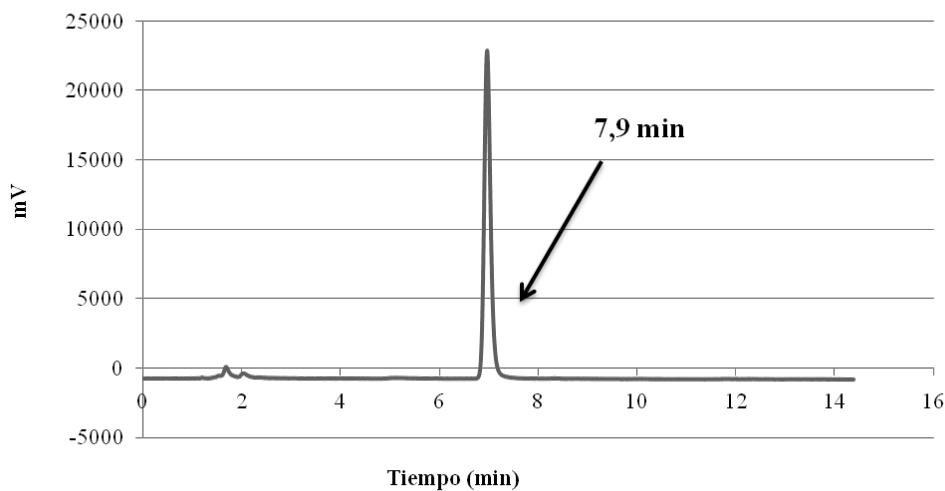


Figura 22. Cromatograma del PTX obtenido por HPLC; a una concentración conocida de 8.000 ng/ml y con un tiempo de retención de 7,9 min a 27 °C.

II.3. Termogravimetría

La termogravimetría (TGA) es una de las técnicas más utilizadas dentro del campo del análisis térmico, ya que permite obtener información sobre el contenido de cenizas y la humedad de la muestra de una forma rápida y sencilla (Soares y cols, 2004).

Mediante esta técnica se registra la variación de masa que sufre una muestra al someterla a un cambio de temperatura durante un tiempo determinado y bajo una atmósfera controlada. Esta variación puede consistir en una pérdida o ganancia de masa en función de la descomposición de la muestra o la interacción con otros componentes. La medida del cambio de masa de una muestra respecto a la variación de temperatura se lleva a cabo en una termobalanza y nos da información sobre el intervalo de estabilidad térmica de los materiales. Asimismo, la termogravimetría puede ser útil en la caracterización de las condiciones responsables de la oxidación de metales o degradación de polímeros, mediante el uso de una atmósfera de aire u oxígeno. Todo ello convierte a dicha técnica en una forma sencilla y potencialmente útil en la identificación de materiales y la creación de bases de datos.

Para ambas formulaciones se utilizó el mismo procedimiento con el fin de caracterizar la estabilidad térmica de las partículas sintetizadas. Se obtuvieron las curvas de la TGA del PTX y de las NPs con y sin fármaco usando un termo-analizador Mettler Toledo (Figura 23). El peso de las muestras fue de alrededor de 1,5 mg. Las muestras se situaron en una balanza y la temperatura fue incrementando de 25 °C a 600 °C a una velocidad de 10 °C min⁻¹ bajo una atmósfera de nitrógeno (velocidad de 60 cm³ min⁻¹). A partir de las curvas de pérdida de masa se determinó la primera derivada (DTG), cuya variación respecto a la temperatura permitió cuantificar el porcentaje de pérdida de masa de cada evento y la temperatura a la que se produce.



Figura 23. Fotografía de un termo-analizador para llevar a cabo el estudio termogravimétrico.

II.4. Liberación *in vitro*

Para poder realizar el ensayo de liberación *in vitro* en un medio acuoso como es el PBS se tuvieron en cuenta las condiciones “sink” (Zhang y cols, 2008). Considerando que la solubilidad acuosa del PTX es de 0,34 $\mu\text{g/ml}$ a 37°C (Bouquet y cols, 2007) y la solubilidad del PTX en el medio de liberación (PBS, pH = 7,4) aumenta hasta 6,32 $\mu\text{g/ml}$ al añadir 0,1 % de Tween 80 (Yang y cols, 2007). En todo el ensayo experimental de liberación se mantuvieron las condiciones “sink”, ya que la máxima concentración de PTX en el medio es menor o igual al 10 % de su solubilidad en el mismo.

La liberación *in vitro* del PTX se realizó por triplicado durante un tiempo de 35 días (841 h) y se midió por HPLC (Figura 24). Para ello, se pesaron NP - PTX (10 mg de NPs Spray y 4 mg de NPs emulsión) que fueron suspendidas en un medio de liberación de PBS (buffer de fosfato, pH=7,4) con Tween 80 al 0,01 % en tubos de polipropileno o tubos de centrifuga Beckman (10 ml para NPs Spray y 4 ml para NPs emulsión) Los tubos se colocaron en un agitador horizontal (Ecotron®, Infors AG CH-4103) a 37 °C, a una velocidad de 120 min^{-1} (Zhang y cols, 2008).

A determinados intervalos de tiempo comprendidos entre 0 h y 841 h, los tubos se centrifugaron a 11.000 rpm durante 15 min en frío en el caso de las NPs obtenidas por Spray Dryer, y a 40.000 rpm durante 20 min en frío en el caso de las obtenidas por doble emulsión. El pellet se resuspendió en el mismo volumen inicial de PBS/Tween 80 al 0,1 % y se volvieron a colocar en el agitador horizontal.

El sobrenadante se recogió para el análisis del PTX, para ello, se realizó un protocolo de extracción (Figura 24). Se añadió al medio 1 ml de DCM y se agitó en el vortex durante 5 min. Después, se recogió la fase orgánica y se llevó a evaporación a temperatura ambiente. La solución final se mezcló con 1 ml de acetonitrilo-agua (60:40, v/v) y se guardó para su lectura en el HPLC.

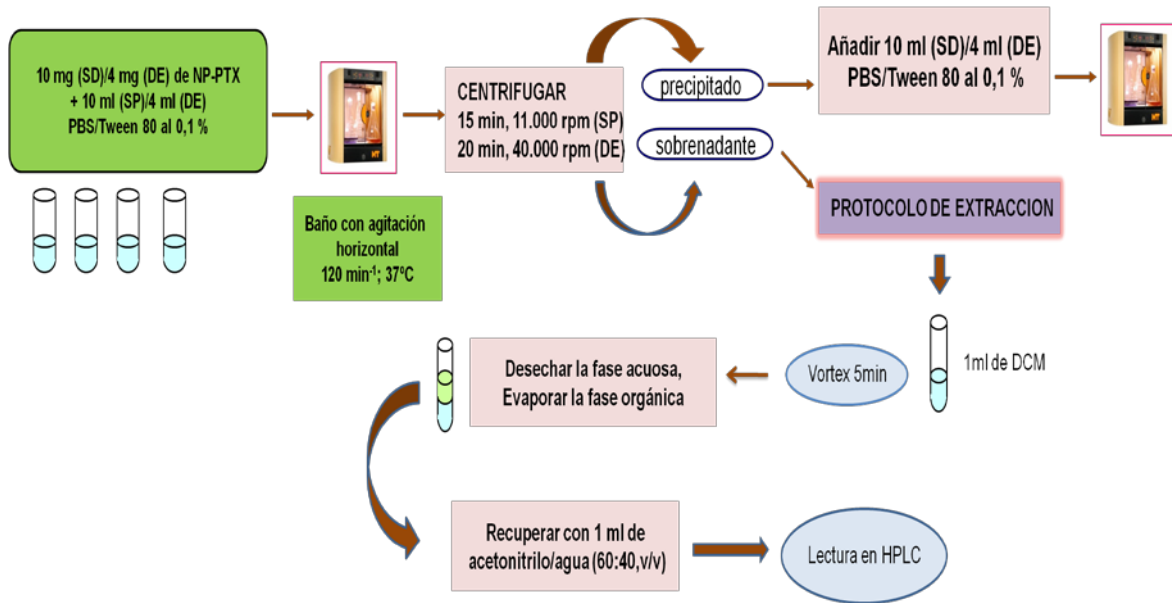


Figura 24. Protocolo seguido para cuantificar la liberación *in vitro* de PTX desde las NPs. SD: Spray Dryer, DE: doble emulsión.

Se determinó el factor de extracción (FE) para cada formulación obtenida. Para el FE de las NPs obtenidas por Spray Dryer, se prepararon concentraciones conocidas de PTX (500 ng/ml a 20.000 ng/ml) en un volumen de 10 ml del medio de liberación (PBS/Tween 80 al 0,1 %); a los cuales se le añadió 1 ml de DCM y se sometió al proceso de extracción descrito anteriormente. Se concluyó que el proceso de extracción recoge un 36 ± 9 % de la cantidad original de PTX.

Para las NPs obtenidas por doble emulsión, se procedió del mismo modo que con las NPs obtenidas por Spray Dryer, es decir se prepararon concentraciones conocidas de PTX (500 ng/ml a 20.000 ng/ml) en un volumen de 4 ml del medio de liberación, a los cuales se le añadió 1 ml de DCM y se sometió al protocolo de extracción descrito anteriormente. Se obtuvo un FE de $68,21 \pm 6,62$ %.

II.5. Cinética y modelos matemáticos

Se ha evaluado si la cinética de liberación determinada experimentalmente se ajusta a alguno de los siguientes modelos (Blanco y cols, 2008):

$$\text{Higuchi: } M_t = K_1 \times t^{1/2}$$

$$\text{Korsmeyer-Peppas: } M_t/M_\infty = K \times t^n$$

$$\text{Hopfenberg: } M_t/M_\infty = 1 - (1 - K_0 t/C_0 a)^n$$

Para todas las ecuaciones, M_t es la cantidad fármaco liberado a un tiempo t y M_∞ es la cantidad de fármaco liberado a tiempo infinito. En la ecuación de Korsmeyer-Peppas, K es la constante cinética y n es el exponente difusional. En la de Hopfenberg, C_0 es la concentración de fármaco inicial, a es el radio inicial para una esfera o cilindro o bloque geométrico; K_0 es la constante de erosión y n es el factor correspondiente a la forma, si es esférica $n=3$, cilíndrico $n=2$ o algún bloque geométrico $n=1$ (Ei-Arini y Leuenberger, 1995; Siepman y Siepman, 2008).

III. Ensayos *in vitro* en la línea celular MCF-7

Se utilizaron líneas celulares de carcinoma humano de mama MCF-7, que una vez descongeladas, fueron cultivadas en frascos de 75 cc con medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con glucosa (4,5 g/l), Glutamax (4 mM) y Piruvato (1 mM), suplementado con 10 % de FBS (Suero Fetal Bovino) y antibióticos: 1 % de Estreptomicina/Penicilina y 0,1 % de Gentamicina (50 µg/ml).

El PTX fue disuelto en DMSO, solución madre de 1 mg/ml, y luego disuelto en el medio correspondiente al 1% de FBS preparándose las concentraciones requeridas de 0 a 60 µM.

III.1. Internalización celular de las nanopartículas

III.1.1. Estudios de fluorescencia

La obtención de partículas con polímeros biodegradables se encuentra en numerosos estudios para la aplicación terapéutica (fármacos, vacunas...); por este motivo, se realizan numerosos estudios para que las partículas obtenidas sean funcionales. No obstante, es importante evaluar la internalización, distribución de las

partículas en las células y en los tejidos, y su biodistribución *in vivo* (Panyam y Labhasetwar, 2003a).

Para poder realizar los estudios correspondientes a la internalización de las NPs, se utilizó la 6-cumarina, un fluorescente lipofílico y biocompatible, que se incorporó en las NPs como marcaje fluorescente. La 6-cumarina, un polvo cristalino de color rojo, es en estos casos el fluorescente más utilizado en los marcajes de internalización celular. Presenta una alta fluorescencia y sólo es necesario una baja inclusión en la partícula (< 0,5 %; p/p). Además de todas estas ventajas, la 6-cumarina, por su alta solubilidad lipídica, puede ser extraída de células lisadas y de muestras de tejido usando disolventes orgánicos, como el metanol o el acetato de etilo con una eficacia de extracción del 95 % y puede ser por tanto cuantificada por HPLC (Panyam y Labhasetwar, 2003a).

La 6-cumarina fue incorporada a las NPs usando la técnica de la doble emulsión, ya que esta técnica presenta la ventaja de obtener partículas de tamaño pequeño frente a las que se obtienen por Spray Dryer.

III.1.1.a. Preparación de las nanopartículas con 6-cumarina

Se prepararon las NPs incorporando el compuesto fluorescente la 6-cumarina, por la técnica de doble emulsión (Figura 20). La 6-cumarina se preparó en una concentración de 1 µg/µl de un stock inicial de 1 mg/ml en DCM. Por tanto, se prepararon NPs de PCL, PLGA 50:50 y PLGA 75:25 con y sin 6-cumarina (Davda y Labhasetwar, 2002; Kim y cols, 2008).

III.1.1.b. Estudio cualitativo

Para evaluar cualitativamente la incorporación de las NPs en las células MCF-7 se realizó el siguiente ensayo (Zhang y Feng, 2006; Vicari y cols, 2008; Zhang y cols, 2008; Mei y cols, 2009):

En placas de 24 pocillos, se sembraron 50.000 células por pocillo. Se trataron con 1 ml a una concentración de 500 µg/ml de disoluciones de NPs con y sin 6-cumarina. De igual modo, se trataron con una solución de 6-cumarina a una

concentración de 100 µg/ml y 500 µg/ml. Todas las disoluciones utilizadas se realizaron a partir de un stock de 2 mg/ml en medio de cultivo al 1 % de FBS.

Tras el tiempo de incubación de 2 y 24 horas, se lavaron los pocillos con PBS para quitar cualquier rastro de NP que se hubiese quedado en suspensión. Se fijaron las células goteando etanol frío al 70 % y se mantuvo durante 30 min en la nevera. Se limpiaron 3 veces los pocillos con PBS, y finalmente se observó por el microscopio de fluorescencia (Leica DMIL microscopio, Leica Microsystems, Suiza).

III.1.1.c. Estudio cuantitativo

Con el fin de conocer el porcentaje de incorporación de las NPs a los tiempos de incubación elegidos (2 h y 24 h) se procedió a realizar el siguiente ensayo cuantitativo. Se midió la intensidad de fluorescencia en cada pocillo de las células lisadas con un lector de placas y de esta forma se evaluó el porcentaje correspondiente a la cantidad de NPs incorporadas en las células, basándose en una recta patrón de la 6-cumarina (Zhang y Feng, 2006; Zhang y cols, 2008; Mei y cols, 2009).

Para ello, se sembraron 15.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Se trataron con un volumen de 100 µl de NPs con y sin 6-cumarina y de 6-cumarina en disolución, a concentración de 100 µg/ml y 500 µg/ml, a partir de un stock de 2 mg/ml, a dos tiempos de incubación: 2 h y 24 h.

Se dejó incubar el tiempo respectivo, y se lavó con 50 µl de PBS frío para quitar cualquier tipo de NP que pudiese haberse quedado en el medio. Se aspiró el PBS y se añadió 50 µl de 0,5 % Triton X-100 en 0,2 N de NaOH para lisar las células y poder medirlas. Se procedió a la lectura por fluorimetría en el lector de placas (Varioskan, Thermo Fisher Scientific, Barcelona, España) con $\lambda_{exc} = 430$ nm y $\lambda_{em} = 485$ nm. Se representa la fluorescencia de las NPs respecto al valor de la fluorescencia que emite la disolución (100 %).

Para realizar la curva patrón de cada NP, en una placa de 96 pocillos se colocó 50 µl de NP con 6-cumarina con las siguientes concentraciones: 50 µg/ml, 100 µg/ml, 300 µg/ml y 500 µg/ml, disueltas en medio de lisis y en medio de cultivo al 1 % de FBS, dejándolo incubar a los mismos tiempos que en los ensayo cuantitativos y cualitativos (2 h y 24 h). Se procedió a la lectura en el lector de placas con $\lambda_{exc} = 430$

nm y $\lambda_{em} = 485$ nm. La ecuación de la recta obtenida se utilizó para extrapolar los resultados obtenidos con los de las células.

III.2. Ensayo de viabilidad celular

El efecto citotóxico del fármaco en disolución y de las NPs con y sin fármaco, fue valorado por el método del MTT (Mosmann 1983). Se trata de un ensayo colorimétrico basado en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (de color amarillo) por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Para ello, las células se sembraron en placas de 96 pocillos con una densidad celular de 10.000 célula/pocillo; se trataron con distintas concentraciones de PTX en disolución (3 μ M; 5 μ M; 10 μ M; 20 μ M; 30 μ M; 40 μ M; 50 μ M y 60 μ M) a distintos intervalos de tiempo (24 h, 48 h, 72 h y 96 h) (Thomadaki y cols, 2006).

Una vez eliminado el contenido con el tratamiento, se añadió 100 μ l a cada pocillo de una disolución de MTT al 20 % (2 mg MTT/ml PBS) disuelto en el medio de cultivo al 1 % de FBS. Tras incubar a 37°C durante 1 hora se eliminó el sobrenadante y se añadió 100 μ L de DMSO para disolver los cristales de formazán.

La formación de este compuesto azul se midió inmediatamente en un lector de placas (DigiScan, Asys Hitech GmbH) a una longitud de onda de $\lambda = 550$ nm. Los resultados están expresados como el porcentaje de viabilidad celular con respecto a la media de absorbancia de los pocillos con células control (no tratadas) que se considera el 100 % de viabilidad. La viabilidad celular se determinó por tanto según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{A_p}{A_c} \times 100$$

Siendo A_p la media aritmética de la absorbancia de la muestra problema y A_c la media aritmética de la absorbancia del control.

Una vez estudiada la viabilidad con el PTX en disolución, se escogieron las concentraciones más adecuadas con el fin de poder compararlas con las NPs obtenidas. Se realizó la viabilidad con las NPs con y sin fármaco a las concentraciones de 30 μ M, 40 μ M, 50 μ M y 60 μ M y a los mismos tiempos de incubación que en el caso anterior (24 h, 48 h, 72 h y 96 h).

Viabilidad celular con las NPs obtenidas por atomización y secado

Teniendo en cuenta la cantidad de PTX encapsulado en las NPs, la cantidad de NPs con y sin fármaco que se añadió en el medio de cultivo al 1 % de FBS fue desde 2,80 mg/ml a 6,60 mg/ml, todas ellas equivalentes a las concentraciones de 30 μ M a 60 μ M como muestra la Tabla 8. Los tiempos de incubación fueron 24 h, 48 h, 72 h y 96 h.

Tabla 8. Concentración de las NPs obtenidas por Spray Dryer. Se calculó la masa necesaria de NPs considerando el valor de la carga de encapsulación, para obtener la concentración necesaria para los ensayos *in vitro*.

	PCL - PTX	PLGA 50:50 - PTX	PLGA 75:25 - PTX
30 μ M	2,86 mg/ml	2,80 mg/ml	3,25 mg/ml
40 μ M	3,82 mg/ml	3,73 mg/ml	4,43 mg/ml
50 μ M	4,77 mg/ml	4,64 mg/ml	5,52 mg/ml
60 μ M	5,72 mg/ml	5,63 mg/ml	6,60 mg/ml

Viabilidad celular con las NPs obtenidas por doble emulsión

Para llevar a cabo el ensayo del MTT con las NPs obtenidas por el método de la doble emulsión, se disolvieron las NPs en el medio de cultivo al 1 % de FBS, y se sonicaron antes de incorporarlo a las células para que quedase homogéneo.

Teniendo en cuenta la cantidad de PTX encapsulado en las NPs, la cantidad de NPs con y sin fármaco que se añadió en el medio de cultivo al 1 % de FBS fue desde 0,63 mg/ml a 2,32 mg/ml, todas ellas equivalentes a las concentraciones de 30 μ M a 60 μ M como muestra la Tabla 9. Los tiempos de incubación fueron 24 h, 48 h, 72 h y 96 h.

Tabla 9. Concentración de las NPs obtenidas por doble emulsión. Se calculó la masa necesaria de NPs considerando el valor de la carga de encapsulación, para obtener la concentración necesaria para los ensayos *in vitro*.

	PCL - PTX	PLGA 50:50 - PTX	PLGA 75:25 - PTX
30 μ M	1,16 mg/ml	0,63 mg/ml	1,11 mg/ml
40 μ M	1,55 mg/ml	0,84 mg/ml	1,48 mg/ml
50 μ M	1,93 mg/ml	1,05 mg/ml	1,85 mg/ml
60 μ M	2,32 mg/ml	1,25 mg/ml	2,21 mg/ml

III.3. Estudio de la muerte celular

III.3.1. Morfología celular

Para observar los cambios morfológicos de las células MCF-7 provocados por el efecto del PTX en disolución, las NPs con y sin PTX, se llevó a cabo el siguiente experimento.

Se trataron las células MCF-7 en Placas de Petri con PTX en disolución y con las NPs con y sin fármaco a dos concentraciones elevadas, 40 μ M y 50 μ M durante 24 h. Tras este tiempo se realizaron una serie de fotografías con el microscopio óptico (Nikon TMS) (Jin y cols, 2007).

III.3.2. Estudio de la apoptosis con Anexina V- FITC y Yoduro de Propidio

La muerte celular es un proceso necesario para mantener la homeostasis de la célula. Existen dos procesos que llevan a la célula a una muerte celular: la apoptosis y la necrosis (Liao y Lieu, 2005)

Cuando la célula muere por apoptosis se producen numerosos procesos como por ejemplo, la translocación de la fosfatidilserina (FS) en la membrana citoplasmática en la cara externa, o la activación de la familia de las caspasas. En cambio, en la muerte celular por necrosis, se produce la dilatación de la mitocondria, el hinchamiento de la célula, el aumento de la permeabilidad de la membrana y el trastorno en la membrana plasmática.

La Anexina-V es una proteína que se une específicamente a los fosfolípidos cargados negativamente como es la FS, la cual se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática. El Yoduro de Propidio (IP) es un colorante que se intercala entre los ácidos nucleicos de la cadena de ADN y ARN. Su utilización para la determinación del contenido de ADN requiere el uso de RNA-asa. Para la unión de la proteína con el fosfolípido se requiere la presencia de calcio, por lo que es necesaria la preparación de un Binding Buffer (BB) donde se mantendrá la suspensión celular.

La FS en presencia de calcio atrapa a la anexina haciendo que la célula emita una fluorescencia verde, que serán las células que hayan cursado por apoptosis; mientras que las células que emitan una fluorescencia roja debido al IP serán consideradas como necróticas, ya que el IP, al igual que el bromuro de etidio, puede atravesar la membrana citoplasmática fragmentada interactuando directamente con el DNA. La fluorescencia emitida por las células puede ser medida por citometría de flujo o mediante el uso de microscopía de fluorescencia. Por lo tanto, la combinación de Anexina V-FITC e IP hace posible la detección de las células vivas, las células en apoptosis (temprana y tardía) y las células en necrosis (Tabla 10) (Vermes y cols, 1995; Del Bino y cols, 1999).

Tabla 10. Representación cualitativa de la presencia de células vivas, apoptóticas y necróticas con la doble tinción: Anexina V-FITC e IP.

	Células vivas	Células en apoptosis	Células en necrosis
Anexina V - FITC	-	+	-
Yoduro de Propidio	-	-	+

En un primer momento, se valoró el PTX en disolución a concentraciones de 3 μM , 10 μM , 20 μM y 50 μM . Para ello, se sembraron 1.000.000 cel/pocillo en placas de 6 pocillos. A las 24 h de la siembra, se trataron con las concentraciones del PTX en disolución durante 24 h. Las células se recogieron por tripsinización y se centrifugaron en frío a 1000 rpm, 15 min. Se eliminó el sobrenadante y se lavó con PBS frío. Se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Se eliminó de nuevo el sobrenadante y se metieron los tubos en hielo donde se resuspendieron con 1 ml de BB. De este ml se cogió 100 μl y se llevó a un tubo de citómetro. Finalmente, se añadió 5 μl de Anexina V-FITC y 5 μl de IP del Kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit. Se incubó 15 min en oscuridad. Se añadió 200 μl de PBS y se llevó al citómetro de flujo para analizar (Becton Dickinson FACScan, Centro de microscopía y Citometría, UCM). Se valoró un mínimo de 10.000 células por muestra.

Tras valorar los resultados obtenidos, se escogió la concentración de 50 μM . Se trataron las células con las NPs con y sin PTX de ambas formulaciones a esa concentración a un tiempo de incubación de 24 h, con el mismo procedimiento descrito anteriormente.

III.3.3. Análisis del ciclo celular

Dado que el PTX es un antineoplásico que interfiere en la función del huso mitótico y por tanto detiene la división celular en la fase G_2/M del ciclo celular, se valoró la eficacia del PTX en disolución, y del PTX incorporado en las NPs de ambas formulaciones por citómetro de flujo y así cuantificar el número de células que se detienen en la fase G_2/M (Liao y Lieu, 2005; Henley y cols, 2007; Jin y cols, 2009).

Para ello, se sembraron en placas de 6 pocillos con una densidad de 1.000.000 de células por pocillo. Con un tiempo de incubación de 24 h, se trataron las células con PTX en disolución a concentraciones de 10 μ M, 30 μ M y 50 μ M; y con las NPs con y sin PTX a 50 μ M. Se levantaron las células por tripsinización y se llevaron a tubos de citómetro. Se centrifugó en frío, a 1000 rpm, 5 min. Se aspiró el sobrenadante, y se lavó con PBS frío. Se fijaron las células añadiendo etanol frío al 70 % gota a gota en agitación. Posteriormente, se dejaron en agitación en la nevera durante 45 min, y se lavó bien con PBS frío para eliminar cualquier rastro de etanol. Se resuspendió en 500 μ l de PBS atemperado. Se añadió 5 μ l de RNA-asa de un stock de 10 mg/ml y se dejó incubar durante 30 min a 37°C en oscuridad. Finalmente, antes de llevarlo a analizar al citómetro de flujo, se añadió en la oscuridad 25 μ l de IP de un stock de 0,1 % PBS.

IV. Análisis estadístico

Los valores presentados se han expresados como media \pm error estándar de la media (S.E.M) de los resultados obtenidos en los ensayos, valorado por triplicado de un número variable de experimentos que se especifica en cada caso. Todos los análisis estadísticos realizados en este estudio se efectuaron con el programa estadístico StatView. Las comparaciones se efectuaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA). Se consideró que la diferencia entre los grupos tratados y el control es significativa (*) cuando el valor $p < 0,05$; muy significativa (**) cuando $p < 0,001$. En el caso que la diferencia respecto al grupo control no sea significativa no se emplea ningún símbolo indicativo.

RESULTADOS

I. Caracterización de las nanopartículas

I.1. Estudios morfológicos

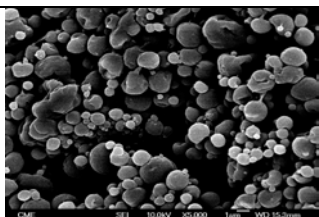
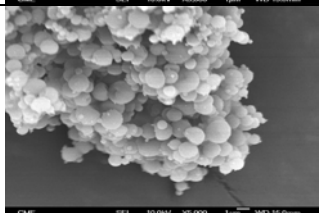
I.1.1. Nanopartículas obtenidas por atomización y secado

De las síntesis realizadas, se obtuvieron las correspondientes fotografías por microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FEG-SEM) que nos permitieron evaluar las morfologías de las partículas, así como su tamaño y polidispersidad de tamaños.

Las primeras síntesis se realizaron con el fin de optimizar el proceso de atomización y secado, y poder hallar los parámetros más idóneos para sintetizar las partículas más adecuadas en morfología y tamaño. Estos resultados quedan recogidos en las Tablas 11 a 13.

En dos de las pruebas realizadas para optimizar las partículas de PCL, se obtuvieron partículas esféricas y de superficie lisa (Tabla 11), pero demasiado grandes para nuestro objetivo ($0,88 \mu\text{m}$ y $0,92 \mu\text{m}$), aunque al variar el flujo de aire a 800 NI/h , se observó una disminución del tamaño de la partícula.

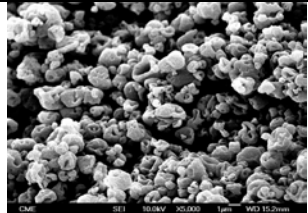
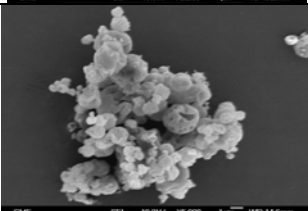
Tabla 11. Distribución de tamaños de las síntesis de optimización del Spray Dryer de las NPs de PCL. Fotografías obtenidas por el FEG-SEM (x 5.000).

	Pruebas	D_n	D_w	U	Media (μm) \pm S.E.M	
PCL	Prueba 1	0,91	1,69	1,84	$0,92 \pm 0,03$	
	Prueba 3	0,88	1,19	1,34	$0,88 \pm 0,02$	

Resultados

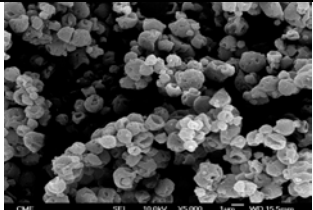
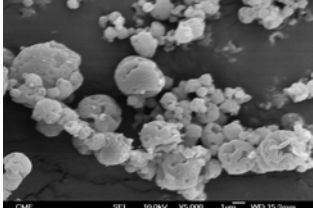
Cuando se realizó el primer ensayo para obtener las partículas de PLGA 50:50, se utilizó una concentración polimérica del 1 % (prueba 1), con tal concentración se observó que las partículas obtenidas tenían un aspecto deshinchado (Tabla 12). Al incrementar la concentración polimérica al 2 %, se obtuvieron partículas más esféricas y el aumento del flujo de aire contribuyó a una disminución del tamaño de las partículas (prueba 2). El tamaño medio de las partículas en esta prueba fue de 0,77 μm y 0,74 μm , respectivamente (Tabla 12).

Tabla 12. Distribución de tamaños de las síntesis de optimización del Spray Dryer de las NPs de PLGA 50:50. Fotografías obtenidas por el FEG-SEM (x 5.000).

	Pruebas	D _n	D _w	U	Media (μm) \pm S.E.M	
PLGA 50:50	Prueba 1	0,77	1,27	1,64	0,77 \pm 0,02	
	Prueba 2	0,74	1,19	1,60	0,74 \pm 0,02	

En las primeras pruebas para obtener las partículas de PLGA 75:25, se observó las mismas características que las partículas de PLGA 50:50, mostrando un aspecto deshinchado para la concentración polimérica del 1 % (prueba 1), y también un tamaño demasiado grande (0,87 μm) (Tabla 13). Cuando se varió el flujo de aire a 800 NI/h, se observó que el tamaño de la partícula obtenida era más pequeño, y al disminuir el porcentaje de la bomba al 5 %, el aspecto de la partícula fue más liso.

Tabla 13. Distribución de tamaños de las síntesis de optimización del Spray Dryer de las NPs de PLGA 75:25. Fotografías obtenidas por el FEG-SEM (x 5.000).

	Pruebas	D _n	D _w	U	Media (µm) ± S.E.M	
PLGA 75:25	Prueba 1	0,87	1,28	1,47	0,87 ± 0,03	
	Prueba2	0,75	1,40	1,84	0,75 ± 0,03	

Los estudios morfológicos y de tamaño llevaron a seleccionar las mejores condiciones experimentales, que se corresponden con las de la prueba 2 para las partículas de PCL (concentración al 1 % (p/v), flujo de aire a 800 NI/h y bomba a 16 %) (Tabla 4; pág. 80); y con las de la pruebas 3 para las de PLGA (concentración al 2 % (p/v), flujo de aire a 800 NI/h y bomba a 5 %) (Tabla 5-6; págs. 80 y 81).

A continuación (Figura 25-27), se muestran las fotografías de las NPs con y sin fármaco obtenidas tras haber seleccionado los parámetros adecuados del Spray Dryer.

Las NPs de PCL sin PTX (Figura 25A) son aproximadamente redondas y de superficie porosa. Al incorporar el PTX, se observan partículas más esféricas (Figura 25B). Las NPs de PLGA 50:50 sin fármaco (Figura 26C) son más redondas que las de PCL, en lo cual puede tener influencia la concentración polimérica utilizada. Al incorporar el PTX, se observa que son más esféricas (Figura 26D). Por último, las NPs de PLGA 75:25 sin PTX no muestran mucha diferencia morfológica con las de PLGA 50:50 (Figura 27).

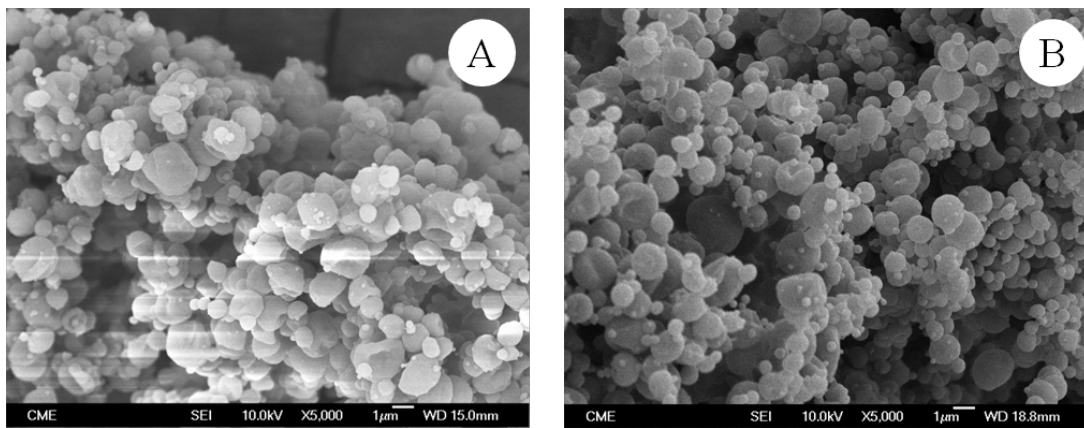


Figura 25. Fotografías obtenidas del FEG-SEM de las NPs de PCL sin PTX (A) y con PTX (B) sintetizadas por el Spray Dryer. Aumento (x 5.000).

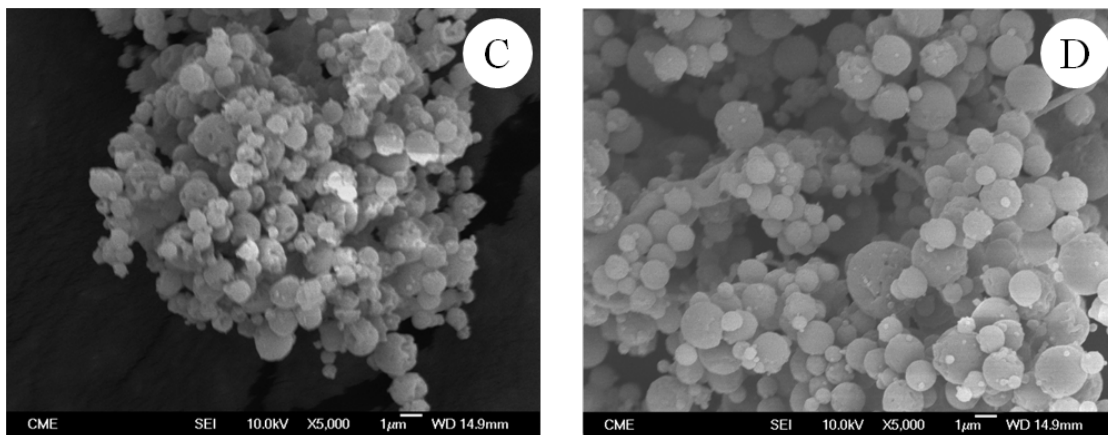


Figura 26. Fotografías obtenidas del FEG-SEM de las NPs de PLGA 50:50 sin PTX (C) y con PTX (D) sintetizadas por Spray Dryer. Aumento (x 5.000).

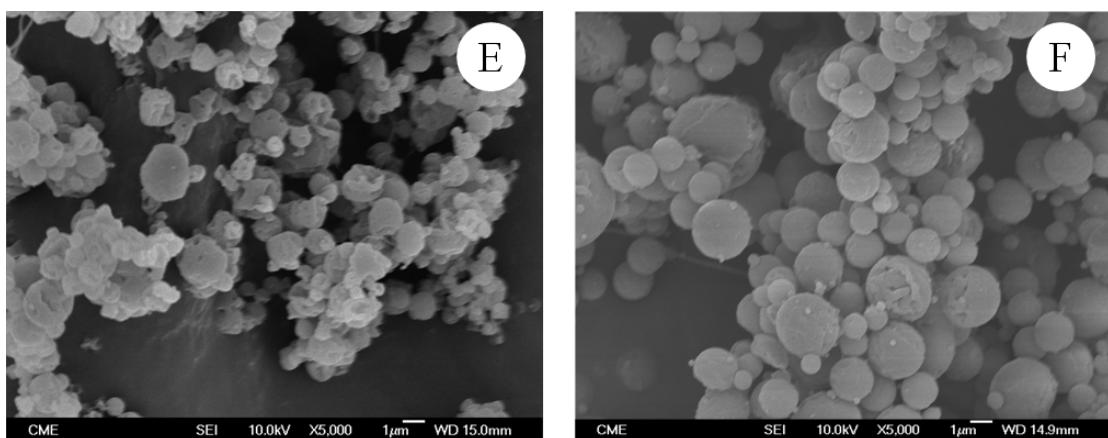


Figura 27. Fotografías obtenidas del FEG-SEM de las NPs de PLGA 75:25 sin PTX (E) y con PTX (F) sintetizadas por Spray Dryer. Aumento (x 5.000).

El diámetro promedio en número (D_n), el diámetro promedio en peso (D_w) y el índice de polidispersidad (U) de cada tipo de partículas con y sin fármaco, y se indica en la Tabla 14.

En todos los casos, la presencia del fármaco conduce a un aumento del tamaño de la partícula, y a una disminución de la polidispersidad. Se observa que los tamaños de las partículas obtenidas por Spray Dryer se encuentran en un amplio intervalo, siendo por tanto polidispersas (Tabla 14). Aún así el porcentaje de partículas inferiores a $1 \mu\text{m}$ supera el 50 %. Así mismo, en la Figura 28 queda reflejada la distribución de tamaños de cada tipo de partículas.

Tabla 14. Distribución de tamaños de las NPs obtenidas por Spray Dryer. Valor de la media \pm S.E.M (n= 250). (a) $p < 0,001$ respecto a las NPs sin fármaco. $D_n = \sum N_i D_i / \sum N_i$; $D_w = \sum N_i D_i^4 / \sum N_i D_i^3$; $U = D_w / D_n$; N_i : número de partícula medida, D_i : diámetro de partícula medida

	D_n	D_w	U	Media (μm)	NP $\leq 1\mu\text{m}$ (%)
PLGA 75:25	0,78	1,29	1,65	$0,78 \pm 0,02$	79,09
PLGA 75:25 - PTX	1,02	1,29	1,25	$1,03 \pm 0,02^a$	58,44
PLGA 50:50	0,69	1,05	1,52	$0,69 \pm 0,02$	86,81
PLGA 50:50 - PTX	0,85	1,06	1,24	$0,85 \pm 0,02^a$	83,54
PCL	0,75	1,30	1,73	$0,75 \pm 0,03$	80,45
PCL - PTX	0,94	1,40	1,48	$0,94 \pm 0,03^a$	64,28

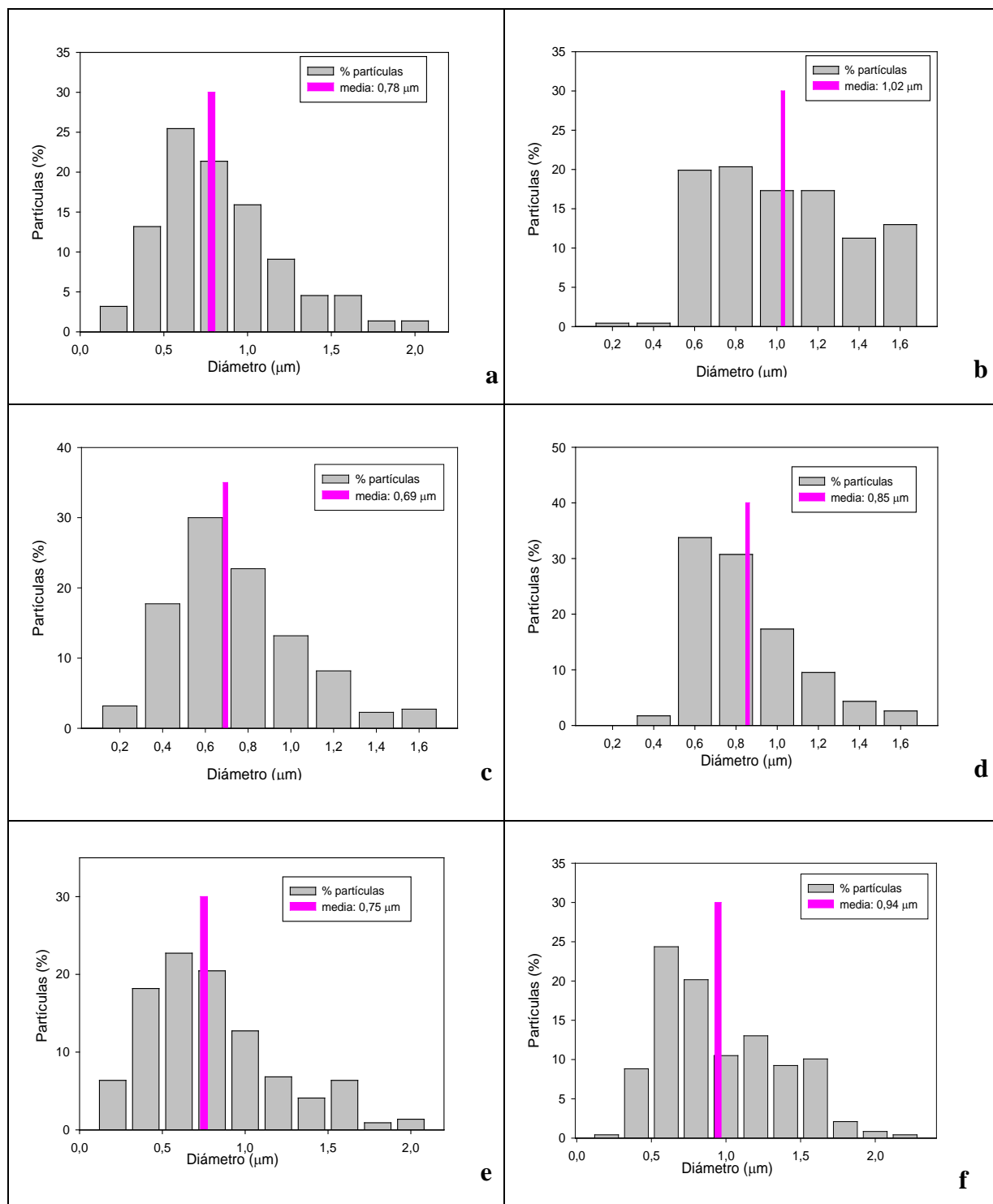


Figura 28. Distribución de tamaños y tamaño medio de las NPs obtenidas por la técnica del Spray Dryer: a) PLGA 75:25; b) PLGA 75:25 – PTX c) PLGA 50:50; d) PLGA 50:50 – PTX; e) PCL; f) PCL-PTX.

I.1.2. Nanopartículas obtenidas por doble emulsión

Se obtuvieron partículas pequeñas < 400 nm, de superficie lisa y esférica, para las NPs de PCL, PLGA 50:50 y PLGA 75:25. La incorporación del PTX no afectó a la morfología de las partículas (Figura 29-31).

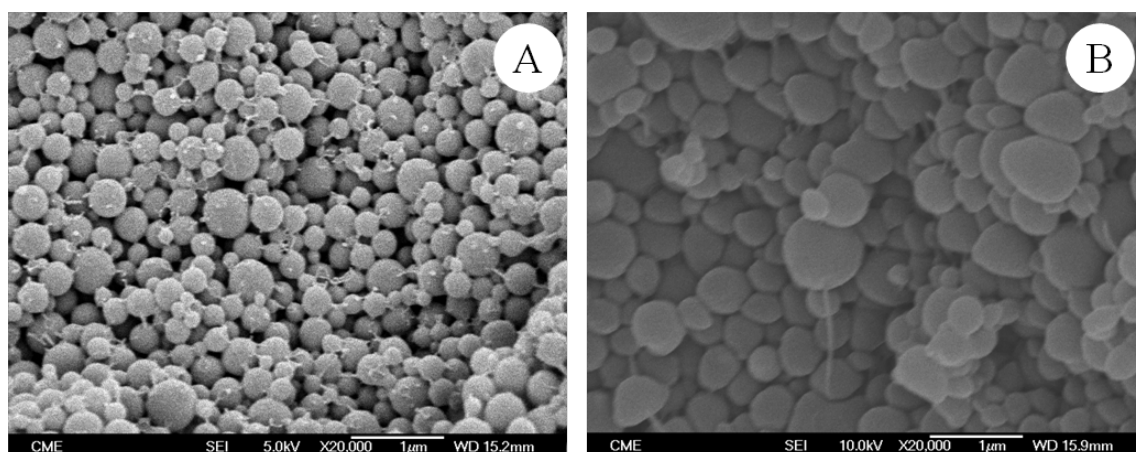


Figura 29. Fotografías obtenidas por FEG-SEM de las NPs de PCL sin PTX (A) y con PTX (B) sintetizadas por doble emulsión. Aumento (x 20.000)

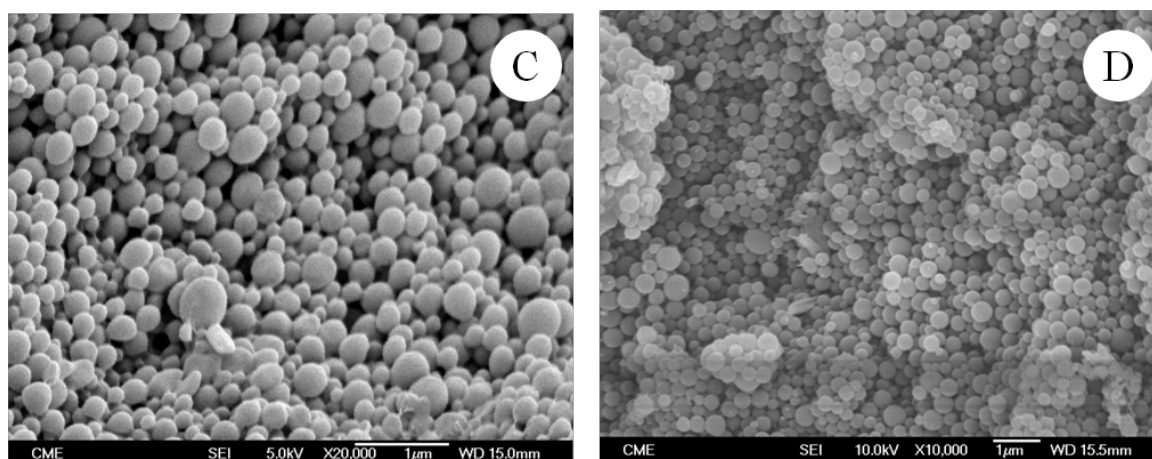


Figura 30. Fotografías obtenidas por FEG-SEM de las NPs de PLGA 50:50 sin PTX (C) y con PTX (D) sintetizadas por doble emulsión. Aumento (x 20.000) y (x 10.000).

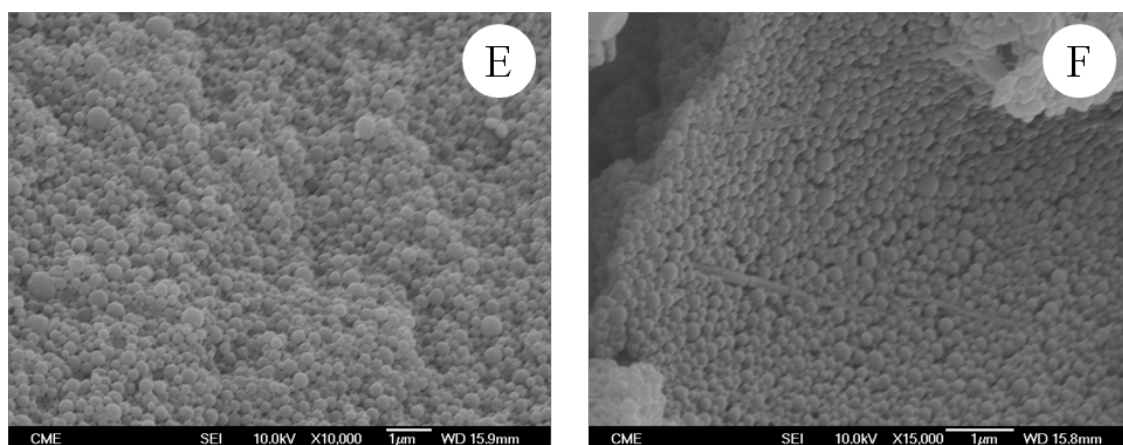


Figura 31. Fotografías obtenidas del FEG-SEM de las NPs de PLGA 75:25 sin PTX (E) y con PTX (F) sintetizadas por doble emulsión. Aumento (x 10.000) y (x 15.000).

Se determinó el tamaño de las partículas mediante las fotografías obtenidas por FEG-SEM (Figura 32). Las partículas obtenidas por doble emulsión son muy pequeñas y monodispersas (Tabla 15). Con ayuda de las fotografías del FEG-SEM, se calcularon el diámetro promedio en número (D_n), el diámetro promedio en peso (D_w) y el índice de polidispersidad (U). La presencia del fármaco induce a un incremento en el tamaño medio de las NPs. Todas las NPs preparadas tienen un tamaño medio inferior a 300 nm, con excepción de las NPs de PCL cargadas con PTX.

Tabla 15. Distribución de tamaños de las NPs obtenidas por doble emulsión. Valor de la media \pm S.E.M (n= 250). (a) $p < 0,001$ respecto a las NPs sin fármaco. $D_n = \sum N_i D_i / \sum N_i$; $D_w = \sum N_i D_i^4 / \sum N_i D_i^3$; $U = D_w / D_n$; N_i : número de partícula medida, D_i : diámetro de partícula medida.

	D_n	D_w	U	Media (nm)
PLGA 75:25	223	264	1,18	223 ± 4
PLGA 75:25 - PTX	229	281	1,22	229 ± 4
PLGA 50:50	246	301	1,22	246 ± 4
PLGA 50:50 - PTX	274	323	1,17	274 ± 4^a
PCL	270	330	1,22	270 ± 5
PCL - PTX	394	489	1,24	394 ± 7^a

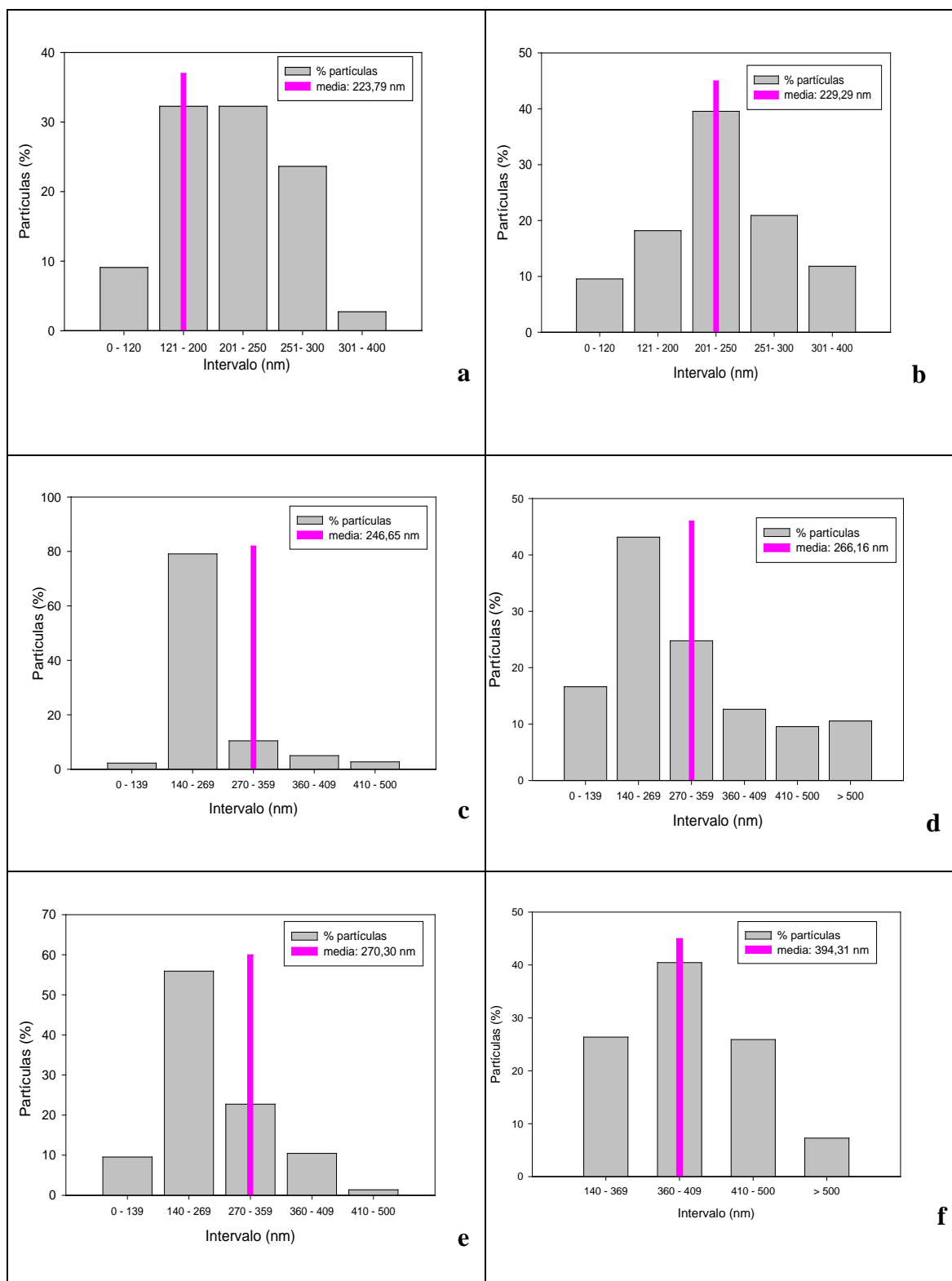


Figura 32. Distribución de tamaños y de las medias de las NPs obtenidas por doble emulsión: a) PLGA 75:25, b) PLGA 75:25 - PTX; c) PLGA 50:50, d) PLGA 50:50 – PTX; e) PCL, f) PCL – PTX.

En cuanto a los rendimientos obtenidos por ambos métodos, en las NPs obtenidas por Spray Dryer fueron bajos: 52,60 % (PCL - PTX), 22,18 % (PLGA 50:50 - PTX) y 24,88 % (PLGA 75:25 - PTX), respecto a las NPs obtenidas por doble emulsión, que tenían un alto rendimiento: 86,10 %, 92,43 %, 97,93 %, PCL - PTX, PLGA 50:50 - PTX y PLGA 75:25 - PTX, respectivamente.

I.2. Eficiencia de encapsulación

Se determinó la Eficiencia de Encapsulación (EE) de las NPs obtenidas por Spray Dryer (Tabla 16) y por doble emulsión (Tabla 17).

Tabla 16. Eficiencia de encapsulación de las NPs obtenidas por Spray Dryer. La cantidad teórica de encapsulación del PTX es de 10 µg de PTX /mg de NP.

Nanopartículas	µg de PTX /mg de NP ± S.E.M	EE (%)
PLGA 75:25 - PTX	7,69 ± 0,06	76,9
PLGA 50:50 - PTX	9,15 ± 0,11	91,5
PCL - PTX	8,78 ± 0,08	87,8

Tabla 17. Eficiencia de encapsulación de las NPs obtenidas por doble emulsión. La cantidad teórica de encapsulación del PTX es de 50 µg de PTX /mg de NP.

Nanopartículas	µg de PTX /mg de NP ± S.E.M	EE (%)
PLGA 75:25 - PTX	44,99 ± 5,17	89,98
PLGA 50:50 - PTX	50,12 ± 8,07	100
PCL - PTX	37,34 ± 5,88	74,68

El fármaco se encuentra incorporado óptimamente en ambas formulaciones, con un EE superior al 70 %; siendo en ambos casos las NPs de PLGA 50:50 las que más PTX encapsulan.

I.3. Termogravimetría

Se ha realizado el estudio termogravimétrico de todas las mezclas preparadas con y sin fármaco, y se ha determinado la pérdida de masa en todas ellas en el intervalo de temperatura de 25 °C a 600 °C. Con el fin de determinar la temperatura a la cual se produce la mayor pérdida de masa, se estudió las curvas de las derivadas termogravimétricas, en las que se ponen de manifiesto los picos de degradación. Se evaluaron las NPs de PCL, PLGA 50:50 y PLGA 75:25 con y sin fármaco, y el PTX en estado puro.

En este estudio no existen diferencias en los resultados obtenidos entre ambas formulaciones. No obstante, se representa en la Figura 33 la gráfica correspondiente a las derivadas obtenidas de las muestras preparadas por Spray Dryer, así como los datos obtenidos en la Tabla 18. En la Figura 34, se muestra la gráfica correspondiente a las derivadas de las muestras preparadas por doble emulsión, junto a sus datos en la Tabla 19.

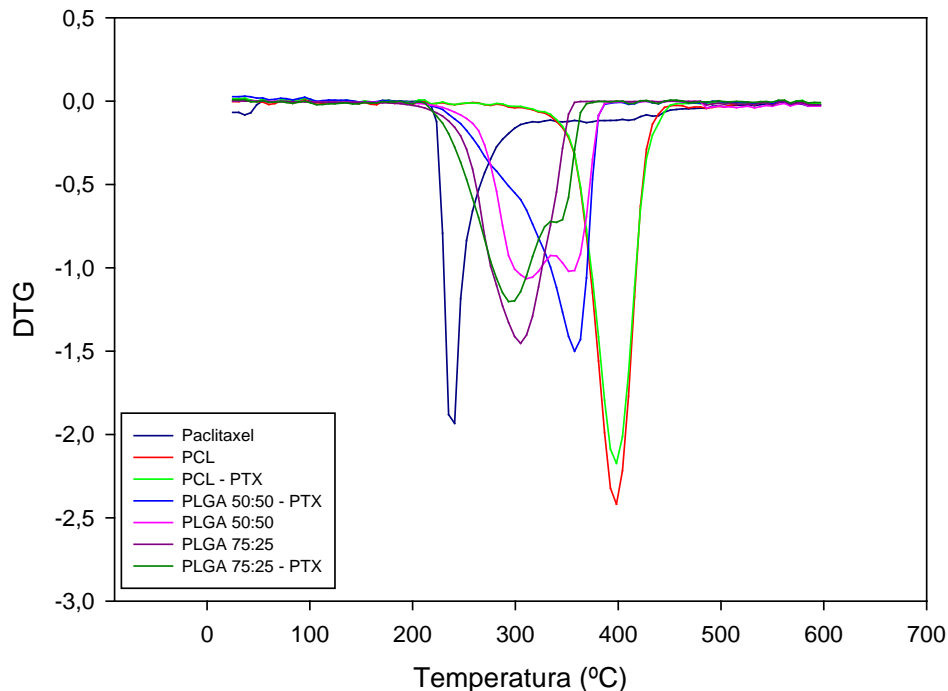


Figura 33. DTG de las muestras de PTX puro y de las NPs con y sin fármaco obtenidas por Spray Dryer.

Tabla 18. Datos obtenidos de la temperatura del estudio termogravimétrico de las muestras de las NP obtenidas por Spray Dryer.

Muestra	Pérdida de masa (%) hasta 600 °C	Pico temperatura en DTG (°C)	Pérdida de masa (%)
Paclitaxel	78,92	245,39	20,45
PCL - PTX	100	405,10	56,26
PCL	100	404,53	63,05
PLGA 50:50 - PTX	100	365,72	76,20
PLGA 50:50	100	321,44	39,96
		363,52	81,61
PLGA 75:25 - PTX	100	303,36	48,86
PLGA 75:25	100	303,89	47,9

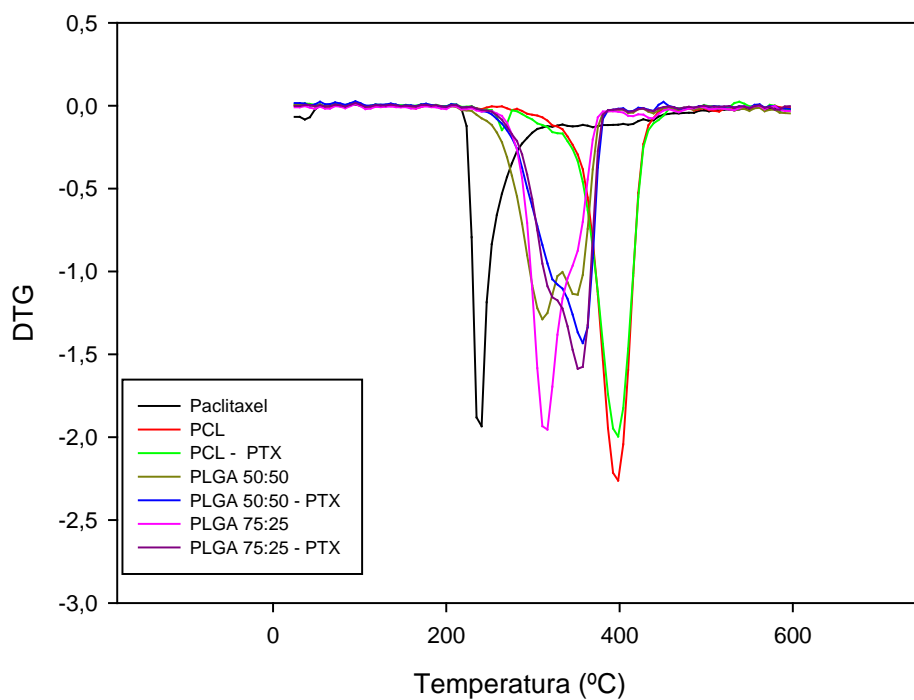


Figura 34. DTG de las muestras de PTX puro y de las NPs con y sin fármaco obtenidas por doble emulsión.

El PTX puro se degrada en un solo paso a un máximo de temperatura de 245,39 °C, y a una temperatura mucho menor que los polímeros. Las NPs obtenidas por Spray Dryer de PLGA 75:25 y PCL se degradan en una única etapa a 303,89 °C y 404,53 °C, respectivamente; mientras que las NPs de PLGA 50:50 se degradan en dos etapas (321,44 °C y 363,53 °C) (Tabla 18). Igualmente, en las obtenidas por doble emulsión de PLGA 75:25 y PCL, se degradan en una etapa 320,96 °C y 402,22 °C; y las NPs de PLGA 50:50 en dos etapas 318,88 °C y 356,49 °C (Tabla 19).

La presencia del PTX en las NPs no provoca modificaciones en la degradación de las mismas, salvo en las NPs de PLGA 50:50 - PTX, donde su inclusión modifica la degradación produciéndose en una sola etapa que corresponde a la temperatura de la segunda etapa en las NPs PLGA 50:50 sin fármaco (Tabla 18-19).

Tabla 19. Datos obtenidos de la temperatura del estudio termogravimétrico de las muestras de las NP obtenidas por doble emulsión.

Muestra	Pérdida de masa (%) hasta 600 °C	Pico temperatura en DTG (°C)	Pérdida de masa (%)
Paclitaxel	78,92	245,39	20,45
PCL - PTX	100	404,48	63,81
PCL	100	402,22	62,41
PLGA 50:50 - PTX	100	364,84	72,88
PLGA 50:50	100	318,88	40,50
		356,49	82,38
PLGA 75:25 - PTX	100	361,67	74,13
PLGA 75:25	100	320,96	41,22

I.4. Liberación *in vitro*

Los estudios de liberación *in vitro* se llevaron a cabo a partir de las NPs constituidas por PLGA 50:50, PLGA 75:25 y PCL que tienen incorporado PTX según la metodología descrita anteriormente en el apartado de material y métodos.

En la Figura 35, se representa la liberación del fármaco durante 841 h (35 días) desde las NPs obtenidas por Spray Dryer. No existe una liberación completa del PTX desde estas NPs. Al cabo de las 841 h, considerando el FE ($36 \pm 9 \%$), se libera un 60 % de PTX desde las NPs de PLGA 50:50 y un 44 % desde las NPs de PLGA 75:25. Sin embargo, desde las partículas de PCL, se obtiene una liberación del casi del 100 %.

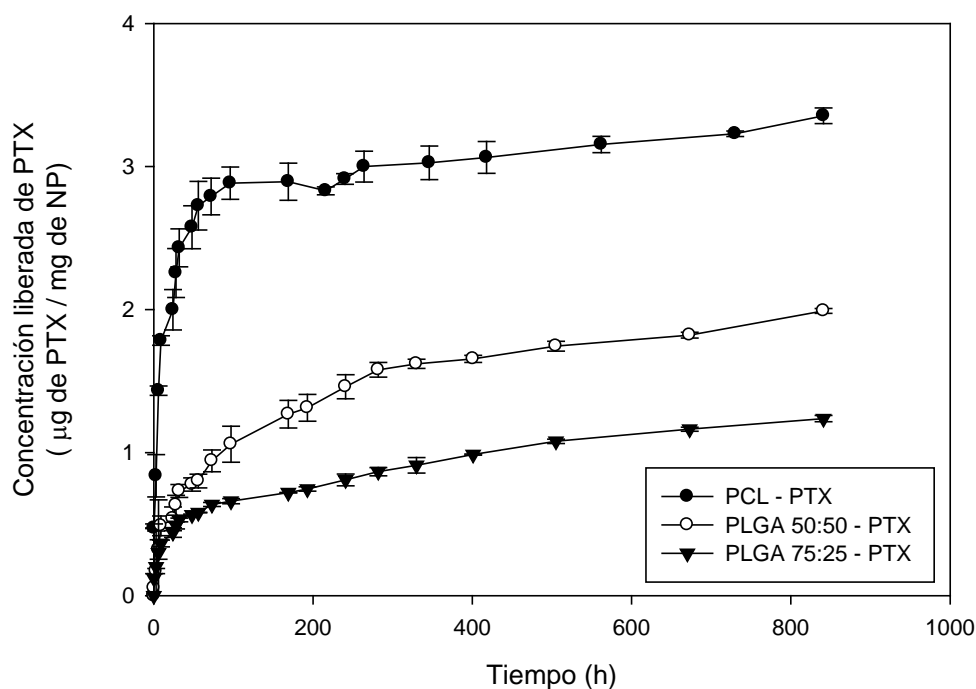


Figura 35. Liberación *in vitro* experimental del PTX desde las NPs obtenidas por Spray Dryer. No se tiene en cuenta el factor de extracción en la representación gráfica. Datos expresados Media \pm S.E.M.

En la Figura 36, se representa la liberación del fármaco obtenida durante 841 h (35 días) desde las NPs obtenidas por de doble emulsión.

Tras terminar el experimento, se observa que no se ha liberado todo el PTX incorporado en las partículas. En este caso, la cinética de liberación del PTX es

equivalente a la observada desde las NPs preparadas por Spray Dryer. Al cabo de las 841 h, considerando el FE ($68,21 \pm 6,62 \%$), se libera un 60 % de PTX desde las NPs de PCL. A continuación, le sigue las NPs de PLGA 50:50, donde se libera un 31 % de fármaco y desde las NPs de PLGA 75:25 con un 24 % (Figura 36).

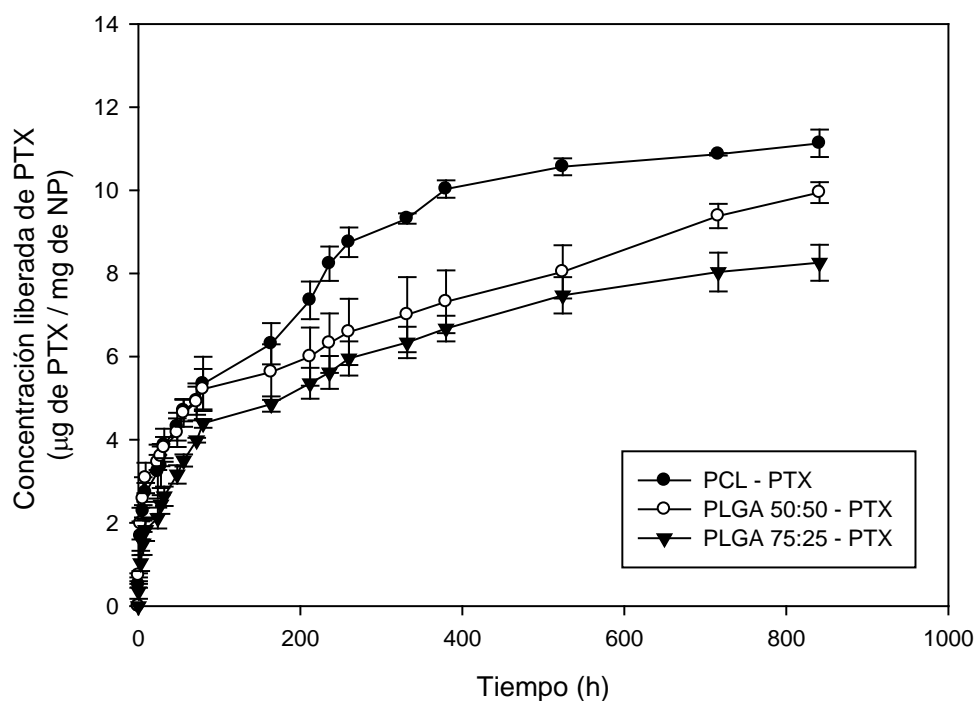


Figura 36. Liberación *in vitro* experimental del PTX desde las NPs obtenidas por doble emulsión. No se tiene en cuenta el factor de extracción en la representación gráfica. Datos expresados Media \pm S.E.M.

Se ha determinado la velocidad de liberación de PTX desde las NPs en las distintas etapas de la cinética mediante el ajuste de los datos experimentales por regresión lineal; y de la correspondiente pendiente se ha obtenido la velocidad de liberación. La Tabla 20 muestra la velocidad de las distintas etapas de liberación desde las NPs obtenidas por Spray Dryer.

Tabla 20. Etapas de la cinética de la liberación *in vitro* del PTX desde las NPs de PCL, PLGA 50:50 y PLGA 75:25 obtenidas por Spray Dryer. K representa la constante de velocidad y r^2 el coeficiente de correlación.

	Etapas	K ($\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{h}$)	r^2
PCL - PTX	0,4 h a 9 h	0,1573	0,990
	9 h a 48 h	0,0216	0,901
	56 h a 841 h	$6,78 \times 10^{-4}$	0,944
PLGA 50:50 - PTX	0,4 h a 9 h	0,0505	0,998
	24 h a 282 h	$3,72 \times 10^{-3}$	0,959
	330 h a 841 h	$7,06 \times 10^{-4}$	0,981
PLGA 75:25 - PTX	0,4 h a 9 h	0,0028	0,993
	9h a 841 h	$1,005 \times 10^{-3}$	0,924

La primera etapa de la liberación del PTX tiene lugar durante las 9 primeras horas con el siguiente orden de velocidad según la composición de las NPs: PCL > PLGA 50:50 > PLGA 75:25.

La liberación del PTX desde las NPs de PCL y de PLGA 50:50 se presenta en 3 etapas, siendo la primera etapa en las 9 primeras horas la más rápida $K_{\text{PCL}} = 0,1573 \mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{h}$ y $K_{\text{PLGA 50:50}} = 0,0505 \mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{h}$ (Tabla 20). En cambio, la liberación del fármaco desde las NPs de PLGA 75:25 se presenta en 2 etapas, siendo la primera etapa la más lenta ($K_{\text{PLGA 75:25}} = 0,0028 \mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{h}$) en comparación con las primeras etapas de las NP de PCL y PLGA 50:50 (Tabla 20).

La Tabla 21 muestra las etapas de liberación del PTX desde las NPs obtenidas por doble emulsión. En este caso, se presentan tres etapas de distintas velocidades. La primera etapa corresponde a las primeras nueve horas, donde la liberación del PTX es más rápida desde las NPs de PLGA 50:50 ($K_{\text{PLGA 50:50}} = 0,4014 \mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{h}$), seguido desde las NPs de PCL con $K_{\text{PCL}} = 0,2906 \mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{h}$, y por último desde las NPs de PLGA 75:25 con $K_{\text{PLGA75:25}} = 0,2376 \mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{h}$.

Tabla 21. Etapas de la cinética de la liberación *in vitro* del PTX desde las NPs de PCL, PLGA 50:50 y PLGA 75:25 obtenidas por doble emulsión. K representa la constante de liberación y r^2 el coeficiente de correlación.

	Etapas	K ($\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{h}$)	r^2
PCL - PTX	0 h a 9 h	0,2906	0,921
	24 h a 380 h	0,0188	0,974
	524 h a 841 h	0,0011	0,971
PLGA 50:50 - PTX	0 h a 6 h	0,4014	0,906
	9 h a 72 h	0,0305	0,983
	80 h a 841 h	0,0066	0,992
PLGA 75:25 - PTX	0 h a 6 h	0,2376	0,951
	6 h a 80 h	0,0374	0,993
	164 h a 841 h	0,0057	0,950

I.5. Modelos matemáticos

Tras la aplicación de los tres modelos matemáticos (Higuchi, Korsmeyer-Peppas y Hopfenberg), se obtuvieron los resultados que se indican en la Tabla 22 y la Tabla 23.

Tabla 22. Modelos matemáticos de liberación *in vitro* de PTX desde las NPs obtenidas por Spray Dryer tras un 80 % de fármaco liberado. n representa el exponente de difusión.

	Higuchi		Korsmeyer-Peppas		Hopfenberg	
	r^2	K ($\text{h}^{-1/2}$)	r^2	n	r^2	K ($\mu\text{gPTX}/\text{mgNP}\cdot\mu\text{m}/\text{h}$)
PLGA75:25 - PTX	0,963	0,0363	0,987	0,30	0,942	0,0053
PLGA50:50 - PTX	0,945	0,0679	0,959	0,43	0,935	0,0056
PCL - PTX	0,939	0,4838	0,968	0,40	0,904	0,0511

Tabla 23. Modelos matemáticos de liberación *in vitro* de PTX desde las NPs obtenidas por doble emulsión cuando se ha liberado el 90 % del fármaco. n representa el exponente de difusión.

	Higuchi		Korsmeyer-Peppas		Hopfenberg	
	r ²	K (h ^{-1/2})	r ²	n	r ²	K (μgPTX/mgNP·μm)/h
PLGA75:25 - PTX	0,973	0,3093	0,984	0,40	0,850	0,00618
PLGA50:50 - PTX	0,958	0,2679	0,971	0,30	0,824	0,00411
PCL - PTX	0,987	0,467	0,981	0,40	0,919	0,0102

Al aplicar la ecuación para el modelo de Higuchi, considerando los coeficientes de correlaciones significativos entre $r^2 = 0,94 - 0,98$, se puede decir que las liberaciones son directamente proporcional a la raíz cuadrada del tiempo (tiempo ^{1/2}) y existe un proceso de difusión en todas las NPs obtenidas, pero no implica que sea éste el único mecanismo de liberación (Tabla 22).

En cuanto al modelo de Korsmeyer-Peppas, el exponente de difusión “n” representa el mecanismo de liberación. Los valores de “n” próximos a 0,43 indican que existe un mecanismo de liberación Fickiano (2º Ley de Fick) como es el caso de la liberación de PTX desde las NPs de PLGA 50:50 obtenidas por Spray Dryer (n = 0,43) (Tabla 22). También se podría considerar n=0,40 como liberación fickiana, tal es el caso de la liberación de PTX desde las NPs de PCL obtenidas por ambas formulaciones y de la liberación del fármaco desde las NPs de PLGA 75:25 de doble emulsión (Tabla 23).

En cambio valores de “n” inferiores a 0,40-0,43 indican que existe una gran dispersión de tamaños y no se puede determinar con exactitud el mecanismo de liberación, tal es el caso de la liberación desde las NPs de PLGA 75:25 preparadas por Spray Dryer (n = 0,30) (Tabla 22), y de las de PLGA 50:50 obtenidas por doble emulsión (n = 0,30) (Tabla 23).

En el modelo de Hopfenberg, basado en la degradación polimérica, se observa que los valores de los coeficientes de correlación del modelo aplicado a la liberación

desde las NPs obtenidas por Spray Dryer son menos significativos $r^2 = 0,90 - 0,94$, y por tanto no está claro que se pueda considerar que la constante de liberación del fármaco sea directamente proporcional al grado de degradación polimérica (Tabla 22). Tampoco puede aplicarse este modelo a las NPs preparadas por doble emulsión (Tabla 23).

I.6. Estudios morfológicos post-liberación

Una vez finalizados los estudios de liberación, las partículas poliméricas fueron sometidas a un estudio morfológico por el FEG-SEM, en el que se pudo apreciar que las partículas, tras 35 días de liberación, perdieron su estructura esférica debido a la degradación de las mismas.

La Figura 37 muestra los restos de las partículas obtenidas por Spray Dryer. Se observa que en las muestras de PLGA 50:50 no se distinguen partículas individualizadas (Figura 37B), al igual que se aprecia en las muestras de PLGA 75:25 (Figura 37C). Sin embargo, en las muestras de PCL (Figura 37A), pueden distinguirse partículas individuales, aunque menos esféricas y más deformadas que las originales.

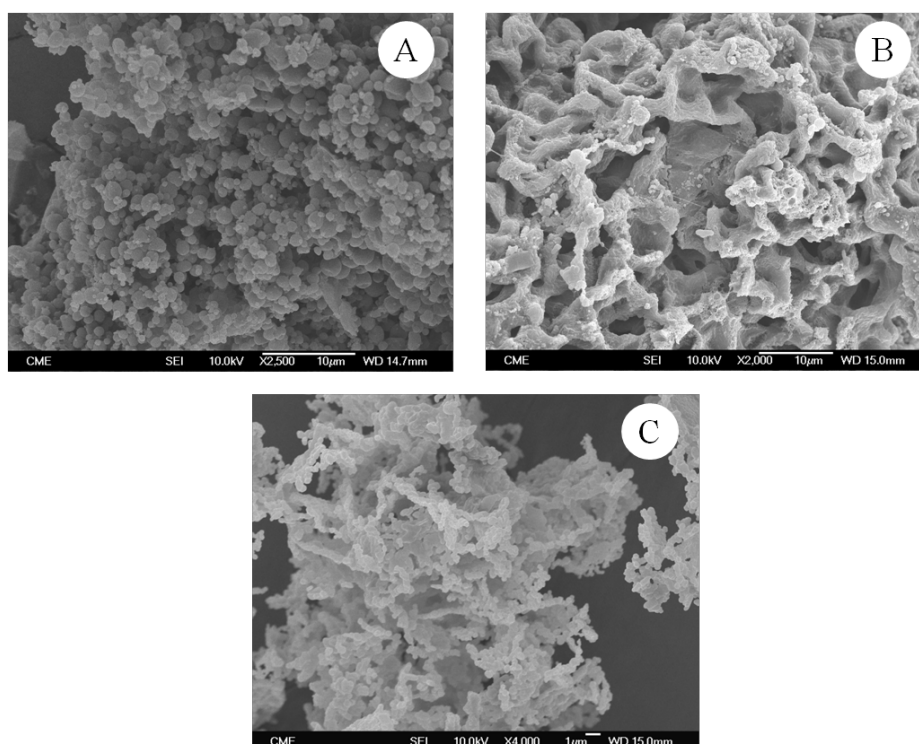


Figura 37. Imagen de las partículas obtenidas por Spray Dryer al cabo de los 35 días de liberación *in vitro* del PTX: A) PCL – PTX; B) PLGA 50:50 – PTX y C) PLGA 75:25 – PTX.

La Figura 38 muestra los restos de las partículas obtenidas por doble emulsión. Las partículas obtenidas por doble emulsión se observan un poco deformadas, más unidas y apelmazadas, sin embargo, no se aprecian los procesos de degradación tan significativos al acabo de las 841 h como en las NPs obtenidas por Spray Dryer.

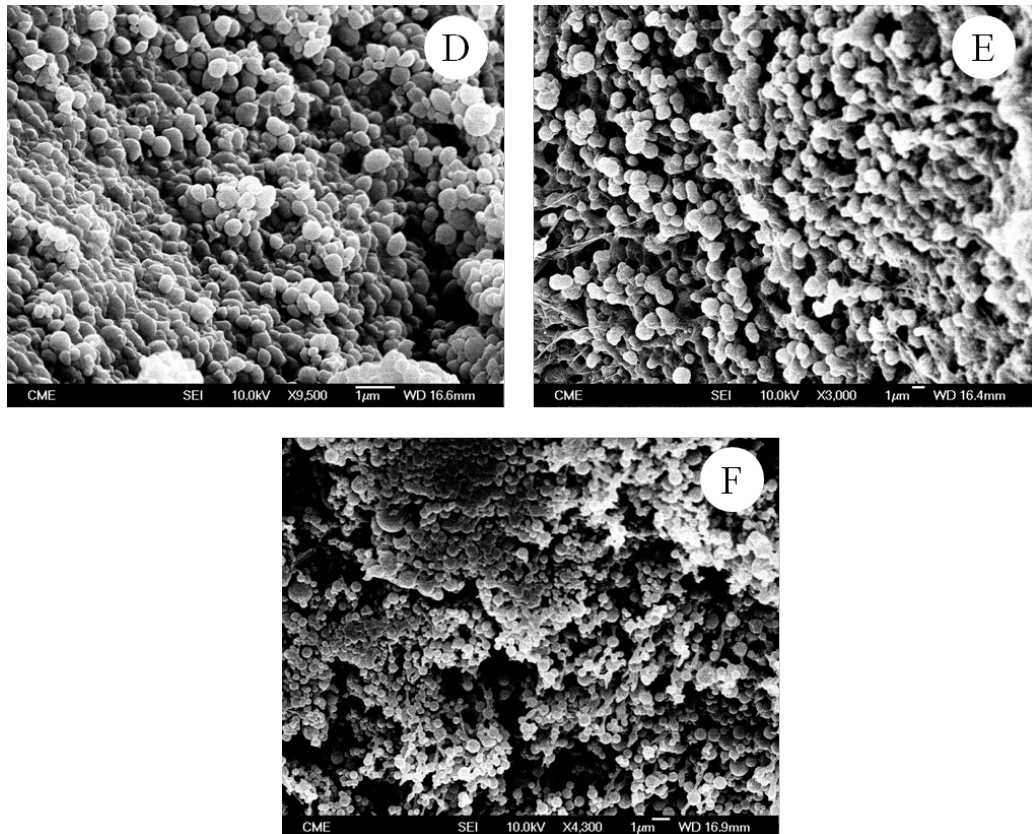


Figura 38. Imagen de las partículas obtenidas por doble emulsión al cabo de los 35 días de liberación *in vitro* del PTX: D) PCL – PTX; E) PLGA 50:50 – PTX y F) PLGA 75:25 – PTX.

II. Ensayos *in vitro* en células MCF-7

II.1. Internalización celular de las nanopartículas

II.1.1. Estudio cualitativo

Para la valoración cualitativa de las NPs se estudió la dinámica de incorporación de las NPs de PCL, PLGA 50:50 y PLGA 75:25 marcadas con el marcador fluorescente 6-cumarina obtenidas por doble emulsión. El estudio cualitativo se realizó mediante microscopio de fluorescencia.

Con el fin de demostrar que la fluorescencia cuantificada es emitida por las partículas con 6-cumarina y no por la 6-cumarina que se haya podido liberar, se utilizó como control las células MCF-7, que se trataron con la cumarina-6 disuelta en el medio de cultivo al 1 % de FBS a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 39) y 500 $\mu\text{g/ml}$, a 2 h y 24 h. Se observó como las cumarina-6 tiñe la célula de color verde, dado su carácter lipófilo, marcando su morfología. Ni entre los distintos tiempos de incubación ni las distintas concentraciones utilizadas, mostraron diferencias en la tinción de las células, a las 24 h presentan la misma coloración que a las 2 h, puesto que las células, una vez teñidas alcanzan su nivel máximo de saturación. Se observa también que en las zonas donde no hay células, no se manifiesta ninguna tinción.

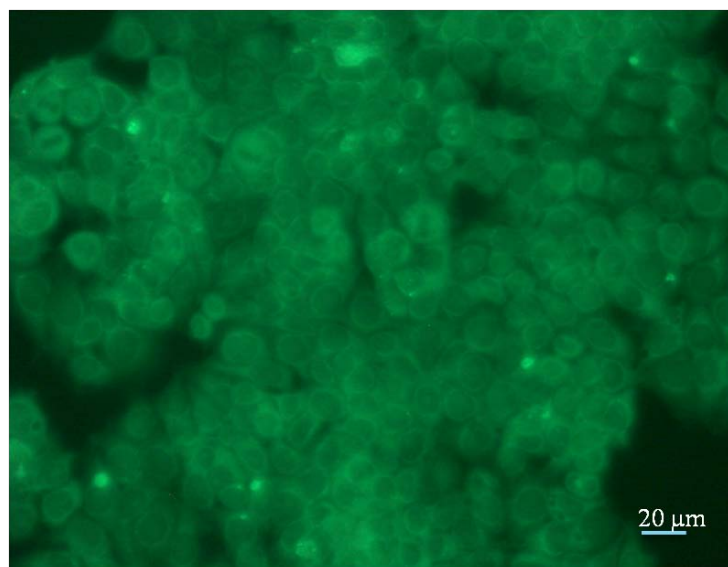


Figura 39. Fotografía de las células MCF-7 control. Se trataron las células con 6-cumarina disuelta en el medio de cultivo al 1 % de FBS a 100 $\mu\text{g/ml}$ durante 2 h.

A continuación, se trataron las células con las NPs de PCL, PLGA 50:50 y PLGA 75:25 preparadas con la 6-cumarina a una concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$ durante 2 h y 24 h. Con las NPs de PLGA 50:50 (Figura 40), se observa una mayor proporción de partículas en el interior de la célula con el transcurso del tiempo, de 2 h (Figura 40B), a 24 h (Figura 40D). En los espacios donde no hay células, no se observa ninguna partícula.

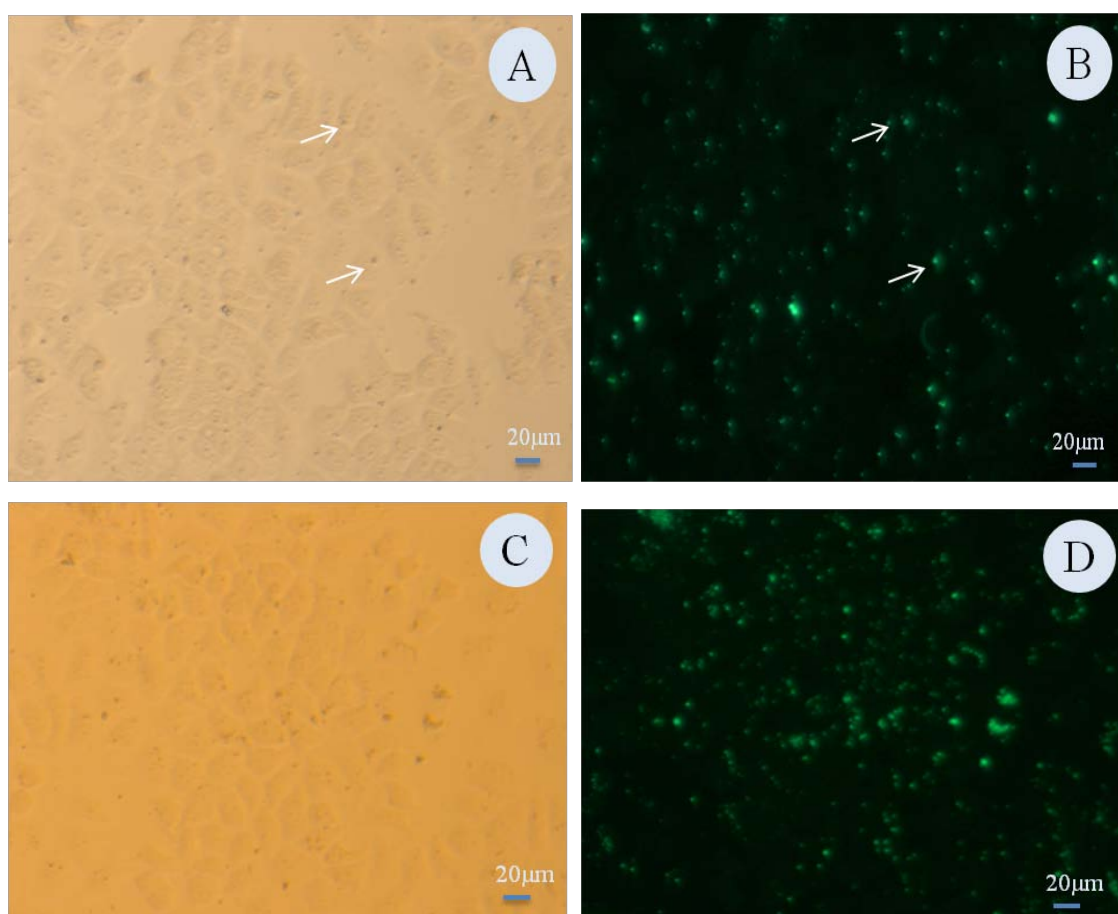


Figura 40. Fotografías de las células MCF-7 tratadas con las NPs de PLGA 50:50 – 6-cumarina a 500 $\mu\text{g/ml}$ a los tiempos de 2 h (B) y 24 h (D), y sus respectivos controles sin fluorescencia (A y C). Las flechas indican algunas NPs-6-cumarina.

Con las NPs de PLGA 75:25 sucede lo mismo que con las de PLGA 50:50, puesto que se presencian más partículas a medida que pasa el tiempo (Figura 41). Además, existe una mayor confluencia de partículas en el interior de la célula en el caso de las NPs de PLGA 75:25.

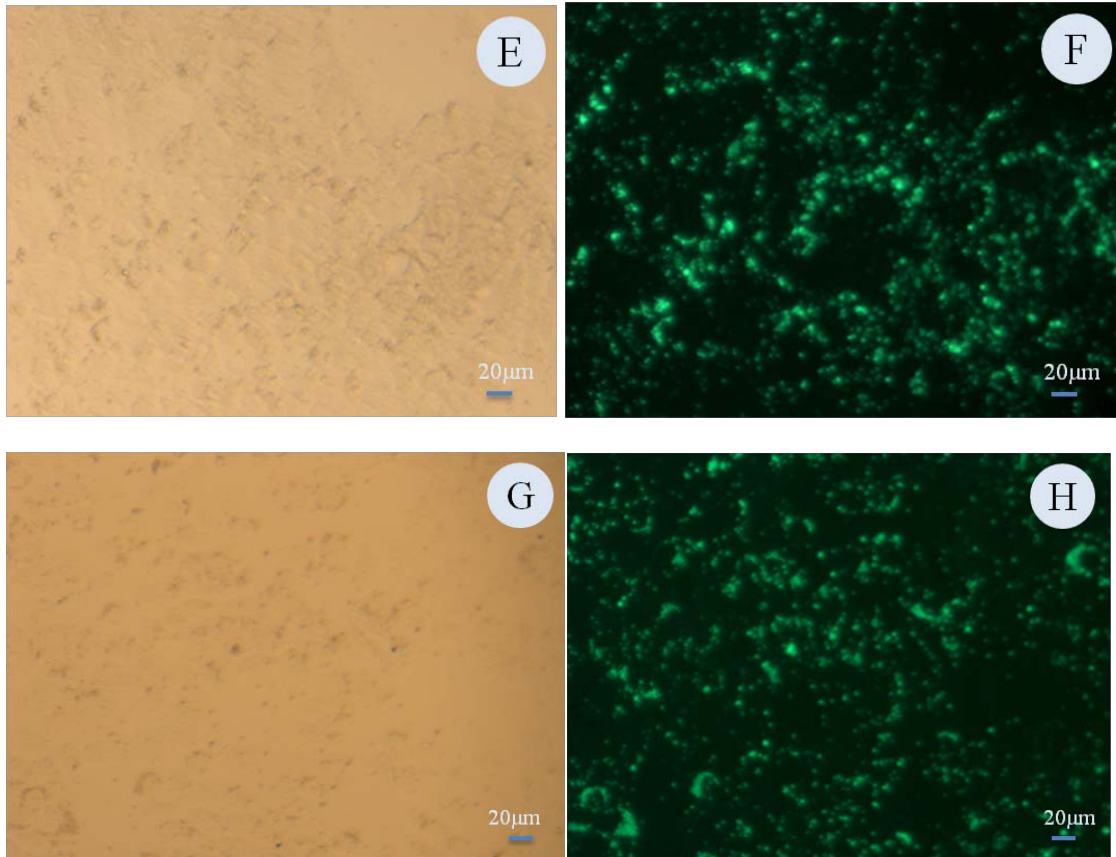


Figura 41. Fotografías de las células MCF-7 tratadas con las NPs de PLGA 75:25 – 6-cumarina a 500 µg/ml a los tiempos de 2 h (F) y 24 h (H), y sus respectivos controles sin fluorescencia (E y G).

En las células tratadas con las NPs de PCL, no se aprecia apenas partículas al cabo de las 2 h de incubación (Figura 42J), sin embargo a las 24 h, se observa levemente mayor proporción de partículas (Figura 42L).

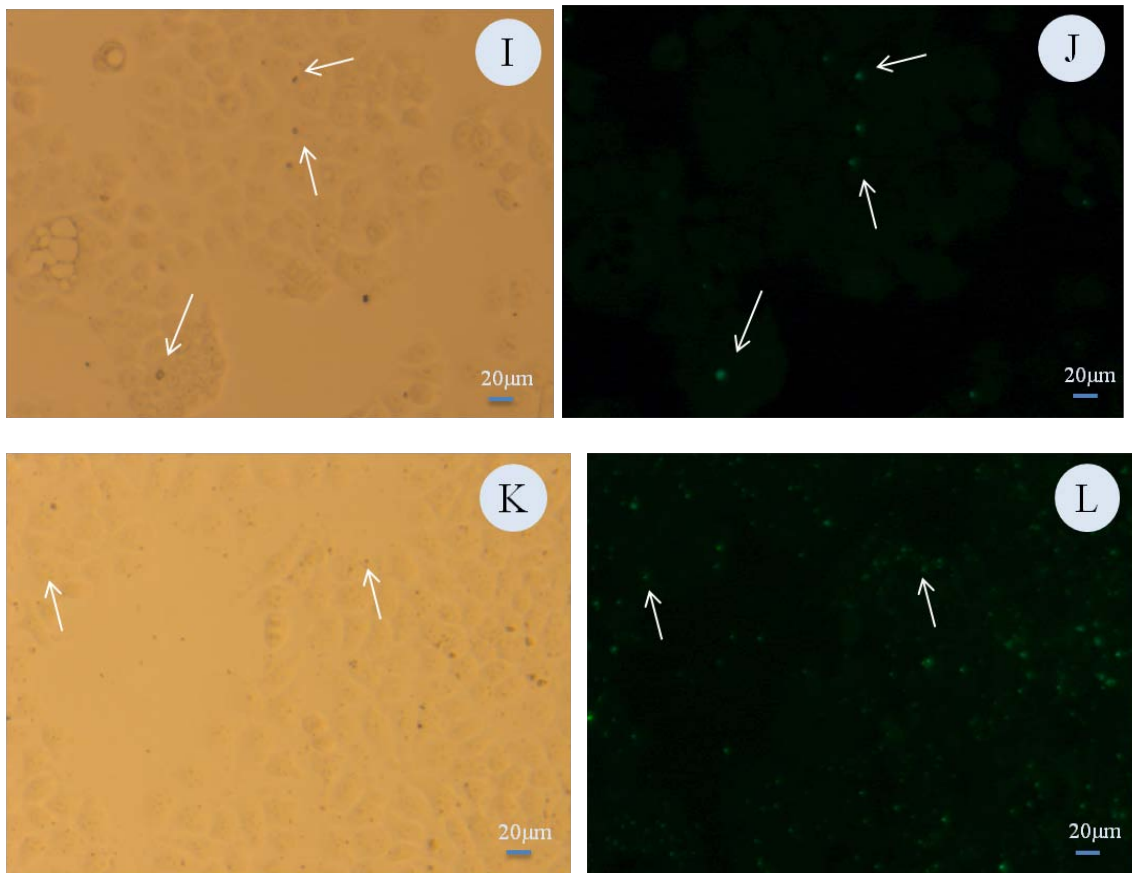


Figura 42. Fotografías de las células MCF-7 tratadas con las NPs de PCL – 6-cumarina a 500 $\mu\text{g/ml}$ a los tiempos de 2 h (J) y 24 h (L), y sus respectivos controles sin fluorescencia (I y K). Las flechas indican algunas NPs-6-cumarina

Una vez evaluado los resultados obtenidos por un lado con las NPs y por otro con las 6-cumarina en disolución, en las Figura 43, se muestran los resultados obtenidos cuando se juntaron ambas. La 6-cumarina en disolución tiñe de color verde las células mostrando con nitidez el contorno de las mismas; así mismo, las NPs se muestran como puntos verdes. De esta forma se observa con claridad donde se encuentran situadas las NPs.

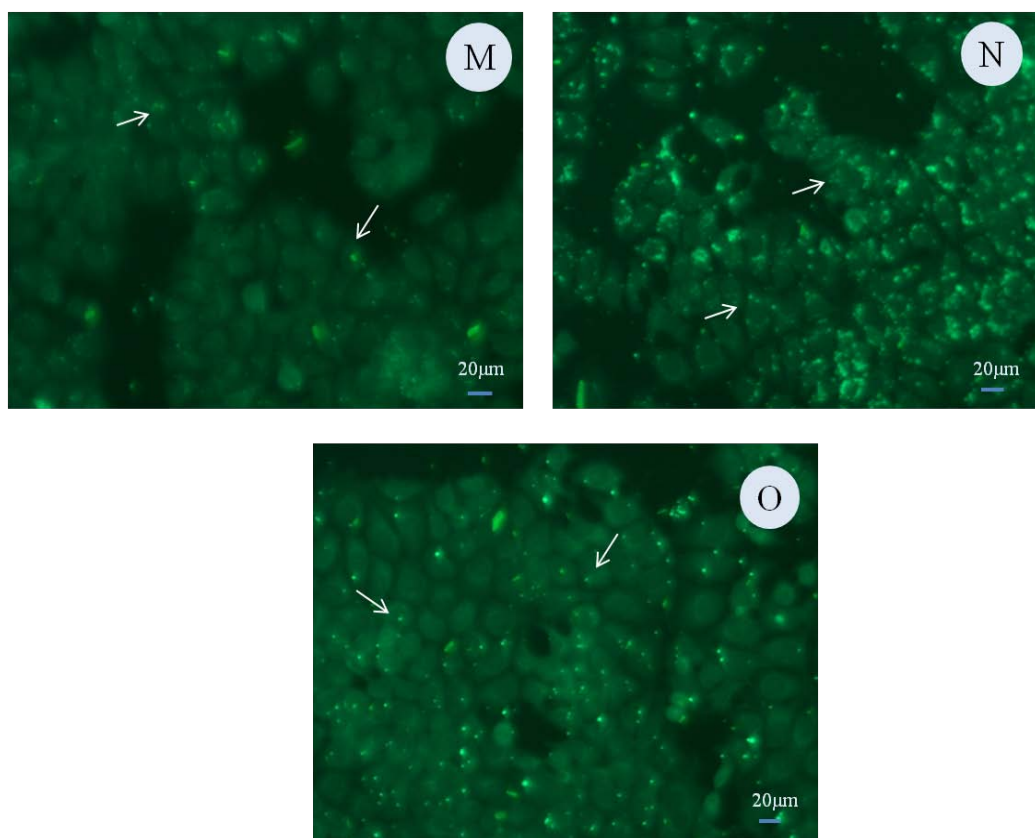


Figura 43. Imagen de las células MCF-7 a las 24 h tratadas conjuntamente con la 6-cumarina disuelta y las NPs de PLGA 50:50 (M), PLGA 75:25 (N) y PCL (O). Las flechas indican algunas NPs o grupos de NPs con el marcaje fluorescente.

II.1.2. Estudio cuantitativo

Esta técnica complementa el estudio cualitativo que se ha realizado anteriormente. Para todas las NPs evaluadas, se observa que la capacidad de internalización de las NPs en las células se ve incrementada en función del tiempo de incubación y también aunque menos significativamente en función de la concentración utilizada. Para la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$, las NPs de PCL presentan muy poca eficacia de incorporación (12 %) al cabo de las 24 h (Figura 44). En cambio, para las NPs de PLGA, la eficacia de incorporación se ve aumentada siendo mayor para las NPs de PLGA 75:25 (38 %) (Figura 44), observándose también en el estudio cualitativo.

A una concentración mayor, a 500 $\mu\text{g/ml}$ las NPs de PLGA 75:25 se encuentran en mayor presencia en las células al cabo de las 24 h de incubación obteniéndose un 78

% de eficacia de incorporación (Figura 45). El efecto que causa las NPs de PLGA 50:50 es similar al de las NPs PLGA 75:25, a las 24 h alcanza una incorporación del 43 %. Sin embargo, las NPs de PCL sólo alcanzan una incorporación del 12 % a las 24 h (Figura 45).

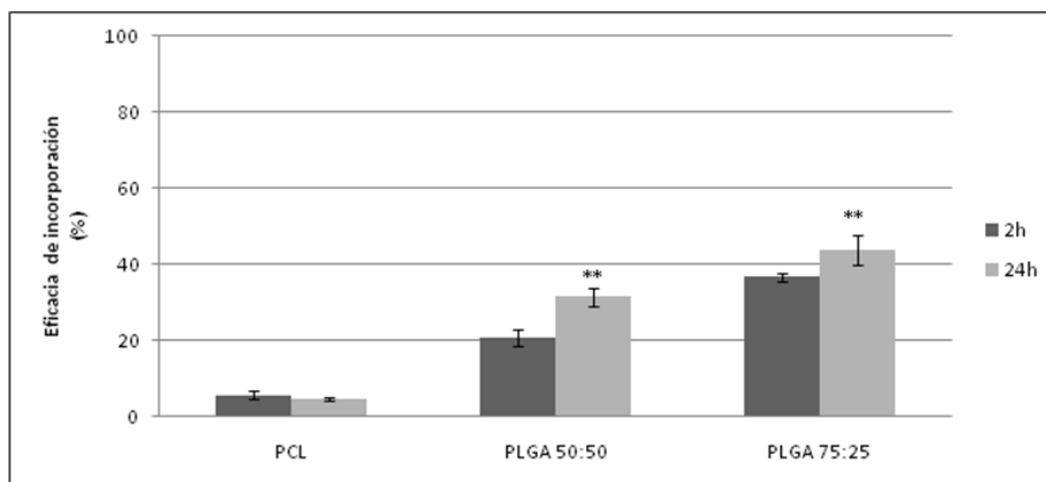


Figura 44. Histograma del estudio cuantitativo de fluorescencia. Se muestra el porcentaje de incorporación de las NPs de PCL, PLGA 50:50 y PLGA 75:25 con cumarina-6, en células MCF-7 a una concentración de 100 µg/ml a las 2 h y 24 h de tratamiento. Datos expresados Media ± SEM. (**) p<0,001.

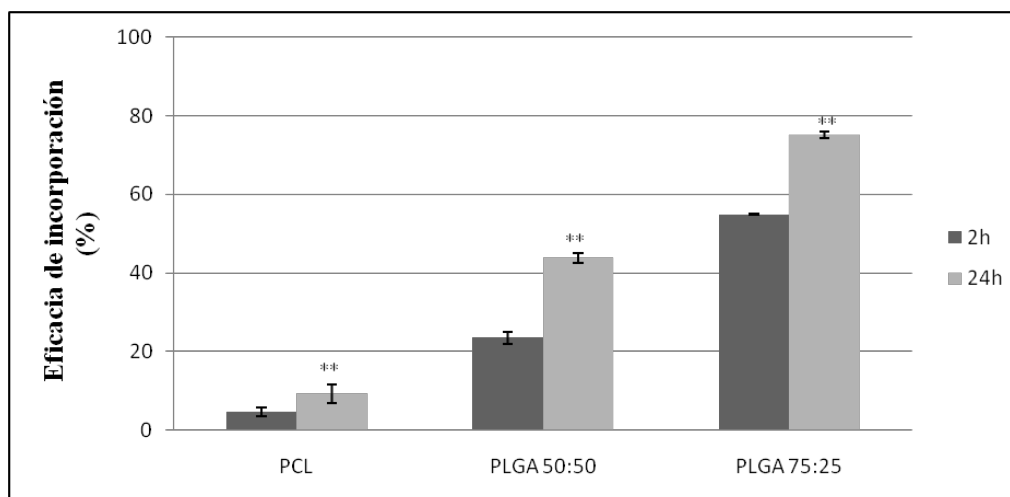


Figura 45. Histograma del estudio cuantitativo de fluorescencia. Se muestra el porcentaje de incorporación de las NPs de PCL, PLGA 50:50 y PLGA 75:25 con cumarina-6, en células MCF-7 a una concentración de 500 µg/ml a las 2 h y 24 h de tratamiento. Datos expresados Media ± SEM. (**) p<0,001.

II.2. Ensayo de viabilidad celular

II.2.1. Viabilidad celular en presencia del PTX en disolución

En la Figura 46-47, se muestra la toxicidad del PTX en disolución sobre las células MCF-7 a distintas concentraciones (3 μM a 60 μM). Se considera que el PTX en disolución es citotóxico cuando presenta un porcentaje de citotoxicidad superior al 50%.

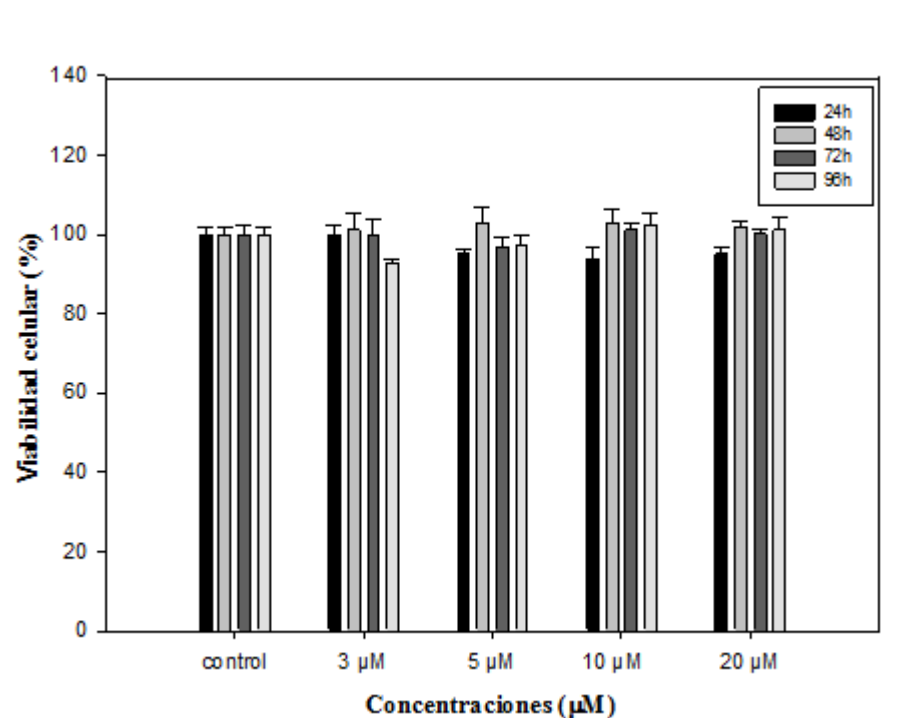


Figura 46. Efecto del Paclitaxel (PTX) en disolución de 3 a 20 μM en células MCF-7 a 24h, 48h, 72h y 96 h de tratamiento, valorado por el método del MTT. Datos expresados Media \pm S.E.M.

Se observó que a concentraciones entre 3 μM y 20 μM , las células no se ven afectadas significativamente por el PTX en disolución a ninguno de los tiempos de incubación (Figura 46). El PTX en disolución de 30 a 60 μM provoca un descenso de la viabilidad celular dependiente del tiempo y de la concentración (Figura 47). Por ese motivo en los demás experimentos, se escogieron las concentraciones de 30 a 60 μM para tratar las células MCF-7 con las NPs con y sin fármaco.

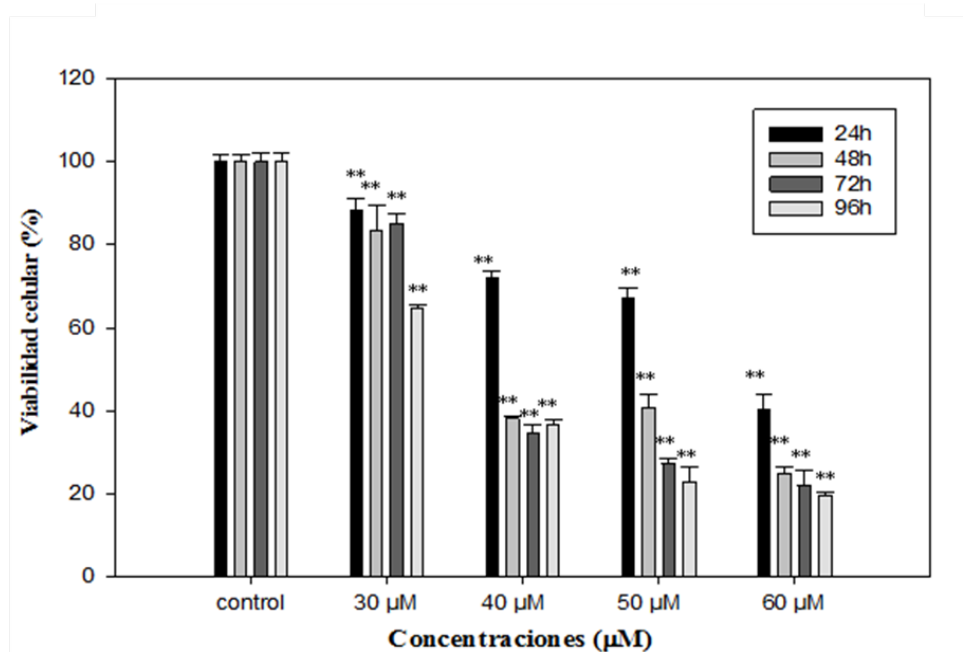


Figura 47. Efecto del Paclitaxel (PTX) en disolución de 30 a 60 µM en células MCF-7 a 24h, 48h, 72h y 96 h de tratamiento, valorado por el método del MTT. Datos expresados Media ± S.E.M. (*) p<0,001 respecto al control.**

A 30 µM la viabilidad celular se mantuvo elevada alrededor del 80 % en los tres primeros tiempos, sin embargo, a las 96 h desciende significativamente a 65 %. El PTX en disolución a una concentración de 40 µM, provoca a las 24 h un descenso de la viabilidad celular a un 70 %, y tras 48 h de tratamiento, el PTX en disolución ya presenta toxicidad en las células MCF-7 puesto que hay una viabilidad celular del 40 % (Figura 47).

Entre las concentraciones de 50 µM y 60 µM, no se observan diferencias estadísticamente significativas; sin embargo a las 24 h, el PTX en disolución a 50 µM mantiene una viabilidad celular por encima del 50 % (Figura 47). Tras 24 h de tratamiento, la viabilidad celular desciende significativamente mostrando valores inferiores al 35 %.

II.2.2. Viabilidad celular en presencia de las NPs obtenidas por Spray Dryer

En la Figura 48, se muestra los resultados de las células tratadas con las NPs obtenidas por Spray Dryer para todas las concentraciones (30 μ M a 60 μ M) y a todos los tiempos.

Las células tratadas con las NPs sin fármaco a las concentraciones de 2,80 – 6,60 mg/ml (equivalente a la necesaria para obtener 30 – 60 μ M de PTX mediante NPs – PTX) no se ven afectadas, se mantiene una viabilidad celular elevada entre 94 % y 108 %. Respecto a las células control no existe ninguna diferencia significativa entre las NPs de PLGA sin fármaco (Figura 48C,E). No obstante, las células tratadas con las NPs de PCL sin fármaco producen un aumento de la viabilidad celular significativo tras las 48 h de tratamiento (109 % – 137 %) (Figura 48A).

En las células tratadas con las NPs de PCL – PTX, se observa un descenso de la viabilidad celular a las 24h de un 80 % para 30 μ M (Figura 48B) que es aproximadamente el mismo efecto que causa el PTX en disolución para esa concentración (Figura 47). Al cabo de las 48 h de tratamiento, las células parecen recuperarse y la viabilidad celular aumenta.

En las células tratadas con las NPs de PLGA 50:50 – PTX para todas sus concentraciones, se produce a las 24 h un descenso brusco de la viabilidad (58 %) (Figura 48D). A las 96 h, la viabilidad celular es de un 25 %. Estos resultados concuerdan con la cinética de liberación.

En las células tratadas con las NPs de PLGA 75:25 – PTX (Figura 48F), se observa una menor toxicidad a las 24 h (78 %) para las concentraciones de 30 μ M y 40 μ M. La viabilidad celular a las concentraciones de 50 μ M y 60 μ M es de un 50 %. A las 48 h, se produce prácticamente la muerte del 90 % de las células tratadas con las NPs de PLGA 75:25 – PTX a todas las concentraciones.

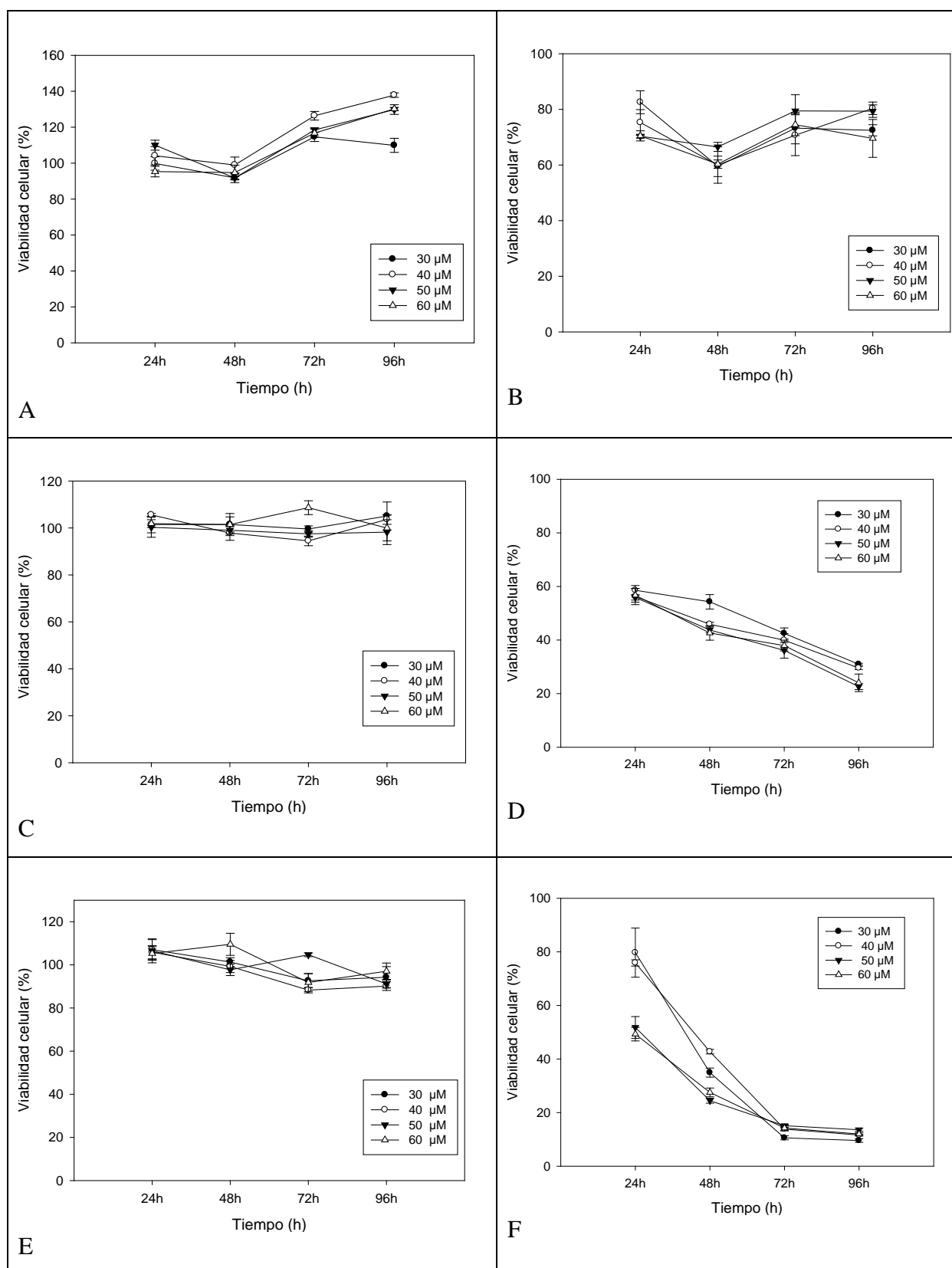


Figura 48. Viabilidad celular de MCF-7 tratadas con las NPs obtenidas por Spray Dryer de A) PCL sin PTX; B) PCL -PTX; C) PLGA 50:50 sin PTX; D) PLGA 50:50 -PTX; E) PLGA 75:25 sin PTX; F) PLGA 75:25 -PTX. Datos expresados Media \pm S.E.M.

II.2.3. Viabilidad celular en presencia de las NPs obtenidas por doble emulsión

Tras tratar las células MCF-7 a todas las concentraciones (30 μ M a 60 μ M) a todos los tiempos con las NPs de PCL, PLGA 50:50 y PLGA 75:25 con y sin PTX obtenidas por doble emulsión se obtuvieron los siguientes resultados (Figura 49).

Como en las NPs obtenidas por Spray Dryer, se observa que el tratamiento con NPs sin PTX no afecta a las células (Figura 49 G,I,K). Sin embargo, en las NPs de PCL se produce un incremento muy significativo de la viabilidad celular que se puede traducir por una proliferación celular al cabo de las 48 h de tratamiento, alcanzando hasta casi un 200 % (Figura 49G).

En las células tratadas con las NPs de PCL – PTX, se observa un descenso de la viabilidad a las 24 h para todas las concentraciones (60 %) que disminuye progresivamente con el tiempo (Figura 49H).

En las células tratadas con las NPs de PLGA 50:50 – PTX, se produce un descenso significativo de la viabilidad celular a las 24 h (58 %) (Figura 49J) disminuyendo progresivamente de forma acusada a las 48 h. A partir de las 48 h, se produce la muerte de un 80 % de las células tratadas con las NPs de PLGA 50:50 – PTX a todas las concentraciones.

En las células tratadas con las NPs de PLGA 75:25 – PTX, se produce un descenso significativo de la viabilidad celular a las 24 h (43 %) para todas las concentraciones (Figura 49L). Esta viabilidad celular se mantiene hasta las 72 h, donde disminuye significativamente a un 29 % para las concentraciones de 50 μ M y 60 μ M (Figura 49L).

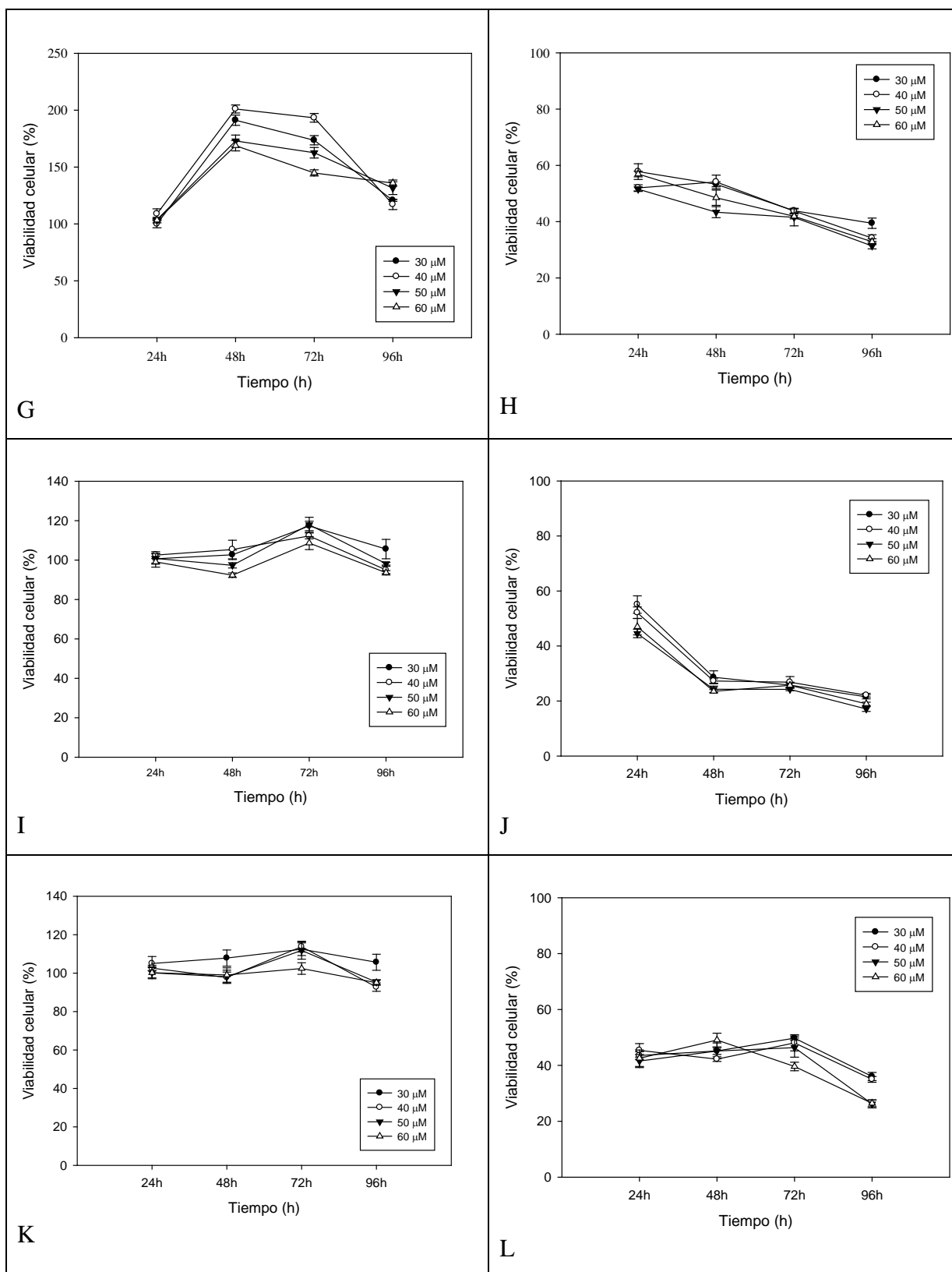


Figura 49. Viabilidad celular de MCF-7 tratadas con las NPs obtenidas por doble emulsión de G) PCL sin PTX; H) PCL -PTX; I) PLGA 50:50 sin PTX; J) PLGA 50:50 - PTX; K) PLGA 75:25 sin PTX; L) PLGA 75:25 - PTX. Datos expresados Media \pm S.E.M.

II.3. Estudio de la muerte celular

II.3.1. Morfología celular

Para determinar los cambios morfológicos producidos en las células de carcinoma humano de mama MCF-7 tras el tratamiento con el PTX en disolución, y con las distintas NPs con y sin fármaco, se llevó a cabo la observación con el microscopio óptico.

La línea celular MCF-7 se caracterizó por presentar una morfología celular epitelial, redondeada y poligonal. El crecimiento de las células fue en monocapa, como agregados irregulares y confluyentes (Figura 50A).

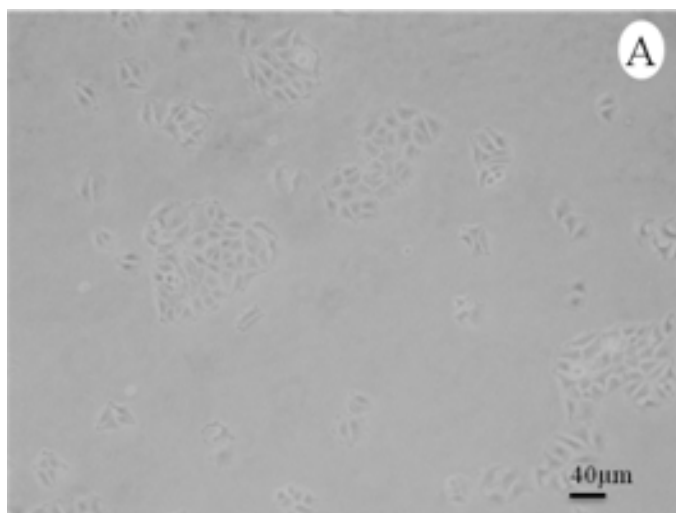


Figura 50. Fotografía de las células MCF-7: A) Células sin tratamiento, al 1 % de FBS.

En las células tratadas con el PTX en disolución a concentraciones de 40 μM y 50 μM (Figura 51 B,C) durante 24 h, se observó una clara morfología poligonal con prolongaciones citoplasmáticas que le confería un aspecto totalmente irregular con tendencia al agrupamiento celular y una alta cantidad de células despegadas o muertas. El resultado de esta observación demostró que el PTX resulta tóxico para las células MCF-7 ya que se observa una deformación de la célula.

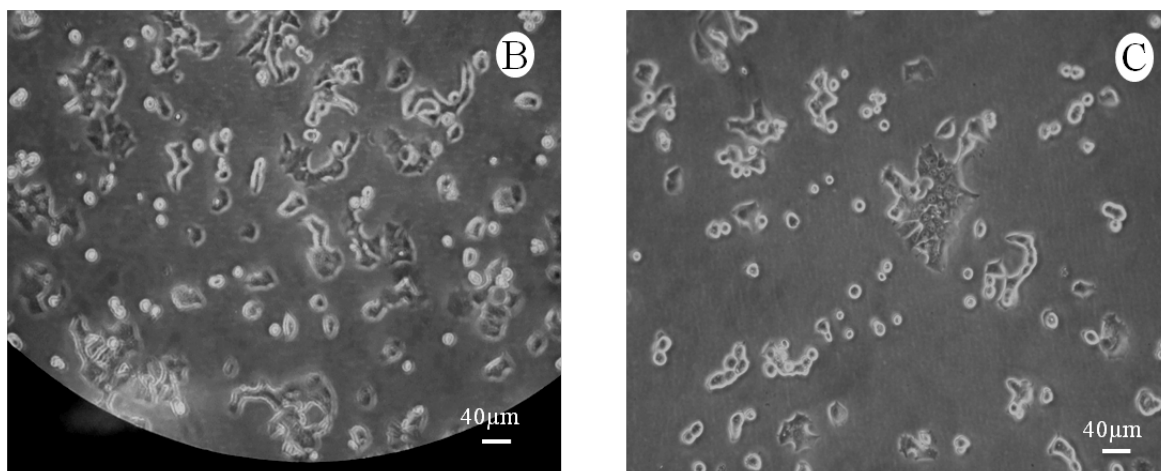


Figura 51. Fotografías de las células MCF-7: B) tratadas con PTX en disolución a 40 μ M y C) tratadas con PTX en disolución a 50 μ M.

A continuación se trataron las células con las NPs con y sin fármaco obtenidas por el Spray Dryer (Figura 52). Las células tratadas con las NPs sin PTX, no mostraron ningún cambio respecto a la morfología natural de la célula (Figura 52 D,F,H). Los puntos brillantes que se pueden apreciar corresponden a las NPs. Entre los distintos polímeros, no se observa ninguna diferencia morfológica lo que indica que los tres polímeros utilizados son citocompatibles.

Sin embargo, las células tratadas con las NPs con PTX durante 24 h, mostraron un crecimiento celular formando agrupamientos esféricos en menor o mayor grado (Figura 52 E,F,G). La morfología de la célula se presenta poligonal y con aspecto irregular y deformado, indicando la presencia de células despegadas o muertas. El PTX liberado desde las NPs obtenidas por el Spray Dryer es efectivo, ya que se produce el mismo efecto que el PTX en disolución.

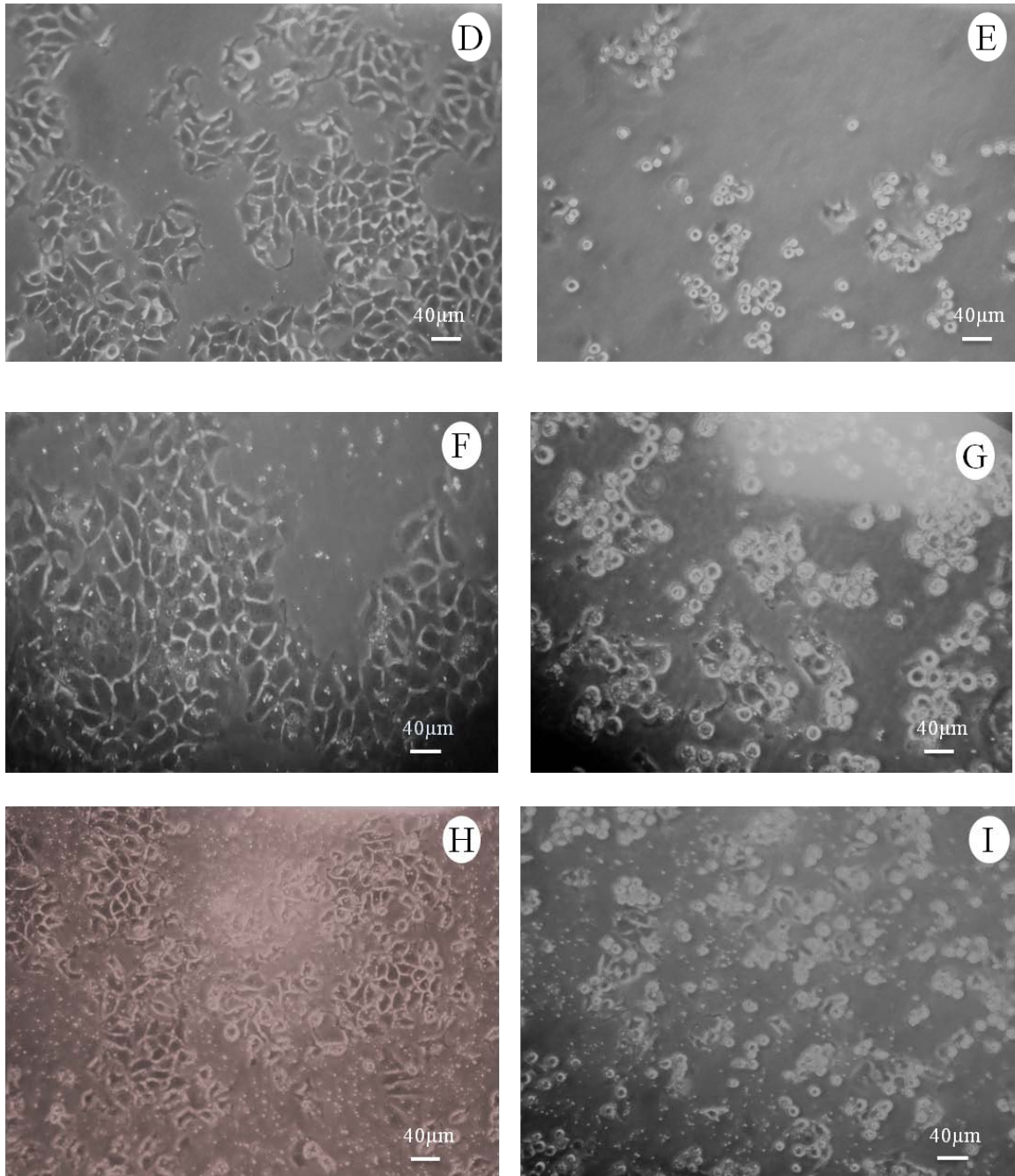


Figura 52. Fotografías de las células MCF-7 tratadas con NPs obtenidas del Spray Dryer: D) PCL sin PTX; E) PCL - PTX; F) PLGA 50:50 sin PTX; G) PLGA 50:50-PTX; H) PLGA 75:25 sin PTX; I) PLGA 75:25 - PTX.

Resultados

En la Figura 53, se muestran los resultados de las células tratadas con las NPs con y sin fármaco obtenidas por la técnica de la doble emulsión.

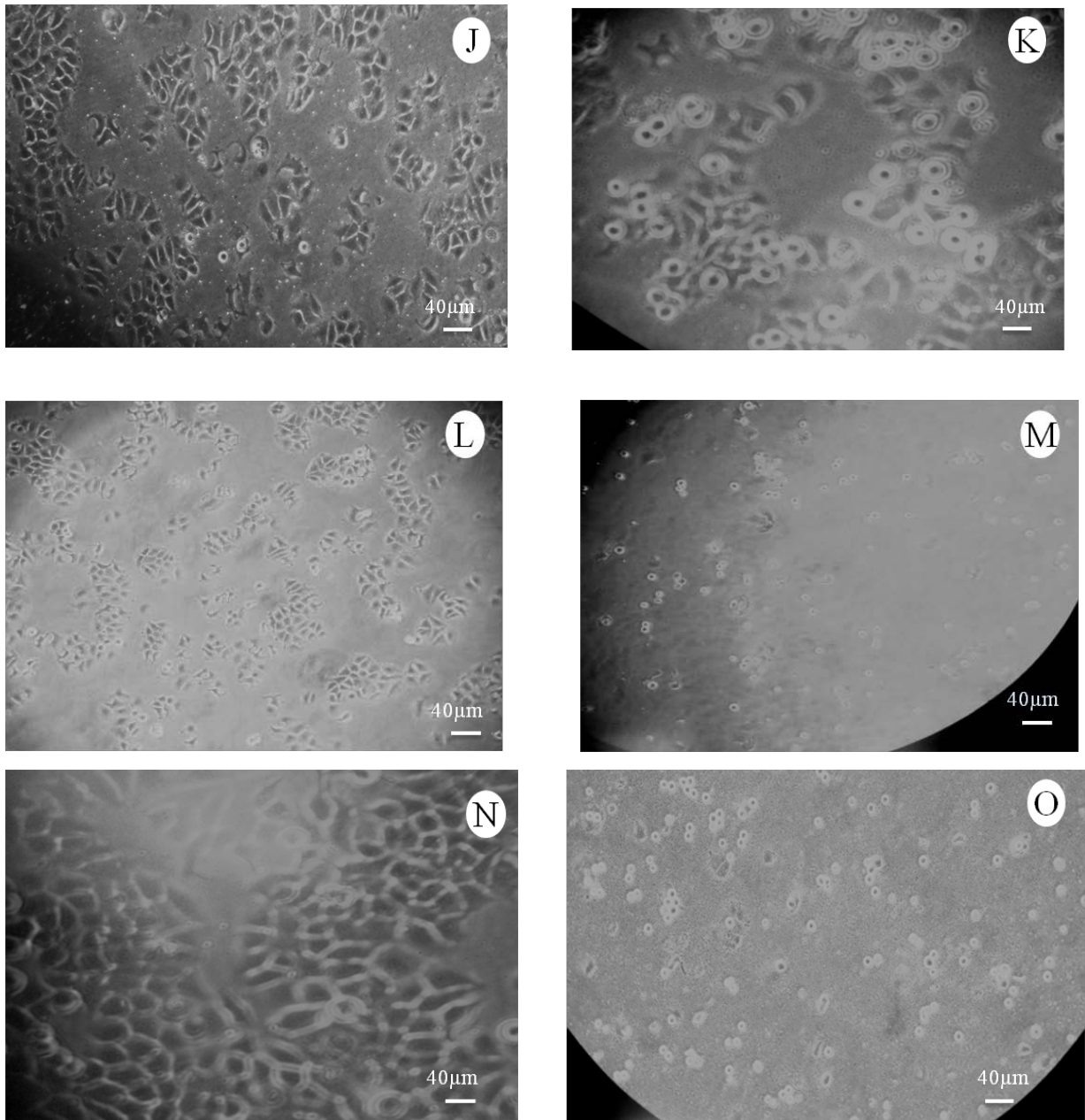


Figura 53. Fotografías de las células MCF-7 tratadas con NPs obtenidas por doble emulsión: J) PCL sin PTX; K) PCL - PTX; L) PLGA 50:50 sin PTX; M) PLGA 50:50-PTX; N) PLGA 75:25 sin PTX; O) PLGA 75:25 - PTX.

En las células tratadas con las NPs sin PTX, no se observa ningún cambio respecto a la morfología natural de la célula. Los puntos brillantes que se pueden

apreciar corresponden a las NPs (Figura 53 J,L,N). No existe diferencia entre los distintos tipos de polímeros utilizados.

Las células tratadas con las NPs con PTX durante 24 h, presentan un aspecto poligonal con las extremidades alargadas y con alguna agrupación de células despegadas o muertas (Figura 53 K,M,O). Al igual que con las NPs obtenidas por el Spray Dryer, las NPs obtenidas por doble emulsión liberan también el PTX de forma efectiva, por producir el mismo efecto que el PTX en disolución.

II.3.2. Estudio de la apoptosis con Anexina V- FITC y Yoduro de Propidio

Una característica de la apoptosis es la externalización de la FS porque se produce antes de la permeabilización de la membrana al IP.

Se realizó la doble con IP y Anexina V- FITC con el fin de analizar la muerte celular por apoptosis y necrosis, tanto en células control sin tratar como en células tratadas con PTX en disolución y con NPs con y sin fármaco. Con el PTX en disolución se utilizaron las concentraciones de 3, 10, 30 y 50 μ M durante 24 h.

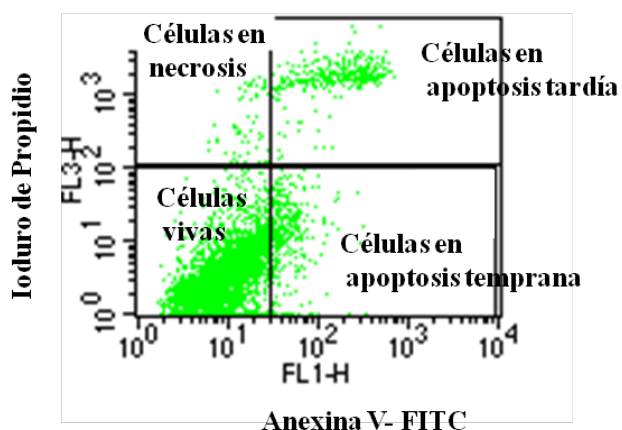


Figura 54. Representación de un Dot plot de las células MCF-7 sin tratar con PTX teñidas con Anexina V-FITC e IP. Cada recuadro muestra como se encuentra la célula.

Se consideró, como muestra la Figura 54, las células vivas como las células no teñidas (A - /IP -); las células en apoptosis: apoptosis temprana (A + /IP -) y tardía (A + /IP +); y las células en necrosis (A - /IP +).

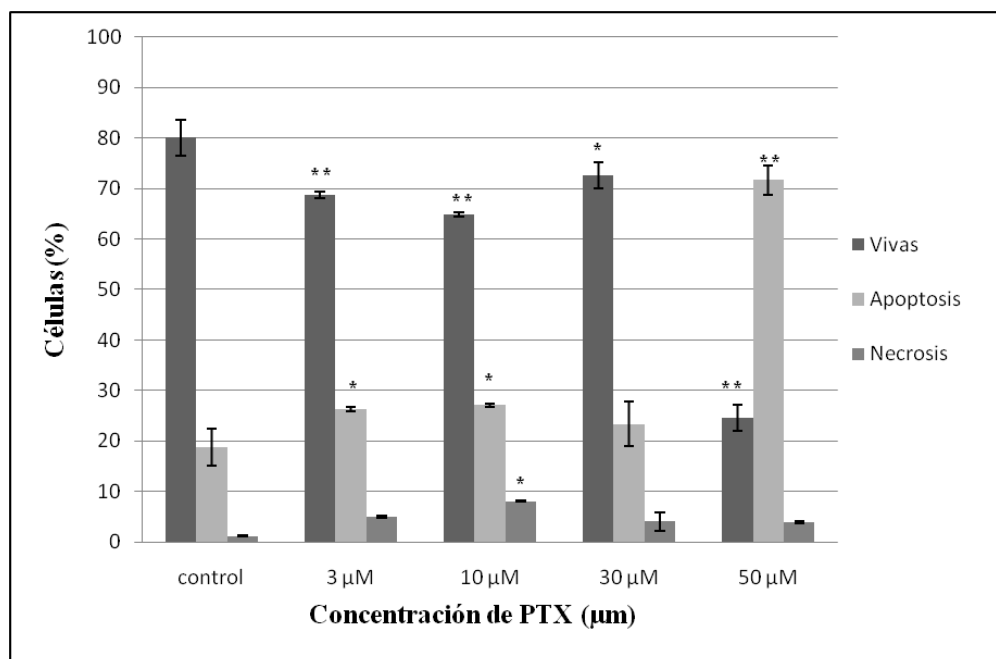


Figura 55. Resultados obtenidos de la tinción con Anexina V-FITC e IP por el citómetro de flujo tras el tratamiento de 24 h en células MCF-7 con PTX en disolución a concentraciones de 3, 10, 30 y 50 μM. Datos expresados Media ± S.E.M. (*) p<0,05; (**) p<0,001 respecto al control.

En las células control tras 24 h de cultivo, el 1 % de las células se encontraban necróticas, el 11 % en apoptosis temprana y el 8 % a apoptosis tardía. En contraste, las células tratadas con PTX en disolución, se observó que la cantidad de células vivas disminuyeron significativamente para las concentraciones de 3, 10 y 30 μM (60 – 70 %) (Figura 55). Las células tratadas con PTX en disolución a 50 μM mostraron un 27 % de células vivas. Se observó que las células en apoptosis aumentaban en función de la concentración, siendo a 50 μM de 70 %, con una mayor cantidad en células en apoptosis tardía (52 %) (Figura 55).

A continuación se trataron las células con las NPs obtenidas por la técnica del Spray Dryer a una concentración de 50 μM durante 24 h (Figura 56).

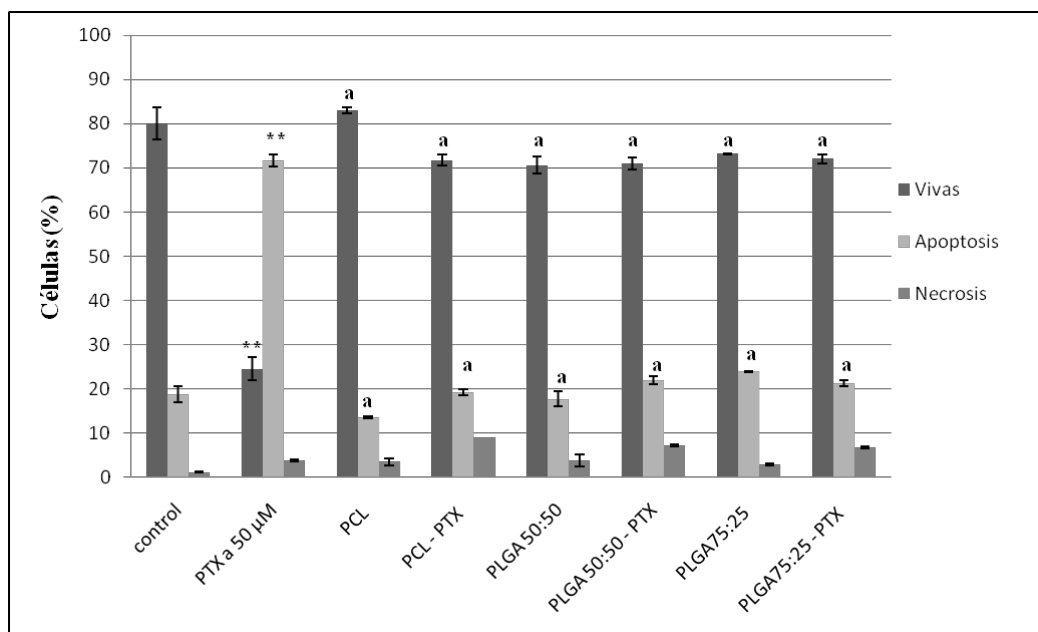


Figura 56. Resultados obtenidos con la tinción de Anexina V-FITC e IP por el citómetro de flujo tras el tratamiento de 24 h en células MCF-7 con NP de Spray Dryer de PCL con y sin PTX, PLGA 50:50 con y sin PTX, y PLGA 75:25 con y sin PTX a 50 µM. Datos expresados Media ± S.E.M. (***) $p < 0,001$ respecto al control; (a) $p < 0,001$, respecto al PTX en disolución a 50 µM.

En las células tratadas con las NPs obtenidas por Spray Dryer a 50 µM (Figura 56), se observó una cantidad elevada de células vivas (70 - 80 %) en comparación con el PTX en disolución a esta misma concentración. Las células tratadas con las NPs con fármaco poseen más células en apoptosis que las NPs sin fármaco. Las NPs de PLGA 50:50 – PTX presentan mayor células en apoptosis (21 %) que las otras NPs ya que presentan mayor toxicidad en las células MCF-7 al cabo de 24 h (Figura 48D).

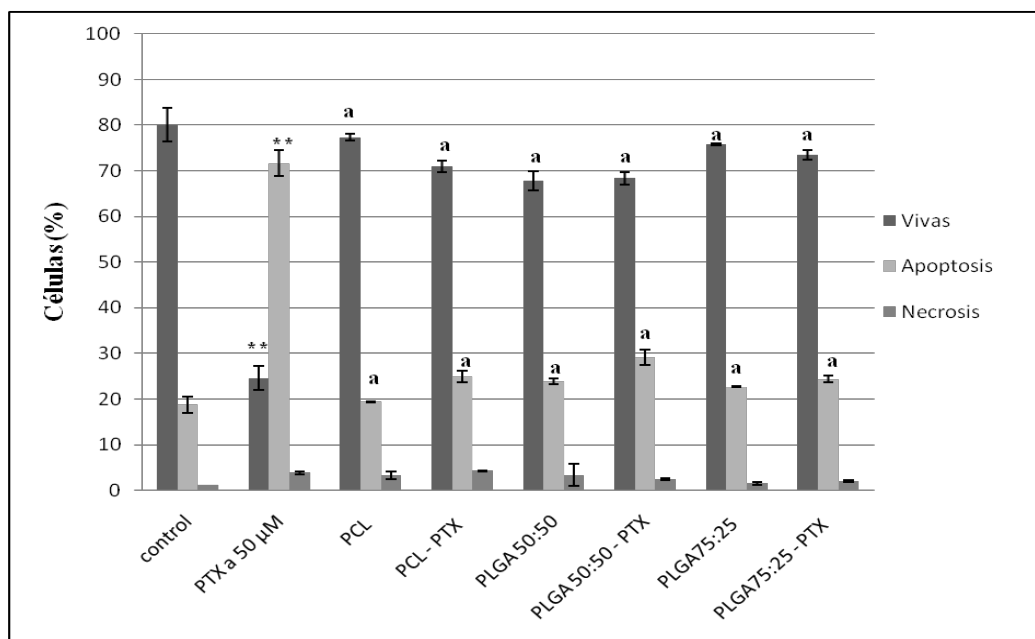


Figura 57. Resultados obtenidos con la tinción de Anexina V-FITC e IP por el citómetro de flujo tras el tratamiento de 24 h en células MCF-7 con NPs de doble emulsión de PCL con y sin PTX, PLGA 50:50 con y sin PTX, y PLGA 75:25 con y sin PTX a 50 µM. Datos expresados Media ± S.E.M. (***) p<0,001 respecto al control; (a) p<0,001, respecto al PTX en disolución a 50 µM.

Las células tratadas con las NPs obtenidas por la técnica de la doble emulsión (Figura 57) presentan los mismos efectos que las tratadas con las NPs obtenidas por Spray Dryer. Las NPs de PLGA 50:50 – PTX ejercen un efecto más apoptótico (28 %) que el resto de las NPs con PTX.

Respecto a las células tratadas con las NPs de Spray Dryer, las NPs de doble emulsión inducen a más células a la apoptosis (19 - 24%) (Figura 57), debido a su pequeño tamaño pueden inducir la muerte celular en mayor proporción.

II.3.3. Análisis del ciclo celular

El análisis del ciclo celular se llevó a cabo en la línea celular MCF-7 por citometría de flujo. Se trataron las células con PTX en disolución a las concentraciones de 10, 30 y 50 µM, y con las distintas NPs a la concentración de 50 µM durante 24 h, teniendo en cuenta como control la línea celular sin tratamiento (Figura 58).

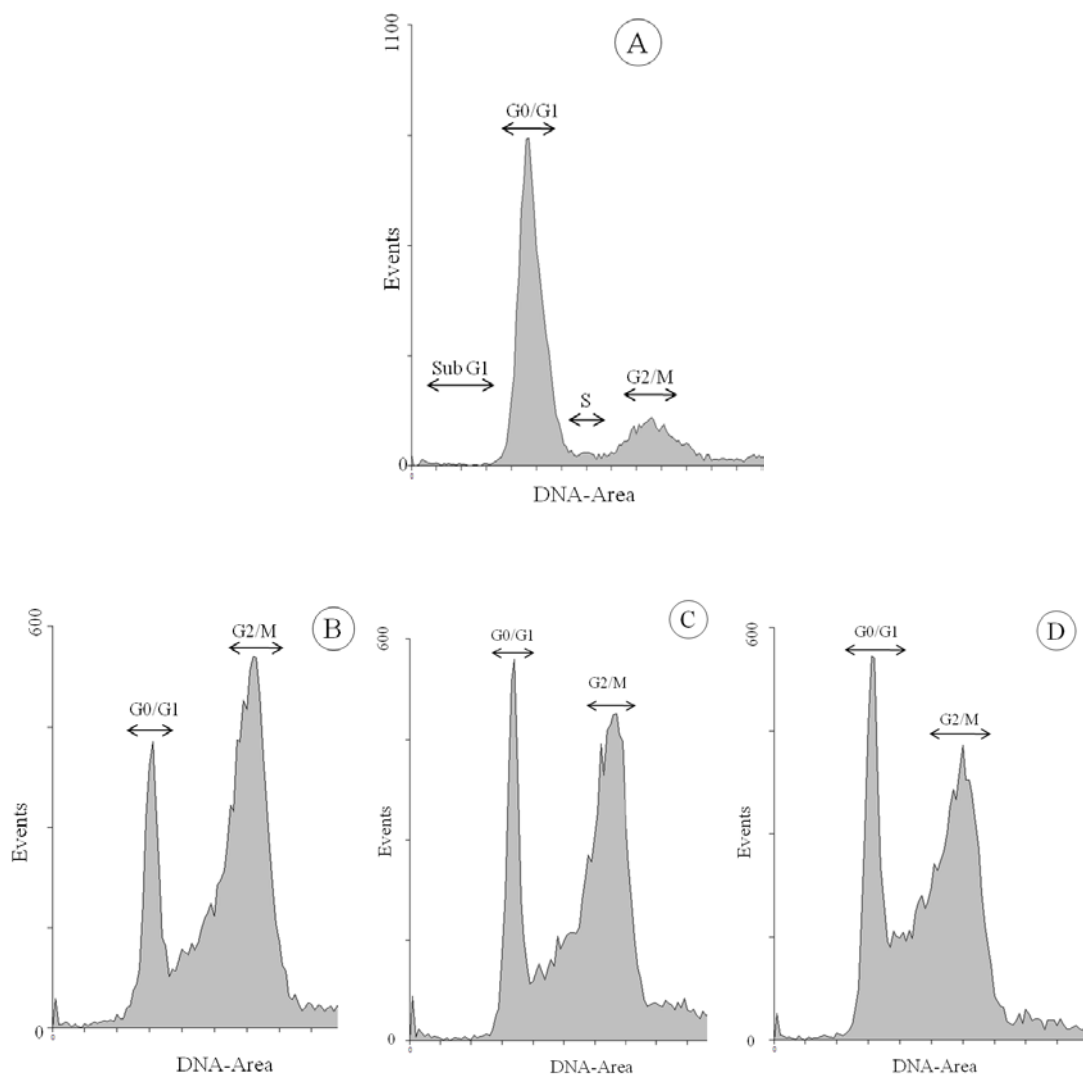


Figura 58. Histogramas del ciclo celular de las células MCF-7 control (A) y tratadas durante 24 h con PTX en disolución a 10 μ M (B), 30 μ M (C) y 50 μ M (D).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 58. El análisis citométrico mostró la existencia de importantes diferencias en la progresión del ciclo celular de las células tratadas con el PTX en disolución comparadas con las células control, en las cuales (Figura 58A), se observó un $77,06 \pm 3,6$ % en la fase G₀/G₁, un $10,46 \pm 1,98$ % en la fase S y un $11,55 \pm 1,81$ % en la fase G₂/M (Tabla 24).

En el caso de las células tratadas con PTX en disolución para las distintas concentración después de 24 h (Figura 58 B,C,D), los porcentajes de células en las

distintas fases del ciclo fueron entre 25 – 29 % en la fase G₀/G₁, 22 – 28 % en la fase S y entre 42 – 52 % en la fase G₂/M (Tabla 24). Se observa por tanto un incremento significativo de células en la fase G₂/M indicando la detención de las células en esta parte del ciclo celular.

Tabla 24. Porcentaje de células MCF-7 en cada fase del ciclo celular (fase sub G₁ (zona de muerte), fase G₀/G₁, fase S y fase G₂/M). Células tratadas con PTX en disolución durante 24 h a 10 μM, 30 μM y 50 μM. Datos expresados Media ± S.E.M.

	Sub G ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
control	1,62 ± 0,50	77,06 ± 3,60	10,46 ± 1,98	11,55 ± 1,81
PTX a 10 μM	3,26 ± 1,95	25,12 ± 3,92	23,13 ± 1,76	51,48 ± 4,44
PTX a 30 μM	2,35 ± 1,47	26,26 ± 0,68	22,94 ± 3,75	49,17 ± 5,65
PTX a 50 μM	0,88 ± 0,21	28,53 ± 0,27	28,07 ± 1,01	42,63 ± 1,81

Para verificar la efectividad del PTX liberado desde las NPs, se trataron las células con las NPs con y sin fármaco obtenidas por ambas técnicas durante 24 h a una concentración de 50 μM (Figura 59).

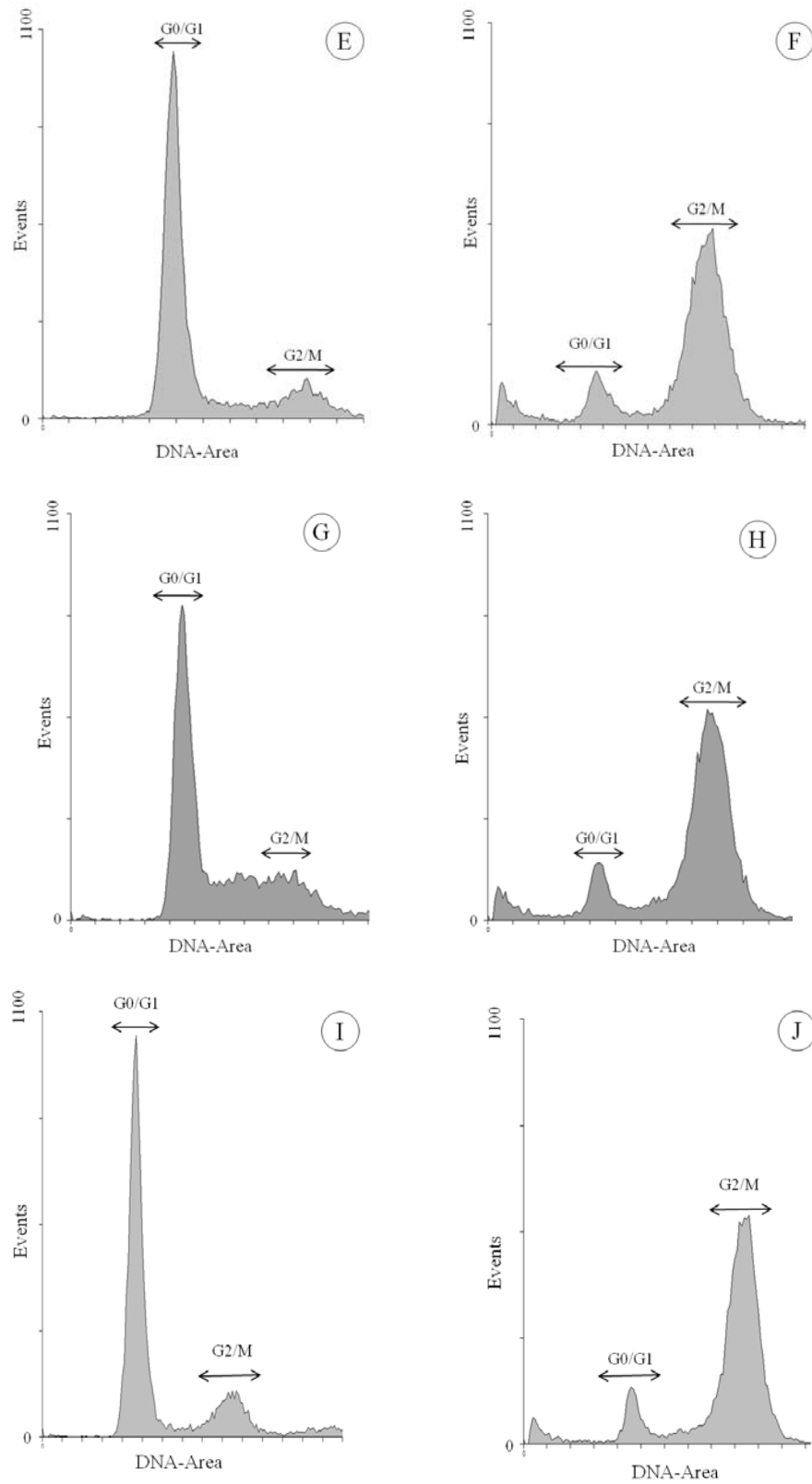


Figura 59. Histogramas del ciclo celular de las células MCF-7. Células tratadas con las NPs obtenidas por Spray Dryer durante 24 h a 50 μ M, E) PCL sin PTX; F) PCL - PTX; G) PLGA 50:50 sin PTX; H) PLGA 50:50 - PTX; I) PLGA 75:25 sin PTX; J) PLGA 75:25 - PTX.

Resultados

Las NPs sin PTX obtenidas por Spray Dryer no afectan el curso del ciclo celular de las células MCF-7 (Figura 59 E,G,I), presentan un porcentaje de células entre 61 – 70 % en la fase G₀/G₁, 7 - 15 % en la fase S y 13 - 22 % en la fase G₂/M (Tabla 25). Estos valores son similares a los obtenidos en las células control.

Sin embargo, al tratar las células con las NPs con PTX (Figura 59 F,H,J), se observó un incremento significativo en la fase G₂/M con un valor entre 70 – 84 % (Tabla 59), mostrando un acúmulo de células en esta fase, característico de la acción del PTX. El PTX encapsulado es liberado eficazmente desde las NPs ejerciendo su acción, y provocando la detención de las células en la fase G₂/M del ciclo celular. Entre los distintos polímeros de las NPs no se observaron diferencias significativas en el número de células paradas en las fase G₂/M.

Tabla 25. Porcentaje de células MCF-7 en cada fase del ciclo celular (fase sub G₁ (zona de muerte), fase G₀/G₁, fase S y fase G₂/M). Células tratadas con las NPs obtenidas por el Spray Dryer con y sin PTX durante 24 h a 50 µM. Datos expresados Media ± S.E.M.

	Sub G ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
control	1,62 ± 0,50	77,06 ± 3,60	10,46 ± 1,98	11,55 ± 1,81
PCL	1,70 ± 0,27	71,59 ± 1,63	11,89 ± 1,50	16,10 ± 1,03
PCL - PTX	4,66 ± 1,37	17,14 ± 5,95	10,48 ± 0,76	70,45 ± 9,59
PLGA 50:50	0,44 ± 0,11	61,85 ± 0,29	15,87 ± 0,50	22,04 ± 1,40
PLGA 50:50 – PTX	5,27 ± 2,67	12,69 ± 1,21	8,16 ± 2,57	74,84 ± 6,03
PLGA 75:25	0,37 ± 0,06	79,64 ± 0,73	7,85 ± 1,79	13,01 ± 0,36
PLGA 75:25 - PTX	1,62 ± 0,31	10,16 ± 0,26	4,73 ± 0,61	83,44 ± 1,03

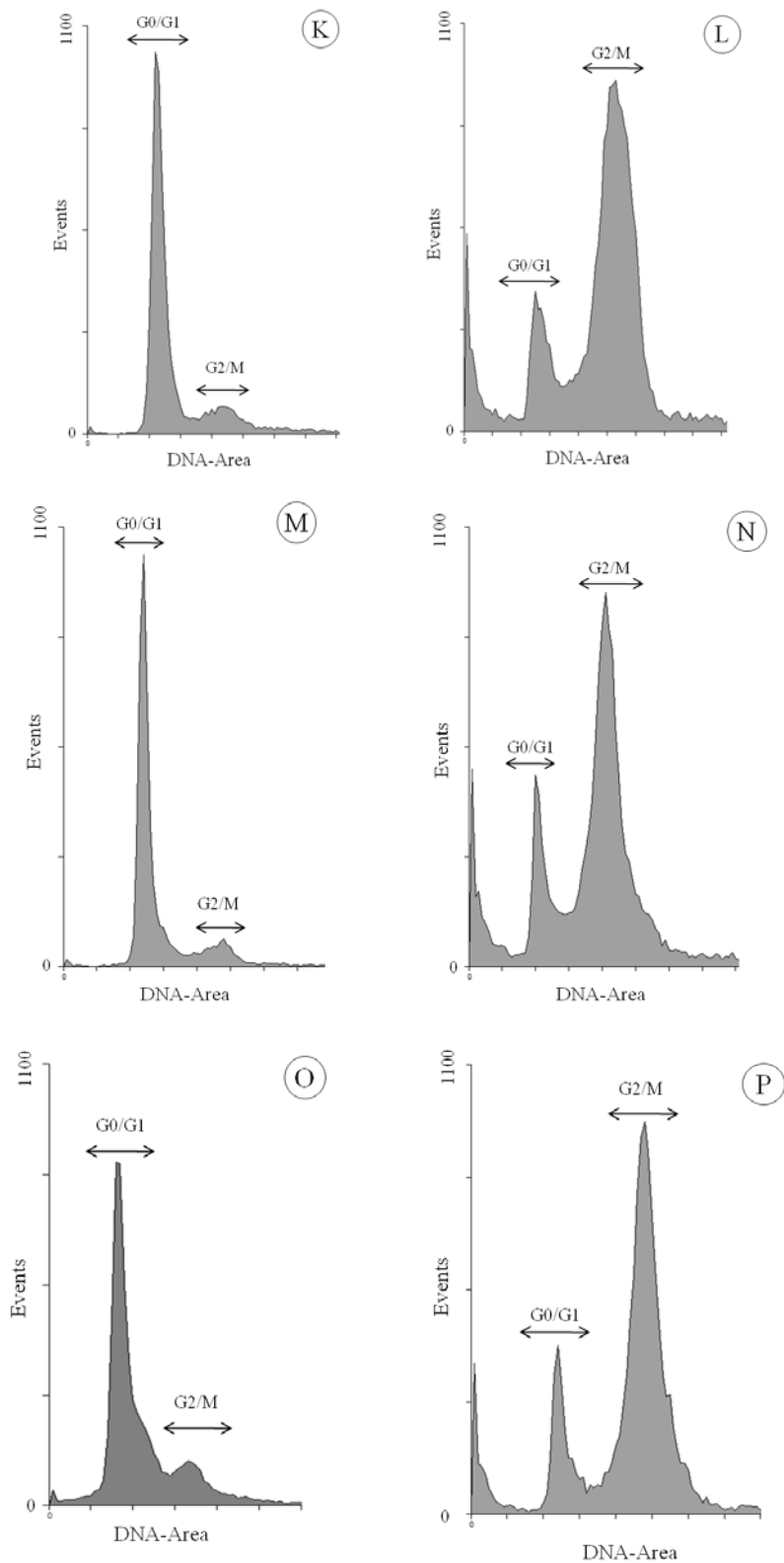


Figura 60. Histogramas del ciclo celular de las células MCF-7. Células tratadas con las NPs obtenidas por doble emulsión durante 24 h a 50 μ M, K) PCL sin PTX; L) PCL - PTX; M) PLGA 50:50 sin PTX; N) PLGA 50:50 - PTX; O) PLGA 75:25 sin PTX; P) PLGA 75:25 - PTX.

Al igual que las NPs del Spray Dryer, las células tratadas con las NPs de doble emulsión sin fármaco presentan un ciclo celular normal sin que se vea afectada ninguna fase (Figura 60 K,M,O).

En el caso de las células tratadas con las NPs con PTX (Figura 60 L,N,P), los porcentajes de las células en la fase G₂/M del ciclo celular aumentaron significativamente en un intervalo entre 69 – 74 % (Tabla 26). Este aumento significativo de células en esta fase respecto a las células control, manifiesta el efecto que ejerce el PTX liberado desde las NPs sobre las células.

Tabla 26. Porcentaje de células MCF-7 en cada fase del ciclo celular (fase sub G₁ (zona de muerte), fase G₀/G₁, fase S y fase G₂/M). Células tratadas con las NPs obtenidas por doble emulsión con y sin PTX durante 24 h a 50 μM. Datos expresados Media ± S.E.M.

	Sub G ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
control	1,62 ± 0,50	77,06 ± 3,60	10,46 ± 1,98	11,55 ± 1,81
PCL	1,13 ± 0,33	66,45 ± 3,56	22,1 ± 4,43	11,24 ± 0,64
PCL - PTX	4,73 ± 0,25	12,70 ± 1,21	10,08 ± 1,58	73,32 ± 0,56
PLGA 50:50	1,02 ± 0,26	78,15 ± 3,71	14,47 ± 1,31	12,59 ± 0,40
PLGA 50:50 – PTX	2,65 ± 0,40	14,5 ± 1,60	12,36 ± 1,83	69,74 ± 3,08
PLGA 75:25	2,40 ± 0,79	57,39 ± 1,08	30,16 ± 1,69	14,18 ± 0,97
PLGA 75:25 - PTX	2,33 ± 0,16	8,19 ± 3,56	11,79 ± 2,48	73,93 ± 1,62

DISCUSIÓN



El Paclitaxel (PTX) constituye uno de los compuestos antineoplásicos de origen natural más prometedor de los últimos años. A pesar de sus efectos adversos, está indicado en numerosas terapias de cáncer; solo o bien en combinación con otros tipos de antineoplásicos. Por ejemplo, para el tratamiento de cáncer de mama no metastásico se utiliza en monoterapia el PTX en un ciclo de 28 días; o bien en un tratamiento combinatorio de PTX y Capecitabina en ciclo de 21 días.

A diferencia de otros antineoplásicos de origen natural, el PTX estabiliza la formación de microtúbulos (MTs) al unirse con la β -tubulina formándose estructuras microtubulares anormales e inhibiendo por tanto la replicación celular (McGrogan y cols, 2008).

Al tratarse de un compuesto tan hidrófobo, ha de disolverse en un disolvente llamado Cremophor EL (CrEL), para su posterior administración intravenosa. Este surfactante, presenta numerosos efectos secundarios (reacciones de hipersensibilidad) que son concentración-dependiente. Estos efectos adversos se han ido solucionando por medio de una medicación previa al tratamiento con el antineoplásico, como son los corticoesteroides. Por este motivo, se ha ido investigando nuevas formulaciones farmacéuticas, con el fin de evitar cualquier tipo de efectos adversos por el surfactante donde se encuentra diluido el PTX.

La nanotecnología es el futuro en la nanomedicina y se han ido creando nuevas formulaciones como liposomas, microesferas, dendrímeros, nanopartículas (NPs)...etc. Desde hace unos años, se ha comercializado Abraxane[®] (Abraxis Bioscience, Inc.), una nueva formulación de NPs de PTX con albúmina, aprobada por la FDA en 2005. Abraxane[®] en monoterapia está indicado en el tratamiento del cáncer de mama metastásico en pacientes adultos en los que haya fracasado el tratamiento en primera línea de la enfermedad metastásica y para los que no esté indicada la terapia estándar con antraciclina.

En este estudio, se han preparado NPs de PTX con polímeros biodegradables, biocompatibles y sobre todo no tóxicos para el organismo vivo. Se emplearon dos técnicas de preparación de NPs, por atomización y secado (Spray Dryer) y por doble emulsión, entre las que se obtuvieron diferencias significativas. Todos los ensayos *in*

vitro aquí realizados permiten caracterizar y evaluar las NPs obtenidas y así seleccionar las más adecuadas para emplearlas en un futuro modelo *in vivo*. A diferencia de trabajar con los modelos *in vivo*, trabajar con líneas celulares permite emplear un mayor número de muestras y hacer una primera relación en función de los resultados más óptimos.

El objetivo de la optimización de las técnicas de preparación de NPs es el poder determinar una serie de parámetros adecuados para la obtención de estos sistemas como son un pequeño tamaño de partícula, una eficiencia de encapsulación (EE) elevada y una morfología adecuada. Estas características facilitarían la administración de fármacos por vía parenteral.

La técnica de atomización y secado utilizada en este trabajo, es una técnica de uso habitual en cuanto al aspecto industrial farmacéutico usada desde los años 40. Es un método útil para la microencapsulación de fármacos, permite obtener sistemas micro y nanopartículas cuyo tamaño y forma pueda controlarse. Además, es notable resaltar que se pueden obtener numerosos tipos de formulación (microencapsulación) solamente en una etapa, en comparación con la técnica de la doble emulsión. Además, es una técnica muy efectiva para fármacos sensibles al calor, como los de tipo proteico, ya que existe una pérdida mínima de su actividad (Broadhead y cols, 1992). Puesto que la formulación de fármacos hidrófobos es un reto por su baja solubilidad y por tanto su disolución, la técnica del Spray Dryer tiene como ventaja la posibilidad de encapsular fármacos hidrófobos y aumentar su disolución, tal es el caso de la tolbutamida (Takeuchi y cols, 1987a) o la bupivacaina (Montanari y cols, 2003), que por otras técnicas sería imposible.

En la literatura, hay un número relativamente escaso de estudios de microencapsulación del PTX por la técnica de Spray Dryer, ya que esta supone un reto a la hora de producir partículas suficientemente pequeñas y obtener una EE del fármaco elevada.

Para la preparación de NPs tanto por la técnica de doble emulsión como por atomización y secado, se escogió como disolvente orgánico el diclorometano (DCM). Aparte de ser un buen disolvente orgánico para los polímeros utilizado (PCL, PLGA 50:50 y PLGA 75:25), tiene un punto de ebullición bajo de 39,8 °C. Según la

clasificación ICH, es un disolvente de segunda clase y su administración es limitada (PDE 6 mg/día concentración límite 600 ppm). Está considerado como uno de los disolventes halogenados que causa menor toxicidad (Jones, 1996). El PTX se disuelve muy bien en el DCM, lo que ayuda a obtener una disolución homogénea en la mezcla polimérica.

Con el fin de optimizar el sistema y encontrar los parámetros idóneos para la preparación de NPs por la técnica de atomización y secado, se prepararon nueve muestras de partículas.

Los parámetros del Spray Dryer se fueron variando en función de los resultados que se querían obtener. Previamente, en nuestro grupo de investigación, se había preparado NPs de PCL con un diámetro medio de $1,4 \pm 0,7 \mu\text{m}$ cuando la concentración polimérica era de 2 % (p/v), el flujo de aire 700 NI/h y la bomba 5 ml/min (16 %) (Sastre y cols, 2004). A la vista de tales resultados, se varió los valores del flujo de aire y de la bomba (Tabla 4), hasta que se consiguió obtener partículas de PCL más pequeñas ($0,75 \pm 0,03 \mu\text{m}$) con un flujo de aire a 800 NI/h y una bomba a 16 % (5 ml/min).

En el caso de las partículas de PLGA, al igual que con las de PCL, se realizó un primer ensayo con una concentración polimérica del 1 % (p/v); al ver que las partículas no presentaban un aspecto esférico, se seleccionó una concentración mayor (2 % p/v). Al tener establecida la concentración polimérica, se fue variando los parámetros de flujo de aire y de la bomba del Spray Dryer. Se ha visto que a un valor de 700 NI/h de flujo de aire, Mu y Feng (2001) obtuvieron partículas de PLGA 75:25 de diámetro medio de $1,19 \pm 0,08 \mu\text{m}$. Según Blanco y cols (2005), el aumento del flujo de aire a 800 NI/h conduce a la obtención de partículas más pequeñas. Por tanto, al aumentar el flujo de aire a 800 NI/h y disminuir el valor de la bomba a 5 %, se obtuvieron partículas de PLGA 50:50 y PLGA 75:25 de diámetro medio de $0,69 \pm 0,02 \mu\text{m}$ y $0,78 \pm 0,02 \mu\text{m}$, respectivamente (Tabla 5-6).

Una vez establecidos los parámetros del Spray Dryer para la obtención de partículas sin fármaco. Se incorporó el PTX. La inclusión del fármaco en las NPs de Spray Dryer provocó un aumento del diámetro medio de la partícula. Las NPs de PCL

obtenidas en nuestro estudio presentaron un tamaño de $0,75 \pm 0,03 \mu\text{m}$ sin PTX, y con PTX de $0,94 \pm 0,03 \mu\text{m}$ (Tabla 14). Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Blanco y cols (2003), donde obtuvieron unas microesferas de PCL $1,4 \pm 0,7 \mu\text{m}$ y al incorporar el fármaco (bupivacaina) aumentó hasta $2,2 \pm 0,8 \mu\text{m}$. De igual modo sucedió con las NPs de PLGA, ya que pasaron, por ejemplo para las NPs de PLGA 75:25, de un tamaño de $0,78 \pm 0,02 \mu\text{m}$ sin fármaco a $1,03 \pm 0,02 \mu\text{m}$ con fármaco (Tabla 14). Estudios realizados por Mu y Feng (2001), obtuvieron también un aumento del tamaño de la partícula al incorporar el PTX en las partículas de PLGA 75:25, $1,60 \pm 0,08 \mu\text{m}$ con fármaco y $1,10 \pm 0,08 \mu\text{m}$ sin fármaco.

Con parámetros similares a los utilizados en nuestro estudio pero empleando un flujo de aire inferior (700 Nl/h), se han descrito partículas esféricas y lisas pero demasiado grandes, con un diámetro entre 1-8 μm (Liu y cols, 2007). Sin embargo, al incorporar algún tipo de emulsificante como el PEG (polietilenglicol) o vitamina E TPGS (succinato ácido del polietilen glicol 1000), se consigue que el diámetro final de la partícula disminuya y alcance valores entre 0,88 y 2,44 μm (Mu y cols, 2005). En nuestros experimentos, no fue necesario el empleo de ningún tipo de emulsificantes ya que se consiguió obtener un alto porcentaje de partículas en la escala nanométrica (> 60 %) (Tabla 14).

Las partículas con menor diámetro obtenidas en este trabajo son sin duda las preparadas mediante la técnica de extracción y evaporación del disolvente, la técnica de la doble emulsión (w/o/w; agua en aceite en agua). Se obtuvieron tamaños de diámetro en la escala nanométrica con valores medios entre 223 nm en NPs de PLGA 75:25, 246 nm en NPs de PLGA 50:50 y 270 nm en NPs de PCL (Tabla 15).

Al igual que con las NPs obtenidas por Spray Dryer, la inclusión del fármaco provocó un aumento del tamaño de las partículas. Se obtuvo un diámetro medio de NPs de PLGA 50:50 de 246 nm y al incorporar el fármaco, aumentó a 274 nm (Tabla 15). El aumento del tamaño de la partícula causado por la incorporación del fármaco, concuerda con los resultados realizados por Kim y cols (2008), que consiguieron NPs de PLGA50:50 de $202 \pm 3 \text{ nm}$ y con fármaco de $212 \pm 4 \text{ nm}$.

Para la obtención de NPs de poliéster con PTX, se ha utilizado distintas técnicas de emulsión. Utilizando la simple emulsión (o/w; aceite en agua), Jin y cols (2007), obtuvieron un tamaño medio de diámetro de 500 nm en NPs de PLGA 50:50 - PTX. En estudios posteriores, Jin y cols, consiguieron disminuir el diámetro medio de las NPs a 318 ± 5 nm (Jin y cols, 2009); aun así, las NPs obtenidas por dichos autores son de mayor tamaño que las obtenidas en este trabajo. En otros estudios con PTX pero con otro tipo de polímero (PLLA: poli ácido-L-láctico), obtuvieron partículas con una distribución de tamaños entre 1 - 40 μ m y 30 - 120 μ m (Liggins y cols, 2000). Danhier y cols (2009), por medio de la técnica de la simple emulsión, prepararon partículas de PLGA 50:50 y PCL sin y con PTX, incluyendo también en la formulación polimérica el PEG, y obtuvieron diámetros medios de 190 ± 2 nm.

Otros estudios evalúan el efecto del tipo de emulsificante utilizado, su concentración sobre el tamaño de partículas y sobre la EE (Feng y cols, 2004). Feng y cols ensayaron con distintas concentración de PVA; al 2 % (p/v) obtuvieron NPs de PLGA (75:25 y 50:50) con PTX de diámetro medio 974 ± 41 nm y una EE de 40,2 %. Cuando el PVA se incrementó al 4 % (p/v), el diámetro disminuyó ligeramente a 801 ± 38 nm, y la EE descendió considerablemente a 22,9 %, lo cual demuestra que a mayor concentración del emulsificante menor EE. Sin embargo, los estudios con DPPC (dipalmitoil-fosfatidil-colina) (0,06 % p/v) y TPGS (0,025 % p/v) dieron como resultado NPs de PLGA con PTX de diámetro medio 571 ± 89 nm y 685 ± 39 nm, respectivamente, y una EE de 44,9 % y 100 %, respectivamente. Es importante obtener el máximo de EE puesto que el PTX es un fármaco excesivamente costoso. Nuestros resultados mostraron una EE elevada, del 75 % al 100 % (Tabla 17), al igual que en otros estudios realizados con NPs de PLGA 50:50 – PTX donde la EE era del 85,5 % (Jin y cols, 2007; Jin y cols, 2009).

En cuanto a los emulsificantes, el TPGS y los fosfolípidos, presentan alguna ventaja más que el PVA, ya que no es necesario una eliminación tan exhaustiva tras la obtención de las NPs. Sin embargo, el PVA es el emulsificante más utilizado por su capacidad en estabilizar la emulsión, ya que ayuda a obtener partículas pequeñas y con una distribución de tamaños uniforme. No obstante, la PVA ha der eliminado, ya que el PVA residual podría interferir en algunas propiedades de las NPs como son el potencial

Z, la distribución de tamaños, la EE o la liberación *in vitro* del fármaco. Por tanto, el PVA residual es un parámetro que puede modular las propiedades de las partículas obtenidas (Sahoo y cols, 2002).

En cuanto a la EE de PTX en las NPs obtenidas por Spray Dryer, fue superior al 75 % en todas las NPs sintetizadas (Tabla 16). Una EE elevada fue debida a la buena solubilidad que presentaba los polímeros y el fármaco en el DCM (Blanco y cols, 2003). En otros estudios (Mu y Feng, 2001; Mu y cols, 2005; Liu y cols, 2007), obtuvieron EE superiores a 60 % usando el mismo disolvente orgánico que en nuestro trabajo, el DCM. Sin embargo, en estudios donde el fármaco no era soluble en el disolvente utilizado, se obtuvieron EE bajas (Blanco-Prieto y cols, 1999; Murillo y cols, 2002).

El aspecto morfológico de los sistemas preparados por Spray Dryer observado en las fotografías obtenidas por FEG-SEM muestran unas partículas de PCL, PLGA 50:50 y PLGA 75:25, pequeñas, de superficie lisa y ligeramente porosa (Figura 25-26-27), lo cual es una característica de las partículas obtenidas por la técnica de atomización y secado (Baras y cols, 2000). La formación de partículas por esta técnica conduce a la formación de poros facilitando la entrada del medio acuoso, para que, posteriormente, la difusión del fármaco sea favorable (Mu y Feng, 2001). Entre las partículas con y sin fármaco, no se observaron diferencias morfológicas, presentando de igual modo esta porosidad característica. En cambio, las NPs obtenidas por doble emulsión, son aun más pequeñas, más esféricas y lisas, y carecen de poros, lo que concuerda con todos los estudios realizados por otros autores (Feng y cols, 2004; Kim y cols, 2008).

Se evaluó la estabilidad térmica de las NPs con y sin fármaco para ambas formulaciones, y entre ellas no se observó ningún cambio (Figura 33-34). El PTX puro se degradó en una etapa correspondiente a una temperatura máxima de 254,5 °C. Las NPs de PLGA 75:25 y PCL se degradaron también en una sola etapa a temperaturas de 303,89 °C y 404,53 °C, respectivamente (Tabla 18); sin embargo, las NPs de PLGA 50:50 mostraron dos etapas a 321,44 °C y 363,52 °C (Tabla 18). Estos resultados concuerdan con los hallados por Penco y colaboradores (Penco y cols, 2000; D'Antone y cols, 2001) que estudian la degradación térmica de PLGA 50:50 y PLGA 75:25 a una

velocidad de 20 °C/min. La presencia del PTX en las NPs de PCL no interfirió en la degradación térmica; no obstante, en las NPs de PLGA 75:25 – PTX tuvo lugar a una temperatura mayor que las NPs sin fármaco. En las NPs de PLGA 50:50 – PTX, el fármaco modificó las etapas de degradación, que se produce en una sola etapa que corresponde a la temperatura de la segunda etapa observada en las NPs de PLGA 50:50 sin fármaco. Aunque la degradación térmica del PTX tuvo lugar a una temperatura menor que la de los polímeros, no se observó ningún pico de degradación en las NPs con fármaco, lo cual se puede explicar por la pequeña proporción correspondiente de fármaco en las NPs (Silva-Junior y cols, 2008). De forma similar a como ha sido descrito, las NPs obtenidas por doble emulsión muestran las mismas características en la degradación térmica que las NPs obtenidas por Spray Dryer.

La liberación *in vitro* del fármaco en un medio de liberación acuoso se estudió durante 841 h (35 días). En este tiempo, se alcanzó el máximo liberado, y la cantidad liberada se calculó considerando el factor de extracción (FE). En nuestro estudio, desde las NPs obtenidas por Spray Dryer, obtuvimos una liberación total del 60 % del fármaco encapsulado desde las NPs de PLGA 50:50, y de un 44,34 % desde las de PLGA 75:25 (Figura 35), esta diferencia de liberación se puede explicar por el carácter más hidrófobo del polímero PLGA 75:25 que dificulta la salida del fármaco. Desde las NPs de PCL, la liberación del PTX fue aproximadamente el 100 %. En estudios realizados por otros investigadores, se liberó un 33 % del PTX encapsulado desde las NPs de PLGA 75:25 (Mu y Feng, 2001) y un 29 % desde las NPs de PLGA 50:50 (Mu y cols, 2005). Las diferencias de liberación del fármaco entre un estudio y otro, están condicionadas por el tamaño de la partícula, al ser menor se liberará más rápidamente, la concentración polimérica de partida y el tipo de polímero utilizado.

La primera etapa de liberación del PTX está controlada por un proceso de difusión, el fármaco situado en la superficie de las partículas se libera rápidamente. Cuando observamos las NPs de PCL, no hay que olvidar que la PCL es un polímero semi-cristalino, que posee una parte amorfa y otra cristalina que contribuyen a una liberación más rápida del fármaco que la observada desde las NPs de PLGA durante las primeras horas, ya que la distribución del PTX no es totalmente homogénea (Sastre y cols, 2004). Además, se ha observado el aumento del porcentaje de cristalinidad del

polímero durante la degradación de las NPs de PCL (Sastre y cols, 2004) y puede conllevar a una liberación del PTX más rápida, como la que se observó durante las primeras 48 h (Tabla 20). A partir de las 56 h, se ha observado una liberación más lenta de PTX desde las NPs de PCL, que se produciría como consecuencia de la degradación por hidrólisis de los enlaces ester del polímero, que tienen lugar preferentemente en las regiones amorfas del mismo.

Comparando las NPs de PLGA, las diferencias entre ambas composiciones se deben al carácter más hidrófilo del PLGA 50:50. Se ha observado que la velocidad de degradación decrece proporcionalmente cuando aumenta el porcentaje del ácido láctico en el polímero (Blanco y cols, 2006). La degradación de estos poliésteres se debe a la hidrólisis de los enlaces ester de la cadena polimérica; sin embargo diferencias en la hidrofobicidad determinan la velocidad de degradación *in vitro*. Por tanto, cuanto más alto sea el porcentaje de ácido glicólico en el copolímero mayor será el carácter hidrofílico de las partículas, y como consecuencia captarán más agua y se verá favorecida la hidrólisis de las uniones ester (Blanco y cols, 2006). Otro parámetro que puede condicionar la liberación del fármaco es que exista una lenta difusión de éste en el medio acuoso desde un polímero de alto peso molecular (Wang y cols, 1996). Entre las NPs de PLGA la liberación más lenta del fármaco se da desde las de PLGA 75:25, el que corresponde con el peso molecular más alto ($M_n = 36100$). Por otro lado, se conoce que la liberación desde NPs de polímeros de bajo peso molecular es más rápida, y este hecho también contribuirá a que la liberación de PTX sea más rápida desde las NPs de PLGA 50:50 ($M_n = 21700$).

La difusión del fármaco desde las matrices poliméricas depende de las características del fármaco y del material polimérico. Diversos estudios ponen de manifiesto que existen tres mecanismos básicos en la liberación del fármaco desde sistemas poliméricos: hinchamiento, difusión y degradación. La hidrofilia del polímero determinará la rapidez con la que el agua penetra durante la liberación. Cuando el agua penetra, las NPs se hinchan y permiten que el fármaco difunda a través de los poros. Estos poros que presentan las NPs son muy característicos y ventajosos en las partículas creadas por la técnica del Spray Dryer, puesto que ayudan a la penetración del medio acuoso y por tanto promueven la liberación del fármaco (Mu y Feng, 2001; Mu y cols,

2005). Por otra parte, el efecto hidrolítico del medio acuoso en las cadenas de los polímeros permite la formación de poros y canales en el interior de las NPs por hidrólisis de los enlaces ester, lo que favorece a la liberación (Bain y cols, 1999b). El proceso de erosión es más lento en los sistemas hidrófobos y controla la liberación del PTX en una segunda o tercera etapa de su liberación.

Se aplicaron varios modelos matemáticos a los resultados experimentales con el fin de analizar un patrón de liberación. Para todas las NPs preparadas por Spray Dryer, la liberación del PTX mostró una buena correlación con el modelo de Higuchi: la matriz polimérica se hincha y la liberación del fármaco está controlada por difusión. Los valores del exponente difusional en el modelo de Korsmeyer-Peppas, se situaron entre 0,43 y 0,30 (Tabla 22). El valor estándar de “n” con el fin de imponer un comportamiento fickiano a partículas esféricas es 0,43 (Korsmeyer y cols, 1983; Brazel y Peppas, 2000), por tanto el PTX liberado desde las NPs de PLGA 50:50 y PCL se rige por un comportamiento fickiano. Para los fármacos que se liberan desde formas esféricas con un gran intervalo de distribución de tamaños, el valor de “n” dependerá de tal distribución de tamaño y se podría obtener valores inferiores a 0,43 (Ritger y Peppas, 1987a-b). El modelo de Hopfenberg permite una descripción cuantitativa para la liberación de fármacos desde sistemas degradables, y muestra una velocidad de liberación proporcional a la superficie del sistema. La aplicación de este modelo en las NPs obtenidas por Spray Dryer, se encontró en el límite de ser considerado dado que los coeficientes de correlación eran menos significativos ($r^2 = 0,90 - 0,94$) (Tabla 22).

Por tanto, en el caso de las NPs obtenidas por Spray Dryer, el PTX desde las NPs de PCL se liberó más rápidamente que desde las NPs de PLGA lo cual se puede relacionar con la semi-cristalinidad de la PCL que favorece la liberación del PTX en las primeras horas del proceso. El estudio de la cinética así como el estudio de los modelos matemáticos muestran una combinación de dos procesos en la liberación del PTX. Al principio, la liberación se ve favorecida por la capacidad de hinchamiento de las NPs que hacen más fácil la difusión del PTX encapsulado y también por la cristalinidad del polímero. Por tanto, la liberación del PTX es más rápida desde las NP de PCL por sus propiedades semi-cristalinas, seguido de la matriz mas hidrófila, el PLGA 50:50.

En cuanto a la liberación *in vitro* desde las NPs obtenidas por la técnica de doble emulsión, tras 35 días de liberación, el porcentaje de fármaco liberado fue inferior al obtenido con las NPs preparadas por Spray Dryer. Desde las NPs de PLGA 50:50 se liberó un 31 % del fármaco encapsulado, desde las NPs de PLGA 75:25 un 24 % y desde las NPs de PCL un 60 % (Figura 36). El tamaño de la partícula influye en la liberación del fármaco puesto que cuanto más pequeñas sean las partículas más rápida será la liberación. Otros investigadores demostraron con partículas de PLA de tamaño entre 303 nm y 671 nm, que la liberación del fármaco (savoxepina) se produjo de manera más rápida desde las partículas de menor tamaño (Leroux y cols, 1996). En la primera etapa las constantes de velocidad de las cinéticas obtenidas de la liberación *in vitro* del PTX desde las NPs preparadas por Spray Dryer fueron menores, lo que concuerda con el tamaño puesto que son más grandes. Así mismo, la cantidad de fármaco encapsulado también influye en la velocidad de liberación, y en este sentido es mayor la cantidad de PTX encapsulado en las NPs preparadas por doble emulsión, debido, entre otros factores, al mayor porcentaje de fármaco inicial de esta formulación.

La encapsulación del PTX en las NPs de PCL preparadas por doble emulsión parece favorecer una mayor interacción entre el fármaco y el polímero, que vendría condicionada por la hidrofobicidad del PTX, que prefiere su interacción con la PCL, aislándose del medio hidrófilo de la emulsión. La liberación del fármaco desde las NPs de PCL podría estar condicionada por la lenta degradación de las mismas (Prabu y cols, 2009).

El perfil de liberación de PTX desde NPs de PLGA obtenidas por el método de extracción y evaporación (Figura 36), puede considerarse dividido en tres fases (Tabla 21): la primera, estaría en concordancia con una rápida liberación del fármaco mas superficial; la segunda, una liberación bastante lenta influenciada por la baja solubilidad del fármaco en medio acuoso, que ralentiza su difusión desde zonas más internas de la NP, antes de pasar a la degradación de la zona más interna de la NP, y que constituye la tercera y última fase, que se acompaña de una erosión de las NPs (Wang y cols, 1996).

Para todas las NPs preparadas por doble emulsión, se aplicaron varios modelos matemáticos a los resultados experimentales con el fin de analizar un patrón de

liberación. Se ha encontrado buena correlación en las tres formulaciones con el modelo de Higuchi lo que implica que la matriz polimérica se hincha y la liberación del fármaco está controlada por difusión. En cambio el valor del exponente difusional, es diferente respecto a las NPs obtenidas por Spray Dryer, los valores inferiores a 0,40 nos indican un gran dispersión de tamaños por el cual no se puede determinar con exactitud el mecanismo de liberación, tal es el caso de las NPs de PLGA 50:50 (Tabla 23). En cuanto a las NPs de PLGA 75:25 y PCL, se considera una liberación de tipo fickiana que rige la Segunda Ley de Fick.

Estudio de las nanopartículas con Paclitaxel en células tumorales de mama MCF-7

En líneas generales se asume que la progresión tumoral del cáncer de mama es debida a una combinación de alteraciones genéticas y epigenéticas, siendo la proliferación celular y la supresión de la muerte celular fenómenos que van a proporcionar la base para esta evolución neoplásica. Por todo ello, se ha hecho preciso el diseño de agentes antineoplásicos que puedan alterar el sistema del ciclo celular y que al mismo tiempo activen la apoptosis como parte de su acción en células neoplásicas.

La línea celular MCF-7 es una línea derivada de cáncer de mama humano y ha sido utilizada como un excelente modelo experimental. Esto ha supuesto una mejora a la hora de la investigación ya que ha permitido probar la eficacia de diferentes terapias antes de su uso en pacientes. La mayoría de los fármacos antineoplásicos usados en la clínica son sistemáticamente agentes antiproliferativos que preferentemente van a matar células dividiéndose, principalmente, por actuar a nivel de síntesis, replicación o procesamiento del ADN. Sin embargo, este fenómeno no es selectivo para las células cancerígenas, y su eficacia terapéutica está limitada por el daño que puede causar a células normales proliferando. Por ello una estrategia sería la liberación controlada del fármaco desde NPs. Esto permite una liberación del fármaco de forma continua, a concentraciones terapéuticas, pudiendo establecerse un patrón de liberación durante determinados periodos de tiempos y por tanto, se reducirían los efectos no deseados y tóxicos producidos por la administración convencional.

Los cultivos se sometieron a diferentes tiempos de exposición incubándose con la muestras de NPs a diferentes concentraciones evaluando la acción citotóxica de las mismas. Se conoce que la toxicidad del PTX está relacionada con la inhibición de la progresión a la fase de mitosis del ciclo celular y por tanto con el paro mitótico (Blagosklonny y Fojo, 1999). En numerosos estudios, las concentraciones de PTX utilizadas en líneas celulares son del orden nanomolar. Así, con el fin de inhibir la proliferación celular en células de carcinoma humano de cérvix HeLa, Jordan y cols (1993), usaron concentraciones nanomolares de PTX. De igual modo, Danhier y cols (2009), trataron las células HeLa a una concentración de PTX de 25 $\mu\text{g/ml}$, lo cual demuestra que en células HeLa, una concentración baja es suficiente para inducir citotoxicidad. En células de ovario, SKOV3, Ofir y cols (2002), también demuestran que concentraciones de PTX entre 100 nM y 1 μM produce muerte celular. Estudios en otras líneas celulares, como la colorectal Caco-2 y de colon HT-29, se observa que bajas concentraciones de PTX entre 0,025 a 25 $\mu\text{g/ml}$ fueron capaces de inhibir la replicación celular (Zhang y Feng, 2006). Nuestros resultados en el ensayo de citotoxicidad han demostrado que el PTX en disolución en las células MCF-7, a dosis entre 3 y 20 μM y a tiempos de tratamiento 24 h, 48 h, 72 h y 96 h, no afectaron la viabilidad celular (Figura 46). Estas observaciones hicieron pensar que es necesaria una dosis más alta para que el fármaco produzca su efecto a nivel celular.

Uno de los factores que explicaría la utilización de dosis altas, se debe a la carencia del gen de la caspasa 3, por una supresión en el par de la base 47 del exón 3 del gen CASP-3 de esta línea celular MCF-7 (Jänicke, 2009). Estudios realizados por Odonkor y Achilefu (2008), demuestran que las caspasas contribuyen a la resistencia del PTX. Diversos autores (Yang y cols, 2001; Lee y cols, 2003), han observado que la carencia de la caspasa 3 puede contribuir a una resistencia a agentes quimioterapéuticos, como es el caso con el PTX, lo que indica que son necesarias concentraciones elevadas para ver un efecto significativo en las células MCF-7. En líneas tumorales de pulmón A549 tratadas con PTX, donde apenas se expresó la caspasa 3, se ha obtenido EC_{50} de 22,5 μM ; mientras que en líneas de mama 4T1-luc donde se observó un aumento de la actividad de la caspasa 3, se obtuvo EC_{50} de 8,5 μM . Tales resultados demostraron que

existe una resistencia intrínseca al PTX que se relaciona con la expresión de la caspasa 3 (Odonkor y Achilefu, 2008).

Nuestros resultados en los estudios de toxicidad han demostrado que el PTX en disolución causa una inhibición dosis-dependiente del crecimiento de las células cancerígenas en la línea MCF-7 a partir de 30 μM (Figura 47), lo cual coincide con los trabajos realizados por Thomadaki y cols (2006) donde concentraciones de PTX del orden de 0 a 100 μM en células MCF-7 provocaron un efecto concentración-dependiente, obteniéndose a partir de una concentración de 60 μM una viabilidad celular inferior al 50 % a partir de las 72 h.

El perfil de las NPs poliméricas sin fármaco de ambas formulaciones fue estudiado también *in vitro*. En la línea celular MCF-7 no se encontró toxicidad en los ensayos de viabilidad manteniéndose por encima del 80 %, independientemente de la concentración y del tiempo. Un caso específico es el tratamiento con las NPs de PCL sin fármaco obtenidas por Spray Dryer que presentan un aumento significativo de la viabilidad celular a partir de las 48 h (137 %) (Figura 48), incremento que llega hasta un 200 % en las preparadas por la técnica de doble emulsión (Figura 49). Estudios realizados por Serrano y cols (2004) usando fibroblastos de ratón L929 con films de PCL, en tiempos cortos de cultivos con el ensayo del MTT, mostraron que la PCL producía una estimulación en la actividad mitocondrial (Serrano y cols, 2004). Una de las razones por la cual el incremento de la viabilidad celular fue mayor en las NPs de PCL obtenidas por doble emulsión, es porque son de menor tamaño, por lo que penetran mejor en la célula y actúan de forma más eficaz (Panyam y cols, 2003a; Prabu y cols, 2009). Sin embargo, para ambas formulaciones de PCL, este efecto proliferativo se ve inhibido por la presencia del PTX, encontrándose una disminución en el porcentaje de supervivencia proporcional al aumento de la concentración (Figura 48B). Si se tiene en cuenta la lenta liberación *in vitro* del PTX desde las NPs de PCL durante las primeras 48 h, se compensa este incremento inducido por la PCL, y por tanto, una pequeña liberación del PTX es suficiente para que se produzca la muerte celular.

Al tratar las células con las NPs de PLGA 50:50 – PTX, se observó un descenso significativo (60 %) de la viabilidad celular a las 24 h, lo que nos indica que el PTX

liberado desde estas NPs es más eficaz que el PTX en disolución; se necesita por tanto, menos concentración con las NPs para poder alcanzar el mismo efecto. Estos resultados concuerdan con estudios realizados con microesferas de PLGA 50:50 con PTX o con 5-fluorouracilo, donde han demostrado en el ensayo de citotoxicidad, que la viabilidad celular en células tratadas con NPs con fármaco era menor que en las tratadas con el fármaco solo. Por tanto, el efecto citotóxico inducido por el fármaco, cuando está encapsulado, es prolongado a lo largo del tiempo, se trata del efecto de liberación controlada (Gupte y Ciftci, 2004).

Las NPs de PLGA 75:25 con fármaco obtenidas por Spray Dryer son menos tóxicas a las 24 h que el resto de las NPs; esto puede relacionarse con que la hidrofobicidad del polímero afecta a la velocidad de liberación del fármaco, en muchos casos disminuyéndola. También el tamaño de la partícula puede influir, puesto que al ser mas grandes ($1,03 \pm 0,02 \mu\text{m}$) podría dificultar la internalización celular en comparación con las NPs de PLGA 50:50 ($0,85 \pm 0,02 \mu\text{m}$) (Tabla 14).

Las NPs de PLGA obtenidas por la técnica de doble emulsión mostraron un efecto citotóxico conforme con la cinética de liberación del fármaco. Las NPs de PLGA 50:50 – PTX provocaron una disminución significativa a las 24 h de tratamiento igual que la causada por la preparadas por Spray Dryer. A partir de las 24 h, el descenso de la viabilidad celular fue más pronunciado que las obtenidas por Spray Dryer, posiblemente debido a una velocidad de liberación más rápida, y al menor tamaño de la partícula.

El tamaño de la partícula es importante puesto que ayuda a establecer posibles estrategias de liberación del fármaco para que llegue a zonas específicas del organismo humano. Las partículas de tamaño micrométrico son filtradas por los capilares pulmonares y las nanométricas son eliminadas por el sistema retículo-endotelial (RES). En especial, partículas inferiores a 200 nm de diámetro tienen como ventaja evitar el RES, circular por el torrente sanguíneo más tiempo y llegar al lugar específico de acción.

Las células tratadas con las NPs de PLGA 75:25 – PTX obtenidas por doble emulsión provocaron una disminución significativa en las viabilidad celular (40 %) a las 24 h. Esta disminución está influenciada por el tamaño de la partícula, ya que son más

pequeñas (229 nm) frente por ejemplo, a las de PLGA 50:50 – PTX (274 nm). Además, presentan una mayor proporción de internalización, lo que facilita al fármaco encapsulado a liberarse de forma más efectiva y por tanto que sea más tóxico. Diversos estudios han demostrado que existe dos posibles vías por las cuales el fármaco encapsulado proporciona mayor citotoxicidad que el fármaco en disolución: a) las NPs son adsorbidas en la membrana celular llevando un aumento de la concentración del fármaco alrededor de la superficie, lo que conlleva a un gradiente de concentración que favorece la entrada del fármaco en el interior de la célula; b) las células cancerígenas permiten la captación de NPs poliméricas y de este modo el fármaco se libera desde el interior de la célula produciendo un aumento de la concentración intracelular de fármaco en el lugar de acción (Hu y cols, 2006; Dong y Feng, 2007; Jin y cols, 2009). De esta forma, la sensibilidad de las células MCF-7 a las NPs con PTX se puede atribuir a la adsorción de las NPs por la membrana celular y por su acumulación. Por tanto, las NPs liberan el PTX desde el interior de la célula, aumentará la concentración de PTX intracelular y por tanto el efecto citotóxico.

Existen estudios que demuestran que la partícula tiene que ser lo más pequeña posible (≤ 200 nm) para así poder evitar cualquier mecanismo de evacuación por filtración en el organismo humano. Por tanto, el tamaño de la partícula juega un papel importante a la hora de su adhesión y de su interacción con las células (Prabu y cols, 2009). En nuestro estudio, las NPs más pequeñas fueron las de PLGA 75:25 con un diámetro de 223 nm, lo que confirma que el tener un tamaño pequeño favorece a la internalización celular. De hecho el meso-tetra(*p*-hidroxifenil)porfirina (m-THRP) encapsulado en NPs de PLGA de 100 nm, 200 nm y 600 nm permanece en el compartimento intravascular durante al menos 25 min después de su administración intravenosa. Sin embargo, el efecto de este compuesto disminuyó al aumentar el tamaño de la NP (Vargas y Delie, 2009).

Los estudios de fluorescencia proporcionan una visualización de la internalización de las NPs en las células. Tras haber evaluado las partículas obtenidas por ambas formulaciones, este estudio se realizó utilizando las de la técnica de doble emulsión por su menor tamaño, que facilita la internalización en la célula; estas NPs fueron preparadas con un marcaje fluorescente: la 6-cumarina. De manera cualitativa y

cuantitativa, las NPs que más se internalizaron en las células MCF-7 fueron las NPs de PLGA 75:25, seguido de las NPs de PLGA 50:50, y por último, las de PCL. Esto es coincidente con los estudios realizados por Feng y cols (2004), que demuestran que la densidad de la fluorescencia es inversamente proporcional al tamaño de la partícula. Se menciona también que las partículas que se encuentran en un intervalo entre 100 y 200 nm se internalizan por endocitosis mediado por receptor, mientras que las partículas más grandes por fagocitosis. Este mecanismo lo retoma Davda y Labhasetwar (2002) que lo proponen como un proceso dependiente de energía.

Estudios realizados con NPs de PLGA, demostraron que existe una internalización celular tiempo-dependiente y concentración-dependiente, sugiriendo que se trata de un proceso dependiente de energía pero que tal internalización de NPs, puede ser saturable (Davda y Labhasetwar, 2002; Panyam y Labhasetwar, 2003a). En este trabajo de investigación para un mismo tiempo de incubación (2 h), se internalizó un 20 % de NPs de PLGA 50:50 de una concentración de 100 µg/ml, y un 22 % de 500 µg/ml (Figura 44-45), confirmándose que se trata de un proceso concentración-dependiente. Zhang y Feng (2006), observaron también una incorporación del 25 % para una concentración de 100 µg/ml, mientras que para una concentración de 500 µg/ml se produjo un 21 % de incorporación. Por otro lado, para una misma concentración la eficacia de incorporación aumentó con el tiempo de incubación, demostrándose también que se trata de un proceso tiempo-dependiente.

Una vez comprobada la actividad antitumoral de estas NPs con fármaco, nuestro interés se centró en el estudio de apoptosis y ciclo celular. La apoptosis ha sido estudiada en términos de desarrollo del cáncer y su tratamiento, intentando identificar su papel en la toxicidad inducida por agente quimioterápicos.

La identificación de apoptosis por microscopía óptica es algo subjetivo y tedioso si tenemos en cuenta que el proceso es muy rápido y las células apoptóticas son rápidamente eliminadas. Así el análisis de las células control de mama MCF-7 mostró células pequeñas de forma redondeada o poligonal creciendo como agregados irregulares y confluyentes. En cambio, las células tratadas con las NPs exhibieron una morfología más poligonal e irregular, conferida por las prolongaciones citoplasmáticas.

El PTX actúa sobre los MTs y por tanto sobre uno de los componentes más importantes del citoesqueleto (Sorger y cols, 1997). Al unirse a los MTs, el PTX manifiesta uno de sus efectos antiproliferativo con los cambios morfológicos celulares.

Estos efectos se han observado al tratar las células con dos concentraciones significativas de PTX en disolución (40 μ M y 50 μ M). Tras un tiempo de incubación, las células comenzaron a deformarse y retraerse mostrando una morfología irregular y perdiendo por tanto toda su morfología inicial (Figura 51). Jin y cols (2007) realizaron el mismo ensayo con las células MCF-7 que trataron con NPs de PLGA 50:50 con PTX, observándose un cambio morfológico. Sin embargo, las células que fueron tratadas con las NPs sin fármaco mantuvieron su morfología inicial, al igual que en nuestro trabajo. Se puede decir entonces, que los polímeros utilizados en este estudio no son tóxicos para las células, y el PTX que se encuentra encapsulado en las NPs se libera de forma eficaz, ya que produce los mismos efectos sobre las células que el fármaco en disolución.

La confirmación de la apoptosis inducida por el PTX en disolución y por las NPs de ambas formulaciones se llevó a cabo mediante la doble tinción con Anexina V-FITC y Yoduro de Propidio (IP). Se trataron las células MCF-7 durante 24 h en todos los casos, con PTX en disolución y NPs con y sin fármaco, ya que hay estudios que demuestran que la apoptosis no ocurre inmediatamente, sino que empieza a partir de las 16 h tras el tratamiento con PTX (Blagosklonny y Fojo, 1999). La tinción con Anexina V-FITC e IP puso en manifiesto que el PTX en disolución condujo a las células a la apoptosis de una forma concentración-dependiente. Así la cantidad de células apoptóticas a 50 μ M, fue de un 71 %, encontrándose una parte en apoptosis temprana (19 %) y otra en apoptosis tardía (52 %) (Figura 55), mientras que a una concentración menor (de 3 a 10 μ M) se halló alrededor del 22 % células en apoptosis temprana y alrededor del 14 % en apoptosis tardía.

Cuando se compararon las NPs - PTX con el fármaco en disolución a 50 μ M, se observó que la cantidad de células en apoptosis se encontraba en menor proporción (13 % -20 %), ya que la liberación del fármaco desde las NPs es más lenta y por tanto no se alcanza en el tiempo del estudio (24 h) la concentración mínima efectiva para ejercer un

efecto apoptótico tan drástico. No se observaron diferencias entre los distintos polímeros utilizados en las formulaciones, aproximándose a los valores de las células controles, con un alto porcentaje de células vivas ($> 70\%$) y con una menor cantidad de células apoptótica ($\leq 20\%$) (Figura 56-57).

En cuanto al mecanismo por el cual el PTX conduce a la apoptosis en las células MCF-7, se siguen desarrollando numerosas investigaciones. Algunos estudios muestran que el PTX en diferentes líneas celulares induce apoptosis, aparentemente, con la liberación del citocromo c seguido de la activación de la caspasa 9 (Blajeski y cols, 2001). Sin embargo, se ha demostrado que en células cancerosas de mama (MDA-MB-43 y NCI/ADR-RES), la familia de los Taxanos no induce la liberación del citocromo c, por lo que la vía mitocondrial no se encuentra activada (Vobořilová y cols, 2008).

En cambio, cuando se ha tratado las células MCF-7 con otros compuestos distintos al PTX como los derivados de stirilpirona (SPD) o daidzen o con un flavonoide (Acaecitin), la caspasa 9 se ha visto activada, seguido de la caspasa 7 (Lee y cols, 2003; Zoli y cols, 2005; Shim y cols, 2007; Jin y cols, 2010). Aunque, la caspasa 3 no se expresa en la línea celular MCF-7, diversos estudios han demostrado, que a pesar de todo el PTX induce a la apoptosis (Ofir y cols, 2002; Jänicke, 2009). Esto se ha demostrado por fragmentación del ADN en ausencia de la caspasa 3, y con activación de la caspasa ejecutora 7 (la cual podría desempeñar el papel que ejerce la caspasa 3), y de este modo, conducir a la célula a la apoptosis (Jänicke y cols, 1998; McGee y cols, 2002; Twiddy y cols, 2006; Jänicke, 2009).

El uso de tratamientos específicos en la terapia contra el cáncer cuyo objetivo principal es el ciclo celular, ha aportado grandes beneficios, debido a los avances que recientemente se ha logrado en la investigación de moléculas reguladoras del ciclo celular y al conocimiento entre el vínculo ciclo celular y apoptosis. Para estudiar los mecanismos de esta actividad antitumoral y antiproliferativa del PTX se analizaron por citometría de flujo los efectos del fármaco en la distribución del ciclo celular. Tras el estudio de las modificaciones que el PTX provoca a nivel celular, nuestro interés se ha centrado en intentar explicar porque estas NPs detienen o enlentecen la progresión de las células tumorales a través de dicho ciclo.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el mecanismo de acción del PTX consiste en la unión a los MTs, y detener el ciclo celular en la fase G₂/M (McGrogan y cols, 2008). El citómetro de flujo permite la cuantificación del número de células MCF-7 que se encuentran en cada fase del ciclo celular. Nuestros resultados muestran que el PTX en disolución induce un aumento significativo de la población de células (43 %) que se encuentran en la fase G₂/M (Tabla 24), lo cual concuerda con otros autores (Michalides y cols, 2002; Henley y cols, 2007) en donde las células MCF-7 tratadas con distintas concentraciones de PTX detienen el ciclo celular en esta misma fase. Además, no causa sólo una detención en las células MCF-7, también en células de leucemia, U937, se observó como el PTX aumenta la fracción de células en apoptosis y necrosis en la fase G₂/M tras 24 h de tratamiento (Liao y Lieu, 2005). Las células que fueron tratadas con las NPs sin PTX, no mostraron ningún cambio en su ciclo celular, sugiriendo que no se ve afectado por el tipo de polímero. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Jin y cols (2009), donde NPs de PLGA 50:50 sin fármaco, no modifican el transcurso del ciclo celular. La inclusión del PTX en las NPs de las distintas formulaciones, produjo un aumento significativo en el número de células en la fase G₂/M alcanzando valores de más del 70 % (Tabla 25 y Tabla 26), superior al observado en las células tratadas con el PTX en disolución; al igual que en ensayos realizados por Jin y cols (2007), donde el PTX liberado desde las NPs de PLGA fue efectivo ya que detuvo las células en la fase G₂/M. En estudios realizados sobre el ciclo celular, por Panyam y Labhasetwar (2003b) obtuvieron que la dexametasona incorporada en las partículas de PLGA, producían más efecto en la retención de células en la fase del ciclo celular G₁, que la propia dexametasona libre. Por tanto, se alcanzan efectos más eficaces del fármaco cuando va encapsulado.

Todos estos resultados ponen de manifiesto que los sistemas nanopartículas preparados son un buen vehículo para la liberación de un fármaco hidrófobo como el PTX. Las NPs han conseguido mantener las propiedades del fármaco, y su liberación de forma controlada permite una mayor y mejor acción citotóxica.

CONCLUSIONES



Los resultados obtenidos en este Trabajo permiten concluir que:

1. Las nanopartículas obtenidas por atomización y secado tuvieron un tamaño medio $\leq 1 \mu\text{m}$ y las obtenidas por doble emulsión un tamaño medio inferior a 300 nm. En todos los casos, la eficiencia de incorporación del Paclitaxel fue elevada. **En cuanto a menor tamaño, mejor morfología, mayor rendimiento y mayor eficiencia de encapsulación, la técnica de doble emulsión es la más efectiva.**
2. La liberación *in vitro* del fármaco depende de las propiedades físicas y químicas de los polímeros y del tipo de técnica utilizada. Las nanopartículas de PCL por su característica semi-cristalina liberan más cantidad de fármaco, mientras que desde las nanopartículas de PLGA la liberación está condicionada por el carácter hidrofóbico de los polímeros. Aplicando los modelos matemáticos, la liberación del fármaco se rige por un **proceso de difusión** y en la mayoría de los casos, por un **mecanismo de liberación fickiana**.
3. La **internalización** de las nanopartículas en las células MCF-7 es **concentración-dependiente** y **tiempo-dependiente**. La mayor eficacia de internalización se mostró con las nanopartículas de PLGA 75:25.
4. La línea celular MCF-7 no se ve afectada por el Paclitaxel en disolución a concentraciones inferiores a 20 μM . Sin embargo, a partir de 30 μM existe una disminución significativa de la viabilidad celular **concentración-dependiente** y **tiempo-dependiente**.
5. Las nanopartículas sin fármaco son **citocompatibles** con las células MCF-7, por lo que son un **buen vehículo** para el fármaco.
6. Las nanopartículas con fármaco a concentraciones superiores a 30 μM y después de 48 h, muestran un **efecto más citotóxico** que el propio fármaco en disolución, por su adhesión a la membrana celular, su internalización y su liberación desde dentro de la célula de forma controlada.
7. El fármaco liberado desde las nanopartículas mantiene las mismas propiedades físico-químicas que el fármaco en disolución ya que actúa del mismo modo en la fase G₂/M del ciclo celular.

BIBLIOGRAFÍA

- Alexis F, Rhee JW, Richie JP, Radovic-Moreno AF, Langer R, Farokhzad OC. 2008. New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. *Urologic Oncology* 26:74-85.
- Alkhalaf M y El-Mowafy AM. 2003. Overexpression of wild-type p53 gene renders MCF-7 breast cancer cells more sensitive to the antiproliferative effect of progesterone. *Journal of Endocrinology* 179:55-62.
- Babensee JE, Anderson JM, McIntire LV y Mikos AG. 1998. Host response to tissue engineered devices. *Advanced Drug Delivery Reviews* 33:111-139.
- Bae YH, Okano T y Kim SW. 1991. "On-off" thermocontrol of solute transport. II. Solute release from thermosensitive hydrogels. *Pharmaceutical Research* 8:624-628.
- Bain DF, Munday DL, Smith A. 1999-b. Solvent influence on spray-dried biodegradable microspheres. *Journal of Microencapsulation* 16:453-474.
- Bakker D, Blitterswijk CA, Hesseling SC, Grote JJ y Daems WT. 1988. Effect of implantation site on phagocyte/polymer interaction and fibrous capsule formation. *Biomaterials* 9:14-23.
- Baras B, Benoit M A, Gillard J. 2000. Influence of various technological parameters on the preparation of spray-dried poly(ϵ -caprolactone) microspheres containing a model antigen. *Journal of Microencapsulation* 17:485-498.
- Behling CA y Spector M. 1986. Quantitative characterization of cells at the interface of long-term implants of selected polymers. *Journal of Biomedical Materials Research* 20:653-266.
- Bennet DB, Li X, Adams NW, Kim SW, Hoes CJT y Feijen J. 1991. Biodegradable polymeric prodrugs of naltrexone. *Journal of Controlled Release* 16: 43-52.
- Benoît JP, Courteille F, and Thies C. 1986. A physicochemical study of the morphology of progesterone-loaded poly(D,L-lactide) microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* 29:95-102.
- Berrino F, Gatta G, Sant M, Capocaccia R. 2001. The EUROCORE study of survival of cancer patients in Europe: aims, current status, strengths and weaknesses. *European Journal of Cancer* 37:673-677.
- Berrino F, De Angelis R, Sant M, Rosso S, Bielska-Lasota M, Coebergh JW, Santaquilani M. 2007. Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995-99: results of the EUROCORE- 4 study: *The lancet oncology* 8:773-783.
- Bernkop-Schnürch A, Walker G. 2001. Multifunctional matrices for oral peptide delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 18:459-501.

Bilensoy E, Gürkaynak O, Ertan M, Sen M, Hincal AA. 2008. Development of Nonsurfactant Cyclodextrin Nanoparticles Loaded With Anticancer Drug Paclitaxel. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97:1519-1529.

Blagosklonny MV, Fojo T. 1999. Molecular effects of paclitaxel: myths and reality (a critical review). *International Journal of Cancer* 83:151-156.

Blajeski AL, Kottke TJ, Kaufmann SH. 2001. A multistep model for paclitaxel-induced apoptosis in human breast cancer cell lines. *Experimental Cell Research* 270:277-288.

Blanco MD, Gómez C, Olmo R, Muñiz E, Teijón JM. 2000. Chitosan microspheres in PLG films as devices for cytarabine release. *International Journal of Pharmaceutics* 202:29-39.

Blanco MD, Olmo R, Teijón JM. 2002. Hydrogels. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* J. Swarbrick and J.C. Boylan (Eds), Marcel Dekker Inc. 1-21.

Blanco MD, Bernardo MV, Sastre RL, Olmo R, Muñiz E, Teijón JM. 2003. Preparation of bupivacaine-loaded poly(epsilon-caprolactone) microspheres by spray drying: drug release studies and biocompatibility. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 55:229-236.

Blanco MD, Sastre RL, Teijón C, Olmo R, Teijón JM. 2005. 5-Fluorouracil-loaded microspheres prepared by spray-drying poly(D,L-lactide) and poly(lactide-co-glycolide) polymers: characterization and drug release. *Journal of Microencapsulation* 22:671-682.

Blanco MD, Sastre RL, Teijón C, Olmo R, Teijón JM. 2006. Degradation behaviour of microspheres prepared by spray-drying poly(d,l-lactide) and poly(d,l-lactide-co glycolide) polymers. *International Journal of Pharmaceutics* 326:139-147.

Blanco MD, Guerrero S, Teijón C, Olmo R, Pastrana L, Katime I, Teijón JM. 2008. Preparation and characterization of nanoparticulate poly (N-isopropylacrylamide) hydrogel for the controlled release of anti-tumour drugs. *Polymer International* 57:1215-1225.

Blanco-Príeto MJ, Besseghir K, Orsolini P, Heimgartner F, Deuschel C, Merkle HP, Nam-Trân Hy Gander B. 1999. Importance of the test medium for the release kinetics of a somatostatin analogue from poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* 184:243-250.

Bodmeier R, McGinity JW. 1987. The preparation and evaluation of drug-containing poly(dl-lactide) microspheres formed by the solvent evaporation method. *Pharmaceutical Research* 4:465-471.

Bodmeier R, Oh KH, Chem H. 1989. The effect of the addition of low molecular weight poly(dl-lactide) on drug release from biodegradable poly(dl-lactide) drug delivery systems *International Journal of Pharmaceutics* 51:1-8.

- Bostman O, Pihlajamaki H. 2001. Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: a review. *Biomaterials* 21: 2615-2621.
- Bouquet W, Ceelen W, Fritzing B, Pattyn P, Peeters M, Remon JP, Vervaeke C. 2007. Paclitaxel/beta-cyclodextrin complexes for hyperthermic peritoneal perfusion - formulation and stability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 66:391-397
- Brazel CS y Peppas NA. 2000. Modeling of drug release from Swellable polymers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 49:47-58.
- Broadhead J, Edmond Rouan SK and Rhodes CT. 1992. The Spray Drying of Pharmaceuticals. *Drug development and industrial pharmacy* 18:1169-1206.
- Bröker LE, Kruyt FAE y Giaccone G. 2005. Cell Death Independent of Caspases: A Review. *Clinical Cancer Research* 11:3155-3162.
- Chauvière G, Guenard D, Picot F, Senilh V, Potier P. 1981. Structural analysis and biochemical study of isolated products of the yew *Taxus baccata*. *CR Academie Sciences (Paris)* 293:501-503.
- Chen TS, Wang XP, Sun L, Wang LX, Xing DA, Mok M. 2008. Taxol induces caspase-independent cytoplasmic vacuolization and cell death through endoplasmic reticulum (ER) swelling in ASTC-a-1 cells. *Cancer Letters* 270:164-172.
- Cheung CH, Chen HH, Kuo CC, Chang CY, Coumar MS, Hsieh HP, Chang JY. 2009. Survivin counteracts the therapeutic effect of microtubule de-stabilizers by stabilizing tubulin polymers. *Molecular Cancer* 3:8-43.
- Chiba M, Hanes J, Langer R. 1997. Controlled protein delivery from biodegradable tyrosine-containing poly(anhydride-co-imide) microspheres. *Biomaterials* 18:893-901.
- Chien YW, Lin S. 2002. Drug Delivery-Controlled Release. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. J. Swarbrick and J.C. Boylan (Eds), Marcel Dekker Inc., 811-833.
- Christel P, Chabot F, Leray JL, Morin C y Vert M. 1980. Biodegradable composites for internal fixation. *Advances in biomaterials*. *Biomaterials* 3:271-280.
- Cloninger MJ. 2002. Biological applications of dendrimers. *Current Opinion in Chemical Biology* 6:742-748.
- Cowsar DR, Rice TR, Gilley RM y English JP. 1985. Poly(lactide-co-glycolide) microcapsules for controlled release of steroids. *Methods in Enzymology*. Academic Press, Florida. 112:101-116.
- D'Antone S, Bignotti F, Sartore L, D'Amore A, Spagnoli G and Penco M. 2001. Thermogravimetric investigation of two classes of block copolymers based on

poly(lactic-glycolic acid) and poly(ϵ -caprolactone) or poly(ethylene glycol). *Polymer Degradation and Stability* 74:119-124.

Danhier F, Lecouturier N, Vroman B, Jérôme C, Marchand-Brynaert J, Feron O y Pr at V. 2009. Paclitaxel loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation. *Journal of Controlled Release* 133:11-17.

Dash S, Murthy PD, Nath L y Chowdhury P. 2010. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Drug Research* 67:217-223.

Davda J, Labhasetwar V. 2002. Characterization of nanoparticles uptake by endothelial cells. *International Journal of Pharmaceutics* 233:51-59.

Del Bino G, Darzynkiewicz Z, Degraef C, Mosselmans R, Fokan D, Galand P. 1999. Comparison of methods based on annexin-V binding, DNA content or TUNEL for evaluating cell death in HL-60 and adherent MCF-7 cells. *Cell Proliferation* 32:25-37.

Denault JB y Salvesen GS. 2002. Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chemical Reviews* 102:4489-4500.

Denault JB y Salvesen GS. 2008. Apoptotic Caspase Activation and Activity. *Apoptosis and Cancer. Methods in Molecular Biology* 414:191-220.

Devi KS, Simha TJM y Vasudevan P. 1986. Biosoluble surgical material from 2,3-diadehyde cellulose. *Biomaterials* 7:193-196.

Domard A y Domard M. 2001. Chitosan: Structure- Properties Relationship and Biomedical Applications. *Polymeric Biomaterials* 187-213.

Domenech AC, Pérez-Gómez B, Aragon s N, Pollán M y López-Abente G. 2009. Vigilancia Epidemiológica del Cáncer. Monitorización de la situación del cáncer en España. La situación del cáncer en España, 1975-2006. <http://publicaciones.isciii.es/>

Dong Y y Feng SS. 2007. Poly(d,l-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles prepared by high pressure homogenization for paclitaxel chemotherapy. *International Journal of Pharmaceutics* 342:208-214.

Ei-Arini SK y Leuenberger H. 1995. Modelling of drug release from polymer matrices: Effect of drug loading. *International Journal of Pharmaceutics* 121:141-148.

Elvira C y San Román J. 1997. Synthesis and stereochemistry of isomeric methacrylic polymers derived from 4- and 5-aminosalicylic acids. *Polymer* 38:4743-4750.

El-Refaei MF, Salem T, Ismael HA, El-Chennawi F. 2002. High concentration of paclitaxel induces partial inhibition and cell death in the human breast cancer cell line MCF7 in vitro. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute* 14:223-228.

- Emanuel NM, Maizus ZK y Zaikov GE. 1984. Oxidation of Organic Compounds: Effect of Medium. Pergamon Press, Oxford 448.
- Farabegoli F, Barbi C, Lambertini E, Piva. 2007. R (-)-Epigallocatechin-3-gallate downregulates estrogen receptor alpha function in MCF-7 breast carcinoma cells. *Cancer Detection and Prevention* 31:499-504.
- Fassihi RA, Ritschel WA. 1993. Multiple-layer, direct-compression, controlled-release system: in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 82:750-754.
- Feng SS, Mu L, Win KY, Huang G. 2004. Nanoparticles of biodegradable polymers for clinical administration of paclitaxel. *Current Medicinal Chemistry* 11:413-24.
- Feng S, Huang G. 2001. Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol) from nanospheres of biodegradable polymers. *Journal of Controlled Release* 71:53-69.
- Ferrari M. 2010. Ciclo de conferencias y debates en ciencias. Revolución nanotecnológica: Estado actual de las aplicaciones prácticas y avances de la Nanociencia: desde las aplicaciones robóticas-biomédicas a las energéticas. Ciclo de conferencias y debates en ciencias. Fundación Ramón Areces.
- Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. 2007. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Annals of Oncology* 18:581-592.
- Fetterly GJ y Straubinger RM. 2003. Pharmacokinetics of Paclitaxel-containing Liposomes in Rats. *American Association of Pharmaceutical Scientists* 5:90-100.
- Feynman RP. 1960. There's Plenty of Room at the Bottom: An Invitation to Enter a New Field of Physics. California Institute of Technology. Engineering and Science magazine.
- Fournier E, Passirani C, Montero-Menei C y Benoit J. 2003. Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug carriers: focus on brain biocompatibility. *Biomaterials* 24:3311-3331.
- Freiberg S y Zhu X. 2004. Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics* 282:1-18
- Fu YJ, Mi FL, Wong TB, Shyn SS. 2001. Characteristics and controlled release of anticancer drug loaded poly (D,L lactide) microparticles prepared by spray drying technique. *Journal of Microencapsulation* 18:733-747.
- Fu Y, Li S, Zu Y, Yang G, Yang Z, Luo M, Jiang S, Wink M, Efferth T. 2009. Medicinal chemistry of paclitaxel and its analogues. *Current Medicinal Chemistry* 16:3966-3985.

Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, Sparreboom A. 2001. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *European Journal of Cancer* 37:1590–1598.

Giunchedi P y Conte U. 1995. Spray-drying as a preparation method of microparticulate drug delivery systems: an overview. *STP Pharma Sciences* 5:276-290.

Gómez C, Blanco MD, Bernardo MV, Olmo R, Muñiz E, Teijón JM. 2004. Cytarabine release from comatrices of albumin microspheres in a poly (lactide-co-glycolide) film: in vitro and in vivo studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57:225-233.

Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ. 1999. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *The Journal of biological chemistry* 274:1156-1163.

Guerrero S. 2004. Evaluación de Microsfemas Biodegradables como Sistemas de liberación Controlada de Ketotifeno. Madrid. Tesina

Guerrero S, Muniz E, Teijón C, Olmo R, Teijón JM, Blanco MD. 2008. Ketotifen-Loaded Microspheres Prepared by Spray-Drying Poly(D,L-Lactide) and Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Polymers: Characterization and In Vivo Evaluation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97:3153-3169

Gupte A, Ciftci K. 2004. Formulation and characterization of Paclitaxel, 5-FU and Paclitaxel + 5-FU microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* 76:93-106.

Haanen C y Vermes I. 1995. Apoptosis and inflammation. *Mediators of Inflammation* 4:5-15.

Healy AM, McDonald BF, Tajber L, Corrigan OI. 2008. Characterisation of excipient-free nanoporous microparticles (NPMPs) of bendroflumethiazide. *European Journal of Pharmaceutics Biopharmaceutics* 69:1182-1186.

Hench LL. 1998. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials*. 19:1419-1423.

Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-776.

Henley D, Isbill M, Fernando R, Foster JS, Wimalasena J. 2007. Paclitaxel induced apoptosis in breast cancer cells requires cell cycle transit but not Cdc2 activity. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 59:235-49.

Higuchi T. 1961a. Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments. *Journal of Cosmetic Chemistry* 11:85-97.

Higuchi T. 1961b. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspensions. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 50:874-875.

- Hiljanen VM, Karjalainen T, Seppälä J. 1996. Biodegradable lactone copolymers. I. Characterization and mechanical behavior of ϵ -caprolactone and lactide copolymers. *Journal of Applied Polymer Science* 59:1281–1288.
- Hirsch LR, Stafford RJ, Bankson JA, Sershen SR, Rivera B, Price RE, Hazle JD, Halas NJ, West JL. 2003. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences USA* 100:13549–13554.
- Holton RA, Somoza C, Kim HB, Liang F, Biediger RJ, Boatman PD, Shindo M, Smith CC, Kim S. 1994. First total synthesis of taxol. Functionalization of the B ring. *Journal of the American Chemical Society* 116:1597–1598.
- Hopfenberg, H. 1976. Controlled release from erodible slabs, cylinders and spheres. *Controlled Release Polymeric Formulations* 3:26–32.
- Horwitz SB. 1992. Mechanism of action of taxol. *Trends in Pharmacological Sciences* 13:134–136.
- Horwitz SB, Cohen D, Rao S, Ringel I, Shen HJ, Yang CP. 1993. Taxol: mechanisms of action and resistance. *Journal of the National Cancer Institute Monographs* 15:55–61.
- Hostyn P, Villain F, Malek-Chehire N, Kuhne F, Yakesue Y, Parrish R K. II y Parel JM. 1996. Biodegradable controlled-release 5-FU implant in the surgery for glaucoma. Experimental study. *Journal Francais d'Ophtalmologie* 19:133–139.
- Hung CT, Mauck RL, Wang CB, Lima EG, Ateshian GA. 2004. A paradigm for functional tissue engineering of articular cartilage via applied physiologic deformational loading. *Annals of Biomedical Engineering* 32:35–49.
- Hunt JA, Flanagan BF, McLaughlin PJ, Strickland I, Williams DF. 1996. Effect of biomaterial surface charge on the inflammatory response: evaluation of cellular infiltration and TNF alpha production. *Journal of Biomedical Materials Research* 31:139–144.
- Jänicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG. 1998. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 273:9357–9360.
- Jänicke RU. 2009. MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3. *Breast Cancer Research and Treatment* 117:219–221.
- Jin S, Zhang QY, Kang XM, Wang JX, Zhao WH. 2010. Daidzein induces MCF-7 breast cancer cell apoptosis via the mitochondrial pathway. *Annals of Oncology* 21:263–268.

- Jin C, Wu H, Liu J, Bai L, Guo G. 2007. The effect of paclitaxel-loaded nanoparticles with radiation on hypoxic MCF-7 cells. *Journal of Clinical Pharmacy Therapeutics* 32:41-47.
- Jin C, Bai L, Wu H, Song W, Guo G, Dou K. 2009. Cytotoxicity of paclitaxel incorporated in PLGA nanoparticles on hypoxic human tumor cells. *Pharmaceutical Research* 26:1776-1784.
- Jones, E. 1996. Methylene chloride, an overview of human and environmental effects. *Pharmaceutical Technology in Europe* 8:30-32.
- Jordan MA, Toso RJ, Thrower D y Wilson L. 1993. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations *Proceedings of the Academy of Natural Sciences USA* 90:9552-9556.
- Karim-Kos HE, de Vries E, Soerjomataram I, Lemmens V, Siesling S, Coebergh JW. 2008. Recent trends of cancer in Europe: a combined approach of incidence, survival and mortality for 17 cancer sites since the 1990s. *European Journal of Cancer* 44:1345-1389.
- Kato Y, Onishi H, Machida Y. 2003. Application of chitin and chitosan derivatives in the pharmaceutical field. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 4:303-309.
- Kim SC, Kim DW, Shim YH, Bang JS, Oh HS, Kim SW and Seo MH. 2001. In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy. *Journal of Controlled Release* 72:191-202.
- Kim MK, Lee JL, Wee WR. 2002. Comparative experiments for in vivo fibroplasia and biological stability of four porous polymers intended for use in the Seoul-type keratoprosthesis. *British Journal of Ophthalmology* 86:809-814.
- Kim BS, Kim CS, Lee KM. 2008. The intracellular uptake ability of chitosan-coated Poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Archives of Pharmacal Research* 31:1050-1054.
- Kingston DGI. 1994. Taxol: The chemistry and structure-activity relationships of a novel anticancer agent. *Trends in Biotechnology* 12:222-227.
- Kingston, DGI. 2001. Taxol, a molecule for all seasons. *Chemical Communications* 867-880.
- Kingston DGI. 2007. The Shape of Things to Come: Structural and Synthetic Studies of Taxol and Related Compounds. *Phytochemistry* 68:1844-1854.
- Korsmeyer RW y Peppas NA. 1981. Effect of the morphology of hydrophilic polymeric matrices on the diffusion and release of water soluble drugs. *Journal of Membrane Science* 9:211-227.

- Korsmeyer RW, Gurny R, Doelker E, Buri P y Peppas NA. 1983. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics* 15:25-35.
- Koziara JM, Lockman PR, Allen DD y Mumper RJ. 2004. Paclitaxel nanoparticles for the potential treatment of brain tumors. *Journal of Controlled Release* 99:259-269.
- Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. 2010. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces* 75:1-18.
- Langer RS y Peppas NA. 1981. Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. *Biomaterials* 2:201-214.
- Laurencin CT y Langer R. 1987. Polymeric controlled release systems: new methods for drug delivery. *Clinical Laboratory Medicine* 7:301-323.
- Lee SH, Yoo SD, Lee KH. 1999. Rapid and sensitive determination of paclitaxel in mouse plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B, Biomedical Sciences and Application* 724:357-63.
- Lee ATC, Azimahtol HLPy Tan AN. 2003. Styrylpyrone Derivative (SPD) induces apoptosis in a caspase-7-dependent manner in the human breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Cell International* 3:16.
- Leroux JC, Allémann E, De Jaeghere F, Doelker E, Gurny R. 1996. Biodegradable nanoparticles - From sustained release formulations to improved site specific drug delivery. *Journal of Controlled Release* 39:339-350.
- Li XH, Deng XM y Huang ZT. 2001. In vitro protein release and degradation of poly-dl-lactide-poly(ethylene glycol) microspheres with entrapped human serum albumin: Quantitative evaluation of the factors involved in protein release phases. *Pharmaceutical Research* 18:117-124.
- Liao PC y Lieu CH. 2005. Cell cycle specific induction of apoptosis and necrosis by paclitaxel in the leukemic U937 cells. *Life Sciences* 76:1623-1639.
- Liggins RT, D'Amours S, Demetrick JS, Machan LS, Burt HM. 2000. Paclitaxel loaded poly(L-lactic acid) microspheres for the prevention of intraperitoneal carcinomatosis after a surgical repair and tumor cell spill. *Biomaterials* 21:1959-69.
- Limé F, Irgun K. 2007. Monodisperse polymeric particles by photoinitiated precipitation polymerization. *Macromolecules* 40:1962-1968.
- Liso PA, Rebuelta M, San Román J, Gallardo A, Villar A. 1995. M. Antinociceptive and antipyretic properties of a new conjugated ibuprofen-methacrylic polymeric controlled delivery system. *Journal of Controlled Release* 33:429-436.

- Liu Y, Pan J, Feng SS. 2010. Nanoparticles of lipid monolayer shell and biodegradable polymer core for controlled release of paclitaxel: effects of surfactants on particles size, characteristics and in vitro performance. *International Journal of Pharmaceutics* 395:243-250.
- Liu J, Meisner D, Kwong E, Wu XY, Johnston MR. 2007. A novel trans-lymphatic drug delivery system: implantable gelatin sponge impregnated with PLGA-paclitaxel microspheres. *Biomaterials* 28:3236-3244.
- Liu J, Chew C, Gan L, Teo W, Gan L. 1997. Synthesis of monodisperse polystyrene microlatexes by emulsion polymerization using a polymerizable surfactant. *Langmuir* 13:4988-4994.
- Loo C, Lowery A, Halas N, West J, Drezek R. 2005. Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy. *Nano Letters* 5:709-711.
- Mainardes RM, Silva LP. 2004. Drug delivery systems: past, present, and future. *Current Drug Targets* 5:449-455.
- Manfredi JJ, Horwitz SB. 1984. Taxol: an antimetabolic agent with a new mechanism of action. *Pharmacology and Therapeutics* 25:83-125.
- Martin FJ, Melnik K, West T, Shapiro J, Cohen M, Boiarski AA, Ferrari M. 2005. Acute toxicity of intravenously administered microfabricated silicon dioxide drug delivery particles in mice: preliminary findings. *Drugs R D* 6:71-81.
- McGee MM, Hyland E, Campiani G, Ramunno A, Nacci V, Zisterer DM. 2002. Caspase-3 is not essential for DNA fragmentation in MCF-7 cells during apoptosis induced by the pyrrolo-1,5-benzoxazepine, PBOX-6. *FEBS Letters* 515:66-70.
- McGrogan BT, Gilmartin B, Carney DN, McCann A. 2008. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 1785:96-132.
- Mei L, Zhang Y, Zheng Y, Tian G, Song C, Yang D, Chen H, Sun H, Tian Y, Liu K, Li Z, Huang L. 2009. A Novel Docetaxel-Loaded Poly (ε-Caprolactone)/Pluronic F68 Nanoparticle Overcoming Multidrug Resistance for Breast Cancer Treatment. *Nanoscale Research Letters* 4:1530-1539.
- Micha JP, Goldstein BH, Birk L, Rottenmeier MA, Brown JV, III. 2006. Abraxane in the treatment of ovarian cancer: The absence of hypersensitivity reactions. *Gynecologic Oncology* 100:437-438.
- Michalakis J, Georgatos SD, Romanos J, Koutala H, Georgoulas V, Tsiftsis D, Theodoropoulos PA. 2005. Micromolar taxol, with or without hyperthermia, induces mitotic catastrophe and cell necrosis in HeLa cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 56:615-622.

- Michalides R, Tiemessen M, Verschoor T, Balkenende A, Coco-Martin J. 2002. Overexpression of cyclin D1 enhances taxol induced mitotic death in MCF7 cells. *Breast Cancer Research and Treatment* 74:55-63.
- Miele E, Spinelli GP, Miele E, Tomao F y Tomao S. 2009. Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane[®] ABI-007) in the treatment of breast cancer. *International Journal of Nanomedicine* 4:99-105.
- Minko T, Kuan C, Shyu S y Chang S. 2000. The study of gelation kinetics and chain-relaxation properties of glutaraldehyde-cross-linked chitosan gel and their effects on microspheres preparation and drug release. *Carbohydrate Polymers* 41:389-396.
- Miyamoto H, Ogura Y, Hashizoe M, Kunou N, Honda Y, Ikada Y. 1997. Biodegradable scleral implant for intravitreal controlled release of fluconazole. *Current Eye Research* 16:930-935.
- Moiseev YV y Zaikov GE. 1985. *Chemical Resistance of Polymers in Reactive Media*. Plenum Press, Londres 426.
- Montanari L, Cilurzo F, Selmin F, Conti B, Genta I, Poletti G, Orsini F, Valvo L. 2003. Poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing bupivacaine: comparison between gamma and beta irradiation effects. *Journal of Controlled Release* 90:281-90.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65:55-63.
- Mu L, Feng SS. 2001. Fabrication, characterization and in vitro release of paclitaxel (Taxol) loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by spray drying technique with lipid/cholesterol emulsifiers. *Journal of Controlled Release* 76:239-54.
- Mu L, Teo MM, Ning HZ, Tan CS, Feng SS. 2005. Novel powder formulations for controlled delivery of poorly soluble anticancer drug: application and investigation of TPGS and PEG in spray-dried particulate system. *Journal of Controlled Release* 103:565-575.
- Mundargi RC, Babu VR, Rangaswamy V, Patel P, Aminabhavi TM. 2008. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *Journal of Controlled Release* 125:193-209.
- Murillo M, Gamazo C, Goñi MM, Irache JM and Blanco-Príeto MJ. 2002. Development of microparticles prepared by spray-drying as a vaccine delivery system against brucellosis. *International Journal of Pharmaceutics* 242:341-344.
- Muzzarelli, R A A. 1999. Native, industrial and fossil chitins. *EXS journal*. 87:1-6.
- Nicolaou KC, Dai WM, Kiplin Guy R. 1994. Chemistry and Biology of Taxol *Angewandte Chemie International Edition in English* 33:15-44.

- Odonkor CA, Achilefu S. 2008. Differential activity of caspase-3 regulates susceptibility of lung and breast tumor cell lines to Paclitaxel. *The Open Biochemistry Journal*
- Ofir R, Seidman R, Rabinski T, Krup M, Yavelsky V, Weinstein Y, Wolfson M. 2002. Taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian and MCF7 breast carcinoma cells is caspase-3 and caspase-9 independent. *Cell death and differentiation* 9:636-642.
- Oyewumi MO, Mumper RJ. 2002. Engineering tumor-targeted gadolinium hexanedione nanoparticles for potential application in neutron capture therapy. *Bioconjugate Chemistry* 13:1328–1335.
- Pan B, Cui D, Sheng Y, Ozkan C, Gao F, He R, Li Q, Xu P, Huang T. 2007. Dendrimer-modified magnetic nanoparticles enhance efficiency of gene delivery system. *Cancer Research* 67:8156–8163.
- Panchagnula R. 1998. Pharmaceutical aspects of paclitaxel. *International Journal of Pharmaceutics* 172:1-15.
- Panyam J, Sahoo SK, Prabha S, Bargar T, Labhasetwar V. 2003. Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly (d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 262:1–11.
- Panyam J, Labhasetwar V. 2003a. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews* 55:329-347.
- Panyam J, Labhasetwar V. 2003b. Intracellular Drug Delivery with Nanoparticles: Correlating Drug Release with Therapeutic Efficacy. *American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*. www.aapsj.org/abstracts/AM_2003/AAPS2003-000192.PDF
- Panyam J, Williams D, Dash A, Leslie-Pelecky D, Labhasetwar V. 2004. Solid-state solubility influences encapsulation and release of hydrophobic drugs from PLGA/PLA nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 93:1804-1814
- Parejo C, Ortiz C, Serradilla C, Vázquez B, Gallardo A y San Román J. 1996. Contribución de las macromoléculas al diseño y desarrollo de sistemas de dosificación controlada y dirigida de medicamentos. *Revista de Plásticos Modernos* 482: 141-154.
- Peng J, He X, Wang K, Tan W, Li H, Xing X, Wang Y. 2006. An antisense oligonucleotide carrier based on amino silica nanoparticles for antisense inhibition of cancer cells. *Nanomedicine* 2:113–120.
- Penco M, Sartore L, Bignotti F, D'Antone S and Di Landro L. 2000. Thermal properties of a new class of block copolymers based on segments of poly(D, L -lactic-glycolic acid) and poly(ϵ -caprolactone). *European Polymer Journal* 36:901-908.

Peppas NA y Gurny R. 1983. Relation between the structure of polymers and the controlled release of active ingredients. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 58:2-8.

Peppas NA. 1985. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 60:110-111.

Peppas NA, Huang Y, Torres-Lugo M, Ward JH, Zhang J. 2000. Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology. *Annual Review of Biomedical Engineering* 2:9-29.

Prabu P, Chaudhari AA, Dharmaraj N, Khil MS, Park SY, Kim HY. 2009. Preparation, characterization, in-vitro drug release and cellular uptake of poly(caprolactone) grafted dextran copolymeric nanoparticles loaded with anticancer drug. *Journal of Biomedical Materials Research A* 90:1128-36.

Ramos Picos D, Gómez Carril M y Fernández Mena D. 2001. Métodos de obtención de microesferas biodegradables. *Revista Cubana. Farmacéutica* 35:126-135.

Rao S., He L., Chakravarty S., Ojima I, Orr GA and Horwitz SB. 1999. Characterization of the Taxol Binding Site on the Microtubule. Identification of Arg²⁸² in β -tubulin as the site of photoincorporation of a 7-benzophenone analogue of Taxol. *The Journal of Biological Chemistry* 274:37990–37994.

Reed AM y Gilding DK. 1981. Biodegradable polymers for use in surgery poly(glycolic)/poly(lactic acid) homo and copolymers: 2. In vitro degradation *Polymer* 22:494-498.

Riehemann K, Schneider SW, Luger TA, Godin B, Ferrari M, and Fuchs H. 2009. Nanomedicine—Challenge and Perspectives *Angewandte Chemie International Edition* 48:872–897.

Ríhová B. 1996. Biocompatibility of biomaterials: hemocompatibility, immunocompatibility and biocompatibility of solid polymeric materials and soluble targetable polymeric carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 21:157-176.

Ríhová B. 2000. Immunocompatibility and biocompatibility of cell delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 42:65-80.

Ringsdorf H. 1975. Structure and properties of pharmacologically active polymers. *Journal of Polymer Science: Polymer Symposia* 51:135-153.

Ritger P, Peppas NA. 1987a. A simple equation for description of solute release. I. Fickian and non-Fickian release from non-swellable device in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Controlled Release* 5:23-36.

Ritger P, Peppas N. 1987b. A simple equation for description of solute release. II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of Controlled Release* 5:37-42.

Rivera E. 2003. Liposomal anthracyclines in metastatic breast cancer: clinical update. *Oncologist* 8:3–9.

Rodgers P. 2010. Ciclo de conferencias y debates en ciencias. Revolución nanotecnológica: Estado actual de las aplicaciones prácticas y avances de la Nanociencia: desde las aplicaciones robóticas-biomédicas a las energéticas. Ciclo de conferencias y debates en ciencias. Fundación Ramón Areces.

Roberts, G.A.F. 1992. *Chitin Chemistry*. McMillan Press Ltd.

Rowinsky EK, Cazenave LA, Donehower RC. 1990. Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent. *Journal of the National Cancer Institute*. 82:1247-1259.

Rowinsky EK, Donehower RC. 1995. Paclitaxel (taxol). *The New England Journal of Medicine* 332:1004-1014.

Sahoo SK, Panyam J, Prabha S y Labhasetwar V. 2002. Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D ,L -lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *Journal of Controlled Release* 82:105-114.

Sahoo SK, Parveen S, Panda JJ. 2007. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine* 3:20-31.

Salthouse TN. 1976. Cellular enzyme activity at the polymer-tissue interface: a review. *Journal of Biomedical Materials Research* 10:197-229.

Sastre RL, Blanco MD, Teijón C, Olmo R, Teijón JM. 2004. Preparation and characterization of 5-fluorouracil-loaded poly(ϵ -caprolactone) microspheres for drug administration. *Drug Development Research* 63:41-53.

Saunders DE, Lawrence WD, Christensen C, Wappler NL, Ruan H, Deppe G. 1997. Paclitaxel-induced apoptosis in MCF-7 breast-cancer cells. *International Journal of Cancer* 70:214-20.

Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. 1979. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 277:665–667.

Serrano MC, Pagani R, Vallet-Regí M, Peña J, Rámila A, Izquierdo I and Portolés MT. 2004. In vitro biocompatibility assessment of poly(ϵ -caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. *Biomaterials* 25:5603-5611.

Shim HY, Park JH, Paik HD, Nah SY, Kim DS, Han YS. 2007. Acacetin-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells involves caspase cascade, mitochondria-mediated death signaling and SAPK/JNK1/2-c-Jun activation. *Molecules and Cells* 24:95-104.

Si-Shen F y Shu C. 2003. Chemotherapeutic engineering: Application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. *Chemical Engineering Science* 58:4087-4114.

Siepmann J y Siepmann F. 2008. Mathematical modeling of drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 364:328-343.

Silva-Júnior AA, Scarpa MV, Pestana KC, Mercuri LP, De Matos JR and Gomes de Oliveira Thermal A. 2008. Thermal analysis of biodegradable microparticles containing ciprofloxacin hydrochloride obtained by spray drying technique. *Thermochimica Acta* 467:91-98.

Silva GA. 2004. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. *Surgical neurology* 61:216-220.

Singla AK, Garg A, Aggarwal D. 2002. Paclitaxel and its formulations. *International Journal of Pharmaceutics* 235:179-192

Sinha VR, Bansal K, Kaushik R, Kumria R, Trehan A. 2004. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International Journal of Pharmaceutics* 278:1-23.

Smith R, Oliver C, Williams DF. 1987. The enzymatic degradation of polymers in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research* 21:991-1003.

Snyder JP, Nettles JH, Cornett B, Downing KH, Nogales E. 2001. The binding conformation of Taxol in beta-tubulin: a model based on electron crystallographic density. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences USA* 98:5312-5316.

Soares JP, Santos JE, Chierice GO, Cavalheiro ETG. 2004. Thermal behaviour of alginic acid and its sodium salt. *Eclética Química* 29:53-56.

Solheim E, Pinholt EM, Bang G. y Sudmann E. 1992. Effect of local hemostatics on bone induction in rats: a comparative study of bone wax, fibrin-collagen paste, and bioerodible polyorthoester with and without gentamicin. *Journal of Biomedical Materials Research* 26:791-800.

Sorger PK, Dobles M, Tournebize R, Hyman AA. 1997. Coupling cell division and cell death to microtubule dynamics. *Current Opinion in Cell Biology* 9:807-814.

Soule, HD; Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. 1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 51:1409-1416.

Sparreboom A, Scripture CD, Trieu V, Williams PJ, De T, Yang A, Beals B, Figg WD, Hawkins M, Desai N. 2005. Comparative, preclinical and clinical pharmacokinetics of a cremophor-free, nanoparticles albumin-bound paclitaxel (ABI-007) and paclitaxel formulated in cremophor (taxol). *Clinical Cancer Research* 11:4136-4143.

Suri SS, Fenniri H, Singh B. 2007. Nanotechnology-based drug delivery systems. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* 2:16.

Suzuki K y Price JC. 1985. Microencapsulation and dissolution properties of a neuroleptic in a biodegradable polymer, poly(d,l-lactide). *Journal of Pharmaceutical Sciences* 74:21–24.

Takeuchi H, Handa T, Kawashima Y. 1987a . Enhancement of the dissolution rate of a poorly water-soluble drug (tolbutamide) by a spray-drying solvent deposition method and disintegrants. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 39:769-773.

Tasciotti E, Liu X, Bhavane R, Plant K, Leonard AD, Price KB, Ming-Cheng Cheng M, Decuzzi P, Tour JM, Robertson F y Ferrari M. 2008. Mesoporous silicon particles as a multistage delivery system for imaging and therapeutic applications. *Nature Nanotechnology* 3:151-157.

Taylor RC, Cullen PC y Martin SJ. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9:231-241.

Tice TR y Gilley RM. 1985. Preparation of injectable controlled – release microcapsules by a solvent – evaporation process. *Journal of Controlled Release* 2:343-352.

Thomadaki H, Talieri M, Scorilas A. 2006. Treatment of MCF-7 cells with Taxol and etoposide induces distinct alterations in the expression of apoptosis-related genes BCL2, BCL2L12, BAX, CASPASE-9 and FAS. *Journal of Biological Chemistry* 387:1081-1086.

Twiddy D, Cohen GM, Macfarlane M, Cain K. 2006. Caspase-7 is directly activated by the approximately 700-kDa apoptosome complex and is released as a stable XIAP-caspase-7 approximately 200-kDa complex. *Journal of Biological Chemistry* 281:3876-3888.

Vargas A y Delie F. 2009. Uso potencial de nanopartículas biodegradables en la terapia fotodinámica de enfermedades oculares. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología* 84:169-176.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H y Reutellingsperger C. 1995. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods* 184:39-51.

Vert, M. 1986. Polyvalent polymeric drug carriers. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 2:291-327.

Vicari L, Musumeci T, Giannone I, Adamo L, Conticello C, De Maria R, Pignatello R, Puglisi G y Gulisano M. 2008. Paclitaxel loading in PLGA nanospheres affected the in vitro drug cell accumulation and antiproliferative activity. *BMC Cancer* 8:212.

- Vobořilová J, Němcová-Fürstová V, Neubauerová J, Ojima I, Zanardi I, Gut I, Kovář J. 2009. Cell death induced by novel fluorinated taxanes in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells. *Investigational New Drugs*
- Wakiyama N, Juni K, Nakano M. 1982. Preparation and evaluation in vitro and in vivo of polylactic acid microspheres containing dibucaine. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)* 30:3719-3727.
- Wang YM, Sato H, Adachi I, Horikoshi I. 1996. Preparation and characterization of poly(lactic-co-glycolic acid) microsphere for targeted delivery of a novel anticancer agent, Taxol. *Chemical and pharmaceutical bulletin* 44:1935-1940.
- Wang FJ, Wang CH. 2003. Etanidazole-loaded microspheres fabricated by spray-drying different poly(lactide/glycolide) polymers: Effects on microsphere properties. *Journal of Biomaterials Science* 14:157-183.
- Wang TH, Wang HS, Soong YK. 2000. Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer* 88:2619-2628.
- Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. 1971. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of American Chemical Society* 93:2325-2327.
- Westedt U, Kalinowski M, Wittmar M, Merdan T, Unger F, Fuchs J, Schäller S, Bakowsky U, Kissel T. 2007. Poly (vinyl alcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for local delivery of paclitaxel for restenosis treatment. *Journal of Controlled Release* 119:41-51.
- Williams DF. 1980. The effect of bacteria on absorbable sutures. *Journal of Biomedical Materials Research* 14:329-38.
- Williams DF. 1992. Mechanisms of biodegradation of implantable polymers. *Clinical Materials* 10:9-12
- Winnips C. 2000. Drug Delivery. *Drug Discovery World Winter* I:62-66.
- Yan F, Kopelman R. 2003. The embedding of meta-tetra(hydroxyphenyl)-chlorin into silica nanoparticle platforms for photodynamic therapy and their singlet oxygen production and pH-dependent optical properties. *Photochemistry and Photobiology*. 78:587-591.
- Yang XH, Sladek TL, Liu X, Butler BR, Froelich CJ, Thor AD. 2001. Reconstitution of caspase 3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin- and etoposide-induced apoptosis. *Cancer Research* 61:348-354.
- Yang T, Cui FD, Choi MK, Cho JW, Chung SJ, Shim CK, Kim DD. 2007. Enhanced solubility and stability of PEGylated liposomal paclitaxel: in vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics* 338:317-326.

Yasukawa T, Ogura Y, Tabata Y, Kimura H, Wiedemann P y Honda Y. 2004. Drug delivery systems for vitreoretinal diseases. *Progress in Retinal and Eye Research* 23:253-281.

Yeung TK, Germond C, Chen X, Wang Z. 1999. The mode of action of taxol: apoptosis at low concentration and necrosis at high concentration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 263:398-404.

Yong KT, Qian J, Roy I, Lee HH, Bergey EJ, Trampusch KM, He S, Swihart MT, Maitra A, Prasad PN. 2007. Quantum rod bioconjugates as targeted probes for confocal and two-photon fluorescence imaging of cancer cells. *Nano Letters* 7:761-765.

Zhang Z, Feng SS. 2006. The drug encapsulation efficiency, in vitro drug release, cellular uptake and cytotoxicity of Paclitaxel-loaded poly (lactide)tocopheryl polyethylene glycol succinato nanoparticles. *Biomaterials* 27:4025-4033.

Zhang Z, Lee SH, Gan CW, Feng SS. 2008. In Vitro and In Vivo Investigation on PLA-TPGS Nanoparticles for Controlled and Sustained Small Molecule Chemotherapy. *Pharmaceutical Research* 25:1925-1935.

Zoli W, Ulivi P, Tesei A, Fabbri F, Rosetti M, Maltoni R, Giunchi DC, Ricotti L, Briigliadori G, Vannini I, Amadori D. 2005. Addition of 5-fluorouracil to doxorubicin-paclitaxel sequence increases caspase-dependent apoptosis in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research* 7:681-689.

ANEXO





PREPARATION, CHARACTERIZATION AND *IN VITRO* RELEASE OF PACLITAXEL FROM DRUG-LOADED PREPARED BY SPRAY DRYING TECHNIQUE.

P. López-Gasco¹, J. Benedí¹, A. Fernández¹, I. Iglesias¹, R. Lozano¹, MD. Blanco²

¹ Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, UCM

² Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, UCM

INTRODUCCIÓN

El Paclitaxel (PTX) es uno de los antineoplásicos más usados de origen natural para el tratamiento del cáncer de mama y ovario. Actúa sobre la equilibrio dinámico de los microtúbulos inhibiendo la replicación celular en la fase G2/M.

El PTX es insoluble en agua y precisa una compleja formulación para su administración intravenosa que se realiza mediante aceite de castor polietoxilado (Cremophor EL), el cual es responsable de numerosos efectos secundarios del Paclitaxel (Taxol®) que incluyen reacciones de hipersensibilidad, nefrotoxicidad, cardiotoxicidad y neurotoxicidad.

La administración del PTX mediante sistemas poliméricos de liberación controlada como las microesferas podrían ofrecer numerosas ventajas terapéuticas a la hora de su administración como por ejemplo la reducción de los efectos de las reacciones de hipersensibilidad.

Por este motivo, hemos recurrido a la búsqueda de distintas microesferas (MS) preparadas con polímeros biodegradables y biocompatibles: poli(ε-caprolactona) (PCL) y copolímeros de poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) de dos composiciones PLGA 50:50 y PLGA 75:25.

MATERIAL Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE MICROESFERAS

Se sintetizaron por atomización y secado (Mini Spray Dryer B-191, Büchi, Switzerland) microesferas de PCL ($M_n=33400$) a partir de disoluciones poliméricas al 1% p/v; y de PLGA 50:50 ($M_n=21700$) y PLGA 75:25 ($M_n=36100$) a partir de disoluciones poliméricas 2% p/v, todas ellas disueltas en Diclorometano (DCM). Se prepararon microesferas con y sin Paclitaxel, donde el 99% era polímero y el 1% fármaco. Previamente, se optimizaron los parámetros del Spray Dryer.

Síntesis	PLGA 50:50 + PTX	PLGA 75:25 + PTX	PCL + PTX
Temperatura de entrada (°C)	60	60	42
Temperatura de salida (°C)	42	42	29
Flujo Aire (Nl/h)	800	800	800
Bomba (%)	5	5	16
Aspirador (%)	70	70	70



Mini Spray Dryer B-191

ESTUDIOS MORFOLÓGICOS

Se determinaron por microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FEG).

ESTUDIOS DE LIBERACIÓN *IN VITRO*

Cantidad de fármaco incorporado

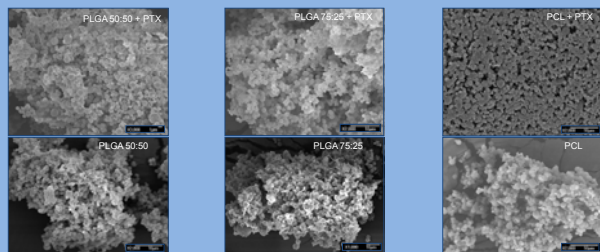
3 mg de MS se disolvieron en 1 ml de DCM, se llevó a evaporación, y se recuperó con 1 ml de Acetonitrilo/Agua al 60% para proceder a su lectura por HPLC.

Cinética de liberación *in vitro*



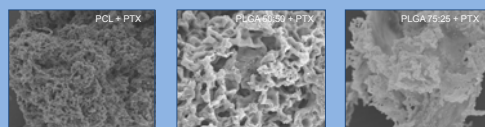
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ESTUDIOS MORFOLÓGICOS

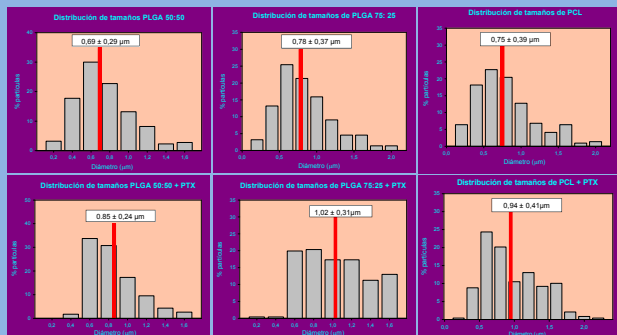


CINÉTICA DE LIBERACIÓN *IN VITRO*

Después de la liberación, se observó que las microesferas más degradadas son las de PLGA 50:50, por tener mayor carácter hidrófilo:



La liberación *in vitro* del Paclitaxel desde las MS está próximo al 100% en los tres casos considerando el factor de extracción. La máxima cantidad de PTX liberado se determinó a las 841h.



	Dn	U	% nanoparticulas (≤1μm)
PLGA 50:50	0,69	1,52	86,81%
PLGA 50:50 + PTX	0,85	1,24	83,54%
PLGA 75:25	0,78	1,65	79,09%
PLGA 75:25 + PTX	1,02	1,25	58,44%
PCL	0,75	1,73	80,45%
PCL + PTX	0,94	1,48	64,28%

D_n: diámetro promedio en número, D_w = ΣND_n³/ΣND_n²; D_w: diámetro promedio en peso, D_n = ΣND_n³/ΣND_n²
 U: índice de polidispersidad, U = D_w/D_n
 N_i: número de partícula medida, D_i: diámetro de partícula medida

EFICIENCIA DE INCORPORACIÓN

Se obtuvieron micro/nanopartículas esféricas con un tamaño medio ≤1μm donde la inclusión del fármaco fue significativa.

	Eficacia de incorporación del PTX (%)	μg de PTX /mg de MS
PLGA 50:50 + PTX	91,4 %	9,14 ± 0,17
PLGA 75:25 + PTX	76,9%	7,69 ± 0,08
PCL + PTX	87,9%	8,79 ± 0,14

CONCLUSIONES

Se obtuvieron micro/nanopartículas esféricas con un tamaño medio ≤1μm donde la inclusión del fármaco fue significativa.

La liberación *in vitro* se ajusta a 2 etapas para las MS de PLGA 75:25 y en 3 etapas para las MS de PLGA 50:50 y PCL. En el caso de las MS de PCL, se libera más rápido y mayor cantidad porque la PCL posee una región cristalina y otra amorfa, por lo cual el fármaco no se reparte de forma tan homogénea.

Los modelos matemáticos aplicados muestran que la liberación del PTX se produce por difusión mediante un compartimento Fickiano desde las MS de PLGA 50:50 y de PCL; y por erosión de polímero en los tres casos.

Con los resultados obtenidos, se puede concluir que el tamaño, la morfología, la eficiencia de incorporación y la cinética de liberación del Paclitaxel, parecen adecuados para evaluar la efectividad de los soportes diseñados mediante los correspondientes estudios *in vivo* para una posible aplicación en la terapia del cáncer de mama y de ovario.



IN VITRO BIOLOGICAL EVALUATION OF PACLITAXEL-LOADED NANOPARTICLES IN MCF-7 CELLS

P. López-Gasco, A. Martínez, I. Iglesias, J. Benedí, R. Lozano, J.M. Teijón

Polymeric Material Group for the Controlled Release of Bioactive Compounds in Biomedicine. Universidad Complutense de Madrid. Spain.

INTRODUCCIÓN

El Paclitaxel (PTX) es uno de los antineoplásicos más usados de origen natural para el tratamiento del cáncer de mama y ovario. Actúa sobre el equilibrio dinámico de los microtúbulos inhibiendo la replicación celular en la fase G2/M. El PTX es insoluble en agua y precisa una compleja formulación para su administración intravenosa.

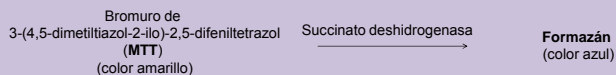
Por este motivo, se realizó la síntesis de nanopartículas (NP) preparadas con polímeros biodegradables y biocompatibles: poli(ϵ -caprolactona) (PCL) y copolímeros de poli (láctico-co-glicólico) (PLGA) de dos composiciones PLGA 50:50 y PLGA 75:25, mediante la técnica de atomización y secado (Spray Dryer).

Tras la caracterización fisicoquímica de las NP, se estudió la viabilidad celular en células de carcinoma humano de mama MCF-7.

MATERIAL Y MÉTODOS

ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR: MTT

La viabilidad celular se valoró por el método del MTT. Este ensayo se basa en la reducción metabólica:



Se determina la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Placas de 96 pocillos 10.000 células/pocillo \rightarrow Tratamiento de MCF-7: - Paclitaxel en disolución de 3 μ M a 60 μ M - NP con y sin PTX de 30 μ M a 60 μ M

MTT al 20% (2mg MTT/ml PBS), incubar a 37°C 1h. Reemplazar por DMSO y lectura en el lector de placas a $\lambda=550$ nm

Incubar 24h, 48h, 72h y 96h.

	PCL - PTX	PLGA 50:50 - PTX	PLGA 75:25 - PTX
30 μ M	2,86 mg/ml	2,8 mg/ml	3,25 mg/ml
40 μ M	3,82 mg/ml	3,73 mg/ml	4,43 mg/ml
50 μ M	4,77 mg/ml	4,64 mg/ml	5,52 mg/ml
60 μ M	5,72 mg/ml	5,63 mg/ml	6,60 mg/ml

La tabla representa las cantidades de NP utilizadas en el ensayo de MTT, para cada concentración.

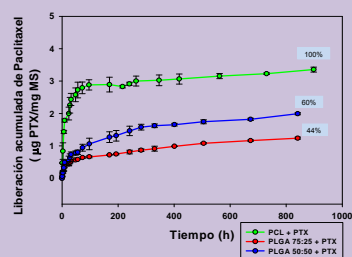
ESTUDIOS DE LIBERACIÓN IN VITRO

Las NP se encuentran cargadas con 1% de PTX

	Diámetro medio (μ m) \pm S.E.M	% cantidad de PTX incorporado
PLGA 50:50	0,694 \pm 0,020	
PLGA 50:50 - PTX	0,856 \pm 0,016	91,4 %
PLGA 75:25	0,785 \pm 0,025	
PLGA 75:25 - PTX	1,030 \pm 0,021	76,9%
PCL	0,750 \pm 0,027	
PCL - PTX	0,947 \pm 0,027	87,9%

Libерación in vitro

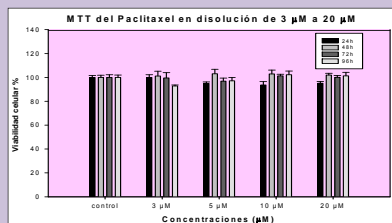
Libерación in vitro de las NPs con PTX con los porcentajes de PTX liberados al cabo de los 35 días de liberación.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

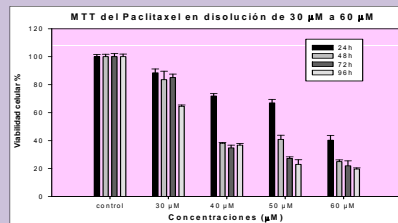
Resultados de MTT del Paclitaxel en disolución

Los valores presentados en las diferentes gráficas, representan la media \pm el error estándar de la media (S.E.M) sobre los controles basales respectivos. El nivel de significación estadística se definió como $p < 0,0001$.

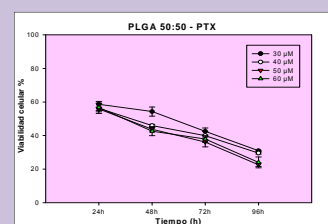
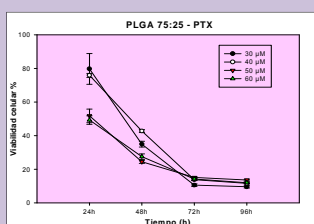
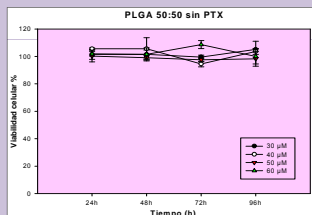
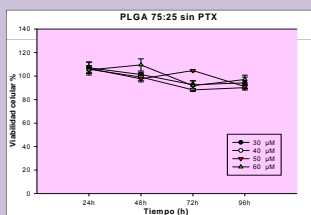


Como podemos observar en los histogramas, el Paclitaxel en disolución no varía la viabilidad celular entre las concentraciones de 3 a 20 μ M.

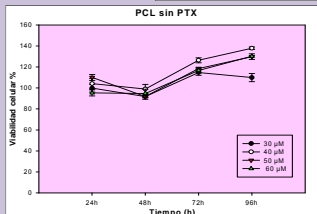
En cambio, se observa una disminución significativa entre 30 μ M y 60 μ M en función del tiempo, siendo estas concentraciones las elegidas para nuestro estudio.



Resultados de MTT de las nanopartículas sin fármaco y con fármaco



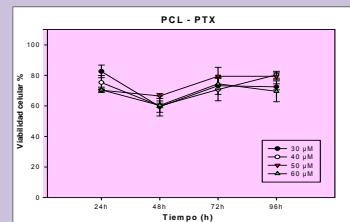
Como se observan en las gráficas, no existen diferencias significativas en la viabilidad celular cuando las células son tratadas con las NP sin PTX. Esto muestra que no presentan toxicidad.



Sin embargo, se observa que la viabilidad celular aumenta desde las 48h con las NP de PCL, esto se debe a la posible estimulación que ejerce la PCL sobre la actividad mitocondrial, como demuestran estudios de Serrano y col., 2004 sobre fibroblastos de ratón L929.

La viabilidad celular de MCF-7 tratadas con PLGA 50:50-PTX disminuye significativamente a las 24h de tratamiento, debido a la más rápida liberación de PTX desde estas NP. Se observa que el PTX liberado es eficaz a bajas concentraciones.

Las NP de PLGA 75:25-PTX disminuyen la viabilidad en función del tiempo, de acuerdo con la menor velocidad de liberación de PTX. Esta formulación es más eficaz a tiempos prolongados de exposición.



De igual modo, las NP de PCL-PTX producen un ligero aumento de la viabilidad celular que se compensa con la lenta liberación del PTX desde las NP a partir de las 48h.

CONCLUSIONES

➢ El Paclitaxel en disolución a concentraciones inferiores a 20 μ M no causa toxicidad para la línea celular MCF-7.

➢ Las NP sin PTX no producen toxicidad a las células MCF-7 por lo que son un buen vehículo de liberación in vitro.

Bibliografía:

Serrano M. C., Pagani R., Vallet-Regí M., Peña J., Rámila A., Izquierdo I. and Portolés M. T. 2004. In vitro biocompatibility assessment of poly(ϵ -caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. Biomaterials 25:5603-5611.

➢ La liberación del PTX desde las NP de PCL produce una ligera recuperación de la viabilidad celular, por la posible estimulación mitocondrial de la PCL.

➢ Las NP de PLGA 50:50 y 75:25 son efectivas en la liberación del PTX. La viabilidad celular disminuye en función del tiempo y de las concentraciones utilizadas. Este descenso de la viabilidad también se relaciona con los comportamientos de liberación de los polímeros.

➢ Por tanto, estas NP -PTX son efectivas en causar la muerte celular de la línea celular MCF-7.

Agradecimientos: Grupos UCM-CAM (920613) y Beca Fundación Rafael Folch a PLópez-Gasco



PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS OBTENIDAS POR EL MÉTODO DE DOBLE EMULSIÓN: LIBERACIÓN *IN VITRO* DE PACLITAXEL

P. López- Gasco¹, A. Fernández², M. Benito², E. Pérez², J. Benedí¹, J.M. Teijón²

¹Dpto de Farmacología, Facultad de Farmacia. ²Dpto de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina. UCM.

INTRODUCCIÓN

El Paclitaxel (PTX), antineoplásico natural obtenido de la corteza del Tejo del Pacífico, *Taxus brevifolia*, es de los más usados para el tratamiento de cáncer de ovario y de mama. Actúa estabilizando los microtúbulos e inhibiendo la replicación celular en la fase G₂/M.

Dado su baja solubilidad, se encuentra actualmente formulado bajo el nombre de Taxol®, una solución que contiene 6 mg de PTX por ml de Cremophor EL y alcohol deshidratado (1:1, v/v) y se administra por vía intravenosa.

Debido a sus numerosos efectos adversos (reacciones de hipersensibilidad) y por su limitada disponibilidad, se buscan nuevas formas de sistemas poliméricos de liberación controlada que ofrezcan ventajas a la hora de administrarlo.

Por este motivo, hemos recurrido por la técnica de doble emulsión a la obtención de distintas nanopartículas (NP) preparadas con polímeros biodegradables: poli-ε-caprolactona (PCL) y copolímeros de poli(D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA) de dos composiciones PLGA 50:50 y PLGA 75:25.

MATERIAL Y METODOS

OBTENCIÓN DE MICROESFERAS

Se prepararon NP de PCL, PLGA 50:50 y PLGA 75:25 con y sin PTX, usando el método de la doble emulsión. Para ello, se disolvieron 60 mg de polímero y 6 mg de PTX en 2 ml de DCM mediante agitación magnética. Se pipeteó gota a gota sobre un volumen de 12 ml de PVA al 2 % (p/v). La mezcla obtenida se sonicó durante 30 segundos a 50 W. La emulsión resultante se pipeteó gota a gota sobre la disolución de la misma mezcla polimérica (60 mg de polímero en 2 ml de DCM) para llevar a cabo una nueva emulsión. Después de una nueva sonicación de 30 segundos a 50 W, la emulsión final se volcó sobre 12 ml de PVA al 2 % (p/v) y se sonicó durante 5 min a 50 W. Finalmente, se dejó en agitación magnética permanente hasta la evaporación total del DCM. Al día siguiente, se recuperaron las NP mediante ultracentrifugación a 35.000 rpm durante 15 min en frío lavándose 2 veces con agua destilada.

ESTUDIOS MORFOLÓGICOS

Se determinaron por microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FEG). La determinación del tamaño de partícula y su distribución fueron determinadas por laser Light Scattering Microtrac-Zetatrac S3500.

TERMOGRAVIMETRIA (TGA)

Se obtuvieron las curvas de la TGA del Paclitaxel, de las NP, y de las NP con PTX usando un termo analizador Mettler Toledo. El peso de las muestras fue de 1,5 mg. Las muestras se situaron en una balanza y la temperatura fue incrementando de 25°C a 600°C a una velocidad de 10°C min⁻¹ bajo una atmosfera de nitrógeno (velocidad de 60 cm³ min⁻¹).

ESTUDIOS DE LIBERACIÓN *IN VITRO*

Cantidad de fármaco incorporado

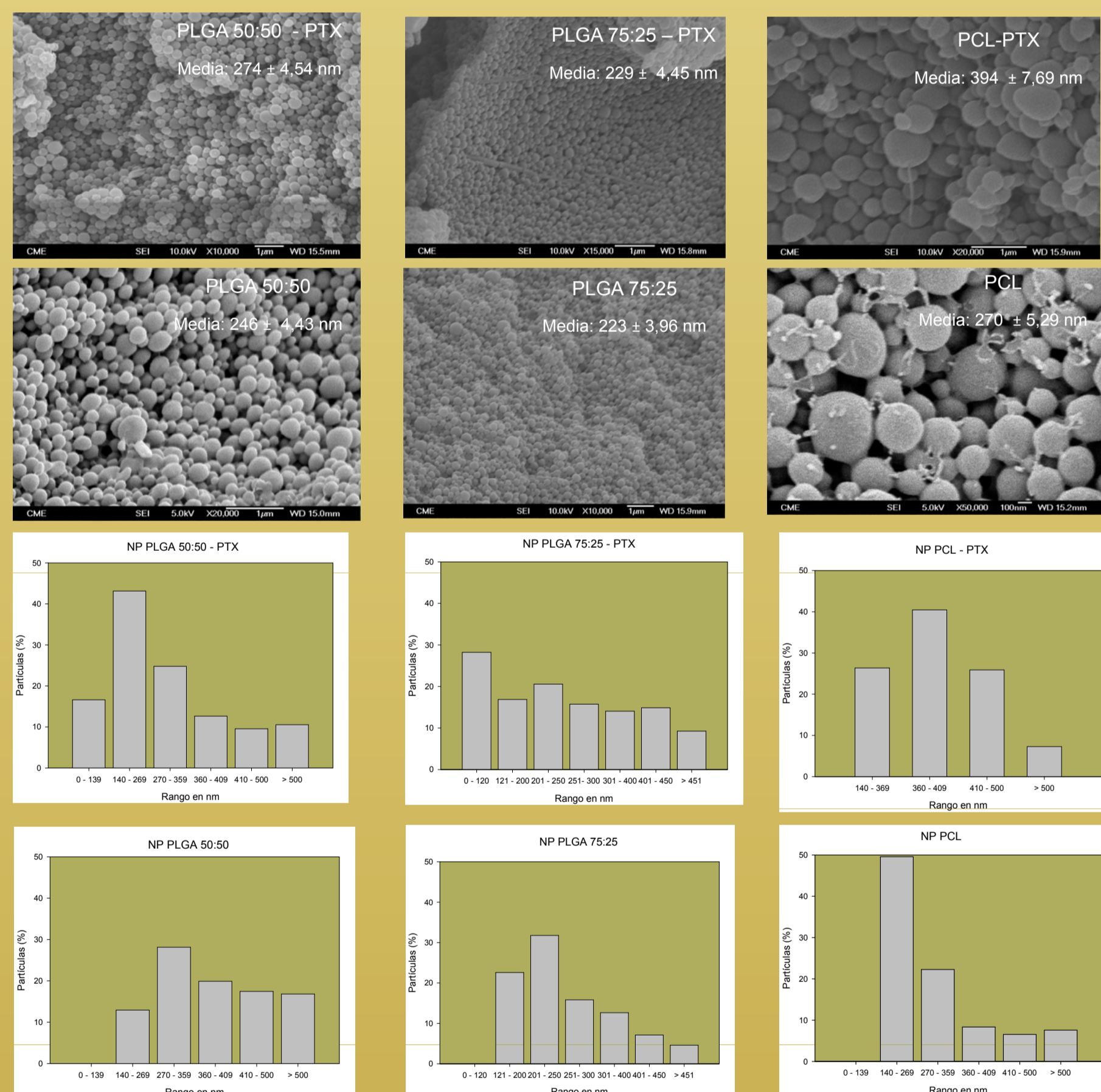
Se disolvieron 3 mg de NP en 1 ml de DCM, se llevó a evaporación, y se extrajo el fármaco con 1 ml de acetonitrilo/agua (60:40; v/v) para proceder a su lectura por HPLC.

Liberación *in vitro*



RESULTADOS

ESTUDIOS MORFOLÓGICOS



EFICACIA DE INCORPORACIÓN

La eficacia de incorporación fue bastante elevada:

- PLGA 75:25 - PTX 44,99 ± 5,17 µg de PTX /mg de NP
- PLGA 50:50- PTX 50,12 ± 8,07 µg de PTX /mg de NP
- PCL-PTX 37,34 ± 5,889 µg de PTX /mg de NP.

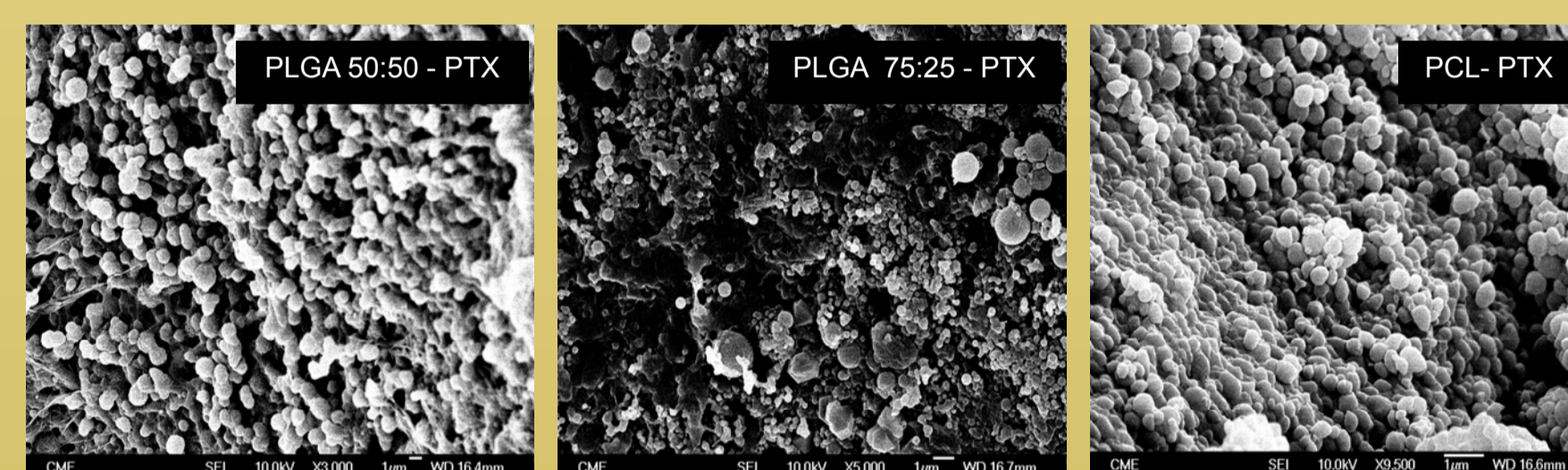
TGA

Muestra	Pérdida de masa (%) hasta 600 °C	Pico temperatura en DTG (°C)	Pérdida de masa (%)
Paclitaxel	78,92	245,39	20,45
PCL - PTX	100	404,48	63,81
PCL	100	402,22	62,41
PLGA 50:50 - PTX	100	364,84	72,88
PLGA 50:50	100	318,88	40,50
PLGA 75:25 - PTX	100	356,49	82,38
PLGA 75:25	100	361,67	74,13
PLGA 75:25	100	320,96	41,22

El Paclitaxel puro se degrada en un solo paso a un máximo de temperatura de 245,39°C. La presencia de PTX en las NP no provoca modificaciones en la degradación de las partículas salvo en las NP de PLGA 50:50, donde su inclusión modifica la degradación a una sola etapa que corresponde a la temperatura de la segunda etapa en las NP PLGA 50:50 sin fármaco.

ESTUDIOS DE LIBERACIÓN *IN VITRO*

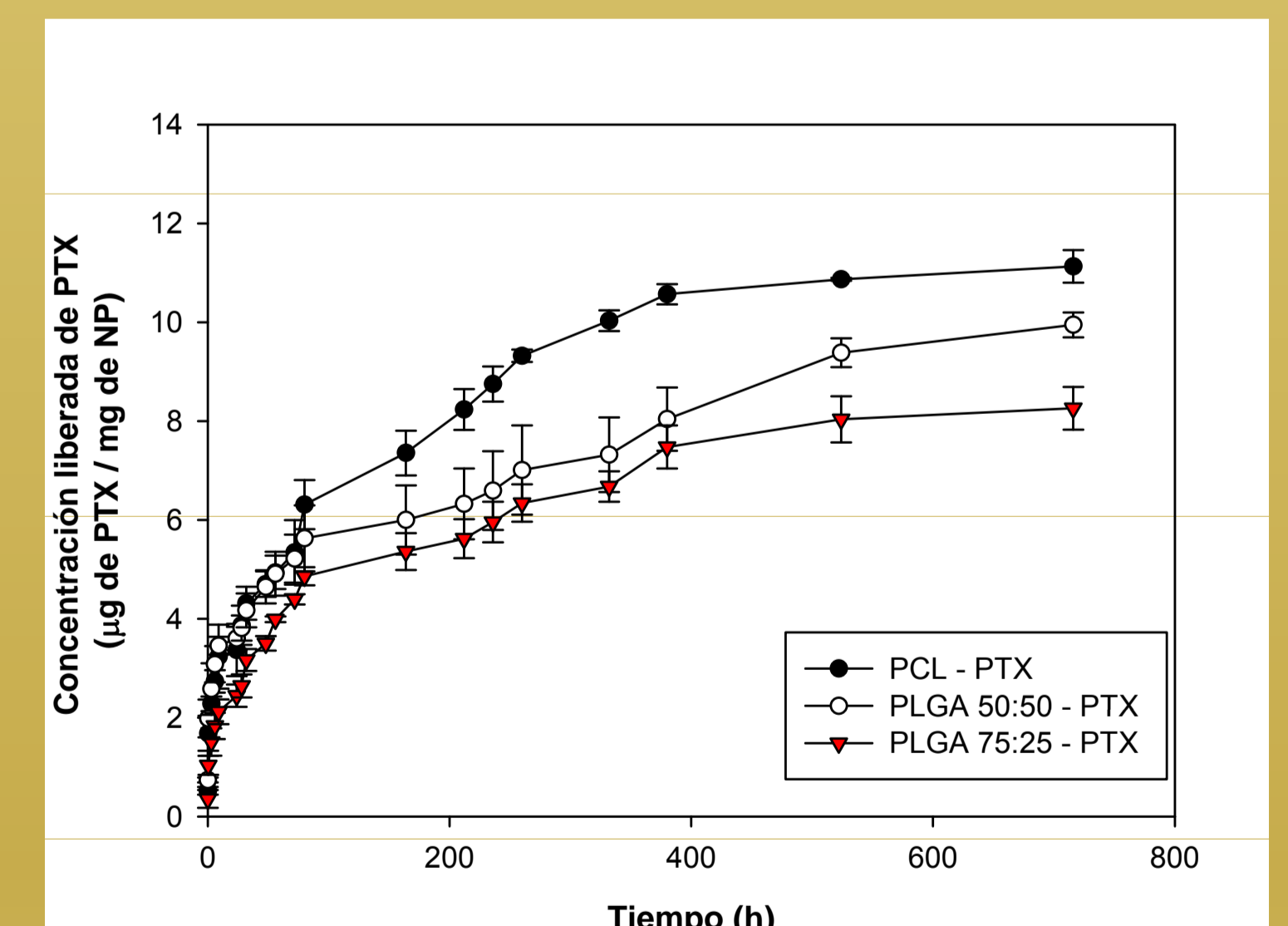
Después de la liberación, se observó que las NPs más degradadas son las de PLGA 50:50, por tener mayor carácter hidrófilo:



Al cabo de 841 h, la máxima liberación de PTX que se alcanza es desde las NPs de PCL con un 60 % liberado, considerando el factor de extracción.

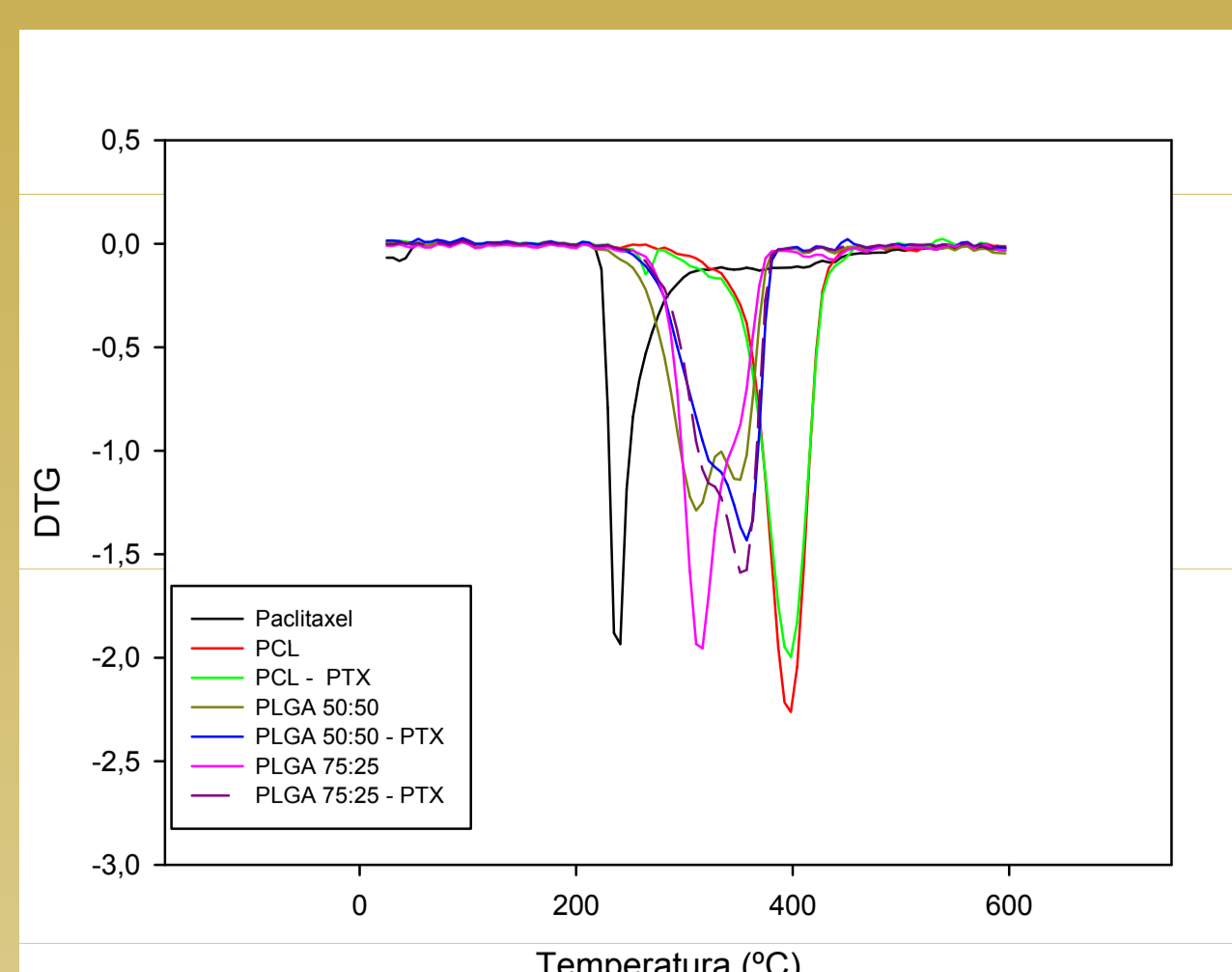
La liberación del PTX se produce en 3 etapas desde todas las NPs, sin embargo, en las primeras 9 horas, desde las NP de PLGA 50:50, la liberación del PTX es la más rápida, dado al carácter hidrófilo y por tener el peso molecular más bajo de los tres polímeros empleados.

Nanopartículas (NPs)	Etapas	K(µg/mg.h)	r ²
PCL - PTX	0 h a 9h	0,2906	0,9211
	24h a 380h	0,0188	0,9739
	524h a 841h	0,0011	0,9708
PLGA 50:50 - PTX	0 h a 6h	0,4014	0,9057
	9h a 72h	0,0305	0,9834
	80h a 841h	0,0066	0,9916
PLGA 75:25- PTX	0h a 6h	0,2376	0,9504
	6h a 80h	0,0374	0,9923
	164h a 841h	0,0057	0,9493



El orden de ajuste de los datos experimentales a los modelos matemáticos de cinética de liberación fue similar tanto para el modelo de Higuchi como para el de Korsmeyer-Peppas. Se considera una liberación tipo fickiana para las NPs de PLGA 75:25 y PCL.

	Higuchi		Korsmeyer-Peppas	
	r ²	K (h ^{-1/2})	r ²	n
PLGA75:25 - PTX	0,973	0,3093	0,984	0,40
PLGA50:50 - PTX	0,958	0,2679	0,971	0,30
PCL - PTX	0,987	0,467	0,981	0,40



CONCLUSIONES

➤ Las NPs obtenidas en este trabajo fueron esféricas y con un tamaño medio < 400 nm, donde la inclusión del fármaco fue muy significativa.

➤ La liberación del PTX se produce de forma sostenida y llega a ser del 50 % al cabo de 80 h.

➤ El tamaño, la morfología, la eficiencia de incorporación y la liberación *in vitro* del Paclitaxel, parecen adecuados para evaluar la efectividad de los soportes diseñados mediante los correspondientes estudios *in vivo* para una posible aplicación en la terapia del cáncer de mama y de ovario.