



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE
TECNOLOGÍA
QUÍMICA



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

INSTITUTO DE TECNOLOGÍA QUÍMICA (UPV-CSIC)

**MATERIALES NANOESTRUCTURADOS
BIOCOMPATIBLES BASADOS EN SÍLICE.
PREPARACIÓN Y APLICACIONES EN
TERAPIA ANTICANCERÍGENA.**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Carlos Muniesa Lajara

Dirigida por:

Dr. Pablo Botella Asunción

Valencia, Mayo, 2013

Agradecimientos

En este apartado quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido al desarrollo de esta tesis durante estos cinco años.

En primer lugar quisiera agradecer al Profesor Avelino Corma el ofrecerme la oportunidad de formarme en el Instituto de Tecnología Química.

Al director de este trabajo, Dr. Pablo Botella Asunción, por la confianza depositada en mí, por sus enseñanzas y por su dedicación.

También me gustaría reconocer la labor realizada por el personal de caracterización, empleados de administración, la plantilla de informática y trabajadores de taller.

A todos mis compañeros del instituto, por su compañía y ayuda, en especial a mis compañeros de laboratorio *Manu*, Christopher Landry y Víctor. Igualmente me gustaría agradecer a los *vecinos* de síntesis III todos los ratos que hemos pasado juntos: Teresa, Raquel, Marta, Alejandro y Aidé. Del mismo modo a la gente de Reacción: Helena, Belén, Dolo, Eva, Aroa, Javi, Amada, Teresa, Selene... y a “las Amparos”.

De igual forma al *equipo de corredores* por tantos buenos almuerzos y tantos kilómetros a nuestras espaldas.

A Ángel y Pilar por resolver mis dudas sobre química orgánica, y a Marcelo Domine por su ayuda con los equipos HPLC.

A la Universidad Católica de Valencia por permitirme aprender en sus instalaciones. En especial a José R. Blesa, Víctor Vicente, Sara Sáez, Marta y Teresa.

Al Departamento de Química de la Universitat Politècnica de València, especialmente al Profesor Miguel Ángel Maqueira y al Profesor Miguel Ángel González.

Al instituto de investigación del Hospital Vall d'Hebron, concretamente al Dr. Simó Schwartz, Ibane Abasolo y Yolanda Fernández.

Por último y no menos importante, a mi familia por todo el apoyo, comprensión y paciencia durante todos estos años.

A mis padres

Resumen

El desarrollo de nanofármacos aplicados en terapias frente al cáncer es un prometedor campo de la biomedicina en el cual se entrecruzan diferentes disciplinas científicas como la biología, la ciencia de los materiales, química, medicina y farmacia. Con la aplicación clínica de este tipo de materiales se pretende superar los inconvenientes que presentan los actuales tratamientos contra el cáncer, como una limitada efectividad terapéutica y un gran número de efectos secundarios.

La presente tesis doctoral se ha enfocado en la síntesis de nanofármacos basados en sílice para la difusión intracelular y liberación controlada del agente antineoplásico camptotecina.

En primer lugar, se llevó a cabo la síntesis de diversos nanomateriales aplicando el método sol-gel. En paralelo, se obtuvieron diferentes profármacos para su posterior incorporación a los materiales mediante enlace covalente. Tras una completa caracterización, se comprobó la estabilidad de los nanofármacos en medio fisiológico y, una vez demostrada su robustez, se procedió al estudio del mecanismo de liberación del principio activo a partir del nanofármaco, realizando experimentos de liberación mediante la aplicación de diferentes estímulos. Sobre los datos experimentales obtenidos se aplicaron varios modelos cinéticos de liberación de fármacos, observando que la difusión en matrices granulares es el fenómeno físico-químico de mayor influencia.

Posteriormente, se evaluó la actividad antineoplásica *in vitro* de los nanofármacos mediante ensayos de viabilidad celular, apreciando una toxicidad similar a la del fármaco libre. Por otro lado, también se realizaron experimentos para determinar los principales factores que influyen en la

internalización de los materiales por parte de las células, siendo estos el diámetro hidrodinámico y la hidrofobicidad del material.

Finalmente, se investigó la biodistribución, tolerabilidad y eficacia terapéutica *in vivo* en un modelo de xenoinjerto de cáncer colorectal humano en ratones.

A pesar de observarse una importante captación del nanofármaco por células del sistema retículoendotelial, la acumulación del sistema terapéutico en el tumor mejoró la efectividad del fármaco libre, a la vez que se minimizaron los efectos secundarios del agente antitumoral.

Los resultados obtenidos apuntan al desarrollo de una nueva generación de fármacos basados en nanomateriales híbridos orgánico-inorgánicos, capaces de llevar a cabo terapias anticancerígenas con un elevado grado de eficacia y selectividad.

Resum

El desenvolupament de nanofàrmacs aplicats en teràpies per al tractament del càncer és un àrea prometedora de la biomedicina en la qual s'entrecreuen diferents disciplines científiques com ara la biologia, la ciència dels materials, química, medicina y farmàcia. Amb l'aplicació clínica d'aquests tipus de materials es vol superar els inconvenients dels tractaments actuals contra el càncer, com una limitada efectivitat terapèutica y un gran nombre de efectes secundaris.

La present tesi doctoral ha estat enfocada en la síntesi de nanofàrmacs basats en sílice per a la difusió intracel·lular i la alliberació controlada de l'agent antineoplàstic camptotecina.

En primer lloc, es va dur a terme la síntesi de diversos nanomaterials aplicant el mètode sol-gel. A la vegada, s'obtingueren diversos profàrmacs per a la seva darrera incorporació als materials mitjançant un enllaç de tipus covalent. Després d'una completa caracterització, es va comprovar l'estabilitat dels nanofàrmacs en medi fisiològic. Una vegada demostrada la seva robustesa, es va procedir a l'estudi del mecanisme d'alliberació del principi actiu a partir del profàrmac, realitzant diversos experiments d'alliberació de la matèria activa mitjançant l'aplicació de diferents estímuls. S'aplicaren diferents models cinètics a les dades experimentals obtingudes. D'aquesta manera, s'observà que la difusió en matrius granulars és el fenomen fisico-químic de major rellevància.

Darrerament, es va avaluar l'activitat antineoplàstica *in vitro* dels nanofàrmacs mitjançant assajos de viabilitat cel·lular, apreciand una toxicitat similar a la del fàrmac lliure. Per altra banda, també es realitzaren experiments per a determinar els principals factors que influeixen en la internalització dels materials per part de les cèl·lules, i s'obté com ha

resultat que el diàmetre hidrodinàmic y la hidrofobicitat del material son les característiques que tenen una major influència.

Finalment, es va investigar la biodistribució, tolerabilitat y eficàcia terapèutica *in vivo* a un model de xenoinjert de càncer colorectal en ratolins.

Tot i que s'observà una important captació del nanofàrmac per cèl·lules del sistema reticulendotelial, la acumulació del sistema terapèutic en el tumor va millorar l'efectivitat del fàrmac lliure, a la vegada que disminuïren els efectes secundaris del agent antitumoral.

Els resultats obtinguts apunten cap al desenvolupament d'una nova generació de fàrmacs basats en nanomaterials híbrids orgànic-inorgànics, capaços de dur a terme teràpies anticancerígenes amb un elevat grau d'eficiència y selectivitat.

Abstract

The development of nanodrugs applied to cancer therapy is a promising field in biomedicine which involves different scientific disciplines such as biology, materials science, chemistry, medicine and pharmacy. The aim of the clinical application of these materials is to overcome the wide range of limitations associated with conventional treatments, as limited therapeutic effectiveness and severe side effects.

This PhD study has been focused on the synthesis of silica based nanodrugs for the intracellular diffusion and controlled release of the antineoplastic agent camptothecin.

Firstly, several nanomaterials were synthesized applying the sol-gel method. Moreover, four different prodrugs were obtained in order to incorporate them on the previously synthesized materials through a covalent bond. After a complete characterization of the nanodrugs, its robustness was tested on physiological media.

In order to study the release mechanism of the drug, experiments were carried out under different stimuli. Four kinetic models were chosen in order to study the release kinetics. It was found that diffusion mechanism in granular matrices was the main physicochemical parameter involved in the drug release.

Afterwards, the nanodrug antineoplastic activity was tested by cell viability assays, showing a similar toxicity to the free drug. In addition, flow cytometry assays were carried out in order to investigate which characteristics have an influence on cell internalization. Results showed that large hydrodynamic diameter and high hydrophobicity enhance cell internalization.

Finally, biodistribution, tolerability and therapeutic efficiency were tested *in vivo* in a human colorectal tumor cell xenograft in mice.

Despite an intensive nanodrug uptake by the reticuloendothelial system cells, the nanodrug accumulation in the tumor improved the treatment effectiveness when comparing to the free drug. Besides, side effects were minimized when using the nanodrug.

The results of this study lead the way to a new generation of drug based on hybrid organic-inorganic nanomaterials, creating new highly effective and selective cancer therapies.

Índice

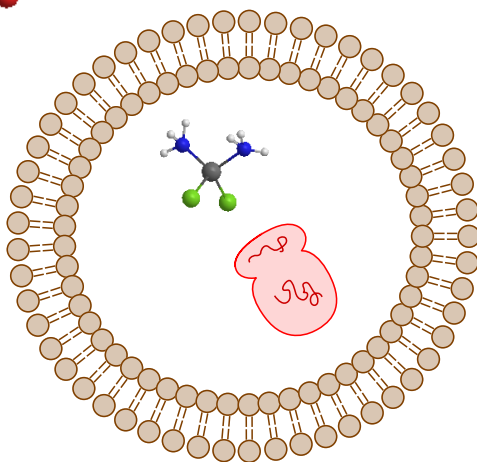
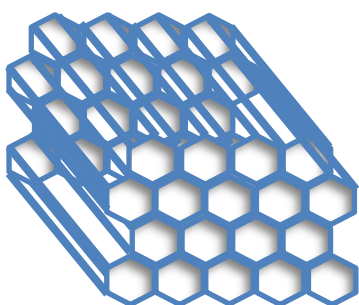
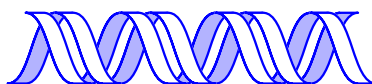
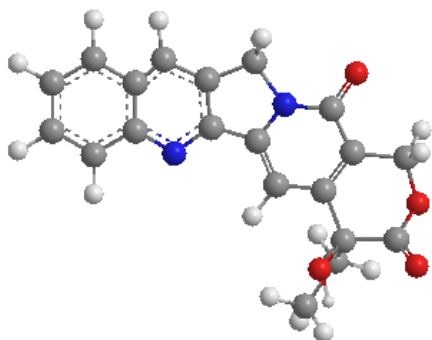
1. Introducción.....	3
1.1. Perspectivas terapéuticas del cáncer.....	3
1.1.1. Quimioterapia con camptotecina (CPT)	4
1.2. Limitaciones de la quimioterapia tradicional: pautas de tratamiento farmacológico..	6
1.3. Alternativas a la terapéutica tradicional: terapia selectiva.....	7
1.3.1. Incorporación de fármacos a moléculas hidrosolubles: profármacos.....	8
1.3.2. Incorporación de fármacos sobre nanopartículas estables en fluidos biológicos: nanofármacos	10
1.4. Requerimientos de los nanofármacos	12
1.5. Modelos de los nanofármacos	14
1.5.1. Vehículos orgánicos.....	14
1.5.1.1. Liposomas	14
1.5.1.2. Dendrímeros	16
1.5.1.3. Ciclodextrinas.....	17
1.5.1.4. Quitosano.....	20
1.5.1.5. Derivados del ácido poliláctico (PLLA).....	22
1.5.1.6. Nanotubos de carbono	23
1.5.2. Vehículos inorgánicos	24
1.5.2.1. Nanopartículas de oro	24
1.5.2.2. Redes organometálicas (MOFs).....	26
1.5.2.3. Nanopartículas de sílice.....	27
a) Rutas sintéticas para la obtención de nanopartículas de sílice	31
b) Mecanismos de liberación intracelular en fármacos de sílice	36
c) Limitaciones para su uso terapéutico	41
Referencias.....	44
2. Objetivos.....	55
3. Procedimiento experimental	61
3.1. Materiales, líneas celulares y animales de laboratorio	61
3.1.1. Reactivos químicos.....	61
3.1.2. Líneas celulares	64
3.1.3. Medios de cultivos celulares.....	65
3.1.4. Animales de laboratorio.....	65

3.2. Síntesis de nanofármacos de camptotecina	65
3.2.1. Sistemas de liberación sensibles a esterasas intracelulares	65
3.2.1.1. Síntesis del profármaco 20-O-trifluoroglicilcamptotecina (Gly-CPT·TFA).....	65
3.2.1.2. Síntesis de nanomateriales	66
3.2.1.3. Incorporación de camptotecina a los nanomateriales.....	67
3.2.1.4. Funcionalización post-síntesis del nanofármaco.....	69
3.2.2. Sistemas de liberación sensibles a reductores intracelulares.....	70
3.2.2.1. Síntesis de profármacos de camptotecina	70
3.2.2.2. Síntesis de nanomateriales	72
3.2.2.3. Incorporación de la camptotecina de nanomateriales.....	73
3.2.2.4. Funcionalización postsíntesis del nanofármaco	74
3.3. Técnicas de caracterización de profármacos y nanomateriales	74
3.3.1. Técnicas espectroscópicas	74
3.3.1.1. Difracción de rayos X (DRX).....	74
3.3.1.2. Espectroscopia infrarroja (FTIR).....	75
3.3.1.3. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).....	76
3.3.1.4. Espectroscopia de ultravioleta-visible (UV-vis).....	78
3.3.1.5. Espectroscopia de fluorescencia	79
3.3.2. Análisis textural.....	80
3.3.3. Microscopía electrónica (TEM).....	81
3.3.4. Dispersión de luz dinámica (DLS).....	82
3.3.5. Análisis elemental.....	83
3.4. Ensayos de liberación de liberación de fármacos	84
3.4.1. Modelo experimental	84
3.4.1.1. Liberación medio alcalino	84
3.4.1.2. Liberación en medio reductor	84
3.4.2. Ensayo de estabilidad en suero humano	85
3.4.3. Modelos cinéticos de liberación.....	86
3.4.4. Análisis de productos.....	88
3.4.4.1. Espectroscopia de (UV-vis).....	88
3.4.4.2. Cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC)	88
3.4.4.3. Espectrometría de masas (HPLC-MS).....	90
3.5. Estudios en cultivos celulares.....	91
3.5.1. Protocolo de trabajo en cultivos celulares.....	91

3.5.2.	Ensayo MTT	94
3.5.3.	Ensayos de internalización celular	95
3.5.4.	Ensayo de citometría de flujo	96
3.5.5.	Análisis estadístico	97
3.6.	Estudio de un modelo de xenoinjerto de cáncer colorectal humano	97
3.6.1.	Protocolo de manejo y tratamiento de los animales de experimentación	97
3.6.2.	Estudio de biodistribución	97
3.6.3.	Estudio de tolerabilidad	100
3.6.4.	Estudio de eficacia terapéutica.....	101
3.6.5.	Análisis estadístico	104
	Referencias	106
4.	Sistemas de liberación basados en actividad enzimática	111
4.1.	Fundamento.....	111
4.2.	Profármaco de captotecina (Gly-CPT·TFA)	111
4.3.	Preparación y caracterización de nanofármacos de camptotecina	113
4.3.1.	Nanofármacos de sílice amorfa porosa (SNP-(CO)-CPT)	113
4.3.2.	Nanofármacos de sílice mesoporosa MCM-41 (MSN-(CO)-CPT).....	119
4.3.3.	Nanofármacos de sílice mesoporosa organizada de poro ultragrande (FSN-(CO)-CPT).....	122
4.4.	Ensayos de liberación en medio acuoso	124
4.4.1.	Influencia del pH	125
4.4.2.	Influencia de la concentración de CPT	126
4.4.3.	Influencia del diámetro de poro	127
4.4.4.	Modelos cinéticos	128
4.5.	Ensayo de estabilidad en medio fisiológico	132
4.6.	Estudios en cultivos celulares.....	134
4.6.1.	Ensayo MTT	134
4.6.2.	Ensayo de internalización celular	136
4.6.3.	Ensayo de citometría de flujo	139
4.7.	Conclusiones parciales	140
	Referencias	143
5.	Sistemas de liberación basados en mecanismos redox	147
5.1.	Fundamento.....	147
5.2.	Preparación y caracterización de los profármacos de CPT.....	148

5.2.1. Preparación y caracterización de los precursores de los profármacos de CPT	148
5.2.2. Preparación y caracterización de los profármacos	150
5.3. Preparación y caracterización de nanofármacos de camptotecina	153
5.4. Ensayos de liberación en medio reductor	161
5.4.1. Influencia de la concentración de DTT	161
5.4.2. Influencia del tiempo en la liberación	162
5.4.3. Modelos cinéticos	165
5.5. Ensayos de estabilidad en medio fisiológico	170
5.6. Estudios en cultivos celulares.....	172
5.6.1. Ensayo MTT	172
5.6.2. Ensayo de internalización celular	178
5.6.3. Ensayo de citometría de flujo	180
5.7. Conclusiones parciales	182
Referencias	184
6. Ensayos in vivo: biodistribución, tolerabilidad y eficacia terapéutica	189
6.1. Biodistribución.....	189
6.1.1. Resultados obtenidos mediante análisis de CPT en tejidos.....	191
6.1.2. Comparativa con nanofármacos.....	199
6.2. Tolerabilidad	201
6.3. Eficacia terapéutica	202
6.3.1. Evolución del volumen del tumor.....	204
6.3.2. Comparativa con otros nanofármacos.....	208
6.4. Conclusiones parciales	209
Referencias bibliográficas	211
7. Conclusiones generales.....	215
Anexo I	219
Anexo II.....	233
Anexo III	239
Anexo IV.....	249
Anexo V	253
Anexo VI.....	263

Capítulo 1



Introducción

1. Introducción

1.1. Perspectivas terapéuticas del cáncer

El cáncer se ha convertido en un gran problema de salud pública a escala mundial. Los estudios epidemiológicos realizados en España indican que el cáncer es la primera causa de muerte en hombres y la segunda en mujeres. La enfermedad presenta una supervivencia relativa a cinco años del 49,3 % [1]. Además, se calcula que en el año 2012 se darán más de 200.000 nuevos casos en España [2].

Existen diversos tipos de tratamientos contra el cáncer, si bien el más empleado en la mayoría de casos es el quirúrgico. Consiste en la resección del tejido tumoral y zonas limítrofes [3]. Asimismo, en ocasiones es necesario extirpar ganglios linfáticos regionales para evitar la aparición de metástasis [4].

Por otro lado, la radioterapia emplea radiación de alta energía como los rayos-X o rayos- γ para eliminar las células cancerosas. El tratamiento puede ser local utilizando equipos generadores de radiación o sistémico mediante sustancias radioactivas como ^{131}I . Su mecanismo de acción se basa en el daño directo del ADN y también en la creación de radicales libres que igualmente causan daño genético. Este tipo de tratamiento está recomendado en determinados tipos de cáncer, como los que afectan a los siguientes órganos y tejidos: cuello, cabeza, laringe, fosas paranasales y nasofaringe. Sin embargo, su aplicación no está indicada en cáncer de hígado y leucemia [5].

Los inhibidores de la angiogénesis también se han aplicado en el tratamiento contra el cáncer debido su capacidad para restringir el flujo sanguíneo en tumores. Lamentablemente, este tipo de tratamiento presenta

un gran número de efectos secundarios asociados a su mecanismo de acción [6].

Por último, en el tratamiento con quimioterapia se administran medicamentos que interrumpen la proliferación de las células cancerosas. Se suele combinar con algunos de los procedimientos citados anteriormente y en ocasiones es necesario un trasplante de médula tras la terapia [7].

1.1.1. Quimioterapia con camptotecina (CPT)

La (S)-(+)-camptotecina es un alcaloide presente en la madera, corteza y frutos del árbol de origen asiático *Camptotheca acuminata*. Esta molécula presenta un grupo funcional lactona en el anillo E, que mediante hidrólisis básica puede convertirse en carboxilato.

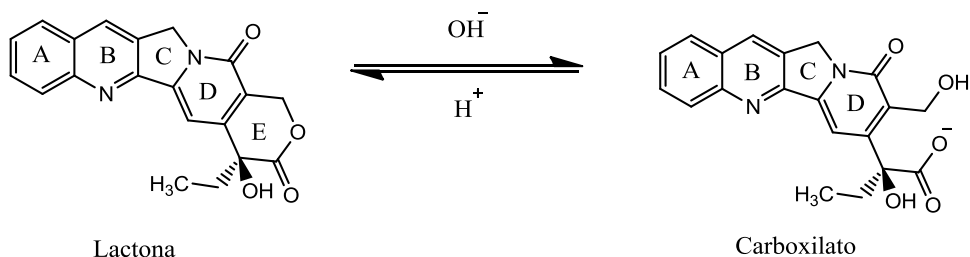


Figura 1.1. Hidrólisis de la CPT.

A pH fisiológico (pH 7,4) el equilibrio está desplazado hacia esta forma. Dicha característica dificulta su aplicación como agente antineoplásico, ya que apenas es farmacológicamente activo y además es inestable en disoluciones acuosas.

La actividad terapéutica de la CPT se debe a su unión al complejo topoisomerasa I-ADN durante la replicación. En condiciones normales la enzima topoisomerasa I se enlaza de forma covalente al grupo 3'fosfato de

la cadena de ADN en la región del corte, mientras que el extremo 5' en la escisión es un grupo hidroxilo. Tras eliminar los superenrollamientos de la cadena de ADN, el enlace fosfodiéster se restablece y se libera la enzima. Sin embargo, cuando este proceso se produce en presencia de CPT, el fármaco se une al complejo enzima-ADN estabilizándolo, y consecuentemente impidiendo el religado del ADN. Este hecho genera daños en su estructura y provoca la apoptosis celular [8].

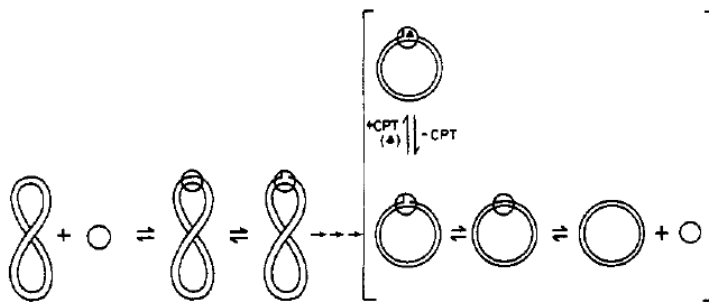


Figura 1.2. Modelo de interacción de la CPT con la enzima topoisomerasa I y ADN [8].

La CPT presenta una elevada actividad antineoplásica *in vitro* en gran variedad de líneas celulares, así como en diferentes modelos de cáncer [9-10]. A pesar de su gran potencial, su escasa solubilidad dificulta en gran medida su aplicación clínica. Para solventar este inconveniente, se empleó la sal sódica hidrosoluble en los primeros ensayos clínicos llevados a cabo en 1970. Los resultados obtenidos fueron desalentadores, debido a la apertura del anillo E y la consecuente pérdida de actividad terapéutica. Además, el equilibrio se revertía a la forma de lactona cuando el fármaco alcanzaba la vejiga, produciendo casos severos de cistitis. Como consecuencia se paralizaron los ensayos clínicos [11].

A mediados de los ochenta retornó el interés por la CPT debido a su particular mecanismo de acción, se sintetizaron varios análogos que presentaban eficacia terapéutica similar y mejoraban los problemas de solubilidad. Finalmente dos derivados de la CPT se aprobaron por la FDA estadounidense (*Food and Drug Administration*), Irinotecan (CPT-11) y Topotecan (TPT), para el tratamiento de cáncer colorectal en estado avanzado y cáncer de pulmón [12].

1.2. Limitaciones de la quimioterapia tradicional: pautas de tratamiento farmacológico

La gran mayoría de tratamientos contra el cáncer se administran de forma intravenosa y tienen un efecto sistémico. Esto hace que sea necesario el uso de dosis elevadas para alcanzar concentraciones de fármaco efectivas en tumor. Como consecuencia de su acción sistémica, los fármacos también actúan en células sanas generando una gran cantidad de efectos secundarios. Normalmente, los tejidos con células de crecimiento rápido como las del epitelio gástrico, folículos pilosos y médula ósea son los más afectados. Los efectos secundarios a corto plazo comprenden náuseas y vómitos. Otros tardan algún tiempo más en aparecer como estomatitis y leucopenia. Por último, algunos efectos secundarios surgen varias semanas después del tratamiento como es el caso de cardiomiopatías y neuropatías periféricas. Estas afecciones disminuyen considerablemente la calidad de vida del paciente [13].

Además, el 40% de los tumores desarrollan resistencia frente a fármacos antitumorales. La resistencia múltiple a drogas (MDR) implica resistencia a fármacos a los cuales las células no han sido expuestas y también se genera resistencia frente a moléculas que tienen mecanismos de acción diferentes.

Este fenómeno afecta negativamente la efectividad del tratamiento y la prognosis del paciente. La resistencia a fármacos puede producirse mediante diferentes mecanismos: disminución del metabolismo o de la permeabilidad de la membrana celular, reparación de ADN e inhibición de la apoptosis celular [14]. Aunque generalmente el mecanismo principal consiste en el transporte activo del fármaco al exterior de la célula mediante la acción de proteínas transportadoras de membrana. Cuando la glicoproteína-P (P-gp) se sobreexpresa, se genera resistencia a una gran variedad de antitumorales como doxorubicina o paclitaxel [15]. Igualmente ocurre con las proteínas MRP1p , ABCG2p y BCRP [16]. En el caso de fármacos basados en platino, p.e., el cisplatino, la resistencia incluye otros mecanismos. Además, del transporte activo del fármaco al exterior de la célula mediante proteínas transportadoras como hCtr1, los derivados de Pt con proteínas azufradas formados en el interior celular son eliminados del citosol por acción de la proteína MDRP2. Otro mecanismo de resistencia implica la sobreexpresión de proteínas involucradas en la reparación del ADN dañado por la acción del cisplatino como HMG1 y hMSH2. Por último, el tercer mecanismo de resistencia consiste en un aumento de la actividad antiapoptótica [17].

1.3. Alternativas a la terapéutica tradicional: terapia selectiva.

Aspecto fundamental de la quimioterapia del cáncer es la posibilidad de llevar a cabo los tratamientos farmacológicos con elevada eficacia sobre las células malignas y con mínima repercusión sobre los tejidos sanos. En este sentido, la posibilidad de aplicar una terapia selectiva en la que los efectos del agente citotóxico se manifiesten únicamente sobre el tejido patológico supondría un enorme avance sobre la terapéutica tradicional, basada en la

monitorización de los niveles plasmáticos del fármaco. A tal fin, los agentes antitumorales se pueden incorporar sobre un vehículo que mejore su biodisponibilidad, aumente la solubilidad y estabilidad en medio fisiológico, favorezca su acumulación en el tumor, y a la vez se minimice su toxicidad sobre las células sanas. Actualmente, se considera dos modalidades de tales vehículos: moléculas hidrosolubles y nanopartículas.

1.3.1. Incorporación de fármacos a moléculas hidrosolubles: profármacos.

Un profármaco es una sustancia biológicamente inactiva derivada de un fármaco, que normalmente requiere una transformación química o enzimática en el organismo denominada activación. Además genera una mejora en la difusión respecto al fármaco original [18].

Una solución para mejorar la aplicación clínica de fármacos hidrófobos consiste en la unión covalente a una molécula hidrosoluble. En muchos casos se emplean polímeros hidrosolubles como polietilenglicol (PEG). En el caso particular del fármaco que nos ocupa en este estudio, CPT, no sólo se mejora la solubilidad sino que además confiere estabilidad a la forma farmacológicamente activa en disoluciones acuosas. Otra ventaja es el aumento del tiempo de aclaramiento plasmático en comparación con el fármaco original y, en el caso concreto de compuestos antitumorales, se favorece la acumulación en tumor mediante el efecto de la permeabilidad capilar y de la retención tisular aumentada (efecto EPR) [19]. Este proceso se basa en dos factores: en primer lugar en la vasculatura patológica tumoral, en la que las células epiteliales no están alineadas correctamente y dejan espacios entre si. Estos espacios pueden llegar hasta los 700 nm [20]. Así los fármacos son fácilmente trasvasados desde el torrente sanguíneo al tumor. En segundo

lugar el tejido tumoral carece de un drenaje linfático efectivo, impidiendo la eliminación de las moléculas que se encuentren en el interior [21]. De esta forma, los medicamentos presentes en el torrente sanguíneo tras una administración intravenosa quedarían retenidos en el tejido tumoral.

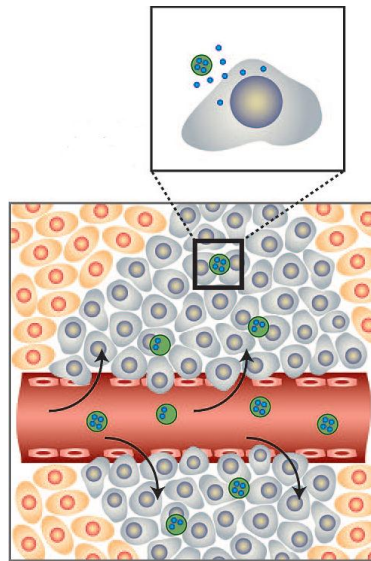


Figura 1.3. Esquema del efecto EPR [22].

Además, para mejorar la biodistribución del profármaco y su acumulación en el tejido tumoral pueden incorporarse en el otro extremo de la molécula hidrosoluble agentes directores como el folato [23] y el bifosfonato [24]. Los agentes directores basan su acción en la capacidad para alcanzar la pared celular y provocar una endocitosis mediada por receptores de membrana.

Los profármacos pueden activarse mediante la acción de enzimas específicas. Esta característica posibilita la liberación del fármaco de forma localizada. Una estrategia seguida de manera general consiste en formar enlaces sensibles a la acción de enzimas sobreexpresadas en el interior de

células cancerígenas. De este modo el fármaco se libera preferiblemente en las células diana, aumentando la efectividad terapéutica y reduciendo los efectos secundarios, ya que el profármaco no se activará, o lo hará en menor medida en células sanas. Sin embargo, el requerimiento de una transformación química previa hace que los profármacos presenten generalmente unos valores del 50 % de la concentración inhibitoria máxima (IC_{50}) varios órdenes superiores al fármaco original [25]. Por otro lado, no todos los fármacos anticancerígenos contienen grupos funcionales adecuados para unirlos de forma covalente a otra molécula. Además, existe la limitación del tipo de enlace generado, ya que este deberá ser sensible a la acción de enzimas o determinadas condiciones fisiológicas. Para solventar este problema asociado al uso de profármacos, se diseñaron enlaces *self-immolative*, en los que el lugar de activación del fármaco, es diferente al lugar de escisión. Esto hace que se puedan emplear una mayor variedad de profármacos activados por una enzima determinada [26].

1.3.2. Incorporación de fármacos sobre nanopartículas estables en fluidos biológicos: nanofármacos.

La incorporación de fármacos a nanopartículas ha dado lugar a la aparición de una nueva familia de productos terapéuticos con propiedades exclusivas: los nanofármacos. Estos pueden emplearse para modificar la biodistribución del fármaco y acumular una mayor cantidad del mismo en el tumor. Esta acumulación en tumor se produce a través de un efecto EPR muy marcado [27]. Pero para que esto ocurra, las nanopartículas no deben ser captadas por el sistema retículo endotelial (SRE). Cuando esto ocurre, las nanopartículas quedan retenidas en órganos como hígado y bazo [28-29], pudiendo causar diversos efectos tóxicos [29-30].

Sobre los nanofármacos se pueden incluir moléculas directoras como biotina y ácido fólico. También biomoléculas como aptámeros o anticuerpos monoclonales [31-32].

Este tipo de nanopartículas también puede ser empleado para vencer la MDR. A pesar de los numerosos fármacos inhibidores de la P-gp sintetizados, sus resultados en estudios clínicos han sido decepcionantes [33]. Por ello, se han aplicado diferentes nanomateriales con el fin de limitar la resistencia a fármacos. Cuando la P-gp se sobreexpresa en células cancerígenas es difícil mantener una concentración terapéutica de fármaco en el interior de la célula durante un tiempo prolongado. En un ensayo llevado a cabo con nanopartículas lipídicas cargadas con doxorubicina, anticancerígeno y sustrato de la P-gp, se demostró que el empleo de nanopartículas propiciaba una mayor concentración intracelular de doxorubicina en comparación con el fármaco libre [34]. Por otro lado micelas diseñadas para la liberación rápida del fármaco mediante el cambio de pH también se han probado con éxito en cultivos celulares multirresistentes [35]. Otra estrategia empleada es la combinación de fármacos antitumorales e inhibidores de la P-gp en un mismo vehículo. El empleo combinado de paclitaxel y tariquidar en nanopartículas funcionalizadas con biotina mostró inhibición en el crecimiento de tumores multirresistentes en ratones, mientras que la administración de paclitaxel no mostró ningún efecto [36], y la aplicación de una combinación de doxorubicina y tariquidar, a pesar de mejorar la actividad antitumoral, no consiguieron restablecer por completo la sensibilidad al fármaco [37].

Los nanovehículos también pueden ser empleados para el transporte de macrobiomoléculas. En este caso, una de las estrategias consiste en silenciar la expresión de determinados genes como por ejemplo el gen MDR-1 que

expresa la P-gp [14]. Otro método consiste en reparar los mecanismos de apoptosis celular. Así, se han empleado nanopartículas de sílice mesoporosa para el transporte de doxorubicina junto a ARN interferente Bcl-2 (siARN Bcl-2). En este caso el ARN interferente actúa como un supresor de la defensa antiapoptótica. El siARN se transporta eficazmente hasta el citosol, generando un efecto sinérgico [38]. Por tanto, los materiales nanoparticulados constituyen un excelente vehículo tanto para fármacos, como para biomoléculas. Sin embargo, debe tenerse presente que la biocompatibilidad e inocuidad a largo plazo de estos materiales no ha sido completamente comprobada.

1.4. Requerimientos de los nanofármacos

A pesar del notable potencial que muestran los nanofármacos, su viabilidad en sistemas biológicos y, en particular, su uso clínico, requiere de una serie de premisas. En primer lugar, y aunque pueda resultar obvio, es imprescindible emplear materiales biocompatibles en aplicaciones médicas y farmacéuticas. Ello implica la ausencia de respuesta inmunitaria o, que se trate de una respuesta muy leve. Durante años este objetivo se ha conseguido empleando materiales con una gran inercia química y biológica, como las aleaciones de titanio empleadas en implantología [39]. No obstante, tras la aparición de nuevos nanomateriales con aplicaciones biomédicas, para que un material sea considerado biocompatible no es imprescindible que este sea inerte, sino que es necesario que ejerza su acción terapéutica sin generar efectos secundarios locales o sistémicos, optimizando la eficacia clínica del tratamiento [40].

El tamaño de partícula es un parámetro fundamental para la aplicación de biomateriales. Un vehículo para la difusión de fármacos debe tener

dimensiones nanométricas. La envergadura de las nanopartículas influirá en su biodistribución, mecanismo de eliminación y toxicidad. Por ello es importante que las nanopartículas tengan un diámetro inferior a los 300 nm para evitar ser captadas por el SRE [41].

El material deberá liberar el fármaco mediante la aplicación de determinados estímulos intracelulares. Preferiblemente estímulos característicos de células tumorales o bien que se den en mayor medida que en células sanas. De este nodo se evita la liberación del fármaco fuera de las células diana. En este sentido, los procesos físico-químicos con mayor aplicación son las variaciones de pH, mecanismos redox, irradiación con luz de una longitud de onda determinada (generalmente ultravioleta o infrarrojo cercano) o la acción de determinadas enzimas [42-45].

Asimismo, como se ha comentado anteriormente, el empleo de moléculas directoras a las células tumorales, aptámeros o anticuerpos monoclonales se basa en la capacidad de estos compuestos para alcanzar la pared celular y provocar una endocitosis mediada por receptores de membrana [31]. Una de las moléculas directoras más empleadas es el ácido fólico. Esto se debe a que los receptores de folato están sobreexpresados en una gran variedad de células cancerígenas. De este modo se favorece la endocitosis del material por parte de las células patológicas, reduciendo así la acción del fármaco en células sanas y minimizando de los efectos secundarios. Cabe mencionar que la adición de moléculas directoras no modifica la biodistribución del material favoreciendo la acumulación en tumor. Sin embargo, sí que aumentan la internalización de partículas que llegan al tumor. Al respecto, se considera que podría resultar más adecuado denominar estos compuestos como moléculas de internalización en lugar de moléculas directoras [46]. Para que este mecanismo de difusión de fármacos

sea efectivo, es necesario que tras la endocitosis, la molécula escape del lisosoma hacia el citosol. Dependiendo del mecanismo de acción del fármaco, la molécula deberá alcanzar el núcleo celular [32]. Este tipo de sistema se ha empleado para la difusión de diferentes fármacos como el cisplatino [47], la CPT [48] o fotosensibilizadores para terapia fototérmica [49].

Finalmente, las nanopartículas deben estar compuestas por materiales biodegradables, capaces de descomponerse en unidades estructurales de carácter no tóxico para el organismo. De este modo, en una situación ideal, el material sería fácilmente eliminado, fundamentalmente por vía renal, sin producir daños en tejidos o alteraciones fisiológicas. [50] .

A continuación se expone de forma resumida los principales nanomateriales propuestos para el transporte y difusión de fármacos y biomoléculas en el organismo, con especial interés en aquellos que constituyen agentes terapéuticos empleados en el tratamiento del cáncer.

1.5. Modelos de nanofármacos

1.5.1. Vehículos orgánicos

1.5.1.1. Liposomas

Los liposomas son vesículas formadas por una bicapa fosfolipídica. Los fosfolípidos que forman la doble capa tienen dos áreas diferenciadas: en primer lugar la “cabeza polar” y en segundo la “cola apolar”. Las colas hidrófobas se agrupan formando una vesícula, quedando las zonas polares hacia el interior y exterior de la estructura. Los liposomas contienen la carga terapéutica en el interior de la vesícula, evitando que el contenido pueda ser

degradado. Cuando son administrados vía intravenosa son rápidamente eliminados de la circulación sanguínea por el SRE. Esta característica se ha empleado para el tratamiento de infecciones localizadas en el SRE como por ejemplo leishmaniosis o para encapsular inmunomoduladores [51]. Para conseguir un mayor tiempo de aclaramiento plasmático, los liposomas se pueden recubrir de polímeros hidrofílicos como PEG [52]. La cubierta es hidrófila, uniforme y flexible evitando la agregación e interacción con proteínas. Así, el liposoma permanece más tiempo en el torrente sanguíneo y se acumula por efecto EPR en tumor. Empleando este tipo de liposomas se puede aumentar diez veces la concentración del fármaco, comparado con la administración del fármaco tradicional [53]. No obstante, la cubierta no inhibe por completo la captación por parte del SRE y la acumulación en tejidos como hígado o bazo. A pesar de los inconvenientes mencionados, existen varias formas comerciales como Caelyx® y Doxil® que se aplican en el tratamiento de cáncer de ovario, mieloma múltiple y sarcoma de Kaposi asociado a síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) [54].

Algunos liposomas incluyen agentes directores como anticuerpos monoclonales, péptidos, glicoproteínas, receptores de membrana o aptámeros [55]. La dirección de los liposomas hacia el foco patológico y la liberación continuada del fármaco puede ayudar a vencer la MDR y a su vez aumentar la eficacia del tratamiento. También se han empleado liposomas en el transporte de ADN o siARN [56]. Otra aplicación de los liposomas es la de agentes de diagnóstico, cuando en su interior contienen radioisótopos como ^{111}In , ^{99}Tc , Mn II o Gd III. Por último, también se han empleado liposomas para la vacunación. Existen dos fórmulas comercializadas denominadas Epaxal® e Inflexal® para la vacunación frente hepatitis A y gripe respectivamente.

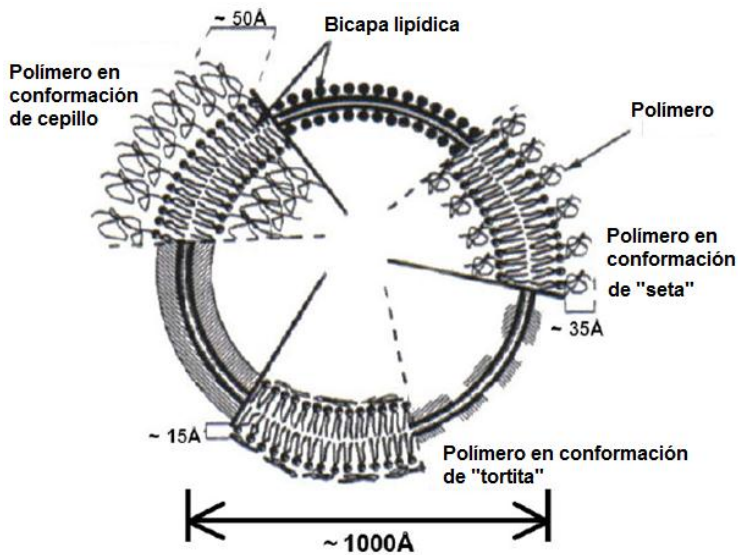


Figura 1.4. Liposoma pegilado [51].

1.5.1.2. Dendrímeros

Los dendrímeros son macromoléculas ramificadas. El inicio de la estructura es un núcleo a partir del cual aparecen ramificaciones. Estas reciben nombre dependiendo de la distancia al núcleo. Los dendrímeros presentan excelentes propiedades como versatilidad estructural, multivalencia y baja polidispersión [57]. En estos soportes se han empleado en la difusión de fármacos, agentes de contraste, ADN y siARN [25]. Las sustancias pueden incorporarse mediante interacciones hidrofóbicas, electrostáticas o puentes de hidrógeno. Aunque también se pueden incluir mediante la formación de un enlace covalente sensible a diferentes estímulos [58]. Los dendrímeros se pueden distribuir mediante difusión pasiva o por el contrario añadir una molécula directora como ácido fólico, biotina o anticuerpos monoclonales.

La mayoría de los dendrímeros con aplicaciones biológicas están formados por polímeros biocompatibles como PEG, ácido poliláctico

(PLLA), policaprolactona (PCL) y polilisina (PLL). Por el contrario los dendrímeros catiónicos basados en poli(amidoamina) (PAMAM) y poli(propiliminina) (PPI) han demostrado una elevada toxicidad en cultivos celulares y en modelos *in vivo*, dificultando la aplicación clínica de este tipo de dendrímeros.

Existen aplicaciones comerciales de estos materiales. En primer lugar en un gel microbicida basado en un dendrímero de polilisina denominado VivaGel®. Por otro lado el dendrímero catiónico SuperFect® se emplea para la transfección de varias líneas celulares [59].

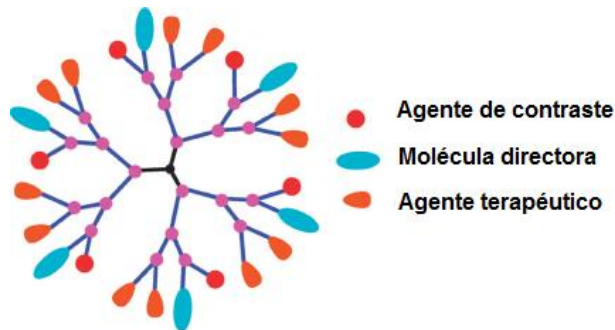


Figura 1.5. Representación de dendrímero [59].

1.5.1.3. Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos formados por varias unidades de glucopiranosas unidas entre sí por un enlace α -1,4. Son conocidas por su escasa toxicidad y por no generar reacciones por parte del sistema inmunológico [60]. La zona interior de las ciclodextrinas es hidrófoba y tiene forma cónica. Por el contrario, la zona exterior es hidrófila y contiene una gran cantidad de grupos hidroxilo primarios y secundarios otorgando carácter hidrosoluble a estas estructuras [61]. Existen tres tipos diferentes de ciclodextrinas dependiendo de la cantidad de monómeros de glucosa incluidos en la estructura. Se nombran como

α , β y γ para un contenido de seis, siete y ocho unidades de glucosa, respectivamente.

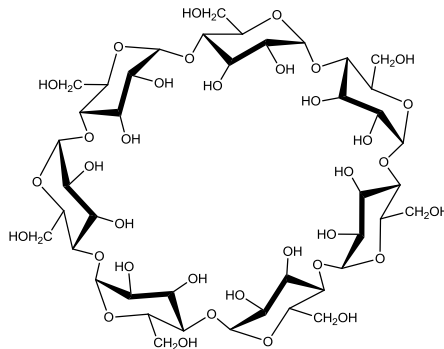


Figura 1.6. Ciclodextrina β .

Es posible funcionalizar los grupos hidroxilo exteriores dando lugar a derivados de ciclodextrinas disustituidos [62]. A su vez, también es posible incorporar estas ciclodextrinas a la estructura de un polímero. En el caso de M. Davis *et al.*, ciclodextrinas β difuncionalizadas se incluyen en la estructura de un PEG y un derivado de la CPT es incluido por enlace covalente [63]. Se emplean ciclodextrinas β ya que son más fáciles de producir y purificar a gran escala [60]. Mediante este sistema se consigue que el fármaco permanezca en la forma farmacológicamente activa (lactona) tras varios días en una disolución de PBS (pH 7.4). Por el contrario, si el fármaco no se incluye en el polímero, casi la totalidad se encuentra en forma de carboxilato (farmacológicamente inactiva). En este ejemplo la CPT se une al material mediante la formación de un enlace éster. Este tipo de enlace es sensible a la acción de la enzima esterasa. Por ello, el material presenta poca estabilidad en suero humano, liberando el 50% de la carga de CPT en menos de dos horas debido a la acción de esterasas plasmáticas inespecíficas. A su vez, el material presenta una actividad antineoplásica similar a la de la CPT en cultivos celulares, indicando que las esterasas

presentes en el citosol son capaces de escindir el enlace liberando el fármaco [64].

De todos los compuestos desarrollados, el denominado IT-101, presenta un gran potencial. Ensayos preclínicos de eficacia antitumoral revelan una mayor eficacia que CPT o irinotecán (CPT-11) [65]. La administración semanal de IT-101 mostró una actividad terapéutica significativa. En todos los xenoinjertos estudiados se produjo retraso en el crecimiento del tumor, incluso regresión total del tumor en todos los animales de estudio con cáncer de pulmón de células pequeñas. Además, el tratamiento también produjo regresión total del tumor en algunos casos de sarcoma de Ewing diseminado, demostrando efectividad en metástasis tumorales, que en ocasiones debido a su tamaño y localización no pueden ser tratadas de forma quirúrgica o bien no pueden ser tratadas de forma eficaz con otros fármacos. Por último, IT-101 presentó una marcada actividad antitumoral en una serie de líneas celulares resistentes a Irinotecan. Este resultado coincide con publicaciones anteriores que indican que los sistemas poliméricos pueden ser útiles frente a la resistencia a fármacos asociada a la P-gp y la MDR [66-68].

El material IT-101 ha demostrado una actividad terapéutica superior en ensayos preclínicos respecto a CPT-11 [69-71] en varias líneas celulares de linfoma. Esto se debe a la liberación continuada de CPT a partir del material, que permite la inhibición de la enzima topoisomerasa I transcurridas 48 horas desde la administración del polímero.

El polímero de ciclodextrinas también se ha empleado para la administración sistémica de siARN [72]. Aunque en este caso se producen algunas modificaciones respecto al polímero original IT-101, dando lugar al producto CALAA-01. Sobre el polímero se enlaza PEG para mejorar su

estabilidad en medio acuoso. Además, se añade transferrina, lo que facilita su paso al interior de la célula, ya que el receptor de transferrina está sobreexpresado en gran cantidad de líneas celulares cancerígenas [73]. Por último incluye siARN diseñado para silenciar la expresión del gen RRM2, reconocida diana terapéutica en el tratamiento del cáncer [74]. Tras la administración intravenosa de CALAA-01 se reduce tanto la expresión de la proteína RRM2 como la cantidad de ARN mensajero correspondiente [75]. De esta forma se demuestra que la administración sistémica intravenosa de siARN puede tener una aplicación terapéutica en humanos.

1.5.1.4. Quitosano

El quitosano es un polímero de origen natural que se obtiene mediante la hidrólisis de la quitina. La quitina es un elemento estructural en el exoesqueleto de los crustáceos y es el segundo polímero más abundante tras la celulosa. La diferencia entre el quitosano y la quitina es que en el primero la mayoría de los grupos N-acetil están hidrolizados. El grado de acetilación tiene gran importancia en las propiedades reológicas y solubilidad del polímero. El grupo amino del polímero tiene un pKa entre 5,5 y 6,5. Esto hace que el polímero sea soluble en soluciones ácidas y que tenga una transición sol-gel a un pH cercano a 7 unidades. A pH fisiológico los grupos amino proporcionan al polímero carga positiva. Su peso molecular puede variar entre 10.000 y 1.000.000 Da. Se trata de un polímero biodegradable, ya que es sensible a la acción de la enzima lisozima [76].

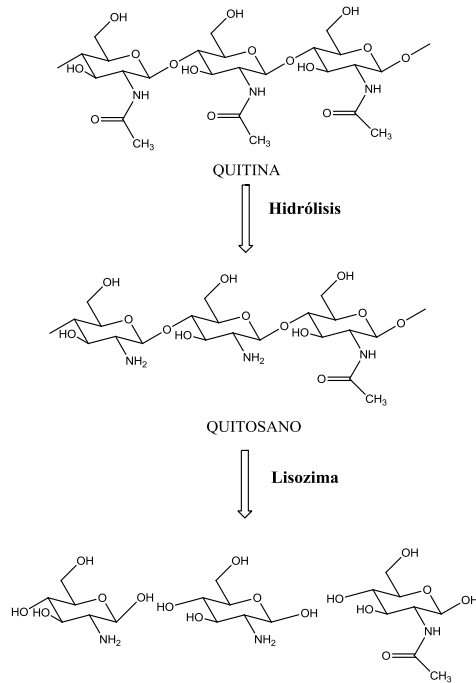


Figura 1.7. Representación de la síntesis y degradación de quitosano.

El quitosano tiene la propiedad de interactuar con grasas, actuando como una esponja en el tracto intestinal. Además, también tiende a interactuar con otro tipo de sustancias como iones de metales pesados, siendo empleado en la purificación de aguas contaminadas [77]. Para su aplicación farmacológica el quitosano presenta varias características. En primer lugar, presenta una gran adherencia a mucosas, por ello las formulaciones que contienen el polímero tienen un mayor tiempo de contacto y consecuentemente aumenta la cantidad de fármaco absorbida [78]. Por otro lado, el polímero al adherirse tiende a separar las uniones de las mucosas y facilita el transporte paracelular de moléculas hidrofóbicas [79]. Al tener carga positiva, el polímero es capaz de promover la coagulación de la sangre, lo que dificulta la aplicación intravenosa de preparados que contengan quitosano.

Su aplicación como vehículo de fármacos antitumorales ha cobrado relevancia en los últimos años. Se han empleado hidrogeles de quitosano y fosfato sódico cargados con CPT (0,25 % p/p) [81]. En los ensayos *in vitro* este material consigue una liberación continuada del compuesto, manteniendo un 90% del compuesto mismo en la forma farmacológicamente activa (lactona). A su vez, el hidrogel es sensible a la acción de la enzima lisozima tanto *in vitro* como *in vivo*. De este modo el vehículo se degrada, facilitando su eliminación del organismo.

También se ha empleado películas biodegradables de quitosano para la difusión de Paclitaxel [80]. En este caso, a pesar de obtener un material con una carga elevada de Paclitaxel (31 % p/p), sólo se consigue liberar un 15 % del fármaco. Además, la adición de lisozima no tiene ningún efecto sobre la liberación del fármaco. Por otro lado, el material es altamente biocompatible y es degradado *in vivo* según los estudios histológicos realizados.

1.5.1.5. Derivados del ácido poliláctico (PLLA)

El PLGA es un copolímero formado por el ácido láctico y el ácido glicólico. Dependiendo de la ratio empleada entre ambos monómeros se pueden obtener diferentes tipos de polímero. El PLGA ha obtenido gran éxito en aplicaciones biomédicas, ya que se hidroliza fácilmente en el organismo generando ácido láctico y el ácido glicólico, que son procesados eficazmente minimizando la toxicidad del polímero [50]. La degradación de este material depende de varios factores como la ratio de los monómeros, el peso molecular, el grado de cristalinidad y la temperatura de transición vítrea (Tg). El tamaño de las nanopartículas de PLGA con aplicaciones biomédicas suele ser inferior a 100 nm, de ese modo se reduce la adsorción de proteínas en superficie y la filtración hepática [81].

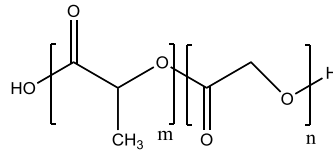


Figura 1.8. Estructura química del PLGA.

Este sistema se ha empleado para la difusión de fármacos, siARN y proteínas, destacando los estudios llevados a cabo por Langer, Farokhzad *et al.* para el tratamiento de cáncer de próstata con Docetaxel [82]. En otros casos, los implantes de PLGA se aplican localmente en el área a tratar [83]. Al inicio, la cinética de liberación de fármacos en partículas de PLGA está gobernada por la difusión del fármaco a través de la partícula, mientras que en las etapas finales está regida por los procesos de erosión y degradación [84]. La FDA aprobó el uso de Lupron® [85], un preparado comercial que contienen PLGA para el tratamiento de cáncer de próstata.

1.5.1.6. Nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono son cilindros formados por hojas de grafeno. Los extremos pueden estar abiertos o bloqueados por partículas [86]. El tamaño del diámetro puede ser de un nanómetro con una longitud de varios micrómetros. Dependiendo de la cantidad de hojas de grafeno presentes en la estructura se puede hablar de nanotubos de pared simple (SWNT) o nanotubos de pared múltiple (MWNT).

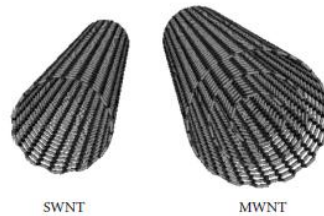


Figura 1.9. Nanotubos de carbono [87].

La superficie exterior de los nanotubos se puede modificar, lo que permite mejorar la estabilidad en medio acuoso o bien enlazar de forma covalente un fármaco o molécula directora [88-89]. Otra posibilidad que ofrece la funcionalización de la cubierta de los nanotubos es el anclaje de liposomas, y así aumentar la cantidad de fármaco incorporada al sistema, ya que los nanotubos por sí solos tienen baja capacidad de carga [90]. También se ha modificado el exterior para enlazar biomoléculas como ADN o siARN. Además los nanotubos de carbono son capaces de absorber las emisiones en la franja del infrarrojo cercano, provocando el calentamiento del medio a nivel local. Esta característica posibilita su aplicación en la terapia fototérmica de tumores. Debido a su forma de aguja los nanotubos pueden introducirse en el citosol perforando la pared celular sin causar daño aparente [87].

1.5.2. Vehículos inorgánicos

1.5.2.1. Nanopartículas de oro

Debido a sus propiedades ópticas, químicas y biológicas las nanopartículas de oro se han empleado en diferentes áreas de interés clínico: difusión de fármacos, terapia fototérmica, agentes de contraste, vacunación y difusión de biomoléculas como ADN o siARN [91-92].

En el caso de la difusión de fármacos, las moléculas pueden unirse de forma covalente a la nanopartícula o se puede incorporar mediante adsorción física. La superficie de las nanopartículas puede modificarse generalmente por tres motivos: i) en primer lugar para prevenir o disminuir la captación de las nanopartículas por parte del SRE. ii) En segundo lugar, incluir moléculas directoras o fármacos unidos de forma covalente. iii) Por último, disminuir la agregación de partículas [44]. La modificación de la superficie se puede realizar fácilmente mediante la formación de enlaces oro-tiol u oro-amino en la superficie de las nanopartículas.

Las nanopartículas de oro pueden sintetizarse en una gran variedad de tamaños de diámetro, desde los pocos nanómetros hasta unos 250 nm. El tamaño junto a otros factores como la carga o funcionalización externa influyen en la internalización celular de las partículas y su biodistribución. Por ejemplo, las nanopartículas de 20 a 50 nm de diámetro se internalizan de un modo más eficiente que el resto. Por otro lado, en estudios de biodistribución *in vivo* de nanopartículas entre 10 y 100 nm. Las nanopartículas más pequeñas alcanzaron el interior del tumor con mayor facilidad [93].

La irradiación de este tipo de nanopartículas genera un aumento en su temperatura, lesionando los tejidos colindantes. Esto hace posible emplearlas en terapia fotodinámica contra el cáncer [94]. Además, se puede emplear como un estímulo externo para la liberación controlada de fármacos [45].

Recientemente se ha investigado sobre la toxicidad de este tipo de partículas. Cuando son administradas de forma intravenosa, la mayoría acaban en el hígado o en el bazo. En menor medida también alcanzan otros tejidos como pulmones y riñones, además de tumor. Si el tamaño es inferior

a 20 nm las nanopartículas de oro pueden atravesar la barrera hematoencefálica [95].

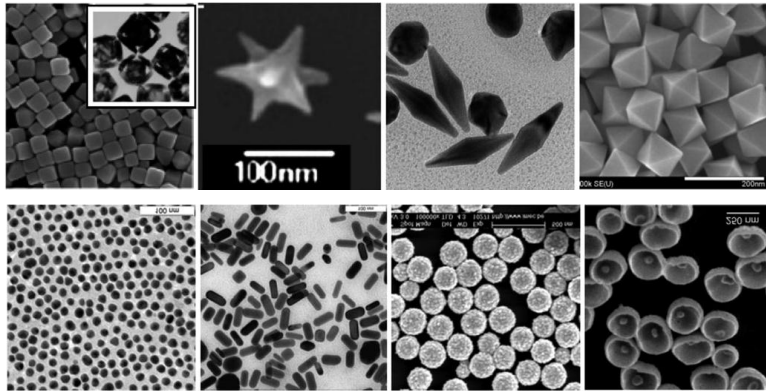


Figura 1.10. Nanopartículas de oro con geometría variada [96].

1.5.2.2. Redes órgano-metálicas (MOFs)

Los MOFs son compuestos formados por iones metálicos que se coordinan con ligandos orgánicos formando estructuras cristalinas. Inicialmente propuestos para aplicaciones biomédicas por el grupo de Vallet-Regí [97], los metales empleados suelen ser Ca, Mg, Zn y Fe debido a su baja toxicidad [98].

Los MOFs destacan por su elevada capacidad de carga, hasta un 70% en peso. probablemente debido a la gran área superficial que presentan estos materiales y a las interacciones que puede tener el fármaco con los iones metálicos que actúan como ácidos de Lewis [99].

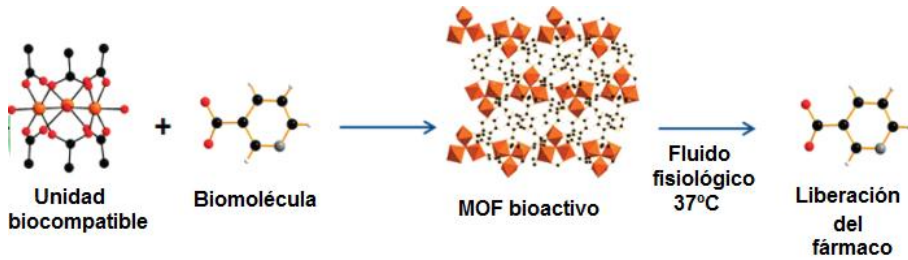


Figura 1.11. Esquema de la formación de un MOF y su aplicación para la difusión de fármacos [99].

Estos materiales también se han empleado para el transporte de gases transmisores. Estos gases son moléculas señalizadoras que son completamente permeables a la membrana celular. Entre ellos se encuentra NO, H₂S y CO [100]. Se ha testado la toxicidad de algunos de estos materiales en cultivos celulares demostrando una baja toxicidad. Por otro lado, los ensayos de biodistribución llevados a cabo indican una elevada acumulación en bazo e hígado. Los MOFs también se pueden emplear como agentes de contraste en resonancia magnética nuclear. En concreto se han aplicado compuestos con Gd III [99]. Finalmente se han utilizado este tipo de materiales con una doble finalidad, incluyendo Fe (III) en la estructura para la su uso en imagen diagnóstica y conteniendo a su vez diferentes principios activos entre los que se encuentran antineoplásicos y antiretrovirales [101].

1.5.2.3. Nanopartículas de sílice

Los materiales de sílice mesoporosa como MCM-41, SBA-15 y MCM-48 presentan una estructura llena de canales vacíos (mesoporos) en los cuales se puede almacenar una cantidad considerable de fármacos. Este tipo de materiales presentan buenas características como vehículos de fármacos

y biomoléculas. Su área superficial elevada ($900 \text{ m}^2/\text{g}$) posibilita la adsorción de moléculas en superficie. Además al tener un gran tamaño de poro ($0,9 \text{ cm}^3/\text{g}$) la cantidad de fármaco almacenada es elevada. La posibilidad de modificar su tamaño entre 2-10 nm se puede emplear para controlar la carga y liberación del fármaco. Por último, se puede modificar la superficie de estos materiales con diferentes grupos mediante co-condensación en la propia síntesis del material o bien post-síntesis, mejorando el control sobre la carga y liberación del fármaco [102].

Un método para obtener una liberación controlada de fármacos a partir de estos materiales consiste en obturar los canales. Para ello, se han empleado otras nanopartículas de un tamaño similar al poro, moléculas y macromoléculas orgánicas. Mediante la aplicación de determinados estímulos los canales se destapan y su contenido difunde al exterior [103].

Otro método empleado en la incorporación de fármacos a materiales de sílice consiste en la unión covalente de la molécula al material funcionalizado con grupos reactivos. La unión covalente hace que el fármaco se libere únicamente mediante la aplicación de determinados estímulos o la acción de enzimas. De esta forma se evita la liberación del fármaco en entornos diferentes a su diana terapéutica [104-105].

Numerosos estudios han demostrado que las nanopartículas de sílice son susceptibles a endocitosis por parte de gran variedad de líneas celulares cancerígenas. También se han empleado en la difusión de fármacos, genes, proteínas, neurotransmisores y otras moléculas biológicas [102]. Existen un gran número de publicaciones en las que se emplean nanomateriales basados en sílice. Cabe destacar los estudios realizado por Vallet-Regí *et al.* sobre las aplicaciones de estos materiales en diferentes campos, remarcando la influencia del tamaño de poro y la funcionalización de materiales de sílice

en la liberación de fármacos [106-107], y analizando los mecanismos de liberación selectivos [108].

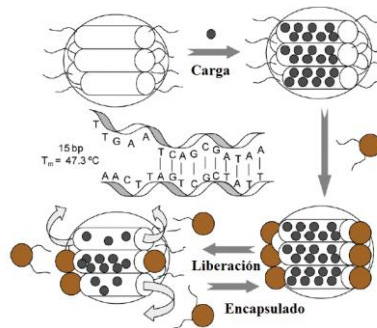


Figura 1.12. Esquema de liberación de fluoresceína a partir de nanopartículas de sílice mesoporosa [108].

También cabe destacar las investigaciones llevadas a cabo por Zink *et al.* en las que se aplica nanopartículas de sílice mesoporosa (MSN) como agentes terapéuticos en el tratamiento del cáncer. Ha diseñado nanopartículas funcionalizadas con grupos fosfonato para evitar la agregación del material y conseguir que se presenten en forma monodispersa en disoluciones acuosas. La CPT se incorpora en el interior de los canales mediante interacciones intermoleculares [43, 109]. También ha empleado materiales de sílice para la liberación controlada de moléculas mediante cambios de pH [109-110]. Además, ha demostrado con gran éxito la eficacia antitumoral *in vivo* de MSN con folato en su superficie y CPT en los canales de la estructura [48]. Por último, se ha empleado estos materiales para en transporte de siARN [37, 111].

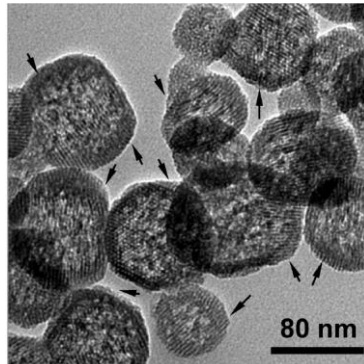


Figura 1.13. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de MSN con cubierta de PEI. Las flechas indican que el interior del poro queda accesible para la incorporación del fármaco y siARN [37].

Asimismo, cabe remarcar la extensa investigación realizada por Lin *et al.* con MSN para la liberación de moléculas terapéuticas mediante estímulos redox [104, 112-113]. Igualmente, este grupo ha llevado a cabo estudios sobre la influencia de la morfología de las nanopartículas en el proceso de endocitosis [114], así como el transporte de biomoléculas como proteínas y ADN al interior celular [42, 115].

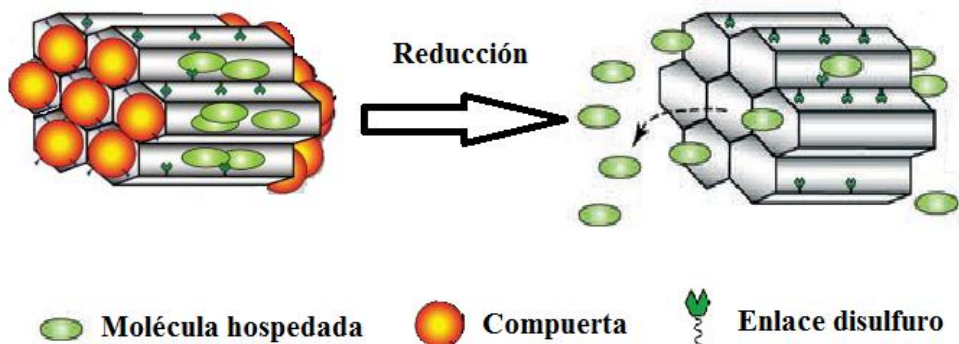


Figura 1.14. Nanopartícula de sílice mesoporosa con mecanismo de liberación de la carga por reducción de enlaces disulfuro [112].

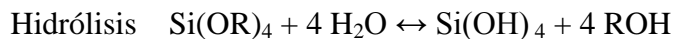
a) Rutas sintéticas para la obtención de nanopartículas de sílice

Síntesis sol-gel

Sol-gel es un término genérico que engloba una diversidad de técnicas, cuyo objetivo es alcanzar materiales de gran pureza y alta homogeneidad a escala molecular [116]. El método consta de cuatro etapas: en primer lugar se desarrolla una disolución coloidal de los precursores, es decir una suspensión estable. Seguidamente se produce la gelificación de la disolución coloidal mediante diversas técnicas de coagulación-floculación de los coloides: envejecimiento, cambios de concentración o adición de un electrolito desestabilizante. Más tarde se produce el secado del gel (xerogel) y por último se procede a la calcinación del xerogel.

El objetivo de esta técnica es desarrollar materiales a partir de unidades discretas que permanecen dispersas en un líquido (sol), hasta alcanzar una red tridimensional sólida que se extiende por toda la matriz líquida (gel).

El proceso de obtención del gel se puede dividir en cinco etapas diferentes: hidrólisis, polimerización, nucleación, crecimiento y aglomeración. En la etapa de hidrólisis-polimerización se formula el tamaño de las “partículas primarias” del sólido, conformadas por cadenas químicas polinucleares de los cationes unidos por puentes químicos obteniendo un gel coloidal acuoso.



En la fase de nucleación-crecimiento se diseña el tamaño de partícula y la distribución de tamaños del sólido neoformado. En general, los procesos sol-gel tienen un proceso de nucleación homogéneo que permiten un buen conformado de la partícula y una distribución monodispersa. Además, se puede controlar el crecimiento de la partícula con el fin de diseñar su forma. Por último, en la etapa de aglomeración de las partículas se diseña la estructura del sólido final. En esta fase se reúnen las partículas de forma ordenada (gel) o desordenada (precipitado).

Las ventajas de este tipo de síntesis son las bajas temperaturas necesarias y la alta homogeneidad de las disoluciones de partida. También permiten diseñar el tamaño, distribución y forma de las partículas sintetizadas, así como el tamaño y distribución de poro de los materiales obtenidos. Es posible controlar el crecimiento de esferas de sílice de tamaño uniforme mediante la hidrólisis de los alquilsilicatos y la posterior condensación del ácido silícico en disoluciones alcohólicas. Para ello se emplea amoníaco como catalizador y se obtienen partículas entre 50 y 2000 nm de diámetro en función de la cantidad de base empleada [117]. También es posible controlar la estructura de los materiales. Por ejemplo, en el caso de los materiales mesoporosos, al añadir cantidades crecientes de alcoholes como metanol, etanol o propanol a la mezcla de síntesis, se produce una transición de mesofase. Cuando se añaden pequeñas cantidades de alcohol, las moléculas se encuentran en el interior de las micelas, actuando como cosurfactantes. Esto hace que se favorezca una transición de fase de MCM-41 a MCM-48, hasta llegar a fase lamelar. Si la adición de alcohol aumenta, este actúa como cosolvente, decreciendo la polaridad de la disolución. De este modo se forman partículas esféricas con estructura hexagonal compacta [118].

Por otro lado, los inconvenientes de este método son el elevado coste del proceso y la debilidad mecánica del gel húmedo, que genera problemas en el procesado cuando se trata de producción industrial [119].

Síntesis biomimética

Este caso se inspira en organismos marinos como esponjas o diatomeas capaces de generar estructuras silíceas. Se trata de un caso particular del proceso sol-gel en el que las reacciones de hidrólisis y condensación se realizan a pH neutro y temperatura ambiente [120]. Además, existe la posibilidad de emplear agentes directores de estructura orgánicos (OSDA) de origen natural. Estos pueden ser aniónicos como el colato sódico o bien no iónicos como los alquilmaltósidos. Mediante esta técnica se pueden obtener materiales biocompatibles y biodegradables para la liberación de fármacos [121-122].

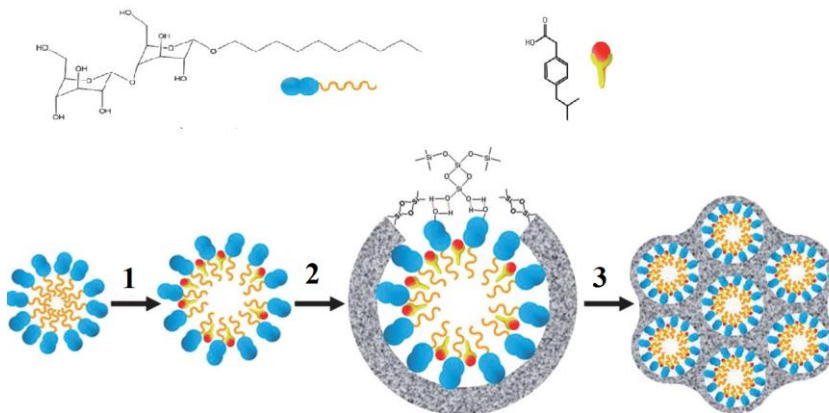


Figura 1.15. Representación esquemática de la síntesis biomimética. 1) Incorporación del fármaco. 2) Condensación de la sílice en la superficie de la micela. 3) Evaporación del disolvente [121].

Síntesis *core-shell*

Este tipo de síntesis genera un material en el cual existen dos partes diferenciadas. La partícula está formada por un núcleo (*core*) cubierto por una corteza (*shell*).

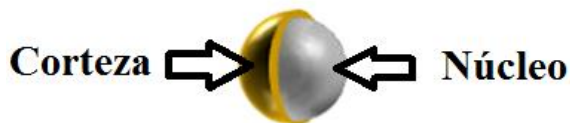


Figura 1.16. Esquema de nanopartícula *core-shell* [123].

Esta técnica se ha empleado frecuentemente para la producción de materiales con núcleo de sílice y corteza metálica. Se obtienen depositando un recubrimiento metálico sobre nanopartículas de sílice. Para que esto se produzca, es necesario funcionalizar la superficie con grupos aminopropilsilano o mercaptopropilsilano, para generar interacciones con las especies metálicas. Este tipo de material se puede sintetizar de diferentes formas: i) por deposición de nanopartículas metálicas en la superficie, ii) por reducción de especies metálicas en disolución, iii) aplicación de ultrasonidos. Los metales más utilizados en este tipo de recubrimientos son el oro y la plata [124].

También es posible efectuar un recubrimiento de nanopartículas metálicas con sílice. En el caso de particular de las nanopartículas de oro y, a diferencia de otras nanopartículas de metales, la parte externa de las nanopartículas de oro es vitreofóbica. Por ello, al igual que en el ejemplo anterior, es necesario añadir un silano que recubra la partícula para generar una superficie vitreofílica en la que pueda generarse una capa de sílice [125].

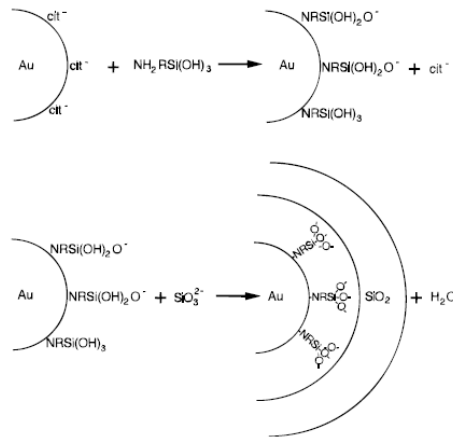


Figura 1.17. Esquema de síntesis de nanopartículas oro-sílice (Au@SiO₂) [125].

Síntesis pseudomórfica

Este tipo de transformación se corresponde con la definición de pseudomorfismo empleada en mineralogía: “La existencia de una especie mineral con la forma cristalina externa de otra”. Este procedimiento se ha aplicado para la obtención de diferentes materiales mesoporosos. Por ejemplo, para la obtención de MCM-41 a partir de partículas de sílice amorfa mediante tratamiento básico en presencia de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB). En esta síntesis el material MCM-41 se forma debido a la disolución de las partículas de sílice amorfa, que actúan como fuente de silicio para formar la nueva fase [126]. También se ha obtenido el material MCM-48 empleando esta técnica a través de diferentes transiciones de fase [127].

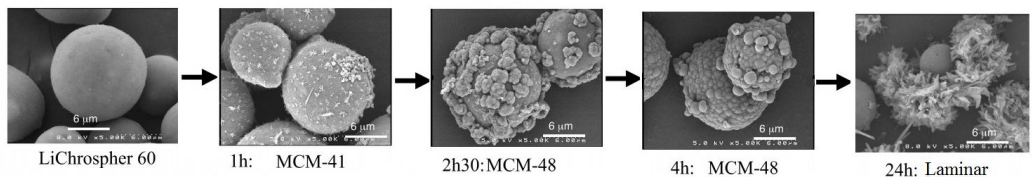


Figura 1.18. Imágenes de microscopía electrónica de barrido SEM [127].

Mediante una modificación de este método, nuestro grupo ha llevado a cabo una transformación pseudomórfica de la cubierta de sílice en materiales *core-shell*. De esta forma se modifican los parámetros texturales y estructurales de la corteza, ofreciendo un excelente soporte para diversas aplicaciones [128-129].

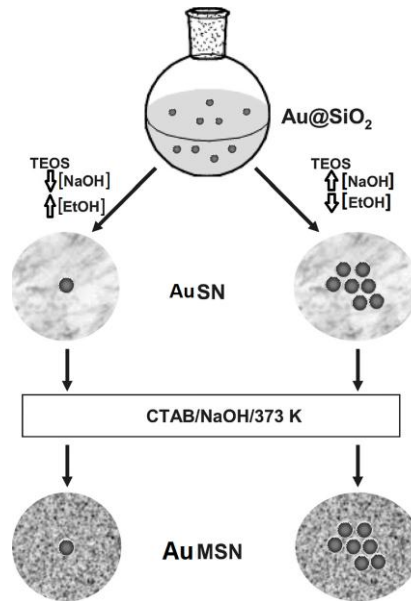


Figura 1.19. Secuencia de la síntesis pseudomórfica de nanopartículas de oro con cubierta de sílice mesoporosa [128-129].

b) Mecanismos de liberación intracelular en nanofármacos de sílice

Como se ha comentado en la sección 1.4, la incorporación de moléculas terapéuticas en sistemas nanoparticulados debe realizarse mediante uniones que permitan la liberación del principio activo exclusivamente dentro de las células diana, lo que supone una “liberación cero” antes de que el nanofármaco alcance tales células. Para ello, en el caso de las partículas de sílice se ha diseñado modelos de varios tipos. Entre

estos, destacan los sistemas dependientes del pH, aquellos sensibles a la luz, mecanismos redox y sistemas que interaccionan con enzimas intracelulares.

Sistemas dependientes del pH

Este tipo de sistemas ha sido empleado para la difusión intracelular de fármacos debido a las diferencias de pH presentes entre tejido sano y tejido tumoral [130]. Algunos tejidos patológicos como el tejido tumoral o inflamatorio tienen un pH ligeramente inferior al fisiológico (pH 7,4). Los lisosomas y endosomas celulares también presentan un pH ligeramente ácido [131]. Por ello es posible diseñar sistemas para la difusión de fármacos cuyo estímulo para la liberación sea un pH moderadamente ácido, evitando así su acción en tejidos fisiológicos.

En el ejemplo mostrado, se emplea el material mesoporoso SBA-15 funcionalizado con grupos carboxilato. En medio neutro o básico los grupos carboxilato interactúan con los cationes de cloruro de polidialildimetilamonio (PDDA), atrapando el fármaco (vancomicina) en el interior de los canales. En medio ácido ya no se produce la interacción anterior y la vancomicina se libera.

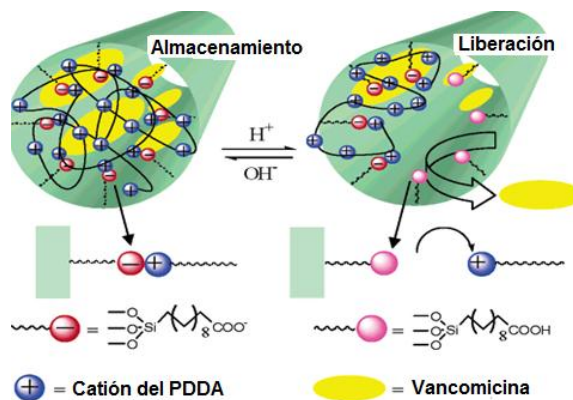


Figura 1.20. Representación de un sistema de liberación basado en nanopartículas de sílice sensible al pH ácido [132].

Sistemas dependientes de mecanismos redox

La presencia de diferentes reductores en el citoplasma de las células eucariotas como nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), ácido dihidrolipoico (DHLA) o glutatión (GSH) posibilitan la liberación de fármacos mediante un mecanismo de oxidación-reducción, generalmente basado en la reducción de la unión entre el fármaco y el soporte, liberando la molécula en el citosol o en diferentes orgánulos.

El primero de estos sistemas fue propuesto por Lin *et al.* [100]. En este caso, se obturan los canales del material mesoporoso tipo MCM-41 con nanopartículas de CdS. Las nanopartículas que bloquean la salida del canal están unidas por puentes disulfuro. Al añadir una sustancia reductora, las nanopartículas de CdS se desprenden y el fármaco es liberado desde el interior de los canales [113].

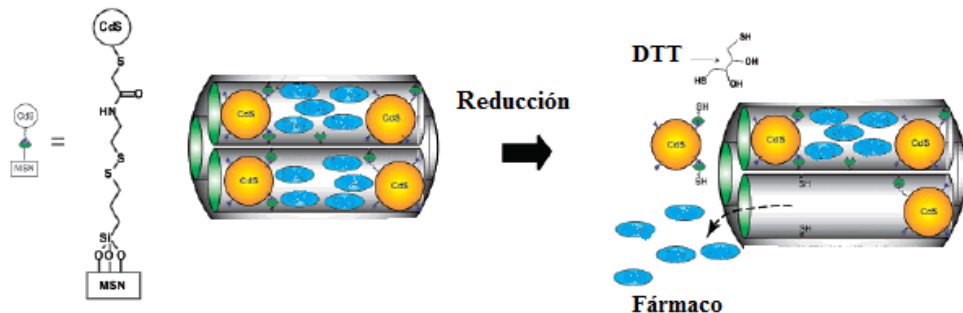


Figura 1.21. Representación esquemática de la liberación de fármaco desde una matriz de sílice mesoporosa mediante un estímulo reductor [113].

Sistemas fotosensibles

En los comienzos de la década pasada se presentaron varios sistemas de sílice mesoporosa tipo MCM-41 capaces de liberar el contenido de sus canales irradiando el material. Estos materiales presentan “puertas

moleculares” en la boca de los poros que pueden abrirse o cerrarse aplicando longitudes de onda determinadas. No obstante, tratándose de sistemas sensibles a la radiación UV, su aplicación clínica está limitada por el posible daño causado por este tipo de radiaciones en tejidos [133-135]. En la figura 1.22 se expone uno de estos sistemas basados en la incorporación de grupos 7-[3-(trietoxisilil)propoxi]cumarina (7-TESPC).

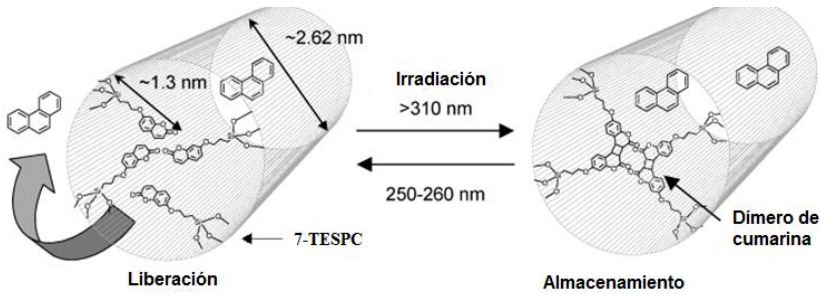


Figura 1.22. Representación de un sistema de liberación basado en nanopartículas de sílice con puertas moleculares activadas por irradiación UV [136].

Sistemas dependientes de la actividad enzimática

Recientemente nuestro grupo ha presentado un nuevo sistema de difusión de CPT basado en nanopartículas amorfas de sílice en el que la liberación de la molécula terapéutica depende de la acción de esterasas intracelulares [137].

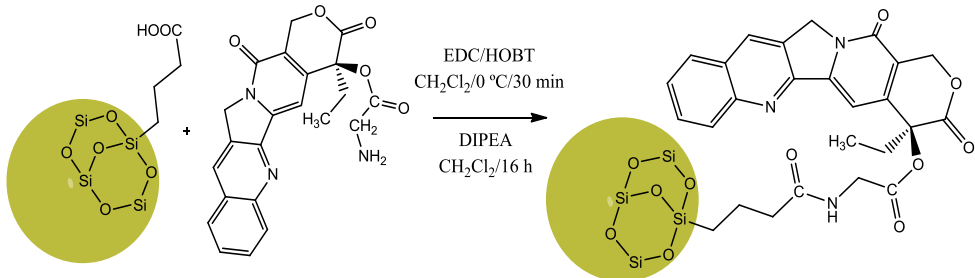


Figura 1.23. Esquema de la incorporación de Gly-CPT·TFA a nanopartículas de sílice funcionalizadas con grupos carboxilo [137].

También se han aplicado mecanismos de “puertas moleculares” en materiales de sílice mesoporosa basados en la acción de enzimas. Uno de estos sistemas se caracteriza por presentar la superficie exterior de los poros bloqueada por biopolímeros, que son degradados por la acción de la enzima β -D-galactosidasa, permitiendo la difusión del fármaco desde el interior del canal mesoporoso [138-139].

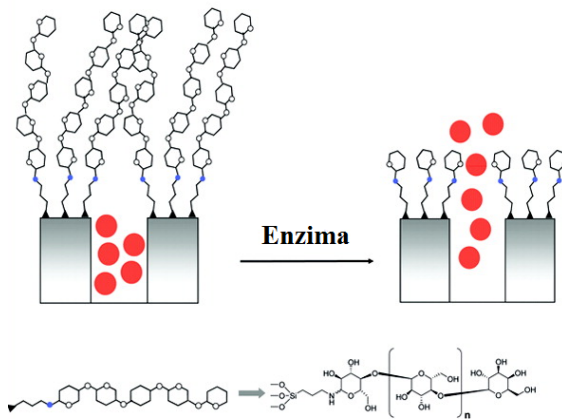


Figura 1.24. Esquema de un sistema de liberación basado en nanopartículas de sílice sensible a la acción de enzimas [140].

Otra modalidad de estos sistemas es la presentada por Corma *et al.* En este ejemplo se aplica una cubierta orgánica-inorgánica sobre liposomas cargados con doxorubicina. El fragmento orgánico contiene un enlace éster susceptible a la acción de esterasas. Tras la ruptura de este enlace se libera el liposoma y posteriormente su carga [141]

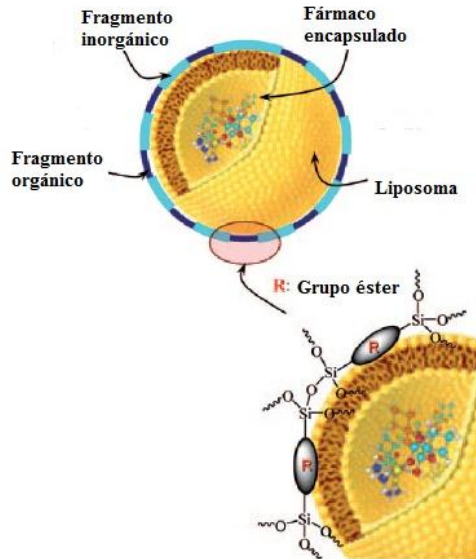


Figura 1.25. Representación artística de liposomas con una cubierta orgánica-inorgánica sensible a la acción de esterasas [141].

c) Limitaciones para su uso terapéutico

La toxicidad *in vitro* de las nanopartículas de sílice se ha estudiado en cultivos celulares fundamentalmente mediante ensayos de viabilidad celular MTT. A concentraciones inferiores a 100 $\mu\text{g/ml}$ las nanopartículas de sílice mesoporosa no producen citotoxicidad en una gran variedad de líneas celulares [28]. La toxicidad producida por las partículas de sílice se debe a tres mecanismos: i) en primer lugar a la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS) por los defectos de superficie e impurezas. ii) En segundo lugar, a la desnaturalización de proteínas y iii) a la alteración de la membrana celular. Estos efectos citotóxicos podrían mitigarse con la modificación de la superficie de las nanopartículas [137, 142].

La toxicidad depende del tamaño de partícula, de manera que para una misma cantidad de sílice incorporada las nanopartículas de mayor tamaño

(400 nm) presentan una toxicidad menor que las nanopartículas más pequeñas (20 nm) [143]. Esto se debe a que, para una misma cantidad de sílice, las partículas de mayor tamaño disponen de un menor área superficial con la que interaccionar con los tejidos.

Además, otros parámetros como la hidrofobicidad y la carga superficial también influyen en la biocompatibilidad de los materiales. Las nanopartículas hidrófobas suelen poseer tiempos de vida media cortos ya que son captadas rápidamente por el SRE. Aunque este hecho puede limitar la aplicación de las partículas de sílice como vehículos de fármacos, algunas aplicaciones se basan en la captación rápida por parte de los macrófagos y su transporte a nódulos linfáticos o tejidos inflamados. Este puede ser el caso de algunos agentes de contraste [142]. Por otro lado, las partículas que presentan cierta carga superficial tienden a adsorber proteínas séricas. Esto puede afectar a su biodistribución, generar repuesta inmunitaria y desestabilizar membranas celulares y proteínas. Esto resulta especialmente patente en el caso de partículas con carga positiva [30].

La biodistribución de las nanopartículas de sílice depende en gran medida de su tamaño y de la funcionalización. Las nanopartículas de sílice funcionalizadas con PEG poseen unos tiempos de aclaramiento plasmático mayores. A su vez, presentan menor acumulación hepática debido a un menor reconocimiento por parte de SER [144]. En el caso de nanopartículas pegiladas de menor tamaño (6-10 nm), se favorece la excreción renal, si bien también hay retención en bazo e hígado [145]. En algunos casos, tras la inyección de nanopartículas se producen ligeros cambios en los parámetros hemodinámicos en ratones. La acumulación se produce tanto en hígado como en riñón y pulmones, indicando excreción renal y hepatobiliar [146]. En el caso de nanopartículas de 20 nm el 75 % de las nanopartículas

inyectadas se acumulan en hígado y bazo para una dosis de 2 mg/kg. Estas se eliminan completamente tras 15 días por vía hepatobiliar sin causar ningún efecto tóxico apreciable [147].

Cuando el tamaño de las nanopartículas aumenta (50-100 nm) el hígado es el órgano que más partículas acumula. Aparecen en vesículas intracelulares de células de Kuffer. La mayoría aparecen en el citoplasma y algunas cercanas al núcleo. Otros órganos como pulmones y bazo también acumulan una cantidad considerable de nanopartículas [137, 148].

No obstante, la incorporación de moléculas directoras a células cancerosas en la superficie de las partículas, concretamente ácido fólico, favorece la acumulación de las mismas en el tumor respecto del resto de órganos, señalando una endocitosis mediada por receptores de ácido fólico [28].

La acumulación hepática de las nanopartículas de sílice es uno de las grandes barreras actuales para su utilización en la práctica clínica. Aunque los macrófagos pueden fagocitar y metabolizar gran cantidad de agentes exógenos, las nanopartículas de sílice pueden resistir debido a su estabilidad química. El estudio histológico de las muestras hepáticas evidenciaron varios cambios patológicos, infiltración linfocitaria en la zona portal y hepatocitos necrosados en la triada portal. Si bien las nanopartículas de sílice no son endocitadas por hepatocitos *in vivo*, la necrosis hepática puede deberse a la respuesta inflamatoria y a las citoquinas liberadas por los macrófagos activados [16]. En este caso, la magnitud de la toxicidad generada por las nanopartículas puede deberse a la elevada cantidad suministrada por vía intravenosa (10 mg/kg).

Referencias

- [1] Sant, M.; Allemani, C.; Santaquilani, M.; Knijn, A.; Marchesi, F.; Capocaccia, R. *Eur. J. Cancer* **2009**, 45, 931-991.
- [2] Sánchez, M. J.; Payer, T.; De Angelis, R.; Larrañaga, N.; Capocaccia, R.; Martinez, C. *Ann. Oncol.* **2010**, 21, iii30-iii36.
- [3] Fader, A. N.; Rose, P. G. *J. Clin. Oncol.* **2007**, 25, 2873-2883.
- [4] Recht, A.; Houlihan, M. J. *Cancer* **1995**, 76, 1491-1512.
- [5] Delaney, G.; Jacob, S.; Featherstone, C.; Barton, M. *Cancer* **2005**, 104, 1129-1137.
- [6] Feldman, A. L.; Libutti, S. K. *Cancer* **2000**, 89, 1181-1194.
- [7] Samson, D. J.; Seidenfeld, J.; Ziegler, K.; Aronson, N. *J. Clin. Oncol.* **2004**, 22, 3618-3630.
- [8] Hertzberg, R. P.; Caranfa, M. J.; Hecht, S. M. *Biochemistry (Mosc)*. **1989**, 28, 4629-4638.
- [9] Zhang, L.; Zhang, Y.; He, W.; Ma, D.; Jiang, H. *Pest Manage. Sci.* **2012**, 68, 652-657.
- [10] Venditto, V. J.; Simanek, E. E. *Mol. Pharm.* **2010**, 7, 307-349.
- [11] Oberlies, N. H.; Kroll, D. J. *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 129-135.
- [12] Garcia-Carbonero, R.; Supko, J. G. *Clin. Cancer. Res.* **2002**, 8, 641-661.
- [13] Klener, P. *J. Basic. Clin. Oncol.* **1999**, 19, 279-295.
- [14] Bu, H.; Gao, Y.; Li, Y. *Sci. China. Chem.* **2010**, 53, 2226-2232.
- [15] Higgins, C. F. *Nature* **2007**, 446, 749-757.
- [16] Rutledge, R. M.; Esser, L.; Ma, J.; Xia, D. *J. Struct. Biol.* **2011**, 173, 333-344.
- [17] Fu-Shing, L. *Taiwan J. Obstet. Gynecol* **2009**, 48, 239-244.
- [18] Conover, C. D.; Zhao, H.; Longley, C. B.; Shum, K. L.; Greenwald, R. B. *Bioconjugate Chem.* **2003**, 14, 661-666.
- [19] Greenwald, R. B.; Pendri, A.; Conover, C. D.; Zhao, H.; Choe, Y. H.; Martinez, A.; Shum, K.; Guan, S. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 3657-3667.
- [20] Hashizume, H.; Baluk, P.; Morikawa, S.; McLean, J. W.; Thurston, G.; Roberge, S.; Jain, R. K.; McDonald, D. M. *Am. J. Pathol.* **2000**, 156, 1363-1380.
- [21] Matsumura, Y.; Maeda, H. *Cancer Res.* **1986**, 46, 6387-6392.
- [22] Farokhzad, O. C.; Langer, R. *ACS Nano* **2009**, 3, 16-20.
- [23] Paranjpe, P. V.; Chen, Y.; Kholodovych, V.; Welsh, W.; Stein, S.; Sinko, P. J. *J. Control. Release* **2004**, 100, 275-292.
- [24] Erez, R.; Ebner, S.; Attali, B.; Shabat, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 816-820.

- [25] Shamis, M.; Lode, H. N.; Shabat, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1726-1731.
- [26] Niculescu-Duvaz, D.; Niculescu-Duvaz, I.; Friedlos, F.; Martin, J.; Spooner, R.; Davies, L.; Marais, R.; Springer, C. J. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 5297-5309.
- [27] Moghimi, S. M.; Hunter, A. C.; Murray, J. C. *Pharmacol. Rev.* **2001**, 53, 283-318.
- [28] Lu, J.; Liong, M.; Li, Z.; Zink, J. I.; Tamanoi, F. *Small* **2010**, 6, 1794-1805.
- [29] Xie, G.; Sun, J.; Zhong, G.; Shi, L.; Zhang, D. *Arch. Toxicol.* **2010**, 84, 183-190.
- [30] Souris, J. S.; Lee, C.-H.; Cheng, S.-H.; Chen, C.-T.; Yang, C.-S.; Ho, J.-a. A.; Mou, C.-Y.; Lo, L.-W. *Biomaterials* **2010**, 31, 5564-5574.
- [31] Rosenholm, J. M.; Peuhu, E.; Eriksson, J. E.; Sahlgren, C.; Lindén, M. *Nano Lett.* **2009**, 9, 3308-3311.
- [32] Rosenholm, J. M.; Meinander, A.; Peuhu, E.; Niemi, R.; Eriksson, J. E.; Sahlgren, C.; Lindén, M. *ACS Nano* **2008**, 3, 197-206.
- [33] Hall, M. D.; Handley, M. D.; Gottesman, M. M. *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, 30, 546-556.
- [34] Wong, H. L.; Bendayan, R.; Rauth, A. M.; Xue, H. Y.; Babakhanian, K.; Wu, X. Y. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, 317, 1372-1381.
- [35] Lee, E. S.; Gao, Z.; Kim, D.; Park, K.; Kwon, I. C.; Bae, Y. H. *J. Control. Release* **2008**, 129, 228-236.
- [36] Patil, Y.; Sadhukha, T.; Ma, L.; Panyam, J. *J. Control. Release* **2009**, 136, 21-29.
- [37] Meng, H.; Liong, M.; Xia, T.; Li, Z.; Ji, Z.; Zink, J. I.; Nel, A. E. *ACS Nano* **2010**, 4, 4539-4550.
- [38] Chen, A. M.; Zhang, M.; Wei, D.; Stueber, D.; Taratula, O.; Minko, T.; He, H. *Small* **2009**, 5, 2673-2677.
- [39] Niinomi, M. *Mater. Sci. Eng., A* **1998**, 243, 231-236.
- [40] David F, W. *Biomaterials* **2008**, 29, 2941-2953.
- [41] Barbé, C.; Bartlett, J.; Kong, L.; Finnie, K.; Lin, H. Q.; Larkin, M.; Calleja, S.; Bush, A.; Calleja, G. *Adv. Mater.* **2004**, 16, 1959-1966.
- [42] Torney, F.; Trewyn, B. G.; Lin, V. S. Y.; Wang, K. *Nat Nano* **2007**, 2, 295-300.
- [43] Lu, J.; Liong, M.; Zink, J. I.; Tamanoi, F. *Small* **2007**, 3, 1341-1346.
- [44] Pissuwan, D.; Niidome, T.; Cortie, M. B. *J. Control. Release* **2011**, 149, 65-71.

- [45] Botella, P.; Ortega, I.; Quesada, M.; Madrigal, R. F.; Muniesa, C.; Fimia, A.; Fernandez, E.; Corma, A. *Dalton Trans.* **2012**, 41, 9286–9296
- [46] Heidel, J.; Davis, M. *Pharm. Res.* **2011**, 28, 187-199.
- [47] Pasqua, L.; Testa, F.; Aiello, R.; Cundari, S.; Nagy, J. B. *Microporous Mesoporous Mater.* **2007**, 103, 166-173.
- [48] Lu, J.; Li, Z.; Zink, J. I.; Tamanoi, F. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2012**, 8, 212-220.
- [49] Cheng, S.-H.; Lee, C.-H.; Chen, M.-C.; Souris, J. S.; Tseng, F.-G.; Yang, C.-S.; Mou, C.-Y.; Chen, C.-T.; Lo, L.-W. *J. Mater. Chem.* **2010**, 20, 6149-6157.
- [50] Campolongo, M. J.; Luo, D. *Nat Mater* **2009**, 8, 447-448.
- [51] Immordino, M. L.; Dosio, F.; Cattel, L. *Int. J. Nanomedicine* **2006**, 1, 297–315.
- [52] Drulis-Kawa, Z.; Dorotkiewicz-Jach, A. *Int. J. Pharm.* **2010**, 387, 187-198.
- [53] Wu, H.-C.; Chang, D.-K. *JOC* **2010**, 2010, 1-8.
- [54] Lyass, O.; Hubert, A.; Gabizon, A. A. *Clin. Cancer Res.* **2001**, 7, 3040-3046.
- [55] Cao, Z.; Tong, R.; Mishra, A.; Xu, W.; Wong, G. C. L.; Cheng, J.; Lu, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 6494-6498.
- [56] Tagami, T.; Suzuki, T.; Matsunaga, M.; Nakamura, K.; Moriyoshi, N.; Ishida, T.; Kiwada, H. *Int. J. Pharm.* **2012**, 422, 280-289.
- [57] Svenson, S.; Tomalia, D. A. *Adv. Drug Del. Rev.* **2005**, 57, 2106-2129.
- [58] Sagi, A.; Weinstein, R.; Karton, N.; Shabat, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 5434-5435.
- [59] Soliman, G. M.; Sharma, A.; Maysinger, D.; Kakkar, A. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 9572-9587.
- [60] Davis, M. E.; Brewster, M. E. *Nat Rev Drug Discov* **2004**, 3, 1023-1035.
- [61] Uekama, K.; Hirayama, F.; Irie, T. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 2045-2076.
- [62] Tabushi, I.; Shimokawa, K.; Fujita, K. *Tetrahedron Lett.* **1977**, 18, 1527-1530.
- [63] Cheng, J.; Khin, K. T.; Jensen, G. S.; Liu, A.; Davis, M. E. *Bioconj. Chem.* **2003**, 14, 1007-1017.
- [64] Cheng, J.; Khin, K. T.; Davis, M. E. *Mol. Pharm.* **2004**, 1, 183-193.
- [65] Schlupe, T.; Hwang, J.; Cheng, J.; Heidel, J. D.; Bartlett, D. W.; Hollister, B.; Davis, M. E. *Clin. Cancer. Res.* **2006**, 12, 1606-1614.
- [66] Nishiyama, N.; Nori, A.; Malugin, A.; Kasuya, Y.; Kopečková, P.; Kopeček, J. *Cancer Res.* **2003**, 63, 7876-7882.

- [67] Miyamoto, Y.; Oda, T.; Maeda, H. *Cancer Res.* **1990**, 50, 1571-1575.
- [68] Omelyanenko, V.; Kopečková, P.; Gentry, C.; Kopeček, J. *J. Control. Release* **1998**, 53, 25-37.
- [69] Schluep, T.; Cheng, J.; Khin, K.; Davis, M. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2006**, 57, 654-662.
- [70] Schluep, T.; Hwang, J.; Hildebrandt, I. J.; Czernin, J.; Choi, C. H. J.; Alabi, C. A.; Mack, B. C.; Davis, M. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 11394-11399.
- [71] Numbenjapon, T.; Wang, J.; Colcher, D.; Schluep, T.; Davis, M. E.; Durringer, J.; Kretzner, L.; Yen, Y.; Forman, S. J.; Raubitschek, A. *Clin. Cancer. Res.* **2009**, 15, 4365-4373.
- [72] Davis, M. E. *Mol. Pharm.* **2009**, 6, 659-668.
- [73] Lee, C.-H.; Cheng, S.-H.; Wang, Y.-J.; Chen, Y.-C.; Chen, N.-T.; Souris, J.; Chen, C.-T.; Mou, C.-Y.; Yang, C.-S.; Lo, L.-W. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, 19, 215-222.
- [74] Cerqueira N.M.; Pereira S.; Fernandes P.A.; Ramos M. J. *Curr. Med. Chem.* **2005**, 12, 1283-1294.
- [75] Davis, M. E.; Zuckerman, J. E.; Choi, C. H. J.; Seligson, D.; Tolcher, A.; Alabi, C. A.; Yen, Y.; Heidel, J. D.; Ribas, A. *Nature* **2010**, 464, 1067-1070.
- [76] Shweta, K.; Pramod Kumar, S.; Vipin Kumar, G.; Nitin, K.; Jonish, V. *Der Pharmacia Sinica* **2010**, 1, 195-210.
- [77] Sanaa , M.; Yosreya , M.; Fikry , A. *Anti-corros Method M* **2001**, 48, 227-235.
- [78] Singla, A. K.; Chawla, M. *J. Pharm. Pharmacol.* **2001**, 53, 1047-1067.
- [79] Marttin, E.; Schipper, N. G. M.; Verhoef, J. C.; Merkus, F. W. H. M. *Adv. Drug Del. Rev.* **1998**, 29, 13-38.
- [80] Anand Babu, D.; Ramesh, P. *The AAPPS Journal* **2004**, 6, 1-12.
- [81] Acharya, S.; Sahoo, S. K. *Adv. Drug Del. Rev.* **2011**, 63, 170-183.
- [82] Whitehead, K. A.; Langer, R.; Anderson, D. G. *Nat Rev Drug Discov* **2009**, 8, 129-138.
- [83] Wen, Y.; Gallego, M. R.; Nielsen, L. F.; Jorgensen, L.; Everland, H.; Møller, E. H.; Nielsen, H. M. *J. Control. Release* **2011**, 156, 11-20.
- [84] Fredenberg, S.; Wahlgren, M.; Reslow, M.; Axelsson, A. *Int. J. Pharm.* **2011**, 415, 34-52.
- [85] http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/019732s037lbl.pdf.

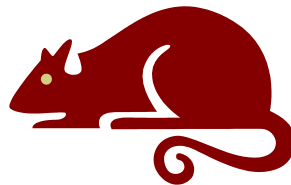
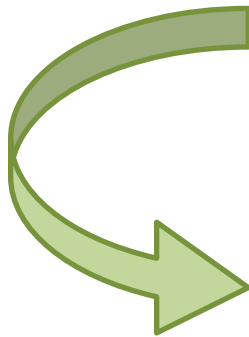
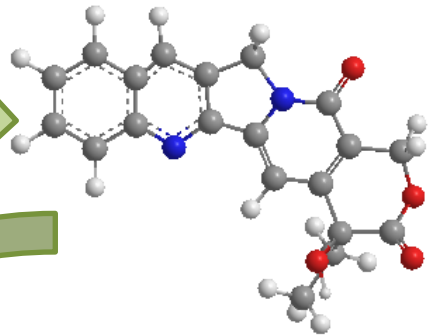
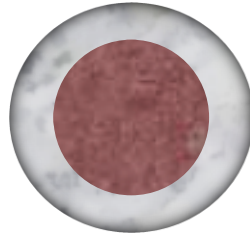
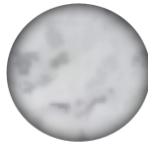
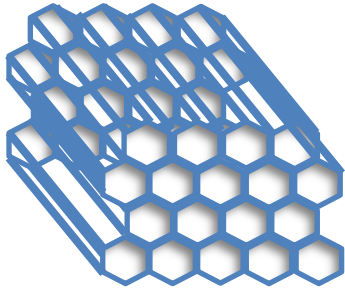
- [86] Li, J.; Yap, S. Q.; Yoong, S. L.; Nayak, T. R.; Chandra, G. W.; Ang, W. H.; Panczyk, T.; Ramaprabhu, S.; Vashist, S. K.; Sheu, F.-S.; Tan, A.; Pastorin, G. *Carbon* **2012**, 50, 1625-1634.
- [87] M. A. Elhissi; A. Waqar; U. I. Hassan; V. R. Dhanak; D'Emanuele, A. *Drug Deliv* **2012**, 2012, 1-10.
- [88] Ren, J.; Shen, S.; Wang, D.; Xi, Z.; Guo, L.; Pang, Z.; Qian, Y.; Sun, X.; Jiang, X. *Biomaterials* **2012**, 33, 3324-3333.
- [89] Fabbro, C.; Ali-Boucetta, H.; Ros, T. D.; Kostarelos, K.; Bianco, A.; Prato, M. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 3911-3926.
- [90] Karchemski, F.; Zucker, D.; Barenholz, Y.; Regev, O. *J. Control. Release* **2012**, 160, 339-345.
- [91] Lytton-Jean, A. K. R.; Langer, R.; Anderson, D. G. *Small* **2011**, 7, 1932-1937.
- [92] Guerrero-Martínez, A.; Pérez-Juste, J.; Carbó-Argibay, E.; Tardajos, G.; Liz-Marzán, L. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 9484-9488.
- [93] Duncan, B.; Kim, C.; Rotello, V. M. *J. Control. Release* **2010**, 148, 122-127.
- [94] Lal, S.; Clare, S. E.; Halas, N. J. *Acc. Chem. Res.* **2008**, 41, 1842-1851.
- [95] Khlebtsov, N.; Dykman, L. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 1647-1671.
- [96] Khlebtsov, N. G.; Dykman, L. A. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer* **2010**, 111, 1-35.
- [97] Horcajada, P.; Serre, C.; Vallet-Regí, M.; Sebban, M.; Taulelle, F.; Férey, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 5974-5978.
- [98] Taylor-Pashow, K. M. L.; Rocca, J. D.; Xie, Z.; Tran, S.; Lin, W. J. *Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 14261-14263.
- [99] Horcajada, P.; Gref, R.; Baati, T.; Allan, P. K.; Maurin, G.; Couvreur, P.; Férey, G.; Morris, R. E.; Serre, C. *Chem. Rev.* **2011**, 112, 1232-1268.
- [100] Hinks, N. J.; McKinlay, A. C.; Xiao, B.; Wheatley, P. S.; Morris, R. E. *Microporous Mesoporous Mater.* **2010**, 129, 330-334.
- [101] Horcajada, P.; Chalati, T.; Serre, C.; Gillet, B.; Sebban, C.; Baati, T.; Eubank, J. F.; Heurtaux, D.; Clayette, P.; Kreuz, C.; Chang, J.-S.; Hwang, Y. K.; Marsaud, V.; Bories, P.-N.; Cynober, L.; Gil, S.; Férey, G.; Couvreur, P.; Gref, R. *Nat. Mater.* **2010**, 9, 172-178.
- [102] Slowing, I. I.; Vivero-Escoto, J. L.; Wu, C.-W.; Lin, V. S. Y. *Adv. Drug Del. Rev.* **2008**, 60, 1278-1288.
- [103] Trewyn, B. G.; Giri, S.; Slowing, I. I.; Lin, V. S. Y. *Chem. Commun.* **2007**, 43, 3236-3245.
- [104] Mortera, R.; Vivero-Escoto, J.; Slowing, I. I.; Garrone, E.; Onida, B.; Lin, V. S. Y. *Chem. Commun.* **2009**, 45, 3219-3221.

- [105] Tourne-Peteilh, C.; Brunel, D.; Begu, S.; Chiche, B.; Fajula, F.; Lerner, D. A.; Devoisselle, J.-M. *New J. Chem.* **2003**, *27*, 1415-1418.
- [106] Horcajada, P.; Rámila, A.; Férey, G.; Vallet-Regí, M. *Solid. State. Sci* **2006**, *8*, 1243-1249.
- [107] Horcajada, P.; Rámila, A.; Pérez-Pariente, J.; Vallet-Regí, M. *Microporous Mesoporous Mater.* **2004**, *68*, 105-109.
- [108] Ruiz-Hernández, E.; Baeza, A.; Vallet-Regí, M. a. *ACS Nano* **2011**, *5*, 1259-1266.
- [109] Meng, H.; Xue, M.; Xia, T.; Zhao, Y.-L.; Tamanoi, F.; Stoddart, J. F.; Zink, J. I.; Nel, A. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12690-12697.
- [110] Nguyen, T. D.; Leung, K. C. F.; Liong, M.; Pentecost, C. D.; Stoddart, J. F.; Zink, J. I. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3363-3366.
- [111] Hom, C.; Lu, J.; Liong, M.; Luo, H.; Li, Z.; Zink, J. I.; Tamanoi, F. *Small* **2010**, *6*, 1185-1190.
- [112] Giri, S.; Trewyn, B. G.; Stellmaker, M. P.; Lin, V. S. Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5038-5044.
- [113] Lai, C.-Y.; Trewyn, B. G.; Jeftinija, D. M.; Jeftinija, K.; Xu, S.; Jeftinija, S.; Lin, V. S. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4451-4459.
- [114] Trewyn, B. G.; Nieweg, J. A.; Zhao, Y.; Lin, V. S. Y. *Chem. Eng. J.* **2008**, *137*, 23-29.
- [115] Slowing, I. I.; Trewyn, B. G.; Lin, V. S. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8845-8849.
- [116] Hench, L. L.; West, J. K. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 33-72.
- [117] Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E. *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26*, 62-69.
- [118] Liu, S.; Cool, P.; Collart, O.; Van Der Voort, P.; Vansant, E. F.; Lebedev, O. I.; Van Tendeloo, G.; Jiang, M. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 10405-10411.
- [119] Monrós, G.; Badenes, J. A.; Garcia, A.; Tena, M. Á. El color de la cerámica: nuevos mecanismos en pigmentos para los nuevos procesados de la industria cerámica. Universitat Jaume I: Castellón de la Plana, 2003.
- [120] Corma, A.; Diaz-Cabanas, M. J.; Moliner, M.; Rodriguez, G. *Chem. Commun.* **2006**, *43*, 3137-3139.
- [121] Botella, P.; Corma, A.; Quesada, M. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 6394-6401.
- [122] Corma, A.; Moliner, M.; Diaz-Cabanas, M. J.; Serna, P.; Femenia, B.; Primo, J.; Garcia, H. *New J. Chem.* **2008**, *32*, 1338-1345.
- [123] Jankiewicz, B. J.; Jamiola, D.; Choma, J.; Jaroniec, M. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2012**, *170*, 28-47.

- [124] Choma, J.; Dziura, A.; Jamiola, D.; Nyga, P.; Jaroniec, M. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects* **2011**, 373, 167-171.
- [125] Liz-Marzán, L. M.; Giersig, M.; Mulvaney, P. *Langmuir* **1996**, 12, 4329-4335.
- [126] Martin, T.; Galarneau, A.; Di Renzo, F.; Fajula, F.; Plee, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2590-2592.
- [127] Petitto, C.; Galarneau, A.; Driole, M.-F.; Chiche, B.; Alonso, B.; Di Renzo, F.; Fajula, F. *Chem. Mater.* **2005**, 17, 2120-2130.
- [128] Botella, P.; Corma, A.; Navarro, M. T. *Chem. Mater.* **2007**, 19, 1979-1983.
- [129] Botella, P.; Corma, A.; Navarro, M. T.; Quesada, M. *J. Mater. Chem.* **2009**, 19, 3168-3175.
- [130] Gerweck, L. E.; Seetharaman, K. *Cancer Res.* **1996**, 56, 1194-1198.
- [131] Ojugo, A. S. E.; McSheehy, P. M. J.; McIntyre, D. J. O.; McCoy, C.; Stubbs, M.; Leach, M. O.; Judson, I. R.; Griffiths, J. R. *NMR Biomed.* **1999**, 12, 495-504.
- [132] Yang, Q.; Wang, S.; Fan, P.; Wang, L.; Di, Y.; Lin, K.; Xiao, F.-S. *Chem. Mater.* **2005**, 17, 5999-6003.
- [133] Yagi, S.; Minami, N.; Fujita, J.; Hyodo, Y.; Nakazumi, H.; Yazawa, T.; Kami, T.; Hyder Ali, A. *Chem. Commun.* **2002**, 38, 2444-2445.
- [134] Liu, N.; Chen, Z.; Dunphy, D. R.; Jiang, Y.-B.; Assink, R. A.; Brinker, C. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 1731-1734.
- [135] Mal, N. K.; Fujiwara, M.; Tanaka, Y. *Nature* **2003**, 421, 350-353.
- [136] Mal, N. K.; Fujiwara, M.; Tanaka, Y.; Taguchi, T.; Matsukata, M. *Chem. Mater.* **2003**, 15, 3385-3394.
- [137] Botella, P.; Abasolo, I.; Fernández, Y.; Muniesa, C.; Miranda, S.; Quesada, M.; Ruiz, J.; Schwartz Jr, S.; Corma, A. *J. Control. Release* **2011**, 156, 246-257.
- [138] Bernardos, A.; Aznar, E.; Marcos, M. D.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Barat, J. M.; Amorós, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 5884-5887.
- [139] Coll, C.; Mondragón, L.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Marcos, M. D.; Soto, J.; Amorós, P.; Pérez-Payá, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 2138-2140.
- [140] Bernardos, A.; Mondragón, L.; Aznar, E.; Marcos, M. D.; Martínez-Máñez, R. n.; Sancenón, F. l.; Soto, J.; Barat, J. M.; Pérez-Payá, E.; Guillem, C.; Amorós, P. *ACS Nano* **2010**, 4, 6353-6368.
- [141] Corma, A.; Díaz, U.; Arrica, M.; Fernández, E.; Ortega, Í. *Angew. Chem.* **2009**, 121, 6365-6368.

- [142] Nel, A. E.; Madler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M. V.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M. *Nat Mater* **2009**, 8, 543-557.
- [143] Thomassen, L. C. J.; Aerts, A.; Rabolli, V.; Lison, D.; Gonzalez, L.; Kirsch-Volders, M.; Napierska, D.; Hoet, P. H.; Kirschhock, C. E. A.; Martens, J. A. *Langmuir* **2009**, 26, 328-335.
- [144] He, X.; Nie, H.; Wang, K.; Tan, W.; Wu, X.; Zhang, P. *Anal. Chem.* **2008**, 80, 9597-9603.
- [145] Burns, A. A.; Vider, J.; Ow, H.; Herz, E.; Penate-Medina, O.; Baumgart, M.; Larson, S. M.; Wiesner, U.; Bradbury, M. *Nano Lett.* **2008**, 9, 442-448.
- [146] M.M. Galagudza; D.V. Korolev; D.L. Sonin *Int. J. Nanomedicine* **2010**, 5, 231-237
- [147] Kumar, R.; Roy, I.; Ohulchanskyy, T. Y.; Vathy, L. A.; Bergey, E. J.; Sajjad, M.; Prasad, P. N. *ACS Nano* **2010**, 4, 699-708.
- [148] Yang, S. H.; Lee, K.-B.; Kong, B.; Kim, J.-H.; Kim, H.-S.; Choi, I. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 9160-9163.

Capítulo 2



Objetivos

2. Objetivos

Como se ha comentado, el uso de fármacos antineoplásicos como la camptotecina conlleva gran cantidad de inconvenientes, debido a su elevada toxicidad y carácter hidrófobo, lo que la hace insoluble en medio fisiológico. Sin embargo, la incorporación de este principio activo sobre una nanopartícula biocompatible y estable en medio fisiológico, permitiría su administración sistémica con mínimos efectos secundarios. En este sentido, las nanopartículas de sílice han demostrado gran robustez en fluidos fisiológicos, muy baja toxicidad incluso a dosis elevadas, y escasa acumulación en tejidos a medio plazo, pudiendo ser excretadas fundamentalmente por vías renal y hepática. Es por ello que, el objetivo primordial de la presente tesis es desarrollar modelos farmacológicos basados en nanopartículas de sílice y camptotecina, estables en el organismo y capaces de llevar a cabo la terapéutica anticancerígena con efectividad al menos equivalente a la del fármaco libre, pero suprimiendo los efectos secundarios asociados a su utilización vía sistémica. A tal fin se desarrollarán nanomateriales de sílice por técnicas sol-gel con diferente estructura y morfología, sobre los que se incorporará por enlace covalente la camptotecina. Los nanofármacos sintetizados deberán ser estables en medio biológico, evitando así posibles efectos tóxicos derivados de la degradación prematura del material. A su vez, el principio activo se liberará, única y exclusivamente, mediante aplicación de estímulos intracelulares, impidiendo de esta forma la liberación del fármaco en entornos extracelulares, lo que daría lugar a efectos indeseados. Asimismo, se validará la actividad antineoplásica de los diferentes nanofármacos en modelos *in vitro* e *in vivo*, con el fin de establecer su posible utilización en terapéutica del cáncer.

Para alcanzar este objetivo global, se plantean los siguientes objetivos científicos específicos:

1) Síntesis de nanofármacos basados en sílice y camptotecina: se prepararán diversos soportes inorgánicos (nanopartículas de sílice amorfa porosa, nanopartículas de sílice estructurada mesoporosa y nanopartículas híbridas de tipo *core-shell*) y se modificará su superficie con diversos grupos orgánicos que permitan el anclaje de la camptotecina por enlace covalente. Esta se incorporará en forma de un profármaco dotado con grupos funcionales sensibles a estímulos intracelulares. Para la realización del presente estudio se ha recurrido a dos tipos de sistemas:

- a. Sistemas sensibles a enzimas intracelulares, concretamente a carboxilasas, en los que la camptotecina se une al soporte inorgánico mediante enlace éster.
- b. Sistemas sensible a reductores intracelular, como el glutatión, en los que la camptotecina se une a la nanopartícula de sílice mediante un puente disulfuro.

En ambos casos, el resultado de la actividad intracelular sobre el nanofármaco permitirá la liberación de la forma activa de la camptotecina.

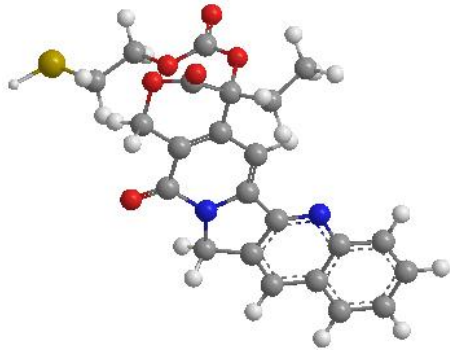
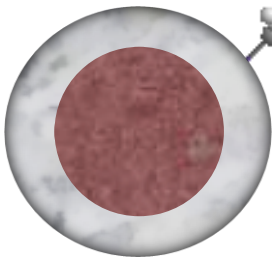
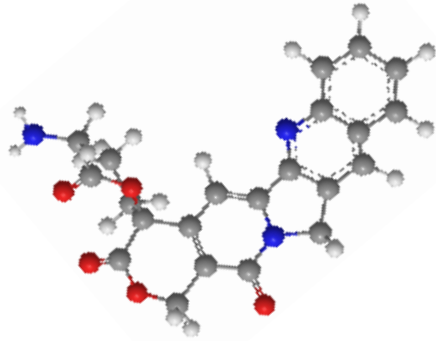
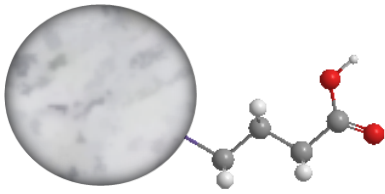
2) Determinación de la estabilidad de los nanofármacos y liberación de camptotecina: para valorar la estabilidad de los nanofármacos en medio biológico y el proceso de liberación del principio activo se llevarán a cabo ensayos en una solución fisiológica (PBS) y en suero humano, y se aplicarán diversos modelos cinéticos, estableciendo los parámetros físico-químicos que gobiernan la liberación del fármaco.

3) Evaluación de la citotoxicidad de los nanofármacos *in vitro*: se llevará a cabo mediante ensayos sobre diversas líneas celulares comerciales, comparado su actividad con la del fármaco libre.

4) Validación *in vivo* de los nuevos preparados farmacológicos: se estudiará la biodistribución, tolerabilidad y eficacia terapéutica en un modelo experimental de xenoinjerto de cáncer colorectal humano en ratón. Dada la complejidad de este estudio, se llevará sobre un tipo de nanofármaco seleccionado entre aquellos presenten mayor potencial terapéutico en base a los estudios *in vitro*.

Finalmente, como objetivo académico, mediante la realización de esta tesis y su presentación se pretende obtener el título de Doctor, bajo el programa de Química Orgánica en la industria químico-farmacéutica.

Capítulo 3



Procedimiento experimental

3. Procedimiento experimental

3.1. Materiales, líneas celulares y animales de laboratorio

3.1.1. Reactivos químicos

Todos los reactivos empleados presentaban un grado de pureza de síntesis o superior. Los reactivos utilizados en esta tesis para las distintas etapas de síntesis, ensayos de liberación y experimentos *in vivo-in vitro* han sido los siguientes:

(3-aminopropil)trietoxisilano (APTES) (Sigma-Aldrich)

(3-cianopropil)triclorosilano (Sigma-Aldrich)

4-(dimetilamino)piridina (DMAP) (Sigma-Aldrich)

2,2'-ditiodipiridina (Aldrithiol™) (Sigma-Aldrich)

1,4-fenilendiamina (Fluka)

1-hidroxibenzotriazol (HOBT) (Sigma-Aldrich)

4-mercapto-1-butanol (Sigma-Aldrich)

2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich)

2-mercaptopiridina (Sigma-Aldrich)

3-mercapto-1-propanol (Sigma-Aldrich)

(3-mercaptopropil)trimetoxisilano (Sigma-Aldrich)

1,3,5-trimetilbenzeno (TMB) (Sigma-Aldrich)

Ácido clorhídrico (HCl) (Sigma-Aldrich)

Ácido nítrico (Sigma-Aldrich)

Ácido sulfúrico (Sigma-Aldrich)

Ácido trifluoroacético (TFA) (Sigma-Aldrich)

Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) (Sigma-Aldrich)

(S)-(+)-Camptotecina (CPT) (Sigma-Aldrich)

Ciclohexano (Sigma-Aldrich)

Cloruro de metoxicarbonilsulfenilo (Sigma-Aldrich)

Cloruro sódico (Scharlab)

Disolución de hidróxido sódico 0,9999 N (Sigma-Aldrich)

Ditiotreitol (DTT) (Sigma-Aldrich)

Fluorocarbono (FC-4, Yick-Vik)

Hexanol (Sigma-Aldrich)

Hidróxido amónico 28-30 % (Sigma-Aldrich)

N-(dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida clorhidrato (EDCi) (Sigma-Aldrich)

N-(tertbutoxicarbonil)glicina (t-boc-glicina) (Fluka)

N,N'-diisopropilcarbodiimida (DPIC) (Sigma-Aldrich)

N,N'-diisopropiletilamina (DIPEA) (Sigma-Aldrich)

Nanopartículas de sílice amorfa 5-15 nm (SNP) (Sigma-Aldrich)

Peróxido de hidrógeno 30 % (p/p) (Sigma-Aldrich)

Pluronic F127 (Sigma-Aldrich)

Polietilenglicol MeO-PEG₄-mal (358 Dalton) (Iris Biotech)

Sulfato de magnesio anhidro (Scharlab)

Tampón fosfato salino (PBS) (Sigma-Aldrich)

Tetraetilortosilicato (TEOS) (Merk)

Trifosgeno (Sigma-Aldrich)

Triton X-100 (Sigma-Aldrich)

Triton X-114 (Sigma-Aldrich)

Disolventes

Acetonitrilo HPLC (Scharlab)

Agua Milli-Q (se obtiene mediante un equipo Milli-Q Academic equipado con un cartucho Quantum Ex de Millipore)

Ciclohexano (Sigma-Aldrich)

Diclorometano (DCM) anhidro (Sigma-Aldrich) tratado en un equipo SPS-800 (MBraun).

Dietil éter pureza para síntesis (Scharlab)

Dimetilsulfóxido (DMSO) HPLC (Scharlab)

Dimetilsulfóxido (DMSO) pureza para síntesis (Scharlab)

Etanol anhidro (Sigma-Aldrich)

Hexanol (Sigma-Aldrich)

Metanol HPLC (Scharlab)

Tolueno anhidro (Sigma-Aldrich) tratado en un equipo SPS-800 (MBraun).

Tolueno pureza para síntesis (Scharlab)

Ensayos *in vitro-in vivo*

Ácido tricloroacético (TCA) (Sigma-Aldrich)

Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich)

Butionina sulfoximina (BSO) (Sigma-Aldrich)

Geneticina (Invitrogen)

Isoflurano 3 % (Abbott)

Lipofectamina 2000 (Invitrogen)

Medio de cultivo DMEM (Lonza)

Medio de cultivo RPMI 1640 (Lonza)

Medio lisante Cellytic-MT™ (Sigma-Aldrich)

Preparado de penicilina/gentamicina (100 µg/ml) (Invitrogen)

Ratones atímicos desnudos Foxn1 (nu/nu) (Harlan)

Ribonucleasa A (RNase A) (Merk)

Suero bovino fetal (Lonza)

Suero humano (Sigma-Aldrich)

Tripsina-EDTA 0,25% (Sigma-Aldrich)

Vector pcDNA3.1 (Invitrogen)

Fluorocromos y compuestos para tinción celular

Azul Tripán (Sigma-Aldrich)

Cy 5.5 éster de N-hidroxisuccinimida (Cy5.5-NHS) (GE Healthcare)

Cy 5.5 maleimida (Cy5.5-MAL) (GE Healthcare)

DAPI (Vector Laboratories)

D-luciferina (Promega Biotech)

DRAQ5 (Biostatus)

Ioduro de propidio (Sigma-Aldrich)

Isotiocianato de tetrametil rodamina (TRIC) (Sigma-Aldrich)

Lysotracker Green (Invitrogen)

3.1.2. Líneas celulares

Se emplearon cinco líneas celulares diferentes: HeLa S3 (carcinoma de cérvix), U87MG (glioblastoma), HCT-116 (carcinoma de colon) y HT-29 (carcinoma de colon) de la colección americana de cultivos tipo (Rockville, Meriland). Las células HT-29.Fluc corresponden a una variante de la línea células HT-29 que sobreexpresa el gen luciferasa. Este gen permite la monitorización del crecimiento de tumor en experimentos *in vivo*. Esta línea celular modificada genéticamente fue proporcionada por el Dr.Simó Schwartz (Institut de Recerca del Hospital Vall d'Hebron VHIR). Se obtuvo

mediante la transfección del vector pc DNA3.1 que contiene el gen luciferasa usando lipofectamina 2000.

3.1.3. Medios de cultivos celulares

Se empleó medio de cultivo RPMI 1640 para HeLa, HCT-116 y HT-29. Por otro lado, las células U87-MG se cultivaron con medio DMEM. Los medios se enriquecieron con 9 % de suero bovino fetal y un 1 % de un preparado de penicilina/gentamicina (100 µg/ml) para evitar contaminación bacteriana. Las células HT-29 transfectadas se cultivaron en medio RPMI 1640 con 500 µg/ml de geneticina.

3.1.4. Animales de laboratorio

En los experimentos *in vivo* se emplearon hembras de ratones atímicos desnudos entre las 5 y 6 semanas de edad. Los animales se mantuvieron protegidos frente a agentes patógenos y se manipularon bajo el código de buenas prácticas de laboratorio del Hospital Universitari Vall d'Hebron. A su vez, el comité de ética para la experimentación animal de la institución aprobó los procedimientos experimentales.

3.2. Síntesis de nanofármacos de camptotecina

3.2.1. Sistemas de liberación sensibles a esterasas intracelulares

3.2.1.1. Síntesis del profármaco 20-O-trifluoroglicilcamptotecina (Gly-CPT·TFA)

En un matraz de 50 ml con un imán agitador se introdujeron 115 mg de t-boc-glicina (0,66 mmol). A continuación, se inyectaron 10 ml de DCM

anhidro. Se añadieron 80 μl de DPIC (0,52 mmol) y 50 mg de DMAP (0,41 mmol) y se mantuvo la disolución en agitación durante 30 min a 0 °C. Transcurrido ese tiempo se añadieron 160 mg de CPT (0,46 mmol) y se dejó alcanzar temperatura ambiente en agitación durante 16 h. A continuación se adicionaron otros 40 ml de DCM y se neutralizó empleando una disolución HCl 0,1 M. Seguidamente se lavó la muestra con salmuera. La fase orgánica se separó, se secó con sulfato de magnesio anhidro y se eliminó el disolvente a vacío, obteniendo un sólido blanco. Se disolvió en la mínima cantidad de metanol caliente y se mantuvo a 4 °C durante 72 h. El sólido, una vez recrystalizado se filtró y se añadieron 0,5 ml de DCM y 0,5 ml de TFA. Tras 30 min se eliminó el disolvente y el ácido a vacío, obteniendo un sólido blanco. Éste se disolvió en la mínima cantidad de metanol caliente, se añadieron dos volúmenes de dietiléter y se mantuvo a 4 °C. Transcurridas 24 h se filtró y se obtuvieron 145 mg de un sólido blanquecino (Gly-CPT·TFA) [1].

3.2.1.2. Síntesis de nanomateriales

Nanopartículas de sílice mesoporosa tipo MCM-41 (MSN)

En un matraz de un litro con imán agitador se introdujeron 476,5 ml de agua Milli-Q y 7 ml de una disolución 0,9999 N de NaOH. A continuación se añadió 1,00 g de CTAB y se dejó en agitación durante 10 min. Se comprobó el pH de la disolución, que debe situarse en torno a 12 unidades. Seguidamente, se calentó la disolución a 80 °C y se añadieron 5,0 ml de TEOS. Se obtuvo un gel con la siguiente composición molar (TEOS/CTAB/NaOH/H₂O 1:1,05:2,73:10492). Transcurridas dos horas el matraz se introdujo en un baño de hielo

durante 15 min antes de filtrar. El sólido se lavó con abundante agua y metanol. A continuación, el material se secó a 100 °C durante 16 h. La muestra se calcinó a 540 °C durante 7 h empleando un flujo de nitrógeno de 100 ml/min minuto durante la primera hora, seguido de un flujo de aire con el mismo caudal durante 6 h [2].

Nanopartículas de sílice mesoporosa de poro ultragrande (FSN)

En un matraz de 100 ml se añadieron 0,27 g de F127 y 0,7 g de FC-4, y se disolvieron con 30 ml de una disolución acuosa de HCl (0,02 M). A continuación se introdujeron 0,20 g de TMB. La mezcla se agitó a 15 °C durante 2 h. Seguidamente se añadieron 1,50 g de TEOS y la disolución se agitó durante 24 h entre 5 y 15 °C. Se formó un gel con la siguiente composición molar (TEOS/F127/TMB/FC-4/HCl/H₂O 1:0,0028:0,24:0,12:0,08:232). El precipitado y la disolución se situaron en un autoclave de teflón y se aplicó un tratamiento hidrotermal (100-150 °C) durante 24 h. El sólido obtenido se filtró y se lavó con abundante agua y metanol. La eliminación de los agentes directores de estructura se realizó empleado un método de digestión en microondas [3]. El sólido (0,4 g) se introdujo en un autoclave de teflón junto a 6 ml de ácido nítrico (15 M) y 4 ml de agua oxigenada 30 % (p/p). La mezcla se trató en un horno microondas MARS-5 a 800 W, 2245 MHz y 220 V. La temperatura máxima (150 °C) se mantuvo durante 2 min. El sólido se filtró y se lavó con abundante agua y metanol. Finalmente se secó a vacío y temperatura ambiente durante 16 h [4].

3.2.1.3. Incorporación de camptotecina a los nanomateriales

La CPT se incorporó en forma de Gly-CPT·TFA sobre nanopartículas funcionalizadas con grupos carboxilato mediante la formación de un enlace

amida. Este procedimiento se aplicó empleando un rango de concentraciones comprendido entre 25 y 500 $\mu\text{mol Gly-CPT}\cdot\text{TFA/g}$. A continuación se detalla el proceso utilizando una concentración de 250 $\mu\text{mol Gly-CPT}\cdot\text{TFA/g}$. Para ello, en un matraz de 100 ml con un imán agitador se introdujo 1,00 g de nanopartículas y se deshidrataron a 350 °C en vacío durante 3 h. A continuación, se inyectaron 10 ml de tolueno anhidro y se aumentó la temperatura del baño de silicona hasta alcanzar 120 °C. Seguidamente, se incluyeron 78 μL de (3-cianopropil)triclorsilano (0,50 mmol) y se mantuvieron estas condiciones durante 16 h. El sólido obtenido se filtró, se lavó con 50 ml de tolueno y 100 ml de metanol y se secó a vacío durante 16 h. Una vez seco, el sólido se dispersó en 150 ml de ácido sulfúrico 60 % (v/v) y se calentó a 150 °C durante 3 h. Posteriormente, se añadieron 200 ml de agua desionizada y el material se filtró, se lavó con 50 ml de tolueno y 100 ml de metanol y se secó a 60 °C a vacío durante 16 h.

Se introdujeron 500 mg de nanopartículas secas en un balón de fondo redondo con dos bocas y se inyectaron 10 ml de DCM. Se añadieron 122 mg de EDCi (0,64 mmol) y 130 mg de HOBT (0,96 mmol), se mantuvo a 0 °C en agitación. Transcurridos 30 min se adicionaron 65 mg de Gly-CPT·TFA (0,125 mmol) y 87 μL de DIPEA (0,50 mmol). La reacción se retiró del baño de hielo y se dejó alcanzar temperatura ambiente manteniendo la agitación durante 16 h. Transcurrido este tiempo se evaporó el disolvente a vacío (50 torr). El sólido obtenido se lavó con metanol y se centrifugó sucesivas veces hasta ausencia total de Gly-CPT·TFA en el sobrenadante (medido en el espectrofotómetro de UV-Vis, A_{368}), y se liofilizó a -55 °C durante 16 h.

Este procedimiento se aplicó para los materiales MSN y FSN, así como a nanopartículas de sílice amorfa comercial (SNP), con un diámetro

medio de partícula de 10 nm. Así, los materiales obtenidos tras la incorporación de los grupos carboxilato se denominan SNP-COOH, MSN-COOH y FSN-COOH, mientras que los correspondientes nanofármacos de CPT se designan como SNP-(CO)-CPT, MSN-(CO)-CPT y FSN-(CO)-CPT.

3.2.1.4. Funcionalización post-síntesis del nanofármaco

Este tipo de procedimiento se aplicó sobre el material SNP-(CO)-CPT con la finalidad de facilitar su estabilidad y localización en los estudios *in vitro* e *in vivo*. Para ello, se introdujeron 500 mg de nanopartículas secas en un balón de fondo redondo con dos bocas y se inyectaron 10 ml de DCM anhidro. Se adicionaron 109 mg de EDCi (0,57 mmol) y 117 mg de HOBT (0,87 mmol) y la reacción se mantuvo a 0 °C en agitación. Transcurridos 30 min se añadieron 4,7 mg de 1,4-fenilendiamina (0,043 mmol) y 3 µL de DIPEA (0,17 mmol). La reacción se retiró del baño de hielo y se dejó alcanzar temperatura ambiente manteniendo la agitación durante 16 h. Transcurrido este tiempo se evaporó el disolvente a vacío (50 torr). El sólido obtenido se lavó con metanol y se liofilizó a -55 °C durante 16 h.

Se introdujeron 100 mg de nanopartículas con 1,4-fenilediamina incorporada en un balón de fondo redondo con dos bocas y se inyectaron 10 ml de DCM. Se añadieron 200 µL de una disolución 1 mg/ml de Cy 5.5-NHS en DMSO, una punta de espátula de EDCi y 1 µL de TEA. La reacción se retiró del baño de hielo y se dejó alcanzar temperatura ambiente manteniendo la agitación durante 24 h. Transcurrido este tiempo se evaporó el disolvente a vacío (50 torr). El sólido se lavó con metanol y se liofilizó a -55 °C durante 16 h. El material así obtenido se denomina SNP-(CO)-Cy5.5.

3.2.2. Sistemas de liberación sensibles a reductores intracelulares

3.2.2.1. Síntesis de profármacos de la camptotecina

Síntesis del piridilditioetil carbonato de camptotecina

Se añadió 2-mercaptoetanol (500 μ L, 7,1 mmol), gota a gota, a una disolución de 2-Aldrithiol™ (2,35 g, 21,4 mmol) en metanol purgado con nitrógeno. La reacción se agitó durante 2 h y el disolvente se eliminó a presión reducida. El aceite amarillento obtenido se purificó por cromatografía en columna empleando una mezcla DCM/metanol (95:5, v/v) como eluyente. Se obtienen 1,25 g de 2-(piridin-2-ildisulfanil)etanol (rendimiento 80%, pureza 85%) [5].

Por otro lado, a una disolución de DMAP (225 mg, 1,8 mmol) y CPT (150 mg, 0,43 mmol) en 30 ml de DCM anhidro, se añadió trifosgeno (66 mg, 0,24 mmol) a temperatura ambiente. Tras 15 min, se añadió 2-(piridin-2-ildisulfanil)etanol (150 mg, 0,7 mmol). La disolución permaneció en agitación bajo atmósfera de argón durante 16 h. Posteriormente se lavó con agua. Seguidamente, la fase orgánica se deshidrató con salmuera y se secó empleando sulfato magnésico anhidro. El disolvente se eliminó a presión reducida. Se obtuvo un aceite amarillento que se disolvió en la mínima cantidad de metanol caliente y se guardó a 4 °C durante 48 h. Apareció un sólido de color blanquecino que se filtró y lavó con metanol. Se obtuvieron 165 mg de piridilditioetil carbonato de camptotecina (CPT-OCOO-C2-SS-Py) (rendimiento 65 %, pureza 95 %) [6].

Síntesis del piridilditiopropil carbonato de camptotecina

Se añadió 3-mercapto-1-propanol (620 μL , 7,1 mmol), gota a gota, a una disolución de 2-AldrithiolTM (2,35 g, 21,4 mmol) en metanol purgado con nitrógeno. La reacción se agitó durante 2 h y el disolvente se eliminó a presión reducida. El aceite amarillento obtenido se purificó por cromatografía en columna empleando una mezcla DCM/metanol (95:5, v/v) como eluyente. Se obtuvieron 0,93 g de 3-(piridin-2-ildisulfanil)propan-1-ol (rendimiento 64 %, pureza 99 %) [5].

Posteriormente, a una disolución de DMAP (225 mg, 1,8 mmol) y CPT (150 mg, 0,43 mmol) en 30 ml de DCM anhidro, se añadió trifosgeno (66 mg, 0,24 mmol) a 0 °C. Transcurridos 15 min se adicionó 3-(piridin-2-ildisulfanil)propan-1-ol (140 mg, 0,7 mmol). La disolución permaneció en agitación bajo atmósfera de argón durante 16 h a 0 °C. Seguidamente se lavó con agua. Más tarde, la fase orgánica se deshidrató con salmuera y se secó empleando sulfato magnésico anhidro. El disolvente se eliminó a presión reducida. Se obtuvo un aceite amarillento que se disolvió en la mínima cantidad de metanol caliente y se guardó a 4 °C durante 48 h. Precipitó un sólido de color blanquecino que se filtró y lavó con metanol. Se obtuvieron 98 mg de piridilditiopropil carbonato de camptotecina (CPT-OCOO-C3-SS-Py) (rendimiento 44 %, pureza 90 %).

Síntesis del piridilditiobutil carbonato de camptotecina

Se añadió 4-mercapto-1-butanol (720 μL , 7,1 mmol), gota a gota, a una disolución de 2-AldrithiolTM (2,35 g, 21,4 mmol) en metanol purgado con nitrógeno. La reacción se agitó durante 2 h y el disolvente se eliminó a presión reducida. El aceite amarillento obtenido se purificó por cromatografía en columna empleando una mezcla DCM/metanol (95:5, v/v)

como eluyente. Se obtuvieron 1.27 g de 4-(piridin-2-ildisulfanil)butan-1-ol (83 % rendimiento, 93 % pureza) [5].

Seguidamente, a una disolución de DMAP (225 mg, 1,8 mmol) y CPT (150 mg, 0,43 mmol) en 30 ml de DCM anhidro, se añadió trifosgeno (66 mg, 0,24 mmol) a 0 °C. Transcurridos 15 min se adicionó 4-(piridin-2-ildisulfanil)butan-1-ol (162 mg, 0,7 mmol). La disolución permaneció en agitación bajo atmósfera de argón durante 5 h a 0 °C. Posteriormente se lavó con agua. A continuación, la fase orgánica se deshidrató con salmuera y se secó empleando sulfato magnésico anhidro. El disolvente se eliminó a presión reducida y se obtuvieron 275 mg de piridilditiobutil carbonato de camptotecina (CPT-OCOO-C4-SS-Py) (rendimiento 85%, pureza 83%).

3.2.2.2. Síntesis de nanomateriales

Se disolvieron 20 mg de TRIC en 3 ml de etanol anhidro agitando bajo atmósfera de nitrógeno. Más tarde se inyectaron 425 µL de APTES gota a gota. La reacción se dejó en agitación durante 24 h protegida de la luz. Se obtuvo el conjugado de (3-aminopropil)trietoxiisotiocianato de tetrametilrodamina (APTES-TRIC).

Por otro lado, en un matraz de 500 ml se añadieron 53 ml de triton X-100, 54 ml de hexanol y 225 ml de ciclohexano. A la mezcla en agitación se adicionaron 2 ml de una disolución de APTES-TRIC (7 mg/ml) mezclados con 15 ml de agua y 3 ml de hidróxido amónico 28-30 %. Pasados 30 min se adicionaron 3 ml de TEOS, y se agitó durante 24 h a temperatura ambiente (la composición molar de gel es: TEOS/APTES-TRIC/H₂O/NH₄OH/ triton X-100/ciclohexano/hexanol 1:0,003:62:5,7:5,8:155:31,8). La suspensión así formada se centrifugó a 16000 g durante 30 min y se lavó con abundante agua y etanol. Se obtuvieron 200 mg de nanopartículas de sílice amorfa

dopadas con rodamina B (RhB-SiO₂), que se suspendieron en 3 ml de agua Milli Q. A continuación, se añadió la suspensión de núcleos RhB-SiO₂ sobre 100 ml de una disolución 8 mM de CTAB y 1 ml de una disolución NaOH 0,1 M. Seguidamente se adicionaron 0,9 ml de una disolución etanólica de TEOS (20 % v/v), en fracciones de 0,3 ml cada 30 min. La composición molar del gel es: TEOS/CTAB/NaOH/H₂O/EtOH 1:0,73:0,12:7321:15,4. La reacción se mantuvo a 60 °C durante 2 h. Se obtuvieron 390 mg de nanopartículas con estructura *core-shell* compuestas por un núcleo de sílice amorfa dopado con rodamina B y una cubierta de sílice mesoporosa, que se denominan RhB-SiO₂@MSN.

Posteriormente, se introdujeron 335 mg de RhB-SiO₂@MSN en un matraz de fondo redondo. El material se secó a vacío calentando a 100 °C durante 10 h. A continuación se inyectaron 10 ml de tolueno anhidro. El matraz se acopló a un reflujo con atmósfera inerte, calentando a 120 °C con agitación. Más tarde se adicionaron 625 µL de (3-mercaptopropil)trimetoxisilano (3,35 mmol). Tras 16 h la suspensión se filtró y el sólido se lavó con abundante tolueno y metanol. El material obtenido se liofilizó. Se obtuvieron 320 mg de nanopartículas de tipo RhB-SiO₂@MSN funcionalizadas con grupos tiol, que se denominan RhB-SiO₂@MSN-SH.

3.2.2.3. Incorporación de la camptotecina a los nanomateriales

Se introdujeron 100 mg de nanopartículas RhB-SiO₂@MSN-SH en 10 ml de una disolución 100 mM de DTT en PBS y se mantuvo en agitación durante 30 min. Seguidamente se centrifugó (6200 g, 10 min) y se lavó con metanol. A continuación, se añadieron sobre 3,3 ml de una disolución 10 mg/ml del fármaco en DMSO y se adicionaron 16 ml de metanol. Se dejó en agitación durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugó

(6200 g, 10 min) lavando con metanol y centrifugando sucesivas veces hasta ausencia total de profármaco en el sobrenadante (medido en el espectrofotómetro UV-Vis, A_{368}), y se liofilizó a $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 16 h. Se obtuvieron 68-94 mg del nanofármaco. En la tabla inferior se recogen los diferentes nombres empleados para designar a los diversos profármacos y nanofármacos sintetizados.

Tabla 3.1. Relación de los diferentes profármacos y nanofármacos sintetizados.

Profármaco	Nanomaterial	Nanofármaco
CPT-OCOO-C2-SS-Py	RhB-SiO ₂ @MSN-SH	RhB-SiO ₂ @MSN-SS-C2-CPT
CPT-OCOO-C3-SS-Py	RhB-SiO ₂ @MSN-SH	RhB-SiO ₂ @MSN-SS-C3-CPT
CPT-OCOO-C4-SS-Py	RhB-SiO ₂ @MSN-SH	RhB-SiO ₂ @MSN-SS-C4-CPT

3.2.2.4. Funcionalización postsíntesis del nanofármaco

Se suspendieron 50 mg de material sintetizado en el apartado anterior en 20 ml de PBS y continuación se disolvieron 15 mg de MeO-PEG₄-mal (358 Da). Se agitó a temperatura ambiente durante 2 h en ausencia de luz. A continuación, se centrifugó (6200 g, 10 min). El sólido aislado se lavó con PBS y liofilizó a $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 16 h [7].

3.3. Técnicas de caracterización de profármacos y nanomateriales

3.3.1. Técnicas espectroscópicas

3.3.1.1. Difracción de rayos X (DRX)

Los rayos X tienen longitudes de onda similares a las distancias interatómicas de los átomos situados en redes cristalinas. Al irradiar una

muestra cristalina en polvo, los rayos se difractan con ángulos que dependen de las distancias interatómicas. Mediante la aplicación de la Ley de Bragg:

$$n\lambda = 2d \cdot \text{sen}\theta$$

Donde n es un número entero, λ es la longitud de onda de los rayos X y θ es el ángulo entre los rayos incidentes y los planos de dispersión.

Así, mediante esta fórmula se obtiene la distancia entre los planos interatómicos (d) que producen la difracción, permitiendo obtener información sobre la estructura del material irradiado [8].

Esta técnica se empleó para confirmar la estructura de los materiales sintetizados. El equipo utilizado fue un difractómetro Philips X'pert-PW-3719, efectuando barridos desde valores de 2θ de $0,7^\circ$ hasta 70° .

3.3.1.2. Espectroscopia infrarroja (FTIR)

Las vibraciones y rotaciones moleculares se pueden producir por la absorción de radiación en la región del infrarrojo del espectro electromagnético. En este caso las rotaciones y vibraciones moleculares se miden directamente como absorción en el espectro de infrarrojo empleando un espectrofotómetro de transformada de Fourier. El principio básico es el registro simultáneo de todas las frecuencias del espectro IR por parte del detector. Se consigue si la luz policromática de la fuente luminosa IR, con la misma intensidad y banda de frecuencias, se transforma en todo momento por medio de un interferómetro, en un interferograma, que no es una función de la frecuencia, sino del tiempo. Después del paso de la radiación a través de la muestra, se convierte el interferograma en un espectro mediante una operación matemática, la transformación de Fourier [9].

Los espectros se obtuvieron empleando el equipo Nicolet IS10 (Thermo Scientific). El registro se obtuvo a partir de muestras en estado sólido empleando pastillas de KBr.

3.3.1.3. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)

Los experimentos de resonancia magnética nuclear se basan en la aplicación de un campo magnético externo sobre la muestra de estudio. En condiciones de equilibrio térmico, los núcleos atómicos se ajustan a una distribución de Boltzmann.

$$\Delta E = \gamma \frac{h}{2\pi} B_o$$

Donde γ es la constante giromagnética y B_o es el campo magnético aplicado.

Puesto que su diferencia de energía es muy pequeña comparada con la energía térmica media, el estado de menor contenido energético estará ligeramente más poblado que el de mayor energía. Para la relación entre las dos poblaciones se cumple que:

$$\frac{N_{(m=-\frac{1}{2})}}{N_{(m=+\frac{1}{2})}} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}}$$

La irradiación con una energía cuantizada de valor igual a ΔE , conduce a la inversión de espín. Como condición de resonancia se obtiene la relación:

$$h\nu = \Delta E = \gamma \frac{h}{2\pi} B_o$$

Cuando se cumple la condición de resonancia, la diferencia de ocupación de ambos niveles nucleares Zeeman se equilibra rápidamente a través de la absorción. Se dice que el sistema se satura cuando el proceso inverso, la relajación no tiene lugar con la extensión suficiente [10].

RMN de líquidos (^1H , ^{13}C)

Las medidas de RMN de líquidos se realizaron en un equipo Bruker AV300 UltrashieldTM de 300 MHz. Se emplearon secuencias de pulso simple de 15 μs transcurriendo 1 s entre pulsos para la adquisición de espectros de ^1H .

Para los experimentos de ^{13}C se emplearon pulsos con desacoplamiento de protón. La duración del pulso es de 9 μs , con un tiempo entre pulsos de 2 s. Para ambos experimentos la referencia de desplazamiento es el tetrametilsilano (TMS).

RMN de sólidos (^{13}C , ^{29}Si)

En el caso de los sólidos los experimentos se realizaron aplicando la técnica de giro con ángulo mágico (MAS), procedente del inglés *magic angle spinning*. Mediante este método, el rotor que contiene la muestra y el campo aplicado forman un ángulo de $54^{\circ}44'$, minimizando la influencia de las interacciones anisotrópicas que dependen del término $(3 \cos^2 \theta - 1)$. Sin embargo, no siempre se pueden eliminar estas interacciones, bien por su magnitud o bien porque no dependen únicamente de ese término, lo que obliga a emplear altas velocidades de giro, encontrando limitaciones técnicas en el rotor. Esta técnica permite obtener bandas más estrechas [11].

Para ambos experimentos se empleó un espectrómetro Bruker AV 400. El espectro RMN-MAS se obtuvo a temperatura ambiente empleando una sonda Bruker BL-7 de 7 mm a 5 kHz.

El espectro de ^{29}Si se obtuvo aplicando pulsos de 3,5 μs que corresponden a un ángulo pulso de $3\pi/4$ rad y un tiempo entre pulsos de 240 s, empleando TMS como referencia.

Los espectros de polarización cruzada de ^1H a ^{13}C se adquieren aplicando pulsos de 90° a ^1H durante 5 μs , con un tiempo de contacto de 5 ms y un tiempo entre pulsos de 3s, empleando adamantano como referencia.

3.3.1.4. Espectroscopia de ultravioleta-visible (UV-vis)

Este tipo de espectros suelen abarcar longitudes de onda desde 200 a 800 nm. Esta técnica ofrece información sobre la diferencia de energía entre los orbitales frontera: HOMO y LUMO. Si se irradia una muestra con la frecuencia adecuada, esta puede absorber la energía y pasar desde un estado fundamental Ψ_0 a un estado energético excitado Ψ_1 [12].

$$\Delta E = E(\Psi_1) - E(\Psi_0) = h\nu$$

En las medidas de reflectancia difusa se emplea la fracción de radiación incidente que es reflejada en todas direcciones por la muestra. Mediante el uso de una esfera integradora (esfera hueca cuyo interior está recubierto de un material altamente reflectante) la luz reflejada por la muestra llega al detector. El espectro resultante se obtiene en unidades de reflectancia (R) en tanto por cien. Normalmente se toma como referencia BaSO_4 , que no absorbe en todo el intervalo indicado. El espectro se obtiene

representando la función Kubelka-Munk $F(R)$ frente a la longitud de onda [13]:

$$F(R) = \frac{(1 - R)^2}{2R}$$

Al contrario de lo que ocurre en disoluciones este espectro no guarda una relación numérica directa entre la intensidad de la banda y la concentración.

Los espectros de absorción de los materiales y nanofármacos sintetizados se realizaron con un espectrofotómetro Varian Cary 5000 UV-vis NIR.

3.3.1.5. Espectroscopia de fluorescencia

Al irradiar una muestra con la frecuencia adecuada, esta puede absorber la energía y pasar desde un estado fundamental Ψ_0 a un estado energético excitado Ψ_1 [12].

$$\Delta E = E(\Psi_1) - E(\Psi_0) = h\nu$$

El paso del estado excitado Ψ_1 al estado fundamental Ψ_0 se puede producir de dos modos diferentes. El sistema puede volver a estado fundamental Ψ_0 mediante procesos radiantes como la fluorescencia o fosforescencia, o bien puede producirse una desactivación no radiante a través de mecanismos de conversión interna o de cruce intersistemas. La emisión de radiación denominada fluorescencia se produce cuando un estado excitado S_1 y en casos contados, a partir de estados singletes más altos S_n , se retorna al estado fundamental S_0 .

Las medidas de fluorescencia en sólidos se realizaron con los siguientes equipos: lamp power supply LPS-200B, arc lamp housing A1010B y photomultiplier detection system 814, todos ellos de PTI (Photon Technology International). Se emplearon cubetas de un milímetro de paso (Starna Scientific) formando un ángulo de 45° frente a la fuente de emisión y otros 45° respecto al sistema de detección.

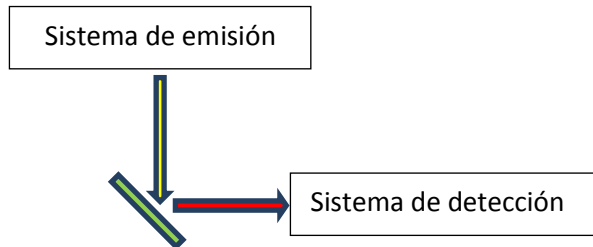


Figura 3.1. Esquema de disposición de la cubeta en el fluorímetro.

Para obtener la señal de emisión de muestras con CPT el material se irradió a 320 nm, registrando la emisión entre 350 y 600 nm. En el caso de muestras con Cy5.5 se irradió a 650 nm y se registra el espectro de emisión desde 690 hasta 750 nm. Por último, para la rodamina B, la muestra se excitó a 400 nm, registrando el espectro de emisión entre 420 y 900 nm.

3.3.2. Análisis textural

La determinación del área superficial se ha llevado a cabo mediante adsorción-desorción de nitrógeno empleando el método de Brunauer, Emmet y Teller (BET). Para el mismo se plantean las siguientes hipótesis: todos los centros de adsorción de la superficie son equivalentes, la capacidad de adsorción de un centro no depende del grado de ocupación de los centros vecinos y sobre cada centro pueden adsorberse varias capas de moléculas, siendo el calor de absorción para todas ellas equivalentes

excepto para la primera [14]. Asimismo, mediante el procedimiento descrito por Barrett, Joyner y Halenda (BJH) [15] se obtuvo el volumen de poro y su distribución. Por último, se aplicó la teoría de Kruk, Janoriec y Sayari (KJS) [16-17] para calcular el diámetro de poro.

Las medidas de adsorción-desorción de nitrógeno se realizaron a -195 °C empleando un equipo Micrometrics ASAP 2000. Las muestras se deshidrataron previamente calentando a 150 °C en vacío.

3.3.3. Microscopía electrónica (TEM)

En el microscopio electrónico de transmisión (TEM) un haz de electrones precisamente enfocado proveniente de un cañón de electrones atraviesa la muestra. El haz de electrones se enfoca sobre un área pequeña de la muestra mediante un condensador electromagnético, que dirige dicho haz en una línea recta para iluminar la muestra. El microscopio electrónico posee lentes electromagnéticas para controlar la intensidad del haz de electrones, el enfoque y los aumentos. El haz atraviesa primero la muestra y después las lentes electromagnéticas del objetivo, que enfocan los electrones sobre una pantalla fluorescente o una placa fotográfica. La imagen final aparece en forma de zonas claras y zonas oscuras, dependiendo de la cantidad de electrones absorbidos por las diferentes zonas de la muestra [18].

Para poder medir las muestras en el equipo se aplicó el siguiente protocolo: una pequeña cantidad de sólido se suspendió en un volumen aproximado de 3 ml de etanol con ayuda de un baño de ultrasonidos. Seguidamente, se colocaron dos gotas de esa suspensión sobre una malla de cobre de 300 rejillas recubierta de un film de carbono. Por último, el

disolvente se eliminó a temperatura ambiente con la ayuda de un extractor. Las muestras se midieron en un equipo Philips CM10 100 kV.

3.3.4. Dispersión de luz dinámica (DLS)

La dispersión de luz dinámica, también conocida como espectroscopia de correlación fotónica, es una de las técnicas más empleadas para medir el tamaño de partícula. Este método presenta varias ventajas: en primer lugar el tiempo de medición es corto, los equipos son simples de manejar y es posible un alto grado de automatización de los equipos. Además el coste del equipo es moderado.

Cuando la suspensión de partículas se ilumina con un láser, la intensidad de la luz dispersada fluctúa de forma dependiente con el tamaño de partícula. En el caso de las nanopartículas de menor tamaño sus desplazamientos son de mayor magnitud y se mueven con mayor velocidad.

Al realizar una medida se asumen dos hipótesis. En primer lugar las partículas presentan movimiento Browniano. Este tipo de movimiento aleatorio se produce cuando las moléculas de disolvente están en movimiento debido a su propia energía térmica y colisionan contra las partículas en suspensión. De este modo se conoce la función de densidad de probabilidad:

$$P(r, t|0,0) = (4 \pi Dt)^{-3/2} e^{-\frac{r^2}{4Dt}}$$

Dónde D es la constante de difusión.

La segunda hipótesis es que las partículas a medir son esféricas y de diámetro pequeño. De este modo es posible aplicar la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{K_B T}{6 \pi \eta a}$$

Siendo K_B la constante de Boltzman, T la temperatura en grados kelvin, η la viscosidad del disolvente y a el radio de la partícula. Como a partir de la dispersión de la luz incidente sobre las partículas se obtiene información acerca de la posición de las partículas, mediante las fórmulas descritas es posible calcular el radio de la partícula [19-20].

El tamaño de partícula se midió empleando un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). Las muestras se prepararon suspendiendo el material en una disolución acuosa de triton x-114 0,021 % (p/p) alcanzando una concentración de 5 ppm. Las partículas se dispersaron introduciendo la suspensión (5 min, 40 kHz) en un baño de ultrasonidos (1510-MT Branson). Las medidas de dispersión de luz dinámica se llevaron a cabo a 25 °C aplicando un ángulo de dispersión de 173 °. El radio hidrodinámico medio se determinó por medidas acumulativas.

3.3.5. Análisis elemental

El contenido en nitrógeno, carbono, hidrógeno y azufre se determina empleando un equipo de análisis Carlo Erba 1106. Esta técnica está basada en la completa e instantánea oxidación de la muestra con O_2 (g) puro a una temperatura de 1000 °C. Los diferentes productos de combustión son transportados con el gas portador (He), a través del sistema, donde son separados por columnas específicas y desorbidos térmicamente. De este modo los gases formados en la combustión pasan de forma separada por un detector de conductividad térmica que genera una señal proporcional a la concentración de cada uno de los componentes individuales de la mezcla.

3.4. Ensayos de liberación de fármacos

3.4.1. Modelo experimental

Para realizar estudios de liberación de fármacos a partir de los materiales en medio acuoso se siguió el siguiente procedimiento. Se pesaron alrededor de 5 mg de material en una microbalanza M2P (Sartorius) con una precisión de 0,001 mg. Se añadió la disolución acuosa indicada en cada caso sobre el material y se agitó empleando un agitador mvor-01 (vortex) durante unos segundos. A continuación se situaron los viales en un agitador Themomixer Confort (Eppendorf) (37 °C, 1350 rpm). Transcurrido el tiempo indicado en cada caso, los viales se centrifugaron (6200 g, 10 min). El sobrenadante se reservó y el sólido se lavó con un mililitro de metanol. Tras centrifugar el metanol se añadió al sobrenadante anterior y se liofilizó. El sólido obtenido se reconstituyó con 1 ml de una mezcla metanol:HCl 95:5 (v/v), se filtró (0,2 µm, Nylon) y se analizó por cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC).

3.4.1.1. Liberación en medio alcalino

Se aplicó el procedimiento explicado anteriormente. Se utilizaron disoluciones acuosas de hidróxido sódico con un pH de 10,12 y 13 unidades obtenidas a partir de una disolución de hidróxido sódico 0,9999 N. Se monitorizó el pH del medio con un pH metro Seven Easy (Mettler-Toledo).

3.4.1.2. Liberación en medio reductor

En este caso se aplicaron dos procedimientos distintos. En el primer caso se aplicó el modelo experimental descrito en el apartado 3.4.1, utilizando una disolución de DTT (100 mM) en PBS, que se adicionó sobre

la muestra. Este es el método empleado para calcular la cantidad máxima liberada por un material.

El segundo protocolo se aplicó en los experimentos destinados a obtener la cinética de liberación del fármaco a partir del material. En este caso se pesaron alrededor de 5 mg de material en una microbalanza con precisión de 0,001 mg. Se añadió 1 ml de PBS sobre el material y se agitó empleando un agitador mvor-01 (vortex) durante unos segundos. A continuación se dispusieron los viales en un agitador Themomixer Confort (37 °C, 1350 rpm). Transcurridas dos horas, se añadieron 15,4 mg de DTT sólido formando una disolución 100 mM de agente reductor. Las muestras se colectaron a diferentes tiempos y se centrifugaron (6200 g, 10 min). El sobrenadante se reservó y el sólido se lavó con 1 ml de metanol. Tras centrifugar, el metanol se añadió al sobrenadante anterior y se liofilizó. El sólido obtenido se reconstituyó con 1 ml de una mezcla metanol:HCl 95:5 (v/v), se filtró (0,2 µm, Nylon) y se analizó por RP-HPLC.

3.4.2. Ensayo de estabilidad en suero humano

Se pesaron alrededor de 5 mg de material con una precisión de 0,001 mg. Se añadió 1 ml de suero humano y se agitó empleando un agitador mvor-01 (vortex) durante unos segundos. A continuación se situaron los viales en un agitador Themomixer Confort (Eppendorf) (37 °C, 1350 rpm). Transcurrido el tiempo indicado en cada caso, los viales se centrifugaron (6200 g, 10 min). El suero se trasvasó a otro vial y se añadieron 500 µl de una disolución acuosa de TCA al 5 % enfriada a 4 °C. Mediante centrifugación (6200 g, 10 min) se separó el sobrenadante de las proteínas precipitadas. Cuidadosamente se colectó el sobrenadante y se liofilizó. El

sólido obtenido se reconstituyó con 1 ml de una mezcla metanol:HCl 95:5 (v/v), se filtró (0,2 μm , Nylon) y se analizó por RP-HPLC.

3.4.3. Modelos cinéticos de liberación

Los modelos cinéticos de liberación se pueden emplear como indicativo del comportamiento de la forma farmacéutica *in vivo*. Así pues, se puede obtener una correlación *in vivo-in vitro* aplicando modelos matemáticos predictivos para describir la relación entre una propiedad *in vitro* de la forma farmacéutica y la respuesta *in vivo*.

Cinética de primer orden

En este modelo la velocidad de liberación es proporcional a la cantidad de fármaco remanente en la forma farmacéutica, disminuyendo con el transcurso del tiempo. La superficie del fármaco se considera variable a lo largo del proceso de disolución, en función de la cantidad de fármaco remanente sin disolver [21].

$$X = 1 - e^{-kt}$$

Higuchi

Es un modelo de liberación controlada por difusión desde matrices homogéneas y granulares. Se asume que el mecanismo de liberación depende de la difusión a través de la matriz granular.

$$X = \sqrt{\frac{D\epsilon}{\tau} (2A - \epsilon C_s) C_s t}$$

Donde X es la cantidad de fármaco liberado a lo largo de un tiempo t por unidad de área expuesta, D es la difusividad de la droga en el fluido, τ es la tortuosidad del sistema, A es la cantidad total de fármaco por unidad de volumen, C_s es la solubilidad del fármaco en el fluido y ϵ es la porosidad de la matriz. Asumiendo constantes todos los valores en el interior de la raíz. Estos se agrupan en una única constante K_H obteniendo la siguiente ecuación [22-24]:

$$X = K_H \cdot t^{0,5}$$

Este modelo se basa en una serie de suposiciones que se enumeran a continuación: en primer lugar la cantidad de fármaco presente en la formulación debe ser elevada respecto a la solubilidad del fármaco en el disolvente empleado. Además, la difusión del fármaco a través de la matriz se considera unidimensional y constante. Al contrario que en la cinética de primer orden, la deformación o disolución del soporte se considera despreciable, manteniendo una superficie constante. Por último, el ensayo de liberación debe realizarse en condiciones de mínima concentración (*sink*), de modo que la concentración del fármaco en el fluido de la disolución no rebase nunca el 20% de su concentración de saturación [25].

Bhaskar

Este modelo se aplica con éxito en liberación de fármacos a partir de resinas. La liberación del fármaco está regida por la difusión [26-27].

$$X = 1 - e^{-kt^{0,65}}$$

Donde X es el porcentaje de fármaco liberado y t es el tiempo.

Ritger-Peppas

Esta ecuación se aplica en sistemas poliméricos con proceso de hinchamiento. El valor de n indica el mecanismo de liberación y depende de la geometría del sistema. Para valores de n inferiores a 0,45 la liberación del fármaco está gobernada por mecanismos de difusión. En el caso de valores entre 0,45 y 0,89 la liberación está gobernada por dos factores, la difusión y la disolución del polímero. Para valores cercanos a la unidad, la liberación del fármaco depende únicamente de la disolución del polímero [28-31].

$$X = K \cdot t^n$$

3.4.4. Análisis de productos

3.4.4.1. Espectroscopia de ultravioleta-visible (UV-vis)

Las medidas de UV-vis se obtuvieron con un espectrofotómetro ND-1000 (Nanodrop), aplicando una gota de la disolución sobre el lector y midiendo la absorbancia a 368 nm (A_{368}). Esta longitud de onda corresponde a la absorbancia máxima de la CPT.

3.4.4.2. Cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC)

La técnica RP-HPLC se empleó tanto para caracterizar los profármacos de CPT sintetizados así como para cuantificar la cantidad de CPT en los estudios de liberación en medio acuoso y muestras biológicas [32-34]. Los análisis se realizaron empleando un equipo LC 1220 Affinity con un detector de fluorescencia acoplado 1260 Affinity (Agilent technologies). La

columna seleccionada es Mediterranea Sea 18 (3 μm , 10x0,21 cm) con pre-columna Ultraguard Sea 18 (10x3,2 mm) (Teknokroma). El flujo empleado es de 0,45 ml/min acetonitrilo/H₂O-TFA (50:50) pH 4,5. Se fijó la medida de absorbancia a 368 nm, correspondiente al máximo de absorbancia de la CPT. En los casos en los que la medida se realiza mediante emisión de fluorescencia, la longitud de onda de emisión elegida es 420 nm. Los disolventes empleados son de pureza HPLC Multisolvant (Scharlab).

Se realizaron diferentes calibrados dependiendo de la naturaleza de la muestra de análisis:

Calibrado de CPT empleando detección UV-Vis

Se utilizó para la cuantificación de CPT en los diferentes ensayos de liberación y estabilidad de los materiales en medio acuoso. El rango de concentraciones del calibrado es [10-300] μmolar . Se obtuvo la siguiente recta de regresión:

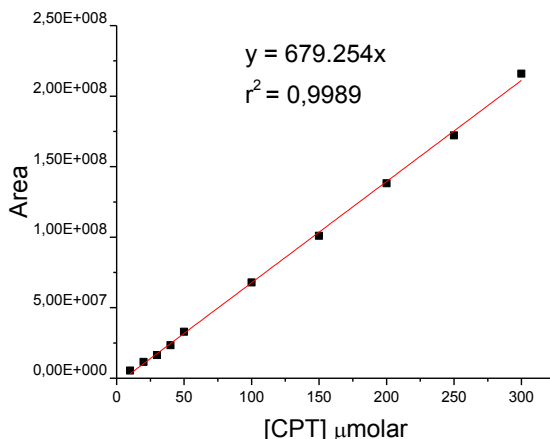


Figura 3.2. Recta de calibrado (UV-vis).

Calibrado de CPT empleando detección de fluorescencia

Se empleó en el análisis cuantitativo de CPT en muestras de suero humano y en aquellas procedentes de los ensayos de biodistribución y eficacia terapéutica. El rango de concentraciones se sitúa entre [100-2000] nmolar. Se obtuvo la siguiente recta de regresión:

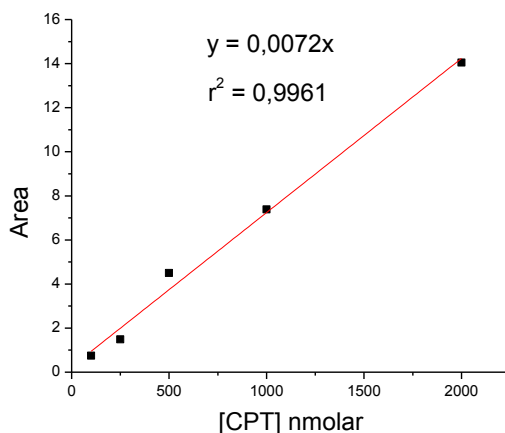


Figura 3.3. Recta de calibrado (fluorescencia).

3.4.4.3. Espectrometría de masas (HPLC-MS)

Se emplearon dos equipos HPLC-MS para el análisis de los productos. En primer lugar se empleó un cromatógrafo acoplado a un detector de masas con ionización por impacto electrónico (EI) 1100 VL Series LC/MSD (Agilent Technologies). La columna seleccionada es Mediterranea Sea 18 (5 μ m, 25x0,46 cm) con pre-columna Ultraguard Sea 18 (10x3,2 mm) (Teknokroma). El flujo empleado es de 0,8 ml/min acetonitrilo/H₂O-TFA (50:50) Abs₃₆₈.

Por otro lado, se utilizó un equipo UPLC Waters acoplado a detector Xevo Qtof MS empleando ESI (Ionización por electroespray). La columna empleada es Aquity UPLC BEH C₁₈ (1,7 μ m, 2,1x50 cm). Los eluyentes elegidos son agua/acetonitrilo acidificado 0,1% (ácido acético) (50:50) con

un flujo 0,5 ml/min. Los disolventes son de pureza LC/MS Optima (Fisher). Los resultados se analizan con el programa Intelli Start (Waters).

3.5. Estudios en cultivos celulares

Los estudios en cultivos celulares se llevaron a cabo en colaboración con el Institut de Recerca del Hospital Vall d'Hebron, bajo la supervisión del Dr. Simó Schwartz y la Dra. Ibane Abasolo, y con el Instituto de Investigación “Dr. Viña Giner” de la Universidad Católica de Valencia (UCV), bajo la supervisión de los Profesores José Hernández-Yago y José Rafael Blesa.

3.5.1. Protocolo de trabajo con cultivos celulares

Las células se cultivaron en el medio correspondiente para cada tipo celular en placas de cultivo Petaka (Celartia) o bien en placas Petri de 15 cm de diámetro. Los cultivos celulares se mantuvieron en estufa a 37 °C con una mezcla 95 % aire y 5 % CO₂.

La recolección de las células se efectuó del siguiente modo: en primer lugar se retiró el medio de cultivo lavando con PBS estéril. Seguidamente, se añadieron 2 ml de tripsina con EDTA 0,25% y se dejó en estufa a 37 °C. Transcurridos 5 minutos se añadieron 10 ml de medio de cultivo y se centrifugó (500 g, 5 min). Se eliminó el sobrenadante y se añadieron otros 10 ml de medio de cultivo.

A continuación, se procedió al recuento de células. Para ello se mezclaron 100 µl de la suspensión celular con 100 µl de una disolución de azul tripán. Seguidamente, se aplicaron dos gotas de la mezcla en una cámara Neubauer. Empleando microscopio óptico invertido (Olympus CK

X41) se realizó el recuento de células viables (células esféricas con halo amarillo) en 5 cuadrantes obteniendo la concentración celular.

En los experimentos realizados se empleó tanto microscopía óptica como confocal. A continuación se realizará una breve descripción de estos equipos:

Microscopio óptico invertido

Un microscopio invertido tiene una disposición inversa de sus componentes respecto a un microscopio convencional. La fuente de luz y el condensador están sobre la plataforma apuntando hacia abajo. Los objetivos están debajo de la plataforma apuntando hacia arriba. La muestra se coloca sobre la platina mecánica, según se indica en la figura 3.4.

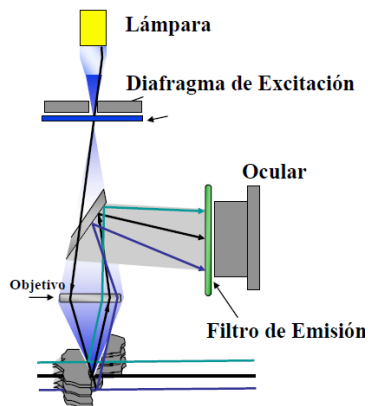


Figura 3.4. Esquema de microscopio invertido [35].

A diferencia de otros microscopios, el microscopio invertido permite observar organismos o tejidos en cultivos sin una preparación previa, favoreciendo el seguimiento del estado de crecimiento, comportamiento y demás parámetros involucrados en el desarrollo del cultivo. Una desventaja

del microscopio invertido es su limitada magnificación, debido a que los objetivos suelen llegar hasta 100X.

Microscopio confocal

El empleo de microscopios ópticos de fluorescencia está ligado a un gran número de limitaciones e inconvenientes. La iluminación vertical hace que el objeto de estudio emita fluorescencia en todo su grosor. Esto causa que, en la mayoría de los casos, más del 90% de la fluorescencia emitida esté fuera de foco. Además, la luz fuera de foco interfiere con los detalles que están en foco y hay bajo contraste entre la señal y el ruido. Por último la dispersión generada por el objeto de estudio de la luz emitida, hace parecer que la fluorescencia emitida proviene de un punto diferente.

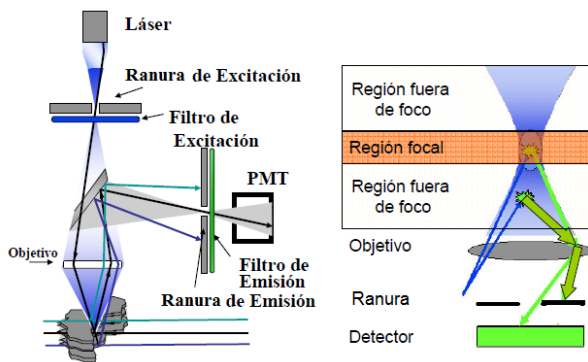


Figura 3. 5. Esquemas de microscopio confocal [35].

Sin embargo, el microscopio confocal elimina la fluorescencia fuera de foco proveniente de otros planos del objeto de estudio y filtra la luz dispersada. De esta forma puede generar imágenes nítidas que corresponden a planos definidos de la muestra. Empleando un láser se ilumina un punto o región a la vez. Sin embargo, esto no elimina la luz fuera de foco ni la

dispersada. Mediante una ranura o *pinhole*, sólo se deja pasar al detector la luz emitida que está en foco y que proviene del punto iluminado.

3.5.2. Ensayo MTT

Este ensayo se basa en la reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT) en 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan (formazán)

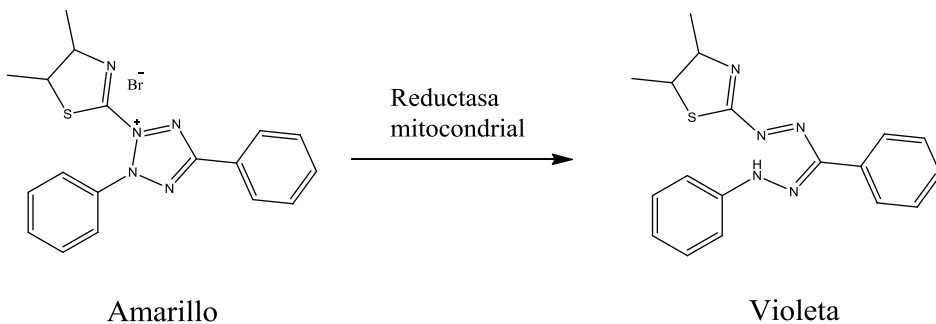


Figura 3.6. Reducción de MTT en formazán.

Se relaciona de forma directa la actividad enzimática con la viabilidad celular, calculando el porcentaje de células viables con la fórmula que se indica a continuación [36-37].

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{Densidad óptica células tratadas}}{\text{Densidad óptica de células no tratadas}} \times 100$$

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos transcurriendo 24 h hasta la adición de los fármacos. La densidad de siembra varió en función de la línea celular: HeLa (2000 células/pocillo VHIR y 4000 células/pocillo UCV), U87MG y HT29.Fluc.C4 (6000 células/pocillo), HCT-116 (10000 células/pocillo). Se empleó un rango de concentraciones entre 0,025 y 2,5

mg/ml en equivalentes de CPT. Tras la adición, pasaron 72 h de periodo de incubación. Una vez finalizado este periodo, se eliminó el medio de cultivo y se añadieron 10 μ l de una disolución 5 mg/ml MTT en DMSO y 240 μ l de PBS. Tras 4 horas de incubación se eliminó la disolución y se añadieron 150 μ l de DMSO. Los cristales formados se disolvieron agitando suavemente y se midió la absorbancia de cada pocillo (550/590 nm, dependiendo del equipo empleado). Los datos obtenidos se expresaron como porcentaje de células viables respecto al grupo control.

Se emplearon dos lectores de placas diferentes: en los experimentos realizados en la UCV se empleó un equipo Perkin Elmer 2030 Victor X5, midiendo la absorbancia a 550 nm. Por otro lado, en los experimentos MTT realizados en el VHIR se utilizó un equipo Biotek ELx800, midiendo la absorbancia a 590 nm.

3.5.3. Ensayos de internalización celular

La internalización de las nanopartículas se estudió en células HeLa. Para ello, se emplearon dos tipos de materiales: nanopartículas con CPT marcadas con Cy5.5 (SNP-(CO)-Cy5.5) y nanopartículas marcadas con rodamina B (RhB-SiO₂@MSN-C2-SS-CPT). Para SNP-(CO)-Cy5.5 se emplearon dos concentraciones diferentes 7,5 y 750 μ g/ml. En el caso del material RhB-SiO₂@MSN-C2-SS-CPT se utilizó una concentración de 290 μ g/ml. Las células se incubaron toda la noche tras la adición de los materiales. Al día siguiente el exceso de nanopartículas se eliminó lavando repetidamente el cultivo con PBS estéril. Tras el lavado se añadieron 10 μ l de LysoTracker Green. Transcurridos 15 min las células se fijaron empleando una solución al 4 % de paraformaldehído y, si era necesario, se añadió una disolución de DAPI en medio hidrófobo.

La internalización de las nanopartículas se estudió mediante microscopía confocal empleando un microscopio Olympus FV1000 empleando unas longitudes de onda de excitación de 405/488/561/633 y de emisión de 461/522/585/693 nm para los fluorocromos DAPI, Lysotracker® Green, rodamina B y Cy5.5 respectivamente.

3.5.4. Ensayo de citometría de flujo

Se emplearon dos protocolos diferentes dependiendo del estudio realizado. En primer lugar se investigó el mecanismo de muerte celular inducido por SNP-(CO)-CPT empleando células HT-29. Con dicho fin se añadió CPT o nanopartículas SNP-(CO)-CPT alcanzando una concentración de 0,005 µg/ml en equivalentes de CPT. También se comprobó la toxicidad de las partículas sin CPT (SNP-COOH) usando la misma concentración. Tras 72 h todas las células (adheridas y libres) se recogieron y trataron con RNase A (10 µg/ml), se fijaron con etanol 70 % y se tiñeron con ioduro de propidio (10 µg/ml). Los ensayos de citometría de flujo se realizaron con un equipo FACSCalibur (BecktonDickinson) y analizados empleando en programa FCS Express3.0 software (DeNovoSoftware).

Por otra parte, se empleó un procedimiento diferente para examinar la internalización de los diferentes nanofármacos *self-immolative*. Para ello se cultivaron células HeLa alcanzando una densidad de unas 400.000 células por pocillo. Tras 24 h se añadieron 0,25 µg CPT eq/ml y los cultivos se incubaron durante otro día más. En este caso sólo se recogieron las células adheridas, que se trataron con 1µl de una disolución de DRAQ 5. Los ensayos se realizaron en un equipo FC 500 (Beckman Coulter).

3.5.5. Análisis estadístico

Los resultados de los ensayos de viabilidad celular se expresan como media con su error estándar. El cálculo de IC_{50} y su error estándar se realizó mediante el programa Prism 5.0 (GraphPad).

3.6. Estudio en un modelo de xenoinjerto de cáncer colorrectal humano

Los estudios se realizaron en el Institut de Recerca del Hospital Vall d'Hebron, bajo la supervisión del equipo investigador del Dr. Simó Schwartz.

3.6.1. Protocolo de manejo y tratamiento de los animales de experimentación

Los experimentos se llevaron a cabo bajo el protocolo del comité ético de experimentación a animal (CEEA) del Hospital Universitari Vall d'Hebron en cumplimiento del Decreto 214/1997 de 30 de julio del Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Generalitat de Catalunya, por el cual se regula la utilización de animales para experimentación y otras finalidades científicas. En la figura 3.7 se muestra el diagrama de flujo de trabajo seguido durante el ensayo.

3.6.2. Estudio de biodistribución

Para el ensayo de biodistribución se emplearon 24 hembras de ratones atómicos Nude-Foxn1nu/nu (Harlan) de 4 semanas de edad. Se suministró una inyección subcutánea de un millón de células HT-29 Fluc. en 100 μ l de PBS en el costado derecho de los animales. El crecimiento tumoral se midió dos veces a la semana empleando un pie de rey. El volumen del tumor se

calculó empleando la fórmula $D \times d^2 / 2$. Tras 25 días, los tumores alcanzaron un tamaño con una mediana de 225–233 mm³, siendo los valores máximo y mínimo 336 y 125 mm³ respectivamente.

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos de ensayo. En la Tabla 3.2 se detalla el tratamiento recibido y el número de animales en cada grupo.

Tabla 3.2. Grupos de animales de experimentación según el tratamiento recibido en el estudio de biodistribución.

Grupo	Tratamiento	Número de animales
G1	SNP-(CO)-Cy5.5 (0,4 mg CPT/Kg)	12
G2	CPT (0,4 mg CPT/Kg)	12

La terapia consistió en una única dosis. Los ratones se sacrificaron a las 5, 24 y 96 h tras la administración intravenosa de nanopartículas. La sangre se obtuvo mediante punción cardiaca y se separó en plasma y suero centrifugando (2000 g, 10 min). Los tumores y diferentes órganos como hígado, pulmones, bazo, riñones y corazón se obtuvieron mediante disección de los cadáveres.

Los órganos se analizaron mediante fluorescencia de tiempo resuelto *ex vivo*. Para ello se empleó un equipo IVIS Spectrum con el software Living Image 3.2 (Caliper Life Sciences). Las muestras de sangre y tejidos se mantuvieron a -80 °C para un análisis posterior mediante HPLC.

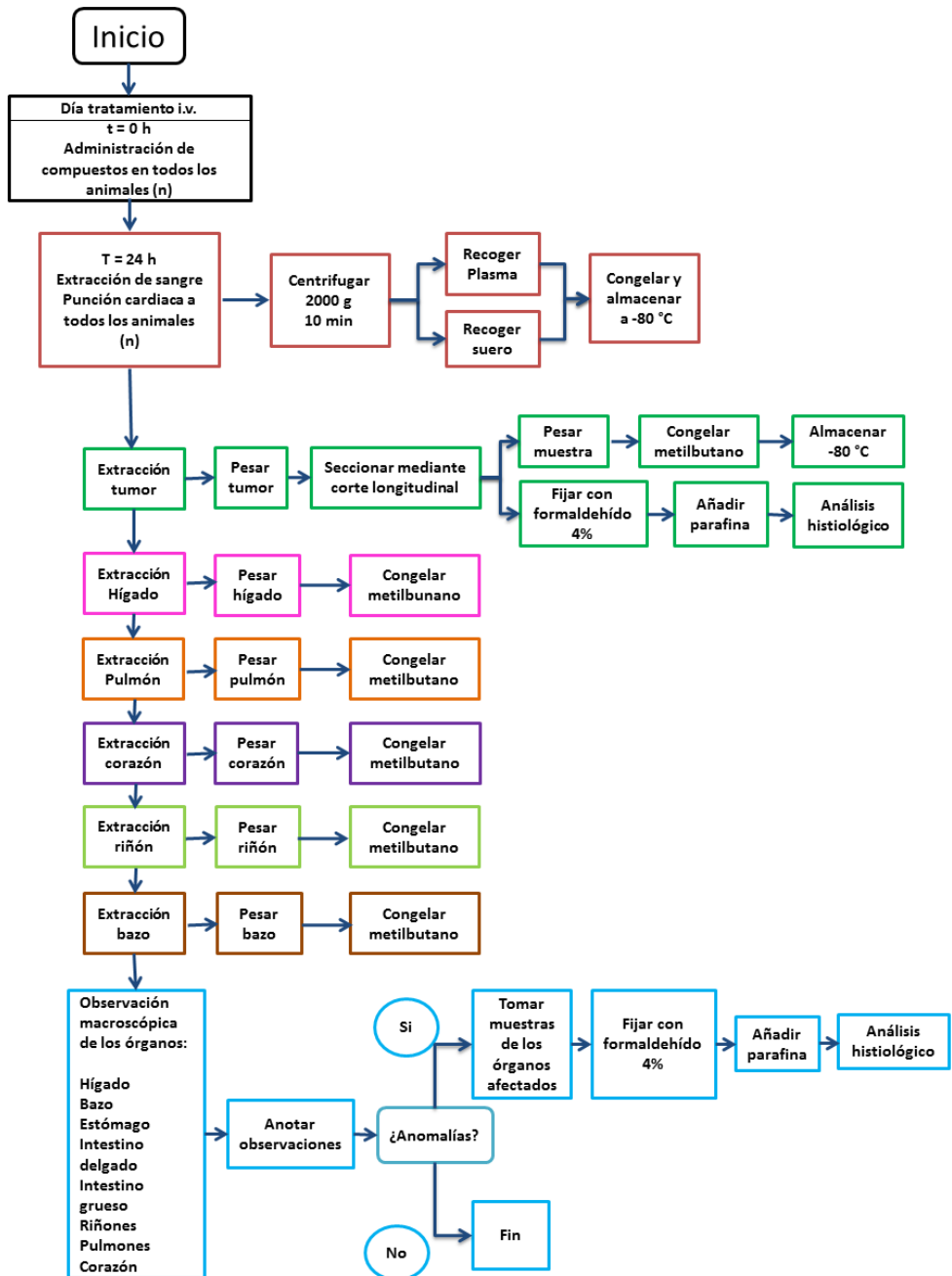


Figura 3.7. Diagrama de flujo de trabajo de los ensayos *in vivo*.

Para la cuantificación de CPT, 200 mg o 200 μL de muestra biológica se introdujeron en tubos con matriz lisante D (MP Biomedicals) junto a 500 μl de reactivo Cellytic MT y se homogenizaron mediante agitación empleando un equipo FastPrep-24 (MP Biomedicals). La mezcla obtenida se centrifugó (16000 g, 30 min, 10 °C). Se separó el sobrenadante y se añadió 500 μL de una disolución fría de TCA para precipitar las proteínas presentes en el sobrenadante. Se centrifugó (16000 g, 30 min, 10 °C) y el sobrenadante se mantuvo a -20 °C (muestra CPT₁). El sólido obtenido tras el tratamiento lisante se mezcló con 500 μL de una disolución 0,02 N de NaOH y se mantuvo en un mezclador Thermomixer Confort a 37 °C. Tras 24 horas se centrifugó (16000 g, 30 min, 10 °C) y se añadieron 600 μL de una disolución fría de TCA al sobrenadante. Se centrifugó (16000 g, 30 min, 10 °C). El sobrenadante (muestra CPT₂) se añadió al vial que contiene la muestra CPT₁ y se liofilizó. El residuo obtenido se disolvió en 250 μL de una mezcla MeOH:HCl 95:5 (v/v), se filtró (0,2 μm , Nylon) y se analizó por RP-HPLC.

3.6.3. Estudio de tolerabilidad

Para el ensayo de tolerabilidad se emplearon 36 hembras de ratones atímicos Nude-Foxn1 (nu/nu) de 5 semanas de edad. La duración prevista fue de 22 días, a razón de dos dosis intravenosas a la semana. Se estudiaron 4 grupos diferentes con 9 animales por grupo. En la siguiente tabla se detalla el tratamiento aplicado.

Tabla 3.3. Grupos de animales de experimentación según el tratamiento aplicado en el estudio de tolerabilidad.

Grupo	Tratamiento	Posología*	Dosis
G1	CPT	(1001000)	0,8 mg CPT/kg
G2	SNP-(CO)-CPT3	(1001000)	0,8 mg CPT/kg
G3	CPT	(1001000)	3 mg CPT/kg
G4	SNP-(CO)-CPT3	(1001000)	3 mg CPT/kg

*Código binario: (1) Dosificación (0) Sin dosificación.

Durante el tratamiento se monitorizó el peso, aspecto y comportamiento de los ratones. La pérdida de peso de los animales de laboratorio se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Pérdida de peso} = \frac{\text{peso} - \text{peso inicial}}{\text{peso inicial}} \cdot 100$$

Como se ha indicado previamente, la duración prevista del estudio fue de 22 días, si bien se introdujeron los siguientes criterios de punto final:

Un grupo se sacrificó si los animales perdían un promedio del 15 % en peso respecto al peso inicial, y un animal se sacrificó si presentaba pérdida de peso superior a 20 %.

3.6.4. Estudio de eficacia terapéutica

Para el ensayo de eficacia terapéutica se emplearon 27 hembras de ratones atímicos Nude-Foxn1 (nu/nu) de 5 semanas de edad. Se estudiaron 3 grupos diferentes con 9 animales por grupo. En la siguiente tabla se detalla el tratamiento aplicado.

Tabla 3.4. Grupos de animales de experimentación según el tratamiento aplicado en el estudio de eficacia terapéutica

Grupo	Tratamiento	Posología*	Dosis
G1	PBS	(1001000)	-
G2	CPT	(1001000)	0,8 mg CPT/kg
G3	SNP-(CO)-CPT3	(1001000)	0,8 mg CPT/kg

*Código binario: (1) Dosificación (0) Sin dosificación.

Los tumores alcanzaron un tamaño con una mediana entre 161 y 178 mm³ previo al tratamiento, siendo el valor máximo de 282 mm³ y el mínimo de 80 mm³. El ensayo comenzó 18 h después de la inyección con células tumorales. La duración prevista fue de 22 días, a razón de dos dosis intravenosas a la semana.

El crecimiento tumoral se midió dos veces a la semana empleando un pie de rey. El volumen del tumor se calculó empleando la fórmula $Dxd^2/2$. Tras 25 días, los tumores alcanzaron un tamaño con una mediana de 225–233 mm³, siendo los valores máximo y mínimo 336 y 125 mm³ respectivamente.

En el caso de las medidas de bioluminiscencia *in vivo*, se inyectó 150 mg/kg de D-luciferina disuelta en PBS estéril mediante inyección intraperitoneal (i.p). A continuación se empleó isoflurano 1-3% para anestesiarse los animales de estudio. Las medidas de bioluminiscencia se realizaron en grupos de cinco ratones, ajustando la imagen en función de la bioluminiscencia de los tumores. Las imágenes se tomaron entre 13 y 21 minutos tras la administración de D-luciferina. Las regiones de interés mostradas en las imágenes se trazaron de forma automática alrededor de las señales de bioluminiscencia y se cuantificaron como fotones por segundo.

Durante el tratamiento se registró un seguimiento del ratio entre el volumen de tumor de los animales tratados y el control.

$$\text{Ratio } \frac{T}{C} = \left(\frac{\frac{\text{mediana del volumen de tumor al final del tratamiento}}{\text{mediana del volumen del tumor antes del tratamiento}}}{\frac{\text{mediana del volumen del tumor grupo control final}}{\text{mediana del volumen del tumor grupo control inicio}}} \right)$$

También, se realizó un seguimiento de la pérdida de peso de los animales de laboratorio. Se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$\frac{T}{C} = \left(\frac{\frac{\text{mediana del peso del animal al final del tratamiento}}{\text{mediana del peso del animal ar antes del tratamiento}}}{\frac{\text{mediana del peso del animal a grupo control final}}{\text{mediana del peso del animal al grupo control inicio}}} \cdot 100 \right) - 100$$

Como se ha indicado previamente, la duración prevista del estudio fue de 22 días, si bien se introdujeron los siguientes criterios de punto final:

Un grupo se sacrificó si:

- Los animales perdían un promedio del 15 % en peso respecto al peso inicial.
- La mediana del volumen tumoral era superior a 1000 mm³.
- Más de la mitad de los animales tenían tumores ulcerados.

Un animal se sacrificó si:

- Presentaba pérdida de peso superior a 20 %.
- El tumor tenía un volumen superior a 1500 mm³.
- El tumor presentaba una ulceración mayor del 50 %.

Al finalizar el experimento los ratones se sacrificaron obteniendo la sangre mediante punción cardiaca y procesándola para obtener plasma y suero. Los tumores y diferentes órganos como hígado, pulmones, bazo, riñones y corazón se obtuvieron mediante disección de los cadáveres. Las muestras de sangre y tejidos se mantuvieron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para un análisis posterior mediante HPLC. Las muestras fueron tratadas y se determinó la concentración de CPT por RP-HPLC del mismo modo que en el apartado anterior.

3.6.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó empleando descriptores y tests no paramétricos. En la estadística no paramétrica no se construyen modelos, y por ello, los descriptores no paramétricos pueden utilizarse cualquiera que sea la distribución de la población. Los descriptores no paramétricos tienen un especial interés cuando se manejan muestras muy pequeñas, como los que resultan de la realización de experimentos triplicados ($n=3$) o quintuplicados ($n=5$). Cuando un estimador estadístico cambia excesivamente de valor al tomar otra muestra de la misma población se dice que no es robusto. En este caso se emplean estimadores no paramétricos debido a que en su cálculo no intervienen los valores extremos de la serie, por ello son bastante más robustos que los estimadores paramétricos equivalentes [38].

Mediana y error estándar

La mediana x_m es un estimador no paramétrico de la tendencia central de una serie. Para poblaciones y muestras normales probablemente x_m será muy similar a la media muestral \bar{x} , pero no tiene por qué coincidir. En este

caso el error estándar (s) se calcula a partir del intervalo intercuartílico (I_c), que es la distancia entre el cuartil superior e inferior [38]:

$$s = 0,74 \cdot I_c$$

Análisis de la varianza de una vía (Kruskal-Wallis) y test post-hoc de Dunn

El análisis de Kruskal-Wallis se emplea para demostrar que un grupo de datos proviene de una misma población. Como hipótesis nula H_0 se asume que los datos provienen de la misma población y como hipótesis alternativa H_1 se establece que alguno de los datos proviene de una población con mediana diferente a los demás. Este tipo de análisis no es paramétrico, de modo que se asume que la distribución de los datos no es normal. Para determinar si se debe rechazar algún dato se compara el valor de H con el de la tabla de la χ^2_{k-1} con $k-1$ grados de libertad. Se rechaza H_0 si el valor del estadístico supera el valor teórico $\chi^2_{k-1,1-\alpha}$. Donde χ^2 es un estadístico cuya distribución es asimétrica, variando entre 0 e infinito y α es el nivel de significación, o de otro modo, la probabilidad de rechazar la hipótesis nula H_0 siendo esta cierta [39].

En caso en el que se rechace la hipótesis nula H_0 , es decir los datos provienen de poblaciones con medianas diferentes, se aplica el test de Dunn en el cual se realizan comparaciones pareadas para identificar cual es el grupo diferente [40].

Todos estos cálculos se realizaron empleando el programa Prism 5.0 (GraphPad).

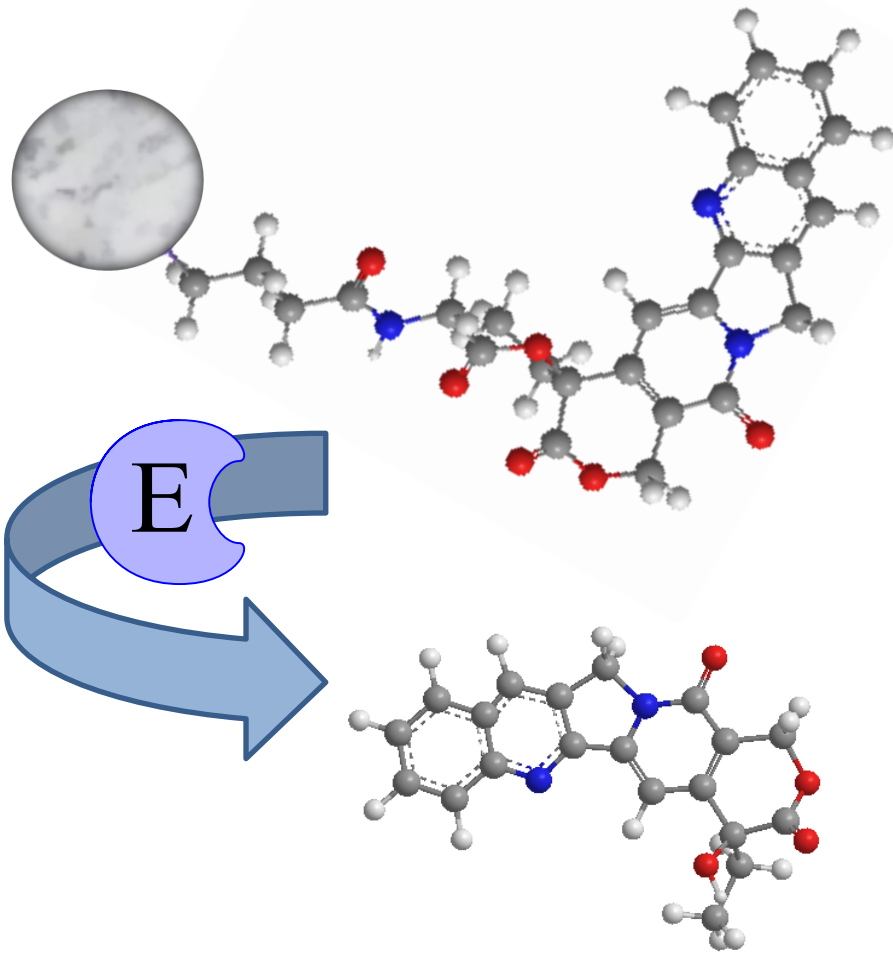
Referencias

- [1] Greenwald, R. B.; Pendri, A.; Conover, C. D.; Lee, C.; Choe, Y. H.; Gilbert, C.; Martinez, A.; Xia, J.; Wu, D.; Hsue, M.-m. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, 6, 551-562.
- [2] Cai, Q.; Luo, Z.-S.; Pang, W.-Q.; Fan, Y.-W.; Chen, X.-H.; Cui, F.-Z. *Chem. Mater.* **2001**, 13, 258-263.
- [3] Tian, B.; Liu, X.; Yu, C.; Gao, F.; Luo, Q.; Xie, S.; Tu, B.; Zhao, D. *Chem. Commun.* **2002**, 38, 1186-1187.
- [4] Gao, F.; Botella, P.; Corma, A.; Blesa, J.; Dong, L. *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 1796-1804.
- [5] Jones, L. R.; Goun, E. A.; Shinde, R.; Rothbard, J. B.; Contag, C. H.; Wender, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6526-6527.
- [6] Henne, W. A.; Doorneweerd, D. D.; Hilgenbrink, A. R.; Kularatne, S. A.; Low, P. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 5350-5355.
- [7] Ghosh, S. S.; Kao, P. M.; McCue, A. W.; Chappelle, H. L. *Bioconj. Chem.* **1990**, 1, 71-76.
- [8] Ladd, M.; Palmer, R. *Structure determination by X-ray Crystallography*. 4^a ed.; Springer: Nueva York, 2003; pp 142-143.
- [9] Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B. *Métodos espectroscópicos en Química Orgánica*. Editorial Síntesis: Madrid, 2005; pp 33-38.
- [10] Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B. *Métodos espectroscópicos en Química Orgánica*. Editorial Síntesis: Madrid, 2005; pp 75-76.
- [11] Escudero, A. *An. Quim.* **2004**, 100, 27-36.
- [12] Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B. *Métodos espectroscópicos en Química Orgánica*. Editorial Síntesis: Madrid, 2005; pp 1-3.
- [13] Pérez, C. *Sensores Ópticos*. Universidad de Valencia: Valencia, 1996; pp 81-82.
- [14] Brunauer, S.; Emmett, P. H.; Teller, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, 60, 309-319.
- [15] Joyner, L. G.; Barrett, E. P.; Skold, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 3155-3158.
- [16] Kruk, M.; Jaroniec, M.; Sayari, A. *Langmuir* **1997**, 13, 6267-6273.
- [17] Kruk, M.; Jaroniec, M.; Sakamoto, Y.; Terasaki, O.; Ryoo, R.; Ko, C. H. *J. Phys. Chem. B* **1999**, 104, 292-301.
- [18] G. J. Tartaro; B. R. Funke; C. L. *Case Introducción a la Microbiología*. 9^a ed.; Médica Paramericana: Buenos Aires, 2007; pp 66-67.
- [19] Be, B. J.; Pecora, R. *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*. Dover publications: Nueva York, 2000; pp 6-10.

- [20] Clark, N. A.; Lunacek, J. H.; Benedek, G. B. *Am. J. Ph.* **1970**, 38, 575-585.
- [21] Aguilar Ros, A.; Caamaño Gomez, M.; Martín Martín, F. R.; Montejo Rubio, M. C. *Biofarmacia y farmacocinética*. Elsevier: Barcelona, 2008; pp 31-33.
- [22] Higuchi, T. *J. Pharm. Sci.* **1963**, 52, 1145-1149.
- [23] Chern, J.-M.; Lee, W.-F.; Hsieh, M.-Y. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2004**, 43, 6150-6156.
- [24] Choudary, B. M.; Madhi, S.; Chowdari, N. S.; Kantam, M. L.; Sreedhar, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14127-14136.
- [25] Ur-Rahman, A.; Caldwell, G. W.; Choudhary, M. I.; D'andrea, M. R. *Frontiers in drug desing and discovery*. Bentham Science: 2006; Vol. 2, pp 304-305.
- [26] Zhang, H.; Zou, K.; Guo, S.; Duan, X. *J. Solid State Chem.* **2006**, 179, 1792-1796.
- [27] Bhaskar, R.; Murthy, R. S. R.; Miglani, B. D.; Viswanathan, K. *Int. J. Pharm.* **1986**, 28, 59-66.
- [28] Serra, L.; Doménech, J.; Peppas, N. A. *Biomaterials* **2006**, 27, 5440-5451.
- [29] Scott, R. A.; Peppas, N. A. *Macromolecules* **1999**, 32, 6149-6158.
- [30] Gonçalves-Araújo, T.; Rajabi-Siahboomi, A. R.; Caraballo, I. *Int. J. Pharm.* **2008**, 361, 112-117.
- [31] Li, F.; Jin, L.; Han, J.; Wei, M.; Li, C. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2009**, 48, 5590-5597.
- [32] Schlupe, T.; Cheng, J.; Khin, K.; Davis, M. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2006**, 57, 654-662.
- [33] Zamboni, W. C.; Jung, L. L.; Egorin, M. J.; Hamburger, D. R.; Joseph, E.; Jin, R.; Strychor, S.; Ramanathan, R. K.; Eiseman, J. L. *Clin. Cancer. Res.* **2005**, 11, 4867-4874.
- [34] Sano, K.; Yoshikawa, M.; Hayasaka, S.; Satake, K.; Ikegami, Y.; Yoshida, H.; Ishikawa, T.; Sawada, S.; Tanabe, S. *J. Chromatogr. B* **2003**, 795, 25-34.
- [35] G. J. Tartaro; B. R. Funke; C. L. *Case Introducción a la Microbiología*. 9ª ed.; Médica Paramericana: Buenos Aires, 2007; pp 56-61.
- [36] Denizot, F.; Lang, R. *J. Immunol. Methods* **1986**, 89, 271-277.
- [37] Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, 16, 55-63.
- [38] Ramis, G.; García, C. *Quimiometría. Síntesis*: Madrid, 2001; pp 38-40.
- [39] Ríus, F.; Barón, F. J.; Sánchez, E.; Parras, L. *Bioestadística: Métodos y Aplicaciones*. Universidad de Málaga: 2009; pp 313-314.

- [40] Berenson, M. L. Estadística básica en administración, conceptos y aplicaciones. 6ª ed.; Pearson Educación: Naucalpan de Juárez, 1996; pp 449-450.

Capítulo 4



Sistemas basados en la actividad enzimática

4. Sistemas de liberación basados en actividad enzimática

4.1. Fundamento

Este tipo de mecanismos se activan de forma específica mediante la acción de determinadas enzimas, y en su ausencia no se produce liberación del fármaco (liberación cero). Dicha característica facilita el objetivo de liberar el principio activo exclusivamente en el interior de las células diana. Esto es posible gracias a que las células tumorales tienden a sobreexpresar ciertas enzimas [1-3]. Existen diferentes ejemplos en los que se emplean estos sistemas de liberación, como aquellos basados en la acción de β -D-galactosidasa [4] o proteasas [5]. Por otro lado, Corma *et al.* proponen un material sensible a la hidrólisis enzimática del enlace éster [6].

A lo largo de este capítulo se describe el desarrollo de un sistema basado en la acción de la enzima esterasa, mediante la cual se produce la liberación de la CPT a partir de materiales con diferente estructura. Para ello, se modifica la superficie de diferentes soportes con grupos carboxilo para más tarde incorporar la Gly-CPT·TFA mediante la formación de un enlace éster [7].

4.2. Profármaco de camptotecina (Gly-CPT·TFA)

El derivado de la CPT se obtiene con un rendimiento del 60 % y se caracteriza en primer lugar empleando RMN de protón y carbono, a continuación se muestran las señales obtenidas en cada caso.

El profármaco se analiza por HPLC, en el cromatograma se aprecia el pico correspondiente a la Gly-CPT·TFA con un tiempo de retención de 2,47 minutos, indicando un 97 % de pureza. Seguidamente, los resultados obtenidos mediante espectrometría de masas indica un valor de 406 [M+H]⁺. Los espectros de RNM están disponibles en el anexo correspondiente.

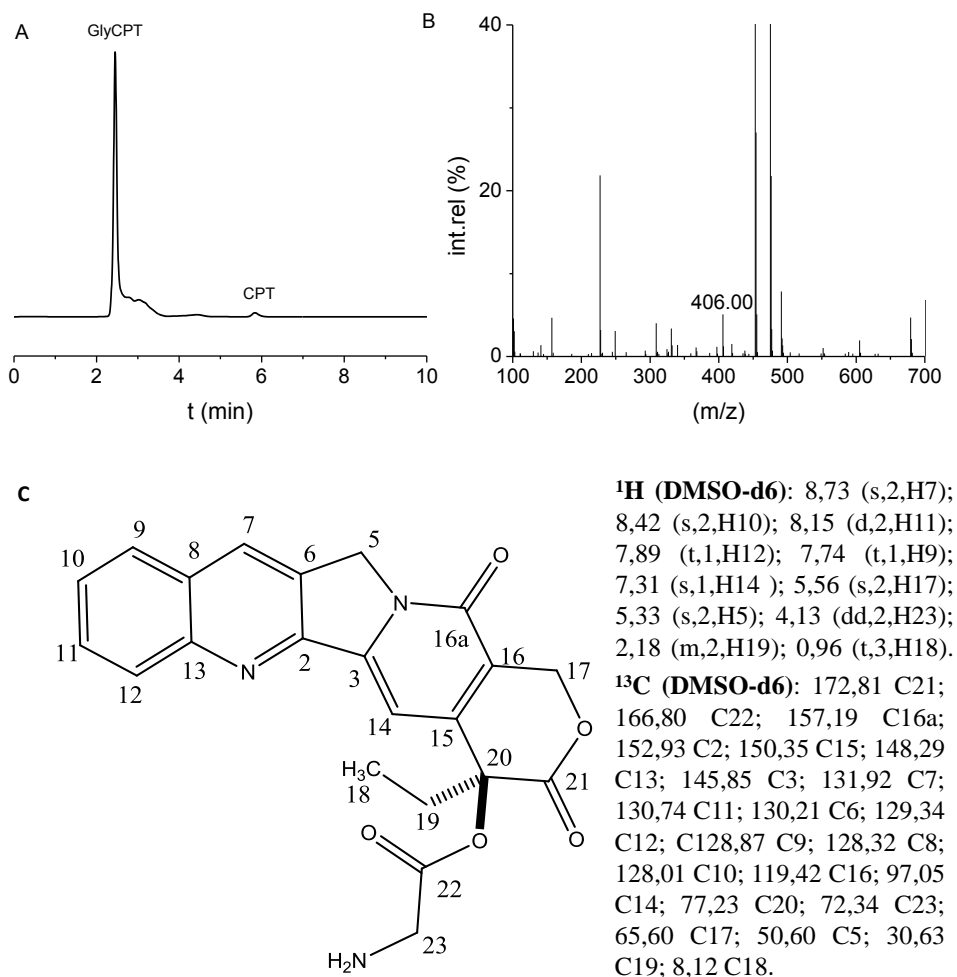


Figura 4.1. A) Cromatograma, B) espectro de masas de Gly-CPT·TFA y C) señales de RMN (¹H y ¹³C) de Gly-CPT·TFA.

4.3. Preparación y caracterización de nanofármacos de camptotecina

4.3.1. Nanofármacos de sílice amorfa porosa (SNP-(CO)-CPT)

En primer lugar se realizó un análisis elemental del material SNP-COOH, obteniendo los siguientes resultados: nitrógeno 0,04 %, carbono 4,82 %, hidrógeno 1,25 % y azufre 0,36 %. El escaso porcentaje de nitrógeno indica una oxidación completa de los grupos cianopropil. Por otro lado, el contenido en carbono ronda el 5 %, que corresponde a 1,00 milimol de grupos carboxilato por gramo de material.

Por lo que respecta a la caracterización empleando RMN, en el espectro de ^{29}Si (Figura 4.2.A) se puede apreciar la señal mayoritaria Q_4 (-119,92 ppm) correspondiente a átomos de silicio unido a otros cuatro mediante átomos de oxígeno ($\text{Si}(\text{OSi})_4$) y la señal Q_2 (-92,08 ppm) propia de átomos de silicio unidos a otros dos átomos de silicio a través de dos átomos de oxígeno y a dos grupos OH ($\text{Si}(\text{OH})_2(\text{OSi})_2$). Por otro lado, se observan los picos T_2 (-58,13 ppm) y T_3 (-66,82 ppm) debidos a la funcionalización del material. La señal T_2 corresponde a un átomo de silicio unido a otros dos a través de átomos de oxígeno, a un grupo OH y a la cadena alifática del silano ($\text{C-Si}(\text{OH})(\text{OSi})_2$). Mientras que la señal T_3 corresponde a un átomo de silicio unido a otros tres mediante átomos de oxígeno y a la cadena alifática del silano ($\text{C-Si}(\text{OSi})_3$). La señal mayoritaria de Q_4 indica una cantidad de defectos de conectividad muy baja, es decir, la gran mayoría de tetraedros SiO_4 están conectados a otros cuatro compartiendo átomos de oxígeno. Por otro lado, cuando un átomo de oxígeno sólo está unido a un átomo de silicio, forma grupos silanol (SiOH), que dan lugar a señales Q_3 o

Q₂. Además, se integró el área correspondiente a cada una de las señales del espectro para calcular el siguiente ratio [8]:

$$\frac{T_2+T_3}{Q_2+Q_3+Q_4}$$

Se obtuvo un valor del 4,99 %, similar al obtenido por análisis elemental (4,82 %). De este modo queda demostrado que la cantidad de carbono analizada por análisis elemental corresponde exclusivamente a la incorporación del silano.

Las bandas obtenidas en el espectro de carbono (Figura 4.2.B) concuerdan con los datos de análisis elemental. Se puede observar a 176,29 ppm una banda intensa correspondiente al grupo carboxilo, indicando la conversión de los grupos cianopropil en carboxipropil. Las otras tres señales corresponden a los tres carbonos de la cadena alifática.

Con el material funcionalizado se procede a la incorporación del fármaco, empleando diferentes concentraciones de Gly-CPT·TFA. En la Tabla 4.1. aparecen las cantidades incorporadas que oscilan entre los 13,7 y los 290 μmoles/g. Como se puede apreciar, la cantidad incorporada depende de la cantidad añadida de Gly-CPT·TFA en la síntesis, con un porcentaje de incorporación cercano al 60 % en todos los casos. También se estudió la influencia que tiene la incorporación de la CPT sobre las características texturales de la nanopartícula mediante medidas de adsorción de N₂ (g). Los datos evidencian la reducción del área superficial BET a medida que aumenta la cantidad de CPT incorporada.

Tabla 4.1. Diferentes propiedades de los materiales SNP-(CO)-CPT.

Material	CPT añadida ($\mu\text{mol/g}$)	CPT incorporada ($\mu\text{mol/g}$)	CPT incorporada (%)	Área BET (m^2/g)	Dispersión del fármaco ($\mu\text{mol CPT}/\text{m}^2$)
SNP-(CO)-CPT1	25	13,7	0,5	158,1	0,09
SNP-(CO)-CPT2	250	150	5,2	63,1	2,37
SNP-(CO)-CPT3	500	290	10,1	57,1	5,08

En cuanto a la caracterización de SNP-(CO)-CPT, el espectro de RMN ^{13}C (Figura 4.2.C) muestra bandas correspondientes a los diferentes carbonos de Gly-CPT·TFA enlazada de forma covalente a la nanopartícula.

Como se puede apreciar en la Figura 4.2.D, el material presenta una banda de absorbancia a una longitud de onda de 368 nm, característica de la CPT. A su vez, al irradiar el material a 368 nm se registra una banda de emisión a 420 nm correspondiente a la Gly-CPT·TFA incorporada a la nanopartícula (Figura 4.2.E).

El estudio del material SNP-(CO)-CPT por microscopía electrónica de transmisión muestra diversos tipos de partículas. La Figura 4.2.G muestra varias nanopartículas aisladas con un tamaño similar al indicado por el fabricante (10 nm). Por el contrario, en la imagen 4.2.H aparecen formando agregados de varias centenas de nanómetros. De este hecho se deduce que al incorporar el fármaco a las nanopartículas, estas tienden a agregarse. Para determinar la influencia de la cantidad de CPT incorporada al soporte sobre la formación de agregados, se realizaron medidas del diámetro hidrodinámico mediante DLS. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.2.F y en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Diámetro hidrodinámico de SNP-(CO)-CPT empleando DLS.

Material	CPT Incorporada ($\mu\text{mol/g}$)	Diámetro (nm)	Intensidad (%)
SNP-(CO)-CPT 1	13,7	276 ± 63	93
SNP-(CO)-CPT 2	150	295 ± 120	100
SNP-(CO)-CPT 3	290	496 ± 245	99

Como se puede apreciar en la Figura 4.2.F, al aumentar la cantidad de CPT presente en las nanopartículas, estas tienden a formar agregados de mayor tamaño. Así pues, la muestra con mayor cantidad de CPT (290 $\mu\text{mol/g}$) llega a formar agregados de unos 500 nm. Este hecho se puede justificar debido a un aumento en la hidrofobicidad de la superficie de la partícula, generado por un incremento del contenido de CPT en el exterior del soporte inorgánico. Consecuentemente, las nanopartículas pierden capacidad para estabilizarse en suspensiones de disolventes polares y tienden a agregarse. Por otro lado, al aumentar la cantidad de fármaco unido de forma covalente al soporte, disminuye la cantidad de grupos carboxilato disponibles. Estos grupos situados en el exterior de las nanopartículas presentan cargas negativas en disoluciones acuosas de pH neutro, que favorecen la estabilidad de las nanopartículas en suspensión [9]. Así pues, al obtener materiales con una elevada cantidad de principio activo incorporado, siendo esta una de las características fundamentales de un nanofármaco, se observa que aumenta el diámetro hidrodinámico debido a la agregación. Este hecho dificulta la aplicación *in vivo* de los materiales con mayor carga de CPT.

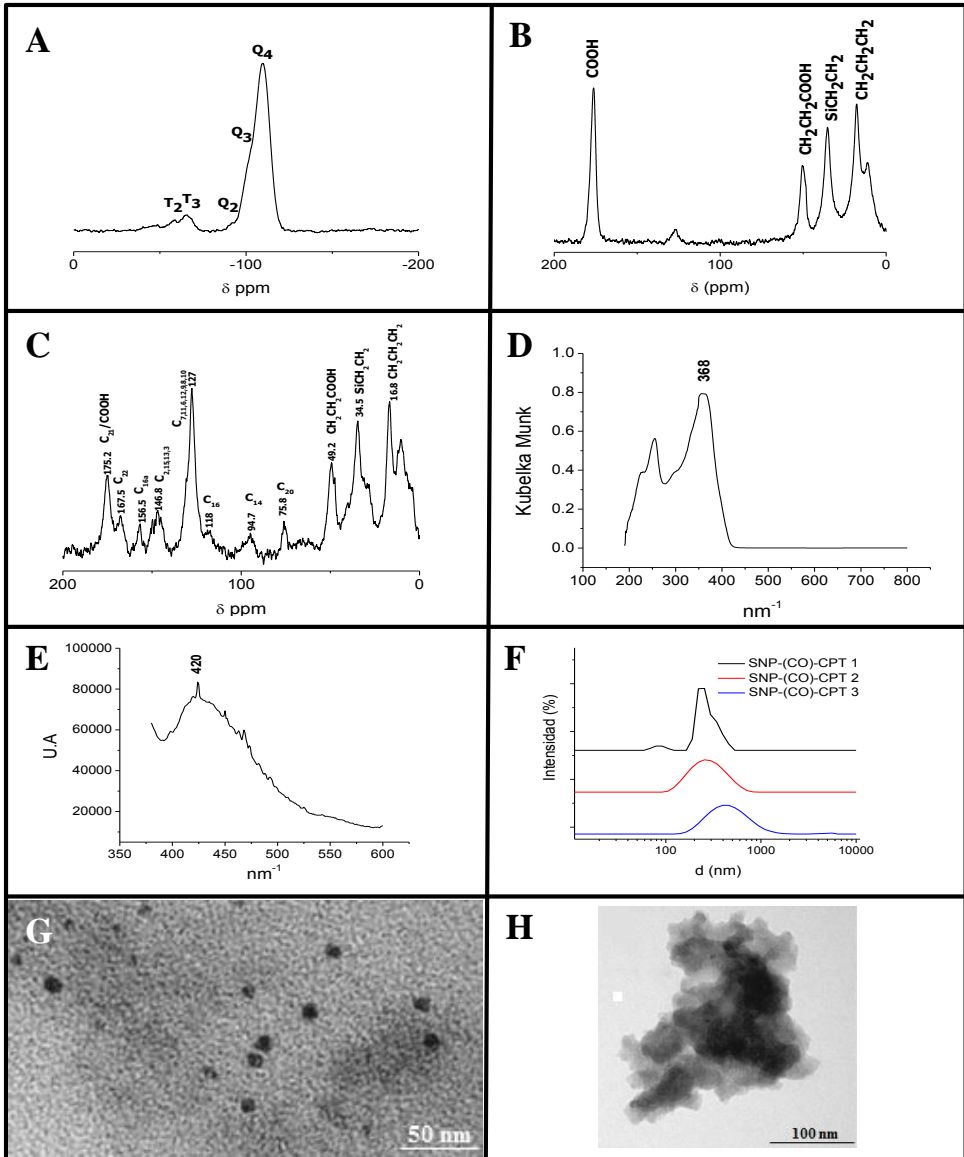


Figura 4.2. A) Espectro de RMN-MAS de ^{29}Si del material SNP-COOH. B) Espectro de RMN-MAS de ^{13}C del material SNP-COOH. C) Espectro de RMN ^{13}C CP-MAS del material SNP-(CO)-CPT. Espectros de absorción (D) y emisión (E) del material SNP-(CO)-CPT. F) Diámetro hidrodinámico de los materiales SNP-(CO)-CPT empleando DLS. G y H) Imágenes de TEM del material SNP-(CO)-CPT2.

Incorporación del fluorocromo Cy5.5

Sobre el material SNP-(CO)-CPT2 150 $\mu\text{mol/g}$ también se enlaza de forma covalente el cromóforo Cy5.5. De esta forma se podrá determinar la biodistribución de las nanopartículas mediante imágenes de fluorescencia y bioluminiscencia *in vivo*. Se emplea Cy5.5 debido a que su máximo de absorción está situado próximo a la zona de infrarrojo cercano (600-900 nm). En este intervalo de longitudes de onda la mayoría de cromóforos del organismo como la hemoglobina, melanina y lípidos presentan baja absorbancia, de este modo la radiación puede penetrar varios centímetros, permitiendo obtener imágenes de órganos y tejidos de los animales de experimentación [10]. La incorporación del cromóforo se comprueba mediante espectroscopia de UV-vis y fluorescencia.

En el espectro UV-Vis (Figura 4.3.A) se pueden distinguir dos bandas a 368 y 684 nm, correspondientes a los máximos de absorción de CPT y Cy5.5 respectivamente. Así mismo, en el espectro de fluorescencia se puede observar una banda a 420 nm correspondiente a la emisión por parte de la CPT tras irradiar la muestra a una longitud de onda de 368 nm (Figura 4.3.B). Por otro lado, en la Figura 4.3.C se puede apreciar una banda de emisión a 710 nm generada al irradiar la muestra a una longitud de onda de 684 nm asignada a Cy5.5 anclado a la nanopartícula.

Respecto del tamaño de partícula, el nanofármaco mantiene un estado de agregación similar tras la incorporación del marcador Cy 5.5. El proceso de anclaje del espaciador e incorporación de Cy 5.5 no afectan al diámetro hidrodinámico del nanofármaco (Figura 4.3.D y Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Diámetro hidrodinámico de SNP-(CO)-Cy5.5.

Material	Diámetro (nm)	Intensidad %
SNP-(CO)-Cy5.5	204 ± 62	100

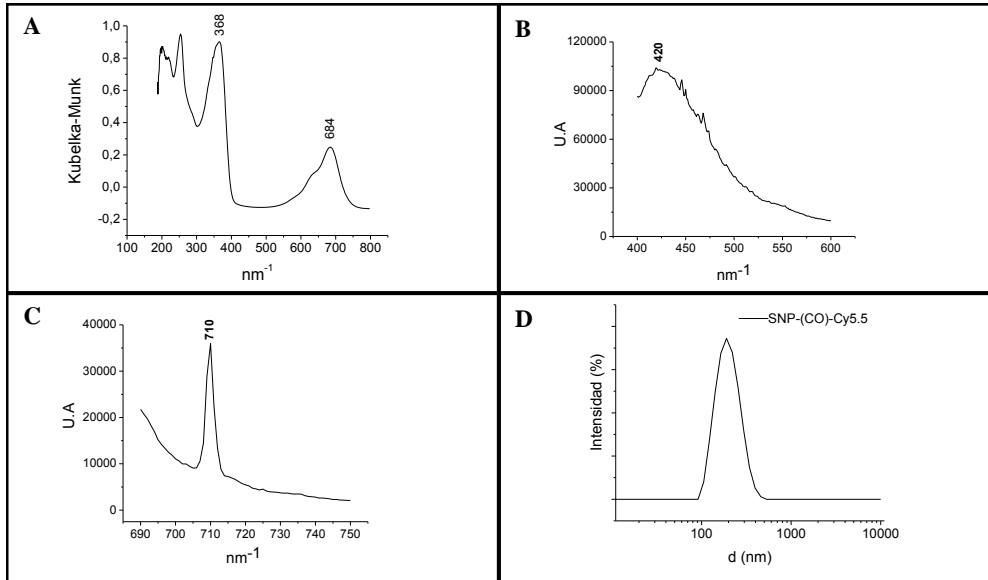


Figura 4.3. A) Espectro de absorción UV-vis del material SNP-(CO)-Cy5.5. B) y C) Espectros de emisión de fluorescencia tras excitar la muestra a 368 nm y 684 nm respectivamente. D) Medida del diámetro hidrodinámico del material SNP-(CO)-Cy5.5 empleando DLS.

4.3.2. Nanofármacos de sílice mesoporosa MCM-41 (MSN-(CO)-CPT)

Los resultados de análisis elemental del material MSN-COOH indican los siguientes porcentajes por elemento: nitrógeno 0,03 %, carbono 6,26 %, hidrógeno 1,21 % y azufre 0,09 %. Son similares a los obtenidos en el caso del material SNP-COOH, si bien en este caso el porcentaje de carbono es algo mayor y corresponde a 1,30 mmol de grupos carboxilo por gramo.

Tras la funcionalización del material sólo se observa un pico a 2,32 (2θ) correspondiente al plano de simetría (100) (hkl). Esta ligera pérdida de ordenación en la estructura mesoporosa puede deberse a la limitada estabilidad del material MCM-41 [11], especialmente, tras un tratamiento oxidante en medio acuoso ácido a elevadas temperaturas durante varias horas (Figura 4.4.A). Por otro lado, la cantidad de CPT incorporada es algo mayor en el caso de materiales mesoporosos, aumentando hasta en un 20 % respecto al material amorfo equivalente (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Incorporación de CPT a MSNP-COOH.

Material	CPT añadida ($\mu\text{mol/g}$)	CPT Incorporado (%)	CPT incorporada ($\mu\text{mol/g}$)	CPT incorporada (%)
MSN-(CO)-CPT1	25	66	16,5	0,6
MSN-(CO)-CPT2	250	76	190	6,6

Para las MSN, los parámetros texturales apenas varían de en función de la cantidad de CPT incorporada. Debido al gran área superficial que presentan estos soportes, la incorporación del fármaco apenas afecta a su valor (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Propiedades texturales de los materiales MSN.

Material	CPT incorporada ($\mu\text{mol/g}$)	Área BET (m^2/g)	Volumen Poro (cm^3/g)	Diámetro de poro* (Å)	Dispersión del fármaco ($\mu\text{molCPT}/\text{m}^2$)
MSN-(CO)-CPT1	16,5	732,53	0,59	25,4	0,02
MSN-(CO)-CPT2	190	740,13	0,72	26,8	0,26

*Aproximación KJS [12].

Respecto de las características estructurales del material MSN-(CO)-CPT, el espectro de RMN de ^{13}C muestra bandas correspondientes a los diferentes carbonos de la Gly-CPT·TFA ligados covalentemente a la partícula (Figura 4.4.B).

La imagen de TEM muestra partículas nonodispersas de un tamaño ligeramente superior a los 100 nm. Esta característica facilita su aplicación *in vivo*, debido a su tamaño y a su estabilidad en disoluciones acuosas. En la imagen también se pueden apreciar la disposición hexagonal los canales situados de forma perpendicular al plano de la fotografía (Figura 4.4.C).

En lo referente al tamaño de partícula, al igual que en caso del material SNP-(CO)-CPT, las nanopartículas con más carga de CPT tienden a formar agregados de mayor tamaño, debido a su mayor hidrofobicidad, y a la deficiente dispersión en medio acuoso. Si bien es este caso, debido al tamaño del diámetro hidrodinámico (271 nm) se trata de agregados de pocas partículas, a diferencia de lo ocurrido con el material SNP-(CO)-CPT en el cual se forman racimos de varias decenas de nanopartículas. Esto puede deberse a que en el caso de los materiales mesoporosos, parte de la carga del fármaco se dispone en el interior de los canales de la estructura. Así pues, con una superficie con menor cantidad de CPT y consecuentemente menos hidrófoba, se produce una menor agregación de las partículas.

Tabla 4.6. Diámetro hidrodinámico de MSN-(CO)-CPT.

Material	Cantidad incorporada ($\mu\text{mol/g}$)	Diámetro (nm)	Intensidad %
MSN-(CO)-CPT1	14,6	190 ± 61	100
MSN-(CO)-CPT2	190	271 ± 113	98

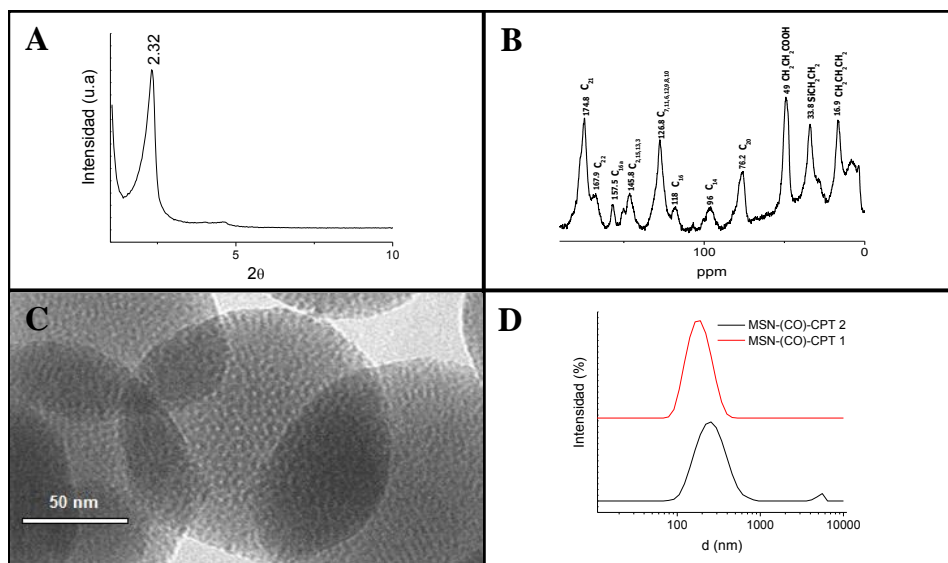


Figura 4.4. A) Espectro de difracción de rayos X del material MSN-(CO)-CPT2. B) Espectro de RMN-MAS de ^{13}C de MSN-(CO)-CPT2. C) Micrografía obtenida mediante TEM. D) Diámetro hidrodinámico de los materiales MSN-(CO)-CPT1 y MSN-(CO)-CPT2 empleando DLS.

4.3.3. Nanofármacos de sílice mesoporosa organizada de poro ultra-grande (FSN-(CO)-CPT)

Los resultados del análisis elemental obtenidos para el material FSN-COOH son los siguientes: nitrógeno 0,08 %, carbono 8,12 %, hidrógeno 1,37 % y azufre 0,10 %. El porcentaje de carbono obtenido corresponde a 1,69 mmol/g de grupos carboxilo incorporados sobre la superficie del material. A la vez que aumenta el diámetro de poro del material, también lo hace la cantidad de grupos carboxilo incorporados tras la modificación del material. De este modo, al aumentar la cantidad de grupos con carga negativa en la superficie del material se incrementa su estabilidad en disoluciones acuosas, debido a la repulsión entre cargas de mismo signo.

Tabla 4.7. Incorporación de CPT al material FSN-COOH.

CPT añadida $\mu\text{mol/g}$	CPT Incorporado %	CPT incorporada $\mu\text{mol/g}$	CPT incorporada % (m/m)	Dispersión del fármaco $\mu\text{molCPT/m}^2$
250	44	109	3,8	0,49

Se comprueba que al modificar las nanopartículas e incorporar el fármaco, disminuyen el área superficial y tanto el volumen como diámetro de poro.

Tabla 4.8. Propiedades texturales de los materiales FSN.

Material	Área BET m^2/g	Volumen poro adsorción cm^3/g	Volumen poro desorción cm^3/g	Diámetro de poro adsorción Å	Diámetro de poro desorción Å
FSN	453,1	0,76	0,83	154	63
FSN-COOH	292,3	0,64	0,65	172	60
FSN-(CO)-CPT	219,9	0,43	0,56	143	39

En la Figura 4.5.A se puede observar la variabilidad de tamaño de partícula que presenta el material FSN-(CO)-CPT, el rango comprende diámetros de menos de 100 nm y más de 300 nm. Además, el nanofármaco se presenta en forma de nanopartículas dispersas. También se puede apreciar que el tamaño de poro es sensiblemente mayor que el observado para el material MSN-(CO)-CPT.

Al igual que en los casos anteriores, al incorporar el fármaco a la superficie de las nanopartículas, estas tienden a agregarse. Como resultado, el diámetro hidrodinámico prácticamente duplica su valor. Por otro lado,

cuando el material se modifica con grupos carboxilo se observan dos poblaciones con diferente tamaño. En primer lugar, un grupo con un diámetro medio de 51 nm, que representa el 23 % de las partículas medidas y otro conjunto con un diámetro hidrodinámico de 187 nm.

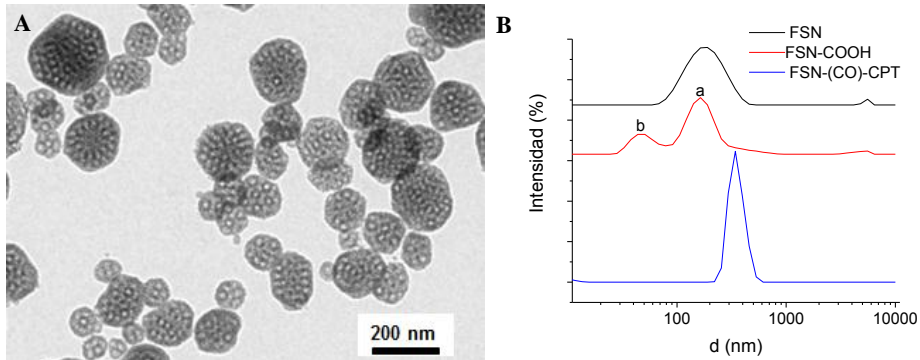


Figura 4.5. A) Imagen del material FSN-(CO)-CPT empleando TEM. B) Media del diámetro hidrodinámico del material FSN-(CO)-CPT mediante DLS.

Tabla 4.9. Diámetro hidrodinámico de los materiales FSN

Material	Diámetro (nm)	Intensidad %
FSN	190 ± 70	98
FSN-COOH	187 ± 97 ^a	75 ^a
	51 ± 13 ^b	23 ^b
FSN-(CO)-CPT	354 ± 57	96

^a Diámetro medio 51 nm y ^b Diámetro medio 187 nm. Ver figura4.5.B.

4.4. Ensayos de liberación en medio acuoso

Con el fin de establecer el material con mayor potencial terapéutico se realizaron diferentes ensayos de liberación. En los experimentos se simulaban condiciones fisiológicas para evaluar la estabilidad de los

materiales en órganos y fluidos. Además, se estudiaron los procesos que gobiernan la liberación de la CPT a partir de los nanofármacos. El material elegido se empleó en los posteriores ensayos *in vitro* e *in vivo*.

4.4.1. Influencia del pH

Todos los materiales preparados presentan gran estabilidad en disoluciones acuosas con un pH menor de 10 unidades, siendo la hidrólisis inferior al 10 % a 3 h. Por el contrario, los porcentajes de CPT liberados aumentan considerablemente a partir de pH 12. Finalmente, el material se disuelve completamente a un valor de pH 13, liberando la totalidad de la carga. Cabe mencionar que la disolución total de las nanopartículas dificulta la cuantificación de la droga.

Se puede observar que la hidrólisis básica del enlace éster del nanofármaco está favorecida frente a la hidrólisis ácida. Este hecho garantiza su estabilidad a pH fisiológico (7,4) debido a la escasa liberación del fármaco por hidrólisis no enzimática. Por otro lado, el material presenta una marcada estabilidad a un valor de pH ligeramente ácido, consecuentemente no se liberará el principio activo en los lisosomas tras el proceso de endocitosis. Así pues, la liberación de la CPT dependerá exclusivamente de la actividad enzimática, de este modo se favorece la liberación específica del fármaco en los tejidos y fluidos que contengan la enzima específica.

La robustez mostrada por el nanofármaco en un intervalo extenso de valores de pH podría facilitar su aplicación terapéutica, ya que no se liberará CPT de un modo sistémico e incontrolado a pH fisiológico. Este hecho ayudaría a reducir la toxicidad y efectos secundarios del principio activo.

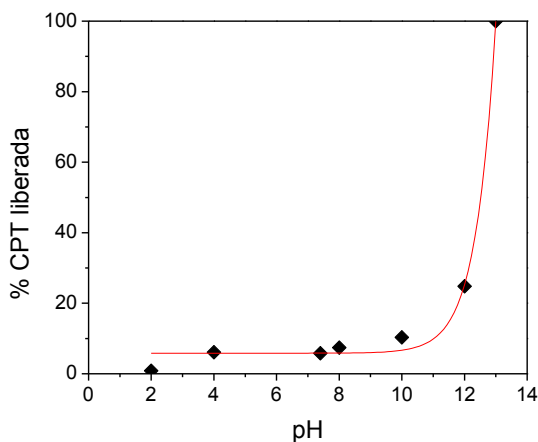


Figura 4.6. Liberación de CPT a partir del material SNP-(CO)-CPT1 en función del pH. Condiciones experimentales: T = 37 °C, t = 3 h y 5 mg/ml.

4.4.2. Influencia de la concentración de camptotecina

Para determinar la influencia que tiene la cantidad de CPT incorporada al material sobre la cinética de liberación, se llevaron a cabo ensayos a un pH de doce unidades con los materiales SNP-(CO)-CPT1 (13,7 $\mu\text{mol/g}$) y SNP-(CO)-CPT2 (150 $\mu\text{mol/g}$). Tras 24 h el material con menor cantidad de fármaco libera más de un 80 % de la carga, mientras que el material SNP-CPT-2 no alcanza el 40 %. Así pues, el material con mayor carga de CPT presenta una liberación más lenta. Esta característica es deseable para sistemas de liberación de fármacos, debido a que este tipo de cinéticas pueden ser ventajosas en los tratamientos frente al cáncer de larga duración [13]. De hecho, se ha propuesto que la combinación de una cinética de liberación lenta, con un tiempo de aclaramiento plasmático superior mejora la actividad terapéutica del nanofármaco respecto al fármaco libre [14].

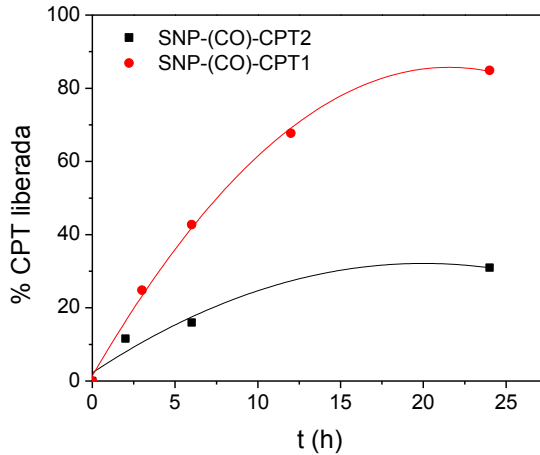


Figura 4.7. Liberación de CPT a partir de materiales SNP-(CO)-CPT con diferente carga de fármaco. Condiciones experimentales: $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 24\text{ h}$, $\text{pH} = 12$ y 5 mg/ml .

4.4.3. Influencia del diámetro de poro

En este apartado se compara la cinética de liberación de varios materiales con propiedades texturales diferentes para determinar en que medida afecta el tamaño de poro a la liberación del fármaco.

En el gráfico se observa que el material con mayor diámetro de poro (FSN-(CO)-CPT) presenta una cinética de liberación sensiblemente más rápida, liberando más del 70 % de su carga tras 24 horas. Por su parte, el material MSN-(CO)-CPT2 libera aproximadamente un 55% de CPT en el mismo periodo. Finalmente, el material SNP-(CO)-CPT2 apenas libera un 30 % para ese mismo tiempo. Así pues, en la medida que disminuye el diámetro de poro del material se dificulta la difusión interna del medio líquido lo que, a su vez, conduce a una velocidad de difusión menor de la molécula de la CPT. En el apartado siguiente se analizará la influencia de la porosidad del material y el modelo cinético de liberación del fármaco.

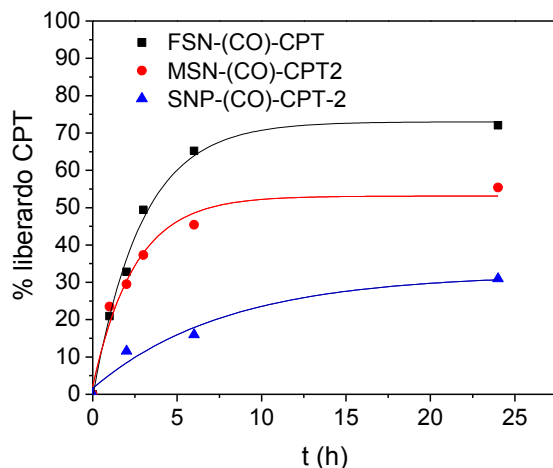


Figura 4.8. Liberación de CPT a partir de diferentes materiales con diámetro de poro variable. Condiciones experimentales: $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 24\text{ h}$, $\text{pH} = 12$ y 5 mg/ml .

4.4.4. Modelos cinéticos

El modelo cinético determina la aplicación *in vivo* del nanofármaco, tanto a nivel de administración como de toxicidad. Por ello, antes de seleccionar un vehículo de CPT para los estudios en cultivos celulares se analizó la influencia de la porosidad del material en dicho modelo cinético.

SNP-(CO)-CPT

Los datos experimentales presentan un buen ajuste a la mayoría de modelos cinéticos. El mejor coeficiente de regresión se obtiene empleando la ecuación de Higuchi, en este modelo la liberación del fármaco está gobernada por procesos de difusión. A su vez, las ecuaciones de Bhaskar y Ritger-Peppas también presentan buenos coeficientes de regresión. El parámetro n obtenido mediante la ecuación de Ritger-Peppas es inferior a $0,45$, indicando un control de la cinética por difusión al igual que en el modelo de Higuchi.

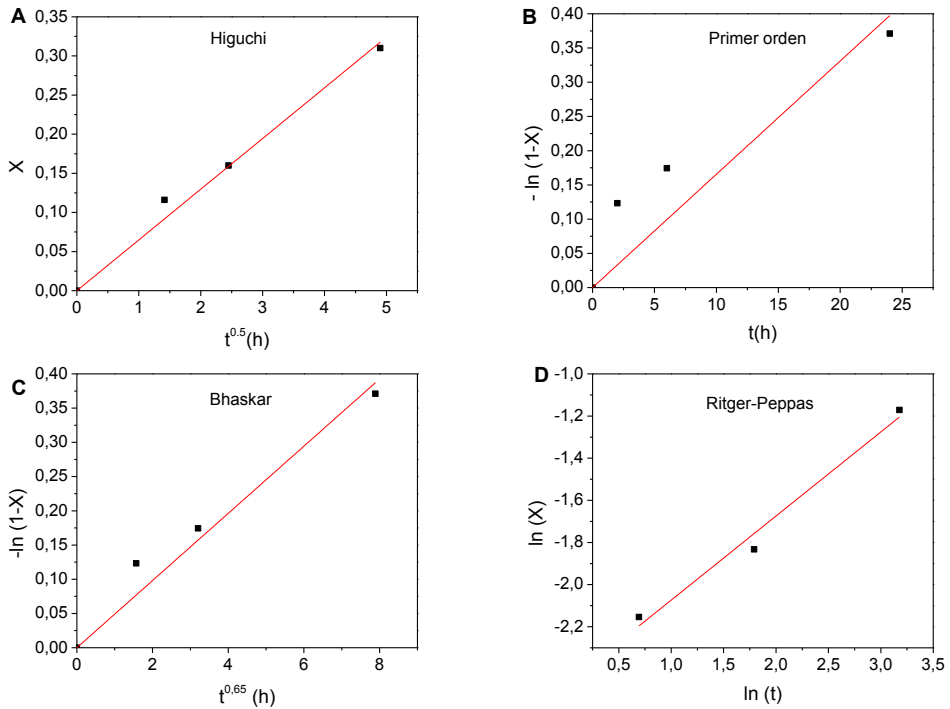


Figura 4.9. Gráficas correspondientes a diferentes modelos de liberación: A) Higuchi, B) primer orden, C) Bhaskar y D) Ritger-Peppas para SNP-(CO)-CPT2. Condiciones de proceso: T = 37 °C, t = 24 h, pH = 12 y 5 mg/ml.

Tabla 4.10. Parámetros de los diferentes modelos empleados en SNP-(CO)-CPT2.

Parámetro	Higuchi	Primer orden	Bhaskar	Ritger-Peppas
K	0,065	0,016	0,049	0,084
n				0,40
r^2	0,9952	0,9211	0,9853	0,9831

MSN-(CO)-CPT2

En este caso los resultados obtenidos se ajustan a las diferentes ecuaciones con buenos índices de correlación, si bien, al igual que en el

apartado anterior, el mejor coeficiente de correlación se obtiene empleando el modelo de Higuchi.

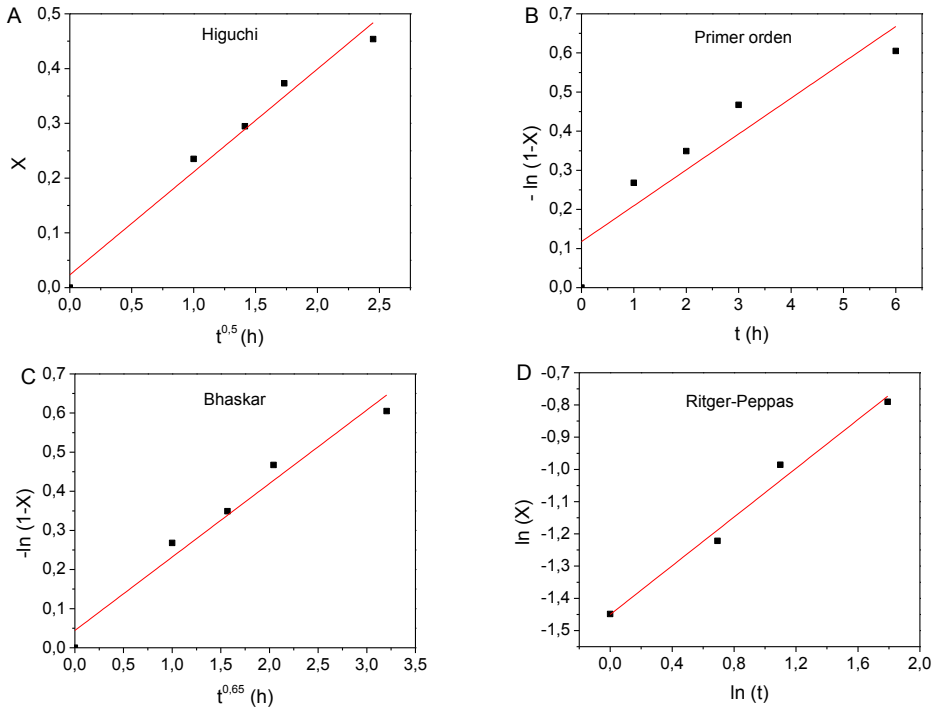


Figura 4.10. Gráficas correspondientes a diferentes modelos de liberación: A) Higuchi, B) primer orden, C) Bhaskar y D) Ritger-Peppas para MSN-(CO)-CPT2. Condiciones de proceso: $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 6\text{ h}$, $\text{pH} = 12$ y 5 mg/ml .

Tabla 4.11. Parámetros de los diferentes modelos empleados en MSN-(CO)-CPT2.

Parámetro	Higuchi	Primer orden	Bhaskar	Ritger-Peppas
K	0,201	0,120	0,207	0,235
n				0,38
r^2	0,9931	0,9248	0,9875	0,9843

FSN-(CO)-CPT

Los datos obtenidos en experimentos de liberación presentan buenos índices de correlación en el ajuste realizado según los diferentes modelos cinéticos. Los mejores resultados son los obtenidos para las ecuaciones de Higuchi y Bhaskar, modelos en los que la liberación del fármaco está gobernada por procesos de difusión.

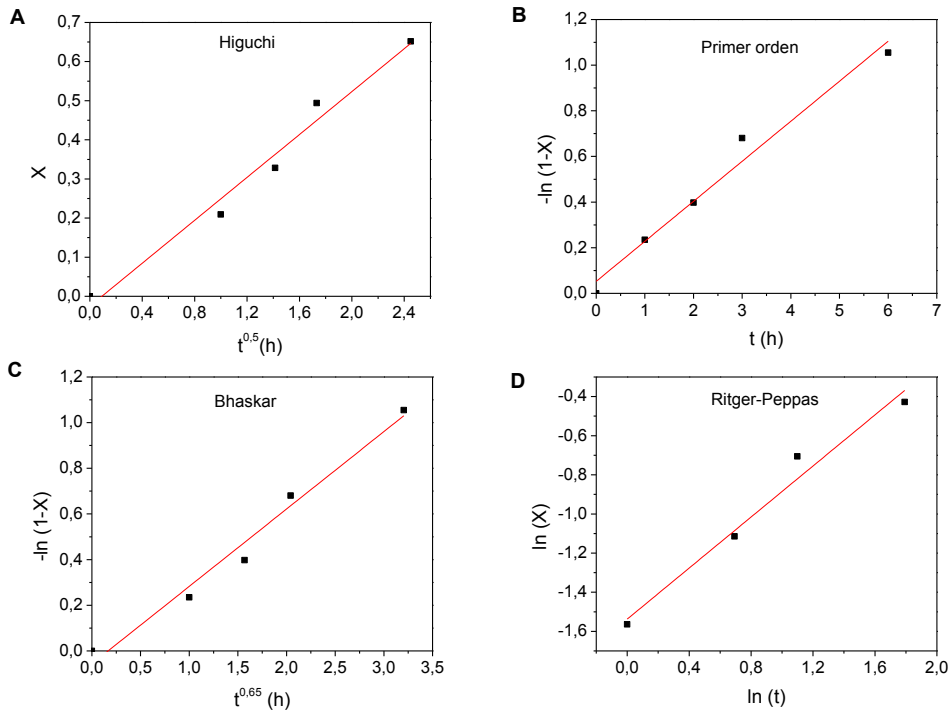


Figura 4.11. Gráficas correspondientes a diferentes modelos de liberación: A) Higuchi, B) primer orden, C) Bhaskar y D) Ritger-Peppas para FSN-(CO)-CPT. Condiciones de proceso: $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 6\text{ h}$, $\text{pH} = 12$ y 5 mg/ml .

Tabla 4.12. Parámetros de los diferentes modelos empleados en. FSN-(CO)-CPT

Parámetro	Higuchi	Primer orden	Bhaskar	Ritger-Peppas
K	0,260	0,188	0,314	0,216
n				0,65
r^2	0,9924	0,9879	0,9892	0,9751

A la luz de los resultados obtenidos, el mecanismo de difusión de es el de mayor influencia en la liberación del fármaco a tiempos inferiores a 6 h, y el modelo de Higuchi es el que mejor se ajusta a los datos experimentales en la mayoría de los casos. Comparando los valores de la K de Higuchi entre los diferentes materiales ensayados, de nuevo se observa como su valor aumenta con el diámetro de poro, de manera que $K_{FSN} > K_{MSN} > K_{SNP}$, en coherencia con los resultados obtenidos en experimentos de hidrólisis a 24 h.

4.5. Ensayos de estabilidad en medio fisiológico

En base a los resultados obtenidos sobre el modelo de liberación de CPT en los diferentes nanomateriales, para la realización de ensayos en medio fisiológico, así como para los posteriores estudios de citotoxicidad se seleccionó el nanofármaco basado en nanopartículas de sílice amorfa (SNP-(CO)-CPT) por varios motivos: en primer lugar su producción es simple y tiene un coste menor de fabricación que los materiales porosos. Esto permite su fabricación industrial y la posibilidad de adquirirlas a través de diversos distribuidores comerciales con un bajo coste. Este hecho facilitaría la producción de SNP aplicadas a la difusión de fármacos, debido a la capacidad de producir grandes cantidades de soporte con un coste limitado. Además, si bien la cantidad de fármaco incorporada es algo menor que en el caso de los materiales mesoporosos con tamaño de partícula equivalente (alrededor de un 20 %), la cantidad de fármaco presente en el soporte depende en mayor medida de la cantidad de profármaco añadido en la síntesis. Asimismo, las SNP dispensan el fármaco de un modo más pausado que el resto de materiales empleados en los experimentos

realizados. Por último, las SNP presentan una mayor resistencia mecánica y estabilidad, permitiendo un almacenamiento prolongado.

Se comprueba la estabilidad de SNP-(CO)-CPT1 en suero humano y PBS para un tiempo de 3 h. En ambos casos el porcentaje liberado es inferior al 5 % (Figura 4.12.A). El material presenta una liberación inespecífica de CPT muy baja. Algo que supone una gran ventaja en su aplicación *in vivo*, ya que la gran mayoría del fármaco permanecerá anclado al soporte tras la administración intravenosa, evitando así que la CPT alcance una distribución sistémica en el organismo. Este hecho puede suponer una reducción en la cantidad e intensidad de efectos secundarios provocados por el fármaco.

Asimismo, se ha determinado la estabilidad del material en suero humano a diferentes tiempos. Como se puede apreciar en la Figura 4.12.B, tras 24 h en suero humano el porcentaje liberado es inferior al 10 %. Indicando que el tipo de enlace empleado para unir la CPT de forma covalente al soporte inorgánico no es sensible a las esterasas plasmáticas.

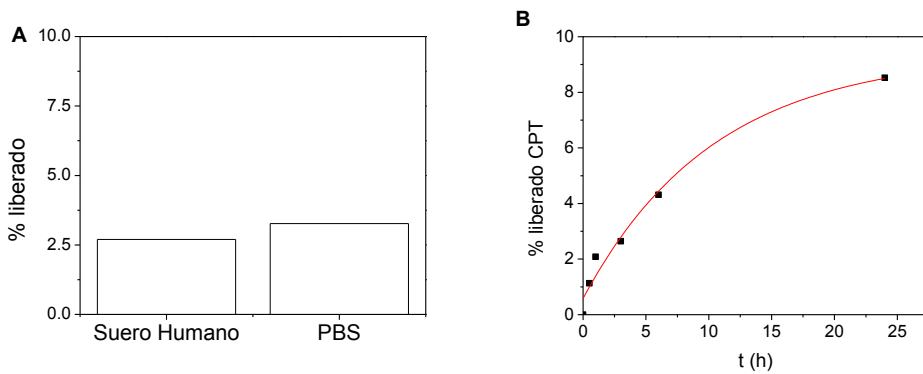


Figura 4.12. A) Porcentaje de CPT liberado a partir del material SNP-(CO)-CPT1 tras tres horas en suero humano y PBS. $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 3\text{ h}$, se emplea suero humano y una disolución de PBS. B) Ensayo de estabilidad de SNP-(CO)-CPT1 en suero humano. $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 24\text{ h}$, se emplea suero humano.

Los resultados obtenidos en los experimentos de este apartado ponen de manifiesto la robustez del nanofármaco SNP-(CO)-CPT en fluidos fisiológicos. Por lo tanto, es posible suponer que este material no liberará CPT en el torrente sanguíneo tras ser inyectado, o lo hará de manera muy lenta, evitando así efectos adversos no deseados.

4.6. Estudios en cultivos celulares

4.6.1. Ensayo MTT

Tras comprobar la estabilidad del material SNP-(CO)-CPT en medio fisiológico, se procedió a valorar su actividad antineoplásica en diferentes líneas celulares. En la Figura 4.13. se muestran imágenes correspondientes a uno de los ensayos de viabilidad celular MTT. Se puede observar como al tratar el cultivo durante 72 h con el material SNP-COOH (Figura 4.13.C) apenas se altera la supervivencia celular. Por el contrario, al añadir CPT o el nanofármaco SNP-(CO)-CPT al medio se provoca la muerte un gran número de células (Figuras 4.13.A y B).

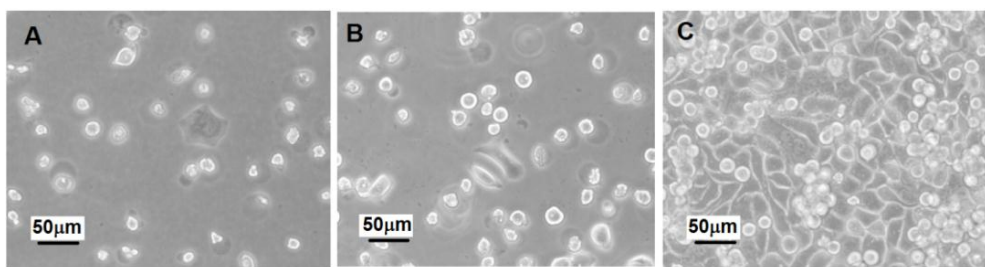


Figura 4.13. Fotografías de cultivos celulares HeLa empleando microscopio invertido tras 72 h de incubación con: A) 1,25 µg/ml de CPT. B) 1,25 µg/ml equivalentes de CPT empleando el material SNP-(CO)-CPT2. C) Material SNP-COOH.

De acuerdo a los resultados mostrados en la Figura 4.14. y en la Tabla 4.13 el material SNP-(CO)-CPT2 presenta una actividad antitumoral ligeramente inferior a la CPT en los diferentes tipos celulares, como se puede observar al comparar los valores de IC₅₀ obtenidos. Los resultados son similares a los obtenidos para otros sistemas de liberación de fármacos, ya estén unidos de forma covalente al soporte [15] o simplemente adsorbidos [16]. En este sentido debe indicarse que la liberación de la CPT mediante hidrólisis enzimática puede verse afectada por impedimentos de tipo estérico que imposibilitan la completa liberación de la carga. Además, el efecto citotóxico depende en gran medida de la línea celular, siendo HT-29.FLuc y HeLa las más sensibles. Esto podría deberse a que la CPT anclada al material se libera mediante hidrólisis enzimática del éster situado en la posición OH 20 de la molécula. Por ello, la actividad antitumoral varía dependiendo del tipo y cantidad de esterasas expresadas en cada tipo celular. Por último, el material SNP-COOH no induce muerte celular en el rango de concentraciones empleadas (hasta 0,350 mg/ml), indicando que el efecto citotóxico de SNP-(CO)-CPT2 se debe exclusivamente a la CPT liberada a partir del material y no al vehículo.

Tabla 4.13. Valores de IC₅₀ para CPT y SNP-(CO)-CPT2 en diferentes líneas celulares.

Línea celular	CPT ^a	SNP-(CO)-CPT2 ^a
HeLa	0,008 ± 0,003	0,014 ± 0,006
HT-29.FLuc	0,002 ± 0,001	0,006 ± 0,002
HCT-116	0,039 ± 0,012	0,120 ± 0,011
U-87 MG	0,061 ± 0,024	0,144 ± 0,035

^aLos valores representados indican la media y el error estándar (µg CPT/ml)

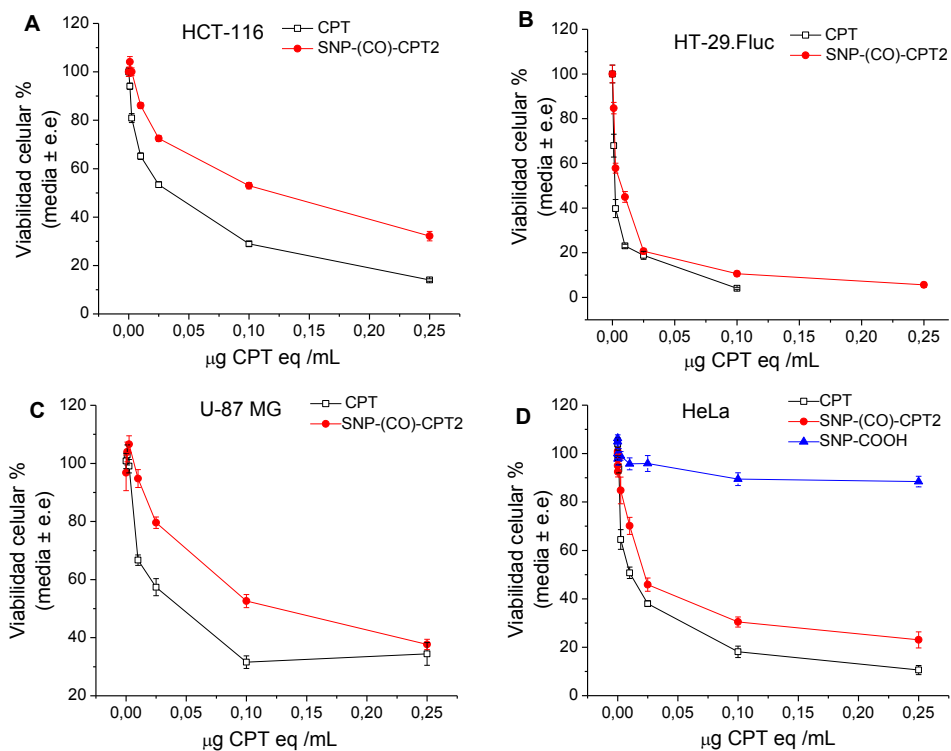


Figura 4.14. Gráficas de ensayos de viabilidad celular MTT para diferentes tipos celulares: A) HCT-116, B) HT-29.Fluc, C) U-87 MG y D) HeLa. Cada valor representa la media \pm error estándar (e.e).

4.6.2. Ensayos de internalización celular

En la Figura 4.15 se muestran los resultados del ensayo de internalización celular por microscopia confocal llevado a cabo con el nanofármaco SNP-(CO)-Cy5.5 y agentes de tinción específicos. Las imágenes A y D corresponden al marcaje celular con lysotracker®, un colorante que tiñe de forma específica los lisosomas. A su vez, las fotografías B y E corresponden a células tratadas con SNP-(CO)-Cy5.5. Como se puede apreciar en C y F, las nanopartículas colocan con la señal correspondiente al cromóforo lysotracker®. Para confirmar que las

dos señales proceden del mismo orgánulo y no a la superposición de las partículas y lisosoma en el eje vertical, se tomaron imágenes a diferentes alturas del eje z. Mediante esta técnica se determina que las dos señales provienen de un mismo plano focal lateral, confirmando la localización de las partículas en el lisosoma. Además, también se puede apreciar que al aumentar la cantidad de nanopartículas presentes en el cultivo, también aumenta la cantidad de partículas internalizadas. Estos datos indican que las nanopartículas son capaces de alcanzar el interior de la célula transportando la CPT. También revelan que el mecanismo de internalización consiste probablemente en una endocitosis dependiente de la concentración de nanopartículas presentes en el medio.

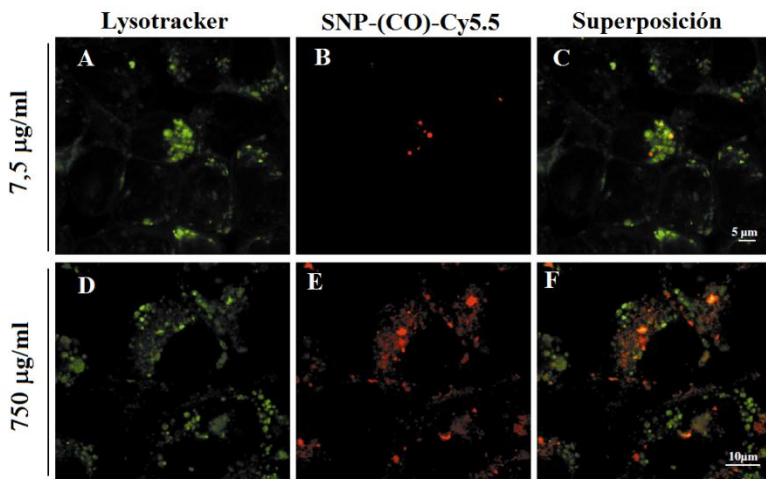


Figura 4.15. Internalización de nanopartículas a dos concentraciones diferentes empleando microscopía confocal. Las imágenes A y D corresponden a las células cultivadas con Lysotracker que tiñe exclusivamente los lisosomas. Por otro lado, se pueden apreciar las partículas del material SNP-(CO)-Cy5.5 en las fotografías B y E. Las fotografías C y F muestran la superposición de A-B y D-E respectivamente.

En la Figura 4.16. se ha llevado a cabo la cuantificación de la colocalización mostrada en la Figura 4.15. sobre una sección y área

determinada. Así, la fotografía situada a la izquierda muestra la ROI, que únicamente incluye una célula, sobre la que se realiza la cuantificación. La imagen de la derecha muestra la estadística de cuadrantes correspondiente a la medida de la señal de Lysotracker® (Ch2) y SNP-(CO)-Cy5.5 (Ch3). Como se puede apreciar en el cuadrante (Ch2+, Ch3+) la gran mayoría de puntos con señal de Cy5.5 tienen, a su vez señal del Lysotracker®, demostrando que las dos señales proceden de un mismo orgánulo.

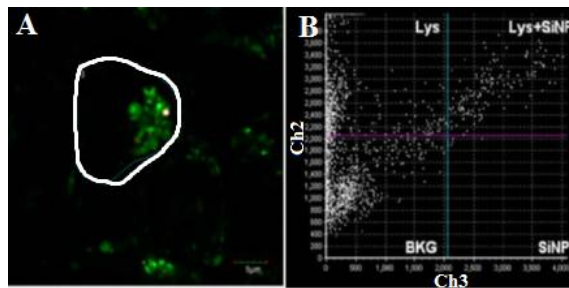


Figura 4.16. Cuantificación de la colocalización sobre una sección y área determinada. A) Región de interés (ROI) sobre la que se realiza la cuantificación. B) Cuantificación de la señal debida al Lysotracker® (Ch2) y a SNP-(CO)-Cy5.5 (Ch3).

Cabe indicar que las nanopartículas del material SNP-(CO)-Cy5.5 en ningún caso alcanza el núcleo celular. Esto se observa en las imágenes de microscopia confocal de la Figura 4.17. Así, la imagen A corresponde a la adición de dos colorantes. Por un lado el colorante DAPI, tiñe de forma específica el núcleo celular de color azul y por otro lado, el tinte lysotracker®, que marca únicamente los lisosomas de color verde. La fotografía B corresponde a las partículas de SNP-(CO)-Cy5.5 (color rojo). Finalmente, en D se puede comprobar que las partículas de sílice colocalizan exclusivamente con los lisosomas, y que no hay partículas en otros orgánulos.

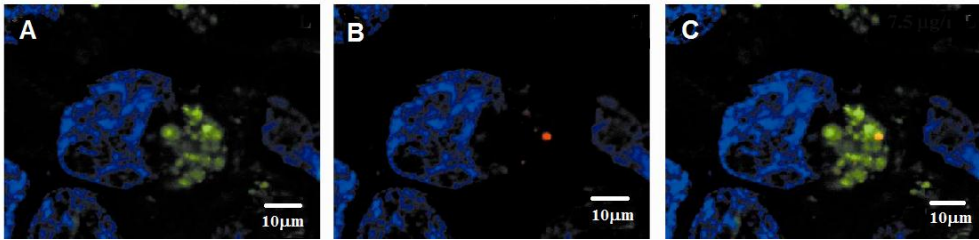


Figura 4.17. Internalización del material SNP-(CO)-Cy5.5 (7,5 $\mu\text{g/ml}$) empleando microscopia confocal. La imagen A) corresponde a la tinción celular realizada con lysotracker y DAPI, empleados para visualizar lisosomas y núcleo celular, respectivamente. Mientras que la fotografía B) corresponde a la tinción del núcleo celular con DAPI, observándose una partícula del nanofármaco. La imagen C) muestra la superposición de las fotografías A) y B).

4.6.3. Ensayo de citometría de flujo

Se estudió el mecanismo de muerte celular mediante esta técnica. Los resultados (Figura 4.18.A) indican que el tratamiento con SNP-(CO)-Cy5.5 induce un bloqueo del ciclo celular en la etapa G_2/M debido a la alteración en la estructura del ADN. Ello implica que la CPT liberada del soporte provoca la estabilización del complejo topoisomerasa I-ADN, impidiendo la unión de los extremos de la hebra de ADN e induciendo daños en la cadena [17]. Cuando esto ocurre la célula no supera el punto de chequeo G_2/M y se interrumpe el ciclo celular [18]. Aunque el bloqueo del ciclo celular puede ser reversible, si los agentes que causan el daño en la estructura del ADN permanecen, se produce una activación de los mecanismos de la muerte celular.

Este mismo efecto también se observó en las células tratadas con CPT en mayor grado, en concordancia con los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad celular. Por el contrario, no se aprecian diferencias en la distribución del ciclo celular entre el grupo control y el tratado con el

material SNP-COOH. Además, también se observó la morfología celular empleando microscopía óptica (Figura 4.18.B). La adición de CPT o SNP-(CO)-Cy5.5 sobre el cultivo celular provoca agrandamiento de las células, como es de esperar tras provocar daños en el ADN. Por otro lado, no se producen cambios en la estructura celular tras la adición de SNP-COOH en comparación con el grupo control, indicando que SNP-COOH no provocan ninguna alteración en el ciclo celular. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el ensayo MTT y en citometría de flujo.

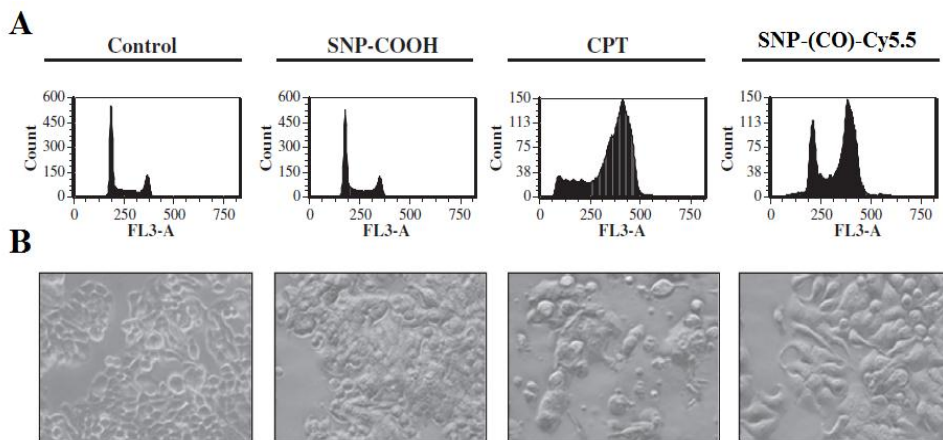


Figura 4.18. A) Citometría de flujo de células HT-29.Fluc. B) Imágenes de microscopía de contraste de fases de células HT-29.Fluc.

4.7. Conclusiones parciales

A lo largo de este capítulo se ha descrito la síntesis de nanofármacos con diferentes estructuras basadas en sílice. En primer lugar, se ha demostrado que el anclaje covalente de la Gly-CPT·TFA al soporte por formación de enlace amido es una excelente forma de incorporar el fármaco, consiguiendo materiales con una carga de hasta 290 μmol CPT/g.

Por otro lado, se ha determinado la influencia que tiene la cantidad de CPT fijada en el nanofármaco sobre el diámetro hidrodinámico. Se observó como al aumentar la cantidad de fármaco incorporado, las partículas tienden a formar agregados. Esto se debe a que la incorporación del fármaco en la superficie de las partículas aumenta su carácter hidrófobo, de tal manera que al suspender las nanopartículas en disoluciones acuosas estas tienen a agruparse para minimizar el área en contacto con la disolución.

También se ha estudiado la liberación de la CPT a partir de los nanofármacos. A través de los resultados obtenidos se ha determinado que la difusión es el fenómeno que mayor influencia ejerce sobre la liberación de CPT. Además, se investigó a cerca de la influencia del tamaño de poro sobre la liberación del fármaco, estableciendo que la constante de difusión de Higuchi aumenta a la vez que lo hace el diámetro de poro del material. Esto es debido a que al aumentar el diámetro de poro se favorece la difusión de la disolución acuosa a través de los canales, facilitando la salida de las moléculas de CPT hacia el exterior. Por otro lado, el material SNP-(CO)-CPT es el que muestra una menor constante de Higuchi, este hecho puede explicarse a causa del estado de agregación que presenta el nanofármaco, que obstaculiza la propagación de la disolución acuosa (polar) entre la agrupación de nanopartículas (hidrófobas).

Además, se comprobó la estabilidad del nanofármaco SNP-(CO)-CPT1 en disoluciones acuosas y suero humano. La escasa liberación inespecífica de CPT a pH neutro y ácido, así como en suero humano limitaría la distribución sistémica del fármaco tras la administración intravenosa. Este hecho podría suponer una disminución en la intensidad de los efectos secundarios y una mejora en la actividad terapéutica.

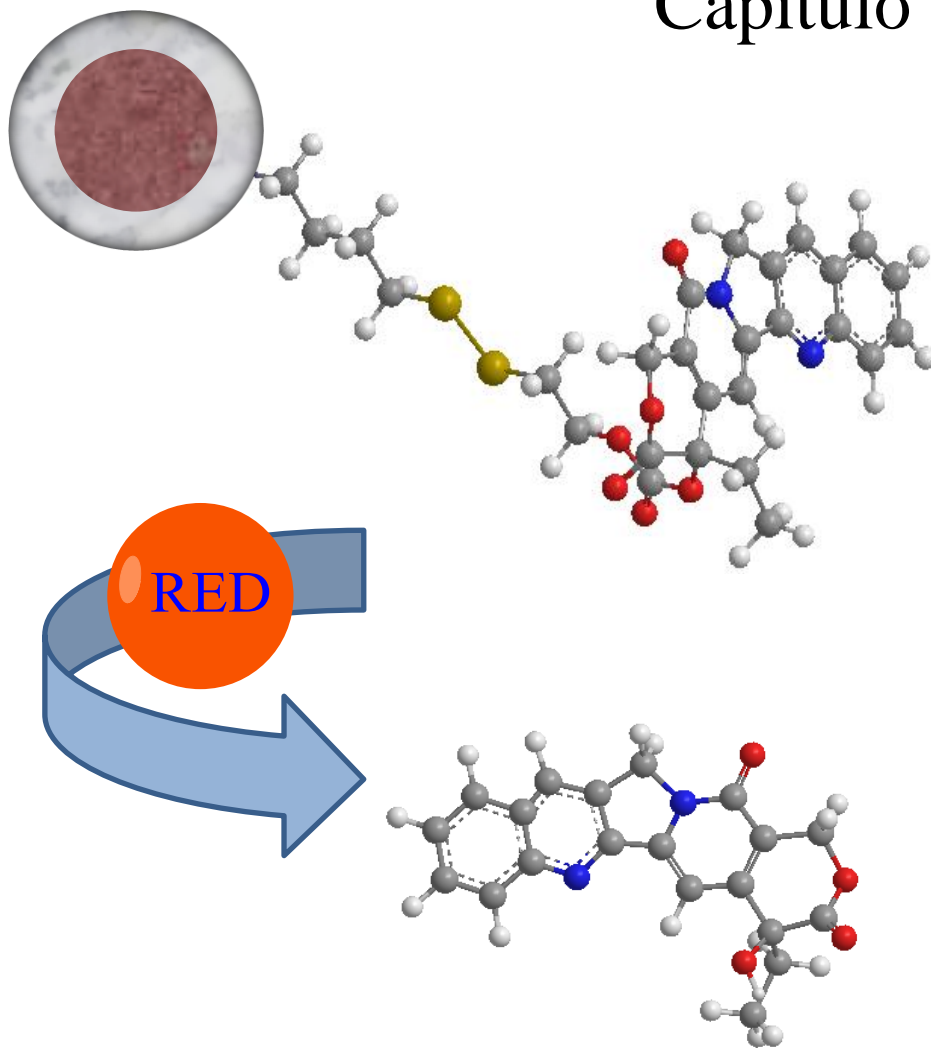
En referencia a la actividad antineoplásica del nanofármaco, cabe destacar que mostró unos valores de IC_{50} ligeramente inferiores a los obtenidos para la CPT. Este descenso en la actividad antineoplásica puede deberse a impedimentos de tipo estérico que dificultan la hidrólisis enzimática del enlace éster. Por otro lado, el material modificado con grupos carboxilo (SNP-COOH) no mostró ningún efecto tóxico a las concentraciones empleadas, confirmando que la toxicidad del nanofármaco SNP-(CO)-CPT2 depende exclusivamente de su contenido en CPT.

Por último, los resultados obtenidos en los ensayos de internalización indican que probablemente las nanopartículas se adentraron en la célula mediante un proceso de endocitosis dependiente de la concentración. También se observó que el material SNP-(CO)-CPT no alcanzó el núcleo celular. Indicando que la CPT incluida en el material se libera en el citosol debido a la acción de esterasas y difundió hacia el núcleo.

Referencias

- [1] Fukuyama, M.; Rokutan, K.; Sano, T.; Miyake, H.; Shimada, M.; Tashiro, S. *Cancer Lett.* **2005**, 221, 97-104.
- [2] Antognelli, C.; Baldracchini, F.; Talesa, V. N.; Costantini, E.; Zucchi, A.; Mearini, E. *Cancer J.* **2006**, 12, 222-228.
- [3] Tanimoto, H.; Yan, Y.; Clarke, J.; Korourian, S.; Shigemasa, K.; Parmley, T. H.; Parham, G. P.; O'Brien, T. J. *Cancer Res.* **1997**, 57, 2884-2887.
- [4] Bernardos, A.; Aznar, E.; Marcos, M. D.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Barat, J. M.; Amorós, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 5884-5887.
- [5] Coll, C.; Mondragón, L.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F.; Marcos, M. D.; Soto, J.; Amorós, P.; Pérez-Payá, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 2138-2140.
- [6] Corma, A.; Díaz, U.; Arrica, M.; Fernández, E.; Ortega, Í. *Angew. Chem.* **2009**, 121, 6365-6368.
- [7] Botella, P.; Abasolo, I.; Fernández, Y.; Muniesa, C.; Miranda, S.; Quesada, M.; Ruiz, J.; Schwartz Jr, S.; Corma, A. *J. Control. Release* **2011**, 156, 246-257.
- [8] Reale, E.; Leyva, A.; Corma, A.; Martinez, C.; Garcia, H.; Rey, F. *J. Mater. Chem.* **2005**, 15, 1742-1754.
- [9] Lu, J.; Liong, M.; Zink, J. I.; Tamanoi, F. *Small* **2007**, 3, 1341-1346.
- [10] Kovar, J. L.; Simpson, M. A.; Schutz-Geschwender, A.; Olive, D. M. *Anal. Biochem.* **2007**, 367, 1-12.
- [11] Chen, C.-Y.; Li, H.-X.; Davis, M. E. *Microporous Mater.* **1993**, 2, 17-26.
- [12] Kruk, M.; Jaroniec, M.; Sayari, A. *Langmuir* **1997**, 13, 6267-6273.
- [13] Lin, Y.-S.; Abadeer, N.; Hurley, K. R.; Haynes, C. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 20444-20457.
- [14] Schluep, T.; Cheng, J.; Khin, K.; Davis, M. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2006**, 57, 654-662.
- [15] Cheng, J.; Khin, K. T.; Jensen, G. S.; Liu, A.; Davis, M. E. *Bioconj. Chem.* **2003**, 14, 1007-1017.
- [16] Johansson, E.; Choi, E.; Angelos, S.; Liong, M.; Zink, J. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2008**, 46, 313-322.
- [17] Hertzberg, R. P.; Caranfa, M. J.; Hecht, S. M. *Biochemistry (Wash.)* **1989**, 28, 4629-4638.
- [18] Macpherson, J. S.; Cummings, J.; Meikle, I.; Miller, E. P.; Smyth, J. F. *Eur. J. Cancer* **1997**, 33, 280-283.

Capítulo 5



Sistemas basados en mecanismos redox

5. Sistemas de liberación basados en mecanismos redox

5.1. Fundamento

Este tipo de sistemas se ha empleado con éxito en diferentes tipos de soportes como: micelas, cápsulas, polímeros, nanogeles y nanopartículas de sílice mesoporosa [1]. En el caso más habitual, la liberación del fármaco depende de la reducción de enlaces disulfuro, aprovechando la diferencia de potencial redox existente entre el exterior celular y el citoplasma [2-3].

El gradiente de potencial redox se genera gracias a la presencia de agentes reductores como nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), ácido dihidrolipoico (DHLA), tioredoxina (Trx), peroxiredoxinas (Prx) y glutatión (GSH) en el citosol [4-5].

Dicha característica permite la liberación del principio activo de forma selectiva en el interior celular. Además, al producirse una sobreexpresión de GSH en células tumorales [6], se potencia la escisión del enlace disulfuro en el interior de las células patológicas frente a las células sanas.

Por otro lado, cuando la reducción del enlace promueve la ruptura de otros enlaces dentro de la molécula se habla de mecanismos de tipo *self-immolative* [7].

En este caso, el lugar de activación del profármaco es diferente al de escisión [8]. Existen diferentes ejemplos de aplicación de estos sistemas en la difusión de diferentes agentes terapéuticos como antibióticos [9] y agentes antitumorales [10-14].

En este capítulo se han empleado nanofármacos sensibles a la acción de estímulos reductores, que liberaron CPT mediante un mecanismo *self-*

immolative [15]. A continuación se procede a desarrollar la síntesis y caracterización de los profármacos y nanofármacos preparados.

5.2. Preparación y caracterización de los profármacos de CPT

El proceso global de la síntesis de precursores y profármacos se esquematiza en la Figura 5.1.

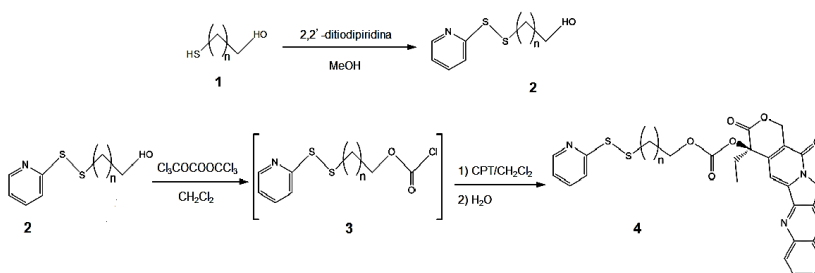


Figura 5.1. Esquema de síntesis de los precursores (2) y profármacos (4).

5.2.1. Preparación y caracterización de los precursores de los profármacos de CPT

Se obtuvieron tres precursores con la estructura indicada en la Figura 5.1.(2). Se diferencian entre si por el número de carbonos de la cadena lateral ($n = 1, 2, 3$).

2-(piridin-2-ildisulfanil)etanol ($n = 1$)

El compuesto se obtuvo con un rendimiento del 80 % y una pureza del 85 %. Los resultados de espectrometría de masas indican un valor m/z de 187 que corresponde a $[M]^+$. La molécula también se caracterizó empleando RMN (Figura 5.2.).

3-(piridin-2-ildisulfanil)propan-1-ol (n = 2)

Se alcanzó un rendimiento del 64 % y una pureza del 99 %. Los resultados de espectrometría de masas indican un valor m/z de 201 correspondiente a $[M]^+$. En lo que refiere a la caracterización mediante RMN, se realizaron experimentos de ^1H y ^{13}C (Figura 5.2.).

4-(piridin-2-ildisulfanil)butan-1-ol (n = 3)

Se consiguió un rendimiento del 83 % y una pureza del 93 %. Los resultados de espectrometría de masas indican un valor de m/z de 216, que se asigna a $[M+H]^+$. Se empleó RMN para concluir la caracterización del compuesto (Figura 5.2.).

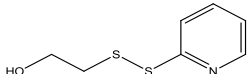
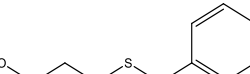
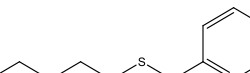
 <p style="text-align: center;">n = 1</p>	<p>^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 8,52(d,1H); 7,58(t,1H); 7,42 (d,1H); 7,13 (t,1H); 3,81 (t,2H); 2,97 (t,2H).</p> <p>^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 159,14; 149,82; 136,84; 121,87; 121,48; 58,30; 42,69.</p>
 <p style="text-align: center;">n = 2</p>	<p>^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 8,46 (dd,1H); 7,58 (m,2H); 7,03(m,1H); 3,71(t,2H); 2,89 (t,2H); 1,87 (m,2H).</p> <p>^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 159,38; 147,67; 139,24; 121,55; 120,19; 60,54; 36,34; 31,42.</p>
 <p style="text-align: center;">n = 3</p>	<p>^1H (300 MHz, MeOD) δ 8,36 (s,1H); 7,83 (m,2H); 7,21 (s,1H); 2,80 (d,2H); 1,71 (d,2H); 1,58 (d,4H).</p> <p>^{13}C (75 MHz, MeOD) δ 161,41; 150,07; 140,84; 123,21; 122,38; 62,69; 40,50; 32,60; 26,81.</p>

Figura 5.2. Señales de RMN (^1H y ^{13}C) correspondientes a cada uno de los precursores.

5.2.2. Preparación y caracterización de los profármacos

A partir de los precursores anteriores se obtuvo 3 profármacos de CPT de acuerdo a la estructura mostrada en la figura 5.1.(4). Por tanto, n puede ser 1,2 o 3.

Piridilditioetil carbonato de camptotecina (CPT-OCOO-C2-SS-Py, n=1)

Empleando HPLC-MS se cuantificó la pureza, alcanzando hasta un 95% (60-95%). Se pudo observar que el tiempo de retención para CPT-OCOO-C2-SS-Py (25 min) es sensiblemente mayor que el de la CPT debido al marcado carácter hidrófobo del profármaco (Figura 5.3.A). La masa obtenida mediante esta técnica es 562,1 [M+H]⁺.

Para confirmar la obtención del profármaco se realizó un análisis de espectroscopia de masas con un equipo Q-tof obteniendo una masa de 560,0948 que corresponde a la fórmula molecular C₂₈H₂₂N₃O₆S₂ (masa calculada 560,0950).

Así pues se asignó el valor obtenido al ion [M-H]⁺. La molécula también se caracterizó empleando RMN, en la Figura 5.4. se detallan las señales obtenidas para cada espectro.

Piridilditiopropil carbonato de camptotecina (CPT-OCOO-C3-SS-Py, n=2)

El compuesto se analizó mediante HPLC-MS. Los resultados indican una pureza de hasta un 90% (75-90%). El tiempo de retención es de 30 min (Figura 5.3.B) y la masa obtenida el 576,2 que corresponde a [M+H]⁺.

Para ratificar la síntesis del compuesto se empleó un equipo Q-tof, obteniendo como resultado una masa de 574,1126 que encaja con la fórmula molecular C₂₉H₂₄N₃O₆S₂ (masa calculada 574,1107). De esta forma, la señal

se asigna a $[M-H]^+$. El producto de la reacción también se caracterizó mediante RMN (Figura 5.4.).

Piridilditiobutil carbonato de camptotecina (CPT-OCOO-C4-SS-Py, n=3)

Con el fin de obtener su pureza se analizó mediante HPLC-MS alcanzando hasta un valor del 85 % (75-85%). Mediante esta técnica se obtiene una masa de 590,2 que se asigna a $[M+H]^+$. El compuesto mostró un tiempo de retención de 37,8 min (Figura 5.3.C).

De esta forma, a medida que aumenta el número de átomos de carbono entre el enlace disulfuro y el grupo carbonato aumenta el tiempo de retención del profármaco, indicando un incremento en el carácter hidrófobo de la molécula.

La síntesis del compuesto se constató empleando un equipo Q-tof, obteniendo una masa de 588,1294 que pertenece a $C_{30}H_{26}N_3O_6S_2$ (masa calculada 588,1263), asignando la señal a $[M-H]^+$. La caracterización de CPT-OCOO-C4-SS-Py concluyó con técnicas de RMN (Figura 5.4.)

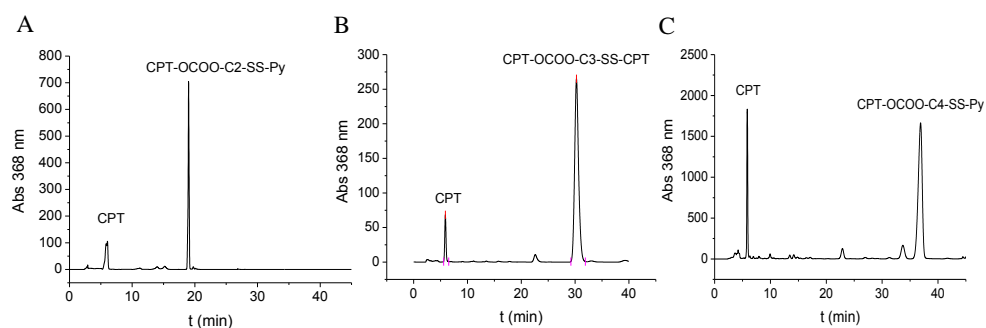


Figura 5.3. Cromatogramas correspondientes a los profármacos sintetizados: (A) CPT-OCOO-C2-SS-Py (84 %). (B) CPT-OCOO-C3-SS-Py (90 %). (C) CPT-OCOO-C4-SS-Py (83 %).

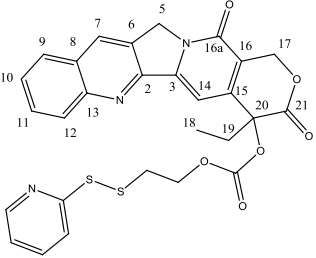
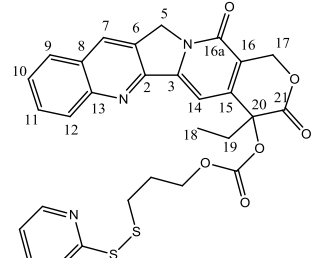
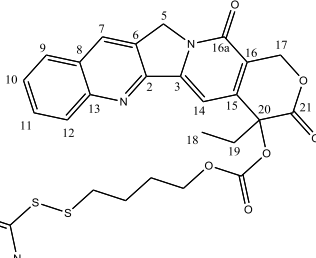
 <p style="text-align: center;">n = 1</p>	<p>¹H (300MHz, DMSO-d₆) δ 0,92 (t,3H, H18); 2,18 (m,2H, H19); 3,14 (t,2H, S-CH₂CH₂); 4,33 (t,2H, O-CH₂CH₂); 5,23 (dd, 2H, H5); 5,52 (d,2H, H17); 7,09 (s,1H, H14); 7,15 (m, 1H, Py-H); 7,70 (m ,2H, Py-H); 7,77 (m, 1H,H10); 7,85 (m,1H, H11); 8,10 (m,2H,H9 & H12); 8,39 (dt, 1H, Py-H); 8,64 (s,1H, H7).</p> <p>¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 172,41 C21; 166,99 -OCOO-; 158,57 C Py; 156,40 C16a; 152,70 C2; 149,49 C Py; 147,80 C15; 146,18 C13; 144,64 C3; 137,63 C Py; 131,48 C7; 130,32 C11; 129,62 C6; 128,90 C12; 128,42 C9; 127,90 C8; 127,66 C10; 121,19 C16; 119,32 C Py; 119,14 C Py; 94,35 C14; 77,90 O-CH₂ CH₂; 72,34 C20; 66,14 C17; 50,22 C5; 36,72 S-CH₂ CH₂; 30,29 C19; 7,51 C18.</p>
 <p style="text-align: center;">n = 2</p>	<p>¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 0,90 (t,3H, H19); 1,96 (m,2H, CH₂CH₂CH₂); 2,17 (m,2H, H18); 2,84 (t ,2H, S-CH₂CH₂); 4,20 (t , 2H, O-CH₂CH₂); 5,30 (dd,2H, H5); 5,51 (d,2H, H17); 7,07 (s,1H, H14); 7,20 (m,1H, Py-H); 7,72 (m ,3H, H10 y Py-H); 7,86 (m,1H, H11); 8,14 (m,2H, H9 y H12); 8,40 (dt,1H, Py-H); 8,70 (s,1H, H7).</p> <p>¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 172,41 C21; 166,99 -OCOO-; 158,57 C Py; 156,40 C16a; 152,70 C2; 149,49 C Py; 147,80 C15; 146,18 C13; 144,64 C3; 137,63 C Py; 131,48 C7; 130,32 C11; 129,62 C6; 128,90 C12; 128,42 C9; 127,90 C8; 127,66 C10; 121,19 C16; 119,32 C Py; 119,14 C Py; 94,35 C14; 77,90 O-CH₂ CH₂; 72,34 C20; 66,14 C17; 50,22 C5; 34,94 S-CH₂ CH₂; 31,74 CH₂ CH₂ CH₂; 30,29 C19; 7,51 C18.</p>
 <p style="text-align: center;">n = 3</p>	<p>¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 0,91 (t,3H, H19); 1,76 (m,2H, CH₂CH₂CH₂); 1,97 (m,2H, CH₂CH₂CH₂); 2,16 (m,2H, H18); 2,88 (t,2H, S-CH₂CH₂); 4,20 (t,2H, O-CH₂CH₂); 5,29 (s,2H, H5); 5,52 (d,2H, H17); 7,06 (s,1H, H14); 7,19 (m,1H, Py-H); 7,36 (m ,3H, H10 y Py-H); 7,78 (m,1H, H11); 8,11 (m,2H, H9 y H12); 8,44 (dt,1H, Py-H); 8,69 (s,1H, H7).</p> <p>¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 172,39 C21; 167,08 -OCOO-; 158,86 C Py; 156,44 C16a; 152,13 C2; 149,49 C Py; 147,85 C15; 146,22 C13; 144,80 C3; 137,59 C Py; 131,48 C7; 130,36 C11; 129,62 C6; 128,95 C12; 128,48 C9; 127,99 C8; 127,70 C10; 121,11 C16; 119,23 C Py; 119,11 C Py; 96,66 C14; 77,76 O-CH₂ CH₂; 72,34 C20; 66,96 C17; 50,28 C5; 34,15 S-CH₂CH₂; 31,75 CH₂ CH₂ CH₂; 30,22 C19; 27,53 CH₂CH₂CH₂; 7,50 C18.</p>

Figura 5.4. Señales de RMN correspondientes a los experimentos de ¹H y ¹³C realizados a los diferentes profármacos sintetizados.

5.3. Preparación y caracterización de nanofármacos de camptotecina

Materiales funcionalizados con grupos tiol (RhB-SiO₂@MSN-SH)

Antes de proceder a la funcionalización del material RhB-SiO₂@MSN con grupos tiol se realizó un análisis elemental del mismo, obteniendo los siguientes porcentajes: 0,53 nitrógeno, 4,13 carbono, 1,62 hidrógeno y 0 azufre.

La cantidad de carbono analizada corresponde a 98 μ mol del derivado de rodamina (TRITC-APTES) por gramo de material. Tras incorporar los grupos tiol se repite el análisis, obteniendo un porcentaje del 1,8 % en azufre correspondiente a 0,58 mmol de grupos tiol por g.

Tabla 5.1. Características texturales, diámetro hidrodinámico y potencial ζ del

Material	A _{BET} (m ² /g)	V _p (cm ³ /g)	D _p (Å)	Diámetro (nm)	Intensidad %	Potencial ζ (mv)
RhB-SiO ₂ @MSN-SH	314,73	0,32	45,3	109 \pm 60	100	-14 \pm 5

material RhB-SiO₂@MSN-SH.

A_{BET} (Área BET); V_p (Volumen de poro) ;D_p (Diámetro de poro, calculado según KJS [16]).

La caracterización de este material por espectroscopia de RMN-MAS de ²⁹Si muestra los picos Q₄ (-111 ppm), Q₃ (-102 ppm) y Q₂ (-93 ppm) correspondientes a (Si(OSi)₄), (Si(OH)(OSi)₃) y (Si(OH)₂(OSi)₂), respectivamente (Figura 5.5.A).

Además, también aparecen las señales correspondientes a T₃ (-67 ppm), T₂ (-57 ppm) y T₁ (-49 ppm) asignadas respectivamente, a (C-Si(OSi)₃), (C-Si(OH)(OSi)₂) y (C-Si(OH)₂(OSi)). También se integró el área

correspondiente a cada una de las señales del espectro para calcular el siguiente ratio [17]:

$$\frac{T_1 + T_2 + T_3}{Q_4 + Q_3 + Q_2}$$

De esta forma, se obtuvo un valor de contenido de carbono del material del 5,84 %, similar al obtenido mediante análisis elemental (5,38 %). En este caso la cantidad de carbono analizada proviene de dos silanos diferentes, TRICT-APTES, incluido en el núcleo amorfo, y 3-(mercaptopropil)trimetoxi silano, empleado para modificar la superficie del material. El porcentaje de carbono analizado corresponde a la incorporación de los dos silanos. Asimismo, la caracterización por espectroscopia de UV-vis y de fluorescencia permite discernir los máximos de absorbanza y emisión correspondientes a la RhB incluida en el núcleo del material (Figuras 5.5.B y 5.5.C). Se comprueba que el recubrimiento de sílice mesoporosa no afecta a las propiedades fotofísicas de los núcleos dopados con RhB. Además, no se produce desactivación fluorescente (*quenching*) a las concentraciones de cromóforo empleadas.

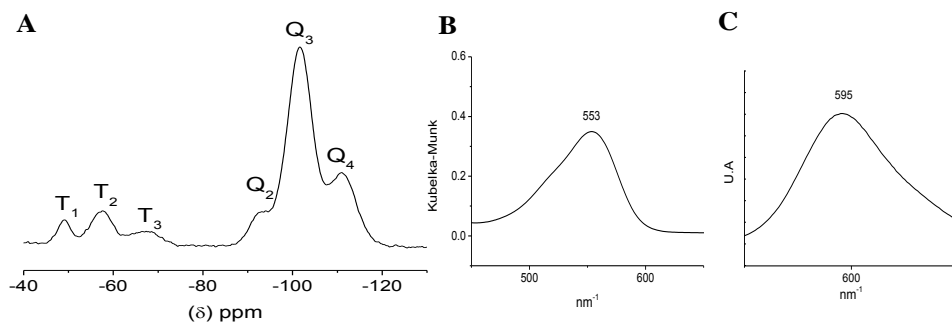


Figura 5.5. A) Espectro de RMN-MAS ^{29}Si de RhB-SiO₂@MSN-SH. Espectros de absorción UV-vis (B) y emisión de fluorescencia (C) de RhB-SiO₂@MSN-SH.

Materiales funcionalizados con grupos tiol y CPT

(RhB-SiO₂@MSN-SS-Cn-CPT)

De acuerdo con la tabla 3.1. del capítulo 3º, se ha sintetizado tres nanofármacos diferentes en función del número de carbonos del ligando que une la CPT a la nanopartícula, y que, genéricamente se definen como RhB-SiO₂@MSN-SS-Cn-CPT, donde n=2,3,4. El esquema general de preparación de este tipo de nanofármacos se muestra en la Figura 5.6.

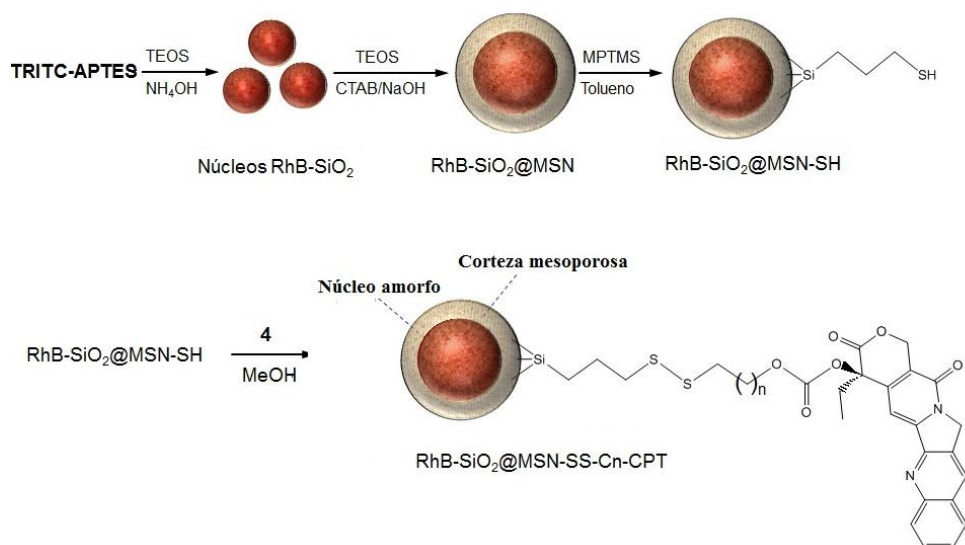


Figura 5.6. Esquema de síntesis de los nanofármacos RhB-SiO₂@MSN-SS-Cn-CPT

En primer lugar se realizó la síntesis del nanofármaco RhB-SiO₂@MSN-SS-C2-CPT a partir del material RhB-SiO₂@MSN-SH sin ningún tipo de pretratamiento. De este modo se anclaron 47,7 µmoles CPT/g, que corresponde a un 8 % de rendimiento en el proceso de incorporación del profármaco (Tabla 5.2). Siendo el porcentaje incorporado

tan bajo, se intentó mejorarlo realizando una reducción previa del soporte RhB-SiO₂@MSN-SH.

Para ello se añadieron las nanopartículas a una disolución 100 mM de ditioneitol (DTT), manteniendo la suspensión en agitación durante 30 min. De esta forma se regeneraron los grupos tiol, que expuestos al oxígeno atmosférico y radiación UV tienden a oxidarse para formar sulfonatos [18].

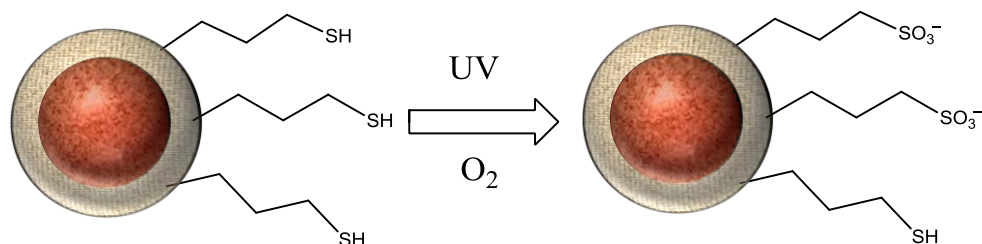


Figura 5.7. Representación de la oxidación de grupos tiol en RhB-SiO₂@MSN-SH.

Los nanofármacos preparados con dicho pretratamiento alcanzaron una carga de fármaco cercana a los 100 μ moles CPT/g. Este hecho se debe a que al regenerar los grupos tiol en la superficie del material, aumenta la cantidad de centros activos disponibles para el anclaje del derivado de la CPT.

Este mismo procedimiento se aplicó para sintetizar los nanofármacos SiO₂@MSN-SS-C3-CPT y SiO₂@MSN-SS-C4-CPT (Tabla 5.2). Se observa que en la medida en que se incrementa el número de carbonos (n) entre el enlace disulfuro y el grupo carbonato la cantidad de profármaco incorporado a las nanopartículas disminuye.

Ello es debido al aumento del carácter hidrófobo con el valor de n , lo que dificulta la interacción del profármaco con la superficie del soporte.

Al igual que en los materiales descritos en el capítulo anterior, al aumentar la cantidad de profármaco incorporado el área y el volumen de poro disminuyen. En este caso el diámetro de poro apenas varía.

Tabla 5.2. Características composicionales y texturales de los materiales RhB-SiO₂@MSN-SS-C_n-CPT.

Material	CPT incorporada		% incorporado	A _{BET} (m ² /g)	V _p ^(b) (cm ³ /g)	D _p ^(c) (Å)
	(μmol/g)	% (p/p)				
C2* ^(a)	47,7	1,7	8,0	139,40	0,16	33,7
C2	99,6	3,5	16,7	114,93	0,11	34,2
C3	57,0	2,0	9,6	164,51	0,15	38,1
C4	7,4	0,25	1,7	537,87	0,28	34,9

(a) Sin reducción previa con DTT. (b) Volumen de poro (V_p). (c) Diámetro de poro calculado según KJS [16] (D_p).

El nanofármaco RhB-SiO₂@MSN-SS-C2-CPT es el único que presenta un tamaño adecuado para su aplicación *in vivo*, ya que es el único material con un diámetro hidrodinámico inferior a 200 nm. Además, la carga negativa superficial que posee facilita su suspensión en disoluciones acuosas.

Los otros dos nanofármacos presentan un diámetro hidrodinámico con un valor cercano a los 400 nm. Este tamaño favorece la captación de las nanopartículas por parte del SRE, dificultando su aplicación en inyectables.

Como se puede observar en la Tabla 5.3, en la medida que aumenta la longitud de la cadena lateral de carbonos se observa un notable incremento del tamaño de partícula.

Ello es debido al mayor carácter hidrófobo del profármaco incorporado, provocando que las nanopartículas tiendan a agregarse cuando se suspenden en disoluciones acuosas.

Tabla 5.3. Diámetro hidrodinámico y potencial ζ de los nanofármacos RhB-SiO₂@MSN-SS-Cn-CPT.

Material	Diámetro (nm)	Intensidad %	Potencial ζ (mv)
RhB-SiO ₂ @MSN-SS-C2-CPT	122 ± 39	100	-17 ± 7
RhB-SiO ₂ @MSN-SS-C3-CPT	363 ± 198	78	-9 ± 6
RhB-SiO ₂ @MSN-SS-C4-CPT	440 ± 80	98	-14 ± 4

La caracterización por espectroscopia de RMN-MAS de ¹³C muestra las bandas correspondientes a diferentes carbonos del profármaco y del silano empleado en la funcionalización del material, probando la incorporación del profármaco al soporte (Figura 5.8).

Las dos bandas presentes en el espectro corresponden a los máximos de absorción de la CPT y RhB.

Por otro lado, las imágenes de TEM muestran partículas monodispersas de un tamaño cercano a los 60 nm.

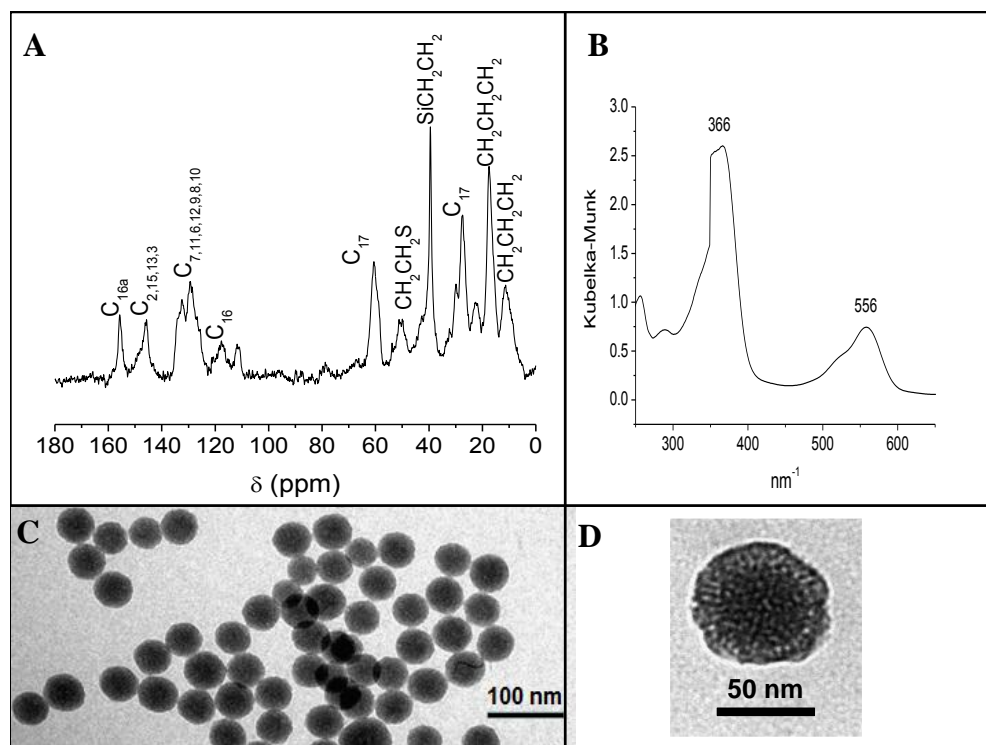


Figura 5.8. A) Espectro de RMN-MAS de ^{13}C del nanofármaco RhB-SiO₂@MSN-SS-C2-CPT (ver figura 5.4). B) Espectro de absorción de UV-vis. C) y D) Micrografías obtenidas mediante TEM.

Materiales funcionalizados con grupos carboxilo y CPT

(RhB-SiO₂@MSN-(CO)-CPT)

Con la finalidad de comparar la efectividad de los sistemas basados en la actividad enzimática frente a los basados en estímulos reductores se sintetizó el nanofármaco RhB-SiO₂@MSN-(CO)-CPT.

Este contiene la misma base estructural RhB-SiO₂@MSN, si bien en este caso se funcionaliza la misma con grupos carboxilo (RhB-SiO₂@MSN-COOH), para poder fijar Gly-CPT·TFA en el soporte, de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 4.3, si bien, en este caso se realizaron

pequeñas modificaciones para conseguir una carga de fármaco en torno a los 50 μmol CPT/g.

Al incorporar Gly-CPT·TFA sobre el soporte se produce una reducción en el área superficial y volumen de poro, al igual que en ocurre para el material MSN-(CO)-CPT (Tabla 5.4.).

Asimismo, se observa como el diámetro hidrodinámico aumenta considerablemente al incorporar Gly-CPT·TFA al material, prácticamente quintuplicando su valor (Tabla 5.5.), lo que podría dificultar posibles aplicaciones *in vivo*.

Tabla 5.4. Características físico-químicas de los materiales RhB-SiO₂@MSN-COOH y RhB-SiO₂@MSN-(CO)-CPT.

Material	CPT incorporada		% incorporado	A _{BET} (m ² /g)	Vp (cm ³ /g)	Dp (Å)
	(μmol /g)	% (p/p)				
RhB-SiO ₂ @MSN-COOH	-	-	-	537,35	0,21	28,6
RhB-SiO ₂ @MSN-(CO)-CPT	44,5	1,6	56,3	449,62	0,11	29,1

A_{BET} (Área BET); Vp (Volumen de poro); Dp (Diámetro de poro, calculado según KJS [16]).

Tabla 5.5. Diámetro hidrodinámico y potencial ζ de los materiales RhB-SiO₂@MSN-COOH y RhB-SiO₂@MSN-(CO)-CPT.

Material	Diámetro (nm)	Intensidad %	Potencial ζ (mv)
RhB-SiO ₂ @MSN-COOH	81 \pm 26	100	-18 \pm 9
RhB-SiO ₂ @MSN-(CO)-CPT	447 \pm 71	100	-10 \pm 4

5.4. Ensayos de liberación en medio reductor

Los profármacos sintetizados en el apartado 5.2.2 presentan un enlace disulfuro en su estructura. Mediante la adición de agentes reductores este enlace se escinde, liberando una molécula de 2-mercaptopiridina.

Además, el grupo tiol generado en la cadena del profármaco puede atacar el grupo carbonilo situado a n+1 carbonos de distancia. De este modo, se produce una ciclación intramolecular que libera una molécula de CPT y genera una molécula de la tiolactona cíclica correspondiente.

Así pues, la liberación de la CPT consta de dos etapas. En primer lugar se produce la reducción del enlace disulfuro, y a continuación una ciclación intramolecular que da lugar a la formación de la CPT libre y la tiolactona correspondiente.

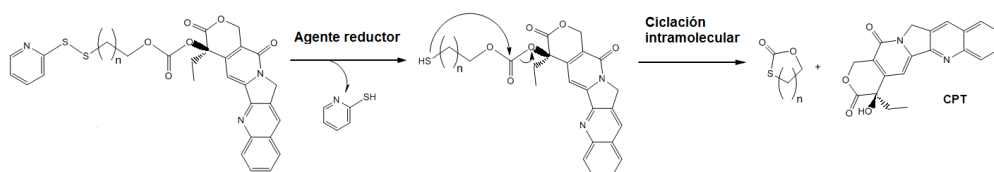


Figura 5.9. Esquema de liberación de la CPT a partir de los profármacos.

A continuación se pasa a describir la influencia de las variables del proceso en la liberación de CPT por los diferentes nanofármacos preparados.

5.4.1. Influencia de la concentración de DTT

En este apartado se estudia la influencia que tiene la cantidad de agente reductor añadido sobre la liberación de la CPT. Para ello se realizó un ensayo de liberación en PBS sobre el material RhB-SiO₂@MSN-SS-C2-

CPT con una duración de 300 min empleando diferentes concentraciones de DTT. Los resultados se muestran en la Figura 5.10.

Como se puede observar, conforme aumenta la concentración del agente reductor aumenta el porcentaje de CPT liberada, hasta alcanzar el valor del 100 % para una concentración de 50 mM.

Además, se produce una liberación superior al 50 % para una concentración de 5 mM, la más baja empleada en el experimento. Esto demuestra la sensibilidad de los nanofármacos a los estímulos reductores, incluso a concentraciones bajas de agente reductor.

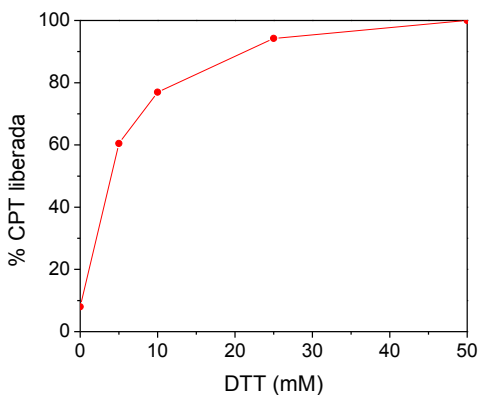


Figura 5.10. Liberación de CPT en PBS a diferentes concentraciones del agente reductor empleando el material RhB-SiO₂@MSN-SS-C2-CPT. Condiciones de proceso (T = 37 ° C, t = 3 h, agente reductor DTT, 5 mg/ml).

5.4.2. Influencia del tiempo en la liberación

Tal y como se muestra en la Figura 5.11, en todos los casos, tras el periodo de exposición al medio fisiológico en ausencia de agentes reductores (2 h), se produce una liberación inespecífica que varía según el material entre el 0,9 y el 8 %.

Tras la adición de DTT, tiene lugar la reducción del enlace disulfuro con gran rapidez, si bien sólo el material RhB-SiO₂@MSN-SS-C2-CPT libera CPT.

Los otros dos nanofármacos no generan CPT, debido a que no se origina la ciclación intramolecular entre el tiol y el carbonato.

Se observa un incremento en la estabilidad del compuesto reducido a medida que aumenta la distancia entre el grupo carbonilo y el tiol. Según resultados publicados anteriormente, esto se debe a que la formación de anillos más grandes (6-7 miembros) está menos favorecida que la formación de la tiolactona cíclica de 5 miembros [19].

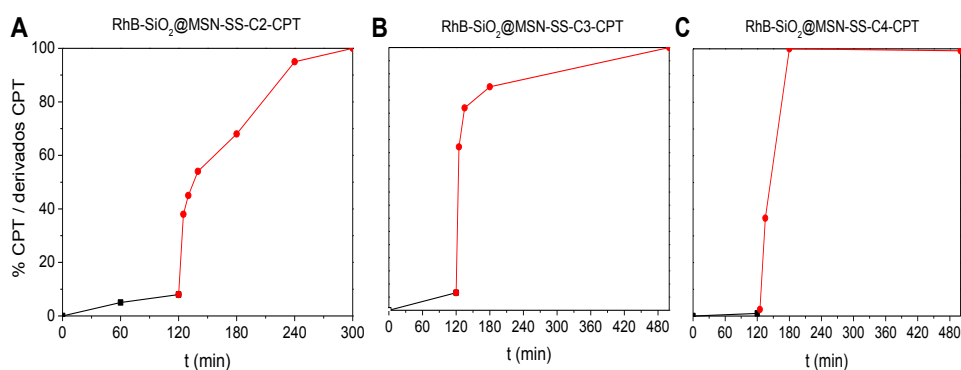


Figura 5.11. Liberación de CPT y derivados en PBS a partir de los nanofármacos RhB-SiO₂@MSN-SS-Cn-CPT. Condiciones de proceso (T = 37 ° C, t = 5 h, el agente reductor (100 mM DTT) se añade transcurridas dos horas desde el inicio del experimento, 5 mg/ml).

Los derivados de la CPT obtenidos en los ensayos de liberación se determinaron mediante HPLC-MS (Figura 5.12).

Cuando se emplea el material RhB-SiO₂@MSN-SS-C3-CPT se obtiene un producto con una masa de 467 que se asigna a [M+H]⁺ y que corresponde al derivado del profármaco de CPT en el que se ha reducido el enlace disulfuro.

En el caso del nanofármaco RhB-SiO₂@MSN-SS-C4-CPT el producto tiene un peso molecular de 480, que corresponde a [M]⁺. De nuevo, este último corresponde al profármaco de CPT en el que se ha reducido el enlace disulfuro.

Por tanto, resulta evidente que la modificación del número de carbonos en el ligando que une la CPT al soporte inorgánico determina no solo la cantidad de fármaco incorporado sino también la molécula liberada por la acción de agentes reductores, ya que en los casos de los nanofármacos RhB-SiO₂@MSN-SS-C3-CPT y RhB-SiO₂@MSN-SS-C4-CPT, tras la reducción del enlace disulfuro no se produce la ciclación intramolecular que provoca la liberación de CPT.

A pesar de esto, debe tenerse en cuenta que el proceso de liberación en el interior de la célula se lleva a cabo durante periodos de tiempo muy superiores a los analizados en este estudio, por lo que no se descarta que, aunque con una cinética claramente más lenta, los nanofármacos RhB-SiO₂@MSN-SS-C3-CPT y RhB-SiO₂@MSN-SS-C4-CPT pueden liberar cantidades terapéuticamente activas de CPT. Por ello, todos los nanofármacos se ensayarán posteriormente en cultivos de células HeLa (Sección 5.6).

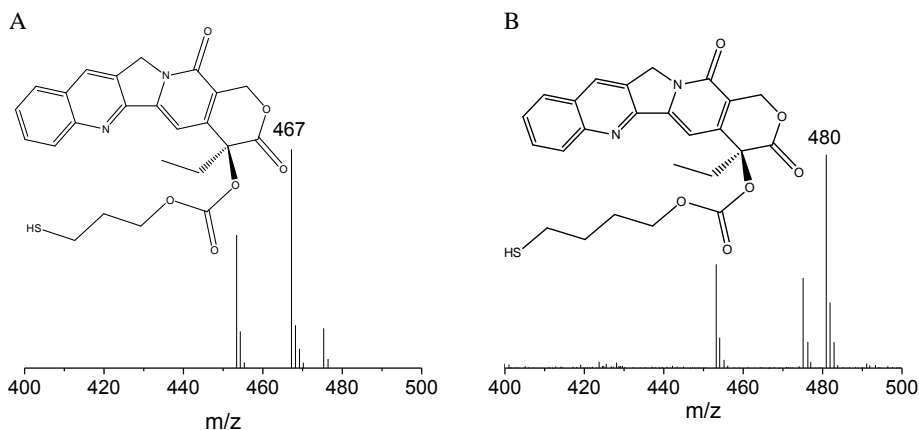


Figura 5.12. Espectros de masas correspondientes a los productos obtenidos empleando RhB-SiO₂@MSN-SS-C3-CPT (A) y RhB-SiO₂@MSN-SS-C4-CPT (B), respectivamente.

5.4.3. Modelos cinéticos

Al igual que en el capítulo anterior, se estudió la cinética de liberación de los diferentes nanofármacos de CPT mediante la aplicación sobre los datos experimentales del apartado anterior de cuatro modelos cinéticos diferentes: Higuchi, primer orden, Bhaskar y Ritger-Peppas. Debe tenerse en cuenta que, mientras en el caso del nanofármaco RhB-SiO₂@MSN-SS-C2-CPT se ha cuantificado la cantidad de CPT liberada, en el caso de los materiales con 3 y 4 carbonos en la cadena ligante se ha medido el derivado del profármaco liberado en el que se ha reducido el puente disulfuro (Figura 5.13).

En el caso del material RhB-SiO₂@MSN-SS-C2-CPT los datos presentan un buen ajuste a la mayoría de los modelos cinéticos empleados (Figura 5.13, Tabla 5.6). La ecuación de Ritger-Peppas es la que obtiene un mejor índice de correlación. El valor de n es claramente menor a 0,45, indicando que el mecanismo de liberación está gobernado por procesos de

difusión. Al respecto, debe tenerse en cuenta que aunque el entorno hidrófobo presente en los canales funcionalizados con grupos propiltiol debería favorecer la difusión de la CPT, para que esta se libere es necesario que el medio acuoso penetre en el interior de la estructura y se reduzca el puente disulfuro que une la CPT a la matriz porosa (Figura 5.14) lo cual, en este caso, presenta severas restricciones.

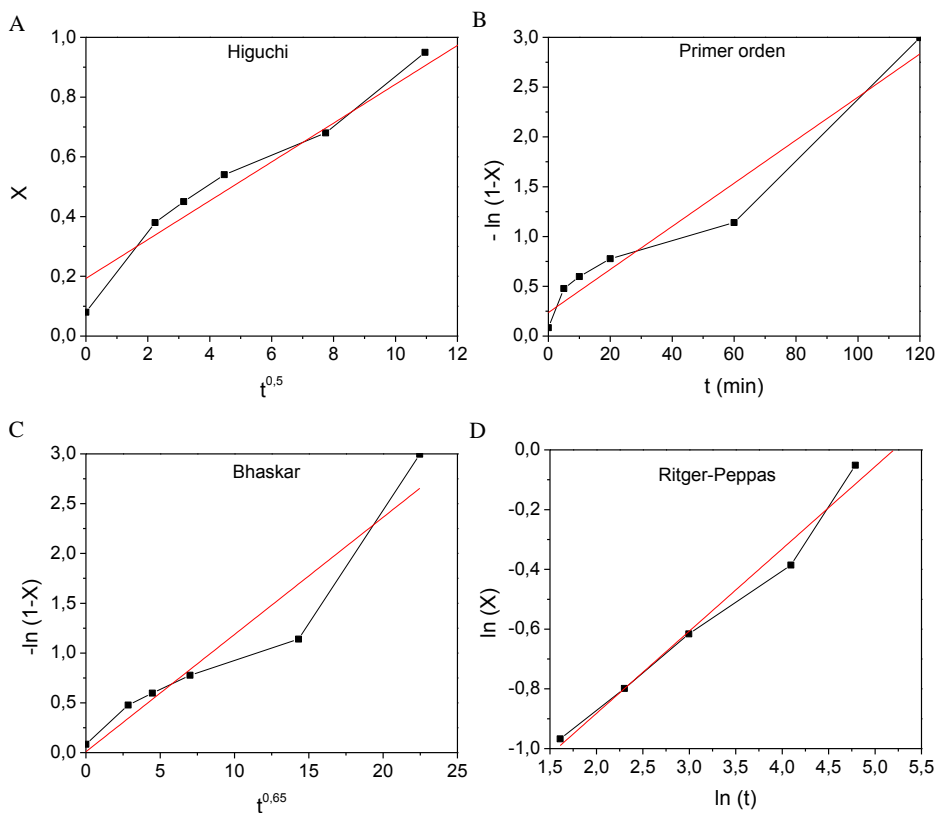


Figura 5.13. Gráficas correspondientes a diferentes modelos cinéticos de liberación para RhB-SiO₂@MSN-SS-C2-CPT: A) Higuchi, B) primer orden, C) Bhaskar y D) Ritger-Peppas.

Tabla 5.6. Parámetros de los diferentes modelos cinéticos de liberación aplicados para la muestra RhB-SiO₂@MSN-SS-C2-CPT.

Parámetro	Higuchi	Primer orden	Bhaskar	Ritger-Peppas
K	0,072	0,022	0,121	0,239
n				0,27
r ²	0,9583	0,9518	0,9144	0,9798

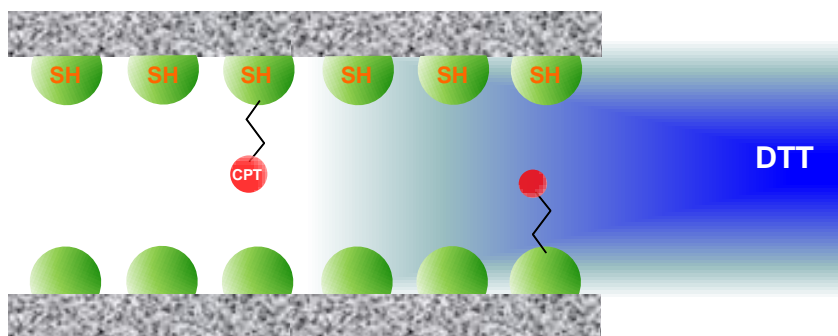


Figura 5.14. Representación de la difusión del medio acuoso en la boca de poro e interior de los canales mesoporosos del soporte inorgánico.

En el caso del material RhB-SiO₂@MSN-SS-C3-CPT, sólo el modelo matemático de Ritger-Peppas ofrece un buen coeficiente de correlación. El valor del parámetro n obtenido es de 0,12, indicando nuevamente que la liberación de la CPT está fuertemente controlada por fenómenos de difusión.

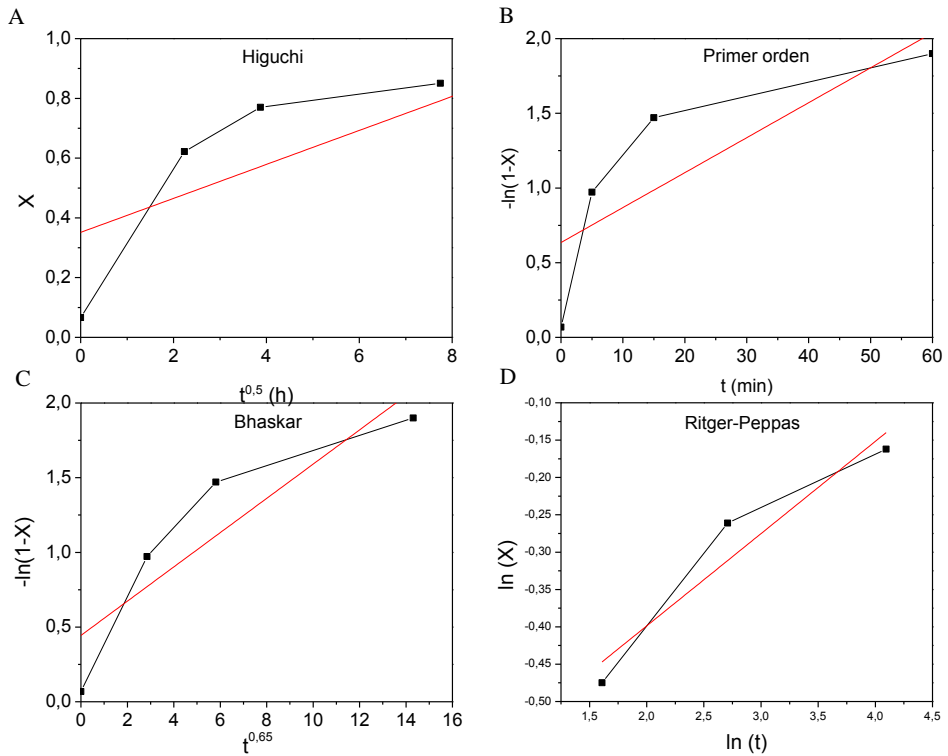


Figura 5.15. Gráficas correspondientes a diferentes modelos cinéticos de liberación para RhB-SiO₂@MSN-SS-C3-CPT: A) Higuchi, B) primer orden, C) Bhaskar y D) Ritger-Peppas.

Tabla 5.7. Parámetros de los diferentes modelos cinéticos de liberación aplicados para la muestra RhB-SiO₂@MSN-SS-C3-CPT.

Parámetro	Higuchi	Primer orden	Bhaskar	Ritger-Peppas
K	0,092	0,023	0,1146	0,524
n				0,12
r ²	0,7317	0,6631	0,8134	0,9257

Por último, para el material RhB-SiO₂@MSN-SS-C4-CPT el modelo que mejor ajuste ofrece es el de primer orden, indicando que la liberación no está controlada por fenómenos de difusión, sino que depende de la

concentración inicial del fármaco. Este hecho resulta sorprendente y contradictorio respecto a los resultados obtenidos con los otros materiales. No obstante, debe tenerse en cuenta que la carga del fármaco en este material es muy baja, lo que podría influir significativamente en los resultados obtenidos.

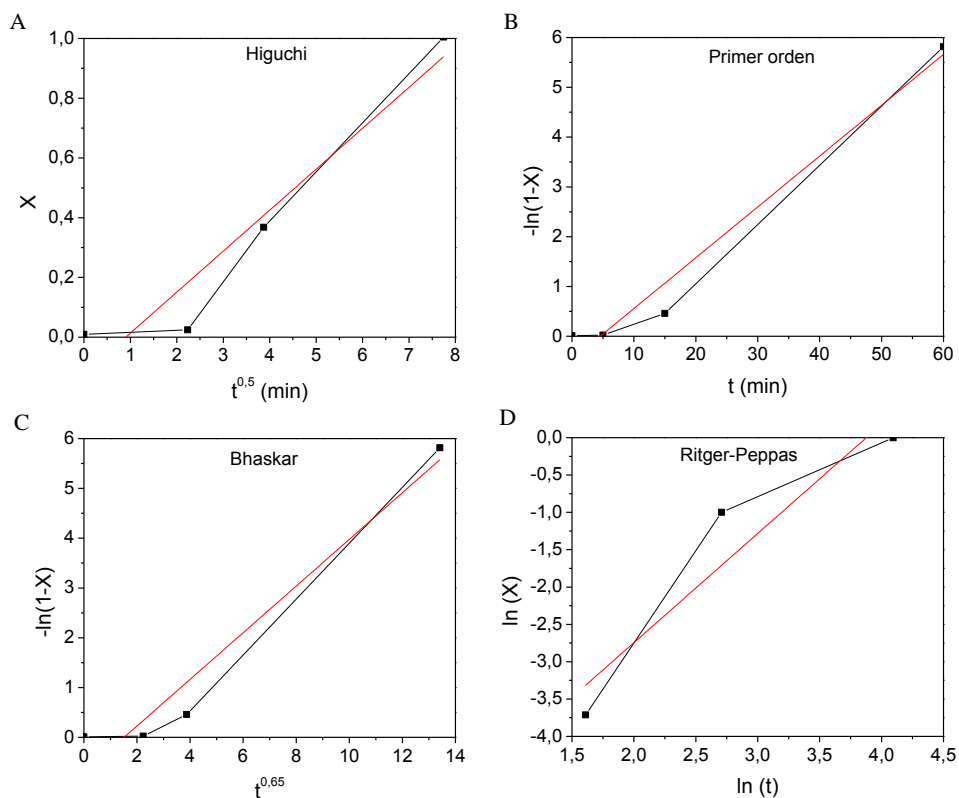


Figura 5.16. Gráficas correspondientes a diferentes modelos cinéticos de liberación para RhB-SiO₂@MSN-SS-C4-CPT: A) Higuchi, B) primer orden, C) Bhaskar y D) Ritger-Peppas.

Tabla 5.8. Parámetros de los diferentes modelos cinéticos de liberación aplicados para la muestra empleados RhB-SiO₂@MSN-SS-C4-CPT.

Parámetro	Higuchi	Primer orden	Bhaskar	Ritger-Peppas
K	0,115	0,092	0,348	0,003
n				1,46
r ²	0,9367	0,9669	0,8802	0,8965

5.5. Ensayos de estabilidad en medio fisiológico

Los ensayos de estabilidad en suero humano de estos nanofármacos demuestran que todos ellos presentan buena estabilidad liberando tan sólo alrededor del 4-10 % de la carga total de CPT del material tras 3 h (Figura 5.17.A). Al comparar los resultados obtenidos en suero con la liberación de CPT en PBS, como se pudo comprobar en el apartado 5.4.2, se observa que la cantidad de fármaco liberada en todos los casos es pequeña, no superando en ningún caso un 8 % (Figura 5.17.B). Así pues, estos nanofármacos además de ser estables en suero humano, también son estables en soluciones salinas. Esto facilita la posible preparación de inyectables destinados a la administración intravenosa del material.

Para desligarse del soporte el fármaco puede utilizar varios mecanismos: en primer lugar puede liberarse mediante la reducción del enlace disulfuro debido a la presencia de una mínima cantidad de GSH en el plasma (10 µM) [20]. La reducción del enlace también puede llevarse a cabo por proteínas presentes en la superficie de diferentes células plasmáticas como la Trx en linfocitos, granulocitos y monocitos [21]. El segundo mecanismo viable es a la hidrólisis enzimática del enlace carbonato dando lugar a CPT y CO₂(g) [22] (Figura 5.18).

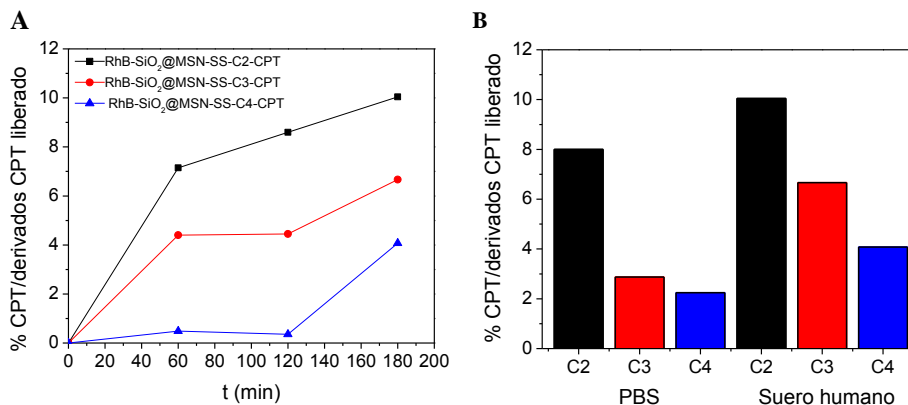


Figura 5.17. A) Ensayo de estabilidad en suero humano para los materiales RhB-SiO₂@MSN-SS-Cn-CPT. B) Estabilidad en medio fisiológico de los materiales RhB-SiO₂@MSN-SS-Cn-CPT. Condiciones de proceso (T = 37 ° C, t = 3 h, 5 mg/ml).

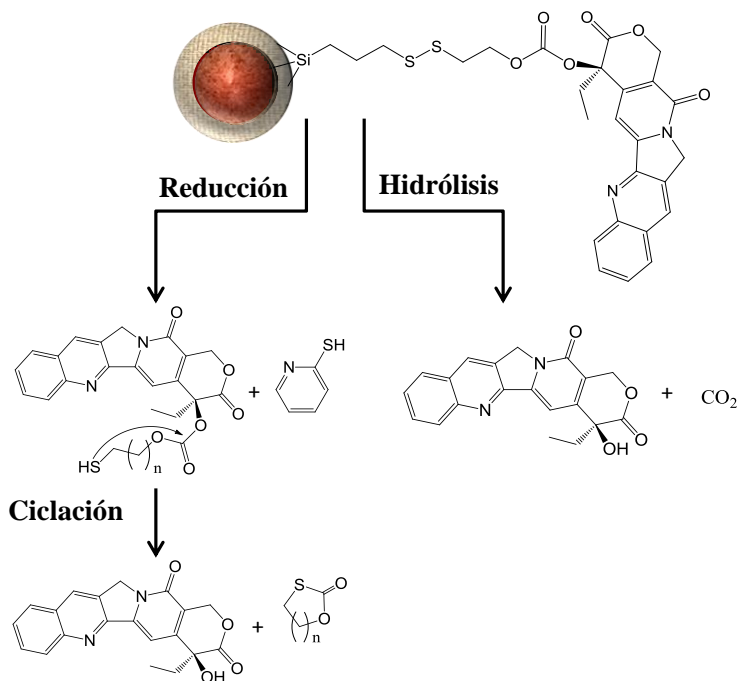


Figura 5.18. Mecanismos posibles de liberación de CPT en suero humano a partir de los nanofármacos RhB-SiO₂@MSN-SS-Cn-CPT.

5.6. Estudios en cultivos celulares.

5.6.1. Ensayo MTT

Primeramente se comprobó que los vehículos utilizados para la incorporación de la CPT y sus profármacos no presentan citotoxicidad en la línea celular estudiada (HeLa). Así, como se puede observar en la Figura 5.19. los materiales RhB-SiO₂@MSN-SH y RhB-SiO₂@MSN-COOH no presentan efectos citotóxicos en las concentraciones empleadas. La viabilidad celular ronda el 80% para las concentraciones más elevadas. Por ello, la toxicidad producida al añadir el nanofármaco dependerá exclusivamente de la liberación de la CPT, y no de la toxicidad del vehículo.

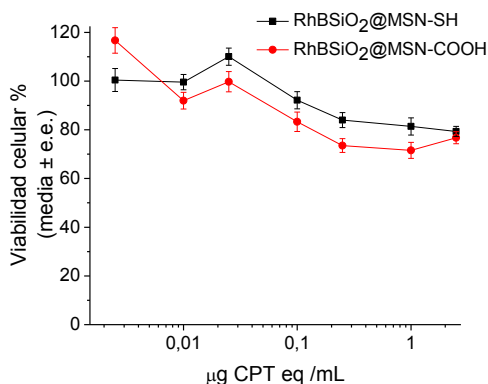


Figura 5.19. Gráfica del ensayo de viabilidad celular MTT en células HeLa para los materiales RhB-SiO₂@MSN-SH y RhB-SiO₂@MSN-COOH. Los resultados se expresan como media ± error estándar.

Actividad antineoplásica de los profármacos de CPT

Al comparar la citotoxicidad de los profármacos se observa que, si bien no existe una tendencia concreta, en todos los casos son menos citotóxicos que la CPT. En el caso particular del compuesto CPT-OCOO-

C4-SS-Py la citotoxicidad mostrada resultó tan baja que no pudo calcularse el valor de IC_{50} , ya que no se alcanzó una mortalidad celular del 50 % en el rango de concentraciones estudiado.

Una explicación posible se basa en la mayor hidrofobicidad de estos compuestos. Esto dificultaría su disolución en el medio de cultivo, precipitando parcialmente en la placa de cultivo e impidiendo que estos alcancen el citoplasma celular y difundan hacia el núcleo.

No obstante, el motivo más probable podría ser que no se lleve a cabo la ciclación intramolecular tras la reducción del enlace disulfuro. Este hecho se ha podido observar en los ensayos de liberación a partir de materiales en el apartado 5.4.2, sugiriendo que otras rutas de liberación de la CPT como la hidrólisis del enlace carbonato se dan en poca medida.

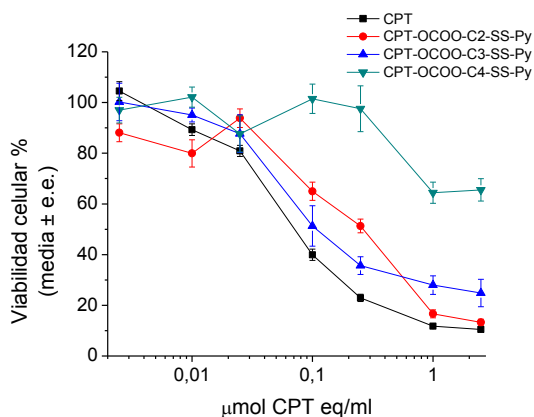


Figura 5.20. Gráfica de ensayo de viabilidad celular MTT en células HeLa empleando CPT y los diferentes profármacos. Los resultados se expresan como media \pm error estándar.

Tabla 5.9. Valores de IC_{50} de los diferentes profármacos CPT-OCOO-Cn-SS-Py y de los nanofármacos RhB-SiO₂@MSN-SS-Cn-CPT en células HeLa.

Profármaco	IC_{50}^a	Material	IC_{50}^a
CPT	$0,057 \pm 0,004$	CPT	$0,057 \pm 0,004$
CPT-OCOO-C2-SS-Py	$0,190 \pm 0,020$	RhB-SiO ₂ @MSN-SS-C2-CPT	$0,06 \pm 0,03$
CPT-OCOO-C3-SS-Py	$0,082 \pm 0,008$	RhB-SiO ₂ @MSN-SS-C3-CPT	$0,42 \pm 0,08$
CPT-OCOO-C4-SS-Py	--- ^b	RhB-SiO ₂ @MSN-SS-C4-CPT	$0,34 \pm 0,04$

(a) Los valores representados indican la media y el error estándar ($\mu\text{g CPT/ml}$). (b) Debido a la escasa efectividad antineoplásica del profármaco CPT-OCOO-C4-SS-Py no es posible calcular IC_{50} en el rango de concentraciones empleado.

Actividad antineoplásica de los nanofármacos

En los ensayos sobre cultivos de células HeLa se observa que el nanofármaco RhB-SiO₂@MSN-SS-C2-CPT presenta un valor de IC_{50} similar al obtenido para la CPT (Figura 5.21, Tabla 5.9). Sin embargo, para RhB-SiO₂@MSN-SS-C3-CPT y RhB-SiO₂@MSN-SS-C4-CPT se produce un aumento de este parámetro de un orden de magnitud.

Esto puede deberse a la mayor estabilidad que presentan los productos correspondientes a la reducción del enlace disulfuro, tal y como se ha podido observar en los ensayos de liberación del apartado 5.4.

Además, a partir de esta diferencia en los valores de IC_{50} también se deduce que otros mecanismos de liberación de la CPT como la hidrólisis o descarboxilación tienen menor influencia sobre la actividad terapéutica de los nanofármacos.

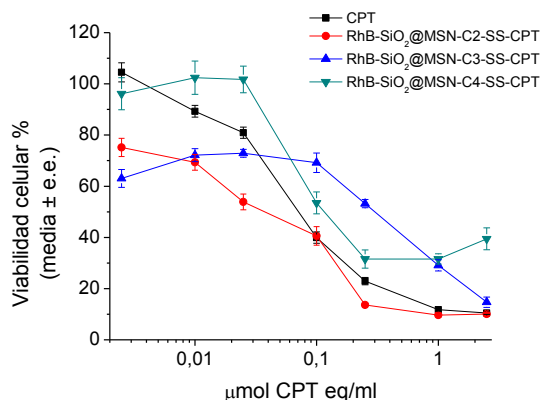


Figura 5.21. Gráfica del ensayo de viabilidad celular MTT en células HeLa empleando CPT y los diferentes nanofármacos. Los resultados se expresan como media \pm error estándar.

Mecanismo de la actividad antineoplásica de los nanofármacos

Para dilucidar el mecanismo de liberación del fármaco, se realizó un ensayo de viabilidad celular MTT con el nanofármaco RhB-SiO₂@MSN-SS-C2-CPT en presencia de L-butionina sulfoximina (BSO), un inhibidor de la síntesis de GSH [6]. Para ello se empleó una concentración de 0,4 mM, ya que se han descrito mecanismos de quimiosensibilización en derivados de la CPT al emplear concentraciones mayores de BSO (2.5 mM) [23].

En la Figura 5.22. se puede apreciar que a concentraciones menores a 0,1 μg CPT/ml la adición de BSO inhibe sensiblemente la actividad del nanofármaco. Además, el valor de IC₅₀ aumenta aproximadamente un 50 % (Tabla 5.10). De este hecho se deduce que la GSH interviene activamente en la liberación de la CPT a partir del nanofármaco[15]. Los datos concuerdan con estudios previos en los que se observan diferencias significativas entre muestras cultivadas con BSO (inhibidor GSH) y GSH-OEt (un análogo del glutatión) [24]. Por otro lado, para concentraciones superiores a 0,1 μg

CPT/ml apenas existen diferencias en el porcentaje de viabilidad celular obtenido. Ello es debido a que al elevar la dosis del nanofármaco se supera el umbral de inhibición sobre la liberación de CPT creado por la concentración de BSO empleada, de manera que empieza a liberarse CPT. Asimismo, debe tenerse en cuenta la posible intervención de otros agentes reductores como Trx, Prx y NADH [5]. También pueden contribuir en menor medida otro tipo de mecanismos de liberación de CPT, como la hidrólisis en medio acuoso [19] o la descarboxilación vía enzimática [22].

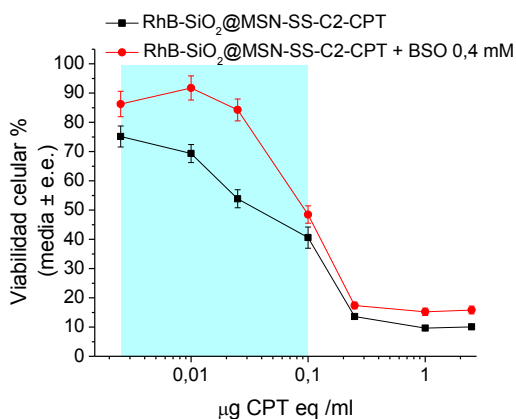


Figura 5.22. Gráfica del ensayo de viabilidad celular MTT en células HeLa empleando RhB-SiO₂@MSN-SS-C2-CPT y BSO. Los resultados se expresan como media ± error estándar.

Tabla 5.10. Valores de IC₅₀ para células HeLa del nanofármaco RhB-SiO₂@MSN-SS-C2-CPT en ausencia y presencia de un inhibidor del glutatión (BSO).

Ensayo	IC ₅₀ ^a
RhB-SiO ₂ @MSN-SS-C2-CPT	0,06 ± 0,03
RhB-SiO ₂ @MSN-SS-C2-CPT + BSO 0,4 mM	0,09 ± 0,05

(a) Los valores representados indican la media y el error estándar (µg CPT/ml)

Comparación de la actividad antineoplásica con sistemas sensibles a enzimas.

En el capítulo anterior se ha descrito un nanofármaco para el transporte y liberación de CPT en medio biológico basado en la actividad de carboxilasas citoplasmáticas. Dicho sistema presenta un mecanismo de liberación lento de CPT, si bien, su eficacia terapéutica (medida en base al valor de IC_{50}) es inferior al del fármaco libre, debido a las restricciones estéricas que afectan a la hidrólisis enzimática del enlace éster que une la CPT al soporte nanoparticulado.

Sin embargo, puesto que las especies tiólicas, incluyendo la GSH son más abundantes en células tumorales que en células sanas, los sistemas basados en nanopartículas MSN con ligandos disulfuro deberían poder liberar completamente la carga terapéutica ante la exposición a reductores intracelulares [4, 25-28].

Para comprobar la eficacia terapéutica de los sistemas sensibles a estímulos reductores respecto a los descritos en el capítulo 4 se llevó a cabo un ensayo MTT con el nanofármaco RhB-SiO₂@MSN-(CO)-CPT.

Los resultados obtenidos (Figura 5.23, Tabla 5.11.) muestran que la actividad antitumoral de este es claramente inferior a la del nanofármaco RhB-SiO₂@MSN-SS-C2-CPT con una carga equivalente de CPT, así como a la del fármaco libre indicando que el enlace éster no se degrada completamente mediante la acción enzimática al igual que en otros sistemas de difusión de fármacos con el mismo tipo de enlace [29].

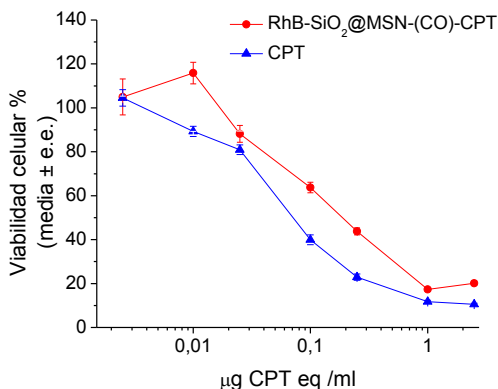


Figura 5.23. Gráfica del ensayo de viabilidad celular MTT en células HeLa empleando RhB-SiO₂@MSN-(CO)-CPT. Los resultados se expresan como media ± error estándar.

Tabla 5.11. Valores de IC₅₀ para células HeLa del nanofármaco RhB-SiO₂@MSN-(CO)-CPT.

Material	IC ₅₀ ^a
CPT	0.057 ± 0.004
RhB-SiO ₂ @MSN-(CO)-CPT	0.084 ± 0.016

(a) Los valores representados indican la media y el error estándar (µg CPT/ml)

5.6.2. Ensayo de internalización celular

Se incubaron células HeLa en presencia de RhB-SiO₂@MSN-SS-C2-CPT para investigar su internalización y localización intracelular. Para validar la ubicación subcelular de las nanopartículas, se tomaron varias imágenes a diferentes alturas del eje Z.

Tras 24 h el nanofármaco colocaliza con los lisosomas, demostrando que RhB-SiO₂@MSN-SS-C2-CPT se internaliza mediante endocitosis (Figura 5.24).

Cabe destacar que tras este tiempo de incubación, también se pueden distinguir nanopartículas en el exterior de los lisosomas, indicando que el nanofármaco alcanza el citosol. Según recientes estudios esta etapa es la limitante en los modelos basados en estímulos redox para la escisión de enlaces disulfuro [30].

En este caso, la carga superficial negativa del material ($\zeta = -9,7 \pm 0,8$ mV, potencial medido en medio RPMI 1640 enriquecido) promueve su salida desde los endolisosomas hacia el citosol [31].

A la luz de los resultados obtenidos se puede indicar que las nanopartículas acceden al interior de la célula mediante endocitosis, para más tarde abandonar el endolisosoma y liberar la carga en el citoplasma.

Si bien, a pesar de quedar demostrada la localización de las nanopartículas en el citoplasma, el mecanismo de liberación no está confirmado en la mayoría de sistemas basados en la reducción de enlaces disulfuro.

Varios autores indican que la reducción del enlace disulfuro se lleva a cabo por GSH [1, 10, 32], aunque también debe tenerse en cuenta la actividad de la proteína disulfuro isomerasa [31] o de reductasas [5], que podrían provocar una liberación anticipada del fármaco.

En este sentido, en el apartado anterior se ha demostrado que la GSH está involucrada en la reducción del enlace disulfuro, si bien pueden existir otros procesos involucrados en la liberación de la CPT, ya que a concentraciones elevadas del nanofármaco la adición de BSO no tiene ningún efecto.

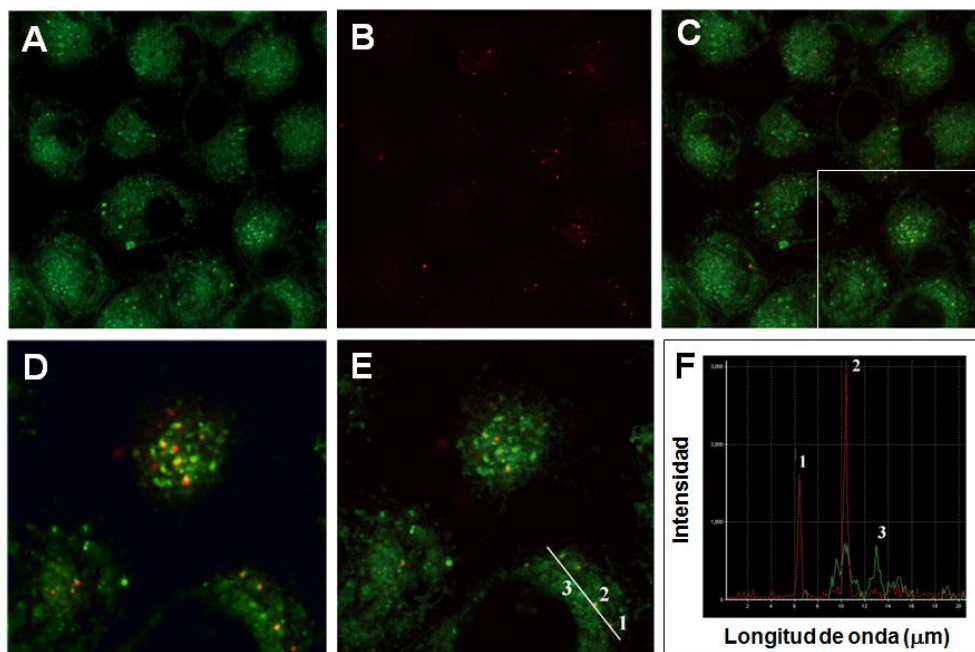


Figura 5.24. Estudios de colocalización de RhB-SiO₂@MSN-SS-C2-CPT en células HeLa. Se obtuvieron imágenes confocales del mismo plano Z para: (A) Liso-tracker® y (B) Nanopartículas marcadas con rodamina B. (C) Corresponde a la superposición de las dos fotografías anteriores. (D) Ampliación de la zona delimitada en (C). (E) Misma imagen que en el caso anterior, esta vez empleando un umbral de detección mayor para la señal verde. Por último, (F) representa la intensidad de las señales. Los números corresponden a las nanopartículas presentes en el citosol (1) RhB-SiO₂@MSN-SS-C2-CPT con lisosomas (2) y lisosomas sin partículas (3).

5.6.3. Ensayo de citometría de flujo

Se aplicó esta técnica para cuantificar la internalización celular de los materiales sintetizados. Diferentes parámetros influyen en la endocitosis, en primer lugar, las características de las nanopartículas, como tamaño, carga, composición, morfología y sedimentación. Por otro lado, también influyen las condiciones biológicas, como la densidad celular o el medio de cultivo

empleado [33]. Igualmente, cabe destacar que al suspender el material en el medio de cultivo enriquecido con suero, es muy probable que se adsorban proteínas en la superficie [34]. Este hecho puede modificar varias propiedades fisicoquímicas del material, como la carga y la hidrofobicidad [35]. En el caso de estudio, los soportes presentan una morfología idéntica y una carga negativa de una magnitud similar. Además, esta última característica no se ve alterada al sumergir las partículas en medio de cultivo enriquecido.

Por el contrario, los nanofármacos muestran diferencias en los valores de diámetro hidrodinámico. Asimismo, la hidrofobicidad de la superficie aumenta a medida que aumenta la lipofilia del profármaco incorporado.

Como se puede observar en la Tabla 5.12, el porcentaje de células analizadas que contienen nanopartículas aumenta a medida que aumenta la hidrofobicidad y diámetro hidrodinámico del material. Los gráficos correspondientes a las medidas realizadas en el citómetro de flujo se muestran en el anexo V.

Así pues, los datos experimentales obtenidos se pueden argumentar a través de la hidrofobicidad del material y el diámetro hidrodinámico. Como se puede observar en la Tabla 5.3, el diámetro hidrodinámico de los nanofármacos aumenta a medida que se incrementa la hidrofobicidad del profármaco anclado. Esto se debe a que, al aumentar la hidrofobicidad del profármaco, la superficie de la partícula se vuelve más hidrófoba y tiende a formar agregados en disoluciones acuosas, provocando un aumento del diámetro hidrodinámico.

Los resultados obtenidos concuerdan con estudios previos en los que la internalización de partículas con superficie hidrofóbica y un tamaño de 360 nm se ve favorecida frente a los materiales con superficie hidrofílica de un

mismo tamaño [36]. También, se ha demostrado con anterioridad que dentro del rango de tamaños estudiado, a medida que aumenta el diámetro de las nanopartículas de sílice, no solo se favorece la endocitosis, sino que además el proceso de exocitosis se da en menor grado [35].

Tabla 5.12. Valores de internalización celular de diferentes materiales *core-shell* para células HeLa determinados por citometría de flujo

Material	Internalización (%)
RhB-SiO ₂ @MSN-SH	3,20 ± 0,15
RhB-SiO ₂ @MSN-SS-C2-CPT	6,0 ± 2,2
RhB-SiO ₂ @MSN-SS-C3-CPT	10,8 ± 1,3
RhB-SiO ₂ @MSN-SS-C4-CPT	16 ± 4

Los valores representados indican la media y desviación estándar.

5.7. Conclusiones parciales

Como resultado de los diferentes experimentos llevados a cabo en este capítulo se han obtenido las siguientes conclusiones:

La estructura del nanofármaco permite combinar la incorporación del profármaco en la superficie mesoporosa del material, a la vez que el cromóforo ubicado en el núcleo permite detectar la ubicación de las nanopartículas debido a sus propiedades fotofísicas sin producirse fenómenos de desactivación fluorescente.

Además, los materiales sintetizados, empleados a modo de soporte no presentan una toxicidad apreciable en el rango de concentraciones testado. De esto, se deduce que toda la actividad antineoplásica mostrada por los nanofármacos depende exclusivamente del profármaco anclado sobre el material.

También se observó que la toxicidad del nanofármaco varía en función del profármaco anclado. Este hecho se debe a que, tras producirse la reducción del puente disulfuro en los nanofármacos con 3 y 4 carbonos entre el grupo carbonato y disulfuro, estos fragmentos orgánicos no dan lugar a la reacción de ciclación intramolecular y, consecuentemente, no se libera la molécula de CPT correspondiente. Por el contrario, el nanofármaco RhB-SiO₂@MSN-SS-C2-CPT presenta un valor de IC₅₀ similar al de la CPT, indicando la eficacia de los sistemas basados en estímulos reductores.

A través de los ensayos llevados a cabo se ha demostrado que el glutatión participa de forma activa en la liberación de la CPT a partir del nanofármaco. Además, mediante los experimentos de liberación realizados se determinó que los datos experimentales se ajustan en la mayoría de los casos al modelo cinético de Ritger-Peppas, indicando que la liberación del fármaco está gobernada por procesos de difusión.

Por otro lado, al aumentar la hidrofobicidad del profármaco incorporado aumenta el diámetro hidrodinámico del nanofármaco y a su vez, la cantidad de partículas internalizadas por células HeLa mediante endocitosis.

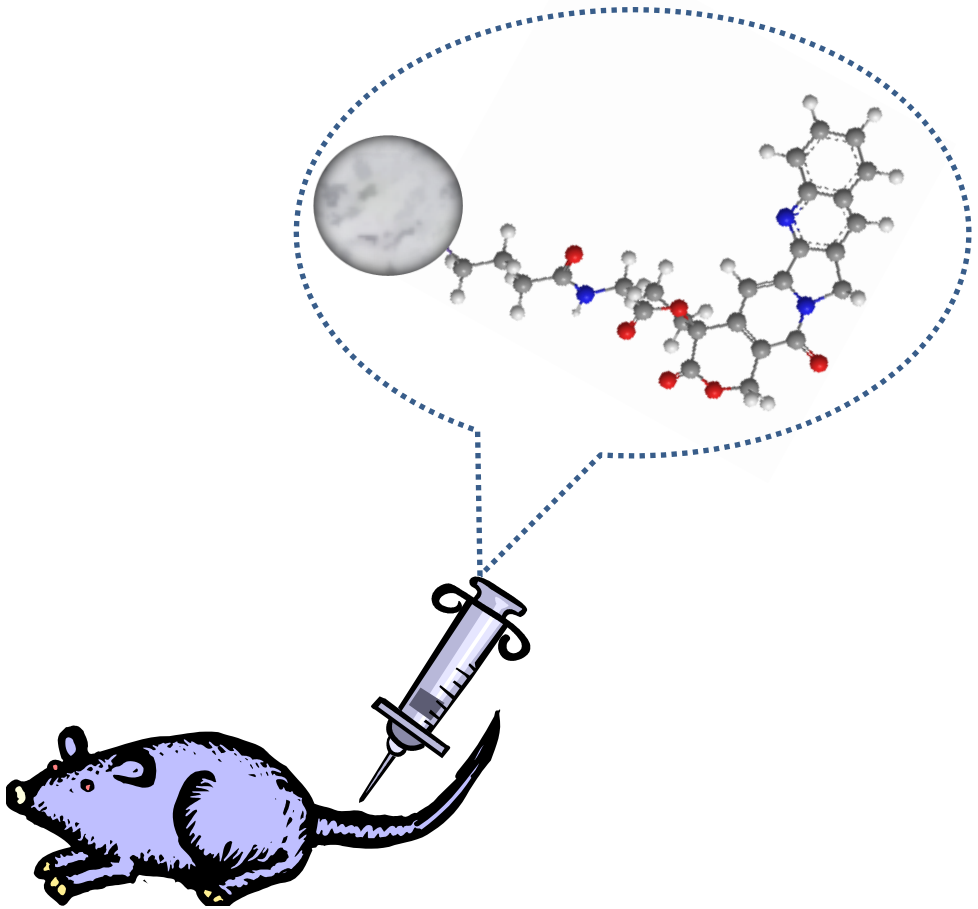
Por último, indicar que los nanofármacos presentan una buena estabilidad en medio fisiológico, algo que puede facilitar la preparación de inyectables destinados a la administración intravenosa del material.

Referencias

- [1] Cheng, R.; Feng, F.; Meng, F.; Deng, C.; Feijen, J.; Zhong, Z. *J. Control. Release* **2011**, 152, 2-12.
- [2] Li, Y.-L.; Zhu, L.; Liu, Z.; Cheng, R.; Meng, F.; Cui, J.-H.; Ji, S.-J.; Zhong, Z. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 9914-9918.
- [3] Bauhuber, S.; Hozsa, C.; Breunig, M.; Göpferich, A. *Adv. Mater.* **2009**, 21, 3286-3306.
- [4] Mortera, R.; Vivero-Escoto, J.; Slowing, I. I.; Garrone, E.; Onida, B.; Lin, V. S. Y. *Chem. Commun.* **2009**, 45, 3219–3221.
- [5] Yang, J.; Chen, H.; Vlahov, I. R.; Cheng, J.-X.; Low, P. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 13872-13877.
- [6] Balendiran, G. K.; Dabur, R.; Fraser, D. *Cell Biochem. Funct.* **2004**, 22, 343-352.
- [7] Meyer, Y.; Richard, J.-A.; Massonneau, M.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. *Org. Lett.* **2008**, 10, 1517-1520.
- [8] Greenwald, R. B.; Pendri, A.; Conover, C. D.; Zhao, H.; Choe, Y. H.; Martinez, A.; Shum, K.; Guan, S. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 3657-3667.
- [9] Conover, C. D.; Zhao, H.; Longley, C. B.; Shum, K. L.; Greenwald, R. B. *Bioconjugate Chem.* **2003**, 14, 661-666.
- [10] Lee, M. H.; Kim, J. Y.; Han, J. H.; Bhuniya, S.; Sessler, J. L.; Kang, C.; Kim, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 12668–12674.
- [11] Niculescu-Duvaz, I.; Niculescu-Duvaz, D.; Friedlos, F.; Spooner, R.; Martin, J.; Marais, R.; Springer, C. J. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 2485-2489.
- [12] Shamis, M.; Lode, H. N.; Shabat, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1726-1731.
- [13] Soliman, G. M.; Sharma, A.; Maysinger, D.; Kakkar, A. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 9572-9587.
- [14] Sagi, A.; Weinstein, R.; Karton, N.; Shabat, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 5434-5435.
- [15] Muniesa, C.; Vicente, V.; Quesada, M.; Sáez, S.; Blesa, J. R.; Abasolo, I.; Botella, P.; *RSC adv.* **2013**, In revision.
- [16] Kruk, M.; Jaroniec, M.; Sayari, A. *Langmuir* **1997**, 13, 6267-6273.
- [17] Reale, E.; Leyva, A.; Corma, A.; Martinez, C.; Garcia, H.; Rey, F. *J. Mater. Chem.* **2005**, 15, 1742-1754.
- [18] Ding, Y.-X.; Hlady, V. *Croat. Chem. Acta* **2011**, 84, 193-202.
- [19] Jones, L. R.; Goun, E. A.; Shinde, R.; Rothbard, J. B.; Contag, C. H.; Wender, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6526-6527.

- [20] Saito, G.; Swanson, J. A.; Lee, K.-D. *Adv. Drug Del. Rev.* **2003**, 55, 199-215.
- [21] Sahaf, B.; Söderberg, A.; Spyrou, G.; Barral, A. M.; Pekkari, K.; Holmgren, A.; Rosén, A. *Exp. Cell Res.* **1997**, 236, 181-192.
- [22] Yang, Y.-L.; Ramaswamy, S. G.; Jakoby, W. B. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 7814-7817.
- [23] Sawyer, T. E.; Bonner, J. A. *Br J Cancer Suppl* **1996**, 27, S109-13.
- [24] Liu, J.; Pang, Y.; Huang, W.; Huang, X.; Meng, L.; Zhu, X.; Zhou, Y.; Yan, D. *Biomacromolecules* **2011**, 12, 1567-1577.
- [25] Kim, H.; Kim, S.; Park, C.; Lee, H.; Park, H. J.; Kim, C. *Adv. Mater.* **2010**, 22, 4280-4283.
- [26] Guo, R.; Li, L.-L.; Zhao, W.-H.; Chen, Y.-X.; Wang, X.-Z.; Fang, C.-J.; Feng, W.; Zhang, T.-L.; Ma, X.; Lu, M.; Peng, S.-Q.; Yan, C.-H. *Nanoscale* **2012**, 4, 3577-3583.
- [27] Luo, Z.; Cai, K.; Hu, Y.; Li, J.; Ding, X.; Zhang, B.; Xu, D.; Yang, W.; Liu, P. *Adv. Mater.* **2012**, 24, 431-435.
- [28] Luo, Z.; Cai, K.; Hu, Y.; Zhao, L.; Liu, P.; Duan, L.; Yang, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 640-643.
- [29] Botella, P.; Abasolo, I.; Fernández, Y.; Muniesa, C.; Miranda, S.; Quesada, M.; Ruiz, J.; Schwartz Jr, S.; Corma, A. *J. Control. Release* **2011**, 156, 246-257.
- [30] Sauer, A. M.; Schlossbauer, A.; Ruthardt, N.; Cauda, V.; Bein, T.; Bräuchle, C. *Nano Lett.* **2010**, 10, 3684-3691.
- [31] Slowing, I.; Trewyn, B. G.; Lin, V. S. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 14792-14793.
- [32] Henne, W. A.; Doorneweerd, D. D.; Hilgenbrink, A. R.; Kularatne, S. A.; Low, P. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 5350-5355.
- [33] Carney, R.; Carney, T.; Mueller, M.; Stellacci, F. *Biointerphases* **2012**, 7, 1-9.
- [34] Lesniak, A.; Fenaroli, F.; Monopoli, M. P.; Åberg, C.; Dawson, K. A.; Salvati, A. *ACS Nano* **2012**, 6, 5845-5857.
- [35] Ling, H.; Zhengwei, M.; Yuying, Z.; Changyou, G. *J. Nanosci. Lett* **2011**, 1, 1-16.
- [36] Nam, H. Y.; Kwon, S. M.; Chung, H.; Lee, S.-Y.; Kwon, S.-H.; Jeon, H.; Kim, Y.; Park, J. H.; Kim, J.; Her, S.; Oh, Y.-K.; Kwon, I. C.; Kim, K.; Jeong, S. Y. *J. Control. Release* **2009**, 135, 259-267.

Capítulo 6



Ensayos *in vivo*: biodistribución, tolerabilidad y eficacia terapéutica

6. Ensayos *in vivo*: biodistribución, tolerabilidad y eficacia terapéutica

Los diferentes ensayos se han llevado a cabo empleando los nanofármacos SNP-(CO)-Cy5.5 y SNP-(CO)-CPT3, fundamentalmente por qué su producción es simple y más económica que la de otros materiales con estructuras porosas. Este hecho posibilita la producción de grandes cantidades a un bajo coste.

Además, los nanofármacos basados en nanopartículas de sílice amorfa admiten una elevada carga de camptotecina y presentan una cinética de liberación del fármaco más lenta, algo que puede ayudar a mejorar la actividad terapéutica del nanofármaco. Finalmente, las nanopartículas de sílice amorfa presentan una mayor resistencia mecánica y estabilidad, permitiendo su almacenamiento durante periodos de tiempo prolongados [1].

Cabe mencionar que los diferentes ensayos con animales, se realizaron en el *Institut de Recerca del Hospital Vall d'Hebron*, mientras que los análisis de CPT en muestras de tejidos mediante HPLC se llevaron a cabo en el Instituto de Tecnología Química (ITQ).

6.1. Biodistribución

Cuando las nanopartículas se suspenden en fluidos biológicos como sangre o plasma, tienden a rodearse de una capa de proteínas. Este hecho hace que varíen diferentes propiedades de las partículas como radio hidrodinámico, carga y estado de agregación [2].

Las interacciones nanopartícula-proteína no son permanentes, sino que se da un intercambio constante entre las proteínas adsorbidas en la

superficie del material y las presentes en el medio. Por ejemplo, al suspender nanopartículas en suero humano, inicialmente la superficie tiende a cubrirse de albúmina sérica y fibrinógeno. Sin embargo, a tiempos mayores se forma una cubierta de apolipoproteína A-I [3].

Por otro lado, cuando las partículas presentan proteínas del complemento e inmunoglobulina fijadas en el exterior, se favorece la fagocitosis mediada por receptores [4]. Así pues, la cubierta proteica influye de forma decisiva en las interacciones con superficies biológicas y receptores, determinando la biodistribución de los nanomateriales.

En lo que refiere a la administración de las nanopartículas, tras inyectar MSN en la vena coccígea de ratones, estas circulan por la vena cava inferior hasta alcanzar el corazón

Más tarde el flujo sanguíneo alcanza los pulmones, y si existen agregados de nanopartículas estos pueden quedar retenidos en los capilares. Tras pasar por los pulmones, la sangre oxigenada con nanopartículas en suspensión vuelve al corazón y se distribuye por todo el organismo.

Los órganos que más nanopartículas suelen acumular son el bazo y el hígado, debido al abundante riego sanguíneo y a la gran actividad del sistema retículo endotelial (SRE) en estos órganos [5].

Estudios previos sobre la biodistribución de nanopartículas de sílice con diferentes estructura, tamaño y funcionalización indican que, tras la administración intravenosa, las partículas tienden a acumularse en hígado [5-13], riñones [6, 8], bazo [5, 9-10, 12-13] y pulmones [8, 13].

En el caso de estudio, la biodistribución del material SNP-(CO)-Cy5.5 se evaluó cuantificando la CPT acumulada en cada tejido

mediante análisis por HPLC. Además, los datos obtenidos se compararon con los resultados de biodistribución llevados a cabo en el *Institut de Recerca del Hospital Vall d'Hebron* mediante medidas de fluorescencia *ex vivo* utilizando un equipo IVIS[®] *Spectrum Imaging System* con el programa Image 3.2[®] (Caliper Life Sciences).

6.1.1. Resultados obtenidos mediante análisis de CPT en tejidos

Se estudió la biodistribución del material SNP-(CO)-Cy5.5 (véase Capítulo IV) administrado de forma intravenosa (i.v.) a diferentes tiempos.

De forma comparativa se estudió, igualmente, la biodistribución del fármaco libre tras la administración i.v. de una dosis equivalente a la contenida en las nanopartículas (0,4 mg CPT/Kg). En la Figura 6.1. se representan los porcentajes correspondientes a cada tejido analizado respecto del total de CPT analizada a 5, 24 y 96 h.

El grupo tratado con SNP-(CO)-Cy5.5 presentó una acumulación hepática superior al 80 % de la CPT analizada. También se produjo un almacenamiento secundario en el bazo, pulmones y riñón.

Por otro lado, se detectó CPT en plasma, obteniendo una concentración claramente inferior al resto de tejidos (<10 ng CPT/ml). Por último, se originó un pequeño depósito de partículas en el tumor (~1 % del total de CPT analizada).

El resultado indica una detección y retención de las SNP por parte del SRE debido a la presencia mayoritaria de nanopartículas en hígado y bazo. Aunque en este caso no se ha determinado, está demostrado que en los procesos de acumulación hepática masiva de nanopartículas de un

preparado farmacológico, la excreción hepatobiliar es la ruta prioritaria de eliminación [7, 9].

Por otro lado, se produce una escasa presencia de CPT en riñones, indicando que las partículas son capaces de eludir el proceso de filtrado glomerular debido a su tamaño, evitando la eliminación renal. Este mecanismo de excreción se ha descrito en estudios de biodistribución para nanopartículas de menores dimensiones (6-50 nm) [6, 12].

Finalmente, la retención de agregados de SNP-(CO)-Cy5.5 en los capilares pulmonares podría justificar la presencia del nanofármaco en los pulmones. A medida que los racimos de partículas del nanofármaco se dispersan, estas retornan al flujo sanguíneo y se distribuyen en el organismo.

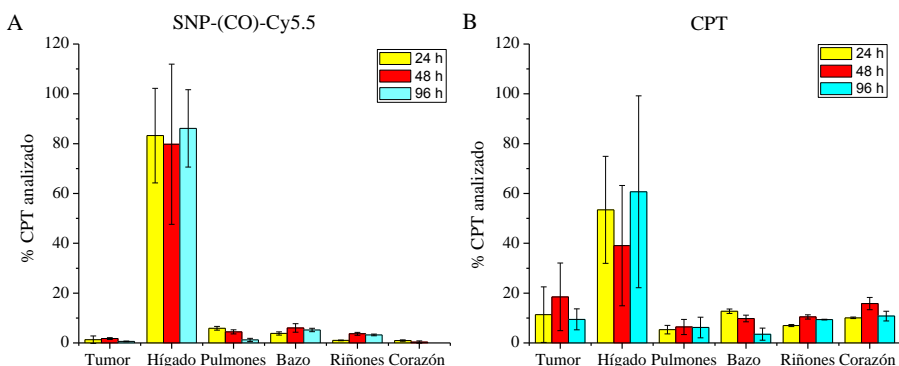


Figura 6.1. Distribución de CPT analizada por HPLC en los diferentes órganos y tejidos tras la administración intravenosa de CPT o SNP-(CO)-Cy5.5 a 5, 24 y 96 h.

Seguidamente se procede a analizar la variación en la concentración de CPT analizada en los diferentes tejidos tras el tratamiento con SNP-(CO)-Cy5.5.

En primer lugar, se puede observar en la Figura 6.2.A como disminuye la CPT analizada en tumor a medida que transcurre el tiempo.

Por otra parte, la cantidad de fármaco detectada en el hígado no presentó grandes variaciones a lo largo del experimento (Figura 6.2.B), si bien, la tendencia es al descenso paulatino de los niveles de CPT con el tiempo, bien sea por excreción hepática o por liberación al torrente sanguíneo.

Por otro lado, la concentración de fármaco detectada en los pulmones descendió paulatinamente, algo que podría indicar la diseminación de los agregados situados en los capilares pulmonares (Figura 6.3.C).

Por el contrario, la concentración de CPT presente en bazo aumentó a medida que avanzaba el tiempo. Una posible interpretación es que, esto se debe a la captación por parte del SRE de las nanopartículas vertidas al torrente sanguíneo desde los pulmones y el hígado (Figura 6.3.D).

A continuación, la cantidad de CPT analizada en el riñón aumenta, debido probablemente, a que el tamaño de las nanopartículas no permite su eliminación mediante filtración glomerular debido a su tamaño (Figura 6.4.E). Sin embargo, la cuantía de CPT detectada en las muestras de corazón disminuye a lo largo del ensayo (Figura 6.4.F).

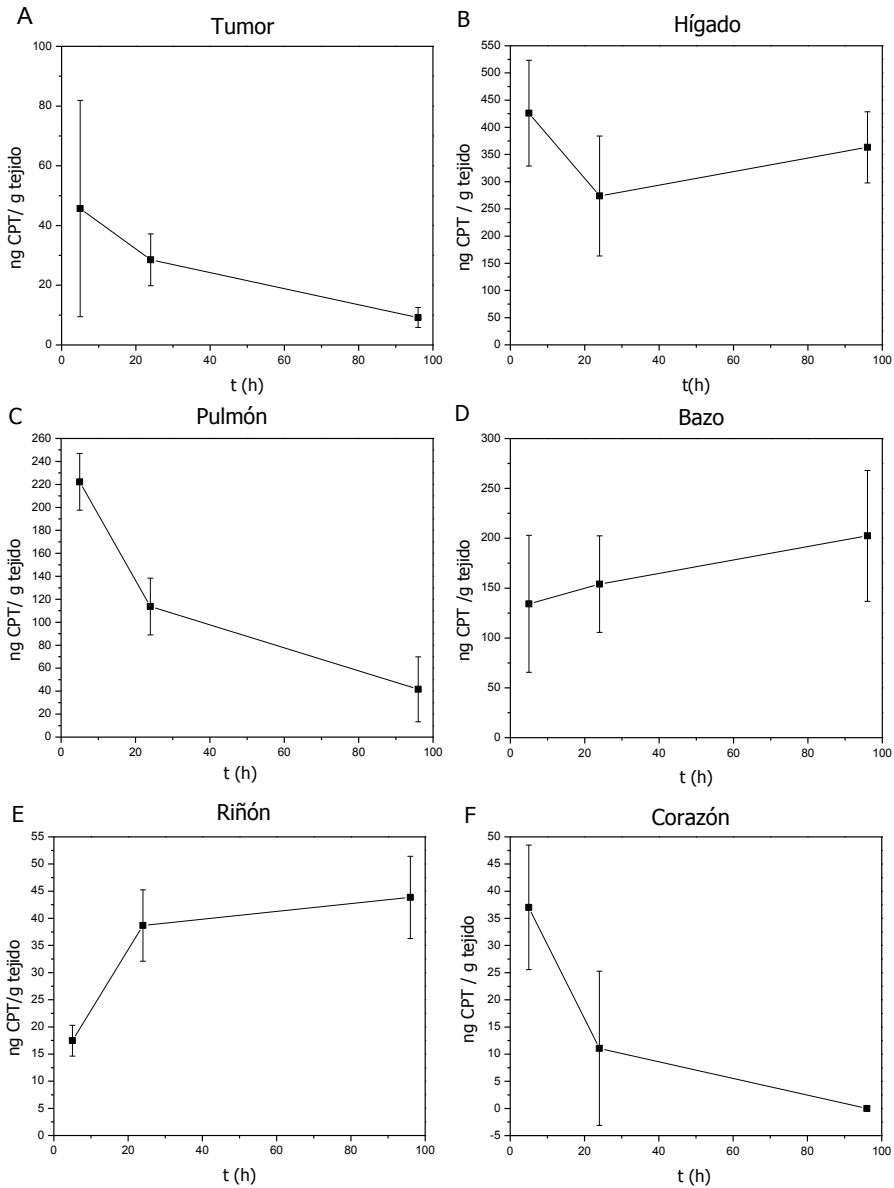


Figura 6.2. Variación de la concentración de CPT en los diferentes órganos de estudio tras la administración de SNP-(CO)-Cy5.5: A) tumor, B) hígado, C) pulmón, D) bazo, E) riñón y F) corazón. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar.

En cuanto a la CPT administrada de forma intravenosa su acumulación en tumor es ligeramente superior a la detectada por SNP-(CO)-Cy5.5, y su concentración disminuye, igualmente, con el tiempo. En cualquier caso, la cantidad máxima del fármaco se localizó de nuevo en hígado. También se analizó CPT en otras muestras de tejidos como corazón, riñones, bazo y pulmón (Figura 6.3). Por el contrario, no se detectó CPT en las muestras de plasma analizadas. Este tipo de biodistribución es característica de fármacos liposolubles, que acceden fácilmente a los órganos altamente irrigados como corazón, pulmón, hígado y riñones [14].

Precisamente, debido a este carácter lipófilo, la concentración de CPT analizada permaneció relativamente constante a lo largo del tiempo en varios de los tejidos analizados

Al comparar los resultados obtenidos para los dos tratamientos, se observa que un gran porcentaje de la CPT detectada en ambos casos se encuentra en el hígado, bazo, pulmón y riñón (Figura 6.1). En esta ocasión, la cantidad presente en tumor es ligeramente mayor cuando se emplea el fármaco libre. Esto puede deberse a las dificultades encontradas para la difusión de las partículas al tumor, aspecto que se comentará a continuación.

Por último, el grupo tratado con CPT presentó un porcentaje cercano al 10 % en tejido cardiaco, en contraste con el grupo tratado con SNP-(CO)-Cy5.5 que no presentó CPT en las muestras de corazón analizadas.

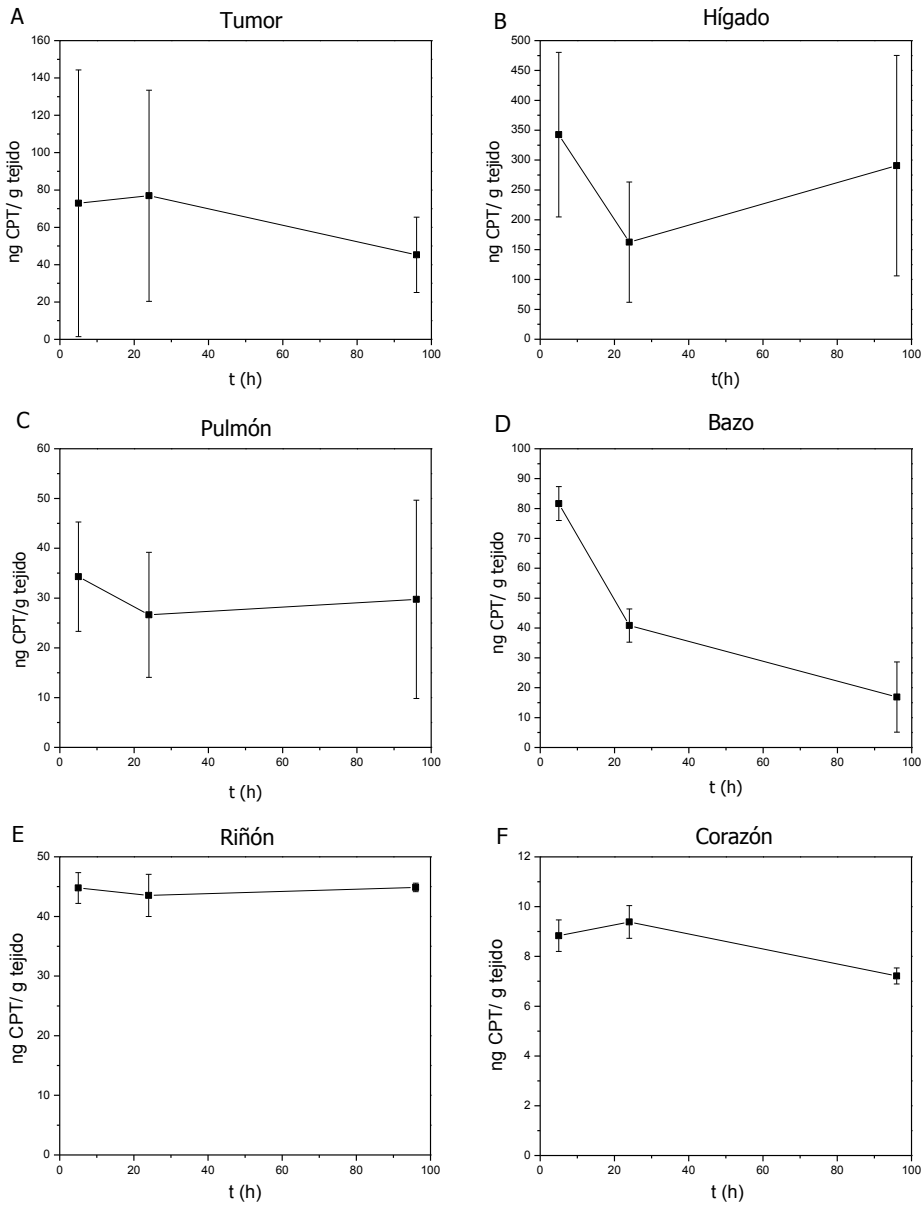


Figura 6.3. Variación de la concentración de CPT en los diferentes órganos de estudio tras la administración de CPT: A) tumor, B) hígado, C) pulmón, D) bazo, E) riñón y F) corazón. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar.

Además de realizar análisis de CPT en tejidos mediante HPLC, también se evaluó la biodistribución de SNP-(CO)-Cy5.5 mediante medidas de fluorescencia *ex vivo* (correspondiente al fluorocromo Cy5.5). En este caso se observa, igualmente, una acumulación de partículas en el hígado, pulmones y bazo, así como un descenso de la cantidad de partículas detectadas en el tumor a lo largo del ensayo (Figura 6.4).

De modo cuantitativo es posible comparar los resultados obtenidos en la biodistribución de las nanopartículas con CPT y Cy5.5 mediante estudios de fluorescencia *ex vivo* (medida del fluorocromo) y de HPLC (determinación del fármaco).

En ambos casos las nanopartículas son retiradas del torrente sanguíneo rápidamente y se acumulan, fundamentalmente, en órganos poblados densamente por células del SRE (Figura 6.4). La acumulación de nanopartículas en el compartimento tumoral tiene lugar a través del efecto de aumento de permeabilidad y retención (EPR), si bien, dicho proceso compite con el aclaramiento plasmático de las partículas llevado a cabo por células fagocíticas. Dos factores determinan el equilibrio entre ambos procesos. De un lado, las propiedades fisicoquímicas de las partículas, tales como el diámetro de partícula y la carga superficial puede influir en la farmacocinética y acumulación en tejido tumoral [15]. En este sentido debe tenerse presente que, el tamaño de partícula en medio fisiológico podría ser superior al medido por DLS y TEM, debido a fenómenos de agregación particular y recubrimiento de proteínas plasmáticas (opsonización). Por otro lado, las características del tumor, tales como tipo de cáncer, grado de desarrollo, tamaño del tumor,

localización y especie hospedadora, podrían determinar la direccionalidad de las partículas al tumor así como la permeabilidad de éste. Al respecto, debe tenerse en cuenta que el proceso de angiogénesis en tumores subcutáneos de xenoinjertos es menor que en los correspondientes tumores originales (en este caso cáncer colorrectal), lo que limita la acumulación de partículas. Con todo, a pesar del escaso porcentaje de dosis administrada de CPT acumulada en tumor los resultados obtenidos mediante fluorescencia *ex vivo* y HPLC muestran buena correlación. Así pues, las medidas de fluorescencia *ex vivo* permiten estimar de forma rápida la acumulación de partículas en tumor y tejidos, si bien, no eximen del sacrificio de los animales para llevar a cabo el estudio.

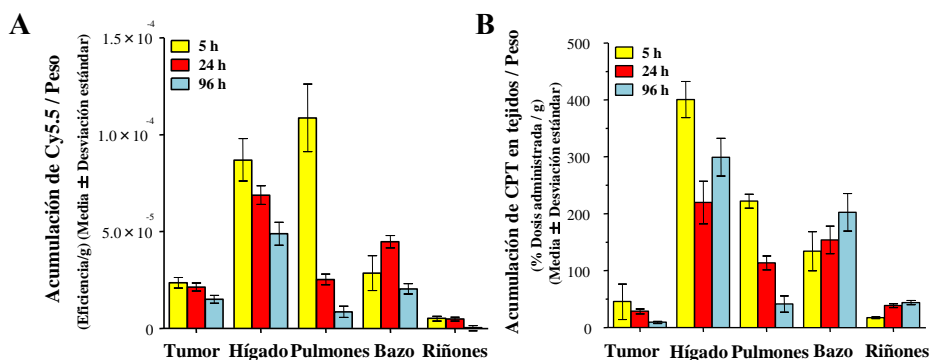


Figura 6.4. Comparación de la biodistribución de SNP-(CO)-Cy5.5 en los diferentes órganos y tejidos medida empleando diferentes técnicas. A) Señal de fluorescencia *ex vivo* correspondiente a Cy5.5. B) Análisis de CPT en tejidos mediante HPLC (% dosis administrada).

6.1.2. Comparativa con otros nanofármacos

Se han realizado estudios similares empleando diferentes soportes para la difusión de CPT. En primer lugar, J. Zink *et al.* [16] utilizaron MCM-41 funcionalizado con grupos fosfonato en la superficie del material para mejorar su estabilidad en medio acuoso. Se comparó la biodistribución del soporte original frente a un nuevo material con folato anclado en el exterior, para evaluar la endocitosis de las nanopartículas mediada por receptores.

La acumulación en tejidos se midió a través de dos técnicas diferentes: inicialmente se utilizaron medidas de fluorescencia *in vivo* para determinar la biodistribución de los dos materiales a estudio. Se obtuvo una señal de fluorescencia intensa en tumor, indicando acumulación debido al efecto EPR.

En segundo lugar se empleó un equipo de plasma de acoplamiento inductivo junto a un espectrofotómetro de emisión óptica (ICP-OES). De esta manera se cuantificó la cantidad de sílice presente en los diferentes tejidos y fluidos analizados. Los resultados obtenidos mediante esta técnica también indican una acumulación mayoritaria en tumor, seguido de una retención secundaria en pulmón. En esta ocasión las nanopartículas funcionalizadas con folato presentan un depósito en tumor más acentuado que las partículas originales. Probablemente se debe a que el folato actúa como un potenciador del proceso de endocitosis [17].

No obstante, los análisis realizados en fluidos indican que alrededor del 95 % de la dosis suministrada se eliminó a través de orina y heces a los cuatro días, lo que está en desacuerdo con una elevada acumulación del fármaco en tumor. Cabe destacar que los animales de

estudio no presentaron ningún tipo de lesión histológica en los tejidos y órganos examinados [18].

Por otro lado también se ha realizado un estudio de biodistribución empleando polímeros de ciclodextrinas (IT-101), analizando la cantidad de CPT presente en los diferentes tejidos [19]. Los resultados indican una acumulación mayoritaria en tumor tras 24 h de la administración. También se produce una retención secundaria del polímero en hígado, bazo y pulmón.

Estos resultados indican cierto grado de detección del polímero por parte del SRE, quedando inmovilizado en hígado y bazo. Por otra parte, la presencia del material IT-101 en pulmón se podría justificar mediante la retención de agregados en los capilares pulmonares [5].

A diferencia de los experimentos realizados con otros nanofármacos, en nuestro estudio la acumulación del material en tumor es limitada, debido a una elevada captación de partículas por componentes del SRE.

En cualquier caso, los resultados obtenidos concuerdan con la mayoría de las referencias bibliográficas que estudian la biodistribución de nanopartículas de sílice en función de su estructura, tamaño y funcionalización en ratones sanos, indicando que tras la administración intravenosa las partículas tienden a acumularse en hígado [5-13], riñones [6, 8], bazo [5, 9-10, 12-13], y pulmones [8, 13].

6.2. Tolerabilidad

La toxicidad de los compuestos administrados se determinó monitorizando el peso de los animales de estudio, su comportamiento y aspecto.

En primer lugar se estableció la dosis tolerada máxima (MTD) para la CPT administrada de forma intravenosa. Para ello se administraron dos dosis diferentes del fármaco a cada uno de los grupos de estudio, 0,8 mg/kg y 3 mg/Kg (véase sección 3.6.3).

La administración de CPT (0,8 mg/Kg) provocó efectos secundarios como dolor, hematuria, pérdida de peso, necrosis y pérdida parcial de las colas (Tabla 6.1). Por otro lado, el grupo tratado con 3 mg/Kg de CPT además presentó venas impracticables (vena lateral de la cola y vena safena) y muerte de 2 de los especímenes tratados. Debido a la intensidad y extrema gravedad de los efectos secundarios se suspendió el ensayo en este grupo 15 días después de iniciar el tratamiento.

Por el contrario, la administración de SNP-(CO)-CPT3 (véase capítulo 4) a razón de 0,8 mg CPT/Kg no provocó ningún tipo de reacción adversa en los ratones tras 22 días de tratamiento. Tampoco generó ningún cambio en el comportamiento de los animales de estudio.

Así pues, la unión del fármaco a un soporte como SNP reduce notablemente los efectos adversos observados en el tratamiento con CPT en ratones, lo que abre la posibilidad de incrementar la dosis administrada o bien prolongar el tratamiento con el fin de mejorar los resultados clínicos.

Tabla 6.1. Parámetros principales monitorizados en el estudio de tolerabilidad de CPT y SNP-(CO)-CPT3 (0,8 mg CPT/Kg).

	PBS	CPT	SNP-(CO)-CPT3
Peso del ratón			
Ratio T/C de pérdida de peso (%)	0	-9	2
Efectos secundarios^a			
Dolor	-	+++	-
Hematuria	-	+++	-
Venas impracticables	-	++	-
Necrosis o pérdida de colas	-	+	-

^a Incidencia en ratones: +++ = 100 %; ++ = 50 %; + = 25 % ; - = 0 %

6.3. Eficacia terapéutica

La actividad terapéutica del nanofármaco SNP-(CO)-CPT3 viene condicionada por la biodistribución obtenida en el apartado anterior. La intensidad del efecto EPR mostrada por el nanofármaco determinará en gran medida su potencial terapéutico. Por otro lado, la captación de nanopartículas por parte del SRE podría dar lugar a una serie de efectos secundarios no deseados.

A pesar de los posibles inconvenientes citados previamente se produce cierta acumulación del nanofármaco en el tejido tumoral. Este hecho facilitaría la liberación controlada de la CPT en el foco patológico, ya que una vez producida la endocitosis del material, apenas se liberará CPT en el lisosoma debido a la estabilidad del material a pH ácido [20]. De este modo se produciría una liberación de CPT constante y

prolongada en el citosol, algo deseable cuando se aplican tratamientos con inhibidores de la fase S del ciclo celular [21].

El estudio de eficacia terapéutica se ha llevado a cabo mediante administraciones sucesivas del nanofármaco SNP-(CO)-CPT3 (0,8 mg/Kg de CPT equivalente en cada administración) sobre un grupo de animales a lo largo de tres semanas, tal y como se describe en la sección 3.6.3. En paralelo, sendos grupos de ratones atímicos hembra fueron tratados con una dosis idéntica del fármaco libre o con PBS (grupo control). Al final del experimento los animales se sacrificaron y se determinó la concentración de CPT en los diferentes tejidos por HPLC.

Asimismo, con la finalidad de seguir la evolución del tumor, todos los animales se trataron con 150 mg/Kg de D-luciferina en PBS mediante inyección intraperitoneal. La acumulación de este marcador en el tumor permitió obtener imágenes de bioluminiscencia (BLI) 13-21 minutos tras la inyección. Para ello se utilizó un equipo IVIS[®] *Spectrum Imaging System* con el programa *Living Image*[®] 3.2 estableciendo las regiones de interés y cuantificando la señal como fotones por segundo (fotones/s).

El análisis por HPLC del grupo tratado con SNP-(CO)-CPT3 presentó una acumulación mayoritaria en el hígado, seguido de los pulmones y el bazo, de manera similar a los resultados obtenidos en los experimentos de biodistribución presentados en el apartado 6.1.1.

A pesar de ello, no se aprecian efectos secundarios en los animales de estudio. También se detectó una pequeña cantidad de CPT en tumor (alrededor del 0,5 % de la dosis administrada) (Figura 6.5).

En lo que refiere a los grupos tratados con CPT administrada por vía intravenosa, se apreció un depósito del fármaco en el hígado, pulmón,

bazo y riñón, si bien la cantidad detectada en tumor era muy baja. La acumulación de la CPT en bazo también se ha descrito para otro tipo de fármacos como colchicina, eritromicina, pirimetamina, tetraciclinas y cloroquinas [22]. Esto puede deberse a que para dosis elevadas de CPT el hígado no es capaz de transformar el fármaco en derivados hidrosolubles eliminables por orina a través de los riñones, y por esta causa se produce la acumulación en bazo.

A su vez, los efectos adversos extremos observados en el apartado anterior tras la administración de dosis de 3 mg CPT/Kg se pueden producir debido a la incapacidad de metabolizar y eliminar la CPT por parte del organismo.

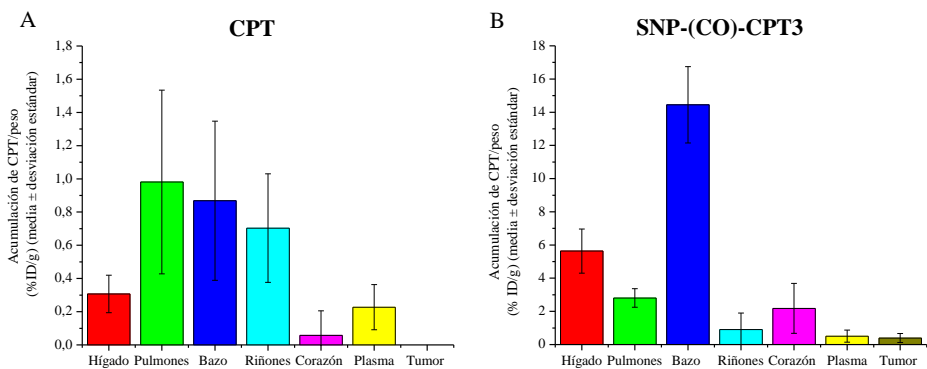


Figura 6.5. Porcentaje de la dosis inyectada de CPT en los diversos tejidos determinado por HPLC tras el punto final (día 22) del estudio de eficacia terapéutica.

6.3.1. Evolución del volumen del tumor

Se analizó la evolución de los xenoinjertos tumorales realizando medidas del volumen de los tumores en los diferentes grupos con un calibre y por BLI. En el caso de las medidas con calibre, se observó que

tanto el tratamiento con CPT como con el nanofármaco SNP-(CO)-CPT3 produjo un retraso significativo en el crecimiento del tumor en comparación con el grupo control (PBS).

El nanofármaco SNP-(CO)-CPT3 resulta claramente más efectivo que la CPT, ya que a los 15 días de estudio los ratios tumor/control (T/C) eran 95 y 88 % para los grupos tratados con CPT y SNP-(CO)-CPT3, respectivamente. Tras 22 días, los ratios T/C eran 81% para el grupo tratado con CPT y 69 % en el caso de SNP-(CO)-CPT3 (Figura 6.6.A) [1].

Los resultados obtenidos se contrastaron con las medidas de BLI. En este caso también se obtiene un mayor retraso en el crecimiento del tumor al emplear el tratamiento con SNP-(CO)-CPT3 (Figuras 6.6.B y Figura 6.7).

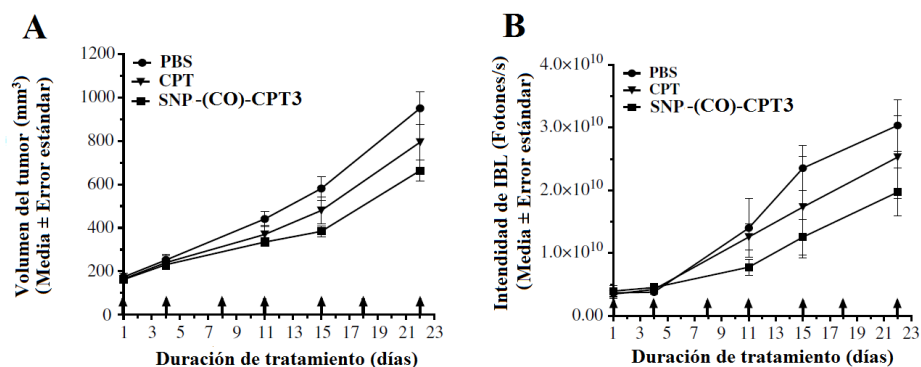


Figura 6.6. Inhibición del crecimiento tumoral. A) Mediante medidas externas del volumen tumoral empleando pie de rey. B) A través de señales de bioluminiscencia (BLI).

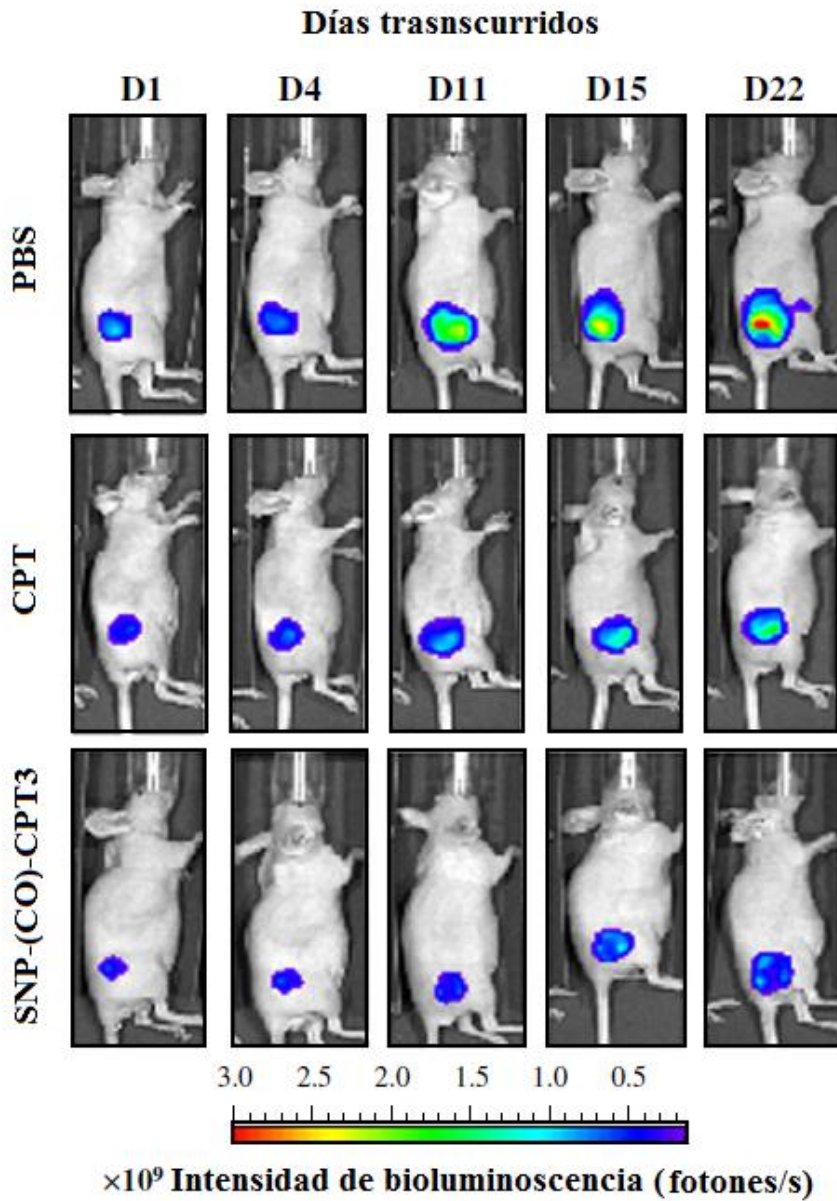


Figura 6.7. Inhibición del crecimiento tumoral. Monitorización *in vivo* de un ratón representativo de cada uno de los tratamientos tras: 1, 4, 11, 15 y 22 días de tratamiento [1].

Al respecto, creemos que la eficacia terapéutica del material SNP-(CO)-CPT3 se debe a la liberación de la CPT de forma lenta y continuada en el citosol celular. Esto sería posible debido a la estabilidad del enlace éster que une el soporte a la CPT en medio ligeramente ácido, como el de los lisosomas [19].

Los análisis de CPT realizados en tejidos también refuerzan la hipótesis de una liberación de CPT prolongada en el foco patológico. Como se ha visto anteriormente, la cantidad de fármaco detectada tras 22 días, era mayor en el grupo tratado con SNP-(CO)-CPT3 ($47,2 \pm 62,2$ ng/ml en sangre y $66,0 \pm 45,5$ ng/g en tumor), que en el grupo tratado con CPT ($38,2 \pm 22,9$ ng/ml en sangre y $<0,1$ ng/g en tumor) (Figura 6.8). Probablemente, la CPT se eliminó a través de la orina como indicaría la importante cantidad de fármaco analizada en riñones en el grupo tratado con $0,8$ mg/Kg de CPT.

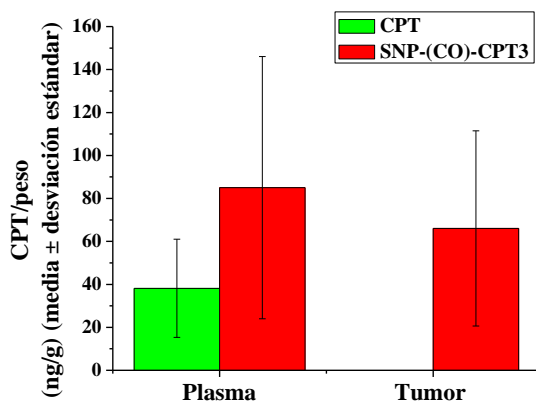


Figura 6.8. Concentración de CPT en plasma y tumor tras el tratamiento terapéutico (22 días). Los valores se expresan como ng CPT/ml y ng CPT/g, respectivamente.

6.3.2. Comparativa con otros nanofármacos

Se han llevado a cabo estudios de eficacia terapéutica con diferentes nanofármacos de CPT. En primer lugar, se ha realizado un ensayo de efectividad terapéutica empleando nanopartículas de MCM-41 con una duración de 68 días. Tras el tratamiento, prácticamente se eliminan los tumores en los grupos tratados con los dos tipos de nanopartículas testadas [18].

No obstante, aunque se trata de materiales similares, los datos son difícilmente comparables con los obtenidos para nuestro nanofármaco debido a que Lu *et al.* efectúan un ensayo de prevención del crecimiento tumoral, siendo la dosis administrada más elevada (y por vía intraperitoneal) [18], mientras que en el experimento realizado con SNP-(CO)-CPT3 se evalúa la inhibición del crecimiento del tumor una vez está desarrollado.

Por otro lado, los ensayos de actividad terapéutica realizados con polímeros de ciclodextrinas indican una actividad antineoplásica mejorada frente el fármaco libre (CPT). Si bien no se produce una regresión total del tumor en todos los casos de estudio, si se produce una inhibición del crecimiento, manteniendo un volumen de tumor constante cercano a los 100 mm³ durante más de 100 días tras el tratamiento. Esta mejora en la eficacia terapéutica puede deberse a la liberación prolongada de la CPT en el tejido tumoral tal y como ocurre en nuestro caso [23]. Además, el nanofármaco de ciclodextrinas es capaz de producir regresión total del tumor en sarcoma de Ewing diseminado y presenta actividad antineoplásica en diferentes líneas celulares resistentes a derivados de la CPT como el Irinotecan [20].

6.4. Conclusiones parciales

El nanofármaco SNP-(CO)-CPT3 se acumula mayoritariamente en hígado, aunque también se detecta en otros tejidos como bazo, pulmones y riñones. Estos resultados indican un reconocimiento y captación de las partículas por parte del SRE.

La cantidad de nanopartículas con CPT acumulada en tumor es relativamente baja (<1 %), si bien está en la línea de lo esperable para ese tipo de preparados farmacéuticos.

Por otro lado, la CPT inyectada por vía intravenosa presentó una biodistribución típica de fármacos liposolubles, en la que el fármaco se acumula en los órganos con mayor irrigación.

En lo referente a la tolerabilidad del tratamiento terapéutico, la administración de CPT genera una gran cantidad de efectos secundarios dependientes de la dosis. Los animales de estudio presentaron dolor, hematuria, pérdida de peso, venas coccígea y safena impracticables, necrosis y pérdida parcial de las colas, e incluso muerte.

Sin embargo, la administración del nanofármaco SNP-(CO)-CPT3 no generó ningún tipo de reacción adversa, ni cambios en el comportamiento de los animales. De este hecho se deduce que la unión del profármaco a un vehículo como SNP suprime los efectos secundarios mostrados en el tratamiento con CPT a concentración terapéutica.

Por último, el tratamiento con SNP-(CO)-CPT3 resulta claramente más eficaz en la inhibición del crecimiento tumoral que el fármaco libre, puesto que el grupo administrado con nanofármaco presenta ratios de T/C y BLI inferiores a los animales tratados con CPT.

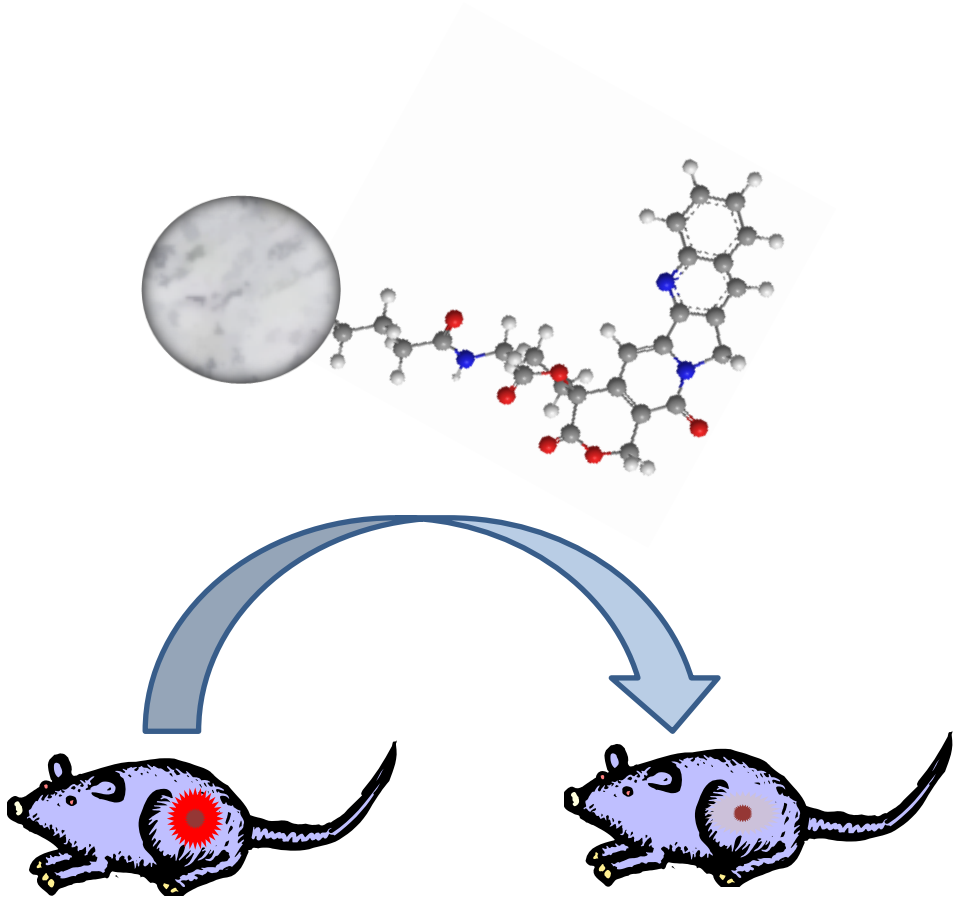
Por lo tanto, el tratamiento con el nanofármaco SNP-(CO)-CPT3 ofrece dos ventajas fundamentales frente al uso de la molécula del antitumoral. En primer lugar, una mayor eficacia terapéutica que la CPT y además la ausencia de efectos secundarios a la dosis empleada.

Referencias

- [1] Botella, P.; Abasolo, I.; Fernández, Y.; Muniesa, C.; Miranda, S.; Quesada, M.; Ruiz, J.; Schwartz Jr, S.; Corma, A. *J. Control. Release* **2011**, 156, 246-257.
- [2] Nel, A. E.; Madler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M. V.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M. *Nat. Mater.* **2009**, 8, 543-557.
- [3] Cedervall, T.; Lynch, I.; Lindman, S.; Berggård, T.; Thulin, E.; Nilsson, H.; Dawson, K. A.; Linse, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 2050-2055.
- [4] Owens III, D. E.; Peppas, N. A. *Int. J. Pharm.* **2006**, 307, 93-102.
- [5] Yu, T.; Greish, K.; McGill, L. D.; Ray, A.; Ghandehari, H. *ACS Nano* **2012**, 6, 2289-2301.
- [6] He, X.; Nie, H.; Wang, K.; Tan, W.; Wu, X.; Zhang, P. *Anal. Chem.* **2008**, 80, 9597-9603.
- [7] Souris, J. S.; Lee, C.-H.; Cheng, S.-H.; Chen, C.-T.; Yang, C.-S.; Ho, J.-a. A.; Mou, C.-Y.; Lo, L.-W. *Biomaterials* **2010**, 31, 5564-5574.
- [8] Galagudza, M. M.; Korolev, D. V.; Sonin, D. L.; Postnov, V. N.; Papayan, G. V.; Uskov, I. S.; Belozertseva, A. V.; Shlyaktho, E. V. *Int J Nanomedicine* **2010**, 5, 231-238.
- [9] Kumar, R.; Roy, I.; Ohulchanskyy, T. Y.; Vathy, L. A.; Bergey, E. J.; Sajjad, M.; Prasad, P. N. *ACS Nano* **2010**, 4, 699-708.
- [10] Xie, G.; Sun, J.; Zhong, G.; Shi, L.; Zhang, D. *Arch. Toxicol.* **2010**, 84, 183-190.
- [11] Lee, C.-H.; Cheng, S.-H.; Wang, Y.-J.; Chen, Y.-C.; Chen, N.-T.; Souris, J.; Chen, C.-T.; Mou, C.-Y.; Yang, C.-S.; Lo, L.-W. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, 19, 215-222.
- [12] Burns, A. A.; Vider, J.; Ow, H.; Herz, E.; Penate-Medina, O.; Baumgart, M.; Larson, S. M.; Wiesner, U.; Bradbury, M. *Nano Lett.* **2008**, 9, 442-448.
- [13] Yu, T.; Hubbard, D.; Ray, A.; Ghandehari, H. *J. Control. Release* **2012**, 163, 46-54.
- [14] Flórez, J. *Farmacología Humana*. 4ª ed.; Masson: Barcelona, 2005; pp 67-68.
- [15] Perrault, S. D.; Walkey, C.; Jennings, T.; Fischer, H. C.; Chan, W. C. W. *Nano Lett.* **2009**, 9, 1909-1915.

- [16] Lu, J.; Liang, M.; Zink, J. I.; Tamanoi, F. *Small* **2007**, 3, 1341-1346.
- [17] Heidel, J.; Davis, M. *Pharm. Res.* **2011**, 28, 187-199.
- [18] Lu, J.; Liang, M.; Li, Z.; Zink, J. I.; Tamanoi, F. *Small* **2010**, 6, 1794-1805.
- [19] Schlupe, T.; Cheng, J.; Khin, K.; Davis, M. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2006**, 57, 654-662.
- [20] Schlupe, T.; Hwang, J.; Cheng, J.; Heidel, J. D.; Bartlett, D. W.; Hollister, B.; Davis, M. E. *Clin. Cancer. Res.* **2006**, 12, 1606-1614.
- [21] Gerrits, C.; de Jonge, M.; Schellens, J.; Stoter, G.; Verweij, J. *Br. J. Cancer* **1997**, 76, 952-962.
- [22] Mendoza Patiño, N. *Farmacología médica*. Editorial Panamericana: México DF, 2008; pp 45-49.
- [23] Cheng, J.; Khin, K. T.; Davis, M. E. *Mol. Pharm.* **2004**, 1, 183-193.

Capítulo 7



Conclusiones

7. Conclusiones generales

En la presente tesis doctoral se han preparado, caracterizado y utilizado en terapia anticancerígena diferentes modelos de nanofármacos basado en partículas de sílice y camptotecina, evaluando su estabilidad en fluidos biológicos, posible toxicidad y potencial terapéutico mediante ensayos en cultivos celulares y en xenoinjertos de cáncer colorrectal humano en ratón. A lo largo de los diversos capítulos de la presente tesis se han expuesto las conclusiones parciales obtenidas a partir de los resultados experimentales. A continuación, se muestran las conclusiones generales extraídas a partir del conjunto de información lograda durante la investigación:

- Los diferentes nanomateriales de sílice desarrollados y sus derivados funcionalizados con grupos orgánicos carecen de citotoxicidad significativa en los modelos *in vitro* estudiados. Este hecho, posibilita la aplicación de nanopartículas de sílice como vehículos para la fabricación de nanofármacos.
- Se ha desarrollado un modelo de nanofármaco basado en nanopartículas de sílice de topología variable que incorporan en su superficie la molécula de camptotecina mediante un enlace éster. La ruptura de dicho enlace por la acción de álcalis o carboxilasas citoplasmáticas permite la liberación del fármaco.
- Se ha desarrollado un modelo de nanofármaco basado en nanopartículas de sílice de estructura *core-shell*, con núcleo de sílice amorfa no porosa y cubierta de sílice mesoporosa organizada, sobre las que se incorpora la molécula de camptotecina mediante un puente disulfuro. La ruptura de dicho enlace por la acción de compuestos reductores activa un mecanismo de ciclación intramolecular entre el grupo tiol libre y un

grupo carbonato cercano, del cual resulta la liberación del fármaco y una tiolactona.

- Los nanofármacos sintetizados presentan gran estabilidad y escasa liberación inespecífica del fármaco o *leaching* en fluidos biológicos, lo que facilita la preparación de formas farmacéuticas inyectables. De esta forma, se limitan los efectos secundarios asociados a la distribución sistémica del principio activo. Esto se debe a que, el enlace covalente formado entre la molécula terapéutica y el soporte de sílice únicamente se escinde de manera cuantitativa bajo condiciones específicas correspondientes a la actividad bioquímica intracelular, como la acción de determinadas enzimas o de compuestos reductores.
- En los nanofármacos desarrollados, el proceso de liberación de la camptotecina está gobernado por fenómenos de difusión. Así pues, los datos experimentales se ajustan bien al modelo cinético de Higuchi, en el caso de liberación por hidrólisis alcalina de ésteres, bien al modelo de Ritger-Peppas, en el caso de liberación por reducción de puentes disulfuro.
- El diámetro de poro de los nanomateriales condiciona el proceso de liberación del fármaco, de manera que las restricciones a la difusión disminuyen (mayor constante cinética) al aumentar el tamaño de poro.
- El carácter hidrofóbico de los nanofármacos condiciona el proceso de endocitosis, en la medida en que dicha hidrofobicidad conduce a peores dispersiones en medio acuoso, agregación de partículas y aumento del radio hidrodinámico, lo que en determinadas condiciones favorece la captación por parte de las células. En este sentido, el carácter hidrofóbico aumenta en la medida en que se incrementa la cantidad de camptotecina incorporada al soporte inorgánico.

- El modelo de nanofármaco basado en nanopartículas de sílice que incorporan camptotecina mediante enlace éster presenta una actividad citotóxica (expresada como valor de IC_{50}) ligeramente inferior al de la camptotecina libre en las diferentes líneas celulares comerciales estudiadas. Ello se debe a impedimentos de tipo estérico que dificultan la hidrólisis enzimática del enlace éster que une el fármaco al soporte inorgánico.
- A pesar de lo anterior, el modelo de nanofármaco basado en nanopartículas de sílice que incorporan camptotecina mediante enlace éster presenta una elevada capacidad de carga de camptotecina (hasta un 10 % en peso), lo que lo hace especialmente interesante para el tratamiento del cáncer colorrectal en estudios *in vivo*.
- El modelo de nanofármaco basado en nanopartículas de sílice sobre las que se une la camptotecina mediante puente disulfuro presenta citotoxicidad variable en células HeLa (expresada como valor de IC_{50}), en función del ligando utilizado para incorporar la camptotecina. En este caso, la longitud de dicho ligando determina la ciclación intramolecular que deja libre la molécula de camptotecina, y sólo la cadena más corta (2 carbonos) permite la liberación completa, obteniéndose valores de IC_{50} similares a los del fármaco libre.
- La incorporación de fluorocromos como rodamina B o Cy5.5, bien sea sobre la superficie del nanofármaco o en el interior de la partícula, es posible mediante reacciones químicas sencillas, y permite llevar a cabo un seguimiento de la difusión de las partículas terapéuticas en estudios *in vitro* e *in vivo*.
- Los ensayos realizados en xenoinjertos de cáncer colorrectal humano en ratón evidencian la captación parcial de los nanofármacos por parte de

células del sistema retículo-endotelial, a la vez que la acumulación registrada en tumor es relativamente baja (inferior al 1% de la dosis administrada).

- A pesar de lo anterior, la terapia aplicada con el nanofármaco basado en nanopartículas de sílice y camptotecina presenta un incremento en la eficacia terapéutica respecto del fármaco libre, y produce una reducción drástica de los efectos secundarios hasta su desaparición a las dosis empleadas.

Anexo I

Índice de Figuras y Tablas

Capítulo 1

Figura	Pie de figura	Página
Figura 1.1.	Hidrólisis de la CPT.	4
Figura 1.2.	Modelo de interacción de la CPT con la enzima topoisomerasa I y ADN.	5
Figura 1.3.	Esquema del efecto EPR.	9
Figura 1.4.	Liposoma pegilado.	16
Figura 1.5.	Representación de dendrímero.	17
Figura 1.6.	Ciclodextrina β .	18
Figura 1.7.	Representación de la síntesis y degradación de quitosano.	21
Figura 1.8.	Estructura química del PLGA.	23
Figura 1.9.	Nanotubos de carbono.	24
Figura 1.10.	Nanopartículas de oro con geometría variada.	26
Figura 1.11.	Esquema de la formación de un MOF y su aplicación para la difusión de fármacos.	27
Figura 1.12.	Esquema de liberación de fluoresceína a partir de nanopartículas de sílice mesoporosa.	29
Figura 1.13.	Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de MSN con cubierta de PEI. Las flechas indican que el interior del poro queda accesible para la incorporación del fármaco y siARN.	30
Figura 1.14.	Nanopartícula de sílice mesoporosa con mecanismo de liberación de la carga por reducción de enlaces disulfuro.	30
Figura 1.15.	Representación esquemática de la síntesis biomimética. 1) Incorporación del fármaco. 2) Condensación de la sílice en la superficie de la micela. 3) Evaporación del disolvente.	33
Figura 1.16.	Esquema de nanopartícula <i>core-shell</i> .	34
Figura 1.17.	Esquema de síntesis de nanopartículas oro-sílice (Au@SiO_2).	35
Figura 1.18.	Imágenes de microscopía electrónica de barrido SEM.	35

Figura	Pie de figura	Página
Figura 1.19.	Secuencia de la síntesis pseudomórfica de nanopartículas de oro con cubierta de sílice mesoporosa.	36
Figura 1.20.	Representación de un sistema de liberación basado en nanopartículas de sílice sensible al pH ácido.	37
Figura 1.21.	Representación esquemática de la liberación de fármaco desde una matriz de sílice mesoporosa mediante un estímulo reductor.	38
Figura 1.22.	Representación de un sistema de liberación basado en nanopartículas de sílice con puertas moleculares activadas por irradiación UV.	39
Figura 1.23.	Esquema de la incorporación de Gly-CPT-TFA a nanopartículas de sílice funcionalizadas con grupos carboxilo.	39
Figura 1.24.	Esquema de un sistema de liberación basado en nanopartículas de sílice sensible a enzimas.	40
Figura 1.25.	Representación artística de liposomas con una cubierta orgánica-inorgánica sensible a la acción de esterasas.	41

Capítulo 3

Figura	Encabezado	Página
Figura 3.1.	Esquema de disposición de la cubeta en el fluorímetro	80
Figura 3.2.	Recta de calibrado (UV-vis).	89
Figura 3.3.	Recta de calibrado (fluorescencia).	90
Figura 3.4.	Esquema de microscopio invertido.	92
Figura 3.5.	Esquema de microscopio confocal.	93
Figura 3.6.	Reducción de MTT en formazán.	94
Figura 3.7.	Diagrama de flujo de trabajo de los ensayos <i>in vivo</i> .	99

Tabla	Encabezado	Página
Tabla 3.1.	Relación de los diferentes profármacos y nanofármacos sintetizados	74
Tabla 3.2.	Grupos de animales de experimentación según el tratamiento recibido en el estudio de biodistribución	98
Tabla 3.3.	Grupos de animales de experimentación según el tratamiento aplicado en el estudio de tolerabilidad.	101
Tabla 3.4.	Grupos de animales de experimentación según el tratamiento aplicado en el estudio de eficacia terapéutica.	102

Capítulo 4

Figura	Pie de figura	Página
Figura 4.1.	A) Cromatograma, B) espectro de masas y C) señales de RMN (^1H y ^{13}C) de Gly-CPT·TFA.	112
Figura 4.2.	A) Espectro de RMN-MAS de ^{29}Si del material SNP-COOH. B) Espectro de RMN-MAS de ^{13}C del material SNP-COOH. C) Espectro de RMN ^{13}C CP-MAS del material SNP-(CO)-CPT. Espectros de absorción (D) y emisión (E) del material SNP-(CO)-CPT. F) Diámetro hidrodinámico de los materiales SNP-(CO)-CPT empleando DLS. G y H) Imágenes de TEM del material SNP-(CO)-CPT2.	117
Figura 4.3.	A) Espectro de absorción UV-vis del material SNP-(CO)-Cy5.5. B y C) Espectros de emisión de fluorescencia tras excitar la muestra a 368 nm y 684 nm respectivamente. D) Medida del diámetro hidrodinámico del material SNP-(CO)-Cy5.5 empleando DLS.	119

Figura	Pie de figura	Página
Figura 4.4.	A) Espectro de difracción de rayos X del material MSN-(CO)-CPT2. B) Espectro de RMN-MAS de ¹³ C de MSN-(CO)-CPT. C) Micrografía obtenida mediante TEM. D) Diámetro hidrodinámico de los materiales MSN-(CO)-CPT1 y MSN-(CO)-CPT2 empleando DLS.	122
Figura 4.5.	A) Imagen del material FSN-(CO)-CPT empleando TEM. B) Media del diámetro hidrodinámico del material FSN-(CO)-CPT mediante DLS.	124
Figura 4.6.	Liberación de CPT a partir del material SNP-(CO)-CPT1 en función del pH. Condiciones experimentales: T = 37 °C, t = 3 h y 5 mg/ml.	126
Figura 4.7.	Liberación de CPT a partir de materiales SNP-(CO)-CPT con diferente carga de fármaco. Condiciones experimentales: T = 37 °C, t = 24 h , pH = 12 y 5 mg/ml.	127
Figura 4.8.	Liberación de CPT a partir de diferentes materiales con diámetro de poro variable. Condiciones experimentales: T = 37 °C, t = 24 h, pH = 12 y 5 mg/ml.	128
Figura 4.9.	Gráficas correspondientes a diferentes modelos de liberación: A) Higuchi, B) primer orden, C) Bhaskar y D) Ritger-Peppas para SNP-(CO)-CPT2. Condiciones de proceso: T = 37 °C, t = 24 h, pH = 12 y 5 mg/ml.	129
Figura 4.10.	Gráficas correspondientes a diferentes modelos de liberación: A) Higuchi, B) primer orden, C) Bhaskar y D) Ritger-Peppas para MSNP-(CO)-CPT2. Condiciones de proceso: T = 37 °C, t = 6 h, pH = 12 y 5 mg/ml.	130

Figura	Pie de figura	Página
Figura 4.11.	Gráficas correspondientes a diferentes modelos de liberación: A) Higuchi, B) primer orden, C) Bhaskar y D) Ritger-Peppas para FSN-(CO)-CPT. Condiciones de proceso: T = 37 °C, t = 6 h, pH = 12 y 5 mg/ml.	131
Figura 4.12.	A) Porcentaje de CPT liberado a partir del material SNP-(CO)-CPT1 tras tres horas en suero humano y PBS. T = 37 °C, t = 3 h, se emplea suero humano y una disolución de PBS. B) Ensayo de estabilidad de SNP-(CO)-CPT1 en suero humano. T = 37 °C, t = 24 h, se emplea suero humano.	133
Figura 4.13.	Fotografías de cultivos celulares HeLa empleando microscopio invertido tras 72 h de incubación con: A) 1,25 µg/ml de CPT. B) 1,25 µg/ml equivalentes de CPT empleando el material SNP-(CO)-CPT2. C) Material SNP-COOH.	134
Figura 4.14.	Gráficas de ensayos de viabilidad celular MTT para diferentes tipos celulares: A) HCT-116, B) HT-29.Fluc, C) U-87 MG y D) HeLa. Cada valor representa la media ± error estándar (e.e).	136
Figura 4.15.	Internalización de nanopartículas a dos concentraciones diferentes empleando microscopía confocal. Las imágenes A y D corresponden a las células cultivadas con LysoTracker que tiñe exclusivamente los lisosomas. Por otro lado, se pueden apreciar las partículas del material SNP-(CO)-Cy5.5 en las fotografías B y E. Las fotografías C y F muestran la superposición de A-B y D-E respectivamente.	137
Figura 4.16.	Cuantificación de la colocalización sobre una sección y área determinada. A) Región de interés (ROI) sobre la que se realiza la cuantificación. B) Cuantificación de la señal debida al LysoTracker® (Ch2) y a SNP-(CO)-Cy5.5 (Ch3).	138

Figura	Pie de figura	Página
Figura 4.17.	Internalización del material SNP-(CO)-Cy5.5 (7,5 $\mu\text{g/ml}$) empleando microscopia confocal. La imagen A) corresponde a la tinción celular realizada con lysotracker y DAPI, empleados para visualizar lisosomas y núcleo celular, respectivamente. Mientras que la fotografía B) corresponde a la tinción del núcleo celular con DAPI, observándose una partícula del nanofármaco. La imagen C) muestra la superposición de las fotografías A) y B).	139
Figura 4.18.	A) Citometría de flujo de células HT-29.Fluc. B) Imágenes de microscopía de contraste de fases de células HT-29.Fluc.	140

Tabla	Encabezado	Página
Tabla 4.1.	Diferentes propiedades de los materiales SNP-(CO)-CPT.	115
Tabla 4.2.	Diámetro hidrodinámico de SNP-(CO)-CPT empleando DLS.	116
Tabla 4.3.	Diámetro hidrodinámico de SNP-(CO)-Cy5.5.	119
Tabla 4.4.	Incorporación de CPT a MSNP-COOH.	120
Tabla 4.5.	Propiedades texturales de los materiales MSN.	120
Tabla 4.6.	Diámetro hidrodinámico de MSN-(CO)-CPT.	121
Tabla 4.7.	Incorporación de CPT al material FSN-COOH.	123
Tabla 4.8.	Propiedades texturales de los materiales FSN.	123
Tabla 4.9.	Diámetro hidrodinámico de los materiales FSN	124
Tabla 4.10.	Parámetros de los diferentes modelos empleados en SNP-(CO)-CPT2	129
Tabla 4.11.	Parámetros de los diferentes modelos empleados en MSN-(CO)-CPT2.	130
Tabla 4.12.	Parámetros de los diferentes modelos empleados en FSN-(CO)-CPT.	131
Tabla 4.13.	Valores de IC_{50} para CPT y SNP-(CO)-CPT2 en diferentes líneas celulares.	135

Capítulo 5

Figura	Pie de figura	Página
Figura 5.1.	Esquema de síntesis de los precursores (2) y profármacos (4).	148
Figura 5.2.	Señales de RMN (^1H y ^{13}C) correspondientes a cada uno de los precursores.	149
Figura 5.3.	Cromatogramas correspondientes a los profármacos sintetizados: (A) CPT-OCOO-C2-SS-Py (84 %). (B) CPT-OCOO-C3-SS-Py (90 %). (C) CPT-OCOO-C4-SS-Py (83 %).	151
Figura 5.4.	Señales de RMN correspondientes a los experimentos de ^1H y ^{13}C realizados a los diferentes profármacos sintetizados.	152
Figura 5.5.	A) Espectro de RMN-MAS ^{29}Si de RhB-SiO ₂ @MSN-SH. Espectros de absorción UV-vis (B) y emisión de fluorescencia (C) de RhB-SiO ₂ @MSN-SH.	154
Figura 5.6.	Esquema de síntesis de los nanofármacos RhB-SiO ₂ @MSN-SS-Cn-CPT	155
Figura 5.7.	Representación de la oxidación de grupos tiol en RhB-SiO ₂ @MSN-SH.	156
Figura 5.8.	A) Espectro de RMN-MAS de ^{13}C del nanofármaco RhB-SiO ₂ @MSN-SS-C2-CPT (ver figura 5.4.). B) Espectro de absorción de UV-vis. C) y D) Micrografías obtenidas mediante TEM.	159
Figura 5.9.	Esquema de liberación de la CPT a partir de los profármacos.	161
Figura 5.10.	Liberación de CPT en PBS a diferentes concentraciones del agente reductor empleando el material RhB-SiO ₂ @MSN-SS-C2-CPT. Condiciones de proceso (T = 37 ° C, t = 3 h, agente reductor DTT, 5 mg/ml).	162

Figura	Pie de figura	Página
Figura 5.11.	Liberación de CPT y derivados en PBS a partir de los nanofármacos RhB-SiO ₂ @MSN-SS-Cn-CPT. Condiciones de proceso (T = 37 ° C, t = 5 h, el agente reductor (100 mM DTT) se añade transcurridas dos horas desde el inicio del experimento, 5 mg/ml).	163
Figura 5.12.	Espectros de masas correspondientes a los productos obtenidos empleando RhB-SiO ₂ @MSN-SS-C3-CPT (A) y RhB-SiO ₂ @MSN-SS-C4-CPT (B), respectivamente.	165
Figura 5.13.	Gráficas correspondientes a diferentes modelos cinéticos de liberación para RhB-SiO ₂ @MSN-SS-C2-CPT: A) Higuchi, B) primer orden, C) Bhaskar y D) Ritger-Peppas.	166
Figura 5.14.	Representación de la difusión del medio acuoso en la boca de poro e interior de los canales mesoporosos del soporte inorgánico.	167
Figura 5.15.	Gráficas correspondientes a diferentes modelos cinéticos de liberación para RhB-SiO ₂ @MSN-SS-C3-CPT: A) Higuchi, B) primer orden, C) Bhaskar y D) Ritger-Peppas.	168
Figura 5.16.	Gráficas correspondientes a diferentes modelos cinéticos de liberación para RhB-SiO ₂ @MSN-SS-C4-CPT: A) Higuchi, B) primer orden, C) Bhaskar y D) Ritger-Peppas.	169
Figura 5.17.	A) Ensayo de estabilidad en suero humano para los materiales RhB- SiO ₂ @MSN-SS-Cn-CPT. B) Estabilidad en medio fisiológico de los materiales RhB-SiO ₂ @MSN-SS-Cn-CPT. Condiciones de proceso (T = 37 ° C, 3 h, 5 mg/ml).	171
Figura 5.18.	Mecanismos posibles de liberación de CPT en suero humano a partir de los nanofármacos RhB-SiO ₂ @MSN-SS-Cn-CPT.	171

Figura	Pie de figura	Página
Figura 5.19.	Gráfica de ensayo de viabilidad celular MTT para los materiales RhB-SiO ₂ @MSN-SH y RhB-SiO ₂ @MSN-COOH. Los resultados se expresan como media ± error estándar.	172
Figura 5.20.	Gráfica de ensayo de viabilidad celular MTT en células HeLa empleando CPT y los diferentes profármacos. Los resultados se expresan como media ± error estándar.	173
Figura 5.21.	Gráfica de ensayo de viabilidad celular MTT en células HeLa empleando CPT y los diferentes nanofármacos. Los resultados se expresan como media ± error estándar.	175
Figura 5.22.	Gráfica de ensayo de viabilidad celular MTT en células HeLa empleando RhB-SiO ₂ @MSN-SS-C2-CPT y BSO. Los resultados se expresan como media ± error estándar.	176
Figura 5.23.	Gráfica de ensayo de viabilidad celular MTT en células HeLa empleando RhB-SiO ₂ @MSN-(CO)-CPT. Los resultados se expresan como media ± error estándar.	178
Figura 5.24.	Estudios de colocalización de RhB-SiO ₂ @MSN-SS-C2-CPT en células HeLa. Se obtuvieron imágenes confocales del mismo plano Z para: (A) Liso-tracker® y (B) Nanopartículas marcadas con rodamina B. (C) Corresponde a la superposición de las dos fotografías anteriores. (D) Ampliación de la zona delimitada en (C). (E) Misma imagen que en el caso anterior, esta vez empleando un umbral de detección mayor para la señal verde. Por último, (F) representa la intensidad de las señales. Los números corresponden a las nanopartículas presentes en el citosol (1) RhB-SiO ₂ @MSN-SS-C2-CPT con lisosomas (2) y lisosomas sin partículas (3).	180

Tabla	Encabezado	Página
Tabla 5.1.	Características texturales, diámetro hidrodinámico y potencial ζ del material RhB-SiO ₂ @MSN-SH.	153
Tabla 5.2.	Características composicionales y texturales de los materiales RhB-SiO ₂ @MSN-SS-Cn-CPT.	157
Tabla 5.3.	Diámetro hidrodinámico y potencial ζ de los nanofármacos RhB-SiO ₂ @MSN-SS-Cn-CPT.	158
Tabla 5.4.	Características físico-químicas de los materiales RhB-SiO ₂ @MSN-COOH y RhB-SiO ₂ @MSN-(CO)-CPT.	160
Tabla 5.5.	Diámetro hidrodinámico y potencial ζ de los materiales RhB-SiO ₂ @MSN-COOH y RhB-SiO ₂ @MSN-(CO)-CPT.	160
Tabla 5.6.	Parámetros de los diferentes modelos cinéticos de liberación aplicados para la muestra RhB-SiO ₂ @MSN-SS-C2-CPT.	167
Tabla 5.7.	Parámetros de los diferentes modelos cinéticos de liberación aplicados para la muestra RhB-SiO ₂ @MSN-SS-C3-CPT.	168
Tabla 5.8.	Parámetros de los diferentes modelos cinéticos de liberación aplicados para la muestra empleados RhB-SiO ₂ @MSN-SS-C4-CPT.	170
Tabla 5.9.	Valores de IC ₅₀ de los diferentes profármacos CPT-OCOO-Cn-SS-Py y de los nanofármacos RhB-SiO ₂ @MSN-SS-Cn-CPT en células HeLa.	174
Tabla 5.10.	Valores de IC ₅₀ para células HeLa del nanofármaco RhB-SiO ₂ @MSN-SS-C2-CPT en ausencia y presencia de un inhibidor del glutatión (BSO).	176
Tabla 5.11.	Valores de IC ₅₀ para células HeLa del nanofármaco RhB-SiO ₂ @MSN-(CO)-CPT.	178
Tabla 5.12.	Valores de internalización celular de diferentes materiales <i>core-shell</i> para células HeLa determinados por citometría de flujo.	182

Capítulo 6

Figura	Pie de figura	Página
Figura 6.1.	Distribución de CPT analizada por HPLC en los diferentes órganos y tejidos tras la administración intravenosa de SNP-(CO)-Cy5.5 a 5, 24 y 96 h.	192
Figura 6.2.	Variación de la concentración de CPT en los diferentes órganos de estudio tras la administración de SNP-(CO)-Cy5.5: A) tumor, B) hígado, C) pulmón, D) bazo, E) riñón y F) corazón. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar.	194
Figura 6.3.	Variación de la concentración de CPT en los diferentes órganos de estudio tras la administración de CPT: A) tumor, B) hígado, C) pulmón, D) bazo, E) riñón y F) corazón. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar.	196
Figura 6.4.	Comparación de la biodistribución de SNP-(CO)-Cy5.5 en los diferentes órganos y tejidos medida empleando diferentes técnicas. A) Señal de fluorescencia <i>ex vivo</i> correspondiente a Cy5.5. B) Análisis de CPT en tejidos mediante HPLC (% dosis administrada).	198
Figura 6.5.	Porcentaje de la dosis inyectada de CPT en los diversos tejidos determinado por HPLC tras el punto final (día 22) del estudio de eficacia terapéutica.	204
Figura 6.6.	Inhibición del crecimiento tumoral. A) Mediante medidas externas del volumen tumoral empleando pie de rey. B) A través de señales de bioluminiscencia (BLI).	205
Figura 6.7.	Inhibición del crecimiento tumoral. Monitorización <i>in vivo</i> de un ratón representativo de cada uno de los tratamientos tras: 1, 4, 11, 15 y 22 días de tratamiento.	206
Figura 6.8.	Concentración de CPT en plasma y tumor tras el tratamiento terapéutico (22 días). Los valores se expresan como ng CPT/ml y ng CPT/g, respectivamente.	207

Tabla	Encabezado	Página
Tabla 6.1.	Parámetros principales monitorizados en el estudio de tolerabilidad de CPT y SNP-(CO)-CPT3 (0,8 mg CPT/Kg).	202

Anexo II

Lista de acrónimos y abreviaturas

Abreviatura	Significado
A _{BET}	Area Brunauer-Emmer-Teller
AE	Análisis elemental
APTES	(3-aminopropil)trietoxisilano
ARN	Ácido ribonucleico
BET	Brunauer-Emmer-Teller
BJH	Barret-Joyner-Halenda
BLI	Imágenes de bioluminiscencia
BSO	Butionina sulfoximina
CPT	Camptotecina
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DCM	Diclorometano
DHLA	Ácido dihidrolipoico
DHLA	Ácido dihidrolipoico
DIPC	N,N'-diisopropilcarbodiimida
DIPEA	N,N'-diisopropiletilamina
DLS	Dispersión de luz dinámica
DMAP	4-(dimetilamino)piridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
Dp	Diámetro de poro
DRX	Difracción de rayos X
DTT	Ditiotreitol
EDC _i	N-(dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida clorhidrato
EPR	Permeabilidad capilar y retención tisular aumentada
FC-4	Fluorocarbono
FTIR	Espectroscopia infrarroja mediante la transformada de Fourier
GC-MS	Cromatógrafo de gases masas
Gly-CPT·TFA	Glicina-CPT (Trifluoroacetato)
GSH	Glutación
HCl	Ácido clorhídrico
HCT-116	Línea celular (carcinoma de colon)
HeLa	Línea celular (carcinoma de cérvix)
HOBT	1-hidroxibenzotriazol
HOMO	Orbital ocupado de mayor energía
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución

Abreviatura	Significado
HPLC-MS	Cromatógrafo de líquidos de alta resolución masas
HT-29	Línea celular (carcinoma de colon)
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
ICP-OES	Espectrofotómetro de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo
KJS	Kruk-Jaroniec-Sayari
LUMO	Orbital desocupado de menor energía
MDR	Resistencia múltiple a drogas
MSN	Nanopartículas de sílice mesoporosa
MTD	Dosis máxima tolerada
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótico
PBS	Tampón fosfato salino
PEG	Polietilenglicol
PEI	Polietilenimina
P-gp	Glicoproteína P
Prx	Peroxiredoxina
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN-MAS	Resonancia magnética nuclear de ángulo mágico de espín
RNA	Ácido ribonucleico
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa
siARN	Ácido ribonucleico interferente
SNP	Nanopartículas de sílice amorfa
SRE	Sistema retículo endotelial
T/C	Ratio Tumor/Control
T-boc-glicina	N-(tertbutoxicarbonil)glicina
TCA	Ácido tricloroacético
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TEOS	Tetraetilortosilicato
TFA	Ácido trifluoroacético
TMB	1,3,5-trimetilbenzeno
TRIC	Isotiocianato de tetrametil rodamina
Trx	Tioredoxina
UA	Unidades arbitrarias

Abreviatura	Significado
U87MG	Línea celular (glioblastoma)
UV-vis	Espectroscopia de ultravioleta visible
Vp	Volumen poro

Alfabeto griego

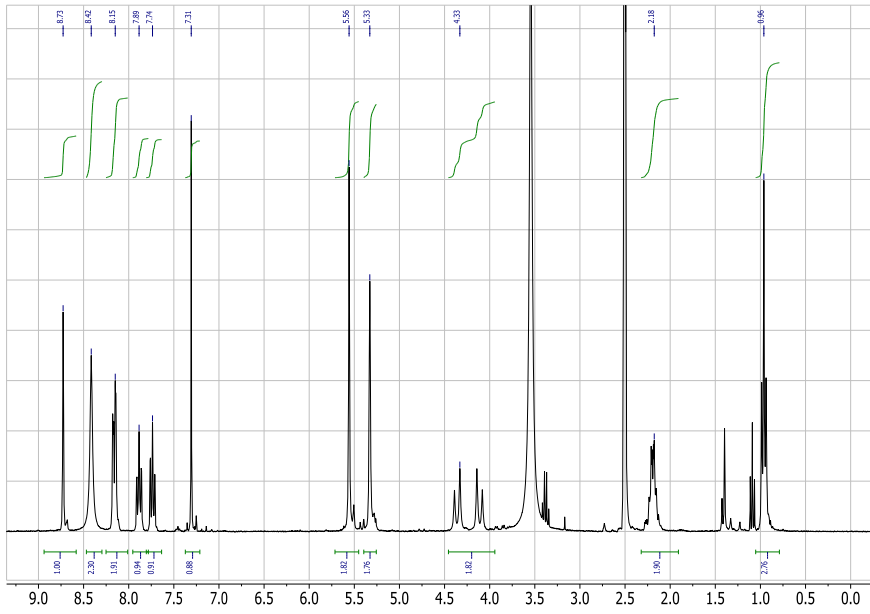
Abreviatura	Significado
δ	Desplazamiento químico
θ	Ángulo
λ	Longitud de onda
ζ	Potencial

Anexo III

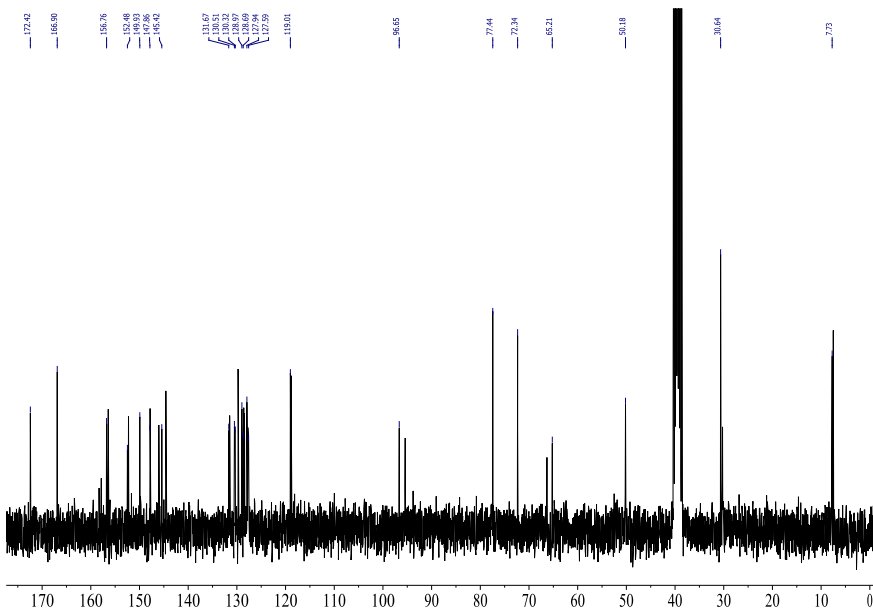
Espectros de RMN

Gly-CPT·TFA

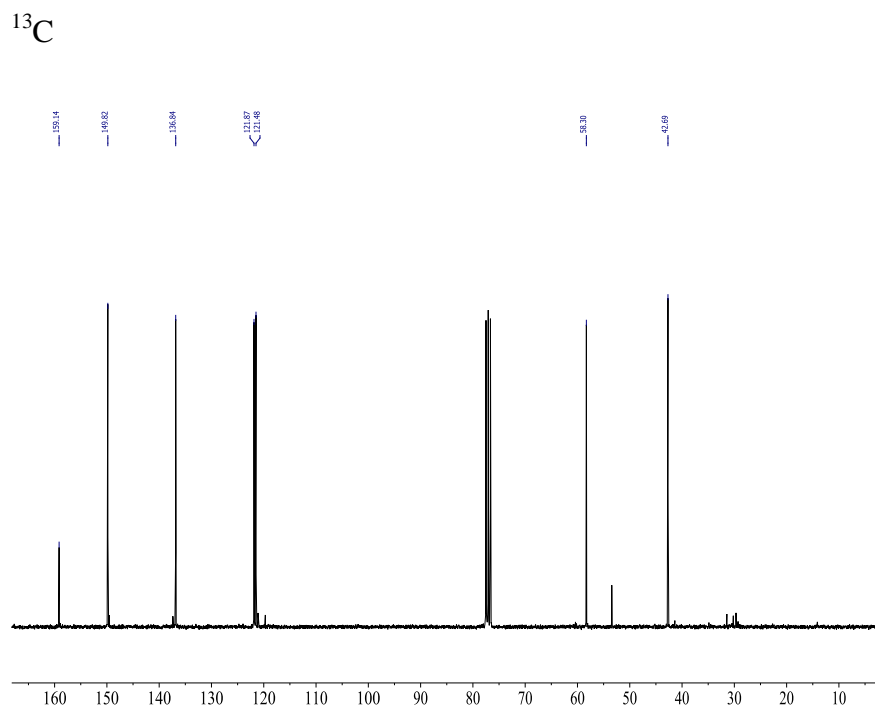
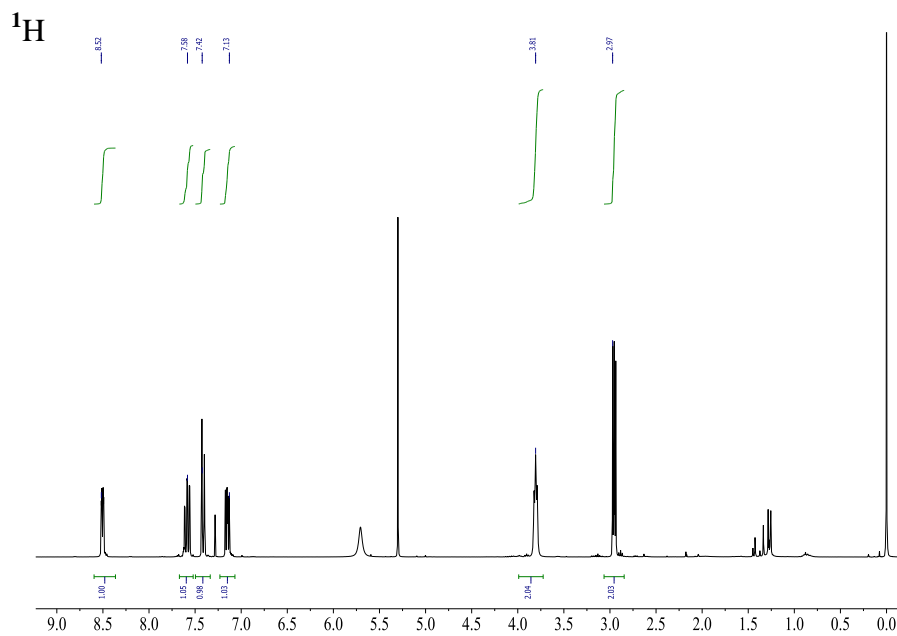
^1H



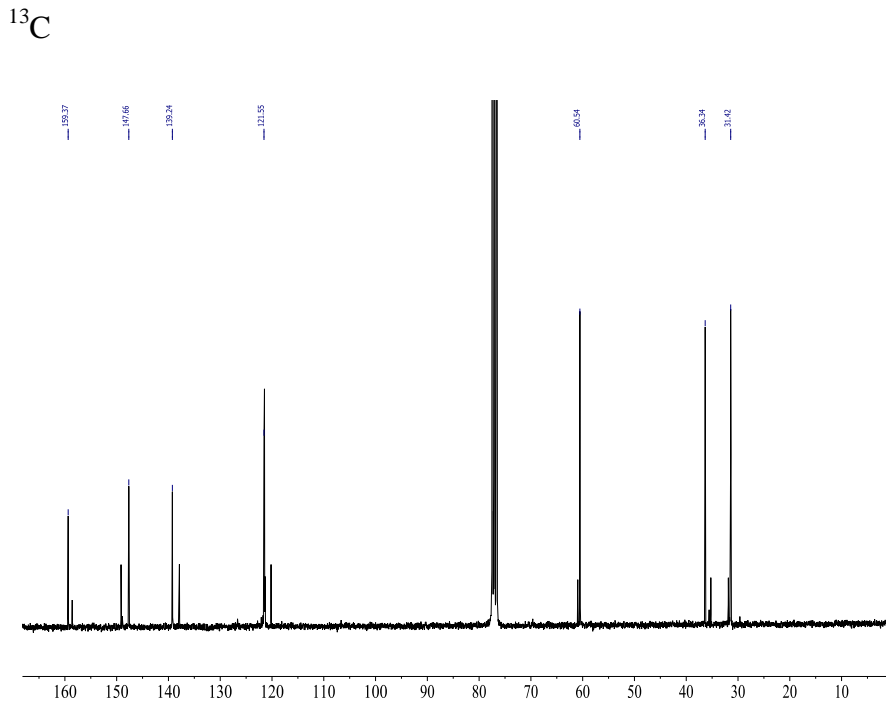
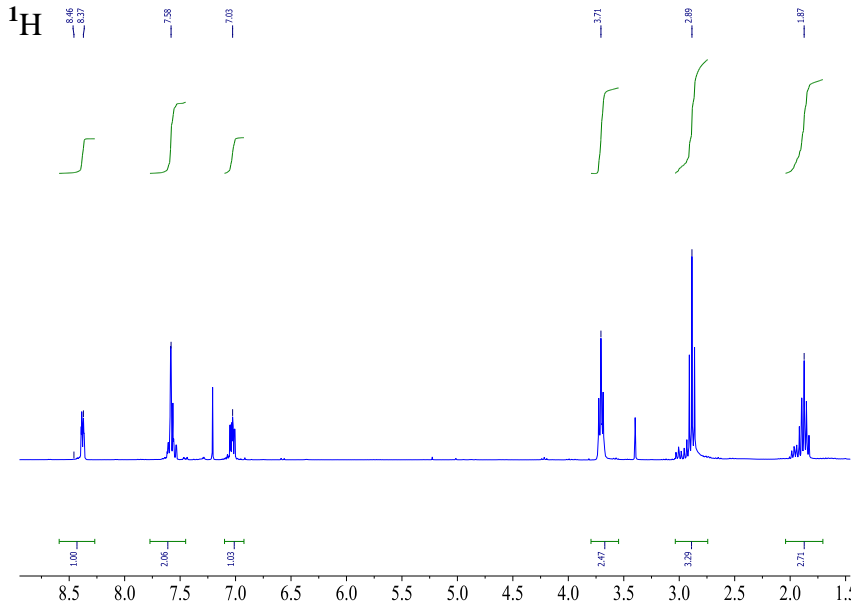
^{13}C



2-(piridin-2-ildisulfanil)etanol

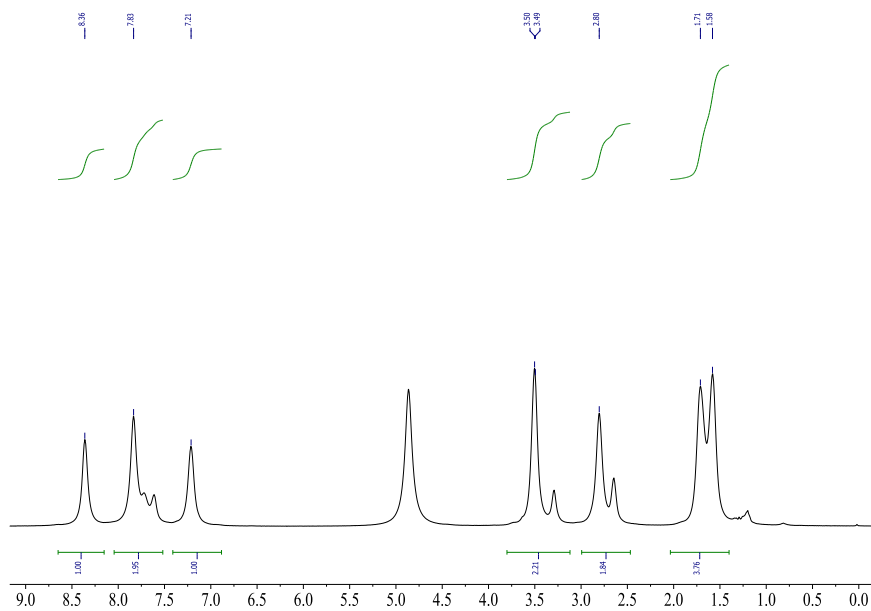


3-(piridin-2-ildisulfanil)propan-1-ol

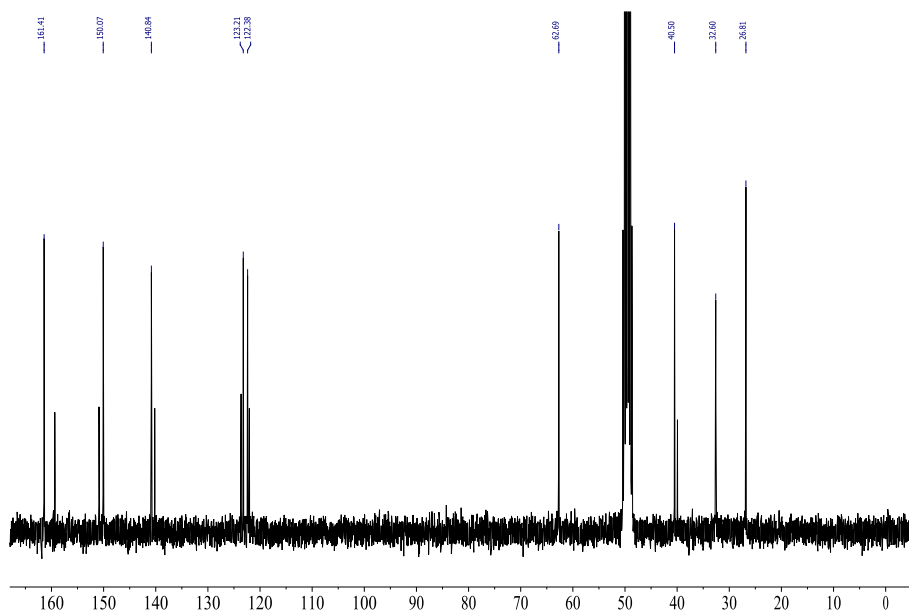


4-(piridin-2-ildisulfanil)butan-1-ol

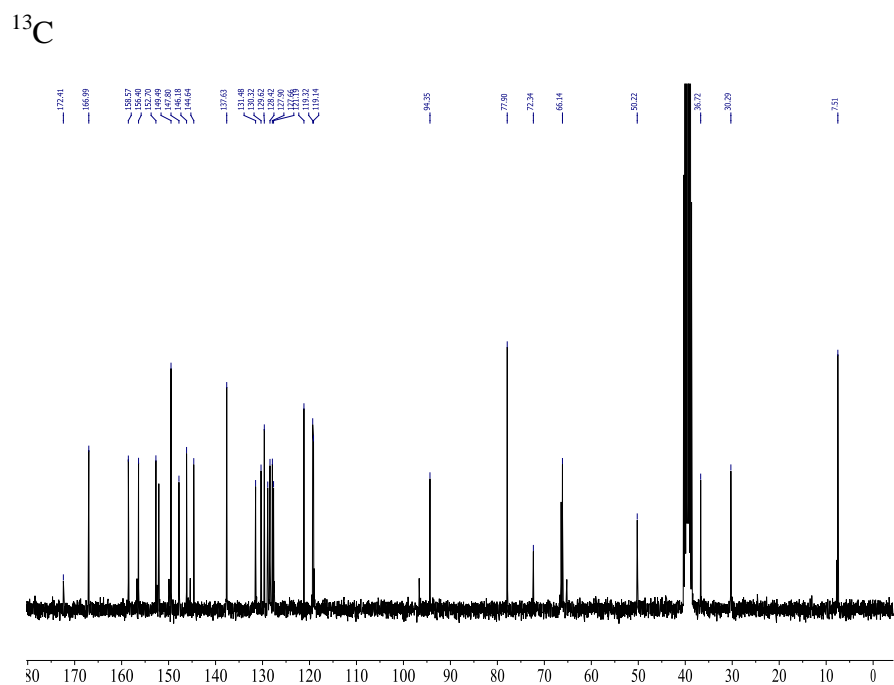
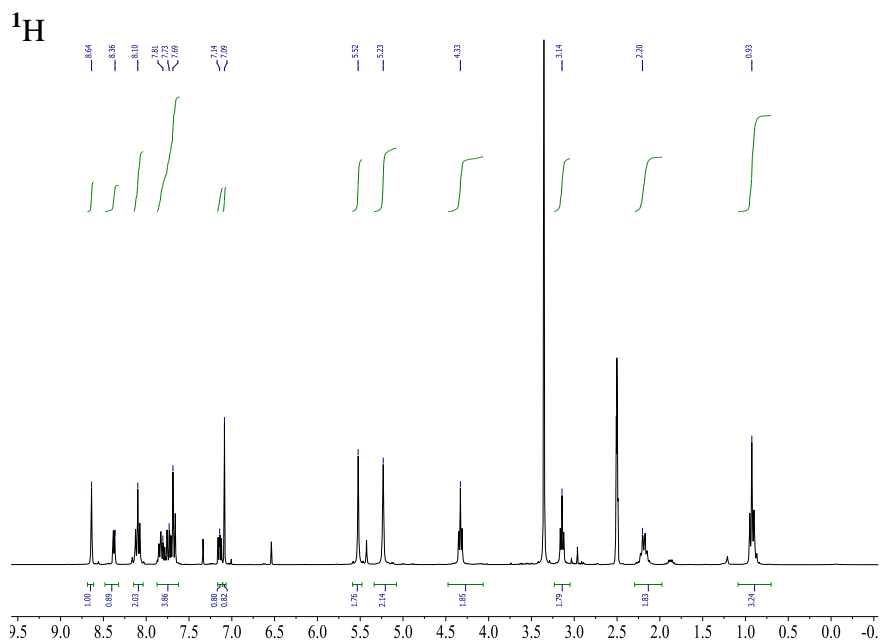
^1H



^{13}C

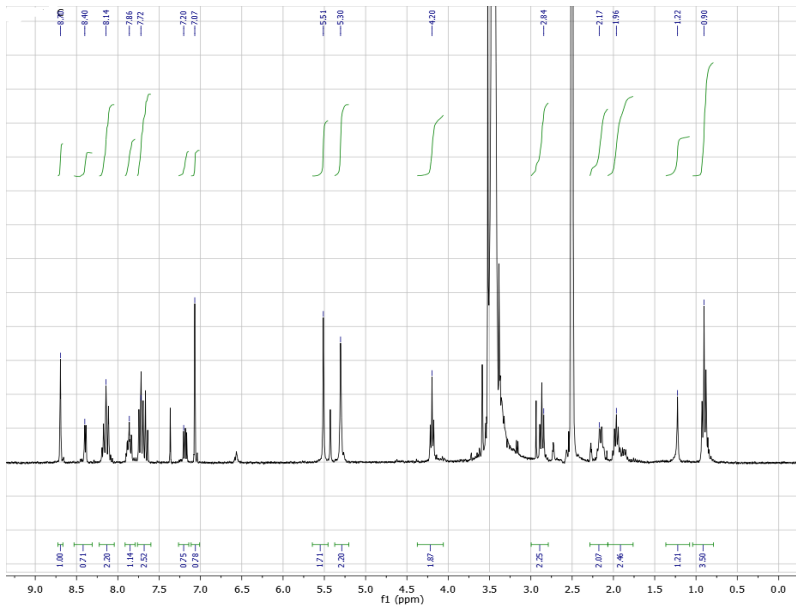


Piridilditioetil carbonato de camptotecina

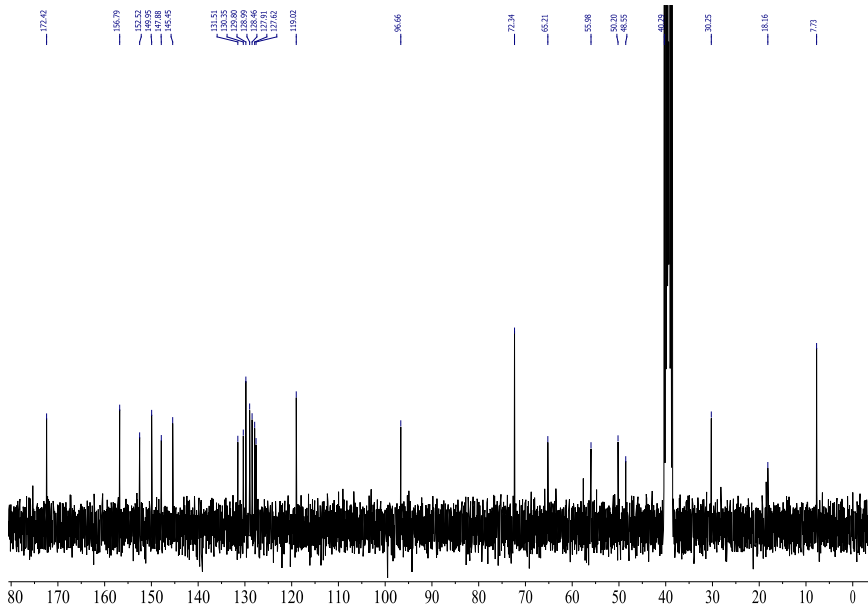


Piridilditiopropil carbonato de camptotecina

^1H

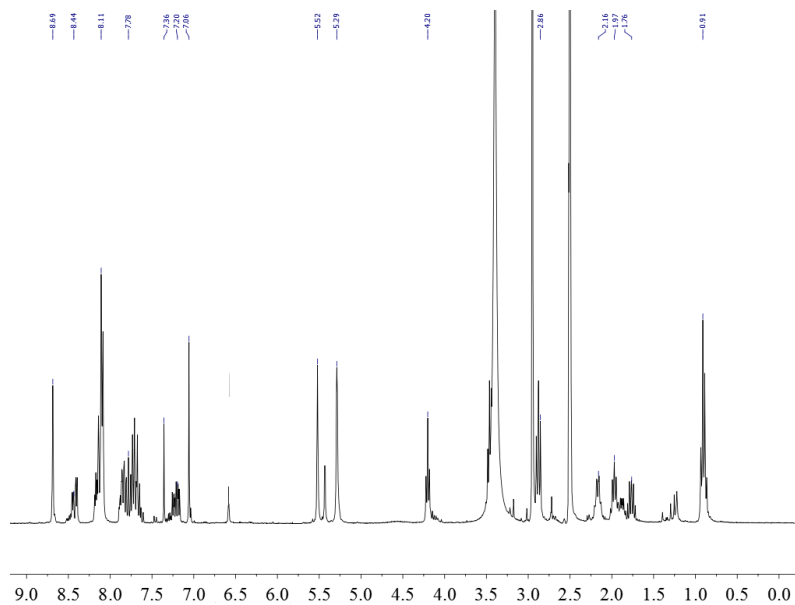


^{13}C

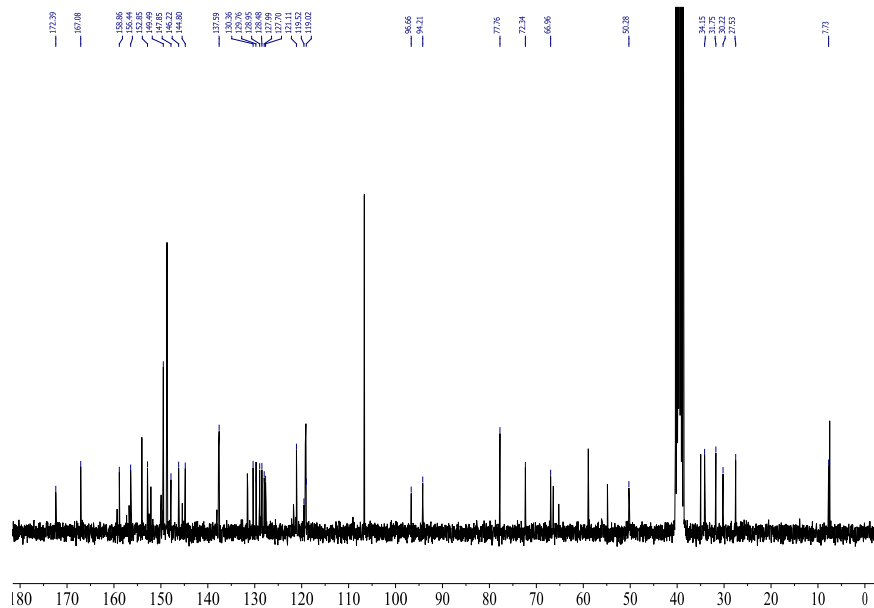


Piridilditiobutil carbonato de camptotecina

^1H



^{13}C



Anexo IV

Datos de los modelos cinéticos de liberación

Capítulo 4

SNP-(CO)-CPT2

Datos experimentales		Higuchi		Primer orden		Bhaskar		Ritger-Peppas	
t (h)	X	\sqrt{t} (h)	X	t (h)	$-\ln(1-X)$	$t^{0.65}$	$-\ln(1-X)$	$\ln(t)$	$\ln(X)$
0	0	0	0	0	0	0	0		
3	0,11	1,4142	0,11	2	0,1233	1,5691	0,1233	0,6931	-2,1541
6	0,16	2,4494	0,16	6	0,1743	3,2047	0,1743	1,7917	-1,8325
24	0,31	4,8989	0,31	24	0,3710	7,8911	0,3710	3,1780	-1,1711

MSNP-(CO)-CPT2

Datos experimentales		Higuchi		Primer orden		Bhaskar		Ritger-Peppas	
t (h)	X	\sqrt{t} (h)	X	t (h)	$-\ln(1-X)$	$t^{0.65}$	$-\ln(1-X)$	$\ln(t)$	$\ln(X)$
0	0	0	0	0	0	0	0		
1	0,2349	1	0,2349	1	0,2677	1	0,2677	0	-1,4486
2	0,2947	1,4142	0,2947	2	0,3491	1,5691	0,3492	0,6931	-1,2217
3	0,3731	1,7320	0,3731	3	0,4670	2,0423	0,4670	1,0986	-0,9858
6	0,4538	2,4494	0,4538	6	0,6048	3,2047	0,6048	1,7917	-0,7900

FSNP-(CO)-CPT

Datos experimentales		Higuchi		Primer orden		Bhaskar		Ritger-Peppas	
t (h)	X	\sqrt{t} (h)	X	t (h)	$-\ln(1-X)$	$t^{0.65}$	$-\ln(1-X)$	$\ln(t)$	$\ln(X)$
0	0	0	0	0	0	0	0		
1	0,2092	1	0,2092	1	0,2348	1	0,2348	0	-1,5641
2	0,3280	1,4142	0,3280	2	0,3975	1,5691	0,3975	0,6931	-1,1145
3	0,4937	1,7320	0,4937	3	0,6807	2,0423	0,6807	1,0986	-0,7056
6	0,6517	2,4494	0,6517	6	1,0548	3,2047	1,0548	1,7917	-0,4280

Capítulo 5

RhB-SiO₂@MSN-SS-C2-CPT

Datos experimentales		Higuchi		Primer orden		Bhaskar		Ritger-Peppas	
t (min)	X	\sqrt{t} (min)	X	t (min)	$-\ln(1-X)$	$t^{0.65}$	$-\ln(1-X)$	$\ln(t)$	$\ln(X)$
0	0,08	0	0,08	0	0,0833	0	0,0833		
5	0,38	2,2360	0,38	5	0,4780	2,8466	0,4780	1,6094	-0,9675
10	0,45	3,1622	0,45	10	0,5978	4,4668	0,5978	2,3025	-0,7985
20	0,54	4,4721	0,54	20	0,7765	7,0092	0,7765	2,9957	-0,6161
60	0,68	7,7459	0,68	60	1,1394	14,3152	1,1394	4,0943	-0,3856
120	0,95	10,9544	0,95	120	2,9957	22,4630	2,9957	4,7874	-0,0512

RhB-SiO₂@MSN-SS-C3-CPT

Datos experimentales		Higuchi		Primer orden		Bhaskar		Ritger-Peppas	
t (min)	X	\sqrt{t} (min)	X	t (min)	$-\ln(1-X)$	$t^{0.65}$	$-\ln(1-X)$	$\ln(t)$	$\ln(X)$
0	0,0662	0	0,0662	0	0,0685	0	0,0685		
5	0,6218	2,2360	0,6218	5	0,9725	2,8466	0,9725	1,6094	-0,4735
15	0,7702	3,8729	0,7702	15	1,4708	5,8137	1,4708	2,7080	-0,0120
60	0,8503	7,7459	0,8503	60	1,8991	14,3152	1,8991	4,0943	-0,0235

RhB-SiO₂@MSN-SS-C4-CPT

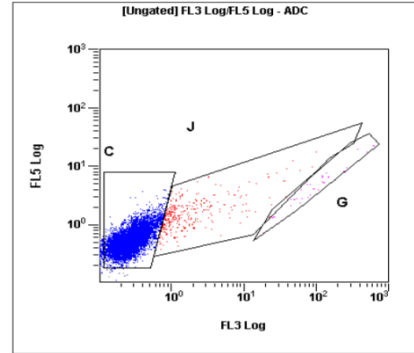
Datos experimentales		Higuchi		Primer orden		Bhaskar		Ritger-Peppas	
t (min)	X	\sqrt{t} (min)	X	t (min)	$-\ln(1-X)$	$t^{0.65}$	$-\ln(1-X)$	$\ln(t)$	$\ln(X)$
0	0,0094	0	0,0094	0	0,0095	0	0,0095		
5	0,0244	2,2360	0,0244	5	0,0247	2,8466	0,0247	1,6094	-3,7117
15	0,3677	3,8729	0,3677	15	0,4585	5,8137	0,4585	2,7080	-1,0002
60	0,9970	7,7459	0,9970	60	5,8151	14,3152	5,8151	4,0943	-0,0029

Anexo V

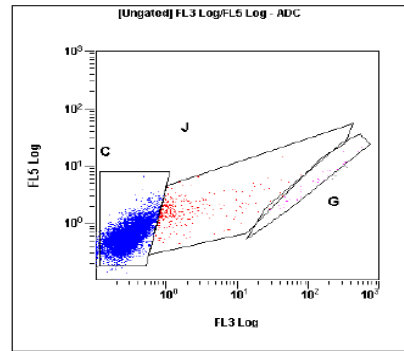
Gráficas de citometría de flujo:

SiO₂RhB@MSN-SH

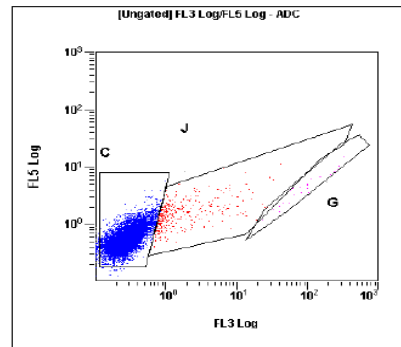
[Ungated] FL3 Log/FL5 Log					
Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	20000	100.00	100.00	0.766	0.642
C	18885	94.42	94.42	0.287	0.591
G	51	0.26	0.26	131	5.68
J	605	3.02	3.02	3.68	1.86



[Ungated] FL3 Log/FL5 Log					
Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	20000	100.00	100.00	0.933	0.711
C	18971	94.86	94.86	0.3	0.645
G	53	0.27	0.27	136	6
J	653	3.27	3.27	4.23	2.01

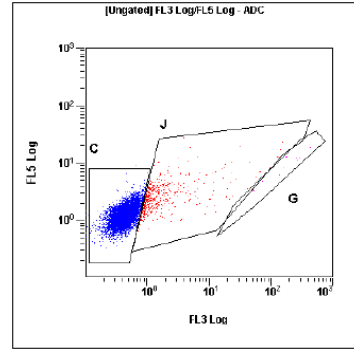


[Ungated] FL3 Log/FL5 Log					
Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	20000	100.00	100.00	1.02	0.695
C	18931	94.66	94.66	0.295	0.63
G	46	0.23	0.23	138	6.21
J	660	3.30	3.30	3.43	1.88

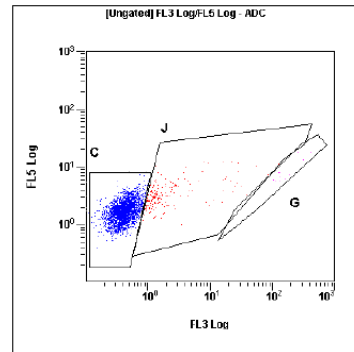


SiO₂RhB@MSN-SS-C2-CPT

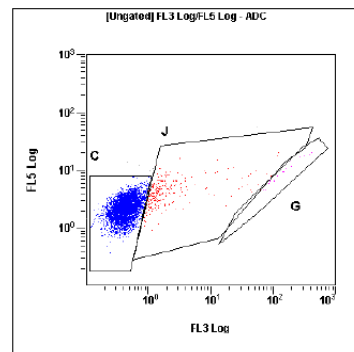
[Ungated] FL3 Log/FL5 Log					
Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	11499	100.00	100.00	1.09	1.51
C	10493	91.25	91.25	0.453	1.35
G	24	0.21	0.21	171	9.03
J	913	7.94	7.94	4.1	3.12



[Ungated] FL3 Log/FL5 Log					
Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	5148	100.00	100.00	1.36	2.04
C	4769	92.64	92.64	0.426	1.87
G	17	0.33	0.33	177	9.53
J	324	6.29	6.29	6.09	4.01

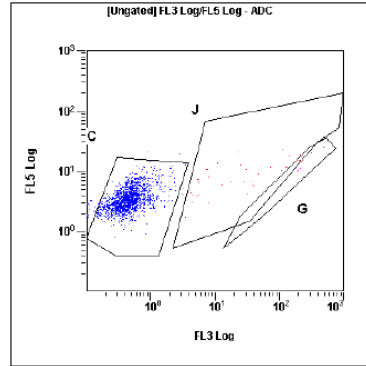


[Ungated] FL3 Log/FL5 Log					
Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	9426	100.00	100.00	1.51	2.62
C	8831	93.69	93.69	0.447	2.42
G	31	0.33	0.33	196	11.6
J	520	5.52	5.52	7.86	4.99



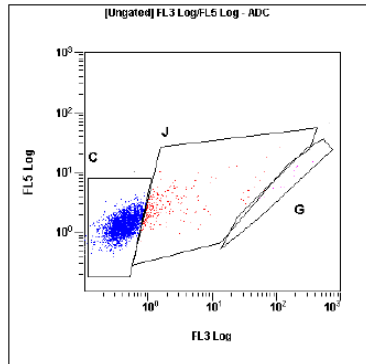
[Ungated] FL3 Log/FL5 Log

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	3204	100.00	100.00	2.35	3.95
C	3077	96.04	96.04	0.523	3.79
G	15	0.47	0.47	224	14.3
J	60	1.87	1.87	59.7	9.96



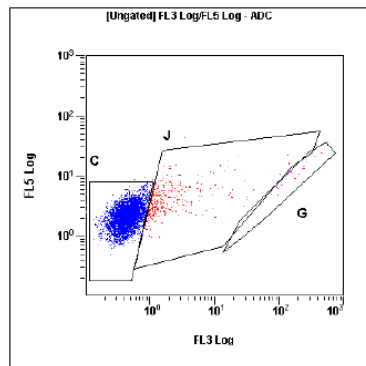
[Ungated] FL3 Log/FL5 Log

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	6095	100.00	100.00	1.4	1.64
C	5585	91.63	91.63	0.438	1.48
G	24	0.39	0.39	146	8.08
J	438	7.19	7.19	4.78	3.27



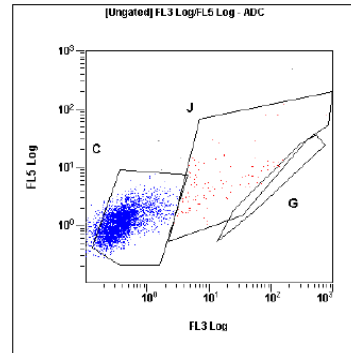
[Ungated] FL3 Log/FL5 Log

Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	9374	100.00	100.00	1.66	2.61
C	8608	91.83	91.83	0.45	2.36
G	43	0.46	0.46	178	11
J	661	7.05	7.05	6.26	5.14

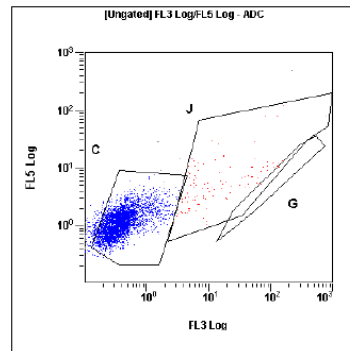


SiO₂RhB@MSN-SS-C3-CPT

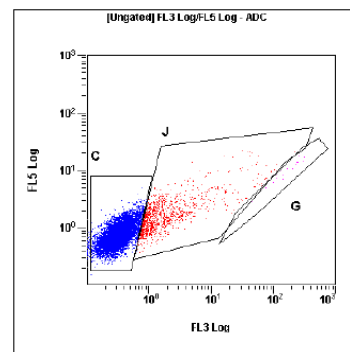
[Ungated] FL3 Log/FL5 Log					
Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	20000	100.00	100.00	1.25	0.948
C	17820	89.10	89.10	0.332	0.77
G	47	0.23	0.23	191	12.1
J	1813	9.06	9.06	4.79	2.28



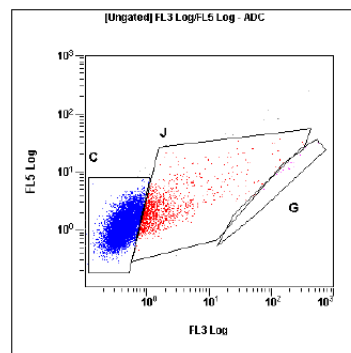
[Ungated] FL3 Log/FL5 Log					
Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	7777	100.00	100.00	1.52	1.62
C	7184	92.37	92.37	0.469	1.32
G	8	0.10	0.10	132	10.2
J	221	2.84	2.84	33.4	9.1



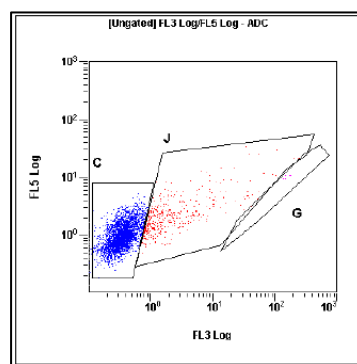
[Ungated] FL3 Log/FL5 Log					
Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	20000	100.00	100.00	1.08	0.995
C	17797	88.98	88.98	0.339	0.828
G	38	0.19	0.19	161	10.7
J	1955	9.78	9.78	4.89	2.33



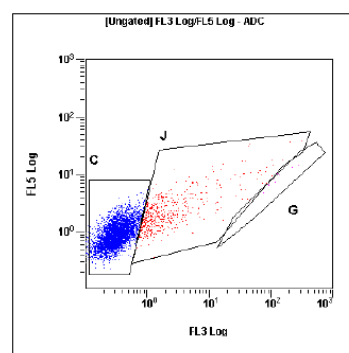
[Ungated] FL3 Log/FL5 Log					
Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	20000	100.00	100.00	1.48	1.66
C	17318	86.59	86.59	0.446	1.35
G	42	0.21	0.21	203	13.9
J	2475	12.38	12.38	4.77	3.19



[Ungated] FL3 Log/FL5 Log					
Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	6461	100.00	100.00	1.41	1.38
C	5579	86.35	86.35	0.366	1.14
G	16	0.25	0.25	141	9.92
J	733	11.34	11.34	5.61	2.98

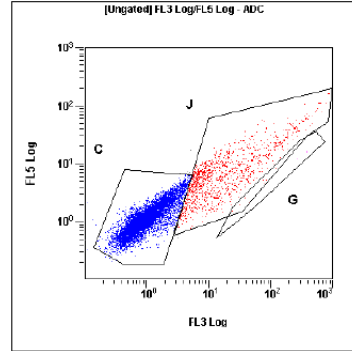


[Ungated] FL3 Log/FL5 Log					
Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	8698	100.00	100.00	1.42	1.3
C	7548	86.78	86.78	0.343	1.04
G	17	0.20	0.20	188	12.4
J	989	11.37	11.37	6.32	3.04

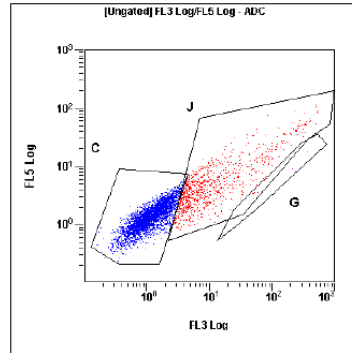


SiO₂RhB@MSN-SS-C4-CPT

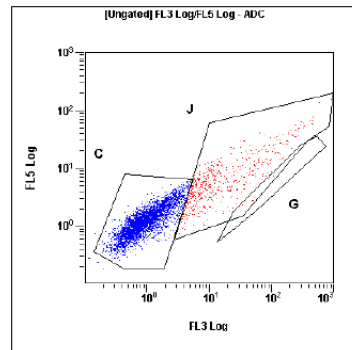
[Ungated] FL3 Log/FL5 Log					
Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	15060	100.00	100.00	7.4	2.8
C	12981	86.20	86.20	1.24	1.4
G	22	0.15	0.15	123	7.48
J	2048	13.60	13.60	44.4	10.9



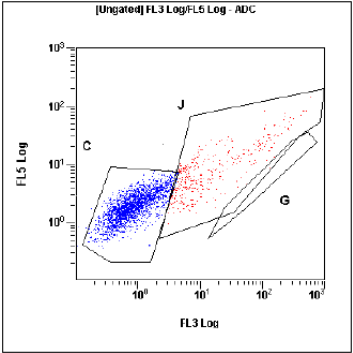
[Ungated] FL3 Log/FL5 Log					
Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	9111	100.00	100.00	7.66	2.99
C	7175	78.75	78.75	1.3	1.54
G	15	0.16	0.16	148	9.84
J	2017	22.14	22.14	29.2	8.11



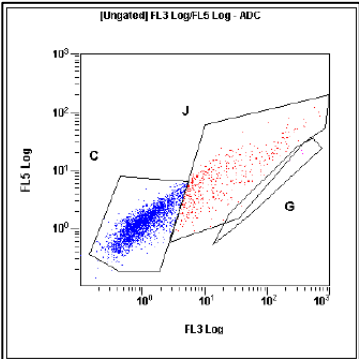
[Ungated] FL3 Log/FL5 Log					
Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	8408	100.00	100.00	6.64	2.71
C	7309	86.93	86.93	1.18	1.46
G	9	0.11	0.11	60.8	3.99
J	1081	12.86	12.86	43.6	11.1



[Ungated] FL3 Log/FL5 Log					
Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	5434	100.00	100.00	5.99	3.63
C	4701	86.51	86.51	1.03	2.21
G	5	0.09	0.09	178	11.6
J	744	13.69	13.69	35.6	12.1



[Ungated] FL3 Log/FL5 Log					
Region	Number	%Total	%Gated	X-Mean	Y-Mean
ALL	6206	100.00	100.00	8.11	3.07
C	5244	84.50	84.50	1.27	1.5
G	10	0.16	0.16	148	9.35
J	938	15.11	15.11	42	11.1



Anexo VI

Currículo obtenido durante el periodo de tesis

Publicaciones

1. Botella, P.; Abasolo, I.; Fernández, Y.; Muniesa, C.; Miranda, S.; Quesada, M.; Ruiz, J.; Schwartz Jr, S.; Corma, A. *J. Control. Release* **2011**, 156, 246-257.
2. Botella, P.; Ortega, I.; Quesada, M.; Madrigal, R. F.; Muniesa, C.; Fimia, A.; Fernandez, E.; Corma, A. *Dalton Trans.* **2012**, 41, 9286-9296. Artículo de portada.
3. Muniesa, C.; Vicente, V.; Quesada, M.; Sáez-Atienzar, S.; Blesa, J. R.; Abasolo, I.; Fernández, Y.; Botella, P. *RSC Adv.* **2013**, en revisión.
4. Quesada, M.; Muniesa, C.; Botella, P. *Chem. Mater.* **2013**, en revisión.

Patentes

1. Inventores (p. o. de firma): Corma, A; Botella, P.; Quesada, M; Muniesa, C.; Schwartz, S.
Título: Nanopartículas de sílice para difusión intracelular de agentes bioactivos poco solubles.
N.º de solicitud: N02011124739 .
País de prioridad: ES.
Fecha de prioridad: 6/04/2010.
Entidad titular: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Politécnica de Valencia, Institut de Recerca de L'Hospital Universitari Vall D'Hebron.

Contribuciones a congresos

1. Autores: Botella, P.; Abasolo, I.; Muniesa, C.; Ruiz, J.; Fernandez, Y.; Quesada, M.; Corma, A.; Schwartz, S., Jr
Título: Delivery of camptothecin to cancer cells with silica nanoparticles
Tipo de participación: Ponencia
Congreso: Nanotech Conference & Expo 2010

Publicación: Proceedings of Nanotech Conference & Expo 2010, Vol 3,
pp.320-323

Fecha 07/2010

Lugar de celebración: Anaheim (USA)

2. Autores: Botella, P.; Abasolo, I.; Muniesa, C.; Ruiz, J.; Fernandez, Y.;
Quesada, M.; Corma, A.; Schwartz, S., Jr

Título: A novel delivery Platform for Camptothecin to Cancer Cells
Based in Mesoporous Silica Nanoparticles

Tipo de participación: Ponencia

Congreso: FZC-IMMS2010 Conference

Publicación: Actas

Lugar de celebración: Sorrento (Italia)

Fecha: 07/2010

3. Autores: Muniesa, C.; Miranda, S.; Fernández, Y.; Quesada, M.; Ruiz,
J.; Schwartz Jr, S.; Corma, A.; Abasolo, I.; Botella, P.

Título: In vitro evaluation of surface-modified silica nanoparticles for the
delivery of camptothecin

Tipo de participación: Póster

Congreso: 5th International FEZA Conference

Publicación: Actas

Lugar de celebración: Valencia (España)

Fecha: 07/2011

4. Autores: Botella, P.; Ortega, Í.; Quesada, M.; Madrigal, M.; Muniesa,
C.; Fimia, A.; Fernández, E.; Corma, A.

Título: Gold nanoclusters with mesoporous silica for combined
chemotherapy and photothermal therapy of cancer cells

Tipo de participación: Ponencia

Congreso: 5th International FEZA Conference

Publicación: Actas

Lugar de celebración: Valencia (España)

Fecha: 07/ 2011

5. Autores: Botella, P.; Quesada, M.; Muniesa, C.; Corma; A.
Título: Diseño de materiales nanoestructurados de sílice mesoporosa para la difusión controlada de moléculas orgánicas
Tipo de participación: Ponencia
Congreso: CICAT 2012 (XIII Congreso Iberoamericano de Catálisis)
Publicación: Actas
Lugar de celebración: Santa Fe (Argentina)
Fecha: 08/2012

6. Autores: Muniesa, C.; Botella, P.; Abasolo, I.; Fernández, Y.; Quesada, M.; Schwartz Jr, S.
Título: Improved Therapy of Colorectal Cancer with Camptothecin-Loaded Silica Nanoparticles: A Preclinical Study
Tipo de participación: Póster
Congreso: Imaginenano 2013
Publicación: Actas
Lugar de celebración: Bilbao (España)
Fecha: 04/2013

Proyectos

1. Título del Proyecto: Diseño Molecular de Nanomateriales Estructurados Orgánicos-Inorgánicos para su aplicación en catálisis, separación de gases y biomédica
Referencia del proyecto: MAT2006-14274-C02-01
Entidad Financiadora: CICYT (C-CONSOLIDER)
Investigador responsable: Avelino Corma Canós
Fechas: 2006-2011

2. Título del proyecto: Development of new therapeutic approaches for retinal dystrophies
Referencia del proyecto: RETINA
Entidad financiadora: CIBER-BBN
Grupo: Advanced delivery systems (ITQ-CSIC)
Investigador responsable: Pablo Botella Asunción

Coordinador: Eduardo Fernández Jover (UMH)

Fechas: 2010-2013

3. Título del proyecto: Nuevas cubiertas biocompatibles e inflamatorias para electrodos neuronales

Entidad financiadora: CICYT

Referencia del proyecto: MAT2012-39290-C02-02

Investigador responsable: Pablo Botella Asunción

Fechas: 2013-2015

4. Título del proyecto: Desarrollo de una nueva generación de lentes intraoculares multifuncionales

Entidad financiadora: INNPACTO

Referencia del proyecto: IPT-2012-0574-300000

Investigador responsable: Pablo Botella Asunción

Coordinador: AJL S.A.

Fechas: 2012-2015