

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