

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y TEXTIL



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS COMO SISTEMA
PARA VEHICULIZAR FÁRMACOS CITOTÓXICOS**

**MEMORIA QUE, PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN
INGENIERÍA QUÍMICA (CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICAS)
POR LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA, PRESENTA:**

D. FERNANDO MESÍAS RECAMÁN



UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



800 AÑOS
UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA
1218 - 2018

La **Dra. Dña. Eva María Martín del Valle**, Catedrática de Ingeniería Química de la Universidad de Salamanca y la **Dra. Dña. Gema Marcelo Alejandro**, profesor Ayudante Doctor de la Universidad de Alcalá de Henares,

INFORMAN:

Que la presente memoria titulada *Síntesis de nanopartículas como sistema para vehiculizar fármacos citotóxicos*, que, para optar al Grado de Doctor en Ingeniería Química, Programa de Doctorado *Ciencia y Tecnología Químicas* (RD 99/2011), presenta **D. Fernando Mesías Recamán**, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Ingeniería Química y Textil de la Universidad de Salamanca y que, considerando que constituye un trabajo de tesis.

AUTORIZAN:

Su presentación ante la Escuela de Doctorado de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firman el presente informe, en Salamanca a 20 de octubre de 2020.

MARTIN VALLE,
EVA MARIA
(FIRMA)

Firmado digitalmente por MARTIN VALLE, EVA MARIA (FIRMA)
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES, serialNumber=07973059V, sn=MARTIN, givenName=EVA MARIA, cn=MARTIN VALLE, EVA MARIA (FIRMA)
Fecha: 2020.10.23 08:54:58 +02'00'

Dña. Eva María Martín del Valle

Dña. Gema Marcelo Alejandro

*A mi hermana,
a mi madre
y a Sergio,
mis tres pilares.*

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis directoras de tesis, la profesora Eva María Martín del Valle y la profesora Gema Marcelo Alejandre. Muchísimas gracias por la ayuda y la confianza que habéis puesto en mí en todo momento, así como por el crecimiento que experimenté como investigador con vuestras enseñanzas.

A mis compañeros de laboratorio y al departamento en general, por vuestra enorme ayuda y por hacer más llevaderas y divertidas las horas de laboratorio. En especial, muchas gracias a Sergio, Álvaro, Celia, Milena, José, Antonio, Inma, Montaña, Rubén, Jesús, Gastón, Héctor, Guillermo, Belén, María, Chema, Audelino y Nekane. También a Edgar, Lidia, Antonio, Borja, Manu, Encarna, Toñi y Vicente.

Al departamento de Química Inorgánica, en especial a Emilio, Elena y Miguel Ángel, y al departamento de Química Orgánica, en especial a Quino y a todos los que trabajan con él, por vuestra amabilidad y gran disposición en ayudarme siempre que lo necesité. A todo el laboratorio 15, del Dr. Atanasio Pandiella, en el Centro de Investigación del Cáncer, por toda la ayuda aportada siempre que me fue necesaria y los buenos momentos vividos con todos vosotros.

A mi madre, la persona que me dio la vida y que estuvo en cada uno de mis días apoyándome, tanto en los buenos como en los malos momentos. Gracias por tu apoyo incondicional en esta etapa, por tus palabras de ánimo y por confiar en mis capacidades. Gracias por preocuparte por mí en todos los momentos de mi vida y darme fuerzas cuando los ánimos flaquean.

A mi hermana, mi niña, la personita que me tiene cautivado desde el día en que nació. Gracias por tus abrazos que todo lo curan, por

acompañarme en este camino, por tu sonrisa, la más bonita que he visto nunca, que me da fuerzas para hacer todo lo que me proponga. Gracias por tus palabras de admiración que me ayudan a ser la mejor versión de mí mismo, luchando por no defraudarte jamás.

A Sergio, el hombre que elegí y sigo eligiendo cada uno de mis días para compartir mi vida. Gracias por tanto, por estar siempre a mi lado, por animarme, cuidarme y quererme tanto en todo momento. Gracias por tu confianza ciega en mí, creyendo fielmente que todo lo puedo. Por tus besos y tus bromas que curan las heridas del camino. Gran parte de esta tesis te la debo a ti.

A mis amigos Angie, John, Mary, Patri, Santi, Ari, Vanesa, Cali, Sergio y Víctor, por vuestra enorme amistad y continuo cariño. A Crismu y Esme, por nuestras increíbles conversaciones que pueden durar horas, por vuestra autenticidad y cariño. A Glori y Anita, por ser los mayores tesoros que, junto con mi novio, Salamanca me regaló, convirtiéndoos en parte de mi familia. Gracias por celebrar siempre mis alegrías y ser un apoyo incondicional en mis tristezas. Gracias por quererme tanto, sois la dulzura personificada. A Vicky, por tu amistad y por tu enorme cariño en la convivencia.

A Mariluz, Nerea, Ainhoa, Nando, Marisa y Eloisa, por vuestro gran cariño y por ser un apoyo enorme e imprescindible en esta maravillosa ciudad que es Salamanca.

A mis amigos de Galicia Jonatan, Faty, Yami, Brais, David, Adri, Eli, Mavi y Lola, porque a pesar de los años que pasen seguimos unidos, demostrándonos el valor de la verdadera amistad.

A mi tía Loli, por su apoyo y ánimo a lo largo de esta etapa.

A mis suegros, Marce y Pedro, y a mis cuñados, Nuria y Pedro, por las comidas tan ricas de los domingos y por vuestra acogida tan cariñosa en la familia, haciéndome sentir uno más de vosotros.

A Hortensia, Sara y Constantino, por transmitirme el interés por la ciencia y la Biología, y la pasión por la enseñanza.

A Infinity, mi gata, por tus mordisquitos y ronroneos que me acompañaron durante la escritura de esta tesis.

A Salamanca, por haberme regalado a tantísimas personas, experiencias y momentos que me cambiaron para siempre, haciéndome disfrutar y mejorar.

Financiación

Este trabajo ha sido realizado en el grupo de investigación *Aplicaciones Biomédicas en Ingeniería Química*, del Departamento de Ingeniería Química y Textil de la Universidad de Salamanca, bajo la dirección de la Dra. Dña. Eva María Martín del Valle y la Dra. Dña. Gema Marcelo Alexandre, gracias a una ayuda destinada a financiar la contratación predoctoral de personal investigador por parte de la Junta de Castilla y León cofinanciada por el Fondo Social Europeo (ORDEN EDU/310/2015, de 10 de abril, por la que se convocan ayudas destinadas a financiar la contratación predoctoral de personal investigador, cofinanciadas por el Fondo Social Europeo, a iniciar en el año 2015).

*“La ciencia es la escuela más íntima de resignación y humildad,
porque nos enseña a doblegarnos ante los hechos
aparentemente insignificantes”*

Miguel de Unamuno

Abreviaturas

µg: microgramos

µL: microlitros

µm: micrómetros

µM: micromolar

ADN: ácido desoxirribonucleico

ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo

BCS: Sistema de Clasificación Biofarmacéutica

CAMP: camptotecina

CD: ciclodextrina

CI₅₀: concentración inhibitoria 50

CMCD: carboximetil-β-ciclodextrina

DLS: dispersión de luz dinámica

DMEM: medio de cultivo mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco

DMPC: 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina

DMPG: 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol

DMSO: dimetilsulfóxido

DOTAP: 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano

DSPE-PEG2000: 1,2,-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000]

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EE: eficiencia de encapsulación

EMA: Agencia Europea del Medicamento

EPC: 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina

EPR: efecto de mejora de la permeación y retención

FDA: Administración de Alimentos y Fármacos

Gly: glicina

HEPES: ácido 4-(2-hydroxietyl)piperazin-1-iletanosulfónico
HP- β -CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina
HSA: seroalbúmina humana
HSPC: fosfatidilcolina de soja hidrogenada
kDa: kilodalton
M: molar
mg: miligramos
min: minutos
mL: mililitros
mM: milimolar
MTT: bromuro de 3-(4, 5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium
n: moles
N: normal
nm: nanómetros
nM: nanomolar
NMSC: cáncer de piel no melanoma
NP: nanopartículas
°C: grado Celsius
OMS: Organización Mundial de la Salud
PBS: tampón fosfato salino
PB- β -CD: permetil- β -ciclodextrina
PC: fosfatidilcolina
PEG: polietilenglicol
PEG-2000: polietilenglicol 2000
PLGA: ácido poli(lacto-co-glicólico)
RDM- β -CD: azarosa dimetil- β -ciclodextrina
RDM- γ -CD: azarosa dimetil- γ -ciclodextrina
rpm: revoluciones por minuto

SBE- β -CD: sulfobutiléter- β -ciclodextrina

SP- β -CD: sulfopropil- β -ciclodextrina

TNM: Tumor, Nódulos y Metástasis

UV: ultravioleta

α -MSH: hormona estimuladora de melanocitos α

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. El cáncer: impacto y tratamiento	3
2. La camptotecina como fármaco anticancerígeno	11
3. Nanotecnología en el uso de la camptotecina	16
4. Liposomas: vectores para el transporte de fármacos	18
5. Formulaciones basadas en liposomas para el transporte de camptotecina	22
6. Complejos de inclusión de ciclodextrinas con camptotecina para mejorar la solubilidad y estabilidad del fármaco	26
7. Complejos de inclusión de ciclodextrinas con camptotecina y su incorporación en liposomas	28
Bibliografía	30
OBJETIVOS	47
CAPÍTULO 1. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LA CAMPTOTECINA CON CICLODEXTRINAS	53
1. Introducción	55
1.1. Camptotecina	55
1.1.1. Estructura química.....	56
1.1.2. Caracterización espectrofotométrica del fármaco en disolución acuosa.....	56
1.1.3. Solubilidad de la camptotecina.....	58
1.2. Ciclodextrinas y los complejos de inclusión	58
1.2.1. Diagrama de solubilidad de fase.....	62
1.2.2. Complejos de inclusión CD-CAMP.....	63
2. Objetivos	65
3. Material y métodos	66
3.1. Materiales y equipos	66
3.2. Metodología	67

3.2.1. Estudio de la formación de los complejos de inclusión CMCD-CAMP por fluorescencia.....	67
3.2.2. Determinación de las constantes de formación por fluorescencia.....	68
3.2.3. Estudios de solubilidad de la camptotecina en presencia de la CMCD y determinación de las constantes de estabilidad de los complejos de inclusión.....	70
4. Resultados y discusión.....	72
4.1. Estudio de la formación de complejos de inclusión camptotecina-CMCD por medidas de fluorescencia	73
4.1.1. Constantes de inclusión del complejo CMCD-CAMP a pH 7,4.....	75
4.1.2. Constantes de inclusión del complejo CMCD-CAMP a pH 3,5.....	77
4.2. Estudios de solubilidad de la camptotecina en presencia de la CMCD	82
4.2.1. Efecto de los disolventes en la solubilidad de la camptotecina en disoluciones acuosas de CMCD-.....	82
4.2.2. Diagramas de solubilidad de fase para el complejo de inclusión CMCD-CAMP.....	87
5. Conclusiones	90
6. Bibliografía.....	92

CAPÍTULO 2. ESTUDIO DE LA FORMACIÓN Y ESTABILIDAD DE LIPOSOMAS	101
1. Introducción	103
1.1. Composición de los liposomas	104
1.2. Preparación de liposomas.....	106
2. Objetivos.....	108
3. Material y métodos.....	108
3.1. Materiales y equipos	108
3.2. Metodología.....	109

3.2.1. Preparación de liposomas.....	109
3.2.2. Caracterización del tamaño hidrodinámico de los liposomas resultantes y su potencial zeta	112
a) Dispersión de luz dinámica (DLS)	112
b) Determinación del potencial zeta de los liposomas	116
3.2.3. Morfología de los liposomas por microscopía electrónica de barrido.....	119
4. Resultados y discusión.....	121
4.1. Liposomas convencionales.....	124
4.1.1. Influencia de la relación molar fosfatidilcolina:colesterol en el tamaño de los liposomas.....	124
4.1.2. Influencia del pH del medio acuoso en el tamaño de los liposomas.....	128
4.1.3. Efecto del tamaño de poro en el tamaño de los liposomas.....	133
4.1.4. Estabilidad térmica de las dispersiones de liposomas.....	136
4.1.5. Potencial zeta de los liposomas convencionales.....	137
4.2. Liposomas PEGilados.....	139
4.2.1. Tamaño y estabilidad en agua a pH 7,4.....	139
4.2.2. Estabilidad térmica de las dispersiones de liposomas PEGilados en agua a pH 7,4	140
4.2.3. Determinación del potencial zeta de los liposomas PEGilados.....	141
4.3. Morfología de los liposomas	141
5. Conclusiones	143
6. Bibliografía	144
CAPÍTULO 3. ENCAPSULACIÓN DE CAMPTOTECINA EN LOS LIPOSOMAS	155
1. Introducción	157
1.1. Encapsulación de fármacos en los liposomas	158

1.2. Los liposomas y el efecto EPR	161
1.3. Sistemas de liposomas para encapsular camptotecina	164
2. Objetivos	165
3. Materiales y métodos	166
3.1. Materiales y equipos	166
3.2. Metodología	167
3.2.1. Tiempo necesario para dializar una disolución saturada de camptotecina.....	167
3.2.2. Formación de la película de lípidos.....	169
3.2.3. Preparación de disoluciones saturadas de camptotecina.....	170
3.2.4. Encapsulación de la camptotecina por métodos pasivos.....	171
3.2.5. Encapsulación de la camptotecina por métodos activos.....	171
3.2.6. Determinación de la cantidad de camptotecina encapsulada por los liposomas.....	172
a) Cálculo de la capacidad de carga.....	174
b) Cálculo de la eficiencia de encapsulación (EE).....	175
3.2.7. Perfil de liberación de la camptotecina en liposomas.....	176
4. Resultados y discusión	177
4.1. Encapsulación en liposomas convencionales	177
4.1.1. Encapsulación de la camptotecina en liposomas convencionales.....	177
a) Encapsulación directa de la camptotecina en liposomas convencionales.....	177
b) Encapsulación de la camptotecina en liposomas convencionales mediante gradiente de pH.....	181
c) Comparación entre la encapsulación pasiva y activa de la camptotecina en liposomas convencionales.....	185
4.1.2. Encapsulación del complejo de inclusión CMCD-CAMP en liposomas convencionales.....	187

a) Encapsulación directa del complejo de inclusión CMCD-CAMP en liposomas convencionales.....	187
b) Encapsulación del complejo de inclusión CMCD-CAMP en liposomas convencionales mediante gradiente de pH.....	189
c) Comparación entre la encapsulación pasiva y activa del complejo de inclusión CMCD-CAMP en liposomas convencionales.....	192
4.1.3. Discusión global de los resultados de encapsulación en liposomas convencionales.....	193
4.2. Encapsulación en liposomas PEGilados	195
4.2.1. Encapsulación de camptotecina en liposomas PEGilados.....	195
a) Encapsulación directa de la camptotecina en liposomas PEGilados.....	195
b) Encapsulación de la camptotecina en liposomas PEGilados mediante gradiente de pH.....	197
4.2.2. Encapsulación del complejo de inclusión CMCD-CAMP en liposomas PEGilados.....	198
a) Encapsulación directa del complejo de inclusión CMCD-CAMP en liposomas PEGilados.....	198
b) Encapsulación del complejo de inclusión CMCD-CAMP en liposomas PEGilados mediante gradiente de pH.....	200
4.2.3. Discusión global de los resultados de encapsulación en liposomas PEGilados.....	202
4.3. Comparación de liposomas PEGilados y convencionales ...	203
4.4. Cinética de liberación de la camptotecina	207
5. Conclusiones	211
6. Bibliografía	212

CAPÍTULO 4. CITOTOXICIDAD DEL SISTEMA NANOPARTICULADO CAMPTOTECINA-LIPOSOMAS	225
1. Introducción	227
1.1. Citotoxicidad de los complejos de inclusión CD-CAMP	229
1.2. Citotoxicidad de la camptotecina en liposomas.....	229

1.3. Internalización celular de los liposomas	230
2. Objetivos	232
3. Materiales y métodos	232
3.1. Materiales y equipos	232
3.2. Metodología	234
3.2.1. Descongelación celular.....	234
3.2.2. Mantenimiento de las líneas celulares.....	235
3.2.3. Conteo celular.....	237
3.2.4. Ensayos MTT de citotoxicidad.....	237
a) Funcionamiento y preparación del reactivo MTT.....	237
b) Realización experimental del ensayo	239
3.2.5. Cálculo de la CI_{50}	240
3.2.6. Internalización de los liposomas en células tumorales.....	241
a) Preparación de liposomas fluorescentes.....	241
b) Preparación del medio de cultivo con LysoTracker rojo.....	242
c) Realización experimental del cultivo celular.....	242
3.2.7. Prueba estadística y de Student.....	243
4. Resultados y discusión	244
4.1. Caracterización de los sistemas utilizados	244
4.1.1. Efecto citotóxico de la CMCD.....	251
4.1.2. Efecto citotóxico de los liposomas.....	251
4.2. Determinación de la CI_{50}	253
4.3. Explicación de las diferencias en eficacia citotóxica en los diferentes tratamientos	254
4.3.1. Comparación estadística de los sistemas liposomales.....	254
4.3.2. Eficacia citotóxica de los sistemas de camptotecina.....	256
a) Liposomas convencionales + CMCD-CAMP.....	256

b) Fármaco libre.....	257
c) Complejo de inclusión CMCD-CAMP	258
d) Liposomas PEGilados + CMCD-CAMP.....	259
4.3.3. Explicación de las diferencias en eficacia citotóxica entre diferentes líneas celulares.....	261
a) El potencial de proliferación.....	263
b) El tamaño celular.....	264
c) La quimiorresistencia.....	266
4.4. Internalización celular de los liposomas.....	267
5. Conclusiones	271
6. Bibliografía	273
CONCLUSIONES	285
Anexo I. Determinación de la eficacia citotóxica en líneas celulares utilizando la prueba t de Student.....	291

INTRODUCCIÓN



1. El cáncer: impacto y tratamiento

El cáncer es una enfermedad genética que se caracteriza por una división descontrolada de células, las cuales tienen capacidad de migración a otros tejidos, provocando metástasis y fallos sistémicos en el organismo. Una célula sana se convierte en tumoral a medida que va adquiriendo diferentes mutaciones de manera progresiva, que le permitirán alcanzar un estado neoplásico y, posteriormente, la capacidad de diseminarse por el individuo, provocando un proceso metastásico. La acumulación de mutaciones va dotando a las células de seis características distintivas que las permiten convertirse en células tumorales malignas (Hanahan y Weinberg, 2000). Estas seis características consisten en la adquisición de *resistencia a la muerte celular*, ya que se silencian los mecanismos que la regulan; *la inducción de la angiogénesis*, que se refiere a la formación de vasos sanguíneos que vascularizan al tumor, previéndolo de nutrientes y oxígeno necesarios para su desarrollo y crecimiento; *inmortalidad replicativa*, pues los mecanismos de división celular están descontrolados, produciéndose mutaciones en genes que sintetizan proteínas involucradas en la división celular; *evasión de los supresores de crecimiento*, los cuales se ven afectados por mutaciones en el ADN (ácido desoxirribonucleico) que los codifican, generando la ausencia de un freno en la división celular y una desregulación del crecimiento; *activación de los mecanismos de migración, invasión y metástasis*, a través de mutaciones en proteínas de adherencia entre células contiguas y *gran señalización proliferativa*, a través de mutaciones en los genes que sintetizan receptores de crecimiento, lo que provoca una masiva transducción de señales hacia el núcleo que promueve una división descontrolada (Hanahan y Weinberg, 2011). Una esquematización de estos pasos se observa en la Figura 1.

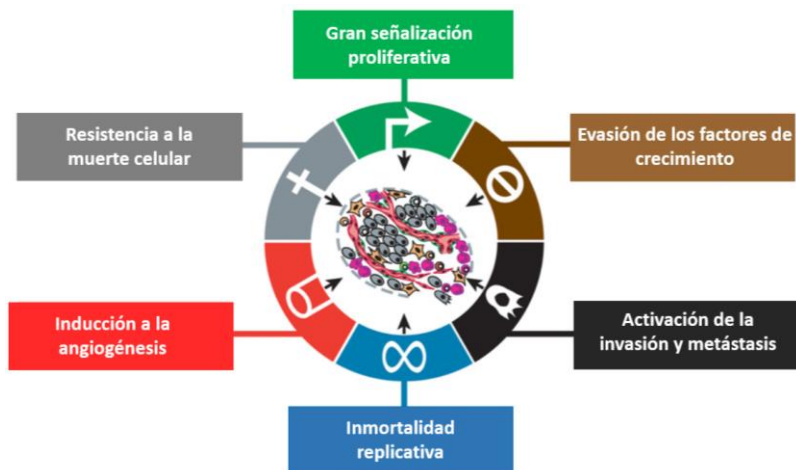


Figura 1. Las seis características distintivas de las células tumorales. Fuente: Hanahan y Weinberg, 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation.

A medida que las células van adquiriendo todas las características citadas anteriormente, se van convirtiendo poco a poco en tumorigénicas y, posteriormente, en malignas, dando como resultado la existencia de un tumor maligno que, comúnmente, llamamos cáncer.

Una vez que se desarrolla un cáncer, este sigue evolucionando hasta convertirse en un tumor metastásico que posee la capacidad de diseminarse a otros órganos del cuerpo. Las diferentes etapas que tienen lugar desde el inicio de ese cáncer hasta que este provoca una metástasis se pueden diferenciar a través del sistema de estadificación TNM (referido al Tumor, Nódulos y Metástasis), que se divide en cuatro etapas o estadios. *La etapa I* consiste en la existencia de un tumor pequeño y localizado dentro del órgano o tejido que le dio origen; *la etapa II* implica un crecimiento del tamaño del tumor, pero sin que exista propagación a los tejidos vecinos, aunque sí implica, en algunos tipos de tumores, que exista propagación a los ganglios linfáticos cercanos; *la etapa III* se caracteriza por el aumento en tamaño del tumor y el inicio

de la propagación a tejidos circundantes, además de una invasión de los ganglios linfáticos y; finalmente, *la etapa IV* implica que el cáncer se ha diseminado a otro órgano del cuerpo, generando un cáncer secundario o metastásico (Fearon y Vogelstein, 1990). Estas etapas se muestran reflejadas en la Figura 2.

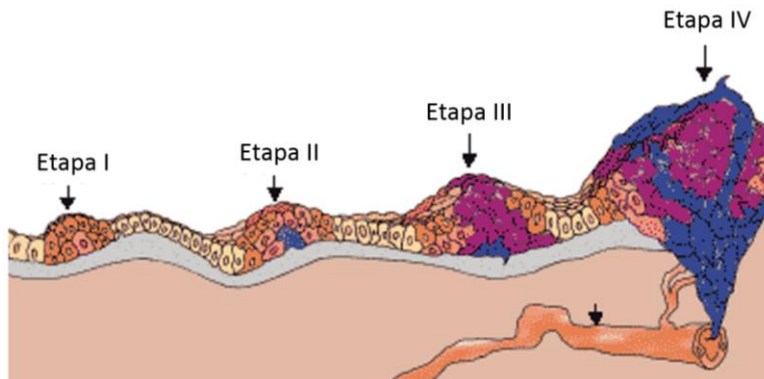


Figura 2. Etapas de diferenciación y progresión tumoral. Fuente: Cancer Research, UK.

Cabe destacar que el cáncer no puede ser entendido únicamente como una masa de células cancerígenas en proliferación, ya que en el tumor existen gran cantidad de células en distintos estados tumorigénicos y con diferente grado de desarrollo, formando una red de diferentes tipos celulares que se relacionan entre sí en pro de su supervivencia y expansión. Además, en las cercanías del tumor existen células sanas que están involucradas en el desarrollo y expansión del mismo, ya que participan en la formación de vasos sanguíneos y demás estructuras que benefician al tumor y le facilitan su nutrición. Todo ello se engloba en una estructura denominada *microambiente tumoral*. Por lo tanto, la biología y el desarrollo del tumor deben de explicarse por la interacción de unas células con otras y no como una agrupación de células cancerígenas aisladas (Binnewies et al., 2018).

El cáncer es la segunda causa de mortalidad en países desarrollados, sólo después de las enfermedades cardiovasculares, lo que constituye un grave problema de salud pública (Siegel et al., 2017, OMS (Organización Mundial de la Salud)). Por ello, sigue siendo necesaria la investigación de nuevas estrategias para mejorar el diagnóstico, el tratamiento y la prevención de la enfermedad (Chabner et al., 2005; Binnewies et al., 2018). La incidencia y la mortalidad del cáncer están creciendo rápidamente en todo el mundo, y entre las razones de este hecho se encuentran principalmente el estilo de vida ligado al desarrollo socioeconómico y el envejecimiento de la población (Bray et al., 2018). La primera razón hace referencia tanto a las condiciones sanitarias de cada país, como a los agentes cancerígenos a los que la sociedad está expuesta, y la segunda razón se refiere al aumento en la esperanza de vida, pues cuanto mayor sea esta, más expuestos estamos a los agentes cancerígenos que nos rodean y, por lo tanto, a una mayor acumulación de mutaciones en nuestras células, que incrementa la posibilidad de desarrollar un cáncer (Gersten y Wilmoth, 2002).

A nivel mundial existen grandes diferencias entre unos países y otros respecto a los tipos de tumores que se desarrollan. En *los países no desarrollados* predominan los cánceres causados por enfermedades infecciosas (las infecciones son más frecuentes en estos países), mientras que en *los países desarrollados* se producen otro tipo de tumores más relacionados con el estilo de vida (Maule y Merletti, 2012). Los tumores más relacionados con infecciones son los cánceres de estómago, cervix e hígado (Bray, 2014).

En el año 2018, se han producido 18,1 millones de nuevos casos de cáncer (17,0 millones sin contar los cánceres de piel no melanoma, NMSC, por sus siglas en inglés, non-melanoma skin cancer) y 9,6

millones de muertes (9,5 millones excluyendo los NMSC) a causa de esta enfermedad en el mundo (Bray et al., 2018).

Para ambos sexos, los tumores con mayor incidencia son el cáncer de pulmón (11,6% de todos los tumores diagnosticados) y el cáncer de mama (11,6%), el cáncer de colon (10,2%), el cáncer de próstata (7,1%), el cáncer de estómago (5,7%) y el cáncer de hígado (4,7%). Posteriormente, en el top 10 les siguen los tumores de esófago (3,2%), cervix uterino (3,2%), tiroides (3,1%) y vejiga (3,0%), existiendo variaciones en hombres y en mujeres (Bray et al., 2018), tal y como se muestra en la Figura 3.

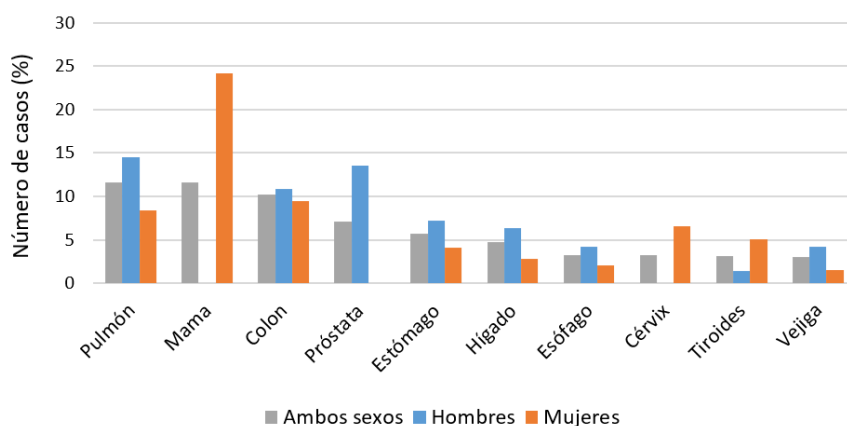


Figura 3. Incidencia del cáncer a nivel mundial.

En cuanto a la mortalidad, el cáncer de pulmón es el más mortal (18,4%), seguido del cáncer colorrectal (9,2%), de estómago (8,2%), hígado (8,2%) y mama (6,6%). Siguiendo esta lista, les siguen el cáncer de esófago (5,3%), páncreas (4,5%), próstata (3,8%), cervix uterino (3,3) y leucemia (3,2%), tal y como se muestra en la Figura 4 (Bray et al., 2018).

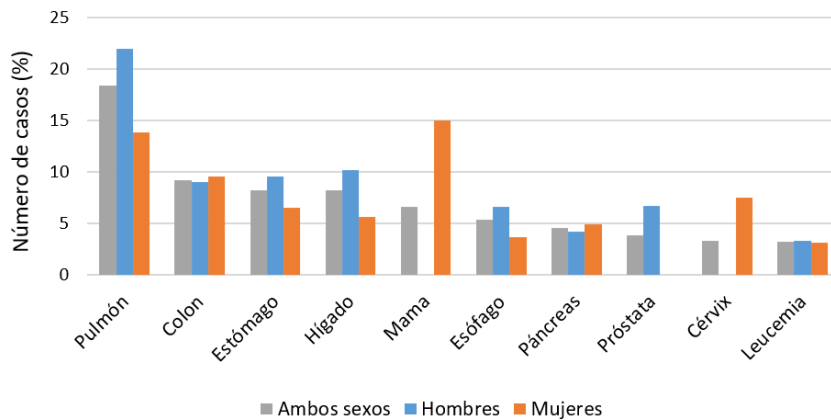


Figura 4. Mortalidad del cáncer a nivel mundial.

El cáncer no es una enfermedad actual, ya que los primeros casos documentados se remontan hacia el año 3000 a.C, en la civilización egipcia. Existen escritos y pinturas que muestran la existencia de estos tumores, así como los primeros casos de metástasis, que se encontraron en Siberia, datados con una antigüedad de 2700 años. En estas épocas, así como en siglos posteriores, el tratamiento predominante era la cirugía, aunque también se recurría al empleo de remedios naturales a base de plantas o a algún tratamiento mágico (Faguet, 2015).

En la actualidad, la lucha contra el cáncer se realiza a través de varias vertientes, que van desde la prevención y el diagnóstico precoz, que salva muchas vidas, hasta el tratamiento. Respecto al tratamiento, el cáncer puede ser abordado a través de cirugía, quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, hormonoterapia y trasplante de células madre. La forma más utilizada es la combinación de la cirugía con la quimioterapia y/o la radioterapia (Urruticoechea et al., 2010).

La quimioterapia es un tipo de tratamiento para combatir el cáncer que consiste en la administración de fármacos con el fin de destruir las células tumorales. Este tipo de tratamientos empezaron a

desarrollarse a partir de 1940, comienzo muy estrechamente relacionado con la II Guerra Mundial, en la que muchas personas sufrieron los terribles efectos del gas mostaza (Einhorn, 1985). En 1942, científicos de la Universidad de Yale descubrieron que este gas era un agente alquilante capaz de modificar el ADN de nuestras células. El interés por el efecto que esta sustancia producía en las células promovió la investigación, por lo que pocos años después se descubrieron tres fármacos (clorambucilo, melafán y busalfán) que se utilizan actualmente en el tratamiento de leucemias, linfomas y melanomas (Goodman y Wintrobe, 1946). Por lo tanto, el descubrimiento de estos fármacos supuso el inicio del camino al desarrollo de la quimioterapia.

De este modo, los fármacos utilizados detienen el crecimiento del tumor y provocan la muerte de las células causantes de la enfermedad. La quimioterapia puede ser el único tipo de tratamiento aplicado, pero frecuentemente se combina con cirugía y/o radioterapia, aunque también puede ser aplicado en combinación con los demás tratamientos mencionados (Faguet, 2015).

Actualmente, la quimioterapia comprende la utilización de una amplia variedad de sustancias citotóxicas que van dirigidas a diferentes lugares dentro de las células, afectando cada una a un proceso metabólico distinto, lo que permite clasificar a los fármacos existentes en la actualidad de tres formas diferentes: atendiendo a la diana celular a la cual se dirige el fármaco (proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, receptores de membrana...), en función de la naturaleza molecular del compuesto (alcaloides, taxanos, metales...) y en relación al tipo de acción que desencadenan (agentes alquilantes, antibióticos citotóxicos, antimetabolitos, inhibidores de proteínas quinasa...) (Kumar et al., 2015; Shi et al., 2019).

La quimioterapia es, en muchos casos, un tratamiento eficaz, ya que frena el crecimiento excesivo de las células tumorales, atacando a gran cantidad de mecanismos moleculares y rutas celulares que comprometen la supervivencia, por lo que es capaz de provocar la muerte celular y la regresión de los tumores. Sin embargo, se sigue destinando una gran atención y muchos esfuerzos en investigación farmacológica, porque en muchos casos el tratamiento no es eficaz debido a la adquisición de resistencias o a los enormes efectos secundarios que impiden continuar con el tratamiento. Se buscan, por lo tanto, nuevos fármacos o sistemas que permitan atacar a los tumores de manera más eficaz, con dosis más bajas de fármaco, para así conseguir minimizar sus efectos secundarios, poder luchar contra aquellos tumores que no responden a tratamientos convencionales y aumentar la esperanza de vida de los pacientes (Shi et al., 2019).

La ineficacia de los tratamientos quimioterápicos está relacionada con factores como son la pobre selectividad (no diferencian células sanas de cancerígenas), la reducida acumulación del fármaco en torno al tumor, su rápida eliminación por vía renal o hepática, la baja biodisponibilidad y absorción celular y la generación de resistencias (Lukyanov y Torchilin, 2004). Unidas a estas desventajas se suman características intrínsecas a los fármacos, como son la baja solubilidad en disolventes acuosos (gran hidrofobicidad), la degradación del fármaco por fluidos gastrointestinales, limitada biodisponibilidad, poca estabilidad *in vivo*, afinidad por el citocromo P450 en el tejido intestinal y hepático (lo que provoca su rápida eliminación) y la baja permeabilidad intestinal. Todo ello conduce a la ineficacia del tratamiento y a la generación de gran cantidad de efectos secundarios (náuseas, alopecia, neuropatías, neutropenia e insuficiencia renal, entre los más comunes)

producto de las altas dosis que deben de ser administradas, ya que la mayor parte del fármaco aplicado no llega al tumor (Nurgali et al., 2018).

Los fármacos anticancerígenos con mayores problemas en cuanto a solubilidad son el paclitaxel, el docetaxel, el etopósido y la camptotecina, debido a que son moléculas que presentan una estructura policíclica voluminosa, lo que provoca incapacidad para formar puentes de hidrógeno con el agua y poder así solubilizarse (Narvekar et al., 2014).

Teniendo en cuenta lo descrito anteriormente, esta tesis doctoral pretende plantear alternativas para mejorar la solubilidad de la camptotecina.

2. La camptotecina como fármaco anticancerígeno

La camptotecina (CAMP) (Figura 5) es un alcaloide vegetal procedente de la planta china *Camptotheca acuminata* (Wall et al., 1966;

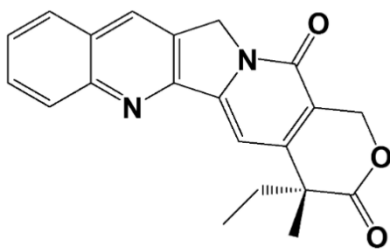


Figura 5. Estructura química de la camptotecina.

Wani et al., 1971), que presenta una gran acción antitumoral contra el cáncer de colon, pulmón y ovario, principalmente. También es activa en otro tipo de tumores como los de mama y estómago (Takimoto et al., 1998; Pantazis et al., 1996). Su diana celular

es la topoisomerasa I, enzima encargada de los procesos de escisión y religación del ADN, imprescindibles cuando se produce el enredo del ADN en los procesos de replicación y transcripción celular. El fármaco se une al complejo ADN-topoisomerasa I e interfiere en el proceso de religación, impidiendo que el ADN vuelva a la forma de doble hélice, ocasionando así la muerte celular por apoptosis (Jaxel et al., 1989). La

fase del ciclo celular que se ve afectada es la fase celular G2 (Tsao et al., 1992). Los efectos secundarios son muy fuertes, entre los que se incluyen la mielosupresión, fuerte diarrea, cistitis hemorrágica, náuseas y vómitos (Ulakan y Swaan, 2002).

Como se ha mencionado anteriormente, los principales problemas de este fármaco en la administración clínica consisten en su pobre solubilidad y su baja estabilidad. La solubilidad del fármaco en soluciones acuosas es prácticamente inexistente, ya que la concentración de camptotecina que se puede disolver en agua es de 1,3 $\mu\text{g/mL}$ (Kang et al., 2002; Cortesi et al., 1997). Su baja estabilidad se debe a la estructura del fármaco, que le confiere pH-dependencia. Por ello, dependiendo del pH de la disolución acuosa en la que se encuentra puede presentarse como una molécula neutra altamente hidrofóbica o como una molécula con carga negativa, tal y como se indica en la Figura 6. A un pH inferior de 5,5, el fármaco está presente en forma lactona y a un pH superior al citado, se obtiene la forma carboxilato. El paso de una isoforma a otra se debe a la apertura del anillo E. La forma neutra (lactona) es la que presenta actividad antitumoral, mientras que la forma carboxilato carece casi totalmente de esta actividad (Ziomkowska et al., 2006).

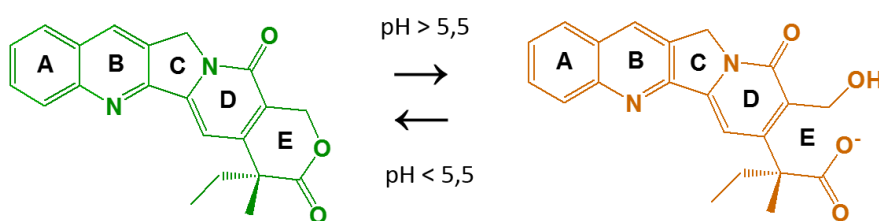


Figura 6. Estructura química de la camptotecina en la forma activa lactona (pH < 5,5) y la forma inactiva carboxilato (pH > 5,5).

Por tanto, la molécula presenta muy baja estabilidad, ya que con el aumento del pH se pasa de una molécula activa a otra inactiva, por lo que es muy importante conseguir que la forma lactona del fármaco sea estable y no abra su anillo E, para que así siga manteniendo su potencial citotóxico. El fármaco, cuando es inyectado en su forma neutra en la sangre, que presenta un pH de 7,4, tarda 120 minutos en convertirse en carboxilato y, por tanto, inactivarse (Mi y Burke, 1994).

Tabla 1. Modificaciones de la camptotecina.

Modificaciones	
Modificaciones del anillo de la quinolona (anillos A y B)	10-Hidroxycamptotecina
	Irinotecán (CPT-11, Camptosar)
	Topotecán (NSC 209669, Hicantina)
	9-Aminocamptotecina (9-AC)
	9-Nitrocantotecina (9-NC, Rubitecán)
	Lurcotecán (GG211, G147211)
	10,11-Metilenedioxi camptotecina
	Morfolino camptotecina
	Exotecán (DX-8951)
	Belotecán (CKD-602, Camtobell)
	Silatecán
	ST1481
	Chimmitecán
Modificaciones del anillo E	Diflomotecán (BN80915)
	Homocamptotecina (BN80927)
Modificaciones del extremo 20-hidroxi	Ésteres hidrofóbicos de camptotecina
	Ésteres de ácido amínico de camptotecina

El otro motivo de la inestabilidad del fármaco en sangre está relacionado con la alta afinidad de la forma carboxilato por la

seroalbúmina humana, proteína presente en gran cantidad en la sangre. De este modo, la camptotecina se une a esta molécula, lo que impide que entre a las células cancerígenas y se una a su diana celular. Esto se traduce en una pérdida total de la actividad (Ziomkowska et al., 2006).

Con el objetivo de solventar todos estos problemas, se trabajó mucho en la investigación de análogos estructurales a la camptotecina. Esta investigación ha conducido al desarrollo de gran cantidad de moléculas que se muestran en la Tabla 1 (Venditto y Simanek, 2010).

De todas las modificaciones descritas, sólo dos compuestos se usan actualmente en la clínica: Irinotecán y Topotecán.

El Irinotecán (9-[(dimetilamino)metil]-10-hidroxi-camptotecina) o CPT-11 (Figura 7) es un profármaco soluble en agua con baja actividad, el cual se transforma en un compuesto denominado SN-38 con actividad citotóxica, tras la acción enzimática que transforma el fármaco de inactivo a activo. Este compuesto se forma a través de la modificación del anillo A de la quinolona, en el cual se adiciona un carbamato de dipiridina en la posición 10-hidroxilo y una modificación del anillo B, añadiéndole un sustituyente en la posición 7, ambos correspondientes a grupos solubilizantes (Venditto y Simanek, 2010; Martino et al., 2017). El resultado fue un carbamato similar a la camptotecina (SN-38) con mejor solubilidad. El inconveniente es que, aunque la forma lactona permanece por más tiempo estable, sigue siendo dependiente de pH (Tanizawa et al., 1994).

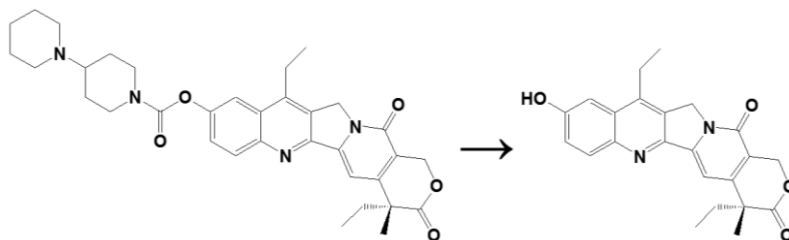


Figura 7. Transformación de Irinotecán inactivo a SN-38.

Actualmente, se utiliza para el tratamiento del cáncer de colon metastásico y cáncer de pulmón de células no pequeñas (Dancey et al., 1996) y estudios en fase II han demostrado que es un fármaco prometedor para el tratamiento del cáncer de mama metastásico refractario. Además, también se ha mostrado actividad contra el cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, linfomas de no Hodgkin refractarios, glioblastomas y sarcomas (Xia et al., 2013). La vida media del Irinotecán está en el rango de 5,2-9,3 horas, sus tiempos de residencia en el cuerpo son de 10 horas para el fármaco activo (SN-38) y su eliminación se realiza por vía biliar y urinaria (Dancey et al., 1996).

El Topotecán (7-etil-10-[4-piperidino)-1-piperidino] carboniloxicamptotecina) (Figura 8) se obtiene de la modificación del anillo A de la quinolona, mediante la adición de una amina terciaria en la posición 9 y de un grupo hidroxilo en la posición 10, produciéndose un aumento de solubilidad y estabilidad, lo que se ve traducido en una mayor actividad antitumoral. Fue el Topotecán.

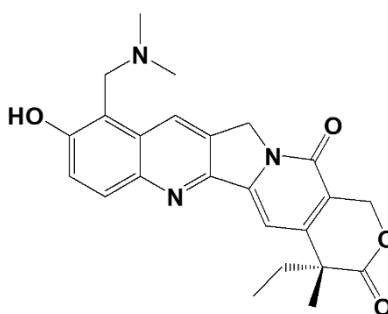


Figura 8. Estructura química del Topotecán.

primer medicamento inhibidor de la topoisomerasa aprobado para ensayos clínicos por la Administración de Alimentos y Medicamentos de

los Estados Unidos, (FDA, por sus siglas en inglés, Food and Drug Administration) (Venditto y Simanek, 2010). Este fármaco se utiliza en la clínica principalmente para el tratamiento del cáncer de ovario, cérvix y pulmón de células pequeñas, además de para los tumores de colon, sarcomas y tumores del sistema nervioso central (Dancey et al., 1996). Su principal utilidad sigue siendo el cáncer de ovario resistente a cisplatino y carboplatino. También se ha demostrado su actividad frente a los tumores de páncreas, cabeza y cuello, mieloma, próstata, riñón, melanoma, mama, estómago, hígado y útero (Sehouli et al., 2011). El problema que presenta este compuesto es que se hidroliza rápidamente en el plasma sanguíneo y se elimina en la orina pasadas las 24 horas de su incorporación en el organismo (Martino et al., 2017).

Es importante destacar que la obtención de las moléculas descritas conlleva el empleo de estrategias sintéticas complicadas y costosas, además de requerir de difíciles técnicas de purificación que garanticen su pureza para un uso clínico.

3. Nanotecnología en el uso de la camptotecina

Debido al gran auge que la nanotecnología ha experimentado en las últimas dos décadas, se han desarrollado nanotransportadores de diversa índole (Botella y Rivero-Buceta, 2017), que permiten transportar la camptotecina solventando así muchos de los inconvenientes relacionados con la falta de estabilidad, solubilidad y especificidad del citado fármaco. El empleo de este tipo de vectores evita las modificaciones químicas de la camptotecina que se han explicado anteriormente. Así, la camptotecina se ha combinado con diferentes sistemas como: **micelas** (Opanasopit et al., 2004; Yokoyama et al., 2004; Watanabe et al., 2006; Fan et al., 2010; Zhang et al., 2010; Ling et al.,

2018), **liposomas** (Sugarman et al., 1996; Watanabe et al., 2008; Sætern et al., 2004), **nanopartículas (NPs) poliméricas de PLGA** (Wang et al., 2000; Astete y Sabliov, 2006; Park, 1995; Parveen y Sahoo, 2008, Householder et al., 2015; Singer et al., 2001; Ertl et al., 1999; Sawyer et al., 2011; Zou et al., 2001; Min et al., 2008), **NPs poliméricas de seroalbúmina humana** (Lomis et al., 2016; Wang et al., 2016), **NPs poliméricas de seroalbúmina bovina** (Zhang et al., 2012; Qiu et al., 2012), **NPs poliméricas de dextrano** (Cao et al., 2016), **NPs poliméricas de sílice** (Rosenholm et al., 2012; Benezra et al., 2011; Muniesa et al., 2013; Botella et al., 2016; Tang et al., 2013), **NPs poliméricas de quitosano** (Patankar y Waterhouse, 2012; Agnihotri et al., 2004; Bodnar et al., 2005; Xiao et al., 2015; Berrada et al., 2005; Min et al., 2008; Aiping et al., 2006; Li et al., 2011; Ranjha, 2009), **NPs poliméricas de caprolactona** (Çirpanli et al., 2011; Ponsart et al., 2000), **dendrimeros** (Cheng et al., 2008; Sadekar et al., 2013; Morgan et al., 2006; Zhou et al., 2013), **hidrogeles** (Xue et al., 2015; Ha et al., 2014; McCarron et al., 2008; Sawant et al., 2008), **cristales mesoporosos activos** (Lin et al., 2013), **NPs inorgánicas de magnetita** (Chertok et al., 2008; Cengelli et al., 2009; Castillo et al., 2014), **óxido de grafeno** (Zhang et al., 2014; Deb y Vimala, 2018), **nanotubos de carbono** (Sahoo et al., 2011; Assali et al., 2013) y **material génico** (Tan et al., 2015). Las ventajas de estas formulaciones es que son específicas, biocompatibles y biodegradables, además de que permiten aplicar de manera simultánea diferentes tipos de terapia.

De todos los vectores anteriores se destaca el uso de los liposomas para el transporte de fármacos en general, y en especial de la camptotecina por las razones que a continuación se explicarán.

4. Liposomas: vectores para el transporte de fármacos

Los liposomas (Figura 9) son vesículas esféricas microscópicas con tamaños de entre los 20 y 1000 nm que están formadas por una bicapa lipídica de fosfolípidos, cuyo origen puede ser natural o sintético. Además, esta bicapa fosfolipídica puede ser estabilizada mediante la adición de colesterol y moléculas en su superficie, como el polietilenglicol (PEG), que aumentan su tiempo de circulación. Debido a su composición, presentan una parte

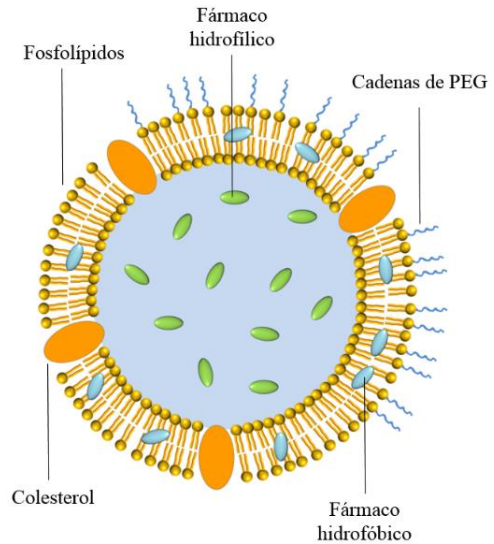


Figura 9. Estructura de un liposoma.

liposoluble que corresponde a la membrana y un núcleo hidrosoluble que alberga la solución acuosa (Hsieh et al., 2002).

Esta arquitectura les permite contener simultáneamente tanto moléculas hidrofílicas, hidrofóbicas, como moléculas anfifílicas en su interfase agua-lípido, proporcionando gran capacidad de carga (Mozafari et al., 2008). Los fosfolípidos, junto con el colesterol, son el principal componente de la membrana celular, y esto implica que los liposomas sean sistemas biodegradables, biocompatibles y carentes de toxicidad. Del mismo modo, su gran similitud en composición con la membrana lipídica también les permite fusionarse con las células fácilmente. Otra de las ventajas de estos sistemas es que suelen alcanzar su sitio de acción gracias a una extravasación desde la corriente sanguínea al espacio intersticial, en donde son capaces de ser fagocitados por las células circundantes (Bulkake et al., 2017).

Los liposomas están aprobados por la FDA de Estados Unidos y la Agencia Europea del Medicamento (EMA, por sus siglas en inglés, European Medicines Agency) para su uso clínico en humanos (Bulkake et al., 2017), por lo que la incorporación en la clínica de un sistema basado en estos transportadores sería mucho más sencilla que en el caso de sistemas que no estuviesen ya aprobados.

Muchos de los liposomas utilizados actualmente en la clínica poseen PEG en su superficie, cuyo objetivo es evadir la eliminación de los mismos por el Sistema Fagocítico Mononuclear, lo que les permite mantenerse durante más tiempo en el torrente circulatorio. También es conocido su papel en la eficacia para combatir el gran problema de la multirresistencia a diversos fármacos, el cual causa la suspensión de muchos tratamientos, ya que reduce la eficacia de las terapias (Barenholz, 2012).

Los liposomas pueden ser preparados por diferentes métodos con diferente complejidad (Pattni et al., 2015). A continuación, se explicarán las dos estrategias más empleadas. La metodología más sencilla consiste en crear una capa lipídica de poco espesor cubriendo el fondo de un matraz de fondo redondo que poco a poco se hidrata con disolventes acuosos manteniendo una fuerte agitación. Con este método se requieren el uso posterior de técnicas como la extrusión o la ultrasonificación para garantizar la uniformidad en tamaño. Otra metodología, también ampliamente utilizada es la evaporación en fase reversa. En este método se parte de una disolución orgánica de los fosfolípidos en éter etílico que se mezcla con una fase acuosa en una relación de volúmenes de aproximadamente 1:3 (fase orgánica/fase acuosa). Esta mezcla se emulsiona por sonicación obteniéndose una suspensión de micelas invertidas. A continuación, se elimina el éter a presión reducida, lo que

conduce a una agregación de dichas micelas que terminan formando una estructura tipo gel, la cual al incrementar el vacío finalmente acaba por romperse. En todo este proceso, las monocapas lipídicas que constituyen las micelas se sitúan lo suficientemente cerca unas de otras, como para dar lugar a las bicapas lipídicas que constituyen la pared de los liposomas (Gharib et al., 2015; Patttni et al., 2015).

Respecto a la manera de cargar los fármacos en los liposomas, se pueden encontrar varias estrategias que se suelen clasificar de manera general en dos: activas y pasivas (Patttni et al., 2015; Sur et al., 2014). Las estrategias pasivas incluyen aquellas metodologías en las que los liposomas se forman en una disolución acuosa que contiene el fármaco, y se utilizan para moléculas que presentan una alta solubilidad en agua, mientras que, en las activas, el fármaco se internaliza dentro de liposomas preformados. Normalmente el transporte del fármaco hacia el interior del liposoma es estimulado por un gradiente de pH. En el exterior del liposoma, el pH permite que el fármaco se encuentre en su forma neutra y pueda migrar a través de la bicapa hasta el interior acuoso que se encuentra a un pH por encima del pKa del fármaco, en donde este se ioniza y se queda atrapado (Bertrand et al., 2010). La camptotecina y alguno de sus derivados se han incorporado en liposomas siguiendo esta estrategia (Modi et al., 2012; Fugit y Anderson, 2014; Burke et al., 1992; Maitani et al., 2008) y manteniendo el interior del liposoma a un pH por encima del valor en el que se produce la apertura del anillo lactona, que corresponde a un pH de 5,5.

Actualmente, existen más de 50 nanomedicinas en uso clínico aprobadas por la FDA para el tratamiento del cáncer, entre las que se incluyen las que están en ensayos clínicos y las definitivamente aprobadas, siendo de estas últimas tan solo 13 de ellas, las cuales se

muestran en la Tabla 2. De las nanopartículas utilizadas actualmente en la clínica, ocho de ellas (el 61,5%) corresponden a formulaciones liposomales, entre las que sobresalen por su gran uso clínico Doxil[®], Myocet[®] o DaunoXome[®], además de muchas otras (Bulkake et al., 2017).

Tabla 2. Fármacos basados en NPs aprobados por la FDA de los Estados Unidos y la EMA de la Unión Europea, en donde se refleja el tipo de nanopartícula, el nombre comercial, el fármaco encapsulado, el año de aprobación y su aplicación actual.

Tipo de NP	Nombre comercial	Fármaco encapsulado	Año de aprobación	Aplicación
Liposomas	Doxil[®], Caelyx[®]	Doxorrubicina	1995	Cáncer de ovario, Sarcoma de Kaposi, Mieloma múltiple
	DaunoXome[®]	Daunorrubicina	1996	Sarcoma de Kaposi asociado a VIH
	DepoCyt[®]	Citarabina	1999	Meningitis linfomatosa
	Myocet[®]	Doxorrubicina	2000	Cáncer de mama metastásico
	Marqibo[®]	Vincristina	2012	Leucemia linfoblástica aguda
	Onyvide[®]	Irinotecán	2015	Cáncer de páncreas

		Vyxeos®	Citarabina y danunorubicina	2017	Leucemia mieloide aguda
		Mepact®	Mifamurtida	2009	Osteosarcoma
NPs de albúmina		Abraxane®	Paclitaxel	2005	Cáncer de páncreas, mama y NSCLC
NPs poliméricas		Oncaspar®	Pegaspargasa	2006	Leucemia linfoblástica aguda
		Eligard®	Acetato de leuprolide	2005	Cáncer de próstata
NPs de óxido de hierro		Feridex®	Ferumóxidos	1996	Imagen de contraste en hígado y bazo
		Nanotherm®	-	2010	Tumores cerebrales y glioblastoma

5. Formulaciones basadas en liposomas para el transporte de camptotecina

La existencia de formulaciones lipídicas para el transporte de fármacos permite pensar en el desarrollo de sistemas citotóxicos con gran potencial para su desarrollo en etapas posteriores (ensayos clínicos). Como se observa en la tabla anterior, no existen formulaciones lipídicas para el transporte de la camptotecina que estén en uso clínico debido a los problemas de solubilidad de este fármaco en agua, que no permiten obtener sistemas con una dosis de fármaco lo suficientemente alta como para que sea eficaz en la terapia.

Los liposomas constituyen la base de desarrollo del sistema de transporte de camptotecina que se presenta en esta tesis.

En bibliografía se pueden encontrar ejemplos de liposomas que se han cargado con camptotecina. Los primeros investigadores que encapsularon este fármaco en el interior de liposomas fueron Burke, Staubus y Mishra en el año 1992 (Burke et al., 1992; Burke et al., 1993). Los sistemas que ellos prepararon se formaron a partir de los lípidos 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol (DMPG) o 1,2-dimiristoil-sn-fosfocolina (DMPC), dando como resultado pequeñas vesículas liposomales unilamelares, en donde la unión de la camptotecina a los lípidos aumentaba la estabilidad del fármaco, permaneciendo con la forma lactona y manteniendo su actividad antitumoral original (Burke, 1992). Estos autores determinaron la constante de asociación de la camptotecina con las bicapas lipídicas de los liposomas, estableciendo que la camptotecina se une a las membranas con constantes de asociación de 100 M^{-1} . Para evidenciar la mayor estabilidad, determinaron que la camptotecina libre abre su anillo lactona para transformarse en forma carboxilato en tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés, Phosphate Buffer Saline) con un pH=7,4 a los 16,6 minutos, mientras que en los liposomas tarda hasta 48 horas. Además, descubrieron que la estabilidad descrita del anillo lactona se debe a que el fármaco se intercala entre las cadenas alquílicas de la bicapa, que lo protegen así del pH externo (Burke et al., 1992).

A partir de estos trabajos pioneros se encontró que la camptotecina y algunos de sus derivados se han incluido en diferentes sistemas de liposomas, con diferente composición lipídica, por métodos convencionales (como evaporación de fase inversa o hidratación en capa fina, que se describirán más ampliamente en el capítulo 3) (Piel et al.,

2006; Maestrelli et al., 2006; Ascenso et al., 2013; Skalko et al., 1996; Chen et al., 2007). Los resultados son bastante diferentes y es difícil encontrar un criterio de uniformidad que permita relacionar los resultados obtenidos en los diferentes laboratorios. Este hecho se debe a la baja solubilidad del fármaco, lo que conduce a adoptar diferentes estrategias para solubilizarlo.

Principalmente, se recurre al uso de disolventes orgánicos que incrementan notablemente su solubilidad respecto al agua, pero al ponerlo en contacto con el medio acuoso donde se van a formar los liposomas conducen a disoluciones sobresaturadas de fármaco que llevan a la precipitación de cristales de camptotecina durante el proceso de formación de los liposomas (Sætern et al., 2004).

A continuación, se recogen los estudios y principales conclusiones de estos trabajos.

Diversos autores como Sætern et al. (2004), Watanabe et al. (2008) y Maitani et al. (2008) analizaron el efecto de la composición lipídica, determinando que este es un factor muy importante que influye en la capacidad de carga de la camptotecina. Obtuvieron cargas con valores desde 12 µg de camptotecina/100 mg de lípido con liposomas de DMPC hasta de 140 µg de camptotecina/100 mg de lípido en los liposomas formados con EPC (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etilfosfolina) y DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano). En otros trabajos se estudió la importancia de la carga superficial de los liposomas en la capacidad de carga de camptotecina encontrándose que, según los autores (Cortesi et al., 1997), los liposomas con carga neutra poseen mayor eficiencia en la encapsulación, así como en la estabilidad de la camptotecina en estos sistemas. En este trabajo también se caracterizó la citotoxicidad de los liposomas cargados con camptotecina y el efecto

citotóxico en células de leucemia K562 fue ligeramente mayor que utilizando el fármaco libre (Cortesi et al., 1997). Además, se demostró a través de experimentos *in vivo* que los liposomas poseían mayor tiempo de circulación que el fármaco libre (Watanabe et al., 2008).

En otros estudios se validó la liberación de la camptotecina del interior los liposomas con el tiempo, determinándose que la liberación del fármaco ocurría de forma prematura (Prabhabara et al., 2013) mientras que en otros trabajos permanecía intacta (Flatén et al., 2013). Por otra parte, otras investigaciones observaron que la cantidad de fármaco que permanecía en el liposoma después del tiempo no dependía tanto de la composición lipídica, sino que era más dependiente de la relación fármaco:lípido existente, en donde los liposomas formados por DMPC son los que más fármaco retenían (Sætern et al., 2004). También se demostró que ciertos liposomas como los sintetizados por HSPC (fosfatidilcolina de soja hidrogenada) y colesterol, con adición de ácido oxálico, 3,5-bis(dodeciloxi) ácido benzoico y PEG-2000 (polietilenglicol 2000) fueron capaces de conferir más estabilidad a la camptotecina manteniendo la forma lactona durante mucho más tiempo y mostrando resultados esperanzadores en líneas celulares de cáncer de colon (Watanabe et al., 2008). Dentro de esta investigación se pueden encontrar ejemplos en los que se han conseguido direccionar los liposomas cargados con camptotecina hacia células cancerígenas específicas. De este modo se unió la hormona estimuladora de melanocitos α (α -MSH) a los liposomas, lográndose un direccionamiento hacia las células causantes de melanoma con una citotoxicidad mayor que en el caso de los liposomas convencionales (Lin et al., 2012).

Finalmente, se prepararon liposomas a partir de lípidos que se funcionalizaron con PEG (poliéter que forma una capa protectora en la

superficie de una nanopartícula, impidiendo su reconocimiento por el sistema inmunológico del organismo) de tal manera que las cadenas de PEG quedaban en el exterior del liposoma. Tras encapsular la camptotecina en este tipo de liposomas, se determinó que el fármaco se liberaba durante un periodo de tiempo más largo que en los liposomas convencionales. Con estos sistemas se comprobó *in vivo*, en estudios con ratas, una disminución del tamaño del tumor en comparación con el fármaco libre (Prabhakara et al., 2013).

6. Complejos de inclusión de ciclodextrinas con camptotecina para mejorar la solubilidad y estabilidad del fármaco

Las ciclodextrinas son macromoléculas que se utilizan para aumentar la solubilidad de muchos fármacos debido a su arquitectura. Las ciclodextrinas (CDs) (Figura 10) son oligosacáridos cíclicos que se obtienen de manera natural, vía degradación enzimática del almidón. Están formadas por unidades de glucopiranosas unidas a través de enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$. De manera general, presentan dimensiones nanométricas con una geometría tipo toroide, en donde existe una cavidad de naturaleza hidrofóbica y una superficie hidrofílica (Martín, 2004).

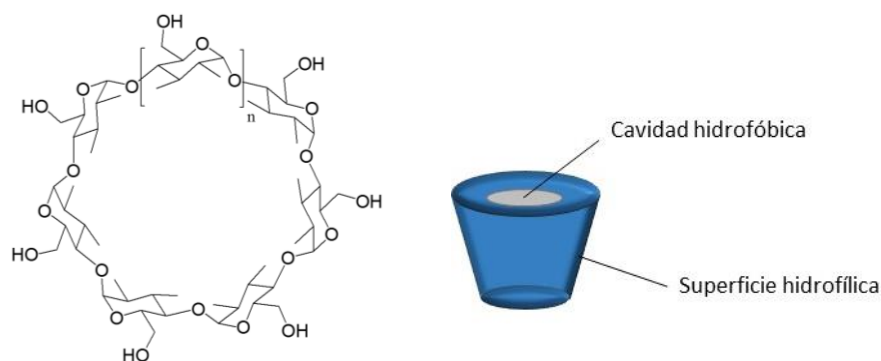


Figura 10. Estructura molecular de la ciclodextrina y esquematización de su arquitectura.

La anchura viene definida por la unidad de repetición de las glucosas, que puede ser de 6 glucosas (α -CD), 7 glucosas (β -CD) u 8 glucosas (γ -CD). Su altura es de 0,8 nm, común a todas las CDs, y su diámetro interno y externo aumenta al incrementarse el número de glucosas. Debido a la cavidad que presentan, las CDs han despertado un gran interés para el transporte de fármacos (Connors, 1997). A mediados de 1950, se demostró que las CDs pueden formar complejos de inclusión reversibles, albergando en su cavidad moléculas con dimensiones compatibles con la citada cavidad, siendo esta capacidad más destacable para moléculas apolares que se encuentran en medios polares (Cramer, 1952). Desde esos trabajos pioneros de Cramer, que marcaron el comienzo en el uso de CDs como agentes complejantes de diferentes moléculas, se han descrito un elevadísimo número de trabajos que describen las CDs para el transporte de fármacos de diferente naturaleza (Gidwani y Vyas, 2015; Davis y Brewster, 2004; Brewster y Loftsson, 2007).

Respecto a la camptotecina, se recurrió al uso de CDs para mejorar la solubilidad y estabilidad de este fármaco. Uno de los estudios principales fue el realizado por Kang et al. (2002), donde se investigó el incremento de solubilidad y la constante de complejación de la camptotecina con algunas de las diversas formas de ciclodextrinas existentes, como son la α -CD, β -CD, γ -CD, HP- β -CD (hidroxipropil- β -ciclodextrina), RDM- β -CD (β -ciclodextrina azarosamente metilada, por su nombre en inglés, *randomly dimethyl- β -cyclodextrin*) y la RDM- γ -CD (γ -ciclodextrina azarosamente metilada, por su nombre en inglés, *randomly dimethyl- γ -cyclodextrin*). Las constantes de estabilidad 1:1 de estos complejos de inclusión estaban en el intervalo comprendido de 41 a 910 M⁻¹. Respecto a la solubilidad, se observó un aumento respecto a

la del fármaco libre de 20 veces tras la complejación con α -CD, mientras que el incremento fue 5,70 veces mayor con la β -CD; 7,56 veces mayor con la γ -CD; 32,60 veces mayor con la HP- β -CD; 170,48 veces con la RDM- β -CD y de 8,88 veces utilizando la RDM- γ -CD. Entre los diferentes complejos estudiados, la complejación con RDM- β -CD condujo a la formación del complejo de inclusión más estable, con una constante de $909,7 \text{ M}^{-1}$. Con este tipo de ciclodextrina también se consiguió el aumento de solubilidad más elevado en otro trabajo (Cheng et al., 2003), siendo la solubilidad de la camptotecina una vez complejada de $228,45 \mu\text{g/mL}$, mientras que la solubilidad del fármaco libre es de $1,34 \mu\text{g/mL}$. Por lo tanto, se determinó que las CDs en general y la RDM- β -CD en particular, son moléculas que aumentan la solubilidad de la camptotecina. Por otra parte, Zhan et al. (2007) comprobaron que la actividad citotóxica del fármaco una vez complejado con las CDs no se ve afectada y que en algunos casos se incrementa, por aumentarse su solubilidad y su estabilidad e incrementarse su internalización celular.

Es importante destacar que, en estos estudios descritos en la bibliografía, las ciclodextrinas utilizadas eran moléculas neutras que no presentaban grupos iónicos. En la presente tesis, se pretende abordar el problema de solubilidad de la camptotecina mediante el estudio de la complejación con un derivado ionizable de la β -CD, llamada carboximetil- β -ciclodextrina (CMCD), que se pueden ionizar en función del pH.

7. Complejos de inclusión de ciclodextrinas con camptotecina y su incorporación en liposomas

Los trabajos que se encontraron en la bibliografía, expuestos anteriormente, describen la formación de liposomas cargados con

camptotecina, pero no dedican atención a la mejora de la solubilidad del citado fármaco. De forma general, los liposomas se forman poniendo en contacto los lípidos con disoluciones de fármaco sobresaturadas. Sin embargo, no se encuentran en la bibliografía estudios en los que se formen liposomas partiendo de disoluciones acuosas de camptotecina con una solubilidad mejorada con respecto a la baja solubilidad del fármaco en agua.

Una vía para mejorar la solubilidad del fármaco en agua es el uso de las ciclodextrinas. De hecho, hay numerosos trabajos en los que se forman los liposomas a partir de disoluciones de fármacos que se encuentran formando complejos de inclusión con diferentes tipos de ciclodextrinas (Gharib et al., 2015).

Este tipo de estrategia se aplicó para la camptotecina y solo aparece descrita en un artículo (Modi et al., 2012), pero en este caso es importante señalar que las disoluciones de camptotecina empleadas también estaban sobresaturadas, la concentración de ciclodextrina era demasiado baja y su papel era meramente el de inhibir la cristalización del fármaco.

Por lo tanto, teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, el objetivo general de esta tesis será desarrollar un sistema de liberación de fármacos basado en sistemas liposómicos con camptotecina, encapsulada en su interior, en forma de complejo de inclusión con la CMCD.

Bibliografía

- Agnihotri S. A., Mallikarjuna N. N., Aminabhavi T. M. (2004). *Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery*. J. Cont. Rel. 100:5-28.
- Aiping Z., Jianhong L., Wenhui. (2006). *Effective loading and controlled release of camptothecin by O-carboxymethylchitosan aggregates*. Carbohydr. Polym. 63:80-96.
- Ascenso A., Cruz M., Euleterio C., Carvalho F. A., Santo F. A., Marques H. C., Simões S. (2013). *Novel tretinoin formulations: A drug-in-cyclodextrin-in liposome approach*. J. of Lipos. Res. 23(3):211-219.
- Assali M., Cid J. J., Pernía-Leal M., Muñoz-Bravo M., Fernández I., Wellinger R. E., Khiar N. (2013). *Glyconanosomes: disk-shaped nanomaterials for the water solubilization and delivery of hydrophobic molecules*. ACS Nano. 7:2145-2153.
- Astete C. E., Sabliov C. M. (2006). *Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles*. J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 17:247-289.
- Barenholz Y.C. (2012). *Doxil[®] - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned*. J. Control. Rel. 160:117-134.
- Benezra M., Penate-Medina O., Zanzonico P. B., Schaer D., Ow H., Burns A., DeStanchina E., Longo V., Herz E., Iyer S., Wolchok J., Larson S. M., Wiesner U., Bradbury M. S. (2011). *Multimodal silica nanoparticles are effective cancer-targeted probes in a model of human melanoma*. J. Clin. Invest. 121(7):2768-2780.
- Berrada M., Serreqi A., Dabbarh F., Owusu A., Gupta A., Lehnert S. (2005). *A novel non-toxic camptothecin formulation for cancer chemotherapy*. Biomaterials 26:2115-2120.

- Bertrand N., Bouvet C., Moreau P., Leroux J.-C. (2010). *Transmembrane pH-Gradient Liposomes To Treat Cardiovascular Drug Intoxication*. 4(12):7552-7558.
- Binnewies M., Roberts E. W., Kersten K., Chan V., Fearon D. F., Merad M., Coussens L. M., Gaboritovich D. I., Ostrand-Rosenberg S., Hedrick C. C., Vonderheide R. H., Pittet M. J., Jain R. K., Zou W., Howcroft T. K., Woodhouse E. C., Weinberg R. A., Krummel M. F. (2018). *Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy*. Nat. Med. 24(5):541-550.
- Bodnar M., Hartmann J. F., Borbely J. (2005). *Preparation and characterization of chitosan-based nanoparticles*. Biomacrom. 6:2521-2527.
- Botella P., Muniesa C., Vicente V., Cabrera-Garcia A. (2016). *Effect of drug precursor in cell uptake and cytotoxicity of redox-responsive camptothecin nanomedicines*. Mat. Sci. & Eng. C-Mat. for Biol. Appl. 58:692-699.
- Botella P., Rivero-Buceta E. (2017). *Self approaches for camptothecin delivery: Structural analogues and nanomedicines*. J. of Contr. Rel. 247:28-54.
- Bray F. (2014). *Transitions in human development and the global cancer burden*. Stewart BW. World Canc. Rep. 42-55.
- Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R. L., Torre L. A., Jemal A. (2018). *Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. Ca. Canc. J. Clin. 1-31.

-
- Brewster M. E., Loftsson T. (2007). *Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers*. *Adv. Drug Del. Rev.* 59:645-666.
 - Bulkake U., Doppalapudi S., Kommineni N., Khan W. (2017). *Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review*. *Pharmaceutics*. 9(12):1-33.
 - Burke T. G., Mishra A. K., Wani M. C., Wall M. E. (1993). *Lipid bilayer partitioning and stability of camptothecin drugs*. *Biochemistry* 32:5352-5364.
 - Burke T. G., Staubus A. E., Mishra A. K. (1992). *Liposomal stabilization of camptothecin's lactone ring*. *J. Am. Chem. Soc.* 114:8318-8319.
 - Cao D., He J., Xu J., Zhang M., Zhao L., Duan G., Cao Y., Zhou R., Ni P. (2016). *Polymeric prodrugs conjugated with reductionsensitive dextran-camptothecin and pH-responsive dextran-doxorubicin: an effective combinatorial drug delivery platform for cancer therapy*. *Polym. Chem.* 7:4198-4212.
 - Castillo P. M., Mata M., Casula M. F., Sánchez-Alcázar J. A., Zaderenko A. P. (2014). *PEGylated versus non-PEGylated magnetic nanoparticles as camptothecin delivery system*. *Beilstein J. Nanotech.* 5:1312-1319.
 - Cengelli F., Grzyb J. A., Montoro A., Hofmann H., Hanessian S., Juillerat-Jeanneret L. (2009). *Surface-Functionalized Ultrasmall Superparamagnetic Nanoparticles as Magnetic Delivery Vectors for Camptothecin*. *Chem. Med. Chem.* 4:988-997.
 - Chabner B. A., Roberts T. G. (2005) *Timeline: Chemotherapy and the war on cancer*. *Nat Rev Cancer* 5: 65-72.

- Chen H., Gao J., Wang F., Liang W. (2007). *Preparation, characterization and phar-macokinetics of liposomes-encapsulated cyclodextrins inclusion complexes for hydrophobic drugs*. Drug Deliv. 14:201-208.
- Cheng J., Khin K. T., Jensen G. S., Liu A., Davis M. E. (2003). *Synthesis of Linear, β -Cyclodextrin-Based Polymers and Their Camptothecin Conjugates*. Bioconjugate Chem. 14:1007-1017.
- Cheng Y., Li M., Xu T. (2008). *Potential of poly(amidoamine) dendrimers as drug carriers of camptothecin based on encapsulation studies*. Eur. J. of Med. Chem. 43:1791-1795.
- Chekot B., Moffat B. A., David A. E., Yu F., Bergemann C., Ross B. D., Yang V. C. (2008). *Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors*. Biomater. 29(4):487-496.
- Çirpanlı Y., Allard E., Passirani C., Bilensoy E., Lemaire L., Çalis S., Benoit J.-P. (2011). *Antitumoral activity of camptothecin-loaded nanoparticles in 9L rat glioma model*. Int. J. of Pharm. 403:201-206.
- Connors K. A. (1997). *The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution*. Chem. Rev. 97:1325-1357.
- Cortesi R., Esposito E., Maietti A., Menegatti E., Nastruzzi C. (1997). *Formulation study for the antitumor drug camptothecin: liposomes, micellar solutions and a microemulsion*. Intern. J. of Pharm. 159:95-103.
- Cramer F. *Einschlußverbindungen der Cyclodextrine*. Angewandte Chemie. 64(5):136-136.
- Dancey J., Eisenhauer E. A. (1996). *Current perspectives on camptothecins in cancer treatment*. Br. J. Cancer. 74:327-338.

-
- Davis M. E., Brewster M. E. (2004). *Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future*. 3:1023-1035.
 - Deb A., Vimala R. (2018). *Camptothecin loaded graphene oxide nanoparticle functionalized with polyethylene glycol and folic acid for anticancer drug delivery*. J. of Drug Del. Sci. and Techn. 43:333-342.
 - Martín del V. E. M. (2004). *Cyclodextrins and their uses: a review*. Proc. Biochem. 39(9):1033-1046.
 - Einhorn J. (1985). *Nitrogen mustard: the origin of chemotherapy for cancer*. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 11:1375-1378.
 - Ertl B., Platzer P., Wirth M., Gabor F. (1999). *Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres for sustained delivery and stabilization of camptothecin*. J. of Control. Rel. 61:305-317.
 - Faguet G. B. (2015). *A brief history of cancer: Age-old milestones underlying our current knowledge database*. Int. J. Cancer: 136:2022-2036.
 - Fan N., Duan K., Wang C., Liu S., Luo S., Yu J., Huang J., Li Y., Wang D. (2010). *Fabrication of nanomicelle with enhanced solubility and stability of camptothecin based on α,β - poly[(N-carboxybutyl)-L-aspartamide]-camptothecin conjugate*. Colloids Surf. B. 75:543-549.
 - Fearon E. R., Vogelstein B. (1990). *A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis*. Cell. 61:759-167.
 - Flaten G. E., Chang T.-T., Phillips W. T., Brandl M., Bao A., Goins B. (2013). *Liposomal formulations of poorly soluble camptothecin: drug retention and biodistribution*. J. of Lipos. Res. 23(1):70-81.

- Fugit K. D., Anderson B. D. (2014). *The Role of pH and Ring-opening Hydrolysis Kinetics on Liposomal Release of Topotecan*. J. of Contr. Rel. 174(1):88-97.
- Gersten O., Wilmoth JR. (2002). *The cancer transition in Japan since 1951*. Demogr. Res. 7:271-306.
- Gharib R., Greige-Gerges H., Fourmentin S., Charcosset C., Auezova L. (2015). *Liposomes incorporatong cyclodextrin-drug inclusion complexes: Current state of knowledge*. Carb. Polym. 129:175-186.
- Gidwani B., Vysa A. (2015). *A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs*. BioMed Res. Intern. 1-15.
- Goodman L. S., Wintrobe M. M. (1946). *Nitrogen mustard ther (1976apy. Use of methyl-bis-(b-chloroethyl) amine hydrochloride and tris-(b-chloroethyl) amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia, and certain allied and miscellaneous disorders*. J. Am. Med. Assoc. 132:126-132.
- Lin H. M, Lin H. Y, Chan M. H. (2013). *Preparation, characterization, and in vitro evaluation of folate-modified mesoporous bioactive glass for targeted anticancer drug carriers*. J. Mater. Chem. B 1:6147-6156.
- Ha W., Yu J., Song X. Y., Chen J., Shi Y. P. (2014). *Tunable Temperature-Responsive Supramolecular Hydrogels Formed by Prodrugs As a Codelivery System*. Acs Appl. Mat. & Int. 6: 10623-10630.
- Hanahan D., Weinberg R. A. (2000). *The hallmarks of cancer*. Cell. 100(1):57-70.

-
- Hanahan D., Weinberg R. A. (2011). *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell. 144(5):646-674.
- Householder K. T., DiPerna D. M., Chung E. P., Wohlleb G. M., Dhruv H. D., Berens M. E., Sirianni R. W. (2015). *Intravenous delivery of camptothecin-loaded PLGA nanoparticles for the treatment of intracranial glioma*. Inter. J. of Pharmac. 479:374-380.
- Hsieh Y.F., Chen T.L., Wang Y.T., Chang J.H., Chang H.M. (2002). *Properties of liposomes prepared with various lipids*. J. of Food Sci. 67:2808-2813.
- Jaxel, C.; Kohn, K. W.; Wani, M. C.; Wall, M. E.; Pommier, Y. (1989). *Structure-activity study of the actions of camptothecin derivatives on mammalian topoisomerase I: evidence for site specific receptor site and a relation to antitumor activity*. Cancer Res. 49:1465–1469.
- Kang J., Kumar V., Yang D., Chowdhury P. R., Hohl R. J. (2002). *Cyclodextrin complexation: influence on the solubility, stability, and cytotoxicity of camptothecin, an antineoplastic agent*. Eur. J. of Pharm. Sci. 15:163-170.
- Kumar S., Ahmad M. K., Waseem M., Pandey A. K. (2015). *Drug Targets for Cancer Treatment: An Overview*. Med. Chem. 5(3):115-123.
- Li X., Kong X., Zhang J., Wang Y., Wang Y., Shi S., Guo G., Luo F., Zhao Xia., Wei Y., Qian Z. (2011). *A Novel Composite Hydrogel Based on Chitosan and Inorganic Phosphate for Local Drug Delivery of Camptothecin Nanocolloids*. J. of Pharm. Sci. 100(1):232-241.
- Lin C.-H., Al-Suwayeh S. A., Hung C.-F., Chen C.-C., Fang J.-Y. (2012). *Camptothecin - Loaded Liposomes with α - Melanocyte - Stimulating Hormone Enhance Cytotoxicity Toward and Cellular*

Uptake by Melanomas: An Application of Nanomedicine on Natural Product. J. of Trad. and Complem. Med. 3(2):102-109.

- Ling L., Ismail M., Du Y., Xia Q., He W., Yao C., Li X. (2018). *High Drug Loading, Reversible Disulfide Core-Cross-Linked Multifunctional Micelles for Triggered Release of Camptothecin.* 15(12):5479-5492.

- Lomis N., Westfall S., Farahdel L., Malhotra M., Shum-Tim D., Prakash S. (2016). *Human Serum Albumin Nanoparticles for Use in Cancer Drug Delivery: Process Optimization and In Vitro Characterization.* Nanomater. 6(6):116.

- Lukyanov A. N., Torchilin V. P. (2004). *Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs.* Adv. Drug Deliv. Rev. 56(9):1273-1289.

- Maestrelli F., Gonzalez-Rodriguez M. L., Rabasco A. M., Mura P. (2006). *Effect of preparation technique on the properties of liposomes encapsulating ketoprofen-cyclodextrin complexes aimed for transdermal delivery.* Intern. J. of Pharmac. 312:53-60.

- Maitani Y., Katayama S., Kawano K., Hayama A., Toma K. (2008). *Artificial Lipids Stabilized Camptothecin Incorporated in Liposomes.* Biol. Pharm. Bull. 31(5):990-993.

- Martino E., Volpe S. D., Terribile E., Benetti E., Sakaj M., Centamore A., Sala A., Collina S. (2017). *The long story of camptothecin: From traditional medicine to drugs.* Bioorg. and Medic. Chem. Ltters 27:701-707.

- Maule M., Merletti F. (2012). *Cancer transition and priorities for cancer control.* Lancet Oncol. 13:745-746.

-
- McCarron P. A., Marouf W. M., Quinn D. J., Fay F., Burden R. E., Olwill S. A., Scott C. J. (2008). *Antibody targeting of camptothecin-loaded PLGA nanoparticles to tumor cells*. *Bioconjug. Chem.* 19:1561-1569.
- Min K. H., Park K., Kim Y.-S., Bae S. M., Lee S., Jo H. G., Park R.W., Kim I. S., Joeng S. Y., Kim K., Kwon I. C. (2008). *Hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles encapsulated camptothecin enhance the drug stability and tumor targeting in cancer therapy*. *J Control Release.* 127: 208-218.
- Modi S., Xiang T.-X., Anderson B. D. (2012). *Enhanced active liposomal loading of a poorly soluble ionizable drug using supersaturated drug solutions*. *J. of Contr. Rel.* 162:330-339.
- Morgan M. T., Nakanishi Y., Kroll D. J., Griset A. P., Carnahan M. A., Wathier M., Oberlies N. H., Manikumar G., Wani M. C., Grinstaff M. W. (2006). *Dendrimer-Encapsulated Camptothecins: Increased Solubility, Cellular Uptake, and Cellular Retention Affords Enhanced Anticancer Activity In vitro*. *Cancer Res.* 66(24):11913-11921.
- Mozafari M.R., Johnson C., Hatziantoniou S., Demetzos C. (2008). *Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology*. *J. of Lip. Res.* 18:309-327.
- Muniesa C., Vicente V., Quesada M., Sáez-Atiénzar S., Blesa J. R., Abasolo I., Fernández Y., Botella P. (2013). *Glutathione-sensitive nanoplatfor for monitored intracellular delivery and controlled release of Camptothecin*. *RSC Adv.* 3:15121-15131.

- Narvekar M., Xue H. Y., Eoh J. Y., Wong H. L. (2014). *Nanocarrier for Poorly Water-Soluble Anticancer Drug-Barriers of Translation and Solutions*. APPS Pharm. Sci. Tech. 15(4):822-833.
- Nurgali K., Jagoe R. T., Abalo R. (2018). *Adverse Effects of Cancer Chemotherapy: Anything New to Improve Tolerance and Reduce Sequelae?* Front. In Pharm. 9(245):1-3.
- Opanasopit P., Yokoyama M., Watanabe M., Kawano K., Maitani Y., Okano T. (2004). *Block Copolymer Design for Camptothecin Incorporation into Polymeric Micelles for Passive Tumor Targeting*. Pharm. Res. 21(11):2001-2008.
- Pantazis P., Giovanella B.C., Rothenberg M.L. (1996). *The camptothecins. From discovery to the patient*. ACS Symp. Ser. 803:1-335.
- Park T. G. (1995). *Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: Effect of copolymer composition*. Biomaterials. 16:1123-1130.
- Parveen S., Sahoo S. K. (2008). *Polymeric nanoparticles for cancer therapy*. J. of Drug Targ. 16(2):108-123.
- Patankar N., Waterhouse D. (2012). *Nano-particulate Drug Delivery Systems for Camptothecins*. Cancer Ther. 8:90-104.
- Pattni B. S., Chupin V. V., Torchilin V. P. (2015). *New Developments in Liposomal Drug Delivery*. Am. Chem. Soc. 115:10938-10966.
- Piel G., Piette M., Barillaro V., Castagne D., Evrard B., Delattre L. (2006). *Betamethasone-in-cyclodextrin-in-liposome: The effect of cyclodextrins on encapsulation efficiency and release kinetics*. Intern. J. of Pharmac. 312:75-82.

-
- Ponsart S., Coudane J., Vert M. (2000). *A Novel Route To Poly(ϵ -caprolactone)-Based Copolymers via Anionic Derivatization*. *Biomacrom.* 1(2):275-281.
- Prabhakara1 P., Zenia T., Marina K., Shama K. P., Girish S. N., Matapady N. H. (2013). *Preparation and evaluation of lipid vesicles of camptothecin as targeted drug delivery system*. *Pak. J. Pharm. Sci.* 26:(4)779-786.
- Qiu N., Yin H., Ji B., Klauke N., Glidle A., Zhang Y., Song H., Cai L., Ma L., Wang G., Chen L., Wang W. (2012). *Calcium carbonate microspheres as carriers for the anticancer drug camptothecin*. *Mat. Sci. And Eng. C.* 32:2634-2640.
- Ranjha N. M. (2009). *Polymeric micelles of ammonium palmitoyl glycol chitosan and solubilization of camptothecin*. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 63:81-87.
- Rosenholm J., Sahlgren C., Mamaeva V., Lindén M. (2012). *Nanoparticles in targeted cancer therapy: Mesoporous silica nanoparticles entering preclinical development stage*. *Nanomed.* 7(1):111-120.
- Sadekar S., Thiagarajan G., Bartlett K., Hubbard D., Ray A., McGill L. D. Ghandehari H. (2013). *Poly(amido amine) dendrimers as absorption enhancers for oral delivery of camptothecin*. *Intern. J. of Pharm.* 456:175-185.
- Sætern A. M., Flaten G. E., Brandl M. (2004). *A Method to Determine the Incorporation Capacity of Camptothecin in Liposomes*. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 5(3)40:1-8.

- Sahoo N. G., Bao H., Pan Y., Pal M., Kakran M., Cheng H. K. F., Li L., Tan L. P. (2011). *Functionalized carbon nanomaterials as nanocarriers for loading and delivery of a poorly water-soluble anticancer drug: a comparative study*. Chem. Commun. 47 (2011) 5235-5237.
- Sawant R. R., Sawant R. M., Torchilin V. P. (2008). *Mixed PEGPE/ vitamin E tumor-targeted immunomicelles as carriers for poorly soluble anti-cancer drugs: improved drug solubilization and enhanced in vitro cytotoxicity*. Eur. J. Pharm. Biopharm. 70:51-57.
- Sawyer A. J., Saucier-Sawyer J. K., Booth C. J., Liu J., Patel T., Joseph M. Piepmeier J. M., Saltzman M. (2011). *Convection-enhanced delivery of camptothecin-loaded polymer nanoparticles for treatment of intracranial tumors*. Drug Deliv. and Transl. Res. 1:34-42.
- Sehouli J., Stengel D., Harter P., Kurzeder C. (2011). *Topotecan Weekly Versus Conventional 5-Day Schedule in Patients With Platinum-Resistant Ovarian Cancer: A Randomized Multicenter Phase II Trial of the North-Eastern German Society of Gynecological Oncology Ovarian Cancer Study Group*. J. of Clin. Onc. 29(2)242-248.
- Shi D., Khan F., Abagyan R. (2019). *Extended Multitarget Pharmacology of Anticancer Drugs*. J. Chem. Inf. Model. 59(6):3006-3017.
- Siegel R., Miller K. D., Fedewa S. A., Ahnen D. J., Meester R. G., Barzi A., Jemal A. (2017). *Colorectal cancer statistics, 2017*. C.A. Cancer J. Clin. 67(3):177-193.
- Singer J. W., Bhatt R., Tulinsky J., Buhler K. R., Heasley E., Klein P., de Vries P. (2001). *Water-soluble poly-(L-glutamic acid)-Gly-*

camptothecin conjugates enhance camptothecin stability and efficacy in vivo. J. of Control. Rel. 74:243-247.

- Skalko N., Brandl M., Bedirevid-Ladan M., Filipovid-Greie J., Jalsenjak I. (1996). *Liposomes with nifedipine and nifedipine cyclodextrin complex: Calorimetric and plasma stability comparison.* Eur. J. of Pharmac. Sci, 4:359-366.

- Sugarman S. M., Zou Y., Wasan K., Poirot K., Kumi R., Reddy S., Perez-Soler R. (1996). *Lipid complexed camptothecin: formulation and initial biodistribution and antitumor activity studies.* Cancer Chemother. Pharmacol. 37:531-538.

- Sur S., Fries A.C., Kinzler K.W., Zhou S., Vogelstein B. (2014). *Remote Loading of Preencapsulated Drugs into Stealth Liposomes,* Proc. Natl. Acad. Sci. 111:2283-2288.

- Takimoto C. H., Wright J., Arbuck S.G. (1998). *Clinical applications of camptothecins.* Biochem. Biophys. Acta 1400:107-119.

- Tan X., Li B. B., Lu X., Jia F., Santori C., Menon P., Li H., Zhang B., Zhao J.J., Zhang K. (2015). *Light-triggered, self-immolative nucleic acid-drug nanostructures.* J. Am. Chem. Soc. 137:6112-6115.

- Tang L., Gabrielson N. P., Uckun F. M., Fan T. M., Cheng J. J. (2013). *Size-Dependent Tumor Penetration and in Vivo Efficacy of Monodisperse Drug-Silica Nanoconjugates.* Mol. Pharm. 10:883-892.

- Tanizawa A., Fujimori A., Fujimori Y., Pommier Y. (1994). *Comparison of topoisomerase I inhibition, DNA damage, and cytotoxicity of camptothecin derivatives presently in clinical trials.* J. Natl. Canc. Inst. 86:836-42.

- Tran S., DeGiovanni P.-J., Piel B., Rai P. (2017). *Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery*. Clin. Trans. Med. 6:(44)1-22.
- Tsao Y. P., D'Arpa P., Liu L. (1992). *The involvement of active DNA synthesis in camptothecin-induced G2 arrest: altered regulation of P34 cdc2/cyclin B*. Cancer Res. 52(7):1823-1829.
- Ulakan H., Swaan P. W. (2002). *Camptothecins. A Review of Their Chemotherapeutic Potential*. Drugs. 62(14):2039-2057.
- Urruticoechea A., Alemany R., Balart J., Villanueva A., Viñals F., Capellá G. (2010). *Recent advances in cancer therapy: An overview*. Curr. Pharm. Des. 16:3-10.
- Venditto V. J., Simanek E. E. (2010). *Cancer therapies utilizing the camptothecins: a review of the in vivo literature*. Mol. Pharmaceutics 7(2):307-349.
- Wall M. E., Wani M. C., Cook C. E., Palmer K. H., McPhail A. T., Sim G. A. (1966). *Plant antitumor agents I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from Camptotheca acuminata*. J. of the Am. Chem. Soc. 88(16):3888-3890.
- Wang N., Wu X.S., Li C., Feng M. F. (2000). *Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers: I. Synthesis and characterization*. J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 11:301-318.
- Wang W. C., Liang H., Sun B. H., Xu J. L., Zeng Z., Zhao X. J., Li Q. (2016). *Pharmacokinetics and tissue distribution of folate-decorated human serum albumin loaded with nano-hydroxycamptothecin for tumor targeting*. J. Pharm Sci. 105: 1874-1880.

-
- Wani M. C., Taylor H. L., Wall M. E., Coggon P., McPhail A. T. (1971). *Plant antitumor agents VI. The isolation and structure of Taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia*. J. Am. Chem Soc. 93:2325-2327.
- Watanabe M., Kawano K., Toma K., Hattori Y., Maitani Y. (2008). *In vivo antitumor activity of camptothecin incorporated in liposomes formulated with an artificial lipid and human serum albumin*. J. Control Rel. 127, 231-238.
- Watanabe M., Kawano K., Yokoyama M., Opanasopit P., Okano T., Maitani Y. (2006). *Preparation of camptothecin-loaded polymeric micelles and evaluation of their incorporation and circulation stability*. Int. J. Pharm. 308:183-189.
- Xia M, Huang R, Sakamuru S, Alcorta D., Cho M. H., Lee D. H., Park D. M., Lelley M. J., Sommer J., Austin C.P. (2013). *Identification of repurposed small molecule drugs for chordoma therapy*. Cancer Biol. Ther. 14(7):638-647.
- Xiao B., Si X., Han M. K., Viennois E., Zhang M., Merlin D. (2015). *Co-delivery of camptothecin and curcumin by cationic polymeric nanoparticles for synergistic colon cancer combination chemotherapy*. J. of Mater. Chem. 3:7724-7733.
- Xue B., Kozlovskaya V., Liu F., Chen J., Williams J. F., Campos-Gomez J., Saeed M., Kharlampieva E. (2015). *Intracellular Degradable Hydrogel Cubes and Spheres for Anti-Cancer Drug Delivery*. ACS Appl. Mat. & Int. 7:13633-13644.
- Y. Zou, Tansey Q. P. Wu W., Chow D., Hung M.C., Charnsangavej C., Wallace S., Li C. (2001). *Effectiveness of water soluble poly(L-glutamic*

acid)camptothecin conjugate against resistant human lung cancer xenografted in nude mice. *Int. J. Oncol.* 18:331-336.

- Yokoyama M., Opanasopit P., Okano T., Kawano K., Maitani Y. (2004). *Polymer design and incorporation methods for polymeric micelle carrier system containing water-insoluble anti-cancer agent camptothecin.* *J. Drug Target.* 12:373-384.

- Zhan H., Jagtiani T., Liang J. F. (2017). *Enhanced anticancer activity of drug nanoparticles formulated with β -cyclodextrin.* *Honglei Anti-Cancer Drugs.* 28(3):271-280.

- Zhang L., Lu Z., Li X., Deng Y., Zhang F., Ma C., He N. (2012). *Methoxy poly(ethylene glycol) conjugated denatured bovine serum albumin micelles for effective delivery of camptothecin.* *Polym. Chem.* 3:1958-1961.

- Zhang W., Huang J., Fan N., Yu J., Liu Y., Liu S., Wang D., Li Y. (2010). *Nanomicelle with long-term circulation and enhanced stability of camptothecin based on mPEGylated α,β -poly(L-aspartic acid)-camptothecin conjugate.* *Colloids Surf. B.* 81:297-303.

- Zhang Y.-M., Cao Y., Yang Y., Chen J.-T., Liu Y. (2014). *A small-sized graphene oxide supramolecular assembly for targeted delivery of camptothecin.* *Chem. Commun.* 50:13066-13069.

- Zhou Z. X., Ma X. P., Jin E. L., Tang J. B., Sui M. H., Shen Y. Q., Van Kirk E. A., Murdoch W. J., Radosz M. (2013). *Linear-dendritic drug conjugates forming long-circulating nanorods for cancer-drug delivery.* *Biomaterials.* 34:5722-5735.

- Ziomkowska B., Kruszewski S., Siuda R., Cyrankiewicz M. (2006). *Deactivation rate of camptothecin determined by factor analysis of*

steady-state fluorescence and absorption spectra. Opt. Applicata.
36(1):137-246.

OBJETIVOS



Objetivos

De acuerdo con lo descrito a lo largo de la introducción general, se puede decir que la camptotecina es un fármaco muy potente y eficaz para inhibir la replicación del DNA, el cual es utilizado en quimioterapia para combatir diferentes tipos de tumores.

Sin embargo, su uso presenta serios inconvenientes relacionados con su baja solubilidad y escasa estabilidad en agua. Para solventar estos inconvenientes se ha recurrido tanto a su modificación química como a su combinación con nanotransportadores. Esta última estrategia permite usarla sin modificación previa.

Entre los vectores mencionados, se quiere destacar a los liposomas, que son sistemas biodegradables y biocompatibles, cuya preparación no entraña complicaciones y en los que las metodologías para introducir los fármacos están bastante bien establecidas. Estos sistemas constituyen la base de un elevado número de formulaciones destinadas a la quimioterapia que se encuentran en la fase de ensayos clínicos y de otras cuyo uso ya ha sido aprobado por la FDA.

Desarrollar un vector que permita combinar la camptotecina con los liposomas es la base de la presente tesis. No es una idea innovadora, como se ha visto en los diversos ejemplos descritos a lo largo de la introducción general. Sin embargo, se pretende aportar novedad en este campo estudiando el efecto que tiene la solubilidad del fármaco a la hora de ser cargado en formulaciones de liposomas estándar (no se pretende profundizar en el efecto de la composición y, por ello, se eligieron formulaciones ampliamente utilizadas para la formación de liposomas). Para mejorar la solubilidad del fármaco en agua se recurrirá al empleo de ciclodextrinas iónicas (carboximetil- β -ciclodextrina), cuyos complejos de inclusión con la camptotecina no se han estudiado

previamente. Por lo tanto, la presente tesis recoge un apartado para el estudio termodinámico de los complejos de inclusión camptotecina-carboximetil- β -ciclodextrina y al estudio de los cambios de solubilidad del fármaco tras la acomplejación.

Se estudiarán diversas estrategias activas y pasivas de encapsulación del fármaco en los liposomas, existente en forma libre o en forma de complejo de inclusión. En la encapsulación activa el fármaco entrará por difusión al interior de los liposomas y en la encapsulación pasiva, el fármaco estará en la disolución acuosa en contacto con los lípidos en el proceso de autoensamblaje para formar los liposomas. Se mostrarán los resultados de carga de la camptotecina en los liposomas en función de la estrategia utilizada.

En la encapsulación generada de forma pasiva, el fármaco entra en el interior de los liposomas durante el proceso de formación de los mismos, mediante reorganización de la bicapa lipídica, sin la necesidad de ningún paso posterior. Por ello, el fármaco debe de estar presente en el disolvente acuoso con el que se hidratarán los liposomas, que será agua a pH 7,4 (tampón fosfato salino) tal y como se indica en la Figura 1, o a pH 3,5 (tampón citrato) como se indica en la Figura 2.

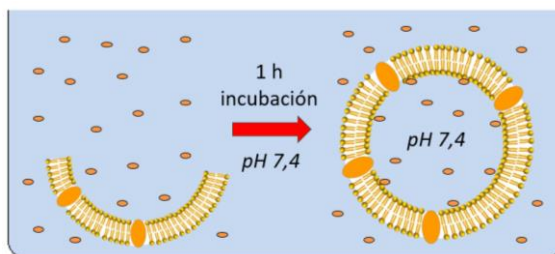


Figura 1. Encapsulación directa del fármaco en los liposomas a pH 7,4.

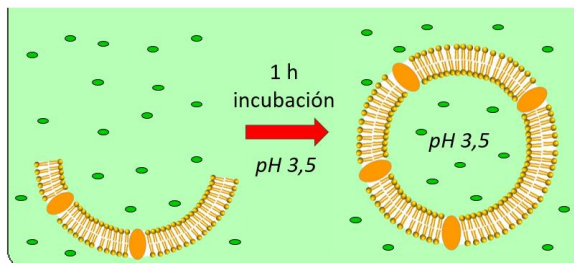


Figura 2. Encapsulación directa del fármaco en los liposomas a pH 3,5.

Por otro lado, la encapsulación activa consiste en realizar la carga del fármaco después de la formación de los liposomas, generando un gradiente de pH entre el disolvente en donde se encuentra el fármaco (pH 3,5) y el disolvente embebido dentro de los liposomas (pH 7,4), tal y como se puede observar en la Figura 3.

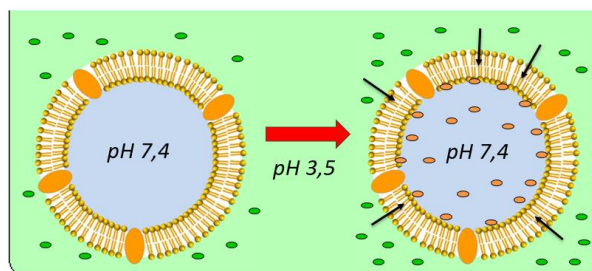


Figura 3. Encapsulación del fármaco en los liposomas a través de un gradiente de pH.

Por último, se estudiará el proceso de entrada de los liposomas dentro de las células y el efecto citotóxico de los liposomas cargados con camptotecina en diferentes líneas celulares cancerígenas, así como en una línea celular sana (fibroblastos).

La presente tesis está estructurada en introducción, objetivos, cuatro capítulos experimentales y conclusiones.

Capítulo 1. Recoge la caracterización del comportamiento de la camptotecina en agua en función del pH y el estudio de los complejos de inclusión formados por la carboximetil- β -ciclodextrina y la camptotecina, así como los estudios de solubilidad del fármaco en agua y tras acomplejarse con la ciclodextrina en función del pH.

Capítulo 2. Incluye la metodología para preparar los liposomas con y sin PEG y las caracterizaciones de estos sistemas por técnicas de dispersión de luz dinámica (DLS) y microscopía electrónica de barrido (MEB). Además, se estudiará la estabilidad de estos sistemas en el tiempo.

Capítulo 3. Engloba las diferentes metodologías activas y pasivas para cargar la camptotecina en el interior de los liposomas, así como su evaluación de la estabilidad de estas formulaciones a través del estudio de las cinéticas de liberación de la camptotecina.

Capítulo 4. Recoge los estudios biológicos (estudios de citotoxicidad de las formulaciones liposomales) y los estudios para conocer el mecanismo de entrada del fármaco en las células.

**CAPÍTULO 1. ESTUDIO
DE LA INTERACCIÓN DE
LA CAMPTOTECINA
CON CICLODEXTRINAS**

1. Introducción

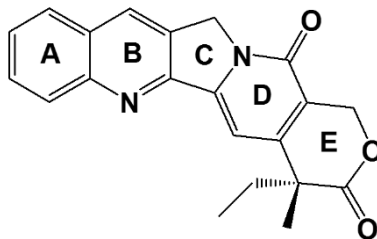
1.1. Camptotecina

La camptotecina (CAMP) o 20-(S)-camptotecina es un alcaloide vegetal con propiedades anticancerígenas procedente de la planta *Camptotheca acuminata*, que tiene a la topoisomerasa I como diana celular (Thomsen et al., 1987; Staker et al., 2002). La topoisomerasa I (TOP1) es una enzima nuclear que relaja las hebras del ADN (ácido desoxirribonucleico) para que tenga lugar el proceso de transcripción y replicación celular y su posterior religación. El efecto de la camptotecina es, por lo tanto, impedir la religación, causando apoptosis celular (Jaxel et al., 1989). Actúa cuando el ADN está en estado de escisión y las topoisomerasas están trabajando sobre él, ya que en esta etapa las células son más vulnerables al ataque de los fármacos. Los inhibidores de la topoisomerasa, como la camptotecina, se unen específicamente a los extremos generados por la topoisomerasa e impiden que se vuelvan a ligar (Pommier, 2013). Este todo proceso genera una parada del ciclo celular en fase G2.

Para el ataque a la topoisomerasa I, el único medicamento actualmente eficaz es la camptotecina y sus derivados. La camptotecina es, por ende, un fármaco muy eficaz contra esta enzima nuclear, pero presenta una deficiente selectividad, ya que esta enzima está presente en todas las células del organismo, por lo que los graves efectos secundarios de la camptotecina limitan el uso de altas dosis. Esto es debido a que todas las células del organismo requieren topoisomerasa para su replicación y las células que a mayor velocidad se dividen, son las que sufren el mayor azote del fármaco, es decir, las células de la médula ósea y las células intestinales (Vo et al., 2012).

1.1.1. Estructura química

La camptotecina (Figura 1.1) está formada por un sistema de cinco anillos planos (anillos A, B, C, D y E), que incluyen una pirrolidina (B), una porción quinoliníca (A, B), una lactama (D) y un estereocentro con configuración *S* en la alfa-hidroxlactámico (E) (Wall et al., 1966;



Nuncio et al., 2011). De los cinco anillos que forman esta molécula, los anillos A, B, C y D son necesarios para

la actividad de la molécula, pero su estructura puede ser ligeramente modificada. Sin embargo, el anillo E (lactona) no puede ser modificado,

ya que es el lugar en el que se ancla la topoisomerasa I (Rivory y Robert et al., 1995).

1.1.2. Caracterización espectroscópica del fármaco en disolución acuosa

Un comportamiento característico de este fármaco en disolución acuosa es su respuesta al pH. El fármaco se puede encontrar en una forma cerrada a un pH menor de 5,5 o una forma abierta a un pH mayor de 5,5, tal y como se esquematiza en la Figura 1.2. La forma cerrada se denomina lactona y presenta actividad antitumoral, mientras que la forma abierta se denomina carboxilato, que carece casi totalmente de esta actividad (Ziomkowska et al., 2006). Ambas formas se encuentran en un equilibrio que se puede desplazar por la modificación del pH. Al pH de la sangre (pH 7,4), la camptotecina tarda 120 minutos en convertirse en carboxilato, es decir, en abrir su anillo E y, por lo tanto, inactivarse. Se ha comprobado que en sangre sólo un 5% se encontrará en la forma

lactona, mientras que en plasma el porcentaje disminuye hasta prácticamente cero (Mi y Burke et al., 1994). A pH básico o neutro, en disolución acuosa, la vida media de la forma lactona es de 33 minutos a pH 7,2; de 22 minutos a pH 7,4 y de 5,3 minutos a pH 8,0 (Ziomkowska et al., 2006).

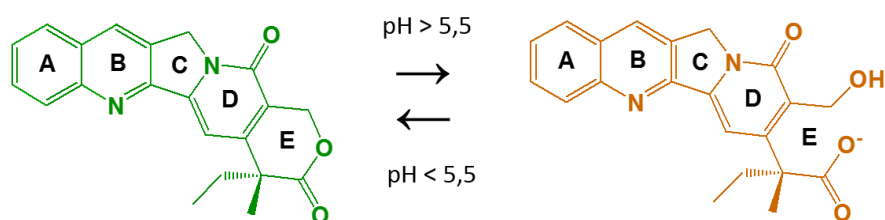


Figura 1.2. Equilibrio de la camptotecina entre su forma lactona o activa (pH < 5,5) y la forma carboxilato o inactiva (pH > 5,5).

La forma carboxilato es inactiva por la modificación del anillo E. El otro motivo está relacionado con la alta afinidad del fármaco en forma carboxilato por la seroalbúmina humana (proteína presente en gran cantidad en la sangre), produciéndose la unión a esta proteína, lo que impide que llegue a unirse a su diana celular (Ziomkowska et al., 2006).

Las dos formas de la camptotecina se pueden diferenciar por espectroscopía ultravioleta (UV)-visible. El máximo de absorción aparece a diferente longitud de onda para cada una de las formas. La forma carboxilato presenta un solo máximo de absorción a 370 nm, mientras que la forma lactona posee dos máximos, uno a 350 nm y otro a 370 nm. Además, la camptotecina es una molécula fluorescente debido a su estructura molecular formada por anillos aromáticos. La intensidad de fluorescencia de la forma carboxilato es menor que la intensidad de la forma neutra, además de que su emisión se encuentra más desplazada hacia el rojo (Chourpa et al., 1998). Estas modificaciones en la intensidad

y posición de los espectros de emisión de fluorescencia han permitido estudiar el proceso de hidrólisis o transformación entre la forma lactona y carboxilato (Ziomkowska et al., 2006).

1.1.3. Solubilidad de la camptotecina

La escasa solubilidad de la camptotecina en disolventes acuosos, su pobre estabilidad y su rápida inactivación a través de su cambio a la forma lactona a un pH fisiológico, limitan su aplicación en ensayos clínicos (Ulakan y Swaan, 2002).

La solubilidad de la camptotecina en agua es de 1,34 $\mu\text{g/mL}$ (Kang et al., 2002; Cortesi et al., 1997). Según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS, por sus siglas en inglés, Biopharmaceutics Classification System), se considera que un fármaco es poco soluble en agua si su dosis más alta no es soluble en 250 mL de un disolvente acuoso, en un rango de pH entre 1 y 7,5 (Kipp, 2004), por lo que es posible decir que la camptotecina es un fármaco poco soluble o insoluble en agua. En otros disolventes orgánicos como el metanol, dimeltilsufóxido (DMSO) y dimetilformamida, la camptotecina es más soluble llegando a disolverse a concentraciones de 40, 10 y 2 mg/mL, respectivamente. En disoluciones de NaOH 1 N la solubilidad es mucho mayor con un valor de 50 mg/mL (Lai et al., 2018).

1.2. Ciclodextrinas y los complejos de inclusión

Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos formados por moléculas de $\alpha\text{-D}(+)\text{-glucosa}$ unidas entre sí por enlaces $\alpha(1\text{-}4)$. La estructura tridimensional de esta molécula recuerda a un cono truncado y posee una cavidad interna hidrofóbica (apolar) y una superficie hidrofílica (polar) (Martín, 2004). La naturaleza hidrofóbica del anillo

interior se debe a la presencia de grupos hidroxilo secundarios, mientras que la naturaleza hidrofílica se debe a la existencia de grupos hidroxilo primarios y secundarios. La cavidad hidrofóbica tan característica de esta molécula le permite formar complejos de inclusión, por interacciones no covalentes, con una gran variedad de compuestos denominados moléculas huésped (Merisko-Liversidge et al., 2003), tanto de naturaleza orgánica como inorgánica. Estos compuestos se introducen de manera total o parcial en la citada cavidad, al tiempo que expulsan moléculas de agua de alta energía de su interior. El tamaño de la cavidad va a permitir una determinada selectividad de la molécula huésped (Martín, 2004).

Hay diferentes tipos de ciclodextrinas en función del número de glucosas que las formen, pudiendo clasificarse en: alfa-ciclodextrina (α -CD) con seis unidades, beta-ciclodextrina (β -CD) con siete unidades y gamma-ciclodextrina (γ -CD) con ocho unidades (Loftsson y Duchêne, 2007). Las ciclodextrinas con menos de seis unidades de glucosa no existen debido a la inestabilidad de su estructura, mientras que las ciclodextrinas con más de ocho unidades son muy difíciles de aislar y de estudiar, por lo que no se utilizan (Merisko-Liversidge et al., 2003; Loftsson y Duchêne, 2007).

Las propiedades de las ciclodextrinas y su arquitectura (tamaño de la cavidad) se relacionan con su grado de polimerización. De este modo, sus características cambian en función del número de unidades de glucosa, el peso molecular, el diámetro de su anillo estructural, el diámetro de la cavidad, la solubilidad en agua, la entalpía y entropía de ionización, la entalpía y entropía de solución, el punto de fusión y la constante de difusión, tal y como se recoge en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Propiedades de las principales ciclodextrinas nativas.

Propiedad	α -CD	β -CD	γ -CD
Unidades de glucosa	6	7	8
Fórmula empírica	C ₃₆ H ₆₀ O ₃₀	C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅	C ₄₈ H ₈₀ O ₄₀
Peso molecular	972,85	1134,99	1297,14
Altura del cono, Å	8	8	8
Diámetro exterior, Å	14,6	15,4	17,5
Diámetro interior, Å	5,2	6,6	8,4
pK _a (25°C)	12,33	12,20	12,08
Solubilidad en agua (25°C)	0,1211	0,163	0,168
ΔH° (ionización)	8,36	9,98	11,22
ΔS° (ionización)	-28,3	-22,4	-17,6
ΔH° (solución)	7,67	8,31	7,73
ΔS° (solución)	13,8	11,7	14,7
Punto de fusión (°C)	275	280	275
Constante de difusión (40°C)	3,443	3,224	3,000

La ciclodextrina más estudiada como modelo es la β -ciclodextrina, debido al tamaño de la cavidad y a sus características distintivas (Gould y Scott, 2005; Loftsson y Duchêne, 2007). A partir de las ciclodextrinas nativas se han realizado gran variedad de modificaciones químicas de manera controlada, en una determinada posición, o bien de manera aleatoria (Sobrinho et al., 2011) con el fin de modificar alguna de sus propiedades, conferir alguna propiedad adicional o incluso mejorar la estabilidad del complejo de inclusión (Vyas et al., 2008).

El equilibrio de inclusión de una molécula en el interior de una ciclodextrina se define como la asociación reversible entre una molécula y la ciclodextrina para formar un complejo de inclusión. Por lo tanto, el proceso de complejación o formación del complejo de inclusión

(relación CD-fármaco = 1:1) entre un fármaco y la ciclodextrina (a una determinada presión y temperatura) puede ser representado por el siguiente equilibrio.



siendo la constante de equilibrio K, representada en la siguiente ecuación (Ec 1.1).

$$K = [\text{CD-FÁRMACO}] / [\text{CD}] \cdot [\text{FÁRMACO}] \quad \text{Ec. 1.1.}$$

Existen diferentes interacciones que favorecen la formación del complejo de inclusión, las cuales se mencionan a continuación (Agrawal y Gupta, 2012): el desplazamiento de las moléculas de agua de la cavidad hidrofóbica de la ciclodextrina que conlleva a un aumento de entropía; el aumento del número de enlaces de hidrógeno formados entre la molécula huésped y la ciclodextrina, a medida que la molécula huésped se acerca; la reducción de la repulsión entre el fármaco hidrofóbico y el ambiente acuoso y, por último, un aumento en las interacciones no covalentes entre la ciclodextrina y la molécula cuando esta última está localizada en la cavidad apolar (Birhade et al., 2010; Serna et al., 2005; Usero et al., 2008; Anjana et al., 2013). Se necesita poco tiempo para lograr un equilibrio inicial, alcanzándose en pocos minutos, mientras que el equilibrio final puede tardar unas cuantas horas.

Como resultado del proceso de inclusión, las propiedades físicas, químicas y biológicas de las moléculas huésped pueden verse enormemente modificadas (Kang et al., 2002). Por ejemplo, se puede apreciar un notable aumento de la solubilidad en disolventes acuosos, una mayor estabilidad de las moléculas (fotoestabilidad, estabilidad térmica o estabilidad frente a modificaciones del pH) o incluso una mayor permeabilidad a la membrana celular (Connors, 1997).

Respecto a la disociación del complejo de inclusión, el equilibrio se puede desplazar hacia el fármaco libre por dilución (Pereva et al., 2016).

El uso de las ciclodextrinas en la industria farmacéutica está muy extendido (Davis y Brewster, 2004). Existen gran variedad de fármacos que se han combinado con las ciclodextrinas para facilitar su uso (Gould y Scott, 2005). Diferentes fármacos anticancerígenos se han logrado encapsular con ciclodextrinas, aunque estas formulaciones aún no están en curso clínico. Algunos ejemplos son: la doxorubicina con la γ -CD (Chordiya y Senthilkumaran, 2012), la curcumina con la HP- γ -CD (Arima et al., 2006), el metotrexato con la β -CD (Dhule et al., 2012), la camptotecina con la β -CD (Oommen et al., 1999) y con nanoesponjas basadas en β -CD (Swaminathan et al., 2010), el paclitaxel con la β -CD (Çirpanli et al., 2009) y con nanoesponjas basadas en β -CD (Mognetti et al., 2012), la doxorubicina con la γ -CD (Agüeros et al., 2009) y con un copolímero de β -ciclodextina (Arima et al., 2006), y el docetaxel con nanoesponjas basadas en β -CD (Liu et al., 2012).

1.2.1. Diagrama de solubilidad de fase

El estudio de dinámica de los complejos de inclusión se lleva a cabo por el método de solubilidad de fase, descrito por Higuchi y Connors (1965). Este método estudia el efecto que tiene la concentración de ciclodextrina sobre la solubilidad de la molécula, pudiéndose trazar un diagrama de solubilidad de fase como el que se muestra en la figura 1.3. El efecto de la ciclodextrina queda recogido de manera general con dos tipos de curvas o comportamientos, tipo A y tipo B. Las curvas de tipo A indican la formación de complejos de inclusión que presentan una buena solubilidad. Sin embargo, las curvas de tipo B indican la

formación de los complejos de inclusión con fármacos de limitada solubilidad (Higuchi y Connors, 1965; Challa et al., 2005).

De manera general, la β -CD da lugar a curvas de tipo B debido a su relativa poca solubilidad en agua, mientras que las ciclodextrinas modificadas químicamente suelen generar curvas del tipo A, ya que producen complejos muy solubles (Higuchi y Connors, 1965; Challa et al., 2005).

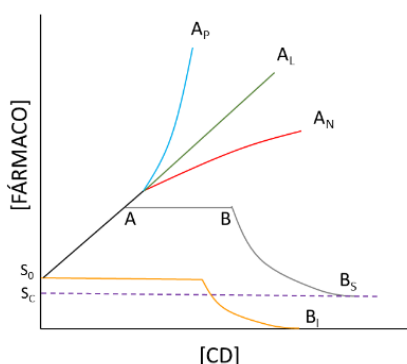


Figura 1.3. Diagrama de solubilidad de fase.

Para un complejo con estequiometría 1:1 es posible determinar la constante de asociación K , a partir de la pendiente de la curva (m) y el valor de la ordenada en el origen (S_0) mediante la Ecuación 1.2

$$K_{a:b} = \frac{m}{S_0 (1-m)} \quad \text{Ec. 1.2.}$$

1.2.2. Complejos de inclusión CD-CAMP

Se han llevado a cabo varios estudios para formar complejos de inclusión con la camptotecina y diversas ciclodextrinas: α -CD, β -CD, γ -CD, HP- β -CD, RDM- β -CD y RDM- γ -CD (Kang et al., 2002; Saetern et al., 2004; Cheng et al., 2003). Muchos de estos estudios se centran en

caracterizar el incremento en la solubilidad y determinar la constante de complejación. En algunos trabajos se ha descrito como la solubilidad en agua de la camptotecina aumentaba a medida que se incrementaba la concentración de ciclodextrina. Por ejemplo, la complejación con α -CD generó un aumento de la solubilidad de 20 veces con respecto a la solubilidad del fármaco libre. Este aumento fue de 5,70 veces empleando la β -CD y de 7,56 veces mayor utilizando la γ -CD; 32,60 veces mayor empleando la HP- β -CD; 170,48 veces empleando la RDM- β -CD y de 8,88 veces utilizando la RDM- γ -CD. Además, la RDM- β -CD formó el complejo de inclusión de mayor estabilidad con una constante de unión de $909,7 \text{ M}^{-1}$ (Kang et al., 2002). En otros estudios se ha comprobado que la estabilidad de la camptotecina mejora tras la complejación con β -CD. Este aumento de la estabilidad y solubilidad conduce a un sistema con más eficacia citotóxica en comparación con el fármaco libre en células A549 de adenocarcinoma alveolar epitelial (Zhan et al., 2017). En otro trabajo emplearon la HP- β -CD para la interacción con la camptotecina. Se observó que la solubilidad del fármaco aumentaba a medida que lo hacía la concentración de HP- β -CD y el pH, y se determinó la diferencia de comportamiento de la forma lactona y carboxilato del fármaco con relación a la complejación, observándose que la forma carboxilato era más soluble que la forma lactona, pero su constante de complejación era menor (Saetern et al., 2004).

Es importante destacar que las ciclodextrinas usadas en los estudios de complejación con camptotecina son ciclodextrinas neutras, es decir, no presentan cargas ni grupos funcionales que se puedan ionizar al variar el pH del medio.

Las ciclodextrinas positiva o negativamente cargadas tienen un papel importante cuando la molécula huésped presenta también cargas

con las que eléctricamente pueden interaccionar. Como resultado se pueden obtener constantes de estabilidad mucho mayores que para las ciclodextrinas neutras o incluso impedirse la formación del complejo de inclusión (Zia et al., 2001). Un ejemplo donde se puede observar claramente el resultado de las interacciones electrostáticas entre la ciclodextrina y la molécula huésped es el caso de la complejación del rocuronio por la (octakis[6-(3-carboxietil)tio] γ CD) (Baldo et al., 2012). Esta CD es conocida como Sugammadex y se trata de un derivado aniónico de la γ -CD que fue diseñado especialmente para formar un complejo de inclusión muy estable con el rocuronio. Este es un bloqueador neuromuscular esteroideo cargado positivamente. La constante de unión es $K = 1,8 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ y se trata de la mayor constante descrita para un complejo de inclusión con ciclodextrinas. Este complejo de inclusión ha supuesto un gran desarrollo en el área de la anestesia en clínica. En el medio biológico, el bloqueador neuromuscular, en un inicio en forma libre, se une a la ciclodextrina, formando un complejo de inclusión, por lo que pasa a ser inactivo, consiguiéndose, por tanto, revertir el efecto anestésico en muy poco tiempo (Yang y Keam, 2012; Baldo et al., 2012).

2. Objetivos

El objetivo de la investigación que se ha desarrollado y que se recoge en este capítulo es el de mejorar la solubilidad de la camptotecina en medio acuoso mediante la formación de complejos de inclusión con ciclodextrina.

La ciclodextrina objeto de estudio es la carboximetil- β -ciclodextrina, una ciclodextrina capaz de ionizarse a un pH superior a 5,5 pasando a estar cargada negativamente. Por lo tanto, se va a:

- Caracterizar el equilibrio de complejación entre la camptotecina y la carboximetil- β -ciclodextrina a diferentes valores de pH (3,5 y 7,4) y temperaturas (25, 35 y 45°).
- Determinar el efecto de la complejación con la carboximetil- β -ciclodextrina en la solubilidad de la camptotecina en disolución acuosa a diferentes valores de pH.
- Calcular las constantes de estabilidad del complejo de inclusión CMCD-CAMP a través de experimentos de solubilidad y determinar la relación estequiométrica entre la camptotecina y la CMCD.

3. Material y métodos

3.1. Materiales y equipos

Los reactivos utilizados fueron camptotecina (CAMP, Alfa Aesar, Estados Unidos), carboximetil- β -ciclodextrina (CMCD, Sigma-Aldrich, Alemania), metanol (VWR Chemicals BDH, Estados Unidos), cloroformo (VWR Chemicals BDH, Estados Unidos), dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, Alemania), ácido acético 96% v/v (Scharlau, España), filtros de jeringuilla de nylon de 0,45 μ m (Perkin Elmer, Estados Unidos), cubetas de dimensiones 1 x 1 cm (HellmaTM, Alemania). Las disoluciones tampón que se emplearon son: disolución tampón fosfato salino (PBS, pH=7,4, cuya composición es 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 8 mM de Na₂HPO₄ y 2 mM de KH₂PO₄, Sigma-Aldrich, Alemania) y disolución tampón citrato (pH 3,5, cuya composición es ácido cítrico (C₂H₈O₇) 0,1 M, NaOH 1 M (5:1) y HCl 0,1 M, Sigma-Aldrich, Alemania).

Los equipos empleados fueron un espectrofotómetro (UV-1800 Shimadzu UV Spectrophotometer, Japón) y un fluorímetro (Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer Varian, Estados Unidos) para determinar las concentraciones de camptotecina solubilizada, y un termostatazador de fluorímetro (Varian Cary Peltier Temperature Controller, Estados Unidos) para mantener estable la temperatura en el citado instrumento.

3.2. Metodología

3.2.1. Estudio de la formación de los complejos de inclusión CMCD-CAMP por fluorescencia

Los experimentos de formación de los complejos de inclusión se realizaron a dos pHs diferentes: pH 7,4 (mediante el uso de una disolución reguladora de PBS) y pH 3,5 (mediante el uso de una disolución reguladora de citrato).

Para realizar el estudio de complejación a través de la técnica de fluorimetría, en primer lugar, se preparó una disolución saturada de fármaco a los dos pHs. Para ello, se disolvieron 3 mg de camptotecina en 100 mL de la disolución tampón elegida y la disolución resultante se dejó agitando durante toda la noche a una velocidad de 150 rpm, resguardada de la luz (cubriéndola con papel de aluminio). A continuación, se filtró cada una de las disoluciones para eliminar el exceso de fármaco no solubilizado a través de un filtro de 0,45 μm . Cada disolución saturada se utilizó para preparar disoluciones de CMCD a diferentes concentraciones: 0,5 mM, 0,8 mM, 1,5 mM, 2 mM, 2,8 mM, 3,5 mM, 4 mM, 6 mM, 7,5 mM, 9 mM y 11 mM. Estas disoluciones se mantuvieron en agitación orbital durante toda la noche y, posteriormente, se caracterizó su fluorescencia en el espectrofluorímetro. Antes de medir

la fluorescencia, las muestras se termostataron durante 10 minutos a cada temperatura (25, 35 y 45°C).

Previamente a medir en el fluorímetro, se caracterizó el espectro de absorbancia de las disoluciones saturadas a los dos valores de pH, para determinar la longitud de onda del máximo de absorción, valor necesario para establecer la longitud de onda de excitación en fluorescencia.

Las condiciones experimentales para obtener los espectros de emisión de fluorescencia fueron las siguientes: longitud de onda de excitación a 358 nm, longitud de onda de emisión a 372-700 nm, apertura de ventanas (excitación y emisión) de 5 y 5, velocidad de barrido media y voltaje medio en PBS y voltaje bajo en tampón citrato.

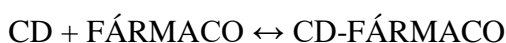
3.2.2. Determinación de las constantes de formación por fluorescencia

Los diferentes parámetros termodinámicos que caracterizan el equilibrio de complejación entre un fármaco y la ciclodextrina, la estequiometría y las constantes de formación o estabilidad del complejo de inclusión se pueden determinar experimentalmente.

Para ello, fue necesaria la aplicación de una metodología que permitiera seguir los cambios de una determinada propiedad en función de la composición de la ciclodextrina. Las espectroscopías de resonancia magnética nuclear, UV-visible, dicroísmo circular, fluorescencia, etc., son técnicas que permiten monitorizar el cambio en la propiedad.

Entre ellas, el uso de la fluorescencia presenta grandes ventajas (Park, 2006), pues es una técnica muy sensible que permite estudiar sistemas con elevadas constantes de asociación. Además, la fluorescencia de un compuesto es dependiente de la polaridad o del tipo

del medio en el que se encuentra. El interior de la cavidad de la ciclodextrina es bastante más hidrofóbico que el medio acuoso y, por tanto, tras producirse la complejación se produce un cambio drástico en la intensidad o posición de la emisión de fluorescencia para el siguiente equilibrio, por lo que la técnica de fluorescencia permite determinar esos cambios:



El cálculo de la constante de unión se puede llevar a cabo a través de un modelo de regresión no lineal (Park, 2006; Cervero y Mendicuti, 2000). En este modelo se relaciona la intensidad de fluorescencia (I) con la concentración de CD ($[\text{CD}]$), la constante de unión (K) y la estequiometría del complejo de inclusión (n) a través de la siguiente ecuación (Ec. 1.3).

$$I = I_0 + I_{\infty} \cdot K \cdot [\text{CD}]^n / 1 + K \cdot [\text{CD}]^n \quad \text{Ec. 1.3.}$$

donde I_0 es la intensidad de fluorescencia de la disolución de fármaco en ausencia de ciclodextrina e I_{∞} es la intensidad de fluorescencia esperada cuando todo el fármaco se encuentra formando un complejo de inclusión con la ciclodextrina. Por tanto, de la representación de la intensidad de fluorescencia del fármaco (a una concentración siempre constante) en función de la concentración de CD se puede calcular la constante de unión, así como la estequiometría del complejo de inclusión mediante el ajuste a la ecuación 1.5.

Los parámetros termodinámicos en condiciones estándar (1 atm) del equilibrio de complejación como la entalpía (ΔH°), entropía (ΔS°) y energía libre de Gibbs (ΔG°), se pueden calcular a partir de la constante de equilibrio de acuerdo con las siguientes expresiones (Ec 1.4, Ec. 1.5 y Ec. 1.6):

$$\Delta G^{\circ} = - RT \ln K \quad \text{Ec. 1.4.}$$

$$\left\{ \frac{\partial \ln K}{\partial (1/T)} \right\}_p = - \Delta H^{\circ}/R \quad \text{Ec. 1.5.}$$

$$\Delta S^{\circ} = (\Delta H^{\circ} - \Delta G^{\circ})/T \quad \text{Ec. 1.6.}$$

Haciendo uso de estas ecuaciones, la ΔG° se puede expresar como (Ec 1.7):

$$\ln K = - \Delta H^{\circ}/RT + \Delta S^{\circ}/R \quad \text{Ec. 1.7.}$$

Esta última ecuación se conoce como la ecuación de van't Hoff. De la representación del $\ln K$ frente al inverso de la temperatura, se puede determinar ΔH° y ΔS° .

Las principales interacciones que explican la complejación entre un fármaco y la ciclodextrina son del tipo fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas. Por otra parte, las interacciones electrostáticas, en el caso de la interacción de fármacos cargados con ciclodextrinas con carga, también pueden afectar a la estabilidad de los complejos, incluso en medios de elevada fuerza iónica.

3.2.3. Estudios de solubilidad de la camptotecina en presencia de la CMCD y determinación de las constantes de estabilidad de los complejos de inclusión

La solubilidad de la camptotecina ha sido previamente estudiada en diferentes disolventes.

La Tabla 1.2 recoge los valores de solubilidad de la camptotecina en distintos disolventes expresados en mg de camptotecina por mL de disolución.

Tabla 1.2. Solubilidad de la camptotecina en diferentes disolventes a 25°C.

Disolvente	Solubilidad (mg/mL)
H₂O_a	0,05
Dimetil formamida	2
Cloroformo:metanol	5
DMSO	10
MeOH	40
NaOH 1 N	50
Ácido acético	50

El protocolo para estudiar la solubilidad en los diferentes disolventes orgánicos fue el mismo para el metanol, el ácido acético y el DMSO, aunque el procedimiento se va a explicar más detalladamente para el caso en que se hace uso del metanol. Se disolvieron diferentes cantidades de camptotecina (0,15, 0,3, 0,5 mg y 5 mg) en 200 µL de metanol a temperatura ambiente, trabajando siempre por debajo de la solubilidad máxima de la camptotecina en metanol (40 mg/mL). Una vez preparadas las disoluciones, se añadieron a 3 mL de una disolución de CMCD (14 mM) a pH 3,5 (tampón citrato) y 7,4 (tampón fosfato). La disolución de CMCD se mantuvo en agitación magnética y sobre ella se adicionó mediante goteo la disolución de fármaco en metanol. La disolución resultante se agitó resguardada de la luz mediante agitación orbital a temperatura ambiente durante toda la noche. Posteriormente, la muestra se filtró con un filtro de jeringa de 0,45 µm. A continuación, se midió su espectro de absorbancia entre 200 y 500 nm. Con el valor de absorbancia en el máximo de absorción (370 nm) y el coeficiente de extinción molar para la camptotecina en cada disolvente se pudo determinar la concentración de fármaco en disolución haciendo uso de la ley de Lambert-Beer (Ec. 1.8).

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad \text{Ec. 1.8.}$$

donde A es la absorbancia, ϵ es el coeficiente de extinción molar, c la concentración de la muestra y l la longitud de la cubeta.

Los coeficientes de extinción molar son diferentes según sea el pH del medio. A pH ácido, el coeficiente de extinción molar es de $22.240 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, mientras que para la forma carboxilato es de $27.530 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Nuncio et al., 2011).

Este mismo protocolo se repitió para todos los disolventes orgánicos estudiados: metanol, ácido acético y DMSO.

Para llevar a cabo el estudio de solubilidad de la camptotecina en función de la concentración de ciclodextrina, se prepararon 3 mL de disoluciones de CMCD con concentraciones de 2, 5, 8, 10, 14 y 16 mM. En cada una de las disoluciones de CMCD se adicionaron 5 mg de camptotecina para lograr condiciones de saturación. Como referencia, se preparó una disolución saturada de camptotecina en ausencia de CMCD. Este procedimiento se realizó a pH 7,4 y a pH 3,5, para determinar la influencia del pH en la solubilidad del fármaco y poder conocer las constantes de estabilidad a dos valores de pH diferentes (por encima y por debajo del pH al cual el fármaco se ioniza). Una vez preparadas las disoluciones, se mantuvieron en agitación a 25°C durante 24 horas. A continuación, las muestras se filtraron a través de un filtro de $0,45 \mu\text{m}$ para eliminar el fármaco no disuelto y se caracterizaron en un espectrofotómetro, determinándose el valor de absorbancia a 358 nm.

4. Resultados y discusión

La ciclodextrina con la que se llevó a cabo el estudio termodinámico de la interacción con camptotecina es la carboximetil- β -ciclodextrina (Figura 1.4). Es de origen comercial y de acuerdo con el proveedor presenta tres grupos carboximetil. Es una ciclodextrina que

puede ionizarse en función del pH, siendo el pKa de los grupos carboxílicos de 3,9 (Uekama et al., 1993). Además, presenta una solubilidad en agua de 50 mg/mL a 25°C, mayor que la β -ciclodextrina neutra convencional (18,5 mg/mL) (Hanna et al., 2004; Saokham et al., 2018). Es importante mencionar que su interacción con la camptotecina no ha sido previamente caracterizada.

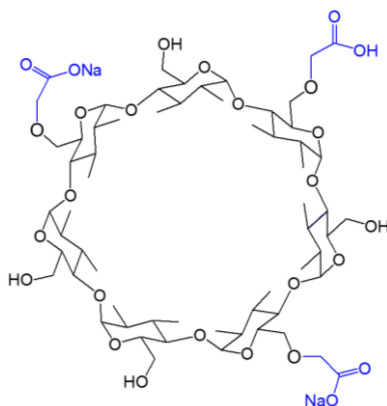


Figura 1.4. Forma de la CMCD más abundante en la muestra.

4.1. Estudio de la formación de complejos de inclusión camptotecina-CMCD por medidas de fluorescencia

Se prepararon disoluciones de camptotecina y CMCD de tal manera que la concentración de CAMP fue constante en todas ellas y se varió la concentración de ciclodextrina en el intervalo de 0 a 11 mM. Las disoluciones se prepararon a dos pHs diferentes: 7,4 (mediante el empleo de una disolución reguladora de fosfato, PBS) y 3,5 (mediante el empleo de una disolución reguladora de citrato).

Antes de caracterizar la fluorescencia de estas disoluciones fue necesario conocer dónde se encontraba la absorción de la camptotecina en función del pH, al igual que su emisión de fluorescencia. Para ello, se prepararon disoluciones saturadas del fármaco a los dos valores de pH.

Se eligieron valores muy diferentes de pH, ya que así, a pH 3,5 la camptotecina se encontraría en su forma cerrada o lactona, mientras que a pH 7,4 se encontraría en su forma abierta o carboxilato. Los espectros de absorción UV-visible se muestran en la Figura 1.5. A pH 7,4, el espectro de absorción se caracteriza por mostrar una banda con máximo de absorción situado a 370 nm. Sin embargo, a pH 3,5 el espectro se caracteriza por una banda que presenta dos máximos de absorción, uno a 350 nm y otro a 370 nm. Esta diferencia en los espectros de absorción está de acuerdo con la que se describe en literatura para cada uno de los tautómeros (Ziomkowska et al., 2006). Por lo tanto, los espectros de absorción informan del estado de ionización del fármaco.

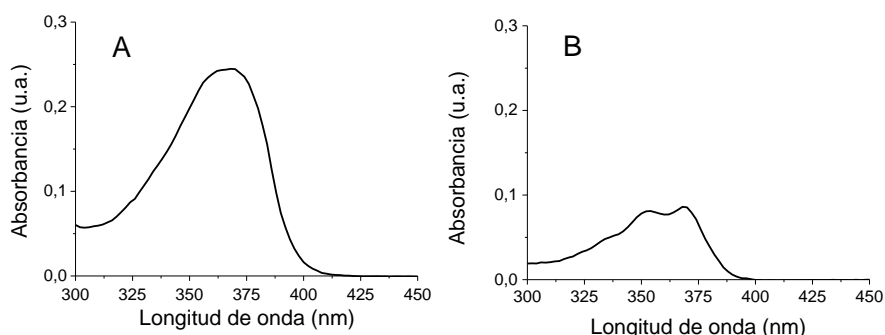


Figura 1.5. Espectros de absorción de la camptotecina en una disolución acuosa saturada a pH 7,4 (A) y a pH 3,5 (B).

A continuación, se caracterizó la fluorescencia de las disoluciones anteriormente descritas. Se eligió el valor de 358 nm como la longitud de onda de excitación, ya que así se podría caracterizar el espectro de emisión completo. Los espectros de emisión de fluorescencia de la camptotecina en sus disoluciones acuosas saturadas a pH 3,5 y 7,4 se muestran en la Figura 1.6. A pH 7,4, la forma carboxilato presenta una banda entre 360 y 650 nm cuyo máximo está situado a 450 nm. A pH

3,5, la emisión de la forma cerrada se encuentra desplazada hacia el ultravioleta con su máximo de emisión a 433 nm. Por tanto, la fluorescencia es sensible a la forma existente en función del pH del medio, lo cual está de acuerdo con la literatura (Ziomkowska et al., 2006).

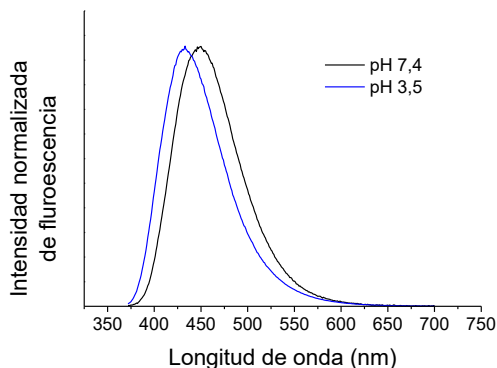


Figura 1.6. Espectro de fluorescencia de las disoluciones saturadas de camptotecina a pH 3,5 (línea azul) y 7,4 (línea negra) a 25°C.

4.1.1. Constantes de inclusión del complejo CMCD-CAMP a pH 7,4

En este apartado se determinó la constante de unión de la camptotecina con la CMCD cuando el pH de la disolución es 7,4.

Para ello, se caracterizó la fluorescencia de las disoluciones de camptotecina a concentración constante, que contenían diferentes concentraciones de CMCD a 25°C. La fluorescencia de la camptotecina disminuyó ligeramente a medida que aumentó la concentración de CMCD. En la Figura 1.7 se muestran los espectros de emisión para las diferentes concentraciones de CMCD. La disminución en la intensidad de fluorescencia al aumentar la concentración de CMCD fue poco significativa, ya que la fluorescencia disminuyó de aproximadamente

26,3 en ausencia de ciclodextrina a 25,6 para la concentración de 11 mM de CMCD.

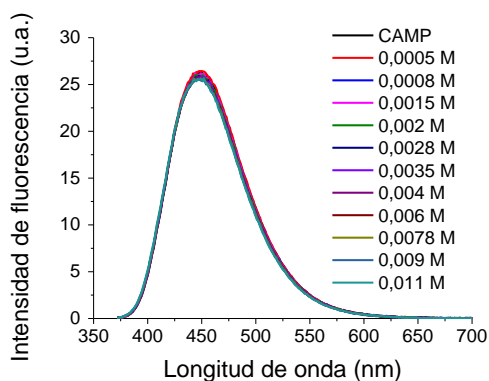


Figura 1.7. Espectros de emisión de fluorescencia de los complejos de inclusión CMCD-CAMP a diferentes concentraciones de CMCD a 25°C en pH 7,4.

Los valores de intensidad en el máximo de emisión se representaron en función de la concentración de la CMCD y se muestran en la Figura 1.8.

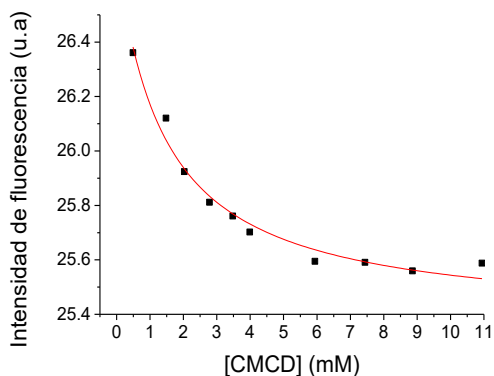


Figura 1.8. Valores de la intensidad de fluorescencia de las disoluciones de la camptotecina a pH 7,4 en función de la concentración de CMCD a 25°C.

Los valores de intensidad de fluorescencia versus concentración de CMCD se ajustaron a la ecuación 1.3 para obtener la constante del equilibrio de complejación a 25°C. La constante obtenida fue $K = 70 \pm 19 \text{ M}^{-1}$. Es una constante bastante pequeña que indica que el equilibrio de formación del complejo de inclusión se encuentra desplazado hacia el fármaco y la ciclodextrina libres en disolución.

Un posible razonamiento que explica el valor tan pequeño de la constante de estabilidad es el siguiente: a pH 7,4 tanto la camptotecina (existente en la forma abierta, carboxilato) como la CMCD se encuentran cargados negativamente. El pKa de los grupos carboxílicos de la CMCD es del valor de 3,9 (Uekama et al., 1993), por lo que la repulsión electrostática entre las cargas negativas de ambas moléculas podría dificultar la formación de un complejo de inclusión estable (Zia et al., 2001).

4.1.2. Constantes de inclusión del complejo CMCD-CAMP a pH 3,5

A continuación, se estudió la estabilidad de los complejos de inclusión a pH 3,5. Para ello, de manera análoga al apartado anterior, se caracterizó la fluorescencia de las disoluciones de camptotecina (concentración constante) que contienen diferentes concentraciones de CMCD a diferentes temperaturas: 25, 35 y 45°C. De igual manera a lo que sucede a pH 7,4, la fluorescencia disminuye a medida que aumenta la concentración de CMCD. Sin embargo, a pH 3,5 la disminución es más significativa. En la Figura 1.9 se muestran los espectros de emisión para las diferentes concentraciones de CMCD a 25, 35 y 45°C. La disminución en la intensidad de fluorescencia al aumentar la concentración de CMCD ocurre para las tres temperaturas estudiadas.

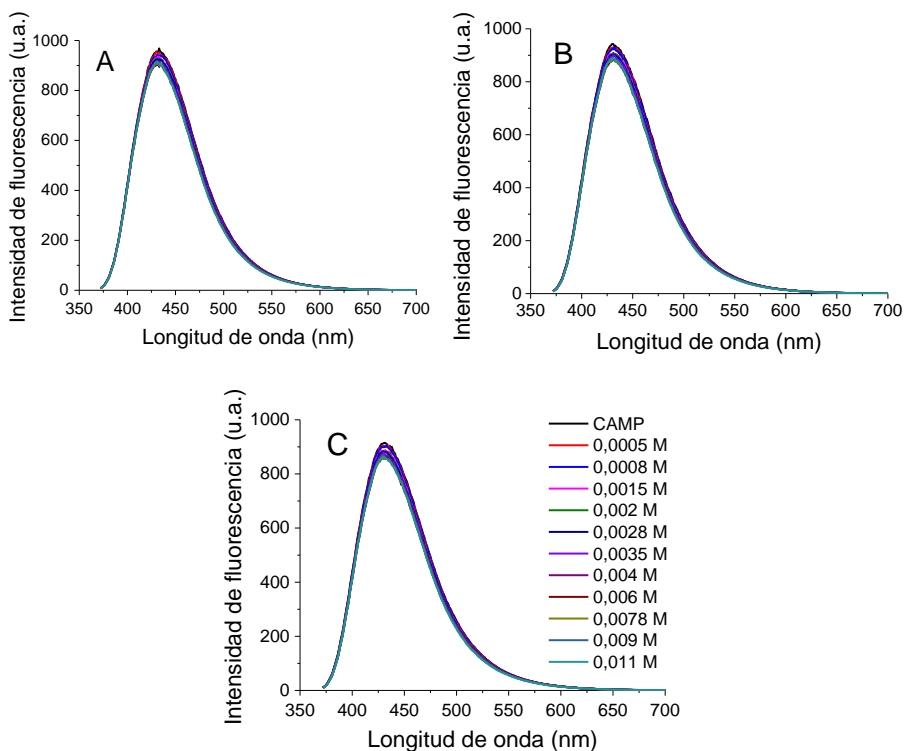
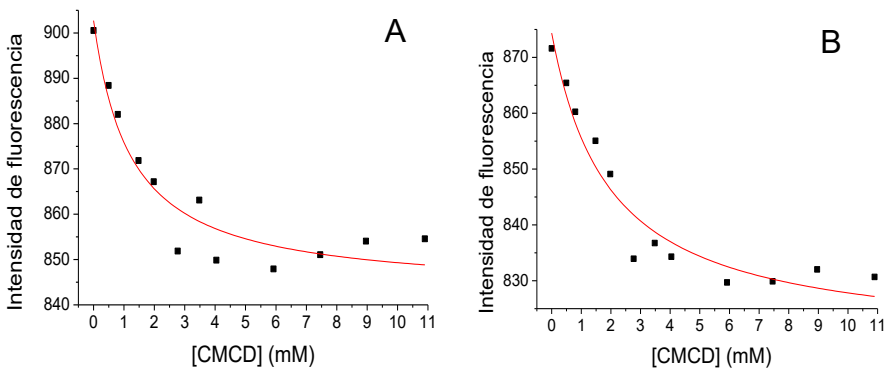


Figura 1.9. Espectros de emisión de fluorescencia de los complejos de inclusión CMCD-CAMP a diferentes concentraciones de CMCD a 25°C (A), 35°C (B) y 45°C (C) en pH 3,5.

Los valores en el máximo de emisión se representaron en función de la concentración de CMCD y se muestran en la Figura 1.10.



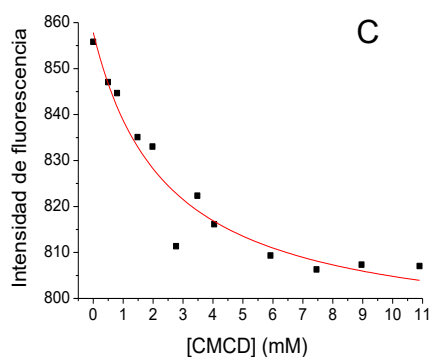


Figura 1.10. Valores de la intensidad de fluorescencia de las disoluciones de camptotecina a pH 3,5 en función de la concentración de CMCD a 25°C (A), 35°C (B) y 45°C (C).

Los valores de intensidad de fluorescencia versus concentración de CMCD se ajustaron a la ecuación 1.3 para obtener las constantes del equilibrio de complejación. Los valores de las constantes de estabilidad del complejo formado para las diferentes temperaturas estudiadas junto con el error del ajuste y los valores de la energía libre de Gibbs se recogen en la Tabla 1.3.

Tabla 1.3. Constantes de estabilidad, errores del ajuste y energía libre de Gibbs para el complejo de inclusión CMCD-CAMP a pH 3,5 a las diferentes temperaturas.

T (°C)	K (M ⁻¹)	ΔG° (J/mol)
25	703 ± 264	-16241
35	510 ± 171	-15964
45	407 ± 173	-15886

Como puede observarse en la Tabla 1.3, a pH 3,5 las constantes de estabilidad son altas, lo que indica que a diferencia de a pH 7,4 se formó un complejo de inclusión estable entre la camptotecina y la CMCD. Esto puede deberse a que a pH 3,5, la camptotecina (existente

en su forma neutra, lactona) y la CMCD ya no están cargadas negativamente, ya que el pKa de los ácidos carboxílicos es del valor de 3,9, por lo que no existe repulsión electrostática que impida la complejación. La constante de inclusión disminuye a medida que aumenta la temperatura. Esto se debe a que a mayor temperatura se debilitan los enlaces de hidrógeno y las fuerzas de van der Waals existentes entre la CMCD y la camptotecina a causa de las vibraciones moleculares (Terekhova et al., 2017; Ameen et al., 2019).

A partir de los valores de las constantes de equilibrio obtenidos a las diferentes temperaturas se pueden obtener: ΔH° , ΔS° y ΔG° para el equilibrio de complejación.

La Figura 1.11 muestra la variación lineal del LnK con el inverso de la temperatura. Del ajuste lineal (ecuación de van't Hoff, Ec. 1.7) se obtiene la ΔH° y la ΔS° , ya que la pendiente es igual a $-\Delta H^\circ/R$ y la ordenada en el origen es igual a $\Delta S^\circ/R$. La pendiente y la ordenada tienen los siguientes valores: 2624 K y -2,25, respectivamente. Por consiguiente, $\Delta H^\circ = -21,8 \text{ KJ mol}^{-1}$ y $\Delta S^\circ = -18,7 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$.

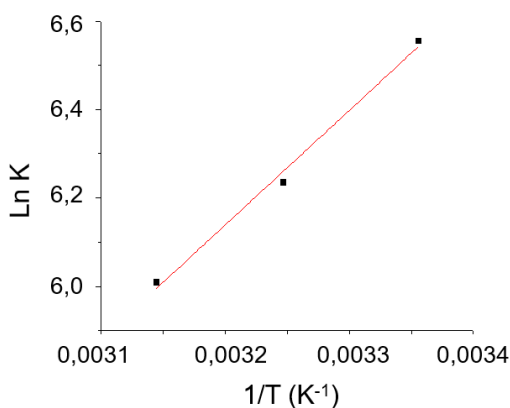


Figura 1.11. Variación del LnK con el inverso de la temperatura y su ajuste lineal.

La variación de entalpía tiene signo negativo, indicando que el proceso de complejación se encuentra entálpicamente favorecido por las interacciones de van der Waals y/o puentes de hidrógeno que se establecen entre el fármaco y la ciclodextrina. Del mismo modo, el signo de la variación de entropía que se observa tras la complejación es negativo. Esta variación es el resultado del balance entre el aumento de entropía debido a la pérdida de moléculas de agua que se encuentran rodeando al fármaco y las localizadas en el interior de la ciclodextrina y la disminución de entropía debido a la pérdida de grados de libertad del fármaco cuando se ocluye en el interior de la ciclodextrina (Cervero y Mendicuti, 2000; Marcelo et al., 2008).

A pH 3,5, los valores de las constantes del equilibrio de complejación entre la camptotecina y la CMCD son más altos que los valores de constantes descritos en la literatura para la complejación de la camptotecina con ciclodextrinas neutras (Kang et al., 2002; Saetern et al., 2004). Por ejemplo, Kang et al. (2002), describen para la β -CD una constante de unión de 266 M^{-1} . Del mismo modo que ocurre en este trabajo, Saetern et al. (2004) observaron que la constante de inclusión disminuye a medida que aumenta el pH, de modo que obtienen valores de constantes de unión de 245 M^{-1} a pH 5,5 y de 184 M^{-1} a pH 7,0. Sin embargo, a pH 7,4 la constante de unión alcanza valores mucho más pequeños ($K=70\pm 19 \text{ M}^{-1}$ a 25°C) que los observados por Saetern et al. (2004) debido posiblemente a la repulsión electrostática entre la ciclodextrina y el fármaco que se encuentran ambos cargados negativamente a pH 7,4.

4.2. Estudios de solubilidad de la camptotecina en presencia de la CMCD

A lo largo de esta sección se van a mostrar los resultados de diferentes estudios en los que se aborda el efecto que tienen diferentes factores en la solubilidad de la camptotecina en agua.

Primero se presentarán los resultados del efecto que tiene disolver la camptotecina en disolventes orgánicos antes de mezclarla con una disolución acuosa con ciclodextrina. En el último apartado se analizará el efecto de la concentración de CMCD en la solubilidad de la camptotecina a diferentes valores de pH con el fin de obtener las constantes de unión CMCD-CAMP.

4.2.1. Efecto de los disolventes en la solubilidad de la camptotecina en disoluciones acuosas de CMCD

A continuación, se van a mostrar los resultados de la influencia de:

- 1) el disolvente orgánico.
- 2) la concentración de camptotecina en el disolvente orgánico.
- 3) el efecto del pH de la disolución acuosa en la solubilidad de la camptotecina en disoluciones acuosas de CMCD.

1) Se estudió el efecto que tiene disolver previamente la camptotecina en un disolvente orgánico para la solubilidad final de la camptotecina en disoluciones acuosas de CMCD empleando tampón citrato a pH 3,5. Los disolventes orgánicos que se consideraron para el estudio fueron: ácido acético, metanol y DMSO. Se disolvió la camptotecina en el disolvente orgánico elegido y se adicionó esa disolución a una disolución 14 mM de CMCD a pH 3,5, y se realizó una disolución saturada del fármaco sin adicionar ningún disolvente, para

establecer la comparación. El aumento de solubilidad de la camptotecina tras interactuar con la CMCD se corroboró a través de la caracterización de los espectros de absorbancia en el UV-vis, de forma que la absorbancia era proporcional a la concentración. Se obtuvo la mayor absorbancia cuando la camptotecina fue inicialmente disuelta en metanol, tal y como se observa en la Figura 1.12.

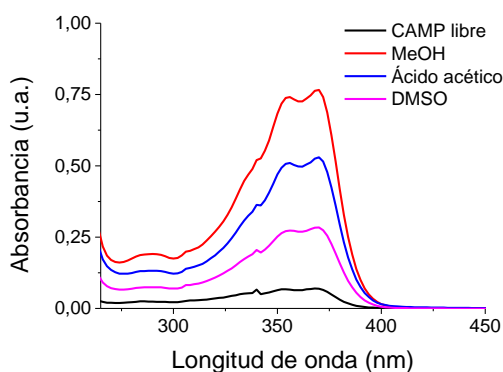


Figura 1.12. Espectros de absorbancia de las disoluciones de CMCD-CAMP preparadas a partir de disoluciones iniciales de CAMP en MeOH, ácido acético y DMSO. También se muestra el espectro de absorbancia de una disolución saturada de CAMP en agua a pH 3,5.

Cuando se empleó el metanol, el aumento de absorbancia con respecto a la disolución saturada de fármaco libre ($3,0 \cdot 10^{-6}$ M) fue de 10,9 veces. Disolviendo inicialmente el fármaco en ácido acético se incrementó la solubilidad en 7,1 veces, mientras que en DMSO el aumento fue de 3,2 veces. Los resultados se recogen en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4. Efecto del disolvente en la solubilidad de la camptotecina a pH 3,5.

	A_{370} muestra	$[CAMP]_{muestra}$ (M)	Δ solubilidad (veces)
Metanol	0,729	$3,27 \cdot 10^{-5}$	10,9
Ácido acético	0,475	$2,13 \cdot 10^{-5}$	7,1
DMSO	0,213	$9,57 \cdot 10^{-6}$	3,2

Se puede concluir que el metanol es el mejor disolvente para realizar disoluciones con una mayor concentración de CAMP-CMCD. Cabe destacar que el porcentaje en volumen de metanol en la disolución acuosa final es relativamente bajo (6%).

Teniendo en cuenta este resultado, en los siguientes estudios se utilizó el metanol para solubilizar inicialmente la camptotecina.

2) Se estudió cómo afecta la concentración inicial de la disolución de CAMP en MeOH en la solubilidad final en presencia de la CMCD. Para ello, se disolvieron en metanol diferentes cantidades de fármaco: 0,15, 0,3, 0,5, 5 y 10 mg. Después, estas disoluciones se adicionaron a una disolución de CMCD (14mM) a pH = 3,5. Los espectros de absorbancia de cada disolución se muestran en la Figura 1.13.

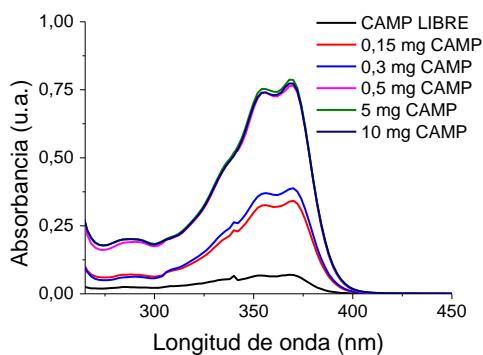


Figura 1.13. Espectros de absorbancia para las disoluciones de CMCD-CAMP preparadas a partir de diferentes cantidades iniciales de CAMP en MeOH.

Con las absorbancias obtenidas a 370 nm, se calculó la concentración de fármaco disuelto en cada uno de los experimentos, y los valores se recogen en la Tabla 1.5.

Tabla 1.5. Valores de absorbancia a 370 nm, concentración de camptotecina e incremento de solubilidad para las diferentes cantidades de fármaco empleadas.

m fármaco (mg)	A_{370nm}	[CAMP]_{dis} (M)	Δ solubilidad (veces)
0,15	0,342	$1,54 \cdot 10^{-5}$	5,1
0,3	0,388	$1,74 \cdot 10^{-5}$	5,8
0,5	0,766	$3,44 \cdot 10^{-5}$	11,4
5	0,786	$3,53 \cdot 10^{-5}$	11,7
10	0,773	$3,47 \cdot 10^{-5}$	11,5

Los resultados indican que la concentración de CAMP en las disoluciones de CMCD-CAMP aumenta a medida que se incrementa la concentración de fármaco inicial disuelto en metanol, hasta llegar a una concentración en donde la solubilidad no aumenta más. Esto se comprueba porque la absorbancia es constante. Para cantidades superiores a 0,5 mg de fármaco en metanol se alcanzó la máxima solubilidad final en las disoluciones de CMCD-CAMP. Por tanto, la concentración máxima de CAMP que se puede llegar a disolver tras interaccionar con la CMCD (14 mM) a pH 3,5 es de $3,5 \cdot 10^{-5}$ M. Esta concentración es del orden de 11 veces superior a la concentración de CAMP en una disolución acuosa saturada a pH 3,5.

3) El pH de la disolución acuosa también afectó a la solubilidad de la camptotecina en una disolución con CMCD. En este estudio, se utilizó el disolvente y la cantidad de camptotecina que se determinó con los dos experimentos anteriores: una masa de 0,5 mg de camptotecina en 200 μ L de metanol. Sin embargo, la disolución de la CMCD se preparó utilizando disolventes con valores de pH de 3,5 y 7.4. Se incluyó en este estudio el resultado de solubilidad determinado en el punto anterior cuando el pH era 3,5. Los espectros de absorbancia de cada disolución se muestran en la Figura 1.14.

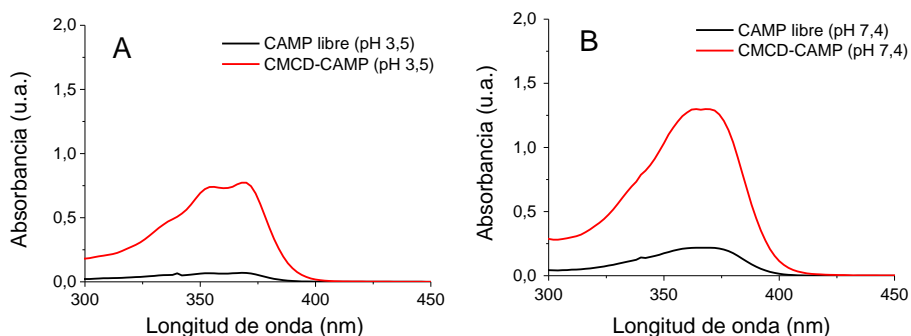


Figura 1.14. Espectros de absorbancia para las disoluciones de CMCD-CAMP a diferentes valores de pH: 3,5 (A) y 7,4 (B). También se muestra el espectro de absorbancia de la disolución acuosa saturada de camptotecina en cada pH de estudio.

Una vez obtenidos los espectros de absorbancia para cada una de las disoluciones, se calcularon las concentraciones de camptotecina en cada disolución. Los resultados se recogen en la Tabla 1.6.

Tabla 1.6. Valores de absorbancia a 370 nm para la camptotecina en las diferentes disoluciones saturadas y para las disoluciones acuosas tras interactuar con la CMCD (14 mM) (a diferentes valores de pH) y los valores de incremento de solubilidad.

	A_{370} dis. saturada	$[CAMP]_{dis}$ saturada (M)	A_{370} muestra	$[CAMP]_{dis}$ (M)	Δ solubilidad (veces)
pH 3,5	0,067	$3,0 \cdot 10^{-6}$	0,729	$3,3 \cdot 10^{-5}$	10,9
pH 7,4	0,213	$7,7 \cdot 10^{-6}$	1,302	$4,6 \cdot 10^{-5}$	6,0

Estos resultados indican que la camptotecina, tras interactuar con la CMCD a pH 3,5 muestra un incremento de solubilidad de 10,9 veces respecto a la solubilidad del fármaco en la disolución saturada, mientras que el complejo de inclusión formado a pH 7,4 conduce a un aumento de solubilidad del fármaco de 6 veces. Se puede, por tanto, concluir, que la formación del complejo a pH 3,5 conduce al mayor

incremento en la solubilidad de la camptotecina con respecto a la disolución saturada de fármaco.

Sin embargo, si se atiende a las concentraciones es importante puntualizar que la concentración de camptotecina en la disolución saturada de pH 7,4 ($7,74 \cdot 10^{-6}$ M) es mayor que la concentración en la disolución saturada a pH 3,4 ($3,01 \cdot 10^{-6}$ M). Por tanto, las disoluciones de la camptotecina con CMCD a pH 7,4 conducen a una mayor concentración de camptotecina disuelta. Los resultados de concentración de la CAMP en la disolución saturada y tras interaccionar con la ciclodextrina a los dos valores de pH se muestran gráficamente en la Figura 1.15.

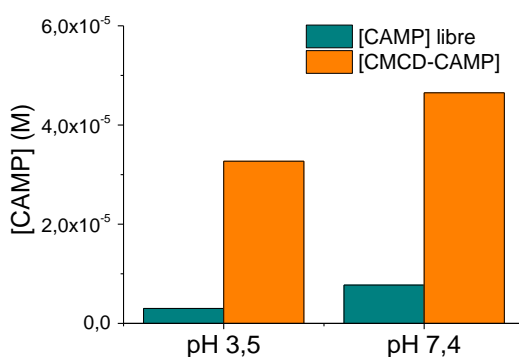


Figura 1.15. Concentración de la CAMP en presencia de la CMCD en disolución acuosa con diferentes valores de pH y en sus correspondientes disoluciones saturadas.

4.2.2. Diagramas de solubilidad de fase para el complejo de inclusión CMCD-CAMP

El siguiente paso propuesto fue determinar las constantes de solubilidad de los complejos de inclusión formados a 25°C, además de conocer el efecto en la solubilidad de la camptotecina a medida que se

incrementó la concentración de CMCD y se mantenía constante la concentración de fármaco. Por último, se determinó la relación entre el fármaco y la CMCD. Para ello, se prepararon disoluciones de CMCD en concentraciones de entre 2 y 16 mM a dos valores de pH diferentes (3,5 y 7,4), manteniendo constante la concentración de fármaco (mediante el uso de disoluciones saturadas). Una vez preparadas, se dejaron agitando toda la noche, se filtraron y se caracterizó su espectro de absorbancia.

A partir de los valores de absorbancia en el máximo del espectro se calculó la concentración del fármaco disuelto. Esta concentración de fármaco en función de la concentración de CMCD se muestra en la Figura 1.16, para los dos valores de pH. A ambos valores de pH se aprecia un aumento lineal de la solubilidad de la camptotecina a medida que se aumenta la concentración de CMCD, clasificándose estas curvas como del tipo A_L de Higuchi y Connors (Higuchi y Connors, 1965), que indican una relación CMCD-CAMP de 1:1.

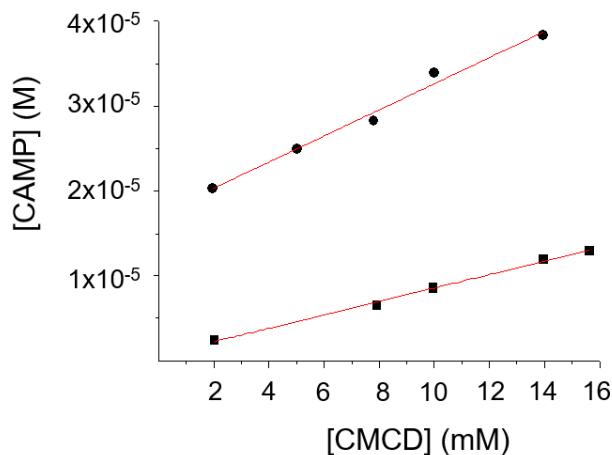


Figura 1.16. Curva de solubilidad de fase del complejo de inclusión CMCD-CAMP a pH 3,5 (cuadrados) y a pH 7,4 (círculos) a 25°C.

A través de la pendiente (m) y del valor de la ordenada en el origen (S_0) que se recogen en la Tabla 1.7, se pueden determinar, haciendo uso de la Ecuación 1.2, los valores de las constantes de estabilidad para el complejo de inclusión a pH 3,5 y a pH 7,4. Para calcular los resultados de la constante de estabilidad del complejo a pH 3,5 se usó el valor de solubilidad de la camptotecina en agua determinado en los apartados anteriores ($S_0=3,0 \cdot 10^{-6}$ M) en lugar del valor en la ordenada, ya que éste presentaba un gran error. Las constantes de solubilidad son de 88 y 514 M^{-1} para los pHs 7,4 y 3,5, respectivamente. Son del mismo orden que los determinados por fluorescencia, por lo que muestran la formación de un complejo estable a pH 3,5, mientras que a pH 7,4 el equilibrio está desplazado hacia la existencia del fármaco en su forma libre.

Tabla 1.7. Constantes de estabilidad, valores de la ordenada en el origen, pendiente y coeficiente de regresión lineal en los diferentes valores de pH.

pH	m	R²	S₀ (M)	K_{sol} (M⁻¹)
7,4	$1,54 \cdot 10^{-3}$	0,98	$1,70 \cdot 10^{-5}$	88
3,5	$7,9 \cdot 10^{-4}$	0,99	$6,60 \cdot 10^{-7}$	514

El valor de la constante de estabilidad del complejo a pH 3,4 es, de manera general, bastante alto en relación con los valores descritos en la literatura caracterizados a través de medidas de solubilidad. En uno de estos trabajos, Fatmi et al. (2015), determinaron la constante de estabilidad de la CAMP con varias ciclodextrinas nativas por medidas de solubilidad, obteniendo el valor de 56,9 M^{-1} para α -CD, de 146 M^{-1} para la β -CD y de 62,2 M^{-1} para la γ -CD. Con ciclodextrinas modificadas como la HP- β -CD la constante de estabilidad fue de 243 M^{-1} y con la SBE- β -CD (sulfobutiléter- β -ciclodextrina) fue de 283 M^{-1} . Valores similares a los obtenidos en esta tesis se han descrito empleando la PB-

β -CD (permetil- β -ciclodextrina) con constantes de estabilidad de 579 M^{-1} . En otro estudio realizado por Huarte et al. (2016), se obtuvieron similares valores de la constante de estabilidad y siempre más pequeños al que en esta tesis se describe: 273 M^{-1} para la β -CD, 130 M^{-1} para la HP- β -CD, 96 M^{-1} para la sulfopropil- β -ciclodextrina (SP- β -CD) y 453 M^{-1} para la M- β -CD.

El rango de valores de las constantes de estabilidad obtenido forma parte de lo que se define por Khan et al. (2011) como los valores más adecuados para la mejora de la solubilidad y estabilidad de fármacos poco solubles, que está en un rango de entre 50 y 5000 M^{-1} (Khan et al., 2011). Por lo tanto, los valores obtenidos son correctos para la formación de un complejo de inclusión que nunca está estático, sino que se mantiene en constante equilibrio entre formación y rotura de los enlaces, por lo que nunca es posible una constante muy alta, ya que las uniones son iónicas y jamás covalentes.

5. Conclusiones

En este capítulo se estudió el equilibrio de complejación entre la camptotecina y la CMCD a pH 7,4 y 3,5 por dos metodologías diferentes: espectroscopía de fluorescencia y caracterizaciones de solubilidad. Como conclusiones más destacables se pueden extraer las siguientes.

- Las constantes de complejación han ido disminuyendo a medida que aumentaba la temperatura, es decir, la constante era mayor cuanto menor era la temperatura. Esto es debido a las vibraciones moleculares generadas por las altas temperaturas, que dificultan la entrada de los fármacos en el interior de la molécula huésped y disminuyen la estabilidad del complejo de inclusión. Por fluorescencia, se caracterizó la constante de unión a pH 7,4 a 25°C , siendo el valor de $70 \pm 19 \text{ M}^{-1}$. Esta

constante indica que el equilibrio está desplazado hacia el fármaco en su forma libre. A pH 3,4, la situación fue la contraria, se formaron complejos estables con constantes elevadas entre 25 y 45°C. Por ejemplo, a 25°C, la constante fue de $703 \pm 264 \text{ M}^{-1}$.

- En los estudios de solubilidad se ha encontrado que la ciclodextrina tiene un efecto positivo, ya que mejora la solubilidad de la camptotecina. El aumento de solubilidad fue de 10,9 veces y de 6 veces a pH 3,5 y 7,4, respectivamente, cuando la ciclodextrina se encontraba disuelta en una concentración de 14 mM.

- El procedimiento más eficaz para formar el complejo de inclusión CMCD-CAMP fue solubilizar 0,5 mg de camptotecina en 200 μL de metanol y añadirlos a 3 mL de la disolución de PBS a pH 7,4.

- Las constantes de unión determinadas por medidas de solubilidad fueron de 88 y 514 M^{-1} para los experimentos realizados a pH 7,4 y pH 3,5, respectivamente. Estos valores estuvieron en concordancia con los obtenidos mediante fluorimetría.

- La relación estequiométrica entre CAMP y CMCD fue de 1:1, según las curvas de Higuchi y Connors.

6. Bibliografía

- Agrawal R., Gupta V. (2012). *Cyclodextrins - A Review on Pharmaceutical Application for Drug Delivery*. Intern. J. of Pharmac. Front. Research. 2(1):95-112.
- Agüeros M., Ruiz-Gatón L., Vauthier C., Bouchemal K., Espuelas S., Ponchei G., Irache J. M. (2009). *Combined hydroxypropyl- β cyclodextrin and poly(anhydride) nanoparticles improve the oral permeability of paclitaxel*. Eur. J. of Pharmac. Sci. 38(4):405-413.
- Ameen H. M., Kunsági-Máté S., Bognár B., Szenté L., Poór M., Lemli B. (2019). *Thermodynamic characterization of the interaction between the antimicrobial drug sulfamethazine and two selected cyclodextrins*. Molecules 24:1-12.
- Anjana M. N., Sreeja C. N., Jipnomon J. (2013). *An Updated review of cyclodextrins. an enabling technology for challenging pharmaceutical formulacions*. 5(3):54-58
- Arima H. Hagiwara Y, Hirayama F., Uekama K. (2006). *Enhancement of antitumor effect of doxorubicin by its complexation with γ -cyclodextrin in pegylated liposomes*. J. of Drug Target. 14(4)225-232.
- Birhade S. T., Bankar V. H., Gaikwad P. D., Pawar S.P. (2010). *Preparation and Evaluation of Cyclodextrin Based Binary Systems for Taste Masking*. Int. J. Pharm. Sci. and Drug Res. 2(3):199-203.
- Cervero M., Mendicuti F. (2000). *Inclusion Complexes of Dimethyl 2,6-Naphtalenedicarboxylate with α - and β -Cyclodextrins in Aqueous Medium: Thermodynamics and Molecular Mechanics Studies*. J. Phys. Chem. B. 104:1572-1580.

- Cervero M., Mendicuti F. (2000). *Inclusion Complexes of Dimethyl 2,6-Naphthalenedicarboxylate with α - and β -Cyclodextrins in Aqueous Medium: Thermodynamics and Molecular Mechanics Studies*. The J. of Physical Chem. B. 104(7):1572-1580.
- Challa R., Ahuja A., Ali J., Khar R.K. (2005). *Cyclodextrins in Drug Delivery: An Updated Review*. AAPS Pharm. Sci. Tech. 6(2):330-357.
- Cheng J., Khin K. T., Jensen G. S., Liu A., Davis M. E. (2003). *Synthesis of Linear, β -Cyclodextrin-Based Polymers and Their Camptothecin Conjugates*. Bioconjugate Chem. 14:1007-1017.
- Chordiya M. A., Senthilkumaran K. (2012). *Cyclodextrin In Drug Delivery: A Review Research and Reviews: J. of Pharm. and Pharmac. Sci.* 1(1):19-29.
- Chourpa I., Millot J.-M., Socklingum G. D. Tiou J.-F., Manfaitm M. (1998). *Kinetics of lactone hydrolysis in antitumor drugs of camptothetin series as studied by fluorescence spectroscopy*. Bioch. et Bioph. Acta 1379(3):353-366.
- Çirpanli Y, Bilensoy E., Dogan A., and Calis S. (2009). *Comparative evaluation of polymeric and amphiphilic cyclodextrin nanoparticles for effective camptothecin delivery*. Eur. J. of Pharm. and Biopharm. 73(1):82-89.
- Connors K. A. (1997). *The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution*. Chem. Rev. 97:1325-1357.
- Davis M. E., Brewster M. E. (2004). *Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future*. Nature reviews. 3:1023-1035.
- Dhule S. S., Penfornis P., Frazier T., Walker R., Feldman J., Tan G., He J., Alb A., John V., Pochampally R. (2012). *Curcumin-loaded γ -*

cyclodextrin liposomal nanoparticles as delivery vehicles for osteosarcoma. *Nanomedicine*. 8(4):440-451.

- Fatmi S., Bournine L, Iquer-Quada M., Lahiani-Skiba M., Bouchal F., Skiba M. (2015). *Amorphous solid dispersion studies of camptothecin-cyclodextrin inclusion complexes in PEG 6000*. *Acta Pol. Pharm.* 72(1):179-192.

- Gould S., Scott R. C. (2005). *2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD): A toxicology review*. *Food and Chem. Toxic.* 43: 1451-1459.

- Hanna K., de Brauer C., Germain P. (2004). *Cyclodextrin-enhanced solubilization of pentachlorophenol in water*. *J. Environ. Manag.* 71:1-8.

- Higuchi T., Connors K. A. (1965). *Phase solubility techniques*. *Adv. Anal Chem Instr.* 4:212-217.

- Huarte J., Espuelasa S., Laib Y., Heb B., Tangc J., Irachea J. M. (2016). *Oral delivery of camptothecin using cyclodextrin/poly(anhydride) Nanoparticles*. *Inter. J. of Pharm.* 506:116-128.

- Jaxel, C., Kohn, K. W., Wani, M. C., Wall, M. E., Pommier, Y. (1989). *Structure-activity study of the actions of camptothecin derivatives on mammalian topoisomerase I: evidence for site specific receptor site and a relation to antitumor activity*. *Cancer Res.* 49:1465–1469.

- Kang J., Kumar V., Yang D., Chowdhury P. R., Hohl R. J. (2002). *Cyclodextrin complexation: influence on the solubility, stability, and cytotoxicity of camptothecin, an antineoplastic agent*. *Eur. J. of Pharm. Sci.* 15:163-170.

- Khan F. N., Dehghan M. H. G. (2011). *Enhanced Bioavailability of Atorvastatin Calcium from Stabilized Gastric Resident Formulation*. AAPS Pharm. Sci. Tech. 12(4):1077-1086.
- Kipp J. E. (2004). *The role of solid nanoparticle technology in the oral delivery of poorly water-soluble drugs*. Int. J. Pharm. 284:109-122.
- Liu T., Li X., Qian Y., Hu X, Liu S. (2012). *Multifunctional pH-disintegrable micellar nanoparticles of asymmetrically functionalized β -cyclodextrin-based star copolymer covalently conjugated with doxorubicin and DOTA-Gd moieties*. Biomaterials. 33(8):2521-2531.
- Loftsson T., Duchêne D. (2007). *Cyclodextrins and their pharmaceutical applications*. Int. J. Pharm. 329:1-11.
- Marcelo G., de Francisco R., González-Álvarez M. J., Mendicuti F. (2008). *Fluorescence properties of (R)- and (S)-[1,1'-binaphthalene]-2,2'-diols solutions and their complexes with cyclodextrins in aqueous medium*. J. of Photochem. and Photobiol. A: Chem. 200(2-3):114-125.
- Martín del V. E. M. (2004). *Cyclodextrins and their uses: a review*. Process Biochem. 39(9):1033-1046.
- Merisko-Liversidge E., Liversidge G. G., Cooper E. R. (2003). *Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds*. Eur. J. of Pharm. Sci. 18(2):113-120.
- Mi Z., Burke T. G. (1994). *Marked interspecies variations concerning the interactions of camptothecin with human blood components*. Biochem. 33(34):10325-10336.

- Mielcarek J. (1997). *Photochemical stability of the inclusion complexes formed by modified 1, 4-dihydropyridine derivatives with betacyclodextrin*. J. Pharm. Biomed. Anal. 15:681-686.
- Moggetti B., Barberis A., Marino S. Berta G., De Francia S., Trotta F., Cavalli R. (2012). *In vitro enhancement of anticancer activity of paclitaxel by a Cremophor free cyclodextrin-based nanosponge formulation*. J. of Incl. Phenom. and Macro. Chem. 74(1-4):201-210.
- Nuncio di M. R., Cohen B., Douhal A. (2011). *Structural Photodynamics of Camptothecin, an Anticancer Drug in Aqueous Solutions*. J. Phys. Chem. A. 115:5094-5104.
- Oommen E., Tiwari S. P. B, Udupa N., Kamath R, Devi P. U. (1999). *Niosome entrapped β -cyclodextrin methotrexate complex as a drug delivery system*. Indian J. of Pharm. 31(4):279-284.
- Park J. W. (2006). *Fluorescence Methods for Studies of Cyclodextrin Inclusion Complexation and Excitation Transfer in Cyclodextrin Complexes*. Cyclodextr. Mat. Photochem., Photophysics and Photobiology. 1-26.
- Pereva S., Sarafska T., Bogdanova S., Spassov T. (2016). *Efficiency of "cyclodextrin-ibuprofen" inclusion complex formation*. J. of Drug Del. Sci. and Techn. 35:34-39.
- Pommier Y. (2013). *Drugging Topoisomerases: Lessons and Challenges*. ACS Chem. Biol. 8:82-95
- Rivory L. P., Robert J. (1995) *Molecular, cellular, and clinical aspects of the pharmacology of 20(S)camptothecin and its derivatives*. Pharm. and Ther. 68 (2):269-296.

- Sætern A. M., Nguyen N. B., Bauer-Brandl A., Brandl M. (2004). *Effect of hydroxypropyl--cyclodextrin-complexation and pH on solubility of camptothecin*. Intern. J. of Pharm. 284(1-2):61-68.
- Saokham P., Muankaew C., Jansook P., Loftsson T. (2018). *Solubility of cyclodextrins and drug/cyclodextrin complexes*. Molecules. 23:1-15.
- Serna L., Di Marco A., Mendicuti F. (2005). *Inclusion complexes of a bichromophoric diester containing anthracene and naphthalene groups with α - and β -cyclodextrins: thermodynamics and molecular mechanics*. Spectr. Acta Part A: Mol. And Biolmol. Spectrosc. 61(8):1945-1954.
- Sobrinho J. L., Soares M. F., Labandeira J. J., Alves L. D., Rolim N. P. (2011). *Improving the solubility of the antichagasic drug benznidazole through formation of inclusion complexes with cyclodextrins*. Quim. Nova. 34:1534-1538.
- Swaminathan S., Pastero L., Serpe L., Trotta F., Vavia P., Aquilano D., Trotta M., Zara G. P., Cavalli R. (2010). *Cyclodextrin-based nanosponges encapsulating camptothecin: Physicochemical characterization, stability and cytotoxicity*. Eur. J. of Pharm. and Biopharm. 74:193-201.
- Terekhova I. V., Chislov M. V., Brusnikina M. A., Chibunova E. S., Volkova T. V., Zvereva I. A., Proshin A, N. (2017). *Thermodynamics and binding mode of novel structurally related 1,2,4-thiadiazole derivatives with native and modified cyclodextrins*. Chem. Phys. Lett. 671:28-36.
- Thomsen B., Mollerup S., Bonven B. J., Frank R., Blocker H., Nielsen O. F., Westergaard O. (1987). *Sequence specificity of DNA topoisomerase I in the presence and absence of camptothecin*. EMBO J. 6:1817-1823.

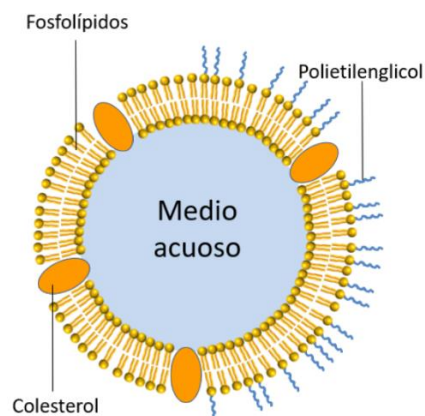
- Uekama K., Horikawa T., Horiuchi Y., Hirayama F. (1993). *In vitro and in vivo evaluation of delayed-release behavior of diltiazem from its O-carboxymehtyl-O-ethyl- β -cyclodextrin*. J. of Control. Rel. 27(1-2):99-106.
- Ulakan H., Swaan P. W. (2002). *Camptothecins. A Review of Their Chemotherapeutic Potential*. Drugs. 62(14):2039-2057.
- Usero R., Alvariza C., González-Álvarez M. J., Mendicuti F. (2008). *Complexation of Dimethyl 2,3-Naphthalenedicarboxylate with 2-hydroxypropyl- α -, - β - and - γ -cyclodextrins in Aqueous Solution by Fluorescence, Circular Dichroism and Molecular Mechanics*. J. Fluoresc. 18:1103-1114.
- Vo T. T., Ryan J., Carrasco R., Neuberger D., Rossi D. J., Stone R.M., Deangelo, D. J., Frattini, M. G., Letai, A. (2012). *Relative mitochondrial priming of myeloblasts and normal HSCs determines chemotherapeutic success in AML*. Cell 151:344-355.
- Vyas A., Saraf S., S. Saraf. (2008). *Cyclodextrin based novel drug delivery systems*. J. of Incl. Phen. and Macroc. Chem. 62(1-2):23-42.
- Wall M. E., Wani M. C., Cook C. E., Palmer K. H., McPhail A. T., Sim G. A. (1966). *Plant antitumor agents I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from Camptotheca acuminata*. J. of the Am. Chem. Soc. 88(16):3888-3890.
- Zhan H., Jagtiani T., Liang J. F. (2017). *Enhanced anticancer activity of drug nanoparticles formulated with β -cyclodextrin*. Honglei Anti-Cancer Drugs. 28(3):271-280.

- Zia V., Raiewski R. A., Stella V. J. (2001). *Effect of cyclodextrin charge on complexation of neutral and charged substrates: comparison of (SBE)7M- β -CD to HP- β -CD*. Pharm. Res. 18(5):667-73.
- Ziomkowska B., Kruszewski S., Siuda R., Cyrankiewicz M. (2006). *Deactivation rate of camptothecin determined by factor analysis of steady-state fluorescence and absorption spectra*. Opt. Applicata. 36(1):137-246.
- Lai C.-H., Chang C.-C., Weng Y.L., Chiang T.-H. (2018). *Synthesis, Experimental and Density Functional Theory (DFT) Studies on Solubility of Camptothecin Derivatives*. Molecules. 23:1-11.
- Yang L. P. H., Keam S. J. (2012). *Sugammadex. A Review of its Use in Anaesthetic Practise*. Drugs. 69:919-942.
- Baldo B. A. A., McDonnell N. J., Pham N. H (2012). *The Cyclodextrin Sugammadex and Anaphylaxis to Rocuronium: Is Rocuronium Still Potentially Allergenic in the Inclusion Complex Form?* Mini Rev. Med. Chem. 12(8):701-712.

**CAPÍTULO 2. ESTUDIO
DE LA FORMACIÓN Y
ESTABILIDAD DE
LIPOSOMAS**

1. Introducción

Los liposomas son vesículas esféricas artificiales de tamaño micrométrico formadas por una bicapa lipídica que engloba un volumen de disolución acuosa en su interior, con un tamaño comprendido entre los 20 y 1000 nm. Puesto que sus constituyentes son los lípidos, que son moléculas naturales y no tóxicas, se consideran a los liposomas como sistemas no inmunogénicos, biodegradables y biocompatibles



(Maestrelli et al., 2006; Anwekar et al., 2011). Un esquema de su estructura se muestra en la Figura 2.1, en donde se puede observar la membrana formada por fosfolípidos y colesterol, a la que se le pueden añadir otros componentes como polietilenglicol (PEG), y el núcleo acuoso.

Figura 2.1. Posible estructura general de un liposoma.

Los liposomas se han estudiado para diferentes aplicaciones biológicas: como modelos artificiales de membranas plasmáticas y como vehículos transportadores de moléculas farmacológicas *in vivo* (Gharib et al., 2015), entre otras. Debido a su arquitectura, pueden encapsular moléculas hidrofílicas en el núcleo acuoso, moléculas hidrofóbicas en la membrana lipídica o moléculas anfipáticas en la interfase agua-lípido (Fielding, 1991). Como transportadores de fármacos presentan varias ventajas (Akbarzadeh et al., 2013; Bozzuto y Molinari, 2015; Sharma et al., 2018; Nisini et al., 2018): confieren estabilidad y protegen al fármaco o molécula con actividad biológica, pueden encapsular moléculas de diferente naturaleza (hidrofílica, hidrofóbica o anfipática), aumentan la

eficacia y los efectos farmacocinéticos de los fármacos encapsulados, así como la solubilidad de estos, se benefician de la direccionalidad pasiva, y reducen la exposición del fármaco a tejidos que son sensibles de dañarse, disminuyendo los efectos secundarios.

1.1. Composición de los liposomas

Los liposomas se pueden preparar utilizando una gran variedad de moléculas lipídicas, siendo las principales los fosfolípidos y los esteroides (Shashi et al., 2012). Los fosfolípidos son el componente más abundante, correspondiendo con más del 50% del peso total del sistema. Los fosfolípidos más comúnmente utilizados son los ácidos grasos saturados, ya que generan liposomas más estables que los ácidos grasos insaturados (Shashi et al., 2012). Estas moléculas fosfolipídicas pueden ser naturales o sintéticas. Los fosfolípidos naturales están presentes en las células eucariotas y el más utilizado para la síntesis de liposomas es la fosfatidilcolina (PC) (Gharib et al., 2015). Los fosfolípidos sintéticos, fabricados artificialmente, son utilizados para modificar las propiedades estructurales (Samad et al., 2007) y los más empleados son la disteoilfosfatidilcolina y la dimiristoilfosfatidilglicerol (Shashi et al., 2012).

Los esteroides, entre ellos el colesterol, aportan beneficios estructurales a los liposomas, ya que su presencia reduce la elevada fluidez de la bicapa lipídica, lo que se traduce en una disminución en la permeabilidad de la membrana a moléculas solubles en agua (Briuglia et al., 2015). Además, aumentan la estabilidad de la membrana a altas temperaturas y disminuyen la agregación (Virden y Berg, 1992; Papahadjopoulos et al., 1987; Bloom et al., 1991).

Los esfingolípidos y los materiales poliméricos, como el PEG, el ácido fólico o los anticuerpos, hacen que los fosfolípidos adquieran características diferenciales (Shashi et al., 2012; Yao et al., 2013). Un ejemplo de ello es el aumento en el tiempo de circulación en sangre de los liposomas que contienen PEG en su superficie.

Los liposomas convencionales están formados por fosfolípidos de diferente naturaleza y colesterol, lo que les atribuye una carga negativa o neutra (Krishna et al., 1999). La desventaja de estos sistemas es que son absorbidos por las células del Sistema Fagocítico Mononuclear y eliminados de la circulación, acumulándose en hígado y bazo, debido al gran suministro de sangre y a la abundancia de células fagocíticas existentes en estos tejidos (Frank 1993; Daemen et al., 1995).

Los liposomas de larga circulación son un tipo de liposomas de composiciones similares a los liposomas convencionales, con la diferencia de que están recubiertos por moléculas de naturaleza polimérica y carácter inerte que les permiten evadir las respuestas del sistema inmunológico y no ser opsonizados. No son reconocidos por el Sistema Fagocítico Mononuclear, por lo que aumentan su tiempo de acción (Özcan et al., 2010; Klibanov et al., 1990). La molécula más utilizada para ello es el PEG, cuyas principales ventajas son: aumentar el tiempo de circulación, reducir la eliminación renal del vehículo (Klibanov et al., 1990), mejorar la solubilidad de los liposomas en disolventes acuosos sin disminuir la eficacia del fármaco ni su toxicidad (Veronese y Harris, 2002), mejorar la biodisponibilidad (Tenzer et al., 2013), facilitar su dispersión en el interior celular (Suh et al., 2007), incrementar la captación por parte de las células tumorales y agudizar el efecto de mejora de la permeación y retención (EPR, por sus siglas en inglés, Enhanced Permeation and Retention) en el tumor, de modo que

debido al tamaño de los liposomas y a las características del microambiente tumoral, estos quedan atrapados en las proximidades del tumor para ejercer su acción citotóxica (Huang et al., 1992).

Este tipo de liposomas se utiliza actualmente en la clínica y el ejemplo más sobresaliente es Doxil®, sistema con doxorubicina, empleado para el tratamiento del cáncer de ovario, mieloma múltiple y sarcoma de Kaposi asociado al Virus de la Inmunodeficiencia Humana (Bulkake et al., 2017).

1.2. Preparación de liposomas

La formación de liposomas es un proceso espontáneo. Ocurre a través de un mecanismo denominado autoensamblaje que tiene lugar en dos pasos consecutivos: la síntesis de una bicapa lipídica plana (teoría de la vesiculación espontánea) y la formación de una vesícula esférica (teoría de la curvatura) (Mozafari y Mortazavi, 2005) (Figura 2.2). En la primera etapa, las moléculas lipídicas en disolución establecen interacciones espontáneas unas con otras y con el agua que las rodea (interacciones lípido-lípido y lípido-agua). Las fuerzas que actúan en esta etapa son las interacciones termodinámicas debido a las propiedades anfifílicas e iónicas de los lípidos y las fuerzas atractivo-repulsivas, lo que se traduce en un autoensamblaje espontáneo en láminas o bicapas (Mouritsen y Bagatolli, 2015). Este proceso ocurre sin necesidad de aportar energía, ya que sólo existen fuerzas intermoleculares de atracción y repulsión (Hauser et al., 1989). En la segunda etapa tiene lugar la curvatura de la bicapa lipídica plana para formar vesículas esféricas. En este paso sí que es necesario un aporte de energía a través de la energía cinética producida en la homogenización, del calor procedente de una

fuerza térmica o de la sonicación (Lasic et al., 2001; Mozafari y Mortazavi, 2005).

Una vez formados los liposomas, pueden fragmentarse en vesículas de menor tamaño por acción de alguna fuerza externa como puede ser la extrusión (Lasic et al., 1995). El tipo de lípidos utilizados y la existencia o no de colesterol determinarán el tipo de curvatura, pudiéndose formar liposomas de diferente forma y tamaño (Mozafari y Mortazavi, 2005).

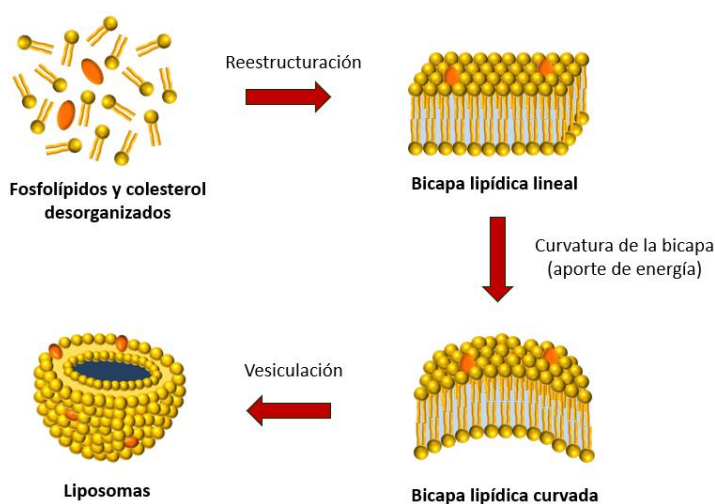


Figura 2.2. Proceso de formación de liposomas.

Los liposomas se pueden preparar a través de diferentes metodologías: hidratación de la capa fina, evaporación en fase inversa, procesos de congelación y deshielo e inyección en etanol (Sheoran et al., 2019). La hidratación en capa fina es el proceso más versátil y utilizado. En esta metodología, los lípidos se disuelven en una pequeña cantidad de disolvente orgánico que es eliminado a presión reducida, obteniendo una fina película lipídica seca que se hidrata por exposición a una disolución acuosa (Maestrelli et al., 2005; Piel et al., 2006).

2. Objetivos

Los liposomas son los sistemas que se han elegido para transportar los complejos de inclusión formados por CMCD y camptotecina, estudiados en el Capítulo 1.

Por lo tanto, en este capítulo, el objetivo va a ser establecer la metodología experimental para obtener y caracterizar las dispersiones de liposomas, tanto convencionales como a partir de lípidos sintéticos (funcionalizados con PEG), que en el siguiente capítulo se estudiarán para encapsular al complejo de inclusión CMCD-CAMP.

3. Material y métodos

3.1. Materiales y equipos

Los materiales empleados en estos experimentos fueron L- α -fosfatidilcolina hidrogenada (Avanti Polar Lipids Inc., Estados Unidos), colesterol $\leq 99\%$ (Sigma-Aldrich, Alemania), 1-2,-diastearoil-sn-glicero-3-fosfaetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (DSPE-PEG2000) (sal de amonio) (Avanti Polar Lipids Inc., Estados Unidos), disolución tampón Fosfato Salino (PBS, pH=7,4, cuya composición es 137 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl, 8 mM de Na₂HPO₄ y 2 mM de KH₂PO₄, Sigma-Aldrich, Alemania), disolución tampón citrato (pH=3,5, cuya composición es ácido cítrico (C₂H₈O₇) 0,1 M, NaOH 1 M (5:1) y HCl 0,1 M, Sigma-Aldrich, Alemania), cloroformo $\geq 99,8\%$ (VWR Chemicals BDH, Estados Unidos), filtros de jeringuilla de nylon de 0,45 μm (Perkin Elmer, Estados Unidos), cubetas de poliestireno (Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) y cubetas de determinación del potencial Z (Zetasizer nano series, Malvern, Reino Unido).

El extrusor (Avanti Polar Lipids Inc., Estados Unidos) que se utilizó para homogeneizar el tamaño de los liposomas (Liu et al., 2000), constaba de dos jeringuillas Hamilton de 1 mL de volumen (Avanti Polar Lipids Inc., Estados Unidos), que encajaban perfectamente a ambos lados de una caja metálica que alberga una membrana porosa de policarbonato. Una vez formados los liposomas, se utilizó un sonicador (Startsonic 90, Liarre Digit, Chipre) para homogeneizar el tamaño.

El diámetro hidrodinámico y el potencial zeta se caracterizaron con el equipo Zetasizer nano series (Malvern, Reino Unido) y la morfología de los liposomas se visualizó con un Microscopio Electrónico de Barrido (EVO HD25, Carl Zeiss Microscopy, Alemania).

3.2. Metodología

3.2.1. Preparación de liposomas

Se prepararon dos tipos de sistemas: liposomas convencionales y liposomas PEGilados.

Los liposomas convencionales se formaron a partir de una mezcla de L- α -fosfatidilcolina hidrogenada y colesterol. Las estructuras químicas de estas moléculas se muestran en las Figuras 2.3 y 2.4, respectivamente.

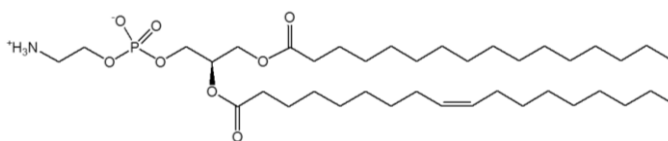


Figura 2.3. Estructura molecular de la L- α -fosfatidilcolina hidrogenada.

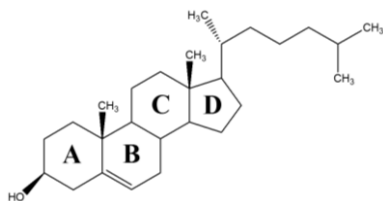


Figura 2.4. Estructura molecular del colesterol.

Los liposomas PEGilados se formaron a partir de una mezcla que contiene L- α -fosfatidilcolina hidrogenada, colesterol y DSPE-PEG2000, cuya estructura química se muestra en la Figura 2.5.

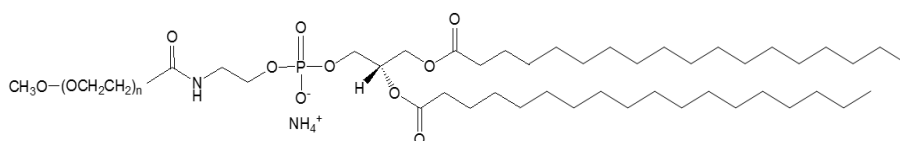


Figura 2.5. Estructura molecular de la DSPE-PEG2000.

La preparación de liposomas se realizó siguiendo el método de hidratación de la capa fina (Maestrelli et al., 2010) que se detalla de manera esquemática en la Figura 2.6.

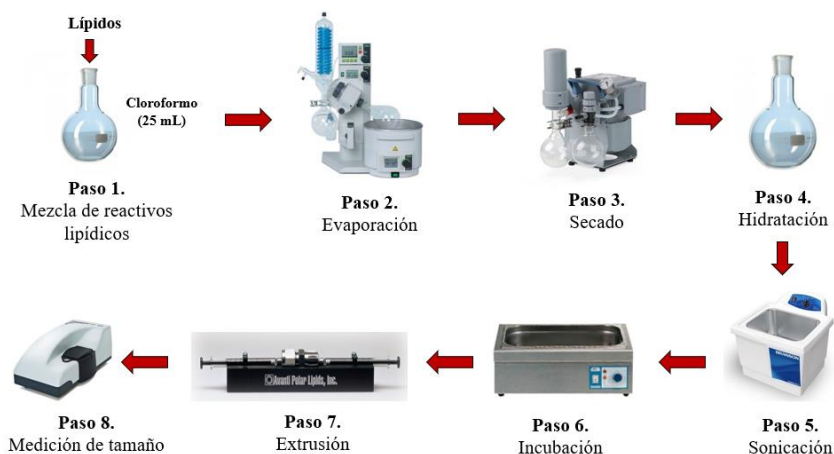


Figura 2.6. Procedimiento para la preparación de liposomas.

Para la preparación de los liposomas convencionales, se pesaron 381 mg de fosfatidilcolina (788 g/mol) y 193,32 mg de colesterol (386,65 g/mol), en una relación molar 50:50, y se disolvieron en 25 mL de cloroformo. En la preparación de los liposomas funcionalizados con PEG se pesaron 381 mg de L- α -fosfatidilcolina hidrogenada, 174 mg de colesterol y 140 mg de DSPE-PEG2000, en una relación molar 50:45:5, y se disolvieron en 25 mL de cloroformo.

Una vez pesados los componentes estructurales, el procedimiento fue el mismo para ambos sistemas. La disolución de lípidos se evaporó lentamente en un rotavapor a bajas presiones y a una temperatura de 50°C durante 2 horas, con el objetivo de evaporar el cloroformo y crear una película de lípidos uniforme en el matraz. Una vez formada la capa homogeneizada de lípidos, ésta se secó en una bomba de vacío durante 7 horas, para eliminar el cloroformo residual. Posteriormente, la película se hidrató con 10 mL de disolución tampón a pH 3,5 (tampón citrato), pH 7,4 (PBS) o simplemente agua. La mezcla se sonicó durante 30 minutos para lograr que la fina capa resultante se despegara del balón y se formara una suspensión lipídica uniforme, logrando de este modo la formación de las vesículas lipídicas. A continuación, la dispersión de liposomas se incubó durante 1 hora en un baño de agua a la temperatura elegida (25, 35, 45, 55 o 65°C) y, posteriormente, se extruyó 10-12 veces utilizando un extrusor (mini-extruder) que contenía filtros de policarbonato con un tamaño de poro de 100, 200 o 400 nm. La extrusión se realizó calentando el extrusor a la temperatura elegida.

3.2.2. Caracterización del tamaño hidrodinámico de los liposomas resultantes y su potencial zeta

La determinación del diámetro hidrodinámico se realizó mediante la técnica de dispersión de luz dinámica, conocida por las siglas DLS, por su nombre en inglés Dynamic Light Scattering. Se realizaron tres medidas de cada una de las muestras y se determinó el promedio del tamaño hidrodinámico con su respectiva desviación estándar. El diámetro hidrodinámico se expresó como el promedio en z que resulta del ajuste de la función de correlación por el método de Cumulantes.

Para evitar el efecto de dispersión múltiple, que puede ocurrir cuando se caracteriza el tamaño hidrodinámico a elevada concentración de partículas, se prepararon dispersiones de liposomas a diferentes concentraciones ($1,14 \cdot 10^{-3}$ mg/mL, $2,87 \cdot 10^{-3}$ mg/mL, $5,74 \cdot 10^{-3}$ mg/mL y $1,14 \cdot 10^{-4}$ mg/mL) y se caracterizó su tamaño hidrodinámico. Se comprobó que el tamaño no variaba cuando se medía en ese intervalo de concentraciones. Por tanto, se consideró como el intervalo de concentración óptimo para llevar a cabo las caracterizaciones de tamaño.

A continuación, se explicará brevemente el fundamento de la técnica de dispersión de luz dinámica y de la caracterización del potencial z .

a) Dispersión de luz dinámica (DLS)

Las partículas, moléculas o macromoléculas existentes en una disolución presentan un movimiento aleatorio que se conoce como movimiento browniano. Al aumentar el tamaño de la partícula, su movimiento browniano se hace más lento. La velocidad de este movimiento se define a través de una propiedad conocida como el coeficiente de difusión traslacional (D). A partir de este coeficiente se

puede obtener el tamaño de la partícula a través de la ecuación de Stokes-Einstein (Ec. 2.1):

$$d(H) = kT/3\pi\eta D \quad \text{Ec.2.1.}$$

en donde $d(H)$ es el diámetro hidrodinámico, D es el coeficiente de difusión traslacional, k es la constante de Boltzman, T es la temperatura absoluta y η es la viscosidad.

Es importante destacar que el diámetro medido por DLS es un valor que indica cómo una partícula (considerada una esfera) difunde en un fluido. Por tanto, este tamaño es un tamaño hidrodinámico.

En DLS se mide la velocidad a la que las partículas difunden debido al movimiento browniano. Esto se hace determinando la velocidad a la que la intensidad de luz dispersada fluctúa. Las fluctuaciones de la intensidad cuando se registran con el tiempo presentan un patrón que depende del tamaño de las partículas, tal y como se observa en la Figura 2.7.

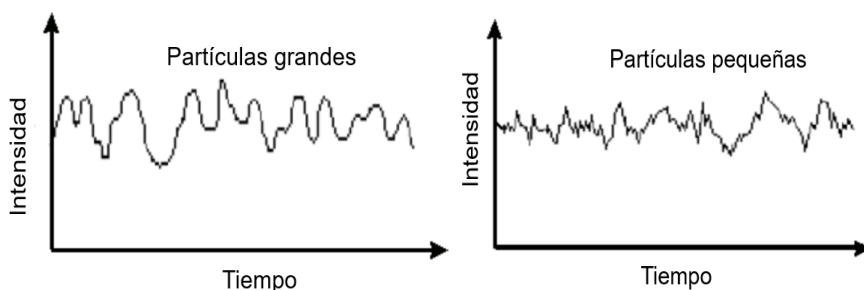


Figura 2.7. Típicas fluctuaciones de intensidad con el tiempo para grandes y pequeñas partículas. Fuente: manual Zetasizer Nano Malvern.

Una vez obtenido este patrón de intensidad vs tiempo, se analiza con un correlacionador. Un correlacionador, de manera general, mide el

grado de similitud entre dos señales o una señal con ella misma a varios intervalos de tiempo.

Si la señal se compara con ella misma a tiempo cero, la correlación es perfecta. Sin embargo, si se compara la señal a intervalos de tiempo dados, la correlación irá disminuyendo hasta que en un determinado momento no exista correlación. El tiempo en el que la correlación comienza a decaer es característico de la velocidad de difusión y, por tanto, del tamaño de las partículas. A partir de los datos de correlación con el tiempo se construye un correlograma como se muestra en la siguiente Figura 2.8.

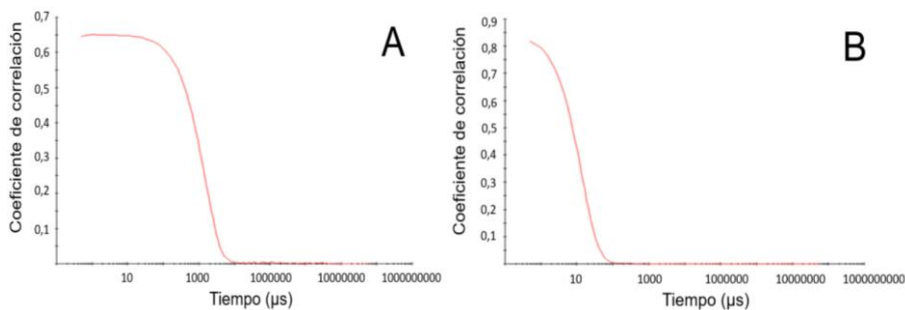


Figura 2.8. Típico correlograma para una muestra que contiene partículas grandes (A) y partículas pequeñas (B). Fuente: manual Zetasizer Nano Malvern.

La expresión matemática de la función de correlación se representa en la Ecuación 2.2:

$$G(t) = \langle I(t) \cdot I(t + t) \rangle \quad \text{Ec. 2.2.}$$

donde t es el tiempo.

Si la muestra contiene un número de partículas monodispersas en tamaño, la función de correlación es una exponencial decayente con el tiempo de correlación (τ), que tiene la expresión siguiente (Ec. 2.3):

$$G(\tau) = A [1 + B \cdot e^{-2\Gamma\tau}] \quad \text{Ec. 2.3.}$$

donde A es la línea base de la función de correlación, B es la intercepción de la función de correlación y Γ se define en la Ecuación 2.4.

$$\Gamma = Dq^2 \quad \text{Ec. 2.4.}$$

donde D significa coeficiente de difusión traslacional y q se expresa en la Ecuación 2.5:

$$q = (4 \pi n / \lambda_0) \sin (\theta/2) \quad \text{Ec. 2.5.}$$

donde n es el índice de refracción del dispersante, λ_0 es la longitud de onda del láser y θ es el ángulo de dispersión.

En el caso de muestras polidispersas, la ecuación (Ec. 2.6) de la función de correlación puede ser descrita como:

$$G(t) = A[1 + B \cdot g_1(\tau)^2] \quad \text{Ec. 2.6.}$$

donde $g_1(\tau)$ es la suma de todos los decaimientos exponenciales que están contenidos en la función de correlación, A es la línea base de la función de correlación y B es la intercepción de la función de correlación.

Existen varios algoritmos para obtener el coeficiente de difusión traslacional, que a través de la ecuación de Stokes-Einstein se relaciona con el tamaño hidrodinámico. Entre ellos se encuentra el de Cumulantes, que se aplica a muestras relativamente monodispersas y consiste en el ajuste de la función de correlación a una única monoexponencial. Este ajuste es el que se ha empleado para el análisis de todas las funciones de correlación obtenidas en el trabajo.

Como resultado de este análisis se obtiene el diámetro de la partícula expresado como promedio en z , una función que relaciona la intensidad con el tamaño para una población de partículas con una baja polidispersión (que se llama función de distribución del tamaño en

intensidad) y el índice de polidispersión que se calcula a través de la siguiente expresión (Ec. 2.7):

$$PDI = \sigma^2 / 2R_H^2 \quad \text{Ec. 2.7.}$$

siendo σ la desviación estándar de una hipotética distribución de Gauss centrada en el promedio en z y R_H el radio hidrodinámico.

El índice de polidispersión indica el grado de homogeneidad del tamaño hidrodinámico de las partículas suspendidas en un líquido. Sus valores pueden estar comprendidos entre 0 y 1. Los valores de 0,1 indican partículas esféricas, con funciones de distribución monomodales y estrechas (Danaei et al., 2018; Malvern, 2018).

En la Figura 2.9 se muestra un esquema de la configuración del equipo (Zetasizer Nano) que se utilizó para realizar la caracterización de los liposomas por DLS.

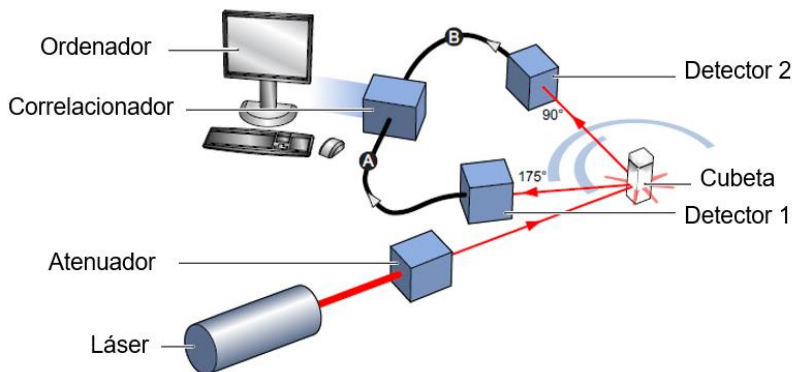


Figura 2.9. Esquema de la configuración del equipo usado para la caracterización de los liposomas por DLS. Fuente: manual Zetasizer Nano Malvern.

b) Determinación del potencial zeta de los liposomas

El potencial zeta es una propiedad física que caracteriza a cualquier partícula o macromolécula en suspensión. Se utiliza para

conocer su estabilidad a largo plazo con respecto a procesos de agregación y/o floculación.

Los científicos Derjaguin, Verwey, Landau y Overbeek desarrollaron en 1940 una teoría (teoría DVLO) para explicar la estabilidad de los sistemas coloidales. Esta teoría indica que la estabilidad de una partícula depende de la función de la energía potencial. Esta función de energía potencial es el balance entre diferentes contribuciones, según se indican en la Ecuación 8:

$$V = V_A + V_R + V_S \quad \text{Ec. 2. 8}$$

donde V_S es la energía potencial debida al disolvente, y su contribución es marginal respecto a los otros dos términos que aparecen en el balance que operan a distancias mucho más largas. V_A viene dado por la Ecuación 2.9:

$$V_A = - A/(12 \pi D^2) \quad \text{Ec. 2. 9}$$

donde A es la constante de Hamaker y D es la separación entre partículas.

El potencial repulsivo (V_R) es una función más compleja que viene dada por la Ecuación 2.10.

$$V_R = 2 \pi \varepsilon a \zeta^2 e^{-\kappa D} \quad \text{Ec. 2.10}$$

donde ε es la permeabilidad del disolvente, a es el radio de la partícula, ζ es el potencial zeta, κ es una función de la composición iónica y D es la separación entre partículas.

La teoría DVLO sugiere que la estabilidad de un sistema coloidal viene determinada por la suma de las fuerzas atractivas de tipo Van der Waals y las repulsivas entre la doble capa eléctrica de los coloides. Por tanto, para garantizar la estabilidad de un sistema coloidal, las fuerzas repulsivas tienen que ser las dominantes.

La capa líquida que rodea una partícula está formada por dos zonas: una región interna llamada *capa Stern*, en donde los iones están unidos fuertemente a la partícula, y una capa difusa o externa, en la cual los iones están menos unidos. Entre ambas capas hay un límite teórico a partir del cual los iones de la capa interna forman una entidad estable, denominada *superficie de corte hidrodinámico* y el potencial eléctrico que existe en este límite se denomina *potencial zeta*, tal y como se esquematiza en la Figura 2.10.

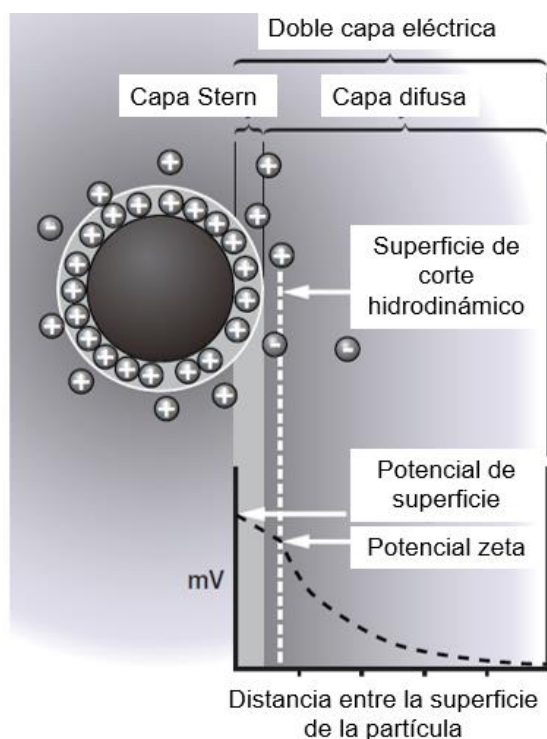


Figura 2.10. Esquema de las diferentes capas eléctricas de una partícula en suspensión. Fuente: manual Zetasizer Nano Malvern.

Cuando un campo eléctrico se aplica a través de un electrolito, las partículas cargadas que se encuentran suspendidas en el electrolito se atraen hacia el electrodo de carga opuesta. La velocidad con la que se

mueven (movilidad electroforética, U_E) viene dada por la siguiente ecuación (Ec 2.11):

$$U_E = \frac{2 \varepsilon z f(ka)}{3\eta} \quad \text{Ec. 2.11}$$

donde ε es la constante dieléctrica, z es el potencial zeta, $f(ka)$ es la función de Henry (siendo k la longitud de Debye y a el radio de la partícula) y η es la viscosidad. La aproximación de Smoluchowski consiste en dar el valor de 1,5 a $f(ka)$ y es válida para partículas mayores de 0,2 μm y la aproximación de Huckel da el valor de 1,0 a $f(ka)$ para partículas menores a 0,2 μm . Ambas aproximaciones son válidas para partículas dispersas en un electrolito con una concentración mayor a 10^{-3} M.

El instrumento Zetasizer mide la movilidad electroforética utilizando la técnica de dispersión de luz y, para ello, combina la velocimetría por láser Doppler y el análisis de fases. De manera muy general, la velocimetría por láser Doppler se basa en el efecto Doppler y mide el cambio de frecuencia de la luz dispersada. Este cambio de frecuencia es función de la velocidad de las partículas y es muy pequeño, por lo que el equipo, en lugar de medir el cambio de frecuencia, lo que detecta es el cambio de fase.

3.2.3. Morfología de los liposomas por microscopía electrónica de barrido

Se visualizaron los liposomas PEGilados y los liposomas convencionales por microscopía electrónica de barrido (Odeh et al., 2012). El voltaje de aceleración de los electrones incidentes que se utilizó para la visualización fue de 15,01 kV.

Para la preparación de las muestras de liposomas se siguieron los siguientes pasos:

1^{er} paso: se colocaron dos portaobjetos especiales para microscopía electrónica sobre un papel de filtro posicionado en una placa de Petri. A estos portaobjetos se les añadió una gota de polilisina al 0,1% (v/v) en agua, se dejaron reposar durante 1 hora y se lavó el exceso de este compuesto con agua desionizada.

2^o paso: se adicionó una gota de cada muestra de liposomas encima de la superficie de cada portaobjetos previamente preparado. El papel de filtro sobre el que estaban las muestras se mojó con una disolución de glutaraldehído al 25% (v/v). Se tapó la placa de Petri y se cerró con Parafilm® para mantener la humedad, dejándolo reposar toda la noche en el frigorífico a 4°C.

3^{er} paso: se lavaron las muestras tres veces con PBS en intervalos de dos minutos, se añadió osmio encima de las muestras y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora.

4^o paso: se lavaron las muestras tres veces con agua desionizada en intervalos de 5 minutos.

5^o paso: se deshidrataron con acetona al 30, 50 y 70%, de forma que cada 10 minutos se lavaron con una disolución de acetona diferente. Después de realizar este proceso, las muestras se lavaron con acetona al 90 y 100% en un intervalo de 20 minutos.

6^o paso: una vez que las muestras estaban preparadas, se secaron a través de la técnica de secado del punto crítico, que deshidrata las muestras para evitar que una evaporación violenta del agua, debido al alto vacío con el que se trabaja en microscopía electrónica, provoque daños en las muestras (Hall et al., 1978).

4. Resultados y discusión

Se prepararon dos tipos de sistemas liposomales. Uno de ellos fue el sistema convencional, que se formó por la combinación de fosfatidilcolina y colesterol. Para la preparación del segundo sistema, que se denominó liposomas PEGilados, se añadió un tercer lípido, DSPE-PEG2000. Este tercer lípido confiere la funcionalización de la superficie del liposoma (superficie expuesta al medio acuoso) con PEG. En la Figura 2.11 se muestra un esquema de los dos tipos de sistemas estudiados.

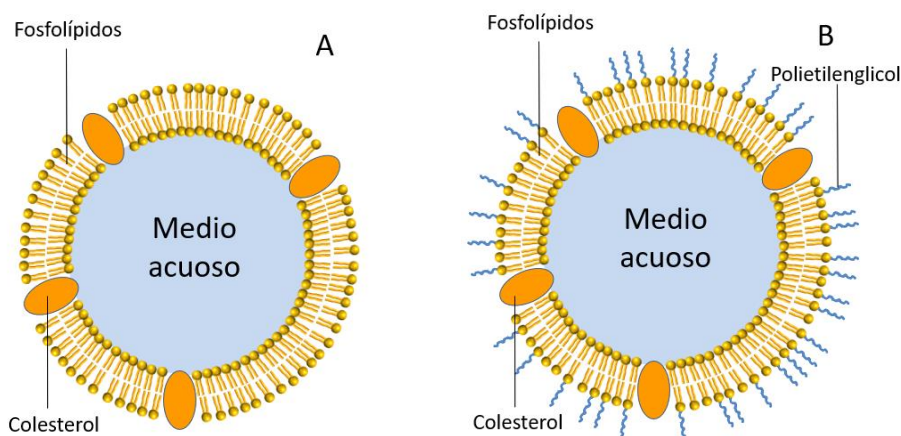


Figura 2.11. Estructura de los liposomas convencionales (A) y de los liposomas PEGilados (B).

La preparación de liposomas se realizó siguiendo el método de hidratación de la capa fina. Para ello, se preparó la disolución de lípidos en cloroformo utilizando un matraz de fondo redondo. Esta disolución se evaporó en el rotavapor para formar una fina película cubriendo el fondo del matraz. Posteriormente, esta película se hidrató con agua, agua a pH 7,4 (PBS) y agua a pH 3,5 (tampón citrato) y se sonicó durante 30 minutos (usando un baño de ultrasonidos convencional). La suspensión resultante de liposomas se incubó a 25, 35, 45, 55 o 65°C y se sometió a

un proceso de extrusión. La necesidad de este proceso de extrusión viene dada porque los liposomas antes de ser extruidos presentan tamaños muy grandes, cercanos a 1 μm e índices de polidispersión de entre 0,5 y 1 (Ong et al., 2016). La extrusión se realizó mediante la aplicación de altas presiones a la suspensión de liposomas, haciéndola pasar a través de los poros de una membrana de policarbonato. En función de ese tamaño de poro se puede modificar el tamaño de los liposomas, algo que no ocurre en otras técnicas (Olson et al., 1979; Nayar et al., 1989; Schneider et al., 1995). El mecanismo por el que las vesículas grandes consiguieron romperse en pequeñas consiste en una rotura de la estructura de bicapa de la membrana (Clerc y Thompson, 1994) a través de su deformación para conseguir atravesar el poro que se rige por la energía de flexión. En concordancia con esto, la ruptura se produce porque la tensión superficial excede a la tensión de rotura (Gompper y Kroll, 1995). Esta metodología, además, permite que la polidispersión en el tamaño se pueda reducir con el número de veces que se hace pasar la dispersión de liposomas por el filtro (Mayer et al, 1986; Ong et al., 2016). El inconveniente de este método se menciona en la patente y reside en la posibilidad de obstrucción de los poros del filtro, con mayor probabilidad de que suceda cuando se extruyen suspensiones concentradas. Gracias a la extrusión se pudo reducir el tamaño hasta aproximadamente 100 nm (Ong et al., 2016). También presenta otras ventajas frente a otras metodologías experimentales como su sencillez experimental, así como una baja polidispersión en el tamaño de los liposomas resultantes. Se pueden conseguir dispersiones con valores de índice de polidispersión de 0,2 o inferiores, a diferencia de los valores de 0,4 que se obtienen en las demás técnicas (Ong et al., 2016). Además, se ha descrito que debido a la presión ejercida durante la filtración es posible eliminar los

microorganismos (Hunter y Frisken, 1998), evitando así la contaminación biológica.

Cuando se lleva a cabo la extrusión, el tamaño de los liposomas puede modificarse en función del número de extrusiones que se realizan, la densidad de la muestra empleada, la composición de los liposomas y del tamaño de poro del filtro (Cullis et al., 1991; Ong et al., 2016; Sur et al., 2014). Por ello, se va a determinar el número necesario de extrusiones para formar los liposomas en PBS (pH 7,4) con el tamaño más pequeño posible. Se realizaron experimentos con diferente número de extrusiones (1, 3, 10 y 14) y se caracterizó el tamaño hidrodinámico (dado por el promedio en z) como se muestra en la Figura 2.12.

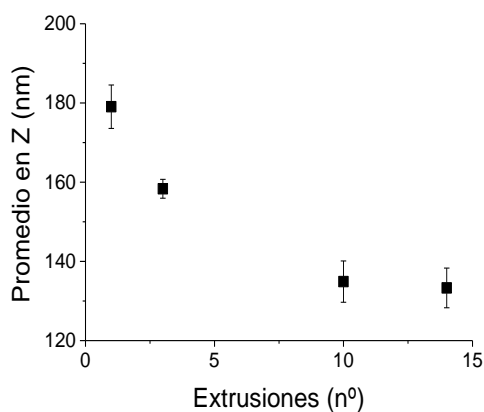


Figura 2.12. Efecto del número de extrusiones en el tamaño de los liposomas.

Por lo tanto, se puede observar que entre un número de extrusiones de 1 y 10, el tamaño disminuye, obteniéndose liposomas con un tamaño medio de 179 ± 6 nm cuando se extruyeron sólo una vez y de 158 ± 2 nm con 3 extrusiones. El tamaño no se vio ya afectado con un número de extrusiones de entre 10 y 14 veces con un valor alrededor de 134 nm. En cuanto a la polidispersión, se obtuvieron muestras más uniformes a medida que se aumentaban el número extrusiones. Por

ejemplo, con tres extrusiones el índice de polidispersión fue de 0,18 mientras que con 10 o 14 se redujo a 0,08. Por tanto, en todas las preparaciones de liposomas estudiadas se mantuvo en 10 el número de extrusiones.

4.1. Liposomas convencionales

Durante el proceso de preparación de los liposomas, se estudió el efecto de diferentes factores que podrían influenciar en las propiedades, tamaño y estabilidad de los liposomas resultantes. Estos factores fueron: la relación molar entre fosfatidilcolina y colesterol, la influencia del pH de la disolución acuosa, el efecto del tamaño de poro del filtro que se usó en la extrusión y el papel de la temperatura en el proceso de incubación y extrusión. Para evaluar la influencia de estos factores, se determinó la estabilidad de los liposomas a lo largo de 21 días, a través de la medición de su diámetro hidrodinámico a lo largo de este periodo.

4.1.1. Influencia de la relación molar fosfatidilcolina:colesterol en el tamaño de los liposomas

La proporción molar de lípidos estructurales que forman los liposomas afecta al tamaño y estabilidad de las partículas lipídicas. En concreto, la presencia de colesterol está relacionada con una mayor rigidez de la membrana liposomal y un menor riesgo de desestructuración de la misma (Liu et al., 2000). Además, la adición de colesterol como lípido estructural es muy importante para su posterior uso clínico, ya que cuando los liposomas se introducen en el torrente sanguíneo, sufren un proceso de desestabilización debido al intercambio adiposo de fosfolípidos con lipoproteínas del plasma (Socaciu et al., 2000), y el colesterol estabiliza los liposomas para que este proceso no

afecte a su estructura. Además, la mayor estabilidad de los liposomas formados con colesterol promueve una protección adicional de los fármacos encapsulados en su interior (Lee et al., 2005).

En esta sección se va a estudiar el efecto que tiene el contenido de colesterol y fosfatidilcolina en el tamaño y en la estabilidad de los liposomas convencionales. Para ello, se prepararon tres muestras de liposomas con diferente relación molar de PC:Col a pH 7,4: 50:50, 75:25 y 25:75. Los liposomas se extruyeron a 55 y a 65°C. El tamaño de poro de la membrana que se utilizó en la extrusión fue de 100 nm, ya que es el tamaño que más interesa para una aplicación clínica (Brown y Khan, 2012; Fang et al., 2018; Chang y Yeh, 2012). El tamaño hidrodinámico de la dispersión de liposomas se caracterizó durante 21 días.

Los resultados del proceso de extrusión a 55°C se muestran en la Figura 2.13. Los liposomas formados a partir de una relación molar 50:50 tenían tamaños medios de 135 ± 3 nm mientras que para una relación de 75:25 presentaron valores de 141 ± 4 nm. Los valores de los índices de polidispersión se encontraron por debajo de 0,1, indicando que los liposomas formados para ambas composiciones son monodispersos. Los valores de tamaño hidrodinámico para ambas composiciones fueron bastante similares. Por tanto, la proporción de colesterol en la membrana lipídica no parece afectar de manera significativa al tamaño y a la estabilidad de los liposomas extruidos a 55°C.

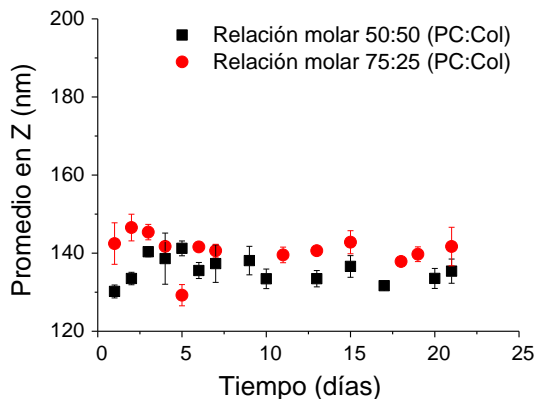


Figura 2.13. Variación del tamaño hidrodinámico (promedio en z) en función del tiempo en liposomas formados por fosfatidilcolina y colesterol en una relación molar de 50:50 y 75:25, en agua a un pH de 7,4 y a 55°C.

La estabilidad de los liposomas resultantes del proceso de extrusión a una temperatura de 65°C se estudió también durante 21 días. Los resultados se muestran en la Figura 2.14. Se determinó que ambos tipos de liposomas, tanto los formados con una relación molar de 50:50 como para los que su relación molar fue de 75:25, mostraron tamaños muy similares, con un valor de tamaño hidrodinámico (z-promedio) en torno a 131 ± 3 nm. Este tamaño es ligeramente inferior a los valores obtenidos cuando el proceso de extrusión se realiza a 55°C, lo que podría deberse a una mayor fluidez de la membrana lipídica a 65°C. Análogamente a lo que ocurría a 55°C, la estabilidad de los liposomas es muy alta y no se observan diferencias significativas entre ambas composiciones. Los valores del índice de polidispersión de ambas muestras se encuentran por debajo de 0,1, indicando que son muy monodispersas y que la composición de los liposomas no afecta a este parámetro.

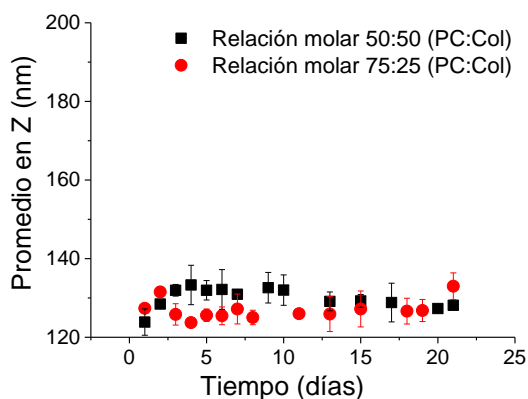


Figura 2.14. Variación del tamaño hidrodinámico (promedio en z) en función del tiempo en liposomas formados por fosfatidilcolina y colesterol en una relación molar de 50:50 y 75:25, en agua a un pH de 7,4 y a 65°C.

La relación PC:Col de 25:75 no se pudo llegar a estudiar ya que los liposomas formados no se pudieron extraer, pues gran cantidad de los lípidos estructurales quedaron retenidos en la membrana de policarbonato.

En la literatura se han descrito por otros autores diferencias en el tamaño y la estabilidad de los liposomas en función de la cantidad de colesterol existente en los liposomas (Pathak et al., 2012; Shaker et al., 2017; Hinna et al., 2016). Briuglia et al. (2015) prepararon liposomas a partir de dimiristoilfosfatidilcolina y dipalmitoilfosfatidilcolina con diferentes porcentajes de colesterol. Describieron que el tamaño aumentaba a medida que lo hacía la concentración de colesterol. Del mismo modo, Tsang et al. (2007) formaron liposomas con dipalmitoilfosfatidilcolina y colesterol. En este sistema también se observó la misma influencia del colesterol.

En esta tesis, tanto a 55 como a 65°C la membrana lipídica es lo suficientemente fluida que al extraer los liposomas a través de una

membrana de 100 nm de tamaño de poro fue posible determinar el tamaño final que se caracterizó. En cuanto a la relación molar de fosfatidilcolina y colesterol, no se encontraron grandes diferencias, aunque el tamaño era ligeramente inferior en una relación molar 50:50 a 65°C y, debido a que en otros estudios se utilizó esta misma relación (Sur et al., 2014), se decidió fijar la relación molar 50:50 para la formación de los liposomas.

4.1.2. Influencia del pH del medio acuoso en el tamaño de los liposomas

Se formaron los liposomas convencionales por hidratación con disoluciones acuosas con diferentes valores de pH. Se empleó agua, una disolución reguladora con pH 7,4 (tampón fosfato, PBS) y una disolución reguladora con pH 3,5 (tampón citrato). La relación molar de PC:Col fue de 50:50. Se empleó una membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 100 nm en el proceso de extrusión. Se estudió, además del efecto del pH, la influencia de la temperatura a la que se extruyen los liposomas en el tamaño, la polidispersión y la estabilidad de los mismos. Para ello, los liposomas se extruyeron a 25, 35, 45, 55 y 65°C. La temperatura repercute en la fluidez de la membrana lipídica en el momento de la extrusión, debido a que un incremento en la temperatura reduce las interacciones moleculares entre los fosfolípidos que forman la membrana (Sulkowski et al., 2005). Por tanto, un aumento de temperatura conlleva a que la membrana lipídica sea más fácil de deformar durante el proceso de extrusión.

En la Figura 2.15 se muestra la variación del tamaño hidrodinámico durante un periodo de 21 días cuando los liposomas se forman en agua, agua a pH 7,4 y agua a pH 3,5.

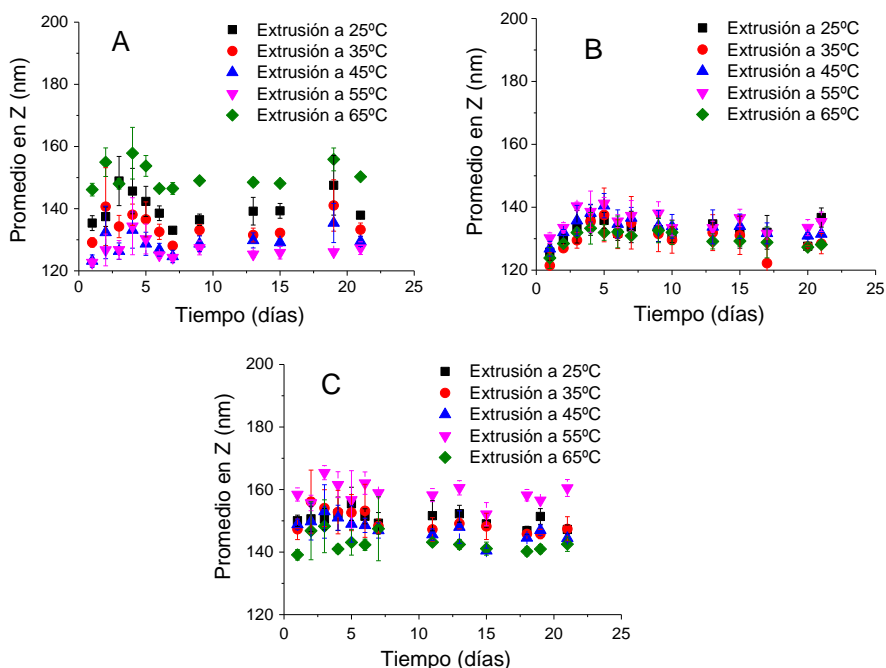


Figura 2.15. Efecto de la temperatura (en el proceso de extrusión) en la estabilidad de los liposomas formados en agua (A), agua a pH 7,4 (B) y agua a pH 3,5 (C).

Los tamaños hidrodinámicos medios obtenidos del estudio de estabilidad en los liposomas formados en agua (Figura 2.15.A) durante 21 días fueron de 140 ± 5 nm, 134 ± 4 nm, 129 ± 4 nm, 150 ± 4 nm y de 127 ± 3 nm para los liposomas extruidos a 25, 35, 45, 55 y 65°C, respectivamente. Los valores de los índices de polidispersión fueron de $0,09\pm 0,02$; $0,08\pm 0,01$; $0,08\pm 0,02$; $0,09\pm 0,03$ y $0,13\pm 0,01$ para los liposomas extruidos a 25, 35, 45, 55 y 65°C, respectivamente.

Como se puede observar en los valores de tamaño, existen ligeros cambios en función de la temperatura a la que son extruidos los liposomas, obteniéndose menor tamaño para los liposomas extruidos a 45 y 55°C. Estos resultados son similares a otras investigaciones que obtuvieron tamaños más bajos a 40°C, justificando que esa temperatura

corresponde a la temperatura de transición de fase de los fosfolípidos saturados (Roy et al., 2016). Con relación a los valores del índice de polidispersión, indican que los liposomas suspendidos en agua tienen un tamaño bastante monodisperso.

A continuación, se muestra cómo la extrusión es un proceso necesario para conseguir liposomas suspendidos en agua con una gran uniformidad en tamaño. Para ello, en la Figura 2.16 se muestra la distribución en intensidad del tamaño hidrodinámico de los liposomas sin extruir (línea roja) y extruidos (línea verde) a 65°C. La muestra sin extruir presenta dos distribuciones: una con un tamaño de 965 nm y una segunda menos intensa con un tamaño de aproximadamente 140 nm. Después de extruir, sólo se observa una distribución en tamaño con un valor de 135 nm y un índice de polidispersión de 0,09.

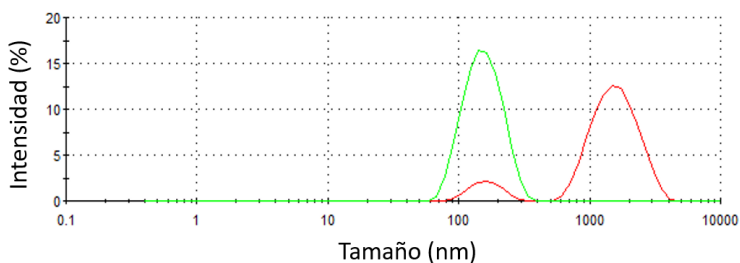


Figura 2.16. Tamaño de los liposomas extruidos a 65°C antes (línea roja) y después (línea verde) del proceso de extrusión. Las distribuciones se muestran en intensidad.

La Figura 2.15.B muestra la variación del tamaño con la temperatura de extrusión y su estabilidad durante 21 días para los liposomas formados a un pH de 7,4. Los tamaños hidrodinámicos medios fueron de 133 ± 5 nm, 130 ± 4 nm, 134 ± 3 nm, 136 ± 3 nm y de 130 ± 2 nm para los liposomas extruidos a 25, 35, 45, 55 y 65°C, respectivamente. Las muestras son bastante monodispersas, siendo los valores de los

índices de polidispersión inferiores a 0,1. Los valores de tamaño obtenidos no parecen mostrar diferencias con la temperatura de extrusión.

Cuando los liposomas se formaron en agua a pH 3,5 (Figura 2.15.C) los valores de tamaño hidrodinámico medios, resultado de la medida durante los 21 días fueron de 151 ± 2 nm, 151 ± 3 nm, 147 ± 3 nm, 159 ± 3 nm y 143 ± 3 nm para las temperaturas de extrusión de 25, 35, 45, 55 y 65°C, respectivamente. En este caso también se observó que los tamaños fueron muy similares en todas las temperaturas estudiadas, como ocurría en los liposomas formados en agua y a pH 7,4. Sin embargo, los liposomas extruidos a 65°C tenían un tamaño ligeramente inferior. Este hecho posiblemente se relaciona con la existencia de una mayor fluidificación de la membrana lipídica (Sulkowski et al., 2005; Sur et al., 2014).

Los valores de polidispersión no variaron en función de la temperatura empleada, pero a pH 3,5 estos valores se encontraron en el intervalo 0,1-0,2, mientras que para los liposomas formados en agua o a pH 7,4 los valores fueron de 0,1 o inferiores, lo que indica que los liposomas formados a este pH presentaron una mayor polidispersión que los formados en agua o a pH 7,4.

Como conclusión de esta sección se puede decir que los liposomas se pueden formar en agua y agua a pH 7,4 en el intervalo de temperaturas de 25-65°C sin que existan diferencias significativas en tamaño y estabilidad. Debido a que en agua a pH 3,5 los liposomas son un poco más pequeños cuando se extruyen a 65°C, se establece 65°C como la temperatura de extrusión para los experimentos posteriores.

Aunque la temperatura no fue un factor importante en el tamaño de los liposomas, sí lo fue el tipo de disolución empleada, observándose

diferencias entre disolventes. Estas diferencias pueden ser debidas al pH, ya que, tal y como descubrieron Garidel et al. (1997), el pH influye en la temperatura de transición de los lípidos que forman las bicapas lipídicas, aumentando este valor a medida que disminuye el pH. Por lo tanto, a menor pH es necesaria una mayor temperatura para lograr un nivel de fluidez óptimo. Del mismo modo, se conoce que el pH y la fuerza iónica influyen enormemente en el tamaño de los liposomas (Sulkowski et al., 2005).

Para poder determinar esta influencia, se representan, en la Figura 2.17, los tamaños hidrodinámicos de los tres disolventes empleados a la temperatura de extrusión de 65°C. Se puede observar que el tamaño fue siempre menor para los liposomas formados en agua (127±4 nm), aumentó a un valor de 131±2 nm cuando los liposomas se formaron a pH 7,4 y, finalmente, los liposomas formados a pH 3,5 fueron los de mayor tamaño, con un valor de 143±3 nm.

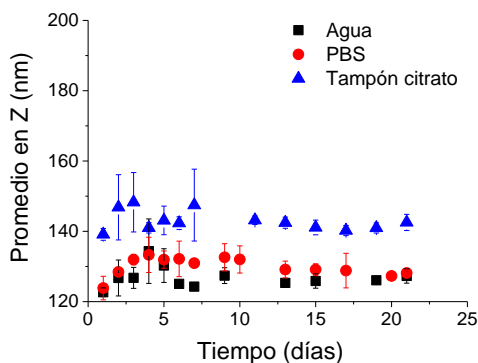


Figura 2.17. Efecto del pH en el tamaño de los liposomas extruidos a 65°C.

Las variaciones obtenidas en el tamaño son debidas a la diferente rigidez de la membrana lipídica en los diferentes medios. A medida que disminuye el pH, aumenta la rigidez. Esta rigidez se debe a que a pH

ácido, los fosfolípidos se encuentran protonados, lo que conduce a un incremento en el número de puentes de hidrógeno y, por tanto, a una reducción en la fluidez de la membrana (Garidel et al., 1997; Roy et al., 2016). Por ello, los liposomas que se formaron a pH de 3,5 son más rígidos y su fluidez es menor, lo que conlleva a que es más difícil lograr su rotura cuando pasan por el poro del filtro en el extrusor. En cuanto a la estabilidad de los liposomas en los diferentes medios acuosos estudiados, es importante destacar que son estables durante el periodo de tiempo estudiado (hasta 21 días después de su preparación). En la literatura está descrito que un pH ácido afecta a la estabilidad de los liposomas (Zhang y Pawelchak, 2000), ya que se detectó la hidrólisis de los lípidos. Cabe destacar que, aunque los estudios de estabilidad a lo largo de los 21 días no mostraron cambios en el tamaño de los liposomas, sí es cierto que los liposomas a pH 3,5 guardados a 5°C durante varios meses mostraron cierta degradación que se observó visualmente, mientras que los liposomas formados a pH 7,4 y agua no poseían estos indicios. Por lo tanto, es posible afirmar que el pH influye decisivamente en el tamaño y polidispersión de los liposomas, tal y como también afirma Sulkowski et al. (2005).

4.1.3. Efecto del tamaño de poro en el tamaño de los liposomas

Para estudiar este efecto, se extruyeron los liposomas formados en agua a pH 3,5 y agua a pH 7,4 a la temperatura de 65°C a través de membranas de policarbonato con tamaño de poro de 100, 200 y 400 nm. Una vez que se formaron los liposomas, se determinó su estabilidad durante 21 días, tal y como se puede observar en la Figura 2.18.

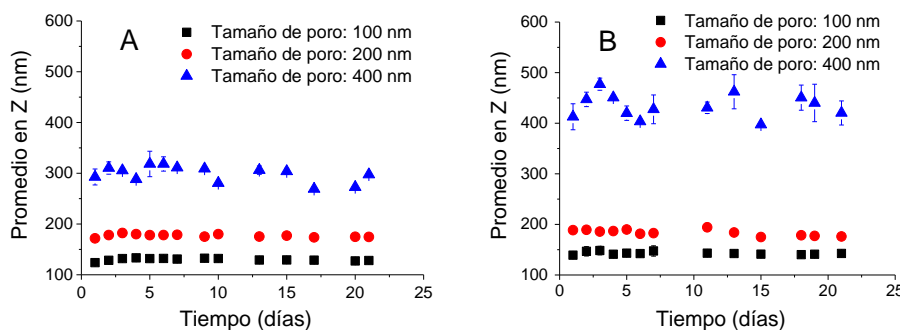


Figura 2.18. Efecto del tamaño de poro en el tamaño de los liposomas extruidos a 65°C en agua a pH 7,4 (A) y a pH 3,5 (B).

En la Figura 2.18 se observa cómo el tamaño de los liposomas varía en función del tamaño de poro. A pH 7,4 (Figura 2.18.A), los tamaños hidrodinámicos fueron de 130 ± 2 nm, 178 ± 4 nm y 297 ± 16 nm cuando el tamaño de poro de la membrana fue de 100, 200 y 400 nm, respectivamente. Por lo tanto, utilizando un tamaño de poro de 100 nm, los liposomas resultantes son mayores que el tamaño de poro empleado, mientras que para los liposomas extruidos a través de tamaños de poro de 200 o 400 nm, el tamaño hidrodinámico es inferior al tamaño de poro empleado. Estos resultados concuerdan con otras investigaciones (Frissen et al., 2000; Ong et al., 2016) y se pueden explicar considerando que los liposomas experimentan una deformación elástica, lo que produce que su forma esférica se deforme hacia una forma elipsoide debido a la presión al pasar por los poros de la membrana (Lesier et al., 1991), ya que las partículas elipsoides pasan más fácilmente por los poros (Olson et al., 1979). De este modo, las partículas más pequeñas, debido a su tamaño, sufren una deformación elástica reversible. Sin embargo, esta deformación no es reversible para los liposomas de mayor tamaño, lo que produce su rotura (Hupfeld et al., 2010).

En cuanto a la estabilidad, los liposomas formados a través de los diferentes tamaños de poro son estables en el tiempo, sin variar su tamaño a lo largo de los 21 días de estudio, como se muestra en la Figura 2.18.A. Respecto a la polidispersión, empleando los filtros de 100 y 200 nm, se obtuvieron muestras muy monodispersas con índices de polidispersión inferiores a 0,1. Sin embargo, al emplear filtros de 400 nm, los valores del índice de polidispersión fueron elevados y próximos a 0,5.

En el caso de los liposomas formados a pH 3,5 (Figura 2.18.B), los tamaños hidrodinámicos fueron de 143 ± 3 nm, 184 ± 6 nm y 434 ± 24 nm cuando el tamaño de poro de la membrana fue de 100, 200 y 400 nm, respectivamente. El efecto del tamaño de poro en el tamaño de los liposomas fue similar al que se observó cuando el pH era 7,4. En cambio, cuando se utilizó un tamaño de poro de 400 nm, el tamaño de los liposomas fue ligeramente superior al tamaño de poro, y esto se puede deber al aumento de rigidez de la membrana lipídica debido a la disminución del pH (Sulkowski et al., 2005). Además, los liposomas extruidos a través de un poro de 400 nm fueron más inestables a lo largo del tiempo, con oscilaciones en el tamaño durante los 21 días, siendo esto más notable en los siete primeros días. Por el contrario, los liposomas formados con tamaños de poro de 100 y 200 nm fueron muy estables a lo largo del tiempo. De forma análoga a lo que ocurrió para el estudio realizado a pH 7,4 y en concordancia con la literatura (Mayer et al., 1989; Berger et al., 2001; Ong et al., 2016), los valores del índice de polidispersión se incrementaron al aumentar el tamaño de poro, siendo de $0,07\pm 0,01$, $0,08\pm 0,02$ y $0,46\pm 0,03$ cuando el tamaño de poro fue de 100, 200 y 400 nm, respectivamente.

4.1.4. Estabilidad térmica de las dispersiones de liposomas

Las suspensiones de liposomas pueden estar expuestas a diferentes temperaturas debido a su almacenaje o a las condiciones térmicas diferenciales entre un tejido sano y otro tumoral. Por tanto, es necesario conocer la estabilidad térmica del sistema. Para ello, los liposomas con una relación molar de PC:Col de 50:50 se formaron en agua a pH 7,4 y 3,5, se extruyeron a través de una membrana de poro de 100 nm a dos temperaturas (55 y 65°C), y se estudió su estabilidad, midiendo su tamaño hidrodinámico en el intervalo de temperaturas de 15 a 65°C, con intervalos de 5°C de temperatura.

En el caso de los liposomas formados a pH 7,4, tanto a 55°C como a 65°C, no se observaron cambios en el tamaño, ya que los valores estuvieron próximos a 130 nm, como se observa en la Figura 2.19. Lo mismo ocurrió con los liposomas que se formaron en agua a pH 3,5. Por tanto, los liposomas a ambos pHs son estables en el intervalo de temperaturas de 15 a 65°C, sin que se observe ningún problema de desestructuración.

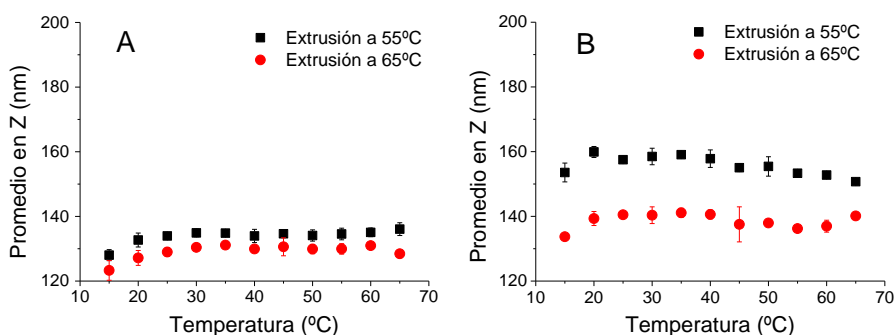


Figura 2.19. Efecto de la temperatura en el tamaño de los liposomas en agua a pHs 7,4 (A) y 3,5 (A).

Algunos trabajos resaltan que, aun manteniendo su forma y su tamaño, los liposomas son más inestables a medida que se incrementa la temperatura, porque su membrana lipídica se vuelve más fluida y tienen un mayor riesgo de degradarse y de liberar el fármaco de su interior (Niu et al., 2012; Began et al., 1999). Esto se debe a que, con el aumento de la temperatura, las cadenas hidrocarbonadas presentan más movimiento, reduciéndose la rigidez de la membrana y promoviendo defectos en la estructura (Niu et al., 2012). Aunque esto ocurra a temperaturas superiores a los 40°C no sería del todo contraproducente, ya que estas temperaturas se alcanzan en los tejidos tumorales. Por tanto, en estos tejidos ya no habría problema en que estos vehículos se desestructuraran y liberaran el fármaco que contienen.

Por lo tanto, no existen problemas de desestructuración en el almacenaje de estos vehículos liposómicos.

4.1.5. Potencial zeta de los liposomas convencionales

Los liposomas convencionales presentan valores de potencial zeta que son función del pH del medio en el que se encuentran (Hunter et al., 2001). Se conoce que la protonación de los grupos amino en la L- α -fosfatidilcolina hidrogenada es función del pH. A pH ácido, los grupos amino se encuentran protonados y, por tanto, contribuyen a disminuir el valor de potencial zeta (Smith et al., 2017). Los liposomas formados en agua tuvieron potenciales zeta de $-18,7 \pm 3,4$ mV, los liposomas formados a pH 7,4 tuvieron un potencial zeta de $-21,0 \pm 4,9$ mV y los formados a pH 3,5 de $-7,2 \pm 1,8$ mV. Por lo tanto, los liposomas formados en agua y agua a pH 7,4 previsiblemente serán sistemas estables porque tienen valores de potencial zeta más negativos que aseguran la repulsión entre las partículas, evitando la agregación. En cambio, los liposomas

formados en agua a pH 3,5 poseen valores menos negativos, es decir, tienen más probabilidad de agregación, aunque en la práctica no se observó agregación y fueron estables a lo largo del estudio.

Las conclusiones para la preparación de liposomas convencionales con tamaños próximos a 100 nm se esquematizan en la Figura 2.20. Se establece el tamaño de 100 nm para los liposomas, ya que es el más adecuado para la captación tumoral (Nagavasu et al., 1999; Sykes et al., 2014) y consiguen no ser eliminados por el hígado y el riñón (Poon et al., 2019). Además, las partículas de este tamaño consiguen entrar en los tejidos tumorales y les cuesta más llegar a los sanos, a causa de la estructura tisular de ambos (Drummond et al., 1999). Tanto es así, que los liposomas más empleados en la clínica poseen tamaños que rondan el citado valor de los 100 nm. Un ejemplo de ello es Doxil[®], cuyos tamaños obtenidos son de 80-100 nm (Barenholz, 2012) o Myocet[®] con tamaños que rondan los 150 nm de diámetro (Kanter et al., 1992).

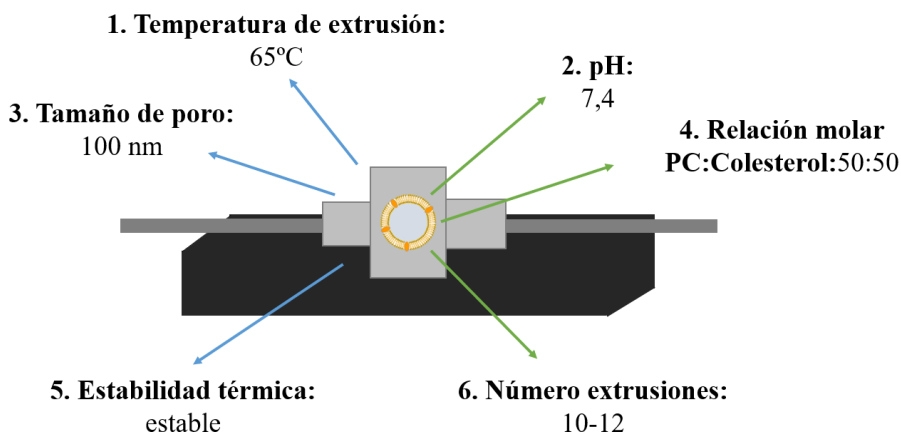


Figura 2.20. Mejores condiciones para la síntesis de los liposomas convencionales con tamaños próximos a 100 nm.

4.2. Liposomas PEGilados

Una vez establecidas las condiciones a través del estudio de preparación y caracterización de liposomas convencionales, se preparó y caracterizó el sistema de liposomas PEGilados. Para prepararlos, se combinó fosfatidilcolina, colesterol y un tercer lípido llamado DSPE-PEG2000, en la relación molar 50:45:5. La metodología empleada es la misma que se usó en la preparación de los liposomas convencionales y las condiciones utilizadas son las expuestas y esquematizadas en la Figura 2.20 (excepto la relación molar de lípidos que varía en estos liposomas PEGilados).

4.2.1. Tamaño y estabilidad en agua a pH 7,4

De manera similar a los liposomas convencionales, los tamaños antes de la extrusión fueron muy elevados, siendo el promedio en z de 1580 nm (línea roja) y el índice de polidispersión de 0,88. Después de la extrusión (filtro de 100 nm de poro), el promedio en z fue de 119 nm (línea verde) y 0,002 de polidispersión, tal y como se muestra en la Figura 2.21.

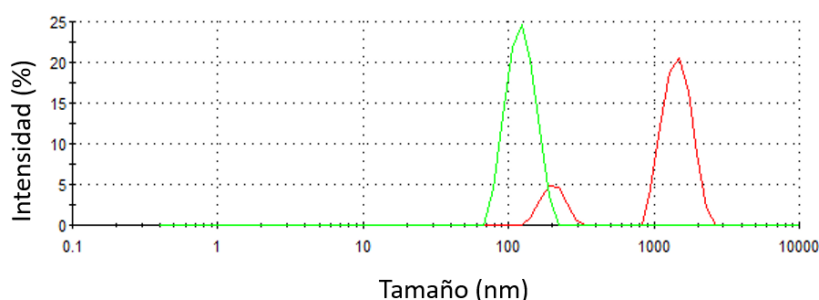


Figura 2.21. Tamaño de los liposomas extruidos a 65°C antes (línea roja) y después (línea verde) del proceso de extrusión. Las distribuciones se muestran en intensidad.

Se caracterizaron el tamaño y el índice de polidispersión a lo largo de 21 días y los resultados se muestran en la Figura 2.22. Se observa que los liposomas son estables a lo largo del tiempo estudiado sin cambios en el tamaño ni en el índice de polidispersión (menor a 0,1).

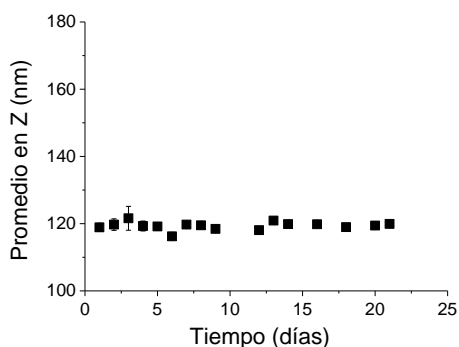


Figura 2.22. Estudio del tamaño de los liposomas PEGilados en agua a pH 7,4 durante 21 días.

Cuando se compararon los dos sistemas, liposomas convencionales y liposomas PEGilados, obtenidos aplicando la misma metodología, se observó que el tamaño de los liposomas convencionales (130 ± 3 nm) era ligeramente superior al de los liposomas PEGilados (119 ± 1 nm).

4.2.2. Estabilidad térmica de las dispersiones de liposomas PEGilados en agua a pH 7,4

Se caracterizó la estabilidad de los liposomas PEGilados y se estudió la estabilidad térmica en un rango de temperaturas de entre 15 y 65°C. El tamaño hidrodinámico para la dispersión de liposomas en función de la temperatura se muestra en la Figura 2.23. Los resultados de tamaño mostraron que los liposomas se mantienen estables en todo el intervalo de temperaturas estudiadas, con tamaños cercanos a 120 nm.

Tampoco se observaron variaciones en el índice de polidispersión, ya que los valores se encontraron en el intervalo de 0,016 y 0,059.

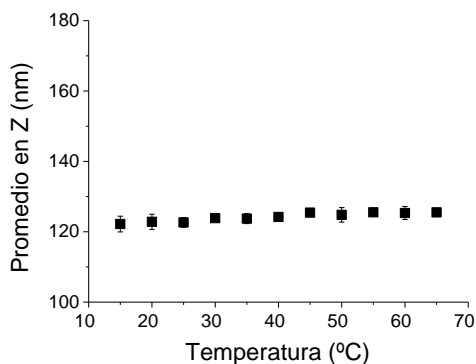


Figura 2.23. Efecto de la temperatura en el tamaño de los liposomas PEGilados en agua a pH 7,4.

4.2.3. Determinación del potencial zeta de los liposomas PEGilados

El potencial zeta de los liposomas PEGilados en agua a pH 7,4 fue de $-6,5 \pm 2,2$ mV. Este valor es inferior al que presentaba la dispersión de liposomas convencionales ($-21,0 \pm 4,9$ mV). Esta disminución se explica considerando que las cadenas de PEG producen un enmascaramiento de las cargas aniónicas de los lípidos estructurales (Vali et al., 2008; Dadashzadeh et al., 2008). Los valores cercanos a la neutralidad podrían provocar la agregación de los liposomas. Sin embargo, los liposomas fueron estables a lo largo del tiempo.

4.3. Morfología de los liposomas

Se caracterizó la morfología de los liposomas por microscopía electrónica de barrido, tanto de los liposomas convencionales (A) como

de los liposomas PEGilados (B), y las imágenes se muestran en la Figura 2.24.

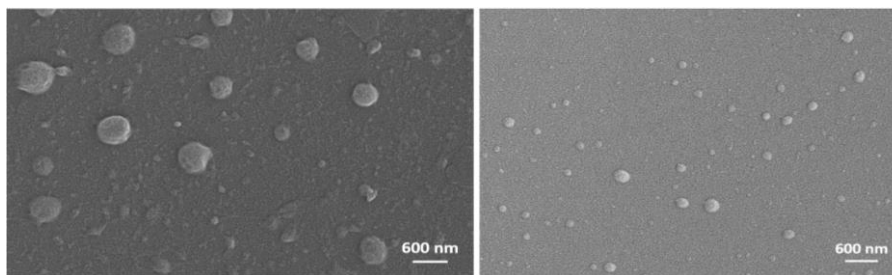


Figura 2.24. Imágenes de liposomas convencionales (A) y PEGilados (B) visualizados mediante Microscopía Electrónica de Barrido.

Ambos liposomas poseen forma esférica, tal y como mencionan otros autores (Bibi et al., 2011; Franken et al., 2017; Robson et al., 2018; Valle y Navarro, 2015; Surianarayanan et al., 2016). Las imágenes muestran la existencia de liposomas de pequeño tamaño, pero también de partículas lipídicas de un tamaño mucho mayor, como si la muestra fuera muy polidispersa. En cambio, en la caracterización por DLS se obtuvieron tamaños en torno a 140 nm para los liposomas convencionales y de 120 nm para los liposomas PEGilados, con polidispersiones por debajo de 0,1. La explicación de esta diferencia entre ambos métodos puede ser debida a la fusión de los liposomas a causa de la técnica de secado de la muestra (Franken et al., 2017). Además, la estructura de los liposomas sufre perturbaciones durante su preparación y a causa de las condiciones de alto vacío necesarias para su visualización podrían conducir a la fusión entre partículas (Ruozi et al., 2011). Sin embargo, la visualización mediante Microscopía Electrónica de Barrido ayuda a observar su morfología esférica (Nirale et al., 2009; Robson et al., 2018).

5. Conclusiones

En este capítulo se establecieron las condiciones experimentales para la preparación y caracterización de dos sistemas liposomales: liposomas convencionales y liposomas PEGilados. Como conclusiones más destacables se pueden extraer las siguientes.

- Los liposomas convencionales estaban formados a partir de una mezcla de L- α -fosfatidilcolina hidrogenada y colesterol. Para este tipo de sistema se evaluó: la relación molar entre ambos componentes, la temperatura de extrusión, el efecto del tamaño de poro del filtro empleado en la extrusión, y el efecto de la temperatura y el pH en el tamaño y estabilidad de los liposomas. Como conclusión de este trabajo se destaca que fue posible obtener liposomas con un tamaño controlado próximo a 130 nm después del proceso de extrusión, siendo estos estables durante al menos 21 días, sin cambios apreciables en su tamaño al variar el pH (3,5 y 7,4) y la temperatura en el intervalo de 15-60°C.

- Una vez establecida la metodología para los liposomas convencionales, esta se aplicó para la preparación de los liposomas PEGilados. Para esta segunda formulación de liposomas se utilizó fosfatidilcolina, colesterol y DSPE-PEG2000, combinados en una relación molar 50:45:5. De manera similar a los liposomas convencionales, los liposomas PEGilados presentaron un tamaño controlado próximo a 120 nm después del proceso de extrusión a un pH de 7,4, siendo los liposomas estables con la temperatura (15-60°C) y el tiempo (21 días).

6. Bibliografía

- Akbarzadeh A., Rezaei-Sadabady R., Davaran S., Joo S. W., Zarghami N., Hanifehpour Y., Samiei M., Kouhi M., Nejati-Koshki K. (2013). *Liposome: classification, preparation, and applications*. *Nanoscale Res. Lett.* 22:8(1):1-9.
- Anwekar H., Patel S., Singhai A. K. (2011). *Liposome as drug carriers*. *Intern. J. of Pharmac. and Life Sci.* 2:945-951.
- Barenholz Y. (2003). *Relevancy of drug loading to liposomal formulation therapeutic efficacy*. *J. of Liposome Res.* 13:1-8.
- Barenholz Y. C. (2012). *Doxil®-The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned*. *J. Control. Rel.* 160:117-134.
- Began G., Sudharshan E., Sankar U. K., Rao A. A. (1999). *Interaction of curcumin with phosphatidylcholine: a spectrofluorometric study*. *J. Agric. Food. Chem.* 47:4992-4997.
- Berger N., Sachse A., Bender J., Schubert R., Brandl M. (2001). *Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics*. *Int. J. Pharm.* 223:55-68.
- Bloom M., Evans E., Mouritsen O. G. (1991). *Physical properties of the fluid-bilayer component of cell membranes: A perspective*. *Quart. Rev. of Bioph.* 24:293-397.
- Bozzuto G., Molinari A. (2015). *Liposomes as nanomedical devices*. *Int. J. Nanomedicine.* 10:975-999.
- Briuglia M.- L., Rotella C., McFarlane A., Lamprou D. A. (2015). *Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release*. *5(3):231-242.*

- Brown S., Khan D. (2012). *The Treatment of Breast Cancer Using Liposome Technology*. J. of Drug Del. 1-6.
- Bulkake U., Doppalapudi S., Kommineni N., Khan W. (2017). *Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review*. Pharmaceutics. 9(12):1-33.
- Çağdaş M., Sezer A. D., Bucak S. (2014). *Liposomes as Potential Drug Carrier Systems for Drug Delivery*. Intech Poen Sci. 1-50.
- Chang H. I., Yeh M. K. (2012). *Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy*. Int J Nanomedicine. 7:49-60.
- Clerc S. G., Thompson T. E. (1994). *A possible mechanism for vesicle formation by extrusion*. Biophys. J. 67:475-477.
- Cullis P. R., Hope M. J., Bally M.B. (1991). *Extrusion Technique for Producing Unilamellar Vesicles*. U.S. Patent 07/310,495.
- Dadashzadeh S., Vali A. M., Rezaie M. (2008). *The effect of PEG coating on in vitro cytotoxicity and in vivo disposition of topotecan loaded liposomes in rats*. Int. J. Pharm. 353:251-259.
- Daemen T., Hofstede G., Ten Kate MT, Bakker-Woudenberg J. A., Scherphof G. L. (1995). *Liposomal doxorubicin induced toxicity: depletion and impairment of phagocytic activity of liver macrophages*. Int. J. Cancer. 61:716-21.
- Danaei M., Dehghankhold M., Ataei S., Hasanzadeh F., Javanmard R., Dohkani A., Khorasani S. y Mozarafi M. R. (2018). *Impact of Particle Size and Polidispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems*. Pharmaceutics, 10(57), 1-17.

- Drummond D. C., Meyer O., Hong K., Kirpotin D. B., Papahadjopoulos D. (1999). *Optimizing liposomes for the delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors*. Pharmacological Reviews. 51, 691-744.
- Fang Y. P., Chuang C. H., Wu Y. J., Lu Y. C. (2018). *SN38-loaded <100 nm targeted liposomes for improving poor solubility and minimizing burst release and toxicity: in vitro and in vivo study*. Int. J. Nanomedicine, 13:2789-2802.
- Fielding M. R. (1991). *Liposomal drug delivery: Advantages and limitations from a clinical pharmacokinetics and therapeutic perspective*. Clin. Pharmacokin. 21, 155-164.
- Frank M. M. (1993). *The reticuloendothelial system and bloodstream clearance*. J. Lab. Clin. Med. 122:487-488.
- Franken L. E., Boekema E. J., Stuart M. C. (2017). *Transmission Electron Microscopy as a Tool for the Characterization of Soft Materials: Application and Interpretation*. Adv. Sci. 4:1-9.
- Frisken B.J., Asman C., Patty P.J. (2000). *Studies of vesicle extrusion*. Langmuir. 16:928-933.
- Garidel P., Johann C., Mennicke L., Blume A. (1997). *The mixing behavior of pseudobinary phosphatidylcholine-phosphatidylglycerol mixtures as a function of pH and chain length*. Eur. Biophys. L. 26:447-459.
- Gharib R., Greige-Gerges H., Fourmentin S., Charcosset C., Auezova L. (2015). *Liposomes incorporating cyclodextrin–drug inclusion complexes: Current state of knowledge*. Carbohydr. Polymers. 129:175-186.
- Gompper G., Kroll D. M. (1995). *Driven transport of fluid vesicles through narrow pores*. Phys. Rev. E. 52:4198-4208.

- Hall D. J., Skerrett E. J., Thomas W. D. (1978). *Critical Point Drying for Scanning Electron Microscopy: A Semi-Automatic Method of Preparing Biological Specimens*. J. Microsc. 113(3):277-290.
- Hauser H., Haering G., Pande A., Luisi P. L. (1989). *Interaction of water with sodium bis(2-ethyl-1-hexyl) sulfosuccinate in reversed micelles*. J. Phys. Chem. 93(23):7869-7876.
- Hinna A., Steiniger F., Hupfeld S., Stein P., Kuntsche J., Brandl M. (2016). *Filter-extruded liposomes revisited: a study into size distributions and morphologies in relation to lipid-composition and process parameters*. J. of Liposome Res. 26(1):11-20.
- Huang S. K., Lee K.-D., Hong K., Friend D. S., Papahadjopoulos D. (1992). *Microscopic Localization of Sterically Stabilized in Colon Carcinoma Mice*. Cancer Res. 52:5135-5143.
- Hynter R. J. (1988). *Zeta Potential In Colloid Science: Principles And Applications*. Academic Press: UK.
- Hunter D. G., Frisken B. J. (1998). *Effect of extrusion pressure and lipid properties on the size and polydispersity of lipid vesicles*. Biophys. J. 74:2996-3002.
- Hunter, R. J., Midmore, B. R., Zhang, H. (2001). *Zeta Potential of Highly Charged Thin Double-Layer Systems*. J. Colloid Interf. Sci. 237:147-149.
- Hupfeld S., Moen H. H., Ausbacher D., Hass H., Brandl M. (2010). *Liposome fractionation and size analysis by asymmetrical flow field-flow fractionation/multi-angle light scattering: influence of ionic strength and osmotic pressure of the carrier liquid*. Chem Phys Lipids 163:141-147.
- Kanter P., Bullard G., Pilkiewicz F., Mayer L., Cullis P., Pavelic Z. (1992). *Preclinical toxicology study of liposome encapsulated*

doxorubicin (TLC D-99): Comparison with doxorubicin and empty liposomes in mice and dogs. In Vivo. 7:85-95.

- Klibanov A. L., Maruyama K., Torchilin V. P., Huang L. (1990). *Amphipatic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. Feder. Of Europ. Biochem. Soc. Lett. 268:235-238.*

- Krishna R., Mayer L. D. (1999). *The use of liposomal anticancer agents to determine the roles of drug pharmacodistribution and P-glycoprotein (PGP) blockade in overcoming multidrug resistance (MDR). Anticancer Res. 19:2885-91.*

- Lasic D. D. (1995). *Mechanism of liposome formation. J. of Liposome Res. 5(3):431-433.*

- Lasic D. D., Joannic R., Keller B.C., Frederik P.M., Auvray L. (2001). *Spontaneous vesiculation. Adv. Colloid. Interf. Sci. 337:89-90.*

- Lee S.-C., Lee K.-E., Kim J.-J., Lim S.-H. (2005). *The Effect of Cholesterol in the Liposome Bilayer on the Stabilization of Incorporated Retinol. J. of Lipos. Res. 15(3-4):157-166.*

- Lesier S., Grabielle-Madelmont C., Paternostre M. T., Olivon M. (1991). *Size analysis and stability study of lipid vesicles by high performance gel exclusion chromatography, turbidity and dynamic scattering. Anal. Biochem. 192:334-343.*

- Li W., Nicol F., Szoka F. C., Jr. (2004). *GALA: a designed synthetic pH-responsive amphipathic peptide with applications in drug and gene delivery. Adv. Drug Deliv. Rev. 56:967-985.*

- Liu D. Z., Chen W. Y., Tasi L. M., Yang S. P. (2000). *Microcalorimetric and shear studies on the effects of cholesterol on the physical stability of lipid vesicles. Colloids Surfaces. 172:57-67.*

- Maestrelli F., Gonzalez-Rodriguez M. L., Rabasco A. M., Ghelardini C., Mura P. (2010). *New “drug-in cyclodextrin-in deformable liposomes” formulations to improve the therapeutic efficacy of local anaesthetics*. Intern. J. of Pharm. 395:222-231.
- Maestrelli F., Gonzalez-Rodriguez M. L., Rabasco A. M., Mura P. (2005). *Preparation and characterization of liposomes encapsulating ketoprofen–cyclodextrin complexes for transdermal drug delivery*. Intern. J. of Pharmac. 298:55-67.
- Maestrelli F., Gonzalez-Rodriguez M. L., Rabasco A. M., Mura P. (2006). *Effect of preparation technique on the properties of liposomes encapsulating ketoprofen-cyclodextrin complexes aimed for transdermal delivery*. Intern. J. of Pharmac. 312:53-60.
- Mayer L. D., Hope M. J., Cullis P. R. (1986). *Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure*. Biochim. Biophys. Acta. 858:161-168.
- Mouritsen O. G., Bagatolli L. A. (2015). *Lipid domains in model membranes: a brief historical perspective*. Essays In Biochemistry. 57:1-19.
- Mozafari M. R., Mortazavi S. M. (2005). *Nanoliposomes: From Fundamentals To Recent Developments*. Trafford Publishing Ltd, Oxford, UK. ISBN 1-4120-5545-8.
- Mui B., Chow L., Hope M. J. (2003). *Extrusion technique to generate liposomes of defined size*. Methods Enzymol. 367:3-14.
- Nayar R., Hope M. J., Cullis P.R. (1989). *Generation of large unilamellar vesicles from long-chain saturated phosphatidylcholines by extrusion technique*. Biochim. Biophys. Acta. 986:200-206.

- Nirale N. M., Vidhate R. D., Nagarsenker M. S. (2009). *Fluticasone propionate liposomes for pulmonary delivery*. Indian J. Pharm. Sci. 71:709-711.
- Nisini R., Poerio N., Mariotti S., De Santis D., Fraziano M. (2018). *The Multirole of Liposomes in Therapy and Prevention of Infectious Diseases*. Frontiers in Immunology. 9(155):1-23.
- Niu Y., Ke D., Yang Q., Wang X., Chen Z., An X., Shen W. (2012). *Temperature-dependent stability and DPPH scavenging activity of liposomal curcumin at pH 7.0*. Food Chem. 135:1377-1382.
- Odeh F., Ismail S. I., Abu-Dahab R., Mahmoud I. S. (2012). *Thymoquinone in liposomes: a study of loading efficiency and biological activity towards breast cancer*. Drug Delivery. 19(8):371-377.
- Olson F., Hunt C., Szoka F., Vail W., Papahadjopoulos D. (1979). *Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes*. Biochim. Biophys. Acta. 557:9-23.
- Ong S. G. M., Chitneni M., Lee K. S. Ming L. C., Yuen K. H. (2016). *Evaluation of Extrusion Technique for Nanosizing Liposomes*. Pharmaceutics. 8(36):1-12.
- Özcan I., Segura-Sánchez F., Bouchemal K., Sezak M., Özer Ö, Güneri T., Ponchel G. (2010). *Pegylation of poly(γ -benzyl-L-glutamate) nanoparticles is efficient for avoiding mononuclear phagocyte system capture in rats*. Int. J. Nanomed. 5:1103-1111.
- Papahadjopoulos D., Gabizon A. (1987). *Targeting of liposomes to tumor cells in vivo*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 507:64-74.
- Pathak S. K., Mishra R., Kumar S., Prakash G., Parthasarthy R. (2012). *Effect of cholesterol concentration on size of liposome*. J. of Pharm. And Biolog. Sci. 1(1):50-53.

- Piel G., Piette M., Barillaro V., Castagne D., Evrard B., Delattre L. (2006). *Betamethasone-in-cyclodextrin-in-liposome: The effect of cyclodextrins on encapsulation efficiency and release kinetics*. Intern. J. of Pharmac. 312:75-82.
- Poon W., Zhang Y. N., Ouyang B., Kingston B. R., Wu J. L. Y., Wilhelm S. y Chan W. C.W. (2019). *Elimination Pathways of Nanoparticles*. ACS Nano. 13:5785-5798.
- Robson A. L., Dastoor P. C., Flynn J., Palmer W., Martin A., Smith D. W., Woldu A., Hua S. (2018). *Advantages and Limitations of Current Imaging Techniques of Characterizing Liposome Morphology*. Front. in Pharm. 9(80):1-8.
- Roy B., Guha P., Bhattarai R., Nahak P., Karmakar G., Chettri P., Panda A. K. (2016). *Influence of Lipid Composition, pH, and Temperature on Physicochemical Properties of Liposomes with Curcumin as Model Drug*. J. of Oleo Sci. 65(5):399-411.
- Ruozi B., Belletti D., Tombesi A., Tosi G., Bondioli L., Forni F., Vandelli M. A. (2011). *AFM, ESEM, TEM, and CLSM in liposomal characterization: a comparative study*. Int. J. Nanomed. 6:557-563.
- Samad A., Sultana Y., Aqil M. (2007). *Liposomal Drug Delivery Systems: An Update Review*. Cur. Drug Deliv. 4:297-305.
- Schlieper P., Medda P. K., Kaufmann R. (1981). *Drug-induced zeta potential changes in liposomes studied by laser Doppler spectroscopy*. Biochim. Biophys. Acta. 644:273-283.
- Schneider T., Sachse A., Rößling G., Brandl M. (1995). *Generation of contrast carrying liposomes of defined size with a new continuous high pressure extrusion method*. Int. J. Pharm. 117:1-12.

- Shaker S., Gardouh A. R., Ghorab M. M. (2017). *Factors affecting liposomes particle size prepared by ethanol injection method*. Res. Pharm. Sci. 12(5):346-352.
- Sharma D., Aara, A., Ali E., Trivedi L. (2018). *An Updated Review On: Liposomes as Drug Delivery System*. Pharmatutor. 6(2):50-62.
- Shashi K., Satinder K., Bharat P. (2012). *A complete review on: liposomes*. Intern. Res. J. of Pharm. 3(7):10-16.
- Sheoran R., Lal S., Chawla V., Dureja H. (2019). *Recent Patents, Formulation Techniques, Classifications and Characterization of Liposomes*. Rec. Pat. on Nanotech. 13(1):17-27.
- Smith M. C., Crist R. M., Clogston J. D. y McNeil S. E. (2017). *Zeta potential: a case study of cationic, anionic and neutral liposomes*. Anal. Bioanal. Chem. 409(24):5779-5787.
- Socaciu C., Jessel R., Diehl H. A. (2000). *Competitive carotenoid and cholesterol incorporation into liposomes: effects on membrane phase transition, fluidity, polarity and anisotropy*. Chem. Phys. Lipids. 106(1):79-88.
- Suh J., Choy K. L., Lai S. K., Suk J. S., Tang B. C., Prabhu S., Hanes J. (2007). *PEGylation of nanoparticles improves their cytoplasmic transport*. Int. J. of Nanom. 2:735-741.
- Sulkowski W. W., Pentak D., Nowak K., Sulkowska A. (2005). *The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome*. J. of Mol. Struct. 744(737-747).
- Surianarayanan R., Shivakumar H. G., Veena N. S., K., V., Srisatava A. (2016). *Effect of simple Concentration on the Characterization of Liposomes using Dynamic light Scattering Technique*. Pharm. Methods. 7(1):70-74.

- Sykes E. A., Chen J., Zheng G., Chan W. C. (2014). *Investigating the impact of nanoparticle size on active and passive tumor targeting efficiency*. ACS Nano. 8(6):5696-5706.
- Takeuchi K., Ishihara M., Kawaura C., Noji M., Furuno T., Nakanishi M. (1996). *Effect of zeta potential of cationic liposomes containing cationic cholesterol derivatives on gene transfection*. FEBS Lett. 397:207-209.
- Tenzer S., Docter D., Kuharev J., Musyanovych A., Fetz V., Hecht R., Schlenk F., Fischer D., Kiouptsi K., Reinhardt C., Landfester K., Schild H., Maskos M., Knauer S. K., Stauber R. H. (2013). *Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology*. Nat. Nanotech. 8:772-781.
- Vali A. M., Toliyat T., Shafaghi B., Dadashzadeh S. (2008). *Preparation, optimization, and characterization of topotecan loaded PEGylated liposomes using factorial design*. Drug Dev. Ind. Pharm. 34:10-23.
- Valle M. J. J., Navarro A. S. (2015). *Liposomes Prepared in Absence of Organic Solvents: Sonication Versus Lipid Film Hydration Method*. Cur. Pharmac. An. 11:86-91.
- Veronese F.M., Harris J. M. (2002). *Introduction and overview of peptide and protein pegylation*. Adv. Drug Deliv. Rev. 54(4):453-456.
- Virden J. W., Berg J. C. (1992). *NaCl-Induced Aggregation of Dipalmitoylphosphatidylglycerol Small Unilamellar Vesicles with Varying Amounts of Incorporated Cholesterol*. Langmuir. 8:1532-1537.
- Yao L., Daniels J., Wijesinghe, D., Andreev O. A., Reshetnyak Y. K. (2013). *pHLIP(R)-mediated delivery of PEGylated liposomes to cancer cells*. J. Contr. Rel. 167:228-237.

- Zhang J. A., Pawelchaj J. (2000). *Effect of pH, ionic strength and oxygen burden on the chemical stability of EPC/cholesterol liposomes under accelerated conditions*. Eur. J. Pharm. Biopharm. 50:357-364.

CAPÍTULO 3.
ENCAPSULACIÓN DE
CAMPTOTECINA EN LOS
LIPOSOMAS

1. Introducción

Desde el descubrimiento de los liposomas en 1965 por parte de Alec Bangham (1965), estas partículas lipídicas han despertado gran interés en el campo de la administración de fármacos. Actualmente, los liposomas se utilizan para encapsular fármacos destinados al tratamiento de enfermedades como el cáncer, la administración de vacunas, al tratamiento de infecciones fúngicas, a la terapia fotodinámica y para tratamientos analgésicos (Bulkake et al., 2017). En el campo de los tratamientos oncológicos es donde más desarrollada se encuentra la tecnología liposomal. Existen numerosas preparaciones de liposomas que se utilizan en el tratamiento clínico contra el cáncer, totalmente seguras y con beneficios demostrados (Bulkake et al., 2017), las cuales se comentan a continuación.

Doxil® es una formulación liposomal compuesta por fosfatidilcolina de soja hidrogenada, colesterol y 1,2,-diastearoil-sn-glicero-3-fosfaetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (mPEG-DSPE) (Working y Dayan, 1996). Se desarrolló en 1995 para encapsular doxorubicina hidrociorada y es el primer sistema de liberación que ha sido aprobado por la FDA de los Estados Unidos. Se administra por vía intravenosa y se utiliza para el tratamiento del cáncer de ovario avanzado, mieloma múltiple y sarcoma de Kaposi asociado al Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

La formulación Doxil® abrió el camino a la investigación en este campo, por lo que después se han desarrollado gran cantidad de sistemas como son DaunoXome® (con daunorrubicina), Depocyt® (con citarabina), Myocet® (con doxorubicina, similar a Doxil®, pero sin PEG, con el objetivo de disminuir los efectos secundarios del síndrome mano-pie), Mepact® (con mifamurtida), Marqibo® (con vincristina), Onivyde®

(con Irinotecán) y Vyxeos[®] (con citarabina y daunorrubicina) (Bulkake et al., 2017), entre otros.

1.1. Encapsulación de fármacos en los liposomas

La encapsulación de fármacos en liposomas se puede realizar de dos formas diferentes: encapsulación pasiva o directa y encapsulación activa o mediante gradiente de pH (Akbarzadeh et al., 2013; Griffin et al., 2019; Mazen y Rivas, 2019).

La encapsulación pasiva consiste en internalizar el fármaco en los liposomas durante el proceso de formación de los mismos. Por lo tanto, el fármaco debe de estar presente en el disolvente acuoso con el que se hidratan los liposomas para que en el momento en que se produce la reorganización y curvamiento de la bicapa lipídica, este sea englobado en el interior del núcleo hidrofílico de los mismos. La cantidad de fármaco encapsulado va a depender de las interacciones fármaco-lípido y del volumen que pueda ser encapsulado (Sur et al., 2014). Del mismo modo, la eficiencia de encapsulación (EE) está limitada también por la solubilidad del fármaco (Pattni et al., 2015). En general, es baja y sólo cuando se encapsulan fármacos solubles en agua se consigue aumentar la cantidad de fármaco internalizado (Akbarzadeh et al., 2013; Griffin et al., 2019). Por lo tanto, la encapsulación pasiva tiene los inconvenientes de presentar una baja EE y, además, para algunos sistemas, existe el inconveniente adicional de la rápida fuga de los fármacos encapsulados.

La encapsulación activa se basa en realizar la carga del fármaco después de la formación de los liposomas. El mecanismo de internalización consiste en la creación de un gradiente de pH transmembrana entre los liposomas y el disolvente en el que se encuentra el fármaco (Dos Santos et al., 2005; Odeh et al., 2019). Para ello, los

liposomas se forman en un medio a un determinado valor de pH, que dependerá de la naturaleza del fármaco. El pH estará por encima del pKa si el fármaco tiene un comportamiento ácido o por debajo del pKb, en el caso de que el fármaco tenga un comportamiento básico. Por lo tanto, el fármaco se disuelve en una disolución acuosa a un pH en el que se encuentre en forma neutra. Posteriormente, ambos medios se ponen en contacto estando en exceso de volumen la disolución que contiene el fármaco (Sur et al., 2014; Fatima et al., 2018). De este modo, se crea un gradiente transmembrana de pH entre el disolvente del interior de los liposomas y la disolución exterior. Este gradiente de pH es la fuerza que impulsa que el fármaco, por difusión, entre en el interior de los liposomas donde se ioniza (Mayer et al., 1993). Una vez que el fármaco está en el interior de los liposomas es más complicada su liberación, pues las moléculas cargadas difunden poco a través de la bicapa lipídica (Hwang et al., 1999) y la afinidad por el núcleo acuoso impide su salida (Cern et al., 2012; Spina et al., 2018). El método de gradiente de pH transmembrana se utiliza en la clínica para tratar la intoxicación cardiovascular por determinados fármacos susceptibles a ionizarse en el interior del liposoma. Para ello, los liposomas son introducidos en el torrente sanguíneo del paciente, de forma que el fármaco presente en la sangre entrará en los liposomas gracias al gradiente de pH existente entre el plasma sanguíneo y el interior de los liposomas. Los liposomas serán eliminados del cuerpo por vía hepática (Bertrand et al., 2010).

En general, el empleo de los métodos de carga activa produce una mayor EE que con los métodos pasivos (Pattni et al., 2015). Para que esta técnica tenga una alta eficacia, es necesario que el fármaco posea una estructura que permita una fácil penetración y difusión a través de la bicapa lipídica, que pueda transformarse en una especie cargada (ser

ionizable), además de tener una alta solubilidad en medio acuoso. Estos requisitos los cumplen los ácidos y bases débiles o fármacos ionizables, mientras que aquellos que no poseen alguna de estas características podrían modificarse químicamente con grupos cargados para facilitar su entrada, aunque la modificación covalente podría generar una alteración de las propiedades químicas y biológicas de la molécula. Otra alternativa es el empleo de ciclodextrinas modificadas con grupos ionizables que, además, aumentan la solubilidad del fármaco (Sur et al., 2014, Fatima et al., 2018).

Existen diferentes combinaciones de disoluciones acuosas que se pueden utilizar para aplicar la metodología de gradientes de pH (Gubernator, 2011). Las más importantes se mencionan a continuación.

El método de citrato se basa en la formación de liposomas en tampón citrato de pH 4. Después, los liposomas se ponen en contacto con una disolución de fármaco a pH 7,4 mantenido por la disolución reguladora de ácido 4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-iletanosulfónico (HEPES). Este método fue ideado por Bally et al. (1988) y logró encapsular gran cantidad de antraciclinas como la doxorubicina o la daunorubicina con una EE cercana al 100% (Dos Santos et al., 2005). Siguiendo esta metodología se han desarrollado dos sistemas liposomales muy utilizados en la clínica, Myocet® y DaunoXome® (Swenson et al., 2001).

El método del amonio (Haran et al., 1993) consiste en la formación de un gradiente de pH entre los liposomas formados en una disolución reguladora de sulfato de amonio a pH 5,5 y el fármaco disuelto en una disolución reguladora a pH 7,4. Este método se aplica para encapsular la doxorubicina y dar lugar a una de las formulaciones lipídicas más conocidas, Doxil® (Barenholz et al., 1996).

1.2. Los liposomas y el efecto EPR

El gran éxito en terapia de las formulaciones liposomales se debe a su direccionalidad pasiva, que es consecuencia del tamaño y la forma de los liposomas en combinación con las propiedades del microambiente tumoral (Maeda et al., 2009). La direccionalidad pasiva está íntimamente relacionada con el efecto EPR, fenómeno por el cual las partículas de un tamaño superior a 100 nm quedan atrapadas en las proximidades del tumor, promoviendo un transporte selectivo hacia el interior de las células tumorales (Maeda et al., 2009). El microambiente tumoral, tan distinto al del resto del organismo, inicia su desarrollo cuando el tejido tumoral alcanza un tamaño de 2-3 mm, momento en que se inicia un proceso de angiogénesis que se caracteriza por la formación de nuevos vasos sanguíneos en las proximidades del tumor para satisfacer las demandas de nutrientes y oxígeno (Hobbs et al., 1998). Este microambiente contiene vasos sanguíneos irregulares, defectuosos, dilatados y con células endoteliales desorganizadas, generando grandes fenestraciones con apertura de vasos sanguíneos y existencia de lagunas. Del mismo modo, tanto las células perivasculares y la membrana basal, como las células del músculo liso, están ausentes o son anormales (Heldin et al., 2004) (Figura 3.1).

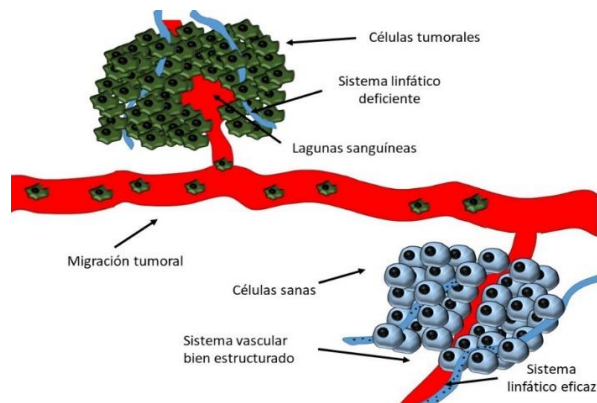


Figura 3.1. Diferencias principales entre tejido tumoral y tejido sano.

Las citadas características del microambiente tumoral hacen que las macromoléculas y nanopartículas que entran en el espacio intersticial del tumor queden retenidas en las proximidades de este durante más tiempo, aumentando el tiempo de residencia para que los sistemas puedan ejercer su acción antitumoral, mientras el flujo sanguíneo continúa. Todo ello se ve favorecido por el deficiente y lento retorno sanguíneo y el escaso drenaje del sistema linfático (Krascini et al., 2003).

La direccionalidad pasiva es posible cuando los vehículos utilizados poseen un tamaño pequeño, pero lo suficientemente grande como para que queden retenidos (entre 100-150 nm como tamaños ideales), son de forma esférica, carga superficial neutra y elevada hidrofilia (Thurson et al., 1998). Esto último se consigue incorporando cadenas de PEG o poloxámeros en la superficie de los transportadores, de modo que el vehículo permanece durante más tiempo en el torrente circulatorio sin ser eliminado por el Sistema Fagocítico Mononuclear, aumentando las probabilidades de que llegue al microambiente tumoral (Maeda et al., 2009). Por lo tanto, a la hora de sintetizar los liposomas es necesario tener en cuenta este conjunto de requisitos.

En el campo de los liposomas existe discordancia en relación a las ventajas o inconvenientes que poseen los liposomas no dirigidos (direccionalidad pasiva) en comparación con los dirigidos con ligando (direccionalidad activa), ya que hay investigaciones que están a favor de la direccionalidad con ligando, abogando por mejoras en su tiempo de circulación (Park et al., 2002; Ran et al., 2018), mientras que otros trabajos no observaron estas ventajas (Goren et al., 1996; Attia et al., 2019). En un inicio, los liposomas que poseen anticuerpos para ser dirigidos hacia un ligando presente en las células diana parecían una gran promesa, pero su principal inconveniente es que son eliminados

rápida de la circulación por el Sistema Fagocítico Mononuclear, cuando se probaron en sistemas *in vivo* (Papahadjopoulos y Gabizon, 1987). Conscientes de este problema y teniendo en cuenta el descubrimiento de los liposomas de larga circulación o liposomas PEGilados, se combinaron ambas técnicas, pero el anticuerpo fue enmascarado por las moléculas de PEG, impidiendo su unión con el antígeno (Mori et al., 1991). Lo cierto es que ambos tipos de liposomas son dirigidos a las células diana por el mismo mecanismo de distribución pasiva, por lo que la utilización de ligandos en las partículas no aumenta la cantidad de liposomas en contacto con el microambiente tumoral (Riviere et al., 2011), ya que todas deben de atravesar barreras anatómicas y fisiológicas que varían con el tipo y localización del tumor (Charrois y Allen, 2003). Por ello, si se tiene en cuenta que los dos tipos de liposomas poseen una vida media similar, la utilización de estas partículas con ligandos dará lugar a poca o ninguna mejora en comparación con los liposomas sin ligando (Goren et al., 1996).

Por otra parte, cabe destacar que pocas formulaciones de direccionalidad activa han llegado a ensayos clínicos, mientras que decenas de formulaciones liposomales con direccionalidad pasiva se utilizan actualmente para el tratamiento de enfermedades. Esto se debe a que la eficacia de la direccionalidad activa depende de muchos factores como son la permeabilidad de la vasculatura, la penetrabilidad del tumor, la densidad del antígeno, la afinidad por los ligandos utilizados y la barrera del sitio de unión, a lo que se suma su elevado coste de producción (Jain, 2010).

Por todo ello, en este trabajo se van a utilizar liposomas convencionales y PEGilados sin adición de un ligando que confiera una direccionalidad activa específica.

1.3. Sistemas de liposomas para encapsular camptotecina

El primer trabajo que describe la encapsulación de camptotecina (CAMP) en sistemas lipídicos fue realizado por Burke et al. (1992). En esta investigación se formaron liposomas a partir de dipalmitoilfosfatidilcolina o dipalmitoilfosfodilglicerol, y se logró una encapsulación de $6,6 \cdot 10^{-3}$ mg CAMP/mg lípido. Posteriormente, Cortesi et al. (1997) formaron liposomas con camptotecina compuestos de fosfatidilcolina, colesterol y un surfactante iónico (fosfato de dicetilo). Emplearon el método de la capa fina para formar los liposomas a la vez que tenía lugar la encapsulación directa de la camptotecina. De esta manera consiguieron encapsular una concentración de camptotecina de entre $3,7 \cdot 10^{-4}$ M y $6,5 \cdot 10^{-4}$ M. Saetern et al. (2004) consiguieron encapsular una concentración de camptotecina de $2,9 \cdot 10^{-4}$ M en liposomas sintetizados con fosfatidilcolina y colesterol por metodologías directas. De modo similar, Watanabe et al. (2008) sintetizaron liposomas siguiendo el método de la capa fina de forma directa, mezclando el ácido lipídico 3,5-bis (dodeciloxi)benzoico artificial con liposomas con PEG y seroalbúmina humana en diferentes concentraciones, consiguiendo encapsular camptotecina en concentraciones de $1,2 \cdot 10^{-3}$ y $1,1 \cdot 10^{-3}$ M, en función de la composición de los liposomas. En ese mismo año, Maitani et al. (2008) sintetizaron liposomas formados por fosfatidilcolina, colesterol y ácido oleico, junto con la incorporación de los lípidos artificiales 4-n-(M12B), 3,5-bis(B12B) y 3,4,5-tris(dodeciloxi) ácido benzoico. Estos sistemas lipídicos encapsularon una concentración de camptotecina de $6,3 \cdot 10^{-4}$ M. Otros autores formaron sistemas lipídicos, pero no determinaron la concentración de camptotecina encapsulada (tampoco fue posible calcularla), indicando únicamente las EE. Estos autores son Sugarman et al. (1996) y Lin et al. (2013). Sugarman et al.

(1996) desarrollaron un complejo lipídico de N-glutaril-fosfatidiletanolamina y camptotecina a través del método de hidratación de la capa fina, obteniendo una EE menor al 5%. Posteriormente, Lin et al. (2013) sintetizaron liposomas formados por fosfatidilcolina, colesterol y estealilamina a la que unieron la α -MSH con el objetivo de conseguir una direccionalidad hacia las células de melanoma, a partir de la técnica de hidratación de la capa fina y de forma directa. Estos experimentos obtuvieron una EE del 100%.

Además de encapsular camptotecina, otros autores también utilizaron liposomas para la internalización de los derivados más solubles de la camptotecina, como Topotecán (Ma et al., 2012), Irinotecán (Zhang et al., 20016; Atyabi et al., 2009; Fang et al., 2016; Rehman et al., 2016), Lurcotecán (García-Carbonero y Supko, 2002), 9-nitrocampotecina (Knight et al., 1999) o dímeros de camptotecina (Fang et al., 2018). El inconveniente de estos sistemas es que necesitan formar un compuesto sintético a partir de la camptotecina, con el gasto económico que eso conlleva, así como con la pérdida de toxicidad producida por la modificación química (Fatima et al., 2018).

2. Objetivos

En el capítulo anterior se abordó el estudio de la metodología para la obtención y caracterización de dispersiones liposomales en agua y a diferentes valores de pH (3,5 y 7,4). Este capítulo se centra, principalmente, en el estudio de la encapsulación de camptotecina en los liposomas, así como en el estudio de la estabilidad del sistema de liposomas-fármaco.

El objetivo general es obtener un sistema liposómico estable y con la mayor concentración de camptotecina posible en su interior. Los objetivos parciales que se proponen en este capítulo son los siguientes.

- Estudiar la encapsulación de la camptotecina y de su complejo de inclusión con la CMCD en los liposomas convencionales y PEGilados. Para ello, se van a utilizar diferentes metodologías de encapsulación (carga activa y pasiva).
- Caracterizar la cinética de liberación de la camptotecina encapsulada en forma de complejo de inclusión en los liposomas convencionales a pH 3,5 en tampón citrato y a 7,4 en PBS.

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales y equipos

Los materiales empleados en estos experimentos fueron los lípidos: L- α -fosfatidilcolina hidrogenada (Avanti Polar Lipids Inc., Estados Unidos), colesterol $\leq 99\%$ (Sigma-Aldrich, Alemania) y 1-2,-Distearoil-sn-Glicero-3-fosfoetanolamina-N-[Metoxi(Polietileno glycol)-2000] (DSPE-PEG2000) (sal de amonio) (Avanti Polar Lipids Inc., Estados Unidos). Además, se utilizó camptotecina (CAMP) (Alfa Aesar, Estados Unidos), carboximetil- β -ciclodextrina (CMCD) (Sigma-Aldrich, Alemania), disolución tampón fosfato salino (PBS, pH=7,4, cuya composición es 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 8 mM de Na₂HPO₄ y 2 mM de KH₂PO₄, Sigma-Aldrich, Alemania), disolución tampón citrato (pH=3,5, cuya composición es ácido cítrico (C₂H₈O₇) 0,1 M, NaOH 1 M (5:1) y HCl 0,1 M, Sigma-Aldrich, Alemania), metanol (VWR Chemicals BDH, Estados Unidos), etanol absoluto (VWR Chemicals BDH, Estados Unidos), filtros de jeringuilla de nylon de 0,45 μ m (Perkin Elmer, Estados Unidos), cubetas de espectrofotómetro y

espectrofluorímetro de cuarzo de dimensiones 1 x 1 cm (Hellma™, Alemania), kit de membranas de diálisis PurA-Lyzer™ Maxi 3500 de 3,5 kDa de tamaño de poro (Sigma-Aldrich, Alemania), cubetas de polietileno para determinar el tamaño de los liposomas (Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) y cubetas de determinación del potencial Z (Zetasizer nano series, Malvern, Reino Unido).

Para la determinación de la concentración inicial de fármaco en disolución acuosa se utilizó un espectrofotómetro (UV-1800 Shimadzu UV Spectrophotometer, Japón), para la determinación de la concentración de fármaco encapsulada se empleó un fluorímetro (Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer, Varian, Estados Unidos) y para mantener la temperatura estable un termostatazador de fluorímetro (Varian Cary Peltier Temperature Controller, Estados Unidos). Por otra parte, para medir la distribución de tamaños de las partículas y su potencial zeta se utilizó un Zetasizer (Nano series, Malvern, Reino Unido) y para disminuir el tamaño de los liposomas formados se empleó un sonicador (Startsonic 90, Liarre Digit, Chipre).

3.2. Metodología

3.2.1. Tiempo necesario para dializar una disolución saturada de camptotecina

El cálculo del tiempo necesario de diálisis es un parámetro previo que es necesario conocer para poder plantear la metodología de las etapas posteriores. A través de la diálisis se garantiza que toda la camptotecina que no es encapsulada en los liposomas se pueda eliminar y así poder cuantificar la que sí es encapsulada. Se eligió la diálisis por tratarse de un método reproducible, fácil de realizar y económico (Lin y Qi, 2019). Para establecer el tiempo de diálisis, se preparó una disolución saturada

de camptotecina en PBS a pH 7,4 y se midió la absorbancia para conocer el valor inicial. Esta disolución se introdujo en una membrana de diálisis con un tamaño de poro de 3 kDa y se dializó frente a PBS, tal y como se muestra en la Figura 3.2. El sistema se mantuvo en agitación durante 24 horas y se midió su absorbancia. A continuación, se renovó la disolución de diálisis con PBS limpio y se mantuvo agitando otras 24 h. Este procedimiento se repite hasta que el valor de absorbancia de la disolución sea cero, es decir, hasta que el fármaco se haya liberado por completo.

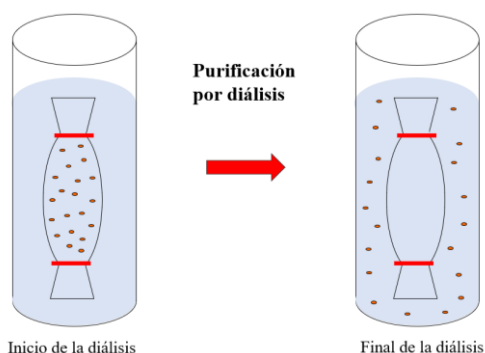


Figura 3.2. Proceso de diálisis para purificar los liposomas cargados.

La evolución de la absorbancia con el tiempo y los diferentes ciclos realizados se muestran en la Figura 3.3.

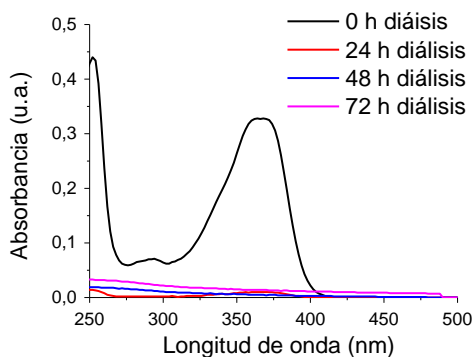


Figura 3.3. Absorbancia del fármaco en el interior de la membrana de diálisis a las 0, 24, 48 y 72 horas.

La absorbancia inicial (tiempo 0) de la disolución saturada de fármaco en PBS fue de 0,326. Pasadas las primeras 24 horas, la absorbancia disminuyó a 0,010, lo que indica que el 97% del fármaco fue liberado durante el primer día. A partir de ese momento, a 48 y 72 h no se observó ninguna banda que correspondiera con la absorción de la camptotecina, por lo que se considera que antes de las 48 horas todo el fármaco se eliminó a través de la membrana de diálisis por difusión.

Por lo tanto, se estableció un tiempo de 36 horas para todos los procesos de diálisis que se describirán en las diferentes metodologías de este trabajo. Tiempos similares son utilizados por otros autores en los procesos de purificación de los liposomas (Lin y Qi, 2019). En cambio, algunos investigadores utilizaron tiempos algo menores de 24 horas, pero con temperaturas de 4°C (Yoon et al., 2017; Deshantri et al., 2019), mientras que Sur et al. (2014) mantuvieron la diálisis durante 12 horas a temperatura ambiente.

3.2.2. Formación de la película de lípidos

Los liposomas convencionales se formaron a partir de una película de lípidos que contenía 381 mg de fosfatidilcolina y 193,32 mg de colesterol, en una relación molar 50:50. Los liposomas PEGilados se prepararon a partir de 381 mg de L- α -fosfatidilcolina hidrogenada, 174 mg de colesterol y 140 mg de DSPE-PEG2000, en una relación molar 50:45:5. Para formar la película, los lípidos se disolvieron en 25 mL de cloroformo y este disolvente se evaporó mediante vacío utilizando un rotavapor durante 2 horas. Finalmente, se secó el residuo de cloroformo mediante vacío durante 5 horas.

3.2.3. Preparación de disoluciones saturadas de camptotecina

Se prepararon dos tipos de disoluciones saturadas formadas por camptotecina o el complejo de inclusión de carboximetil- β -ciclodextrina y camptotecina (CMCD-CAMP) a pH 7,4 y 3,5; en función del experimento realizado.

1. Disolución saturada de camptotecina a pH 7,4 o 3,5: se preparó disolviendo 3 mg de camptotecina en 25 mL de PBS o tampón citrato, según el caso. La mezcla se agitó durante toda la noche protegida de la luz para evitar la degradación del fármaco y, posteriormente, se filtró con una jeringuilla a través de un filtro de nylon de 0,45 μm .

2. Disolución que contiene el complejo de inclusión CMCD-CAMP: se disolvieron 1,7 mg de camptotecina en 670 μL de metanol para mejorar su solubilidad y la disolución resultante se sonicó durante 5 minutos para eliminar los agregados. Esta mezcla se añadió a una disolución de 10 ml de PBS o tampón citrato con CMCD 14 mM (196 mg de CMCD/10 mL del disolvente). Esta disolución final se mantuvo en agitación durante toda la noche resguardada de la luz. A continuación, se evaporó el metanol en un rotavapor. Después, la mezcla se filtró con una jeringuilla a través de un filtro de nylon de 0,45 μm .

Se determinó la absorbancia de cada una de las disoluciones mediante espectrofotometría, para conocer la concentración de fármaco de partida. Para ello, se emplearon los siguientes coeficientes de extinción molar: 27.530 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para PBS y 22.240 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para tampón citrato (Nunzio et al., 2011).

3.2.4. Encapsulación de la camptotecina por métodos pasivos

Se encapsuló la camptotecina de manera directa durante el proceso de formación de los liposomas y, para ello, se realizaron los siguientes pasos.

1^{er} paso: se hidrató la película lipídica con 10 mL de una de las disoluciones de camptotecina descritas en el apartado anterior 3.2.3.

2^o paso: la suspensión de liposomas resultante del paso 1 se sonicó durante 30 minutos para ayudar a la formación de las partículas. Esta mezcla se incubó durante 2 horas a 55 o 65°C utilizando un baño de agua.

3^{er} paso: finalmente, los liposomas se dializaron frente a 200 mL de PBS o tampón citrato (en función de la disolución empleada) durante 36 horas para eliminar el fármaco que no se había encapsulado, utilizando una membrana de diálisis que permite el paso de moléculas con masa molar de hasta 3,5 kDa. Al cabo de 24 horas, la disolución frente a la que se dializó la muestra se sustituyó por otra nueva.

Para los liposomas PEGilados se utilizó la misma metodología que para los liposomas convencionales. Sin embargo, estos liposomas se prepararon únicamente en PBS a pH 7,4; con la disolución del fármaco libre o con la disolución del complejo de inclusión CMCD-CAMP.

3.2.5. Encapsulación da la camptotecina por métodos activos

La camptotecina se encapsuló utilizando un gradiente de pH entre los liposomas y el medio en el que estaba el fármaco. Para ello, se realizaron los siguientes pasos.

1^{er} paso: la película lipídica de los dos sistemas de liposomas, (convencionales o PEGilados) se hidrató con 10 mL de PBS a pH 7,4 para obtener una dispersión de liposomas a pH 7,4.

2^o paso: aproximadamente 2,8 mL de la dispersión de liposomas se introdujeron en una membrana de diálisis de 3,5 kDa, que se sumergió en un vaso con 200 mL de una disolución saturada de camptotecina (libre o en forma de complejo de inclusión) de pH 3,5. Este sistema se mantuvo en agitación durante 24 horas. Se estudiaron diferentes temperaturas de incubación: 25°C, 37°C y 55°C durante 30 min, durante 2 horas o durante 4 horas, tiempo después del cual se mantendrían a 25°C hasta completar las 24 horas del experimento. En el caso de los liposomas PEGilados, se encapsuló de la misma manera el fármaco libre y el complejo de inclusión CMCD-CAMP, manteniendo el proceso únicamente durante 2 h a 55°C y el resto del tiempo, hasta completar las 24 h, a 25°C.

3^{er} paso: los liposomas se dializaron frente a 200 mL de una disolución de PBS durante 36 horas, sustituyendo el disolvente a las 24 horas.

3.2.6. Determinación de la cantidad de camptotecina encapsulada por los liposomas

Los liposomas cargados con la camptotecina (1mL) se rompieron mediante la adición de MeOH (3mL) en el caso de los liposomas convencionales (Miao et al., 2014) o de EtOH (3mL) para los liposomas PEGilados (Leung et al., 2019). Cada muestra se centrifugó a 7500 rpm durante 7 minutos y dos veces, para eliminar los liposomas rotos. Finalmente, el sobrenadante que contenía el fármaco libre se analizó mediante fluorimetría.

Las condiciones para trazar los espectros fueron: temperatura de 35°C, excitación a 358 nm (con voltaje medio) y la emisión se adquirió entre 372 y 700 nm. La única diferencia entre disolventes es que en PBS la apertura de ambas ventanas fue de 10, mientras que en tampón citrato fue de 5.

Para poder relacionar la intensidad de fluorescencia con la concentración de camptotecina y así poder cuantificar la cantidad de fármaco encapsulado, es necesario obtener una recta patrón a partir de disoluciones de camptotecina cuya concentración se conoce.

Para realizar la recta patrón que relacione la fluorescencia con la camptotecina se siguieron los siguientes pasos.

1^{er} paso: se disolvieron 10 mg de camptotecina en 30 mL de MeOH/EtOH y se agitó esta disolución durante 10 minutos mediante agitación orbital. La concentración de camptotecina obtenida fue de $9,47 \cdot 10^{-4}$ M.

2^o paso: a partir de la disolución del primer paso, por adición de 10 mL de PBS/tampón citrato, se preparó una disolución de camptotecina de $3,75 \cdot 10^{-5}$ M. A partir de ella, se prepararon disoluciones hijas por dilución de la mezcla de disolventes de PBS/tampón citrato:MeOH/EtOH con relación de volumen 1(agua):3(alcohol). Las disoluciones preparadas tenían concentraciones en el intervalo $1,50 \cdot 10^{-6}$ M - $8,64 \cdot 10^{-10}$ M.

3^{er} paso: se relacionó la intensidad de fluorescencia con la concentración para cada una de las disoluciones, obteniéndose así una recta de calibración.

Las condiciones para trazar los espectros fueron: temperatura de 35°C, excitación a 358 nm (con voltaje bajo) y la emisión se adquirió

entre 372 y 700 nm. La única diferencia entre disolventes es que en PBS la apertura de ambas ventanas fue de 10 y en tampón citrato fue de 5.

Las rectas patrón para la cuantificación de camptotecina por fluorimetría en los diferentes medios se recogen en la Tabla 3.1. Siempre que se cuantificó una concentración, se determinó la curva de calibración, con el fin de trabajar siempre en las mismas condiciones experimentales del instrumento. Por tanto, las rectas de calibración que se muestran en la tabla son sólo un ejemplo.

Tabla 3.1. Rectas patrón de fluorimetría que relacionan la concentración de camptotecina con la intensidad de fluorescencia.

Disolventes	Recta patrón	R ²
PBS:MeOH	$y = 9 \cdot 10^7 x + 0,5517$	0,995
	$y = 9 \cdot 10^7 x + 0,012$	0,999
Tampón citrato:MeOH	$y = 8 \cdot 10^7 x + 0,1625$	0,999
	$y = 8 \cdot 10^7 x + 1,3376$	0,998
PBS:EtOH	$y = 6 \cdot 10^7 x + 0,3077$	0,998
	$y = 6 \cdot 10^7 x + 0,2766$	0,999

a) Cálculo de la capacidad de carga

La capacidad de carga relaciona la cantidad de fármaco encapsulado con la masa de lípidos que forman los liposomas. Para calcularla, se determinó, en primer lugar, la masa de camptotecina (mg) por mililitro a partir de la concentración molar de fármaco encapsulado, obtenido gracias al valor de fluorescencia. Posteriormente, se calculó la masa de liposomas (mg) por mililitro. Finalmente, se relacionaron ambos valores para obtener la masa de camptotecina (mg) por masa de lípido (mg).

Este parámetro está relacionado con la concentración de camptotecina encapsulada, es decir, son equivalentes, por lo que en el apartado de resultados únicamente se comentarán los valores de concentración. En cambio, la capacidad de carga es muy importante para calcular la cantidad de liposomas necesarios para tratar a las líneas celulares en los estudios *in vitro*, explicados en el siguiente capítulo.

b) Cálculo de la eficiencia de encapsulación (EE)

La EE informa sobre el porcentaje de fármaco que se atrapa en los liposomas en función de la cantidad de camptotecina total utilizada para realizar la encapsulación (Kumari et al., 2014). Para calcular este parámetro se utilizaron diferentes ecuaciones en función del tipo de internalización realizada.

Cuando la encapsulación se llevó a cabo por la metodología directa, se determinó la concentración de fármaco solubilizado en el disolvente inicial con el que se hidrataron los liposomas a través de espectrofotometría ($[CAMP]_{total}$). Una vez se realizó la encapsulación, se rompieron los liposomas con MeOH/EtOH y se midió la concentración total de fármaco encapsulado que hay en su interior ($[CAMP]_{encap}$) (Costa et al., 2013; Deshantri et al., 2019). Posteriormente, se aplicó la siguiente ecuación (Ec. 3.1).

$$EE (\%) = [CAMP]_{encap} / [CAMP]_{total} \cdot 100 \quad \text{Ec. 3.1.}$$

Cuando la carga se realizó mediante gradiente de pH, se tuvo en cuenta la diferencia de volúmenes entre la dispersión de liposomas contenidos en la membrana de diálisis y el volumen exterior en donde se encontraba la camptotecina. Por lo tanto, se determinó la concentración de fármaco en la disolución inicial por espectrofotometría y, una vez que

se realizó la encapsulación, se rompieron los liposomas con MeOH/EtOH y se determinó por fluorescencia la concentración de fármaco encapsulado. Tras la obtención de ambos valores y teniendo en cuenta la diferencia de volumen, se aplicó la siguiente ecuación (Ec. 3.2).

$$EE (\%) = [\text{CAMP}]_{\text{encap}} \cdot V_{\text{lip}} / [\text{CAMP}]_{\text{total}} \cdot V_{\text{vaso}} \quad \text{Ec. 3.2.}$$

donde $[\text{CAMP}]_{\text{encap}}$ es la concentración de fármaco encapsulado, V_{lip} es el volumen de liposomas presente en la membrana de diálisis, $[\text{CAMP}]_{\text{total}}$ es la concentración de fármaco inicial y V_{vaso} es el volumen de la disolución de camptotecina en el vaso de precipitados.

3.2.7. Perfil de liberación de la camptotecina en liposomas

Para conocer la capacidad de liberación *in vitro* de la camptotecina en los liposomas se realizaron los siguientes pasos.

1^{er} paso: la camptotecina se encapsuló en los liposomas convencionales por una metodología directa a partir de una disolución que contenía el complejo de inclusión CMCD-CAMP a pH 7,4. La concentración de camptotecina encapsulada fue de $3,46 \cdot 10^{-6}$ M.

2^o paso: 500 μL de la dispersión de estos liposomas que contenían la camptotecina encapsulada se añadió a 2 mL de PBS a pH 7,4 o tampón citrato a pH 3,5. Estas disoluciones se midieron, por fluorescencia, en el momento inicial (tiempo 0) y a diferentes tiempos (al principio cada 30 min, después cada hora y, finalmente, cada tres horas).

Cabe destacar que todos los experimentos están realizados por triplicado, por lo que los resultados que se van a presentar son una media de todos los experimentos realizados.

4. Resultados y discusión

Se estudió la encapsulación de la camptotecina a partir de disoluciones que contenían la camptotecina o el complejo de inclusión (CMCD-CAMP) en liposomas convencionales y PEGilados. Se estudiaron las metodologías de encapsulación pasiva y activa, con el objetivo de comparar los resultados obtenidos y determinar la metodología que proporciona una mayor encapsulación del fármaco.

4.1. Encapsulación en liposomas convencionales

4.1.1. Encapsulación de la camptotecina en liposomas convencionales

En los próximos experimentos (a y b) se van a presentar los resultados de la encapsulación de camptotecina libre en los liposomas convencionales, a partir de métodos directos (encapsulación pasiva) e indirectos (gradiente de pH).

a) Encapsulación directa de la camptotecina en liposomas convencionales

La encapsulación directa se llevó a cabo mediante la formación de los liposomas en una disolución acuosa de camptotecina a pH 7,4 o 3,5.

La disolución de camptotecina en PBS a pH 7,4 presentaba una absorbancia de 0,458, valor que corresponde a una concentración de $1,67 \cdot 10^{-5}$ M ($\epsilon = 27.530 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). La disolución de camptotecina en tampón citrato a pH 3,5 tenía una absorbancia de 0,085, valor que corresponde con una concentración de $3,5 \cdot 10^{-6}$ M ($\epsilon = 22.240 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Como se observa en la Figura 3.4, la absorbancia a pH 3,5 y, por tanto, la concentración de camptotecina, es menor debido a la menor

solubilidad del fármaco. A pH 3,5 no se encuentra ionizado y es altamente insoluble, de acuerdo a la caracterización de la solubilidad de la camptotecina explicada en el Capítulo 1 (sección 4.2).

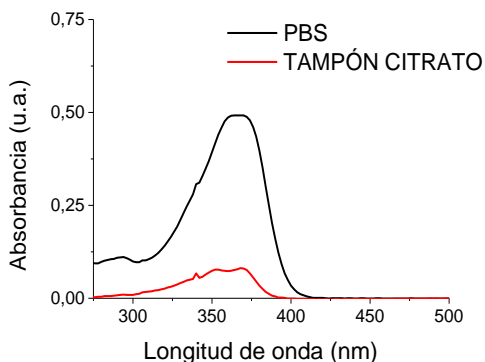


Figura 3.4. Absorbancia de la disolución de camptotecina con la que se hidrataron los liposomas a pH 7,4 en PBS (línea negra) y a pH 3,5 en tampón citrato (línea roja).

Estas disoluciones, en un volumen de 10 mL, se usaron para formar los liposomas, hidratando la película lipídica con ellas. La concentración de lípidos fue de 57,4 mg/mL.

Por lo tanto, con este método, el fármaco libre es embebido en el interior de los liposomas durante el proceso de autoformación y ensamblaje, sin necesidad de ningún paso adicional, tal y como se representa en la Figura 3.5.

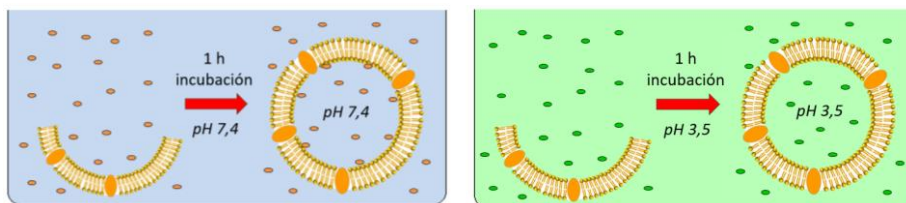


Figura 3.5. Encapsulación directa del fármaco libre a pH 7,4 y 3,5 en liposomas convencionales.

Después, la dispersión de liposomas se incubó a dos temperaturas, 55 y 65°C (en dos experimentos diferentes), durante 1 hora. Una vez se realizó la encapsulación, los liposomas se dializaron para liberar el fármaco que no fue incluido en el vector liposómico.

Para cuantificar la cantidad de camptotecina encapsulada, se rompieron mediante la adición de metanol (Miao et al., 2014). Es necesario romperlos ya que los liposomas presentan una marcada dispersión de luz que aumenta la línea de base en las espectroscopías usadas para la cuantificación: absorción y fluorescencia. Se determinó la intensidad de fluorescencia de la camptotecina en la disolución resultante. Los espectros de fluorescencia se muestran en la Figura 3.6, para las dos temperaturas a las que se equilibraron los liposomas en contacto con el fármaco, 55 y 65°C.

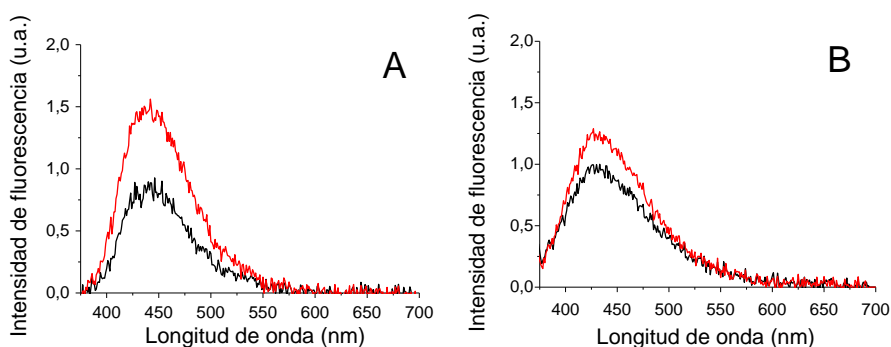


Figura 3.6. Espectros de fluorescencia de la camptotecina encapsulada a pH 7,4 en PBS (A) y a pH 3,5 en tampón citrato (B) a una temperatura de 55°C (línea negra) y 65°C (línea roja).

Esta intensidad se interpoló en la recta de calibración que relaciona la intensidad de fluorescencia con la concentración de disoluciones de camptotecina cuya concentración es conocida. Por tanto, con los valores de fluorescencia se calculó la concentración, la EE y la

capacidad de carga, la cual relaciona la masa de fármaco con la masa de lípido. Estos resultados se recogen en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Resultados de la encapsulación directa de camptotecina en los liposomas convencionales: concentración molar de la camptotecina en la dispersión de liposomas, relación de la cantidad de camptotecina (mg) por cantidad de lípido (mg) y eficiencia de encapsulación determinada por la ecuación 1, en función del pH del medio y de la temperatura de equilibración.

ENCAPSULACIÓN CAMP DIRECTA				
pH	T ^a (°C)	[CAMP] (M)	Capacidad de carga (mg CAMP/mg lípido)	EE (%)
7,4	55	$1,50 \cdot 10^{-8} \pm 0,27 \cdot 10^{-8}$	$0,91 \cdot 10^{-7} \pm 0,09 \cdot 10^{-7}$	$0,089 \pm 0,01$
	65	$3,93 \cdot 10^{-8} \pm 0,021 \cdot 10^{-8}$	$2,38 \cdot 10^{-7} \pm 0,014 \cdot 10^{-7}$	$0,26 \pm 0$
3,5	55	$4,69 \cdot 10^{-8} \pm 0,97 \cdot 10^{-8}$	$2,84 \cdot 10^{-7} \pm 0,29 \cdot 10^{-7}$	$1,95 \pm 0,34$
	65	$5,80 \cdot 10^{-8} \pm 0,57 \cdot 10^{-8}$	$3,51 \cdot 10^{-7} \pm 0,34 \cdot 10^{-7}$	$2,33 \pm 0,18$

A la luz de los resultados obtenidos es posible decir que la encapsulación es más eficiente cuando los liposomas se equilibran a una temperatura de 65°C independientemente del pH de la disolución de camptotecina. A pH 7,4 se obtienen concentraciones de fármaco casi tres veces superiores encapsulando el fármaco a 65°C ($3,93 \cdot 10^{-8}$ M) que realizando el mismo procedimiento a 55°C ($1,50 \cdot 10^{-8}$ M) y, de modo similar, a pH 3,5 el aumento en encapsulación a 65°C ($5,80 \cdot 10^{-8}$ M) es de 1,2 veces respecto al mismo procedimiento realizado a 55°C ($4,69 \cdot 10^{-8}$ M). Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por Sulkowski et al. (2005), donde un incremento de temperatura aumenta la fluidez de la membrana, permitiendo la entrada de una mayor concentración de fármaco y, por lo tanto, conduciendo a valores más altos de encapsulación (Martí et al., 1992).

Por otra parte, la EE es mucho mayor a pH 3,5 (1,95% a 55°C y 2,33% a 65°C) que a pH 7,4 (0,089% a 55°C y 0,26% a 65°C), a pesar de que el fármaco se encontraba inicialmente disuelto en una mayor concentración a pH 7,4. Por tanto, los mejores valores para la encapsulación se han obtenido a pH 3,5 realizando la encapsulación a 65°C. Esto puede deberse a que la camptotecina en este disolvente se encuentra en forma lactona, cuya estructura es muy hidrofóbica. En esta forma, el fármaco es capaz de crear un mayor número de interacciones fármaco-lípido con los componentes de la bicapa lipídica a medida que se forman los liposomas (Akbarzadeh et al., 2013). En cambio, el fármaco a pH 7,4 se encuentra ionizado, y tiene, por tanto, un carácter más hidrofílico que determina que se encapsule únicamente en la fase acuosa del interior de los liposomas, lo que se traduce en una menor EE. Este aspecto también influye en la concentración de fármaco encapsulado.

Finalmente, cabe destacar que la encapsulación por métodos directos a los dos pH estudiados conduce a valores de concentración de fármaco muy bajos. Esto es debido a que la masa de fármaco que se consigue solubilizar utilizando el método de encapsulación directa es muy pequeña, pues la camptotecina de partida es muy poco soluble en disolventes acuosos (Eloy et al., 2014).

b) Encapsulación de la camptotecina en liposomas convencionales mediante gradiente de pH

Se preparó una disolución de camptotecina en tampón citrato a pH 3,5 con un valor de absorbancia medio de 0,073; que corresponde a una concentración de $3,30 \cdot 10^{-6}$ M. Por otro lado, se formaron los

liposomas a pH 7,4 en PBS. La concentración de lípidos total fue de 57,4 mg/mL.

A continuación, se colocaron 2,8 mL de la dispersión de liposomas en un cartucho de diálisis y se sumergió en 200 mL de la disolución de camptotecina a pH 3,5. Se estudió el efecto que tiene la temperatura en la encapsulación. Para ello, se realizaron experimentos variando la temperatura: en un experimento la temperatura se mantuvo a 25°C durante 24 horas, en otro a 37°C durante 24 horas y, en el último, a 55°C. Para la temperatura de 55°C, ésta se mantuvo a 55°C durante 30 min, 2 horas y 4 horas y, el resto del tiempo, hasta completar las 24 horas, se mantuvo a 25°C. Esta metodología se esquematiza en la Figura 3.7.

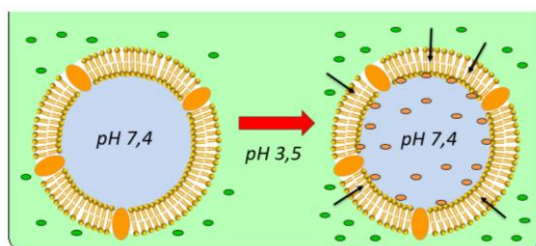


Figura 3.7. Encapsulación del fármaco libre en los liposomas convencionales mediante un gradiente de pH.

Después, se realizó un proceso de diálisis para eliminar el fármaco no encapsulado y se determinó la cantidad de camptotecina que se había encapsulada. Para ello, se siguió la misma metodología que en la sección anterior. Los espectros de fluorescencia con los cuales se determinó la concentración de fármaco encapsulado se representan en la Figura 3.8.

Por otra parte, los valores de intensidad de fluorescencia fueron de 7,22; 38,33; 37,81; 36,00; 29,67 para los experimentos realizados a 25°C, 37°C y 55°C durante 2 h, 4 h y 30 min, respectivamente. A partir

de estos valores, se obtuvieron las concentraciones de fármaco encapsulado, la capacidad de carga y la EE, y sus valores se recogen en la Tabla 3.3.

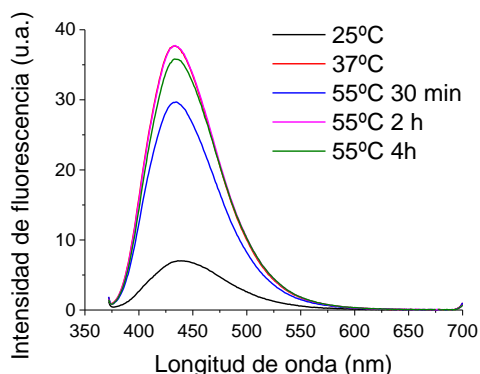


Figura 3.8. Intensidades de fluorescencia de la camptotecina encapsulada en los liposomas después del proceso de rotura de estos, para los experimentos realizados a 25°C, 37°C y 55°C durante 2 h, 4 h y 30 min.

Tabla 3.3. Resultados de la encapsulación de camptotecina en los liposomas convencionales por gradiente de pH: concentración molar de la camptotecina en la dispersión de liposomas, relación de la cantidad de camptotecina (mg) por cantidad de lípido (mg) y eficiencia de encapsulación determinada por la ecuación 2 de la temperatura de equilibración y tiempo.

ENCAPSULACIÓN CAMP GRADIENTE DE pH			
	[CAMP] (M)	Capacidad de carga (mg CAMP/mg lípido)	EE (%)
25°C	$2,95 \cdot 10^{-7} \pm 0,92 \cdot 10^{-7}$	$1,79 \cdot 10^{-6} \pm 0,05 \cdot 10^{-6}$	$0,17 \pm 0,05$
37°C	$1,67 \cdot 10^{-6} \pm 0,40 \cdot 10^{-6}$	$1,01 \cdot 10^{-5} \pm 0,24 \cdot 10^{-5}$	$0,71 \pm 0,15$
55°C 30'	$1,26 \cdot 10^{-6} \pm 0,055 \cdot 10^{-6}$	$7,64 \cdot 10^{-6} \pm 0,33 \cdot 10^{-6}$	$0,59 \pm 0,13$
55°C 2h	$1,68 \cdot 10^{-6} \pm 0,16 \cdot 10^{-6}$	$1,02 \cdot 10^{-5} \pm 0,09 \cdot 10^{-5}$	$0,74 \pm 0,14$
55°C 4h	$1,57 \cdot 10^{-6} \pm 0,17 \cdot 10^{-6}$	$9,53 \cdot 10^{-6} \pm 1,03 \cdot 10^{-6}$	$0,67 \pm 0,09$

Para observar mejor las diferencias entre los diferentes modos de encapsulación, se representan en la Figura 3.9 los resultados de la concentración y la EE en forma de gráfico de barras en función de las variables experimentales estudiadas, temperatura y tiempo.

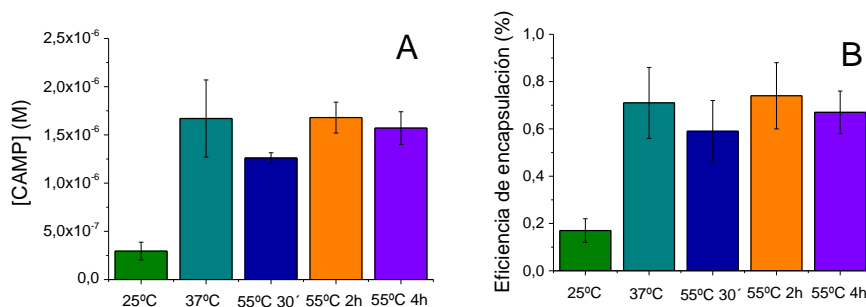


Figura 3.9. Concentración (A) y EE (B) de la camptotecina en los liposomas mediante una metodología activa por gradiente de pH, efecto del tiempo y de la temperatura de equilibración.

Se puede observar cómo la concentración más alta de camptotecina encapsulada ($1,68 \cdot 10^{-6}$ M) y la mayor EE (0,74%) se obtuvieron realizando el experimento a 55°C en agitación durante 2 horas y 22 horas a temperatura ambiente. Resultados muy cercanos de concentración ($1,67 \cdot 10^{-6}$ M) y EE (0,71%) se obtuvieron realizando el experimento manteniendo el sistema en agitación a 37°C durante 24 horas. Esto ocurre posiblemente porque en ambos experimentos, la temperatura es suficiente para aumentar la fluidez de la membrana lipídica y permitir que el fármaco entre en el interior de los liposomas. A estos dos resultados, les siguen en cantidad de fármaco encapsulado los experimentos en que el proceso se mantiene a 55°C durante 4 horas o durante 30 minutos, muy cercanos ambos a los otros resultados. La poca variación puede deberse a que 4 horas posiblemente sea un tiempo demasiado grande en el cual el fármaco puede liberarse de los liposomas

por mantenerse la membrana lipídica fluida durante mucho tiempo (Deshantri et al., 2019). Sin embargo, 30 min a 55°C es muy poco tiempo para que el fármaco se internalice de manera tan eficiente como en los casos anteriores. El peor resultado en la encapsulación con una concentración de camptotecina encapsulada de $2,95 \cdot 10^{-7}$ M y una EE de 0,17 % se obtuvo manteniendo el sistema a 25°C durante 24 horas. Posiblemente, la membrana lipídica de los liposomas a temperatura ambiente no sea suficientemente fluida para permitir el paso del fármaco, tal y como sí ocurre calentando el sistema, lo que se traduce en una disminución en la cantidad de fármaco encapsulado.

c) Comparación entre la encapsulación pasiva y activa de la camptotecina en liposomas convencionales

Una vez se consigue encapsular el fármaco de las dos formas mencionadas, es posible establecer comparaciones entre ambos métodos. La encapsulación de la camptotecina fue mucho más eficaz utilizando la técnica de carga activa mediante gradiente de pH en comparación con la carga pasiva, lo que está de acuerdo con la bibliografía (Deamer et al., 1972; Eloy et al., 2014; Gubernator, 2011; Akbarzadeh et al., 2013; Zucker et al., 2009). El motivo es que la encapsulación pasiva únicamente permite internalizar el fármaco que se consigue embeber durante la formación de los liposomas, mientras que en el caso del gradiente de pH existe una fuerza impulsora que permite al fármaco internalizarse (Pattni et al., 2015; Akbarzadeh et al., 2013). En este experimento, la camptotecina internalizada se ioniza y permanece en el interior de los liposomas a pH 7,4, ya que el pKa del fármaco es de 5,5, transformándose en forma carboxilato. En este estado de carga negativa, el fármaco es capaz de generar enlaces de hidrógeno o atracciones electrostáticas con los fosfolípidos, manteniéndose estable, tal y como

ocurre con otros compuestos (Álvarez-Puebla y Garrido, 2005; Deshantri et al., 2019).

En el mejor experimento de carga pasiva (a pH 3,5 y a 65°C) se obtuvo una concentración de camptotecina encapsulada de $5,80 \cdot 10^{-8}$ M y una EE del 2,33%, mientras que, en el mejor resultado obtenido mediante la carga activa (55°C durante 2 horas), la concentración de camptotecina encapsulada fue de $1,68 \cdot 10^{-6}$ M y la EE del 0,74%. Por lo tanto, la concentración de fármaco encapsulado se incrementa en más de 28 veces realizando la encapsulación por la técnica de gradiente de pH. En el caso de la EE, los resultados no se pueden comparar en función de la metodología, ya que no se usaron condiciones experimentales comparables. En las metodologías pasivas se utilizaron 10 mL de disolución saturada de fármaco mientras que para las metodologías activas (gradiente de pH) se necesitaron 200 mL de disolución saturada. Los resultados se representan en la Figura 3.10.

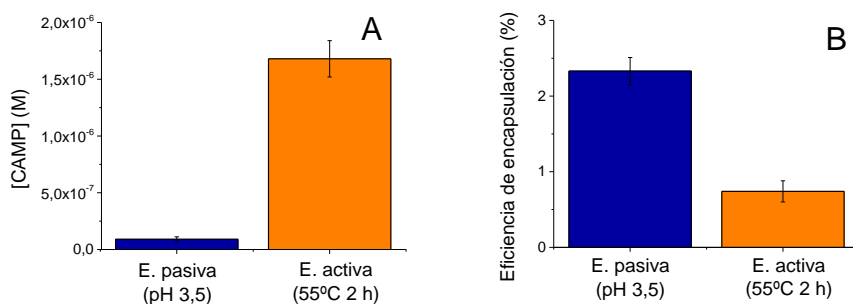


Figura 3.10. Representación de la concentración (A) y la EE (B) de la camptotecina en liposomas mediante la encapsulación pasiva y activa.

Para experimentos futuros en el desarrollo de esta tesis doctoral, la encapsulación del fármaco libre se realizará utilizando el método del gradiente de pH a una temperatura de 55°C durante 2 horas y el resto del tiempo, hasta alcanzar las 24 horas, a 25°C.

4.1.2. Encapsulación del complejo de inclusión CMCD-CAMP en liposomas convencionales

Una vez se estudió el proceso de internalización del fármaco libre utilizando la encapsulación pasiva y activa, a continuación, se estudiará la encapsulación de la camptotecina en forma de complejo de inclusión por ambas metodologías.

a) Encapsulación directa del complejo de inclusión CMCD-CAMP en liposomas convencionales

Se preparó una disolución de camptotecina con CMCD (14 mM) a pH 7,4 o 3,5. Se determinó la absorbancia de la camptotecina para cada una de las disoluciones. La absorbancia de camptotecina se relacionó con la concentración por los coeficientes de extinción molar descritos en el Capítulo 1 ($27.530 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para PBS a pH 7,4 y $22.240 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para tampón citrato a pH 3,5). Las concentraciones de camptotecina en estas disoluciones fueron de $7,2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ y $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ a pH 7,4 y 3,5, respectivamente. Estas disoluciones se utilizaron para hidratar los lípidos y formar los liposomas. Por lo tanto, con este método, el complejo de inclusión fue embebido en el interior de los liposomas durante el proceso de autoformación y ensamblaje, sin necesidad de ningún paso adicional, tal y como se muestra en la Figura 3.11.

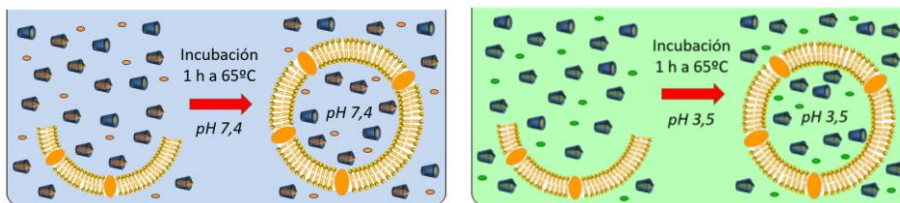


Figura 3.11. Encapsulación directa del complejo de inclusión CMCD-CAMP a pH 7,4 y 3,5 en los liposomas convencionales durante su formación a 65°C.

Una vez que los liposomas fueron hidratados, incubados a 65°C y dializados para eliminar el exceso de fármaco y ciclodextrina no encapsulados, se cuantificó la cantidad de camptotecina encapsulada por fluorimetría. Los espectros de fluorescencia de la camptotecina en las disoluciones que resultan de romper los liposomas por adición de metanol se muestran en la Figura 3.12.

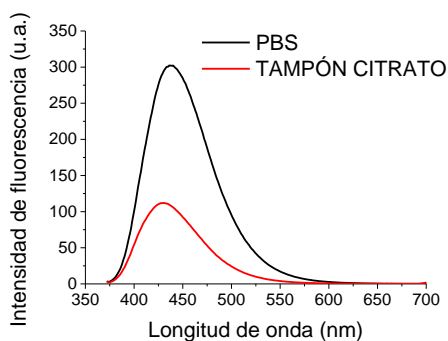


Figura 3.12. Espectros de fluorescencia de la camptotecina en las disoluciones resultantes de romper los liposomas a pH 7,4 en PBS y a pH 3,5 en tampón citrato.

Los valores de intensidad de fluorescencia fueron de 303,0 y 112,2 para los experimentos realizados a pH 7,4 y a pH 3,5, respectivamente. Con estos valores se calculó la concentración de fármaco encapsulado, la capacidad de carga y la EE, tal y como se recogen en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Resultados de la encapsulación directa del complejo de inclusión CAMP-CMCD en los liposomas convencionales: concentración molar de la camptotecina en la dispersión de liposomas, relación de la cantidad de camptotecina (mg) por cantidad de lípido (mg) y eficiencia de encapsulación determinada por la ecuación 1, en función del pH del medio y de la temperatura de equilibración.

ENCAPSULACIÓN CMCD-CAMP DIRECTA			
pH	[CAMP] (M)	Capacidad de carga (mg CAMP/mg lípido)	EE (%)
pH 7,4	$1,72 \cdot 10^{-5} \pm 0,10 \cdot 10^{-5}$	$1,04 \cdot 10^{-4} \pm 0,06 \cdot 10^{-4}$	$23,89 \pm 1,36$
pH 3,5	$7,33 \cdot 10^{-6} \pm 0,37 \cdot 10^{-6}$	$4,44 \cdot 10^{-5} \pm 0,22 \cdot 10^{-5}$	$20,79 \pm 1,85$

La formación de los liposomas en la disolución que contenía el complejo de inclusión CMCD-CAMP a pH 7,4 condujo a la encapsulación de una mayor concentración de camptotecina ($1,72 \cdot 10^{-5}$ M) y de una mayor EE (23,89 %). Estos valores son mucho más altos que los obtenidos en la encapsulación directa del fármaco libre. Puede deberse a que la ciclodextrina aumenta la solubilidad de la camptotecina en medio acuoso como se determinó en el Capítulo 1, siendo este efecto a pH 7,4 mucho mayor que a pH 3,5 (Mi y Burke et al., 1994; Ziomkowska et al., 2006). Por tanto, había más concentración de fármaco en las disoluciones iniciales que se usaron para formar los liposomas. Por otra parte, se puede observar que no hay mucha diferencia en los resultados de la EE obtenidos a los dos valores de pH. La EE es tan solo un poco mayor a pH 7,4 (23,89%) que a pH 3,5 (20,79%) a pesar de que la concentración de camptotecina inicial era el doble a pH 7,4. Esto podría deberse a que se alcanzara un máximo en eficiencia de la técnica, lo que es independiente de la concentración de fármaco disuelta.

b) Encapsulación del complejo de inclusión CMCD-CAMP en liposomas convencionales mediante gradiente de pH

Se prepararon 10 mL de una disolución de camptotecina con CMCD (14mM) a pH 3,5. La absorbancia de la camptotecina en esta disolución fue de 0,804, la cual corresponde a una concentración de

camptotecina de $3,6 \cdot 10^{-5}$ M. Por otro lado, se formaron los liposomas a pH 7,4 en PBS. La concentración de lípidos total fue de 57,4 mg/mL.

A continuación, se colocaron 2,8 mL de la dispersión de liposomas en un cartucho de diálisis y se sumergió en un vaso con 200 mL de la disolución del complejo de inclusión CMCD-CAMP a pH 3,5. El sistema se dejó equilibrando en un primer experimento a 25°C durante 24 horas y en un segundo experimento a 55°C durante 2 horas y el resto del tiempo hasta llegar a las 24 horas, se mantuvo a 25°C. El proceso se esquematiza en la Figura 3.13.

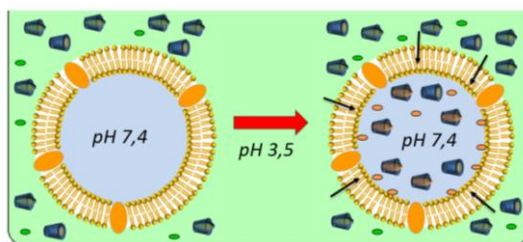


Figura 3.13. Encapsulación del complejo de inclusión CMCD-CAMP en liposomas convencionales mediante gradiente de pH.

Una vez que los liposomas fueron dializados, se rompieron por adición de metanol para determinar la concentración de camptotecina encapsulada por fluorescencia. Los espectros de fluorescencia se muestran en la Figura 3.14.

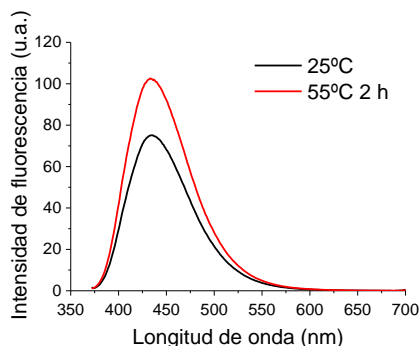


Figura 3.14. Espectros de fluorescencia de la camptotecina en las disoluciones que resultan de romper los liposomas para los dos experimentos de carga activa realizados a 25°C y a 55°C durante 2 horas.

Los valores de fluorescencia medios obtenidos fueron de 75,7 y 102,9 para los experimentos realizados a 25°C y 55°C durante 2 h, respectivamente. A partir de estos valores, se obtuvieron las concentraciones de fármaco encapsulado y la EE que se recogen en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Resultados de la encapsulación por gradiente de pH del complejo de inclusión CMCD-CAMP en los liposomas convencionales: concentración molar de la camptotecina en la dispersión de liposomas, relación de la cantidad de camptotecina (mg) por cantidad de lípido (mg) y eficiencia de encapsulación determinada por la ecuación 2, en función del pH del medio y de la temperatura de equilibración.

ENCAPSULACIÓN CMCD-CAMP GRADIENTE DE pH			
	[CAMP] (M)	Capacidad de carga (mg CAMP/mg lípido)	EE (%)
25°C	$3,73 \cdot 10^{-6} \pm 0,55 \cdot 10^{-6}$	$2,26 \cdot 10^{-5} \pm 0,33 \cdot 10^{-5}$	0,15±0,03
55°C 2h	$5,09 \cdot 10^{-6} \pm 0,40 \cdot 10^{-6}$	$3,08 \cdot 10^{-5} \pm 0,24 \cdot 10^{-5}$	0,20±0,01

Se obtuvo una mayor concentración de camptotecina realizando el experimento de encapsulación a 55°C durante 2 horas, tal y como ocurría con la encapsulación del fármaco libre, debido a la mayor fluidez de la membrana lipídica con el aumento de temperatura y como se observa en otros estudios (Sulkowski et al., 2005). La EE fue tan solo un poco mayor a 55°C durante 2 h (0,20%) que a 25°C (0,15%), posiblemente debido, como en el caso anterior, a un máximo en eficiencia de la técnica.

c) Comparación entre la encapsulación pasiva y activa del complejo de inclusión CMCD-CAMP en liposomas convencionales

Con los resultados obtenidos en los experimentos de encapsulación del complejo de inclusión CMCD-CAMP en los liposomas, se pudo observar que la encapsulación directa es la mejor forma de internalizar el fármaco. La concentración que se consiguió encapsular es de $1,72 \cdot 10^{-5} \pm 0,10 \cdot 10^{-5}$ y es 3,4 veces superior a la que se consigue por la metodología de gradiente de pH, como se muestra en la Figura 3.15.A. Estas diferencias pueden deberse a que la disolución tampón que se utiliza para disolver el fármaco en la encapsulación pasiva es PBS. En este disolvente la solubilidad de la camptotecina es mucho mayor que en la disolución reguladora de pH 3,5 (tampón citrato), disolvente utilizado para disolver el fármaco en la encapsulación activa. Por lo tanto, cuanto más fármaco hay disponible, más cantidad entrará en los liposomas (Akbarzadeh et al., 2013).

Las EE de encapsulación no se pueden comparar, ya que al igual que ocurría para el fármaco libre, ambas metodologías se llevan a cabo

en diferentes condiciones experimentales. No obstante, éstas se muestran en la Figura 3.15.B.

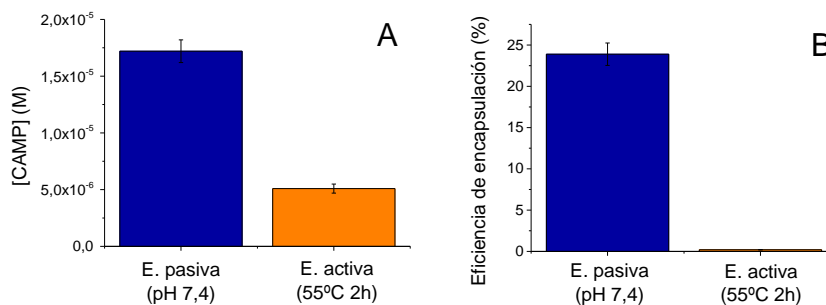


Figura 3.15. Representación de la concentración (A) y la EE (B) del complejo de inclusión CMCD-CAMP en liposomas mediante la encapsulación pasiva y activa.

4.1.3. Discusión global de los resultados de encapsulación en liposomas convencionales

La Figura 3.16.A muestra gráficamente la concentración de camptotecina encapsulada mediante las tecnologías pasivas y activas que se han empleado, partiendo tanto de disoluciones que contienen el fármaco libre como el complejo de inclusión CMCD-CAMP. Se puede concluir que el experimento que condujo a una mayor concentración de fármaco en el interior de los liposomas fue la encapsulación pasiva a pH 7,4 a partir de una disolución que contiene el complejo de inclusión CMCD-CAMP, alcanzándose una concentración de $1,72 \cdot 10^{-5}$ M. Esto significa que la encapsulación es del orden de 10 veces mayor que con el mejor resultado de encapsulación del fármaco libre ($1,68 \cdot 10^{-6}$ M).

De manera general, las concentraciones de fármaco son mayores cuando se parte de disoluciones que contienen el complejo de inclusión y, en particular, cuando se emplea una metodología directa con estas

disoluciones. Esto se debe a que estas disoluciones contienen el fármaco a mayor concentración, ya que la ciclodextrina aumenta su solubilidad (Martín, 2004) como se ha caracterizado en el Capítulo 1. Estos resultados concuerdan con la literatura. Por ejemplo, Sur et al. (2014) describieron que la encapsulación del fármaco (BI-2536) libre fue del orden de 20 veces menor que utilizando el fármaco en forma de complejo de inclusión. Del mismo modo, Piel et al. (2006) aumentaron la cantidad de la betametasona en el interior de los liposomas en casi diez veces utilizando ciclodextrinas mediante una encapsulación directa, como también ocurre con la prednisolona (Fatouros et al., 2001).

En cuanto a las EE, no fue posible comparar los resultados obtenidos por metodologías pasivas y activas, ya que son métodos muy diferentes cuyas eficiencias se calculan de forma distinta, así como tampoco es posible compararlas con otros artículos que realicen la técnica de otra forma diferente. No obstante, los resultados de EE se muestran gráficamente en la Figura 3.16.B.

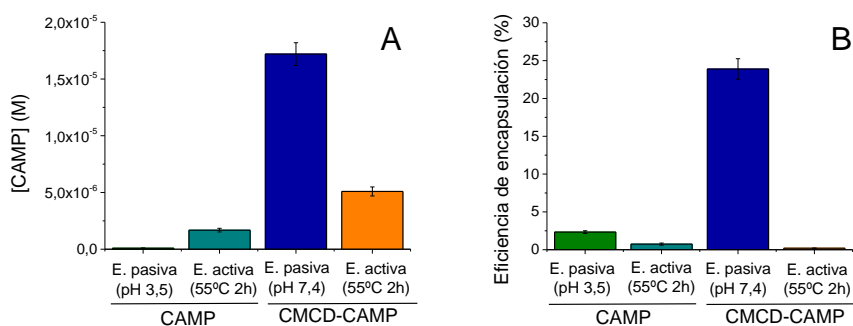


Figura 3.16. A) Concentración de camptotecina encapsulada mediante metodologías activas y pasivas a partir de disoluciones que contienen el fármaco libre y el complejo de inclusión CMCD-CAMP. B) EE para las metodologías activas y pasivas estudiadas, a partir de disoluciones que contienen el fármaco libre y el complejo de inclusión CMCD-CAMP.

La concentración de camptotecina encapsulada en los liposomas fue menor que la obtenida por otros trabajos (Cortesi et al., 1997; Saetern et al., 2004; Watanabe et al., 2008 y Maitani et al., 2008). En estas investigaciones se alcanzaron valores de concentraciones de entre $1,2 \cdot 10^{-3}$ y $6,5 \cdot 10^{-4}$ M. Aun así, es posible encapsular la camptotecina en cantidades superiores a la terapéutica. En cuanto a la EE, sólo es posible establecer comparación de los resultados obtenidos con la literatura cuando la metodología utilizada es la encapsulación directa, ya que el resto de los experimentos presentados para las demás metodologías difieren experimentalmente de los descritos en la bibliografía. Se han descrito valores de EE diversos para la encapsulación directa en la literatura de entre el 5 y el 100% (Cortesi et al., 1997; Saetern et al., 2004; Watanabe et al., 2008; Maitani et al., 2008; Sugarman, 1996; Lin et al., 2013).

4.2. Encapsulación en liposomas PEGilados

4.2.1. Encapsulación de camptotecina en liposomas PEGilados

La encapsulación de la camptotecina en los sistemas de liposomas PEGilados se llevó a cabo en las condiciones que proporcionaron los mejores resultados en los sistemas convencionales.

a) Encapsulación directa de la camptotecina en liposomas PEGilados

Se empleó una disolución saturada de camptotecina en PBS con un valor de absorbancia de 0,684, que corresponde a una concentración de $2,48 \cdot 10^{-5}$ M. Esta disolución se utilizó para hidratar la película lipídica y formar los liposomas PEGilados. La concentración de lípidos fue de 69,55 mg/mL. Una vez que los liposomas se hidrataron, se incubaron a

65°C durante 1 hora y se extruyeron, se dializaron durante 36 horas para eliminar el exceso de fármaco y se cuantificó la cantidad de camptotecina encapsulada, tal y como se indica en la Figura 3.17.

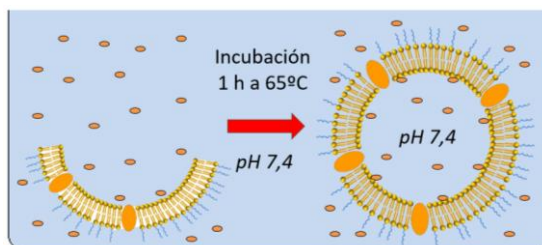


Figura 3.17. Encapsulación directa del complejo de inclusión a pH 7,4 en liposomas PEGilados durante su formación a 65°C.

Una vez realizada la encapsulación, los liposomas se rompieron por adición de etanol y se midió la intensidad de fluorescencia de la camptotecina. Este valor fue de 0,90; que por interpolación en la recta de calibración corresponde con una concentración de $3,98 \cdot 10^{-8}$ M. Con la concentración, se calculó la capacidad de carga y la EE, tal y como se muestra en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6. Resultados de la encapsulación directa de camptotecina a pH 7,4 en los liposomas PEGilados: concentración molar de la camptotecina en la dispersión de liposomas, relación de la cantidad de camptotecina (mg) por cantidad de lípido (mg) y eficiencia de encapsulación determinada por la ecuación 1.

ENCAPSULACIÓN CAMP DIRECTA			
Tª (°C)	[CAMP] (M)	Capacidad de carga (mg CAMP/mg lípido)	EE (%)
25	$3,97 \cdot 10^{-8} \pm 1,21 \cdot 10^{-8}$	$1,99 \cdot 10^{-7} \pm 0,61 \cdot 10^{-7}$	0,16 ± 0,03

La concentración de camptotecina y la EE en los liposomas PEGilados tuvieron valores muy similares que los que se obtuvieron en los liposomas convencionales a pH 7,4 ($3,93 \cdot 10^{-8}$ M; 0,26%).

b) Encapsulación de la camptotecina en liposomas PEGilados mediante gradiente de pH

El procedimiento fue análogo al descrito en la sección 4.1.2., apartado b). Se esquematiza en la Figura 3.18.

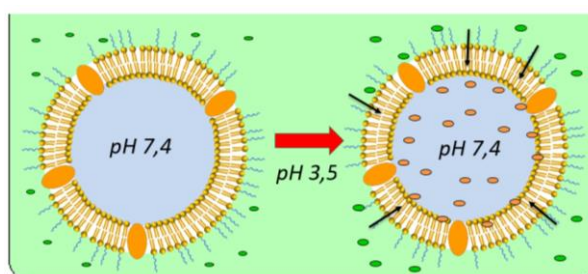


Figura 3.18. Encapsulación del fármaco libre en liposomas PEGilados mediante gradiente de pH.

En esta metodología, se partió de una disolución de camptotecina a pH 3,5 (tampón citrato) con una absorbancia de 0,099, que correspondió a una concentración de $4,48 \cdot 10^{-6}$ M.

Por otro lado, se formaron los liposomas PEGilados a pH 7,4 en PBS. La concentración de lípidos total fue de 69,5 mg/mL.

A continuación, se colocaron 2,8 mL de la dispersión de liposomas en un cartucho de diálisis que se sumergió en un vaso que contiene 200 mL de la disolución de fármaco a pH 3,5. El sistema se dejó equilibrando a 55°C durante 2 horas y 22 horas a 25°C. Una vez que los liposomas se dializaron y se rompieron por adición de etanol, se midió la fluorescencia y se calculó la concentración de camptotecina

encapsulada. Con este valor, se determinó la capacidad de carga y la EE, tal y como se muestra en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7. Resultados de la encapsulación de la camptotecina por gradiente de pH en los liposomas PEGilados: concentración molar de la camptotecina en la dispersión de liposomas, relación de la cantidad de camptotecina (mg) por cantidad de lípido (mg) y eficiencia de encapsulación determinada por la ecuación 2.

ENCAPSULACIÓN CAMP GRADIENTE DE pH			
	[CAMP] (M)	Capacidad de carga (mg CAMP/mg lípido)	EE (%)
55°C	$2,88 \cdot 10^{-7} \pm 0,24 \cdot 10^{-7}$	$1,44 \cdot 10^{-6} \pm 0,12 \cdot 10^{-6}$	$0,08 \pm 0,00$
2h			

Estos resultados indicaron que la concentración de camptotecina era mucho mayor realizando la encapsulación por gradiente de pH que mediante encapsulación pasiva, ya que la concentración se incrementó en 7 veces. Por tanto, tal y como ocurrió en los liposomas convencionales, el mejor método de encapsulación para el fármaco libre fue la encapsulación activa. Sin embargo, la cantidad de fármaco encapsulado no fue elevada en ninguno de los dos sistemas.

4.2.2. Encapsulación del complejo de inclusión CMCD-CAMP en liposomas PEGilados

a) Encapsulación directa del complejo de inclusión CMCD-CAMP en liposomas PEGilados

Se prepararon 10 mL de una disolución de camptotecina ($6,76 \cdot 10^{-5}$ M) con CMCD (14mM) a pH 7,4 (PBS) que se utilizó para hidratar a los liposomas. La concentración de lípidos fue de 69,5 mg/mL.

Los liposomas, una vez formados en el medio con el fármaco de forma directa, tal y como se muestra en la Figura 3.19, se dializaron a temperatura ambiente durante 36 horas.

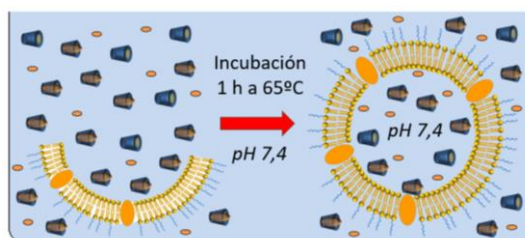


Figura 3.19. Encapsulación directa del complejo de inclusión CMCD-CAMP a pH 7,4 en liposomas PEGilados durante su formación a 65°C.

Una vez realizada la encapsulación, se rompieron los liposomas por adición de etanol y la disolución resultante se analizó por espectrofotometría de fluorescencia para determinar la concentración de camptotecina encapsulada. El valor de intensidad de fluorescencia media que se obtuvo fue de 45,98. Con este dato, se obtuvieron las concentraciones de fármaco encapsulado, la capacidad de carga y la EE, que se recogen en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8. Resultados de la encapsulación directa del complejo de inclusión CMCD-CAMP en los liposomas PEGilados a pH 7,4 (PBS): concentración molar de la camptotecina en la dispersión de liposomas, relación de la cantidad de camptotecina (mg) por cantidad de lípido (mg) y eficiencia de encapsulación determinada por la ecuación 1.

ENCAPSULACIÓN CMCD-CAMP DIRECTA			
T^a (°C)	[CAMP] (M)	Capacidad de carga (mg CAMP/mg lípido)	EE (%)
25	$3,07 \cdot 10^{-6} \pm 0,25 \cdot 10^{-6}$	$1,53 \cdot 10^{-5} \pm 0,01 \cdot 10^{-5}$	$4,53 \pm 0,37$

La concentración de camptotecina encapsulada fue bastante alta ($3,07 \cdot 10^{-6}$ M) si se compara con la encapsulación directa del fármaco libre ($3,97 \cdot 10^{-8}$ M). Se obtuvo una concentración con un valor 77 veces mayor. La causa de ello es la misma que se ha explicado en el caso de los liposomas convencionales, donde un aumento de solubilidad de la camptotecina gracias al complejo de inclusión incrementaba la concentración del fármaco en el medio y, por tanto, disponible para la encapsulación (Mi y Burke et al., 1994; Ziomkowska et al., 2006). Respecto a la EE, fue bastante deficiente (4,57%) pero mucho mejor que la obtenida con la encapsulación del fármaco libre con el mismo método (0,16%).

b) Encapsulación del complejo de inclusión CMCD-CAMP en liposomas PEGilados mediante gradiente de pH

Se prepararon 10 mL de una disolución de camptotecina ($3,39 \cdot 10^{-5}$ M) con CMCD (14mM) a pH 3,5 (tampón citrato). Por otro lado, se formaron los liposomas PEGilados a pH 7,4 en PBS. La concentración de lípidos total fue de 69,5 mg/mL.

A continuación, se colocaron 2,8 mL de la dispersión de liposomas en un cartucho de diálisis y se sumergió en un vaso que contenía 200 mL de la disolución del complejo de inclusión a pH 3,5. El sistema se dejó equilibrando a 55°C durante 2 horas y después a 25°C hasta llegar a las 24 horas, tal y como se muestra en la Figura 3.20.

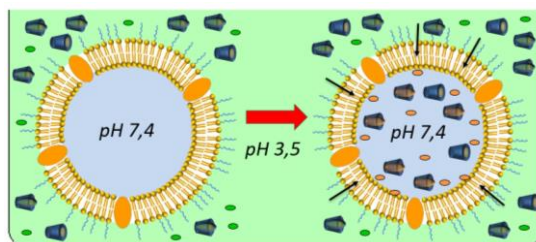


Figura 3.20. Encapsulación del complejo de inclusión CMCD-CAMP mediante un gradiente de pH en liposomas PEGilados.

Una vez que los liposomas fueron dializados, se rompieron por adición de etanol para determinar la concentración de la camptotecina encapsulada por fluorescencia. Este valor fue utilizado para calcular la capacidad de carga y la EE, como se observa en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9. Resultados mediante gradiente de pH del complejo de inclusión CMCD-CAMP en los liposomas PEGilados: concentración molar de la camptotecina en la dispersión de liposomas, relación de la cantidad de camptotecina (mg) por cantidad de lípido (mg) y eficiencia de encapsulación determinada por la ecuación 2.

ENCAPSULACIÓN CMCD-CAMP GRADIENTE DE pH			
	[CAMP] (M)	Capacidad de carga (mg CAMP/mg lípido)	EE (%)
55°C 2h	$1,70 \cdot 10^{-6} \pm 0,02 \cdot 10^{-6}$	$8,52 \cdot 10^{-6} \pm 0,16 \cdot 10^{-6}$	$0,07 \pm 0,00$

La concentración de camptotecina encapsulada ($1,70 \cdot 10^{-6}$ M), tal y como ocurrió en los liposomas convencionales, fue mucho menor que la conseguida con las metodologías de encapsulación pasiva ($3,07 \cdot 10^{-6}$ M). Este resultado se debe a que la concentración de la camptotecina en la disolución del complejo de inclusión preparada a pH 3,5 fue menor que para la disolución del complejo de inclusión a pH 7,4, debido a la capacidad de disolución del fármaco en cada una de las disoluciones.

4.2.3. Discusión global de los resultados de encapsulación en liposomas PEGilados

Como comparativa final de los experimentos de carga de la camptotecina en los liposomas PEGilados, se puede decir que el método que consiguió encapsular una mayor concentración de camptotecina fue la encapsulación directa utilizando el complejo de inclusión CMCD-CAMP a pH 7,4 ($3,07 \cdot 10^{-6}$ M). Significó un aumento en encapsulación de la camptotecina de 10,6 veces que empleando el mejor resultado de encapsulación con el fármaco libre ($2,88 \cdot 10^{-7}$ M), tal y como se puede observar en la Figura 3.21.A.

Las EE no son comparables entre las metodologías directas y de gradiente de pH, ya que, como se ha comentado, los experimentos se llevan a cabo con diferentes volúmenes iniciales de fármaco. No obstante, se muestran las EE en la Figura 3.21.B.

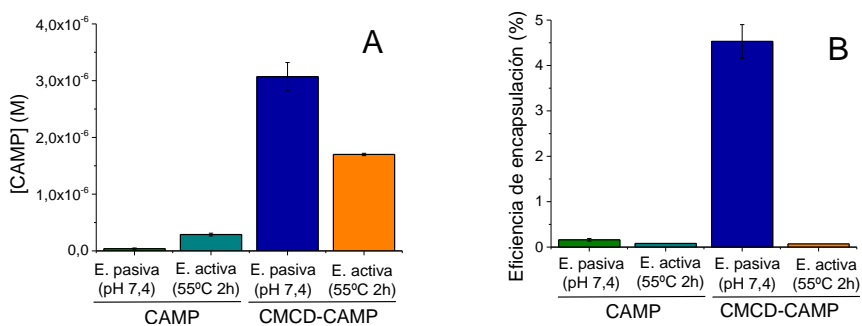


Figura 3.21. A) Concentración de camptotecina encapsulada en los liposomas PEGilados mediante metodologías activas y pasivas a partir de disoluciones que contienen el fármaco libre y el complejo de inclusión CMCD-CAMP. B) EE de camptotecina encapsulada en los liposomas PEGilados mediante metodologías activas y pasivas estudiadas, a partir de disoluciones que contienen el fármaco libre y el complejo de inclusión CMCD-CAMP.

4.3. Comparación de liposomas PEGilados y convencionales

En la Figura 3.22 se esquematizan los experimentos y variables experimentales que se han tenido en cuenta para la encapsulación de la camptotecina en los liposomas convencionales (A) y PEGilados (B).

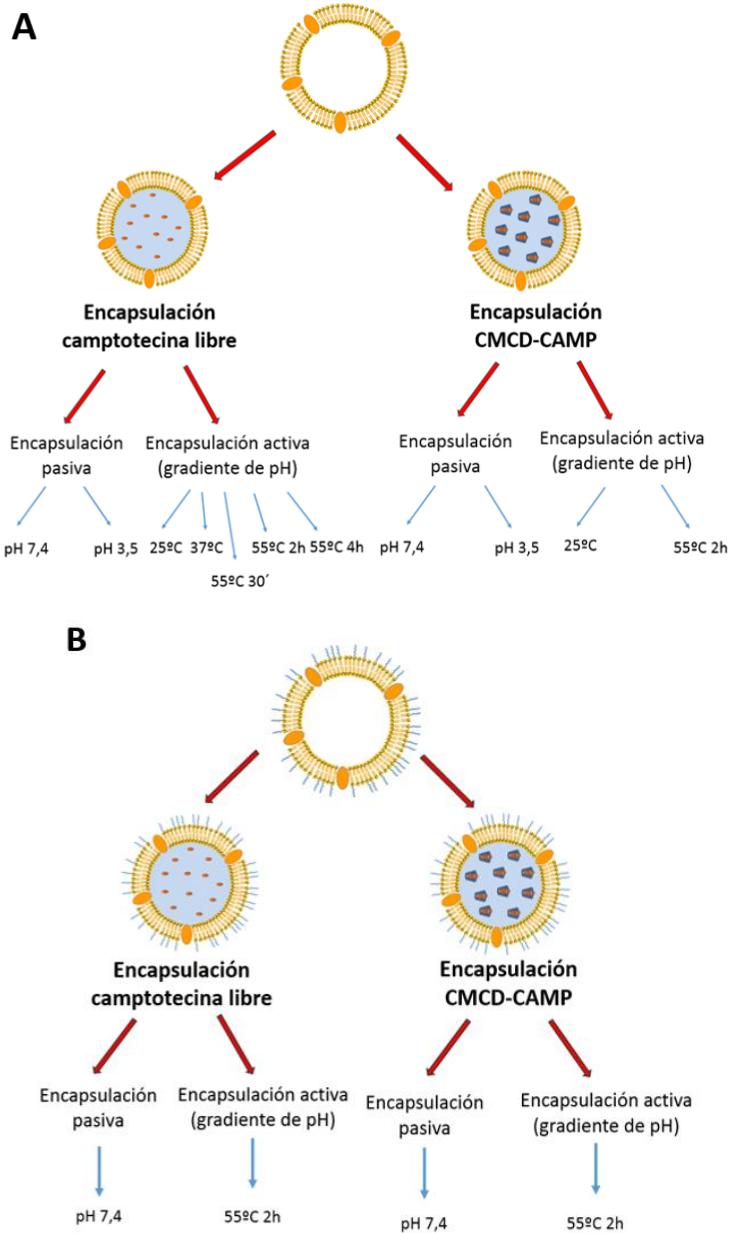


Figura 3.22. Representación de los experimentos de encapsulación realizados en liposomas convencionales (A) y PEGilados (B).

Una vez que se han realizado los experimentos de encapsulación en los dos tipos de liposomas empleados en esta tesis, se compararon ambos resultados en función de su capacidad de carga y EE.

Los valores más altos de concentración de camptotecina encapsulada en ambos sistemas por las diferentes metodologías se recogen en la Tabla 3.10. Se puede observar que la concentración de camptotecina encapsulada en los liposomas convencionales fue mayor que en los liposomas PEGilados, independientemente de la metodología utilizada para la encapsulación. En la última fila de la tabla se recoge el número de veces que la concentración de camptotecina fue superior en los liposomas convencionales con respecto a los liposomas PEGilados.

Tabla 3.10. Valores de concentración de camptotecina encapsulada tanto en los liposomas convencionales como en los liposomas PEGilados por las diferentes metodologías.

	Concentración de camptotecina (M)			
	CAMP libre		CMCD-CAMP	
	E. pasiva	E. activa	E. pasiva	E. activa
Liposomas convencionales	$5,80 \cdot 10^{-8} \pm$	$1,68 \cdot 10^{-6} \pm$	$1,72 \cdot 10^{-5} \pm$	$5,09 \cdot 10^{-6} \pm$
	$0,57 \cdot 10^{-8}$	$0,16 \cdot 10^{-6}$	$0,10 \cdot 10^{-5}$	$0,40 \cdot 10^{-6}$
Liposomas PEGilados	$3,97 \cdot 10^{-8} \pm$	$2,88 \cdot 10^{-7} \pm$	$3,07 \cdot 10^{-6} \pm$	$1,70 \cdot 10^{-6} \pm$
	$1,21 \cdot 10^{-8}$	$0,24 \cdot 10^{-7}$	$0,25 \cdot 10^{-6}$	$0,02 \cdot 10^{-6}$
Δ carga	1,4	5,8	5,6	2,9

Para facilitar la comparación de los resultados, los valores de concentración de camptotecina encapsulada se muestran gráficamente en la Figura 3.23.

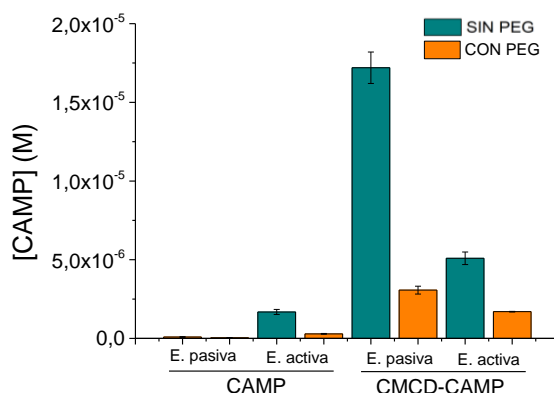


Figura 3.23. Comparación de la concentración de camptotecina encapsulada entre liposomas PEGilados y convencionales.

La menor concentración de camptotecina encapsulada en los liposomas PEGilados podría relacionarse con su tamaño, ya que estos son 10-15 nm menores que los convencionales, de acuerdo con su caracterización que se ha llevado a cabo en el Capítulo 2. Según los estudios de Szoka (1990) y Berger et al. (2001), un menor tamaño de liposomas conduce a una reducción en la encapsulación del fármaco.

Estos resultados podrían resultar contraproducentes para la utilización de los liposomas PEGilados en futuros experimentos, sin embargo, esta menor encapsulación no representa un inconveniente debido a la elevada toxicidad de la camptotecina. De esta forma, la capacidad de carga obtenida en los liposomas PEGilados puede ser suficiente como para producir un efecto citotóxico en las células, ya que la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) del fármaco es del orden de nanomolar (Garnett et al., 2012; He et al., 2016; Cheng et al., 2003).

Los valores de EE en ambos sistemas por las diferentes metodologías se recogen en la Tabla 3.11. Se observa que los valores son siempre mucho mayores en los liposomas convencionales que en los

liposomas PEGilados, relacionándose, posiblemente, a la mayor concentración de fármaco encapsulado. Además, en los liposomas convencionales los valores de EE se encuentran en un intervalo mucho más amplio que los obtenidos para los liposomas PEGilados.

Tabla 3.11. Valores de EE de la encapsulación de camptotecina tanto en los liposomas convencionales como en los PEGilados por las diferentes metodologías.

	EE (%)			
	CAMP libre		CMCD-CAMP	
	E. pasiva	E. activa	E. pasiva	E. activa
Liposomas convencionales	0,26±0	0,74±0,14	23,89±1,36	0,20±0,01
Liposomas PEGilados	0,16± 0,04	0,08±0,00	4,53± 0,37	0,07± 0,00
Δ EE	1,6	9,2	5,3	2,8

Para facilitar la comparación de los resultados, los valores de EE de camptotecina encapsulada se muestran gráficamente en la Figura 3.24.

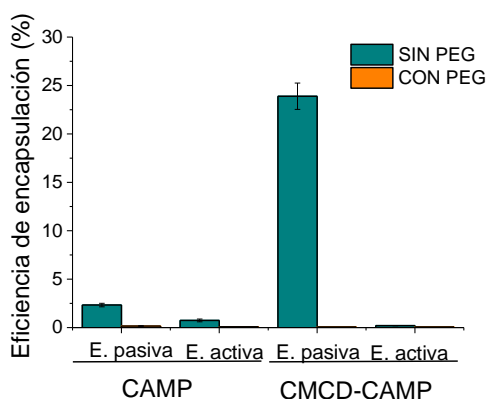


Figura 3.24. Comparación de la EE entre liposomas PEGilados y convencionales.

4.4. Cinética de liberación de la camptotecina

Está descrito que cuando los fármacos se encapsulan en los liposomas, se encuentran confinados en nanodominios acuosos en los que la distancia entre las diferentes moléculas es muy pequeña. En estas circunstancias puede observarse el efecto de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET, por sus siglas en inglés, Fluorescence Resonance Energy Transfer). Se basa en que la energía de una molécula excitada (dador) puede transferirse de manera no radiactiva a otra molécula (aceptor) que se encuentre muy próxima (Bajar et al., 2016; Yu-Tang, 2018). Para que tenga lugar FRET es necesario que se cumplan, entre otros requisitos, que:

- el espectro de emisión del dador debe solaparse con el espectro de emisión del aceptor.
- la distancia entre dador y aceptor debe de estar comprendida, de manera general, entre 1 y 10 nm.

FRET puede darse entre una misma molécula o entre moléculas diferentes. Para la camptotecina, se muestra el espectro de absorbancia y fluorescencia en liposomas formados a pH 7,4 y a pH 3,5, suspendidos ambos a pH 7,4, en las Figuras 3.25.A y 3.25.B, respectivamente. Como se observa, existe solapamiento que podría dar lugar a FRET cuando la camptotecina se encuentra confinada en el interior de los liposomas.

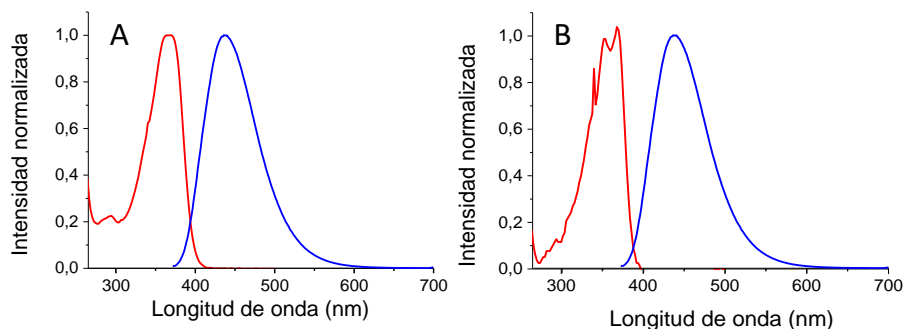


Figura 3.25. Espectros normalizados de fluorescencia (azul) y absorbancia (rojo) en liposomas formados a pH 7,4 en PBS (A) y liposomas formados a pH 3,5 en tampón citrato (B), en donde se observa solapamiento de los espectros.

FRET es una herramienta ampliamente utilizada en el campo de la biología celular para monitorizar diferentes procesos biológicos (Shrestha et al., 2015). En los sistemas de liposomas, FRET se utilizó como herramienta para evaluar la integridad de éstos en el transporte de fármacos (Li et al., 2018). Este fenómeno conduce a que la intensidad de fluorescencia que se observa sea menor que si la transferencia no tuviera lugar.

Para monitorizar la estabilidad de los liposomas convencionales que encapsulan camptotecina en función del pH del medio, se recurrió a detectar los cambios de intensidad de fluorescencia que experimentaba la camptotecina. Un aumento de fluorescencia indicaría que la camptotecina se libera al exterior del liposoma, donde ya no puede ocurrir FRET.

La cinética de liberación de la camptotecina se estudió a pH 7,4 y a pH 3,5. Los dos valores de pH corresponden a los valores de pH de los medios a los que serían expuestos los liposomas en el cuerpo, pues la sangre posee un pH de 7,4 (Stewart, 1981; Kellum, 2000) y los lisosomas un pH ácido, alrededor de 4 (Perera y Zoncu, 2016; Lawrence y Zoncu, 2018). La concentración de camptotecina encapsulada en una dispersión de liposomas convencionales a pH 7,4 fue de $3,46 \cdot 10^{-6}$ M. Para llevar a cabo el estudio, se dispersaron 500 μ L de esta muestra de liposomas en 2 mL de la disolución tampón (PBS o tampón citrato, según el experimento) y se midió la fluorescencia inicial (tiempo 0), que fue de 90,0 para la suspensión a pH 7,4 en PBS y de 82,1 para la realizada a pH 3,5 en tampón citrato. Las muestras se midieron a diferentes tiempos

hasta que los valores de intensidad de fluorescencia se estabilizaron, lo que indica que ya no se produce más liberación en las condiciones experimentales. El valor de fluorescencia en el plato fue de 90,0 para los liposomas a pH 7,4 y de 91,3 para los dispersados a pH 3,5. La variación del aumento de fluorescencia, expresado en porcentaje respecto al valor inicial, se muestra en la Figura 3.26. A pH 3,5, la intensidad de fluorescencia aumentó un 5% en las cuatro primeras horas y, posteriormente, aumentó ligeramente con el tiempo hasta llegar al valor del 5,65% a las 100 horas de experimento.

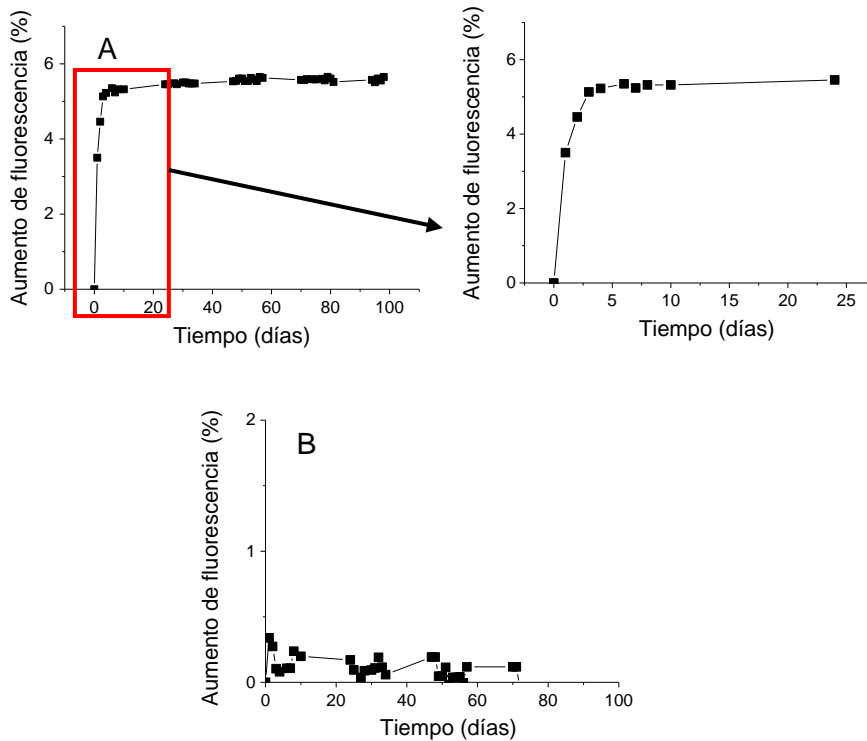


Figura 3.26. Cinética de liberación de la camptotecina encapsulada en liposomas convencionales a pH 3,5 (A) en tampón citrato y a pH 7,4 (B) en PBS.

Cuando la liberación se estudió a pH 7,4, apenas se observaron cambios en la intensidad de fluorescencia, lo que indicó que la camptotecina no abandona el interior del liposoma. Esto se puede explicar teniendo en cuenta que la camptotecina a pH 7,4 se encontraba en su forma abierta (carboxilato). Por tanto, la molécula estaba cargada negativamente y no podría atravesar la membrana lipídica que se encontraba también cargada negativamente.

Esto indica que, cuando los liposomas lleguen a los lisosomas celulares, de pH ácido, van a sufrir un efecto de liberación rápida de entorno al 5% de su contenido, aunque de manera prácticamente inmediata todo el sistema va a ser degradado por los enzimas lisosomales, dejando libre el fármaco para que ejerza su acción citotóxica en el núcleo celular (Ziomkowska et al., 2006).

La estabilidad que presentan los liposomas a pH 7,4 parece indicar que una vez que se inyecten en el torrente sanguíneo, cuyo pH es 7,4, la camptotecina no se va a liberar de los liposomas, evitándose los efectos secundarios del tratamiento. De esta forma, el fármaco sólo se liberaría cuando fuera endocitado por las células y degradado en los lisosomas, proceso que ocurre cuando los liposomas están en el microambiente tumoral, por el ya citado efecto EPR (Mishra et al., 2018).

Estos resultados están en concordancia con los observados en la bibliografía, que ponen de manifiesto un porcentaje de liberación de entre el 0,5-7% (en función de la composición lipídica, según Flaten et al., 2013). En este trabajo, la liberación fue incluso menor, ya que era prácticamente nula. Sin embargo, otros liposomas que encapsulan camptotecina muestran perfiles de liberación más altos, incluso del 95%

a las 24 horas, posiblemente debido a su diferente composición (Prabhbara et al., 2013).

5. Conclusiones

Las conclusiones obtenidas en este capítulo se mencionan a continuación.

- Los mejores resultados de encapsulación en liposomas convencionales ($1,72 \cdot 10^{-5} \pm 0,10 \cdot 10^{-5}$ M) y PEGilados ($3,07 \cdot 10^{-6} \pm 0,25 \cdot 10^{-6}$ M) se consiguieron a través de la internalización del complejo de inclusión CMCD-CAMP de forma directa. Por lo tanto, van a ser las formas de realizar la encapsulación para sintetizar sistemas liposomales destinados a los ensayos en líneas celulares *in vitro*.

- La concentración de camptotecina encapsulada fue mayor que el valor marcado por la CI_{50} (20-150 nM), por lo que son aptos para ser probados en líneas celulares.

- Se estudió por FRET la liberación de la camptotecina en función del pH del medio. Los liposomas formados a pH 7,4 mantuvieron su carga de camptotecina estable a pH 7,4 y presentaron muy poca liberación (6%) a pH 3,5.

6. Bibliografía

- Akbarzadeh A., Rezaei-Sadabady R., Davaran S., Joo S. W., Zarghami N., Hanifehpour Y., Samiei M., Kouhi M., Nejati-Koshki K. (2013). *Liposome: classification, preparation, and applications*. *Nanoscale Res. Lett.* 22:8(1):1-9.
- Álvarez-Puebla R. A., Garrido J. J. (2005). *Effect of pH on the aggregation of a gray humic acid in colloidal and solid states*. *Chemosphere*. 59:659-667.
- Attia M. F., Anton N., Wallyn., Omran Z., Vandamme T. F. (2019). *An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites*. *J. of Pharm. And Pharmac.* 71(8):1185-1198.
- Atyabi F., Farkhondehfai A., Esmaeili F., Dinarvand R. (2009). *Preparation of pegylated nano.liposomal formulation containing SN-38: In vitro characterization and in vivo biodistribution in mice*. *Acta Pharm.* 59(2):133-144.
- Bajar B. T., Wang E. S., Zhang S., Lin M. Z., Chu J. (2016). *A Guide to Fluorescence FRET Pairs*. *Sensors*. 1-24.
- Bally M. B., Mayer L. D., Loughrey H., Redelmeier T. Madden T. D., Wong K., Harrigan P. R., Hope M. J., Cullis P. R. (1988). *Dopamine accumulation in large unilamellar vesicle systems induced by transmembrane ion gradients*. *Chem Phys Lipids*. 47:97-107.
- Bangham A.D., Standish M.M., Watkins J.C. (1965). *Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids*. *J. Mol. Biol.* 13:238-252.

- Barenholz Y., Bolotin E., Cohen R., Gabizon A. (1996). *Sterically stabilized doxorubicin loaded liposomes (DOX-SL(TM)): from basics to the clinics*. Phosph. Sulfur. Silicon. Relat Elem. 109:293-296.
- Berger N., Sachse A., Bender J., Schubert R., Brandl M. (2001). *Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics*. Int. J. Pharm. 223:55-68.
- Bertrand N., Bouvet C., Mure P., Leroux J.-C. (2010). *Transmembrane pH-Gradient Liposomes To Treat Cardiovascular Drug Intoxication*. ACS Nano. 4(12):7552-7558.
- Brandl M. (2003). *Liposomal drug carriers for cancer diagnosis and therapy*. In: Budman D. R., Calvert A. H., Rowinsky E. K. (Eds.). *Handbook of anticancer drug development* (pp. 225–236). Philadelphia, Pennsylvania, USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Bulkake U., Doppalapudi S., Kommineni N., Khan W. (2017). *Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review*. Pharmaceutics. 9(12):1-33.
- Burke T. G., Staubus A. E., Mishra A. K. (1992). *Liposomal stabilization of camptothecin's lactone ring*. J. Am. Chem. Soc. 114:8318-8319.
- Cern A., Golbraikh A., Sedykh A., Tropsha A., Barenholz Y., Goldblum A. (2012). *Quantitative structure - property relationship modeling of remote liposome loading of drugs*. J. Control. Rel. 160:147-157.
- Charrois G.J.R., Allen T.M. (2003). *Rate of biodistribution of STEALTH® liposomes to tumor and skin: influence of liposome diameter*

and implications for toxicity and therapeutic activity. Biochim. Biophys. Acta 1609:102-108.

- Cheng J., Khin K. T., Jensen G. S., Liu A., Davis M. E. (2003). *Synthesis of Linear, β -Cyclodextrin-Based Polymers and Their Camptothecin Conjugates.* Bioconjugate Chem. 14:1007-1017.

- Cortesi R., Esposito E., Maietti A., Menegatti E., Nastruzzi C. (1997). *Formulation study for the antitumor drug camptothecin: liposomes, micellar solutions and a microemulsion.* Intern. J. of Pharm. 159:95-103.

- Costa A. P., Xu X., Burgess D. J. (2013). *Freeze-Anneal-Thaw Cycling of Unilamellar Liposomes: Effect on Encapsulation Efficiency.* Pharmac. Res. 31(1):97.

- Deamer D. W., Crofts A. R., Prince R. C. (1972). *Response of fluorescent amines to pH gradients across liposome membranes.* Biochim. Biophys. Acta. 274:323-335.

- Deamer D. W., Nichols J. W. (1983). *Proton-hydroxide permeability of liposomes.* Proc. Natl. Acad. USA. 80(1):165-168.

- Deshantri A. K., Metselaar J. M., Zagkou S., Storm G., Mandhame S. N., Fens M. H. A. M., Schiffelers R. M. (2019). *Development and characterization of liposomal formulation of bortezomib.* Intern. J. of Pharmac. 1:1-8.

- Dos Santos N., Waterhouse D., Masin D., Tardi P. G., Karlsson G., Edwards K., Bally M. B. (2005). *Substantial increases in idarubicin plasma concentration by liposome encapsulation mediates improved antitumor activity.* J. Control Release. 105(1-2):89-105.

- Eloy J. O., Claro de Souza M., Petrilli R., Barcellos J. P., Lee R. J., Marchetti J. M. (2014). *Liposomes as carriers of hydrophilic small*

molecules drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. Colloids Surf B. Biointer. 123:345-363.

- Fang S., Hou Y., Ling L., Wang D., Ismail M., Du Y., Zhang Y., Yao C., Li X. (2018). *Dimeric camptothecin derived phospholipid assembled liposomes with high drug loading for cancer therapy.* Colloids and Surf. B: Bioint. 166:235-244.

- Fang T., Dong Y., Zhang X., Xie K., Lin L., Wang H. (2016). *Integrating a novel SN38 prodrug into the PEGylated liposomal system as a robust platform for efficient cancer therapy in solid tumors.* Intern. J. of Pharm. 512:39-48.

- Fatima M. T., Islam Z., Ahmad E., Barretod G. E., Ashraf G. M. (2018). *Ionic gradient liposomes: Recent advances in the stable entrapment and prolonged released of local anesthetics and anticancer drugs.* Biomed. And Pharmacother. 107:34-43.

- Fatouros D. G., Hatzidimitriou K., Antimisiaris S. G. (2001). *Liposomes encapsulating prednisolone and prednisolone-cyclodextrin complexes: Comparison of membrane integrity and drug release.* Eur. J. of Pharmac. Sci. 13:287-296.

- Flaten G. E., Chang T.-T., Phillips W. T., Brandl M., Bao A., Coins B. (2013). *Liposomal formulations of poorly solubility drug retention and biodistribution.* J. of Lip. Res. 23(1):70-81.

- Garcia-Carbonero R., Supko J. G. (2002). *Current Perspectives on the Clinical Experience, Pharmacology, and Continued Development of the Camptothecins.* Clin. Cancer Res. 8(3):641-661.

- Garnett M. J., Edelman E. J., Heidorn S. J., Greenman C. D., Dastur A., Lau K. W., Greninger P., Thompson I. R., Luo X., Soares J., Liu Q., Iorio

F., Surdez D., et al. (2012). *Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells*. Nature. 483:570-575.

- Goren D., Horowitz A.T., Zalipsky S., Woodle M.C., Yarden Y., Gabizon A. (1996). *Targeting of stealth liposomes to erB-2 (Her/2) receptor: in vitro and in vivo studies*. Br. J. Cancer. 74:1749-1756.

- Griffin P., Wei-Lun T., Shyh-Dar L. (2019). *Development and Characterization of the Solvent-Assisted Active Loading Technology (SALT) for Liposomal Loading of Poorly Water-Soluble Compounds*. Pharmaceutics. 11(9):465.

- Gubernator J. (2011). *Active methods of drug loading into liposomes: Recent strategies for stable drug entrapment and increased in vivo activity*. Expert Opin. Drug Deliv. 567-582.

- Haran G., Cohen R., Bar L. K., Barenholz Y. (1993). *Transmembrane ammonium-sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases*. Biochim. Biophys Acta. 1151(2):201-215.

- He Y., Zhu Q., Chen M., Huang Q., Wang W., Li Q., Huang Y., Di W. (2016). *The changing 50% inhibitory concentration (IC50) of cisplatin: a pilot study on the artifacts of the MTT assay and the precise measurement of density-dependent chemoresistance in ovarian cancer*. Oncotar. 7(3):70803-70821.

- Heldin C. H., Rubin K., Pietras K., Ostman A. (2004). *High interstitial fluid pressure – an obstacle in cancer therapy*. Nat. Rev. Cancer. 4:806-813.

- Hobbs S. K., Monsky W. L., Yuan F., Roberts W. G., Griffith L., Torchilin V. P., Jain R. K. (1998). *Regulation of transport pathways in*

tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:4607-4612.

- Hwang S. H., Maitani Y., Qi X. R., Takayama K., Nagai, T. (1999). *Remote loading of diclofenac, insulin and fluorescein isothiocyanate labeled insulin into liposomes by pH and acetate gradient methods.* Int. J. Pharm. 179:85-95.

- Jain R.K., Stylianopoulos T. (2010). *Delivering nanomedicine to solid tumors.* Nat. Rev. Clin. Oncol. 7:653-664.

- Kellum J. A. (2000). *Determinants of blood pH in health an disease.* Crit. Care. 4(1):6-14.

- Knight V., Koshkina N. V., Waldrep J. C., Giovanella B. C., Gilbert B. E. (1999). *Anticancer effect of 9-nitrocamptothecin liposome aerosol on human cancer xenografts in nude mice.* Cancer Chemother. Pharmacol. 44:177-186.

- Krascini S., Werner A., Eichhorn M. E., Schmitt-Sody M., Pahernik S. A., Sauer B., Schulze B., Teifel M., Michaelis U., Naujoks K., Dellian M. (2003). *Effect of the Surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels.* Int. J. Cancer. 105:561-567.

- Kumari A., Singla R., Guliani A., Yadav S. K. (2014). *Nanoencapsulation for drug delivery.* EXCLI J. Exp. And Clin. Sci. 13:265-286.

- Lawrence, R. E., Zoncu R. (2019). *The lysosome as a cellular centre for signalling, metabolism and quality control.* Nature Cell Biol. 1-10.

- Leung A., Amador A., Wang L. C., Mody U., Bally M. B. (2019). *What Drives Innovation: The Canadian Touch on Liposomal Therapeutics.* Pharmaceutics. 11(124):1-26.

- Li D., Zhuang J., Yang Y., Wang D., Yang J., He H., Fan W., Benerjee A., Lu Y., Wu W., Gan L., Qi J. (2018). *Loss of integrity of doxorubicin liposomes during transcellular transportation evidenced by fluorescence resonance energy transfer effect*. Coll. And Sur. B: Biointerf 171:224-232.
- Lin C.-H., Al-Suwayeh S. A., Hung C.-F., Chen C.-C., Fang J.-Y. (2013). *Camptothecin - Loaded Liposomes with α - Melanocyte - Stimulating Hormone Enhance Cytotoxicity Toward and Cellular Uptake by Melanomas: An Application of Nanomedicine on Natural Product*. J. of Trad. and Complem. Med. 3(2):102-109.
- Lin M., Qi X.-R. (2019). *Purification Method of Drug-Loaded Liposome*. Lipos.-Based Drug Del. Systems. 1-11.
- Ma Y., Yang Q., Wang L., Zhou X., Zhao Y., Deng Y., (2012). *Repeated injections of PEGylated liposomal topotecan induces accelerated blood clearance phenomenon in rats*. Eur. J. of Pharm. Ci. 45:539-545.
- Maeda H., Bharate G. Y., Daruwalla J. (2009). *Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect*. Eur. J. Pharm. Biopharm. 71:409-419.
- Maitani Y., Katayama S., Kawano K., Hayama A., Toma K. (2008). *Artificial Lipids Stabilized Camptothecin Incorporated in Liposomes*. Biol. Pharm. Bull. 31(5):990-993.
- Martí A., Armengol X., Estelrich J., Hernández-Borrell J. (1992). *Encapsulation of doxorubicin in neutral liposomes by passive methods: evidence of drug-lipid interaction at neutral pH*. J. Microencap. 9(2):191-200.

- Martín E. M. M. (2004). *Cyclodextrins and their uses: a review*. *Process Biochem.* 39(9):1033-1046.
- Mayer I. D., Madden T. M., Bally M. U., Cullis P. R. (1993). *pH gradient-mediated drug entrapment in liposomes*. In *Liposome Technology*. 2nd edition. Edited by Gregoriadis G. Boca Raton: CRC Press. 27-44.
- Mazen M., Arias J. (2019). *An update on liposomes in drug delivery: a patent review (2014-2018)*. *Exp. Opin. On Ther. Patents.* 891-907.
- Mi Z., Burke T. G. (1994). *Marked interspecies variations concerning the interactions of camptothecin with human blood components*. *Biochem.* 33(34):10325-10336.
- Miao Z.-L., Deng Y.-J., Du H.-Y., Suo X.-B., Wang X.-Y., Wang X., Wang L., Cui L.-J., Duan N. (2015). *Preparation of a liposomal delivery system and its in vitro release of rapamycin*. *Exp. And Therap. Med.* 9:941-946.
- Mishra H., Chauhan V., Kumar K., Teotia D. (2018). *A comprehensive review on Liposomes: a novel drug delivery system*. *J. of Drug Del. and Ther.* 8(6):400-404.
- Mori A., Klibanov A.L., Torchilin V.P., Huang L. (1991). *Influence of the steric barrier of amphipathic poly(ethyleneglycol) and ganglioside GM1 on the circulation time of liposomes and on the target binding of immunoliposomes in vivo*. *FEBS Lett.* 284:263-266.
- Odeh F., Nsairat H., Alshaer W., Alsotari S., Buqaien R., Ismail S., Awidi A., Bawab A. (2019). *Remote loading of curcumin-in-modified β -cyclodextrins into liposomes using a transmembrane pH gradient*. *RCS Adv.* 64(9):37148-37161.

- Papahadjopoulos D., Gabizon A. (1987). *Targeting of liposomes to tumor cells in vivo*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 507:64-74.
- Park J.W., Hong K., Kirpotin D.B., Colbern G., Shalaby R., Baselga J., Shao Y., Nielsen U.B., Marks J.D., Moore D., Papahadjopoulos D., Benz C.C. (2002). *Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery*. Clin. Cancer Res. 8:1172-1181.
- Pattni B. S., Chupin V. V., Torchilin V. P. (2015). *New Developments in Liposomal Drug Delivery*. Chem. Rev. 115(19):10938-10966.
- Perera R. M., Zoncu R. (2016). *The lysosome as a regulatory hub*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 32, 223-253.
- Piel G., Piette M., Barillaro V., Castagne D., Evrard B., Delattre L. (2006). *Betamethasone-in-cyclodextrin-in-liposome: The effect of cyclodextrins on encapsulation efficiency and release kinetics*. Intern. J. of Pharmac. 312:75-82.
- Prabhakara P., Zenia T., Marina K., Shama K. P., Girish S. N., Matapady N. H. (2013). *Preparation and evaluation of lipid vesicles of camptothecin as targeted drug delivery system*. Pak. J. Pharm. Sci. 26:(4)779-786.
- Ran R., Wang H., Liu Y., Hui Y., Sun Q., Seth A., Wibowo D., Chen D., Zhao C.-X. (2018). *Microfluidic self-assembly of a combinatorial library of single- and dual-ligand liposomes for in vitro and in vivo tumor targeting*. Eur. J. Pharm. Biopharm. 130:1-10.
- Rehman S. S., Lim K., Wang-Gillam A. (2016). *Nanoliposomal irinotecan plus fluorouracil and folinic acid: a new treatment option in metastatic pancreatic cancer*. Expert. Rev. Anticancer Ther. 16:485-492.

- Riviere K., Huang Z., Jerger K., Macaraeg N., Szoka F. C. J. (2011). *Antitumor effect of folate-targeted liposomal doxorubicin in KB tumor-bearing mice after intravenous administration*. J. Drug Target. 19:14-24.
- Saetern A. M., Flaten G. E., Brandl M. (2004). *A Method to Determine the Incorporation Capacity of Camptothecin in Liposomes*. AAPS Pharm. Sci. Tech. 5(3):1-8.
- Shrestha D., Jenei A., Nagy P., Vereb G., Szöllosi J. (2015). *Understanding FRET as a Research Tool for Cellular Studies*. Intern. J. of Mol. Sci. 16(4):6718-6756.
- Spena C. R., De Stefano L., Palazzolo S., Salis B., Granchi C., Minutolo F., Tuccinardi T., Fratamico R., Crotti S., Aronco S. D., Agostini M., Corona G., Caligiuri I., Canzonieri V., Rizzolio F. (2018). *Liposomal delivery of a pin1 inhibitor complexed with cyclodextrins as new therapy for high-grade serous ovarian cancer*. J. Control. Release. 281:1-10.
- Stewart P.A. (1981). *How to understand acid–base. A Quantitative acid–base Primer for Biology and Medicine*. New York: Elsevier. 1-286.
- Sugarman S. M., Zou Y., Wasan K., Poirot K., Kumi R., Reddy S., Perez-Soler R. (1996). *Lipid-complexed camptothecin: formulation and initial biodistribution and antitumor activity studies*. Cancer Chem. Pharm. 37:531-538.
- Sulkowski W. W., Pentak D., Nowak K., Sulkowska A. (2005). *The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome*. J. of Mol. Struct. 744:737-747.
- Sur S., Fries A.C., Kinzler K.W., Zhou S., Vogelstein B. (2014). *Remote Loading of Preencapsulated Drugs into Stealth Liposomes*. Proc. Natl. Acad. Sci. 111:2283-2288.

- Swenson C. E., Perkins W. R., Roberts P., Janoff A. S. (2001). *Liposome technology and the development of MyocetTM (liposomal doxorubicin citrate)*. Breast. 10(2):1-7.
- Szoka F. C. (1990). *The future of liposomal drug delivery*. Biotechnol. Appl. Biochem. 12:496-500.
- Thurston G., McLean J. W., Rizen M., Baluk P., Haskell A., Murphy T. J., Hanahan D., MacDonald D. M. (1998). *Cationic liposomes target angiogenic endothelial cells in tumors and chronic inflammation in mice*. J. Clin. Invest. 101(7):1401-1413.
- Watanabe M., Kawano K., Toma K., Hattori Y., Maitani Y. (2008). *In vivo antitumor activity of camptothecin incorporated in liposomes formulated with an artificial lipid and human serum albumin*. J. Control Rel. 127:231-238.
- Working P., Dayan A. (1996). *Pharmacological-toxicological expert report. CAELYX. (Stealth liposomal doxorubicin HCl)*. Hum. Exp. Toxicol. 15(9):51-785.
- Yoon H. Y., Kwak S. S., Jang M. H., Kang M. H., Sung S. W., Kim C. H., Kim S. R., Yeom D. W., Kang M. J., Choi Y. W. (2017). *Docetaxel-loaded RIPL peptide (IPLVVPLRRRRRRRC)-conjugated liposomes: drug release, cytotoxicity, and antitumor efficacy*. Int. J. Pharm. 523(1):229-237.
- Yu-Tang, W. (2018). *Föster Resonance Energy Transfer Immunoassays Using Engineered Proteins for Breast Cancer Biomarker Detection*. Biological Physics. Université Paris. Sacaly.
- Zhang B., Wang T., Yang S., Xiao Y., Song Y., Zhang N., Garg S. (2016). *Development and evaluation of oxaliplatin and irinotecan co-*

loaded liposomes for enhancer colorectal cancer therapy. J. of Contr. Tel. 238:10-21.

- Ziolkowska B., Kruszewski S., Siuda R., Cyrankiewicz M. (2006). *Deactivation rate of camptothecin determined by factor analysis of steady-state fluorescence and absorption spectra. Opt. Applicata. 36(1):137-246.*

- Zucker D., Marcus D., Barenholz Y., Goldblum A. (2009). *Liposome drugs' loading efficiency: A working model based on loading conditions and drug's physicochemical properties. J. Control Rel. 139(1):73-80.*

CAPÍTULO 4.
CITOTOXICIDAD DEL
SISTEMA
NANOPARTICULADO
CAMPTOTECINA-
LIPOSOMAS

1. Introducción

Una vez desarrollado el sistema de liberación de liposomas con camptotecina es necesario comprobar su potencial citotóxico en células y, para ello, se realizaron ensayos celulares de viabilidad.

Los ensayos celulares son utilizados para determinar la toxicidad y los efectos sobre la proliferación celular de nuevos fármacos o sistemas vehiculizados con moléculas citotóxicas para gran cantidad de enfermedades, entre ellas el cáncer (Chang et al., 2015). Además, son necesarios antes de realizar experimentos *in vivo* (Liu et al., 2015).

Existen diferentes metodologías entre las cuales los ensayos de reducción de sales de tetrazolium o ensayos MTT son los más populares. En general, todos los métodos tienen en común que miden algún aspecto del metabolismo celular o de la actividad enzimática, generando información sobre el número de células viables al final de cada experimento (Berg et al., 1990; Riss et al., 2016). Todos estos ensayos buscan determinar un parámetro muy importante para conocer el efecto sobre la viabilidad celular, conocido como concentración inhibitoria 50 (CI₅₀). Este parámetro se define como la dosis requerida para que un agente quimioterápico o de otro tipo produzca una mortalidad del 50% de una población celular con un número inicial de células definido (He et al., 2016).

Para la camptotecina, diversas investigaciones han determinado los valores de CI₅₀ en diferentes líneas celulares, tanto cancerígenas como sanas. Los valores se recogen en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Valores de la CI_{50} para la camptotecina en diferentes líneas celulares estudiadas en la bibliografía.

Tumor de origen	Línea celular	CI_{50} (nM)	Referencias
Pulmón	HT29	20	Cheng et al., 2003
		46	Thomas et al., 2004
		87,8	Zhao et al., 1997
	LS174T	5	Cheng et al., 2003
	RKO	40	Dong et al., 2003
	SW480	290	Zi et al., 2019
	SW620	10	Dong et al., 2003
HTC116	14,3	Sooryakumar et al., 2011	
Próstata	PC3	75	Cheng et al., 2003
	DU145	11,5	Sooryakumar et al., 2011
Estómago	AGS	61	Gaur et al., 2012
	NCI-N87	5	Gaur et al., 2012
Ovario	A2780	7	Cheng et al., 2003
	SK-OV-3	51	Zhao et al., 1997
	SKVLB	53	Zhao et al., 1997
Mama	MCF7	570	Acevedo-Morantes et al., 2013
		200	Chauvier et al., 2002
		680	Zi et al., 2019
		13,3	Sooryakumar et al., 2011
	MDA-MB-157	7	Jones et al., 1997
	GI-101A	150	Jones et al., 1997
	MDA-MB-231	250	Jones et al., 1997
Leucemia (CML)	K562	140	Chauvier et al., 2002
Leucemia	HL-60	64	Zi et al., 2019
	CCRF-CAM	5,5	Sooryakumar et al., 2011
Hígado	SMMC-7721	450	Zi et al., 2019
Pulmón	A-549	90	Zi et al., 2019
		1	Krishman et al., 2017
	H460	330	Thomas et al., 2004
		330	Dallavalle et al., 2000
Cérvix	KB	13	Chang et al., 2000
Células de mama sanas	MCF10A	1070	Acevedo-Morantes et al., 2013
Células de riñón sanas	HEK293	0,9	Li et al., 2017

Se pueden observar enormes diferencias en los valores de CI_{50} entre líneas celulares e incluso entre diferentes experimentos realizados por diferentes laboratorios en los que se ha utilizado la misma línea. Aun así, todas las concentraciones están en un rango de nanomolar. La

diferencia entre líneas celulares es debida a la heterogénea eficacia del fármaco en función del tipo y número de mutaciones que las células tumorales han adquirido para alcanzar el estado neoplásico, obteniendo como resultado una diferente quimiorresistencia. La diferencia dentro de una misma línea celular se debe a la densidad celular inicial y a la capacidad de división en ese determinado momento (He et al., 2016). La CI_{50} de la camptotecina en las líneas celulares varía en su mayoría entre 1 y 150 nM, y solamente algunos experimentos obtienen valores superiores a estos, tal y como se observa en la Tabla 4.1.

1.1. Citotoxicidad de los complejos de inclusión CD-CAMP

La citotoxicidad de disoluciones que contienen los complejos de inclusión ciclodextrina-camptotecina no se ha caracterizado mediante ensayos celulares de manera directa, sino que se ha determinado la citotoxicidad de diferentes sistemas, bien polímeros o nanopartículas, en los que se han incorporado los complejos de inclusión ciclodextrina-camptotecina (Krishan et al., 2017; Rajan et al., 2017; Cheng et al., 2003; Kuswaha et al., 2014; Swaminathan et al., 2010; Cirpanli et al., 2009; Kim et al., 1992; Gaur et al., 2012; Zhan et al., 2007; Gigliotti et al., 2016). De manera general, la citotoxicidad para estos sistemas aumentaba considerablemente con respecto a la citotoxicidad de la camptotecina libre.

1.2. Citotoxicidad de la camptotecina en liposomas

Es importante destacar que no existen apenas trabajos que estudien la citotoxicidad de la camptotecina cuando se encuentra encapsulada en liposomas. La mayor parte de las investigaciones se

centran en determinar el perfil de liberación del fármaco en células, sin tratar su eficacia citotóxica. En cambio, en otros trabajos directamente llevan a cabo ensayos *in vivo* (Watanabe et al., 2008; Prabhakara et al., 2013; Koshkina et al., 1999). Los estudios citotóxicos de la camptotecina en liposomas se describen a continuación. Cortesi et al. (1997) encapsularon el fármaco en liposomas, en soluciones micelares y en microemulsiones, y determinaron su citotoxicidad y actividad antiproliferativa en células de leucemia K562 y compararon estos resultados con la eficacia del fármaco libre. Los sistemas lipídicos mostraron una actividad similar o ligeramente mejorada respecto al fármaco libre. Además, describieron que los sistemas de liposomas sin fármaco no causan inhibición sobre el crecimiento. Otros investigadores encapsularon camptotecina en liposomas que se funcionalizaron en su superficie con una hormona estimuladora de melanocitos y caracterizaron la citotoxicidad del sistema en células de melanoma B16F10 para comparar su eficacia respecto al fármaco libre. La administración de este sistema condujo a una reducción de la viabilidad significativamente mayor a las 24 horas en comparación con la administración de camptotecina libre (Lin et al., 2013). Otros autores sintetizaron sistemas lipídicos no liposomales con un lípido denominado cardiolipina con camptotecina en su interior, y caracterizaron su actividad citotóxica en células de las líneas DIFI de cáncer de colon y MDA-Panc3 de cáncer de páncreas. Este sistema mejoró la solubilidad y la eficacia del fármaco (Sugarman et al., 1996).

1.3. Internalización celular de los liposomas

Los liposomas no difunden a través de la membrana celular, ya que ésta es solamente permeable a moléculas muy pequeñas y polares.

Estos sistemas liposomales utilizan la endocitosis como mecanismo de internalización celular (Mahmoudi et al., 2014).

La endocitosis consiste en la creación de una invaginación de la membrana plasmática de la célula, que envuelve el líquido extracelular en donde está presente la sustancia a internalizar, formando una vesícula unida a la membrana plasmática llamada endosoma (Makaraci y Kim, 2018). Este proceso de endocitosis puede ser de dos tipos en función de la naturaleza de la sustancia internalizada: fagocitosis o pinocitosis. *La fagocitosis* consiste en la internalización de material extracelular mayor a 250 nm de tamaño, a través del marcaje por opsoninas o inmunoglobulinas, que desencadenan el proceso de internalización. El fagosoma formado se une a los lisosomas y el material es digerido por enzimas hidrolíticas (Caviston y Holzbaur, 2006). Este tipo de endocitosis se produce para incorporar bacterias, restos de células o solutos de gran tamaño (Rajendran et al., 2018). *La pinocitosis* internaliza nanopartículas de tamaños inferiores a los 250 nm (Panariti et al., 2012). En este tipo de endocitosis, la membrana plasmática forma una invaginación que absorbe pequeños volúmenes de líquido extracelular en donde están suspendidas las nanopartículas, formando vesículas intracelulares llamadas pinosomas, las cuales se fusionan con los lisosomas que, debido a su pH ácido, degradan el contenido (Ramsdem et al., 2018). Este proceso ocurre en todas las células de manera continua, independientemente del tipo que sean. La endocitosis está influenciada por varios factores, de modo que esta puede mejorarse cambiando parámetros de los vehículos a internalizar, como son el tamaño, la forma, la carga superficial, la hidrofobicidad, la elasticidad y las características de superficie (Foroozandeh y Aziz, 2018).

2. Objetivos

Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, el objetivo principal de este capítulo es estudiar la eficacia citotóxica de los diferentes sistemas en cultivos celulares *in vitro*. Para ello, se proponen los siguientes objetivos parciales.

- Estudiar la citotoxicidad de los sistemas: liposomas convencionales + CMCD-CAMP, liposomas convencionales + CAMP, liposomas PEGilados + CMCD-CAMP, complejo de inclusión CMCD-CAMP y camptotecina libre. Se eligieron para este estudio las líneas celulares HTC-116 de cáncer de colon, H-460 de cáncer de pulmón, BT-474 de cáncer de mama y HS-5 de fibroblastos sanos.
- Analizar la toxicidad de los liposomas (convencionales y PEGilados) y la CMCD en las mismas concentraciones utilizadas para el tratamiento celular.
- Obtener las CI_{50} de cada uno de los sistemas estudiados, determinando así la eficacia citotóxica de cada uno de ellos.
- Conocer el mecanismo de internalización celular de los liposomas.

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales y equipos

Los materiales utilizados en los experimentos de este capítulo fueron: tampón fosfato salino (PBS, pH=7,4, cuya composición es 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 8 mM de Na_2HPO_4 y 2 mM de KH_2PO_4 , Sigma-Aldrich, Alemania), dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, Alemania), medio de cultivo mínimo esencial de Eagle modificado por

Dulbecco ((DMEM, Sigma Aldrich, Alemania), tripsina-EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 1X (0,5 mg/mL de tripsina y 0,20 mg/mL de EDTA, Sigma-Aldrich, Alemania)), suero bovino fetal (Sigma-Aldrich, Alemania), penicilina-estreptomina (Sigma-Aldrich, Alemania), reactivo bromuro de 3-(4, 5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium (MTT, Sigma-Aldrich, Alemania), azul tripán al 0,4% (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), placas de conteo celular (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), placas de cultivo de 24 pocillos (Falcon[®] Life Sciences, Estados Unidos), *flask* de 25, 75 y 150 cm² (TPP[®], Suiza), LysoTracker[™] Rojo DND-99 (Molecular Probes, Estados Unidos), placas Petri para microscopía confocal 35 mm de altura (Idibi, Alemania), colesterol fluorescente 25-[N-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)metil]amino]-27-norcolesterol (25-NBD, Avanti Polar Lipids Inc., Estados Unidos), pipetas serológicas de 1, 5, 10 y 20 mL (Sigma-Aldrich, Alemania) y las líneas celulares H-460 (ATCC[®] HTB-177[™]) de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), BT-474 (ATCC[®] HTB-20[™]) de carcinoma de mama ductal invasivo, HTC-116 (ATCC[®] CCL-247[™]) de carcinoma colorrectal y HS-5 (ATCC[®] CRL-11882[™]) de fibroblastos estromales sanos, obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Estados Unidos).

Los ensayos celulares se realizaron en una campana de flujo laminar (CellGard class II, Type A2, Biological Safety Cabinet. Nuair[™], Reino Unido) y las células utilizadas se mantuvieron en un incubador (Thermo Electron Corporation, Estados Unidos) en condiciones controladas. Por otra parte, para contarlas se utilizó un contador de células (Invitrogen[™] Countness[™] automated cell counter, Estados Unidos) y para separarlas del medio de cultivo se utilizó una

centrífuga (Centrífuga 5804 Eppendorf, Alemania). La medición de las absorbancias en las placas multipocillo se realizó utilizando un espectrofotómetro multiplaca (Biochrom EZ Read 2000 Microplate Reader, Reino Unido). Previamente a esta medida, las placas con el reactivo MTT se mantuvieron en agitación a través de un agitador orbital (Heidolph polymer 1040, Alemania). Una vez medidas las placas, el cálculo de las CI_{50} se realizó utilizando el programa informático GraphPad Prism 6 Project (Estados Unidos). Por último, para esterilizar el material de vidrio se empleó un autoclave (P Selecta PV-1157, España) y para mantener las células congeladas a $-80^{\circ}C$ se utilizó un ultracongelador (Ultra low temperature freezer U570 premium, New Brunswick Scientific, Estados Unidos).

Para realizar los experimentos de internalización celular, se utilizó un microscopio confocal de fluorescencia (Leica TCS-SP5, Leica Microsystems, Alemania) y las imágenes se analizaron a través del programa de adquisición de imágenes de fluorescencia (Leica LAS AF Versión 2.7.3.9723, Alemania).

3.2. Metodología

3.2.1. Descongelación celular

La realización de los ensayos MTT comenzó con la descongelación de los viales en donde se encontraban las células, conservados a $-80^{\circ}C$, con el objetivo de cultivar las líneas celulares y que alcanzaran la fase de crecimiento exponencial y un número suficiente. Para ello, se siguieron los siguientes pasos.

1^{er} paso: se introdujeron los viales de criopreservación (2 mL) en un baño de agua previamente calentado a $37^{\circ}C$, facilitando un cambio rápido de temperatura, con el objetivo de evitar una descongelación lenta

que promoviera la formación de cristales de hielo que dañaran a las células. El vial se mantuvo en el baño de agua durante 2 minutos.

2º paso: se transfirió el volumen de medio de cultivo con las células en suspensión (2 mL) a un tubo de centrifuga y se añadieron 3 mL más de medio de cultivo fresco.

3er paso: se centrifugó el tubo a 1500 rpm durante 4 minutos, se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 5 mL de medio de cultivo fresco, se resuspendieron las células y se transfirieron a un *flask* de 5 mL.

4º paso: se introdujeron en el incubador para su crecimiento.

Todo este proceso se realizó para eliminar el DMSO con el que se congelaron las células, existente en los viales.

3.2.2. Mantenimiento de las líneas celulares

Las líneas celulares se mantuvieron en el incubador a una temperatura de 37°C, con una atmósfera del 100% de humedad relativa y un 5% de saturación de CO₂. Las células se almacenaron en los *flask* con el medio de cultivo para su crecimiento y, debido a sus propiedades adherentes, se unieron a la superficie del mismo. El medio de cultivo DMEM, que se suplementó con un 10% de suero bovino fetal y un 1% de penicilina-estreptomicina, se sustituyó en su totalidad a diario, ya que las células consumían los nutrientes y producían sustancias de deshecho tóxicas. Una vez que las células se dividían durante dos o tres días (dependiendo de la tasa de crecimiento y el tamaño de cada línea celular) se lograba gran confluencia y las células empezaban a morir por falta de espacio y nutrientes. Por ello, se cambiaron de recipiente a un *flask* de mayor superficie o se desechó la mitad de las células y se volvían a sembrar las demás en un *flask* limpio de las mismas dimensiones. En cualquiera de los casos, se siguieron una serie de pasos comunes:

1^{er} paso: se eliminó el medio de cultivo con una pipeta y se lavaron las células con 2,5, 5 o 10 mL de PBS, según fuera el *flask* de 25, 75 y 150 cm², respectivamente. A continuación, se retiró el PBS.

2^o paso: se añadió el mismo volumen de Tripsina-EDTA 1X que el añadido de PBS, cuya función era romper las uniones que tienen las células con la superficie del recipiente y entre ellas mismas.

3^{er} paso: se incubaron las células durante un periodo de 3 minutos en el incubador a 37°C. Era muy importante que no fuera más tiempo que el mencionado, ya que las células podrían sufrir daños.

4^o paso: se añadió el mismo volumen de medio DMEM que de tripsina, para inactivar las propiedades líticas de este reactivo.

5^o paso: se transfirió todo el volumen a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 1500 rpm durante 4 minutos.

6^o paso: se retiró el sobrenadante y se resuspendió el residuo en el conveniente volumen de medio de cultivo.

7^o paso: se transfirió todo el volumen del tubo de centrifuga (o la mitad, según la cantidad de células que se quieran sembrar) a un nuevo *flask* y se añadió el medio de cultivo necesario para que se alcanzaran los 5 mL de volumen final en el caso de los *flask* de 25 cm², de 10 mL en los de 75 cm² y de 20 mL en los *flask* de 150 cm².

Estas células se mantuvieron en incubación realizando los cambios de medio de cultivo y recipiente oportunos. Una vez que poseían número y viabilidad favorables, se podrían realizar los ensayos de citotoxicidad.

3.2.3. Conteo celular

Para determinar tanto el número de células por mililitro como el porcentaje de viabilidad celular, se utilizó la técnica del azul tripán. Este colorante entra, únicamente, en el interior de las células muertas y las tiñe, observándose de color azul al microscopio (Strober, 2001). Para ello, se utilizó un contador de células automático y una placa de conteo que sigue el patrón de una cámara de Neubauer, y se siguieron los siguientes pasos:

1^{er} paso: se realizó una mezcla con 20 μ L de la suspensión celular y 20 μ L de azul tripán.

2^o paso: se añadieron 10 μ L de esta mezcla a cada una de las dos celdas de la placa de conteo.

3^{er} paso: se introdujo la placa en el interior del contador automático y este indicó el número de células y su viabilidad en cada una de las dos celdas. Finalmente, se realizó la media de ambas medidas.

El contador determinaba el número de células viables según la ecuación 4.1. (Ec. 4.1).

$$\% \text{ células viables} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ células viables}}{\text{N}^{\circ} \text{ células viables} + \text{n}^{\circ} \text{ células no viables}} \quad \text{Ec. 4.1.}$$

3.2.4. Ensayos MTT de citotoxicidad

a) Funcionamiento y preparación del reactivo MTT

Los ensayos MTT tienen como objetivo medir la viabilidad celular en respuesta a factores externos, como son los compuestos citotóxicos, a través de la reducción del reactivo MTT. Las células reaccionarán con este reactivo y la cantidad de formazán generado en forma de sales será directamente proporcional al número de células

viables. Solamente las células vivas son capaces de convertir el reactivo MTT en un producto de formazán de color morado. La cantidad de formazán se mide por absorbancia a una longitud de onda de 550 nm (Riss et al., 2016). Por lo tanto, la presencia o ausencia de color se convierte en un marcador para determinar la viabilidad celular. El mecanismo de transformación del reactivo MTT en formazán comprende una reacción de reducción de equivalentes reductores como el NADH, el NADPH o moléculas similares por parte de las enzimas deshidrogenasas que transfieren electrones al reactivo MTT, tal y como se esquematiza en la Figura 4.1, generando sales de formazán moradas. Estas sales se solubilizan con un solvente orgánico como el DMSO y son medidas espectrofotométricamente (Marshall et al., 1995).

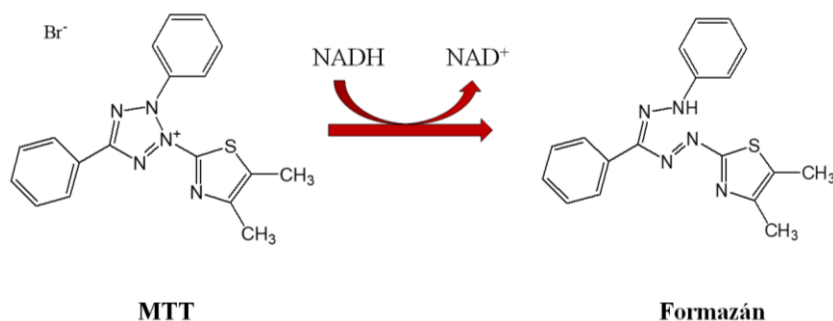


Figura 4.1. Reducción del reactivo MTT a formazán.

También se cree que en esta reacción reductora están involucradas enzimas mitocondriales, por lo que, de ser cierto, se mediría también la actividad mitocondrial (Berridge et al., 1996).

El sustrato de MTT se prepara en una solución de PBS a un pH de 7,4, previamente esterilizada, a una concentración de 5 mg/mL. La disolución se mantiene en agitación orbital durante 24 horas, protegida de la luz, para que el reactivo se disuelva en su totalidad.

b) Realización experimental del ensayo

Todos los experimentos se realizaron por triplicado ($n=3$), de modo que los resultados mostrados son una media de los tres ensayos. Se siguieron los siguientes pasos:

1^{er} paso: se descongelaron y cultivaron las células como se explicó en el apartado 3.2.1 y 3.2.2, respectivamente. Una vez que estaban en fase exponencial de crecimiento, se despegaron con tripsina y se determinó el número de células y su viabilidad.

2^o paso: se sembraron en placas de 24 pocillos a razón de 6.000 células/mL para las líneas celulares tumorales y de 25.000 células/mL para los fibroblastos sanos. Para ello, se preparó una suspensión madre con células en número necesario y 1 mL de ese volumen se adicionó a cada uno de los pocillos, exceptuando el blanco en el que solamente se añadió medio de cultivo.

3^{er} paso: se mantuvieron en el incubador durante 24 horas para su asentamiento y crecimiento.

4^o paso: después de las 24 horas, se eliminó el volumen de cada pocillo y se adicionó el mismo volumen de medio de cultivo que contenía el sistema de estudio (fármaco, complejo de inclusión o dispersión de liposomas con camptotecina encapsulada). El número de réplicas sembradas fue de tres para cada sistema.

5^o paso: se realizó una medición a 0, 24, 48 y 72 horas. El primer día (tiempo 0) se determinó el número de células que crecieron en una de las placas sembrada para tal fin, cuyo valor de absorbancia debe de ser superior a 0,1 para que haya un número de células suficiente que permita determinar el efecto del fármaco. Por otra parte, el valor de

absorbancia no debe de ser superior a 0,3 para evitar que las células mueran por falta de espacio y alimento antes de la medición a 72 horas.

6º paso: se añadieron 100 µL del reactivo MTT a cada pocillo (concentración final de 0,45 mg/mL) y las placas se mantuvieron en el incubador durante 1 hora a 37°C.

7º paso: se eliminó el medio de cultivo y se añadieron 500 µL de DMSO para disolver las sales de formazán. Las placas se mantuvieron en agitación orbital durante 10 minutos, protegidas de la luz, para homogeneizar la solución de color morado.

8º paso: se midió la absorbancia de cada una de las placas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm.

9º paso: con los resultados, se determinó el porcentaje de viabilidad a través de la ecuación 4.2. (Ec. 4.2) y se representaron los porcentajes en forma de gráfico de barras.

$$\% \text{ células viables} = \frac{(ABS_m - ABS_b)}{(ABS_c - ABS_b)} \times 100 \quad \text{Ec. 4.2.}$$

donde ABS_m es la absorbancia de la muestra, ABS_b es la absorbancia del blanco (medio de cultivo) y ABS_c es la absorbancia de la muestra control (células sin tratamiento).

3.2.5. Cálculo de la CI_{50}

El cálculo de la CI_{50} se realizó utilizando los resultados de viabilidad obtenidos en cada una de las concentraciones probadas a un tiempo de 48 horas. Con estos valores, se representó la concentración de fármaco frente a la viabilidad celular en porcentaje, y la concentración en la que se obtiene la inhibición del crecimiento en un 50% es la CI_{50}

(He et al., 2016). El cálculo de la CI_{50} se realizó tomando en consideración la ecuación de Hill (Ec. 4.3).

$$\% \text{ células viables} = \min + \frac{(\max - \min)}{(1 + 10^{\log CI - x}) \cdot k} \quad \text{Ec. 4.3.}$$

donde x es la concentración de fármaco, k es la pendiente de Hill, \min indica el valor mínimo de viabilidad, \max el valor máximo de viabilidad y CI indica la CI_{50} .

Aunque esta es la base teórica, en la práctica se determinó con la ayuda del software GraphPad Prism 6 Project.

3.2.6. Internalización de los liposomas en células tumorales

Previamente a la realización del ensayo, se sintetizaron liposomas con colesterol fluorescente en su estructura, así como la disolución de LysoTrackerTM Rojo para teñir los lisosomas celulares. De esta forma, fue posible monitorizar el lugar en donde se encontraban los liposomas en el interior celular y observar si se internalizaban por vía endocítica, ya que en este caso aparecerían en el interior de los lisosomas.

a) Preparación de liposomas fluorescentes

Con la finalidad de monitorizar la posición de los liposomas en el interior celular se tiñeron con colesterol fluorescente, de forma que pudieran visualizarse mediante microscopía de fluorescencia. Para ello, se preparó un volumen final de liposomas de 1 mL y se pesaron 38,1 mg de fosfatidilcolina y 19,3 mg de colesterol con una relación molar de 50:50, en donde el colesterol fluorescente (25-[N-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)metil]amino]-27-norcolesterol) estaba en un porcentaje del 4,14% del colesterol total (0,8 mg). De este modo, la concentración de colesterol fluorescente fue de 1,74 μM .

b) Preparación del medio de cultivo con LysoTracker rojo

Para visualizar los lisosomas celulares y conocer si en ellos se internalizaban los liposomas, se tiñeron de rojo. Para administrar este colorante, se preparó una disolución madre de 100 μ M en PBS a pH 7,4. A partir de esta disolución, se prepararon 2 mL de otra disolución en el medio de cultivo DMEM con una concentración del colorante de 100 nM. Se añadió 1 mL de este medio a la placa para teñir a las células.

c) Realización experimental del cultivo celular

El ensayo de internalización se realizó empleando los liposomas teñidos de verde y los lisosomas teñidos de rojo en células de cáncer de mama BT-474 (con una viabilidad mayor al 95%), con el objetivo de conocer el mecanismo de internalización celular de los liposomas. Para realizar este experimento se siguieron los siguientes pasos:

1^{er} paso: las células se despegaron de la placa de cultivo utilizando Tripsina-EDTA 1X, calentada previamente a 37°C.

2^o paso: se sembraron aproximadamente 15.000 células en una placa de cultivo específica para microscopía confocal. La elección de este número de células viene dada por el tamaño de las placas, ya que debe existir una cantidad de células suficiente que cubra toda la superficie, pero no un número excesivo para que el alimento y el espacio no se conviertan en un factor limitante.

3^{er} paso: las placas se incubaron durante 48 horas.

4^o paso: se eliminó el medio de cultivo y se adicionaron 2,2 mL del medio de cultivo fresco en el que estaban disueltos los liposomas a una concentración final de 0,15 mg/mL. Las placas se mantuvieron en el incubador durante 2 horas.

5° paso: se retiró el medio de cultivo con los liposomas que no fueron internalizados y se lavó la placa con 1 mL de PBS.

6° paso: se adicionaron 2 mL de medio DMEM con el LysoTracker™ Rojo a una concentración de 100 nM para teñir los lisosomas.

7° paso: las placas se introdujeron en el incubador durante 1 hora, tiempo suficiente para que los lisosomas se tiñeran. Terminado este tiempo, la muestra se visualizó mediante Microscopía Confocal de Fluorescencia.

3.2.7. Prueba estadística t de Student

La prueba t de Student, diseñada por William Gossett, es la prueba estadística más utilizada en ciencia, por su facilidad de uso y la veracidad de sus resultados. Se emplea para comparar una media simple con un valor de referencia o para comparar dos medias poblacionales. Esta prueba puede ser de tres tipos: de una muestra (compara resultados con un solo valor de referencia), de dos muestras (compara dos muestras en base a medias independientes de cada población) y pareado (dos grupos se comparan entre sí en función de sus medias). Con ello, la prueba indicará si los datos pueden ser considerados como iguales o son diferentes (Skaik, 2015). Esta prueba se realizó utilizando las medias de cada uno de los experimentos realizados ($n = 3$, en este trabajo) a través del programa Excel.

En esta investigación se utilizó la prueba estadística t de Student pareada para comparar los resultados medios de mortalidad obtenidos en una línea celular con los resultados obtenidos en otra línea celular.

4. Resultados y discusión

4.1. Caracterización de los sistemas utilizados

Se caracterizó la citotoxicidad de los diferentes sistemas de camptotecina, descritos a continuación.

1. Dispersión en PBS de liposomas convencionales que encapsulan el complejo CMCD-CAMP. La dispersión preparada tenía una concentración de camptotecina de $1,72 \cdot 10^{-5}$ M y una concentración de liposomas de 57,4 mg/mL.
2. Dispersión en PBS de liposomas PEGilados que encapsulan el complejo CMCD-CAMP. La concentración de camptotecina fue de $3,07 \cdot 10^{-6}$ M y la de liposomas de 69,5 mg/mL.
3. Dispersión en PBS de liposomas convencionales que encapsulan camptotecina. La concentración de camptotecina fue de $1,68 \cdot 10^{-6}$ M y la de liposomas de 57,4 mg/mL.
4. Disolución de camptotecina en PBS a pH 7,4 a una concentración de $2,48 \cdot 10^{-5}$ M.
5. Disolución del complejo de inclusión CMCD-CAMP en PBS. La concentración de camptotecina fue de $6,76 \cdot 10^{-5}$ M y la de ciclodextrina de 14mM.
6. Dispersión en PBS de liposomas convencionales a la concentración de 57,4 mg/mL
7. Dispersión en PBS de liposomas PEGilados a la concentración de 69,5 mg/mL.
8. Disolución de CMCD en PBS a una concentración de 1 mg/mL ($7,14 \cdot 10^{-10}$ M).

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron en las líneas celulares de carcinoma colorrectal (HTC-116), carcinoma de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) (H-460), carcinoma de mama ductal invasivo (BT-474) y fibroblastos estromales sanos (HS-5). La elección de estas líneas celulares se debe a que la camptotecina presenta una eficacia terapéutica sobradamente reconocida en este tipo de tumores (Takimoto et al., 1998). De hecho, el cáncer de colon fue el primer tipo de tumor en el que se utilizó este fármaco con gran éxito (Giovannella et al., 1989), lo que facilitó que los estudios continuaran durante años en esa dirección y actualmente, el Irinotecán es el tratamiento de primera línea para el tratamiento del cáncer de colon metastásico (Venditto y Simanek, 2010). En años posteriores se empezó a utilizar para el cáncer de pulmón de células no pequeñas (Dancey et al., 1996). Por otro lado, la elección de la línea celular de cáncer de mama se debe a que la camptotecina y sus derivados no se utilizan como tratamiento de primera línea para este y otros muchos tumores sólidos (Venditto y Simanek, 2010; Xia et al., 2013), pero sí son empleados en segunda línea, por lo que buenos resultados podrían abrir el camino en su uso. Adicionalmente, se eligieron estas tres líneas tumorales porque corresponden a los tumores que provocan una mayor mortalidad en la sociedad (Bray et al., 2018). Por ello, y con el objetivo de alcanzar el mayor espectro de beneficio posible con esta investigación, se planteó trabajar con estas tres líneas celulares.

Por último, se eligió la línea de fibroblastos HS-5 para conocer el efecto que tiene el fármaco en una línea celular sana. Cabe destacar que, en estudios *in vitro*, se espera en esta línea un efecto citotóxico similar al obtenido en células tumorales, ya que el fármaco no es selectivo frente a ningún tipo de célula, pues todas las células tienen la topoisomerasa I

activa. De todas maneras, se determinará su efecto para conocer si su mortalidad es mayor que en las líneas tumorales. Su efecto citotóxico selectivo puede verse únicamente en estudios *in vivo*, en donde el microambiente tumoral y sus características, unidas al tamaño de los liposomas, juegan un papel esencial (Binnewies et al., 2018).

Las concentraciones de la camptotecina libre o encapsulada de los sistemas en el medio de cultivo fue de 10, 40, 75 y 150 nM. Se eligieron estas concentraciones porque se encuentran en el intervalo de valores de CI_{50} que se conocen para la camptotecina y que se recogen en la Tabla 4.1. Estas concentraciones de camptotecina corresponden a las siguientes de lípidos: 0,03 0,13, 0,25 y 0,5 mg/mL para los liposomas convencionales que encapsulan el complejo de inclusión; 0,3, 1,3, 2,5 y 5,1 mg/mL para los liposomas convencionales que encapsulan la camptotecina y 0,2, 0,90, 1,7 y 3,4 mg/mL para los liposomas PEGilados que encapsulan el complejo de inclusión.

A continuación, se muestran, en las Figuras 4.2, 4.3, 4.4 y 4.5, los resultados de viabilidad celular determinados por el ensayo MTT tras exponer las diferentes líneas celulares a los sistemas anteriormente descritos.

Línea celular HTC-116 (carcinoma de colon)

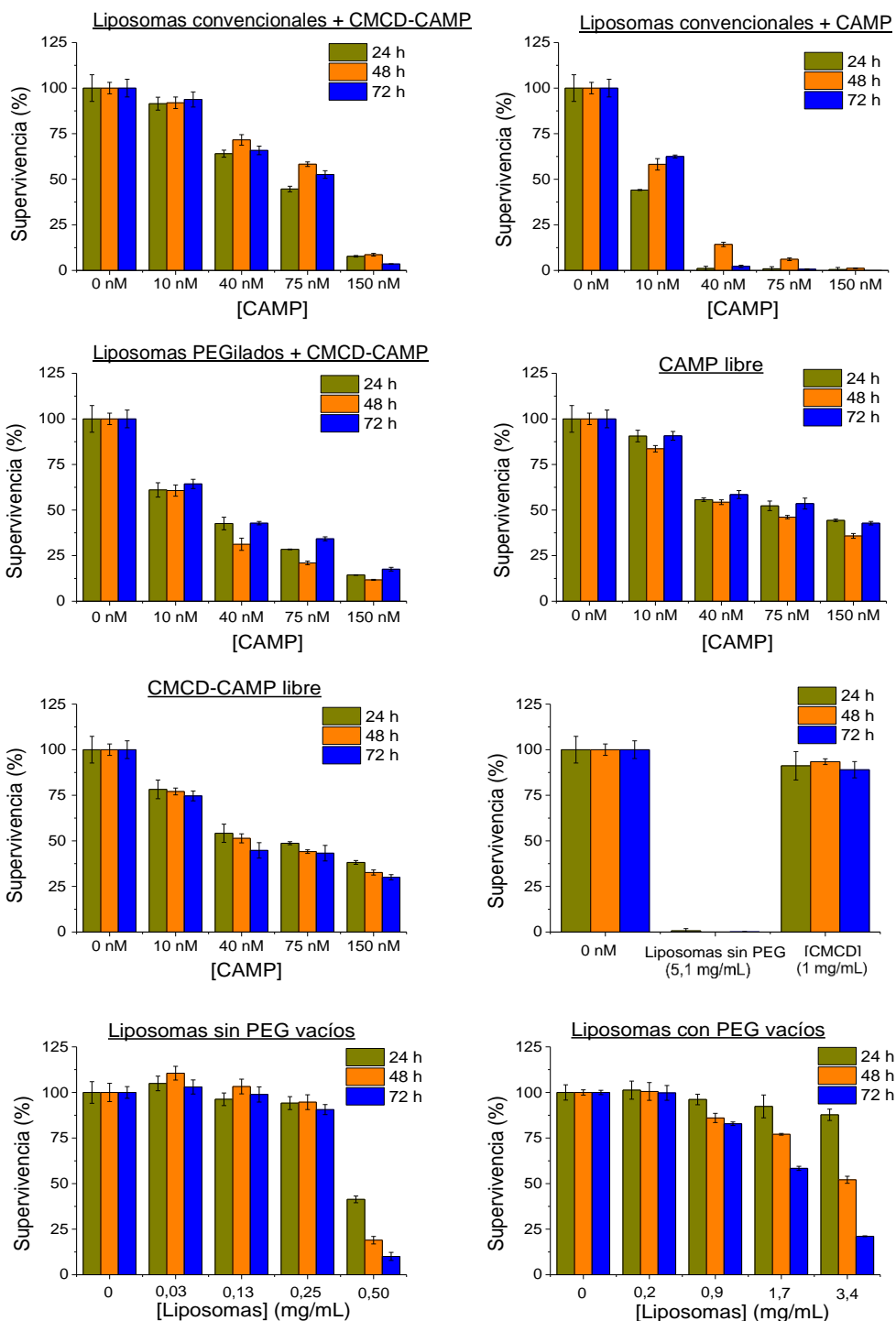


Figura 4.2. Viabilidad celular de la línea HTC-116.

Línea celular H-460 (CPCNP)

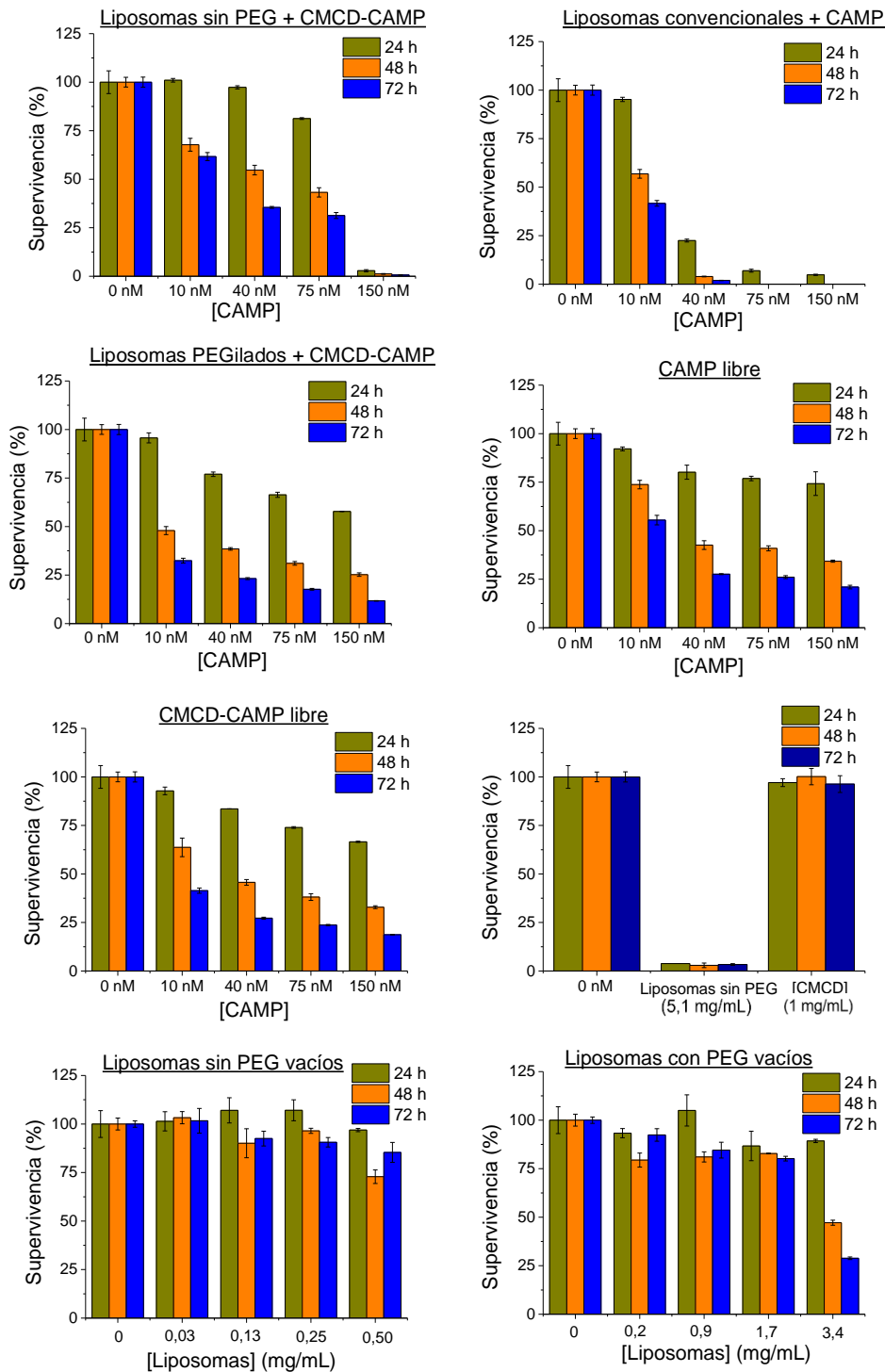


Figura 4.3. Viabilidad celular de la línea H-460.

Línea celular BT-474 (carcinoma de mama ductal invasivo)

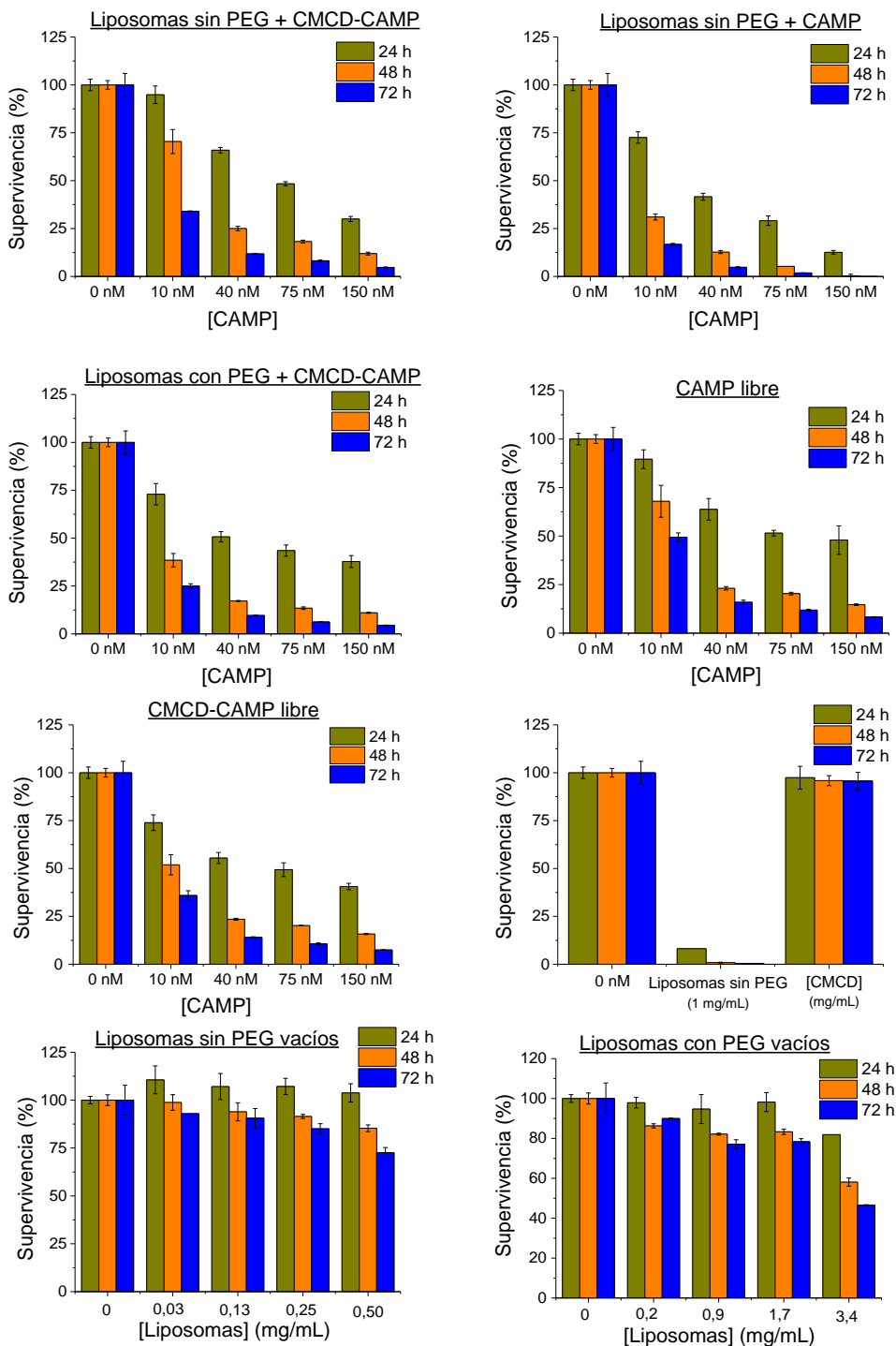


Figura 4.4. Viabilidad celular de la línea BT-474.

Línea celular HS-5 (fibroblastos estromales sanos)

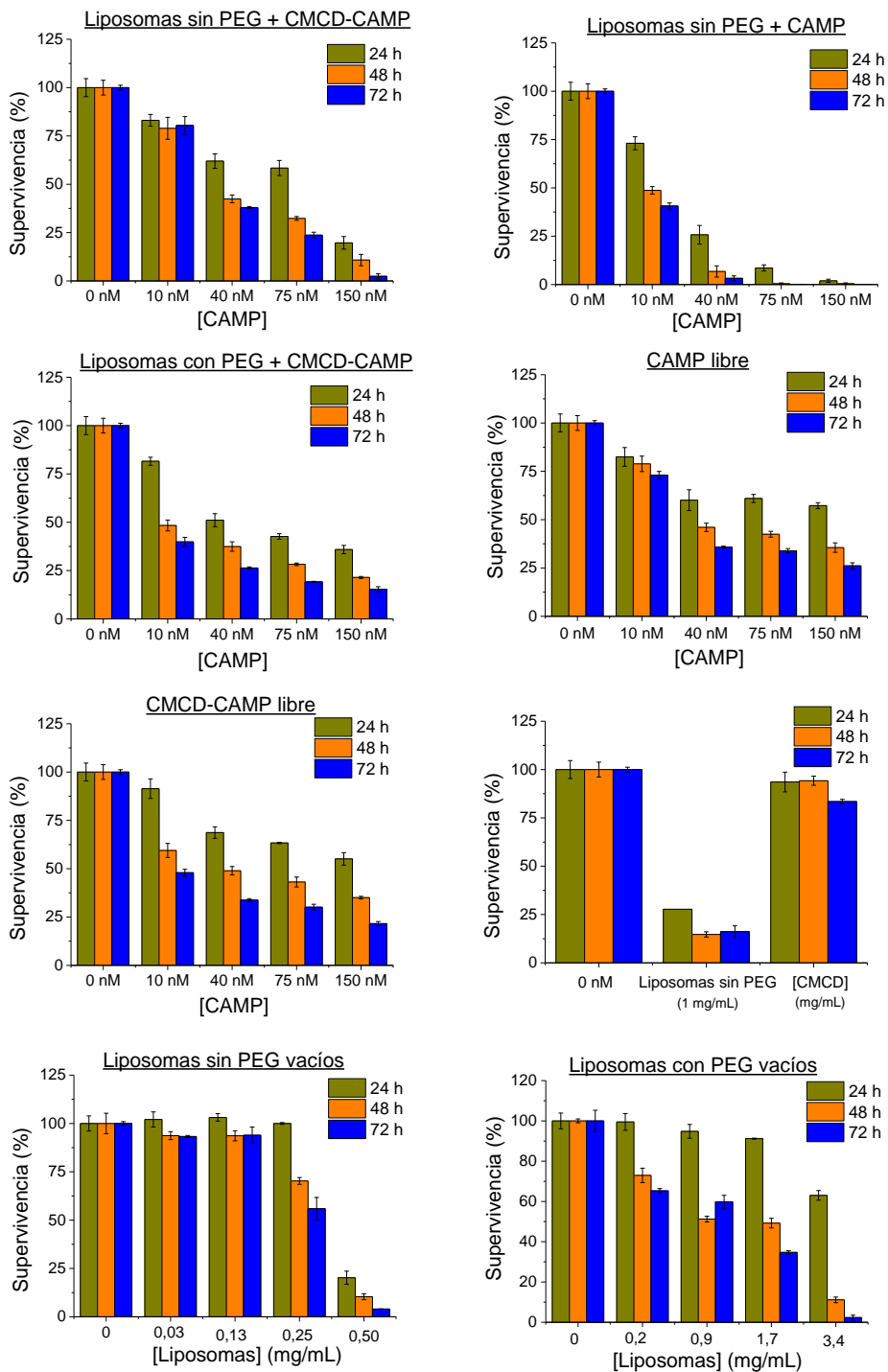


Figura 4.5. Viabilidad celular de la línea HS-5.

De manera general, si se observan las Figuras 4.2, 4.3, 4.4 y 4.5 puede concluirse que los sistemas de camptotecina en sus diferentes formas son eficaces, aunque de manera diferente en función del sistema utilizado y de la línea celular, tal y como se comentará a continuación. Además, puede verse que la lesión celular letal inducida por el fármaco se mejoró con la exposición prolongada, pues las células no conseguían recuperarse de la acción farmacológica.

4.1.1. Efecto citotóxico de la CMCD

Se estudió la toxicidad de la CMCD para comprobar que esta molécula, utilizada para complejar la camptotecina, no era tóxica a la concentración utilizada en estos ensayos celulares. Por ello, se preparó una disolución de CMCD en una concentración de 1 mg/mL. Las viabilidades de las células se recogen en las Figuras 4.2-4.5.

A esta concentración de CMCD no se generó un aumento de mortalidad en ninguna de las líneas celulares estudiadas. Por lo tanto, se puede concluir que la CMCD no es tóxica para ninguna de las cuatro líneas celulares. Este resultado concuerda con los estudios que afirman que este tipo de ciclodextrinas no son tóxicas y resaltan incluso que son menos tóxicas que cualquiera de las ciclodextrinas nativas (Szente et al., 2018). Por lo que, junto con la hidroxipropil- β -ciclodextrina, esta ciclodextrina es especialmente interesante para su uso con fines farmacológicos.

4.1.2. Efecto citotóxico de los liposomas

Se determinó el efecto citotóxico, tanto de los liposomas convencionales como de los liposomas PEGilados sin fármaco, para conocer si los vectores por sí solos poseían algún tipo de toxicidad.

Para ello, se administraron los liposomas a la máxima concentración utilizada, ya que, si a esa concentración no eran tóxicos, a concentraciones menores tampoco lo serían. Los liposomas convencionales se administraron a la concentración de 5,1 mg/mL porque es la máxima concentración que se añade a las células cuando se encapsula camptotecina libre. Se observa en las Figuras 4.2, 4.3, 4.4 y 4.5 que los liposomas convencionales a esta concentración presentaron una elevada toxicidad en todas las líneas celulares, llegándose incluso a alcanzar una mortalidad del 100% a las 72 horas de tratamiento en las células tumorales de mama y colon.

Por tanto, el sistema de liposomas convencionales que encapsula camptotecina libre se descartó del análisis de resultados, debido a que la toxicidad que se observó en todas las líneas celulares es debida a la alta concentración de liposomas empleada y no al efecto citotóxico del fármaco. La concentración de liposomas utilizada no se puede disminuir por debajo de esos valores porque es la concentración necesaria para administrar la misma concentración de fármaco que la estudiada en el resto de los sistemas, y esta debe mantenerse constante en todos ellos, con el fin de comparar la citotoxicidad.

Una vez se conoce que los liposomas convencionales son tóxicos a altas concentraciones, se determinó su citotoxicidad a las concentraciones empleadas para encapsular el complejo de inclusión (0,03, 0,13, 0,25 y 0,50 mg/mL). A estas concentraciones no se observó toxicidad de los liposomas en ninguna de las líneas celulares y, por lo tanto, el efecto citotóxico de estos sistemas sería únicamente debido al fármaco encapsulado.

En el caso de los liposomas PEGilados, se estudió su toxicidad a las concentraciones de 0,20, 0,90, 1,7 y 3,4 mg/mL. La toxicidad fue

notable para concentraciones de 3,4 mg/mL a partir de las 48 horas de tratamiento, pero estas concentraciones de liposomas no se alcanzan nunca cuando se administra el sistema que contiene el fármaco, por tanto, estos liposomas no serán tóxicos. Por lo tanto, la toxicidad de los sistemas PEGilados con camptotecina es debida únicamente a la acción farmacológica y no al vector liposómico.

4.2. Determinación de la CI₅₀

La CI₅₀ se determinó en cada uno de los sistemas y en cada una de las líneas celulares por triplicado, por lo que se calculó la media de los resultados obtenidos, como se muestra en la Tabla 4.2 y gráficamente en la Figura 4.6.

Tabla 4.2. CI₅₀ media de los diferentes sistemas con camptotecina (liposomas convencionales + CMCD-CAMP, liposomas convencionales + CAMP, liposomas PEGilados + CMCD-CAMP, CAMP libre y CMCD-CAMP libre) en las líneas celulares HTC-116 de cáncer de colon, H-460 de cáncer de pulmón, BT-474 de cáncer de mama y HS-5 de fibroblastos sanos.

	CI ₅₀ (nM)			
	Colon	Pulmón	Mama	Fibroblastos
Liposomas convencionales + CMCD-CAMP	67,8±12,8	49,6±3,1	18,6±2,3	33,6±2,9
Liposomas convencionales + CAMP	7,7±2,6	9,8±1,2	5,2±0,2	8,9±1,4
Liposomas PEGilados + CMCD-CAMP	11,7±1,7	10,0±1,5	6,5±3,7	10,3±1,9
CAMP libre	46,9±4,4	24,5±5,4	17,0±2,9	40,9±9,4
CMCD-CAMP libre	33,3±6,1	24,3±4,0	10,6±1,6	22,6±1,4

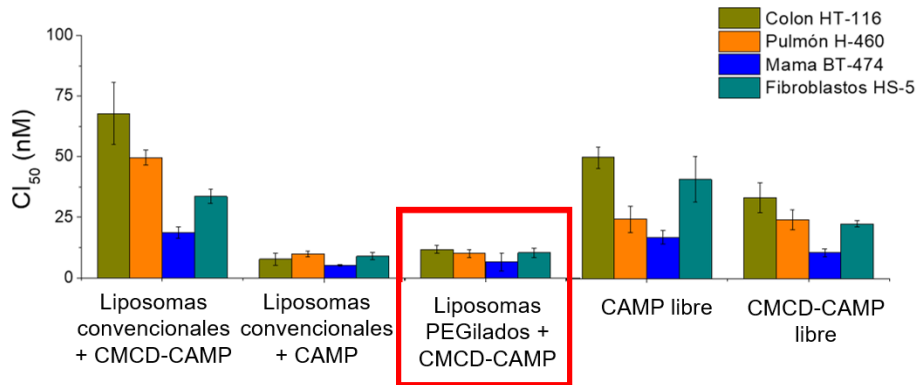


Figura 4.6. Representación gráfica de las CI_{50} de los diferentes sistemas con camptotecina empleados (liposomas convencionales + CMCD-CAMP, liposomas convencionales + CAMP, liposomas PEGilados + CMCD-CAMP, CAMP libre y CMCD-CAMP libre) en las líneas celulares HTC-116 de cáncer de colon, H-460 de cáncer de pulmón, BT-474 de cáncer de mama y HS-5 de fibroblastos sanos.

Una vez obtenidas las CI_{50} , se puede asegurar que los liposomas convencionales y los liposomas PEGilados no son tóxicos a las concentraciones necesarias para administrar el fármaco.

4.3. Explicación de las diferencias en eficacia citotóxica en los diferentes tratamientos

4.3.1. Comparación estadística de los sistemas liposomales

Tal y como se observa en los gráficos de viabilidad, existen diferencias entre los sistemas estudiados, lo que les atribuye mayor eficacia citotóxica a unos sobre otros. Con el objetivo de conocer si estas diferencias son significativas, se recurrió a la prueba estadística t de Student para cada una de las líneas celulares.

a) *Línea celular de cáncer de colon*: el efecto citotóxico de unos tratamientos sobre otros fue significativo (p-valor menor a 0,05 tomando

un nivel de confianza del 95%), lo que significa que los sistemas afectaron de diferente manera, excepto en la comparación de dos sistemas (liposomas con camptotecina libre y liposomas PEGilados + CMCD-CAMP, p-valor = 0,096). Aunque en los ensayos realizados ambos sistemas tienen un efecto muy similar, el sistema liposómico posee mayores ventajas *in vivo*, según los estudios realizados por diferentes investigadores (Greish, 2010; Mishra et al., 2018).

b) *Línea celular de cáncer de pulmón*: las diferencias entre unos sistemas terapéuticos y otros fueron significativas (p-valor menor a 0,05 tomando un nivel de confianza del 95%), por lo que los sistemas afectaron de forma distinta en función del vector empleado, excepto en dos sistemas (camptotecina libre comparada con el complejo de inclusión CMCD-CAMP, p-valor = 0,251), en los cuales el efecto citotóxico se considera idéntico. Sin embargo, la utilización del complejo de inclusión presenta mayores ventajas respecto al tratamiento con el fármaco libre, aunque el efecto en líneas celulares sea muy parecido.

c) *Línea celular de cáncer de mama*: las diferencias entre unos tratamientos y otros fueron significativas (p-valor fue menor a 0,05 tomando un nivel de confianza del 95%), es decir, el efecto citotóxico fue diferente entre los distintos tratamientos empleados, excepto en dos comparaciones (sistema de liposomas convencionales + CMCD-CAMP con la camptotecina libre (p-valor = 0,513) y los liposomas PEGilados + CMCD-CAMP con el complejo de inclusión CMCD-CAMP (p-valor = 0,190)). En ambos casos es más ventajoso utilizar sistemas liposómicos para incrementar la eficacia *in vivo*, tal y como se argumentará más adelante.

d) *Fibroblastos*: las diferencias entre unos tratamientos y otros fueron significativas (p-valor menor a 0,05 tomando un nivel de

confianza del 95%), es decir, el efecto terapéutico fue diferente entre sistemas, exceptuando dos comparaciones (liposomas convencionales + CMCD-CAMP con el sistema de camptotecina libre (p-valor = 0,310) y el fármaco libre con el complejo de inclusión CMCD-CAMP (p-valor = 0,075)). En estas, se asume que el efecto terapéutico es idéntico en ambos tratamientos. Del mismo modo, en ensayos *in vivo* sería más ventajoso utilizar un sistema basado en liposomas o un complejo de inclusión, en lugar del fármaco libre.

Los valores detallados de esta prueba estadística se muestran en el Anexo.

4.3.2. Eficacia citotóxica de los sistemas de camptotecina

Una vez se conocieron las diferencias estadísticas entre unos tratamientos terapéuticos y otros, se va a comentar cada uno de ellos por separado, determinando cuáles son las posibles causas de esa diferencia entre tratamientos.

a) Liposomas convencionales + CMCD-CAMP

El sistema de liposomas convencionales + CMCD-CAMP se caracterizó por presentar los valores de CI_{50} más altos. Los valores de CI_{50} se encontraron en un intervalo bastante amplio: 18,6-67,8 nM. Se sigue cumpliendo una mayor toxicidad para la línea celular de cáncer de mama. Para esta línea, el valor de CI_{50} fue muy similar al obtenido para el fármaco libre (17,0 nM).

La menor toxicidad de este tratamiento con respecto al fármaco libre o al complejo de inclusión podría deberse a que este sistema se internaliza de manera lenta, vía endocitosis. Una vez en el interior celular, debe de degradarse en los lisosomas para liberar el fármaco.

Teniendo en cuenta estos resultados, podría pensarse que la utilización del sistema de liposomas convencionales + CMCD-CAMP resulta ineficiente, ya que, con la misma cantidad de fármaco, el efecto citotóxico es mayor empleando el fármaco libre o el complejo de inclusión. Este planteamiento podría ser erróneo si se tiene en cuenta que el sistema de liposomas es dirigido, lo que se traduce en una reducción de los efectos secundarios, aunque la acción farmacológica sea más lenta. Además, generaría una mayor eficacia *in vivo*, como se ha descrito en la literatura (Greish, 2010). Finalmente, es importante destacar que este sistema es el que presenta una menor toxicidad en la línea de fibroblastos (células sanas), resultado muy importante, ya que se podría traducir en un menor daño en el organismo una vez este sistema terapéutico fuera aplicado a pacientes.

b) Camptotecina libre

La toxicidad de la camptotecina depende de la línea celular estudiada. Los valores de CI_{50} se encontraron en un intervalo amplio: 17-46,9 nM. Los extremos de este intervalo corresponden a la línea de células de cáncer de colon y el extremo inferior a la línea de células de cáncer de mama. De manera general, se acepta que los fármacos de pequeño tamaño entran en las células por difusión pasiva, proceso de internalización celular caracterizado por su gran rapidez en comparación con otros mecanismos como la endocitosis (Burke et al., 1993). Esta velocidad de internalización y la ausencia de procesos posteriores de digestión para liberar el fármaco en el citoplasma hacen que los procesos de muerte celular sean más rápidos que para los sistemas de liposomas, ya que estos deben de internalizarse y sufrir el proceso de degradación.

c) Complejo de inclusión CMCD-CAMP

De forma general, los valores de CI_{50} caracterizados para el complejo de inclusión CMCD-CAMP fueron inferiores a los que se encontraron en el fármaco libre, excepto para la línea de cáncer de pulmón en la que los valores fueron muy similares. Los valores de CI_{50} se encontraron en un intervalo amplio: 10,6-33,3 nM. El valor más bajo se obtuvo para la línea de cáncer de mama, del mismo modo que sucedió para el sistema de camptotecina libre.

El aumento de la citotoxicidad del complejo de inclusión CMCD-CAMP con respecto a la camptotecina no ha sido reportado en bibliografía previamente. Sin embargo, sí se han encontrado resultados similares de un aumento de solubilidad con la doxorubicina empleando una ciclodextrina. Mohammad et al. (2015) determinaron un efecto sinérgico cuando la doxorubicina se administró en forma de complejo de inclusión con metil- β -ciclodextrina, de forma que esta actuó como un elemento de reducción del colesterol que aumentó la sensibilidad al fármaco en células cancerígenas de mama e hígado. Por tanto, la reducción de la cantidad de colesterol aumenta la fluidez y la permeabilidad de la membrana. Esta propiedad es intrínseca a la β -CD, que es capaz de extraer colesterol de las membranas celulares, especialmente en los dominios de balsas de lípidos muy enriquecidas con colesterol. Además, otras investigaciones realizadas por Dos Santos et al. (2016) y Sziente et al. (2018) demostraron que el uso de la ciclodextrina complejada con los fármacos no limitó el efecto, por lo que los complejos de inclusión podrían generar un efecto sinérgico que permitiera romper la estructura de la membrana y mejorar la entrada de los fármacos complejados. Posiblemente, esta sea la causa del efecto tan

beneficioso logrado con la utilización de complejos de inclusión (Rosenbaum et al., 2010).

d) Liposomas PEGilados + CMCD-CAMP

Se trata del sistema más eficaz en todas las líneas celulares estudiadas. En general, los valores de CI_{50} se encontraron por debajo de 12 nM, siendo el valor de CI_{50} remarcable en la línea de cáncer de mama ($6,5 \pm 3,7$ nM). El bajo valor de la CI_{50} significa que es necesaria una baja concentración de fármaco para obtener una mortalidad del 50% de la población celular, lo que reduciría los efectos secundarios del fármaco. Estos valores se encuentran muy por debajo de los obtenidos para la camptotecina libre, debido posiblemente a que un sistema liposomal PEGilado es capaz de entregar el fármaco en una mayor concentración que cuando está en forma libre (Torchilin et al., 2005).

No existen, hasta ahora, muchos trabajos que comparen el efecto citotóxico *in vitro* de liposomas convencionales y PEGilados, sino que esa comparación la establecen únicamente en estudios *in vivo* en donde se resaltan las ventajas de los liposomas PEGilados (Torchilin et al., 2005; Fang et al., 2011; Greish, 2010; Teske et al., 1990; Mishra et al., 2018).

La mayor eficacia de los sistemas PEGilados frente a los convencionales puede ser explicada por diferentes factores:

1) Menor tendencia a la agregación y la adsorción gracias a la estructura del PEG, lo que se traduce en un aumento de la biodisponibilidad (Tenzer et al., 2013).

2) Las cadenas de PEG confieren a los liposomas una mayor solubilidad y estabilidad que podría favorecer la entrada en las células (Romberg et al., 2008).

3) Los liposomas PEGilados presentan un menor tamaño que los liposomas convencionales, lo que puede conducir a un porcentaje de internalización celular mayor (Hu et al., 2007; Pamujula et al., 2012). Los liposomas convencionales fueron 15 nm más grandes que los liposomas PEGilados (Capítulo 2).

4) El transporte celular en el interior de las células puede ser diferente para ambos sistemas. Cuando los liposomas son endocitados, llegan al citoplasma en forma de endosomas tempranos que son transportados a través del citoesqueleto. Este transporte es más complicado en el caso de los liposomas convencionales porque interactúan con las proteínas del citoesqueleto y muestran resistencia al movimiento, además de que se adhieren a los orgánulos celulares por interacciones adhesivas y obstrucción estérica. Suh et al. (2007) concluyeron que los sistemas PEGilados mostraron mayores tasas de difusión, posiblemente por reducir las interacciones intracelulares entre nanopartículas y el citoesqueleto. Además, una vez que los liposomas entran en el citoplasma en forma de endosomas, se funden con las vesículas intracelulares ácidas como los lisosomas y, si la cantidad de PEG es baja, como en nuestro caso, el sistema se degradará en estos orgánulos, liberando el fármaco (Miteva et al., 2015).

Por tanto, el sistema con mejor eficacia citotóxica para todas las líneas celulares fue el sistema de liposomas PEGilados que encapsula el complejo CMCD-CAMP. El aumento de toxicidad con respecto al fármaco libre se muestra en la Figura 4.7. Este aumento es de cuatro veces para la línea celular de cáncer de colon HTC-116, 2,4 veces en la línea de cáncer de pulmón H-460, de 2,6 veces en la línea BT-474 de cáncer de mama y de casi cuatro veces en los fibroblastos HS-5.

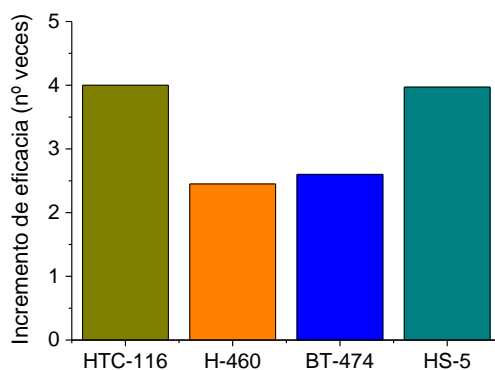


Figura 4.7. Incremento de eficacia de los liposomas PEGilados + CMCD-CAMP en comparación con la camptotecina libre en las diferentes líneas celulares: HTC-116 de cáncer de colon, H-460 de cáncer de pulmón, BT-474 de cáncer de mama y HS-5 de fibroblastos sanos.

La mejoría en eficacia entre los liposomas PEGilados + CMCD-CAMP y el fármaco libre fue muy llamativa y no se ha observado previamente con la camptotecina. En estudios que recogen ensayos celulares *in vitro* se ha descrito que tanto los liposomas convencionales con camptotecina como el fármaco libre poseían una actividad prácticamente idéntica en líneas de leucemia K562, resaltando este resultado como ventajoso, además de mencionar que los liposomas vacíos no causaban ninguna inhibición del crecimiento y eran aptos para su utilización en cultivos celulares (Cortesi et al., 1997). En otros trabajos se menciona la obtención de una mayor mortalidad celular empleando liposomas con camptotecina en comparación con el fármaco libre (Lin et al., 2013).

4.3.3. Explicación de las diferencias en eficacia citotóxica entre diferentes líneas celulares

Se puede observar que existen diferencias respecto a la eficacia citotóxica de los tratamientos en cada una de las líneas celulares tumorales, y que la línea celular más afectada por los tratamientos es la línea de cáncer de mama, seguida de la de pulmón y, posteriormente, la línea de cáncer de colon. Los fibroblastos no siguieron un patrón establecido, ya que un determinado tratamiento les afectó en mayor o menor medida, por lo que a veces se vio más afectada la línea de cáncer de pulmón y otras veces los fibroblastos, tal y como se muestra en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Graduación en eficacia citotóxica de las líneas celulares HTC-116 de cáncer de colon, H-460 de cáncer de pulmón, BT-474 de cáncer de mama y HS-5 de fibroblastos sanos en función del tratamiento (liposomas convencionales + CMCD-CAMP, liposomas PEGilados + CMCD-CAMP, CAMP libre y CMCD-CAMP libre).

Sistema	Eficacia citotóxica			
	++++	+++	++	+
Liposomas convencionales + CMCD-CAMP	Mama	Fibroblastos	Pulmón	Colon
Liposomas PEGilados + CMCD-CAMP	Mama	Pulmón	Fibroblastos	Colon
CAMP libre	Mama	Pulmón	Fibroblastos	Colon
CMCD-CAMP libre	Mama	Fibroblastos	Pulmón	Colon

Estas diferencias en el efecto de la viabilidad celular de los diferentes sistemas con camptotecina pueden ser debidas a varios factores, como son el potencial de proliferación de cada línea celular, el

tamaño de las células y la inestabilidad genética intrínseca que afecta a la quimiorresistencia a un determinado fármaco (He et al., 2016).

a) El potencial de proliferación

Se sabe que cada línea celular posee una velocidad de división característica, ya que hay células que necesitan dividirse más que otras debido a sus condiciones fisiológicas o al grado de mutación de sus genes (Loeb et al., 2003). Este potencial de división celular puede influir en el efecto de la camptotecina, ya que este fármaco ataca a la topoisomerasa I, enzima implicada en los procesos de replicación del ADN y división celular. Por tanto, a mayor división, más posibilidad tiene el fármaco de actuar y provocar errores en el proceso de replicación.

Teniendo en cuenta lo mencionado, se realizó un seguimiento del crecimiento de las cuatro líneas celulares en ausencia de fármaco para conocer la velocidad de división, utilizando los datos de los pocillos control de los ensayos MTT. Se obtuvo una curva de crecimiento desde el primer día de cultivo hasta las 72 horas, tal y como se puede observar en la Figura 4.8.

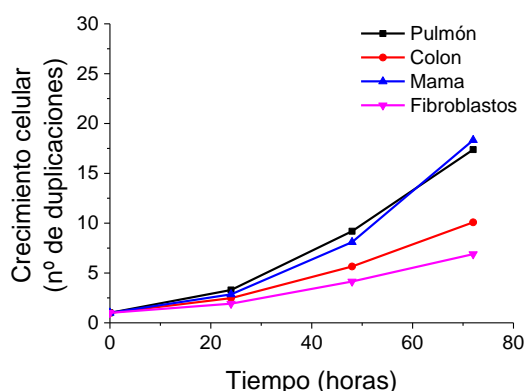


Figura 4.8. Curva de crecimiento de las líneas celulares H-460 de cáncer de pulmón, HT-116 de cáncer de colon, BT-747 de cáncer de mama y HS-5 de fibroblastos sanos.

Se observa como la línea celular BT-474 de cáncer de mama es la que experimenta un crecimiento más rápido, muy cercana a la línea H-460 de cáncer de pulmón. Estos resultados son concordantes con la tasa de mortalidad, en donde las líneas celulares más sensibles al fármaco son las líneas de cáncer de mama y pulmón, aunque teniendo en cuenta sólo este parámetro, están muy igualadas. En siguiente lugar, las células que más se dividieron fueron las HTC-116 de cáncer de colon y, finalmente, los fibroblastos HS-5. Las líneas celulares de cáncer de colon fueron las siguientes que mayor mortalidad experimentaron. En los fibroblastos, cuyo crecimiento fue el más lento de todos los tipos celulares, no se produjo correlación con las otras líneas tumorales, sino que en ocasiones el fármaco fue más efectivo en un sistema que en otro, sin seguir una relación fija. Lo que sí se observó claramente es que los fibroblastos son el tipo celular con el crecimiento más lento, ya que las células sanas se dividen a un ritmo mucho menor, porque no poseen mutaciones en los genes de supresión del crecimiento. Estas mutaciones les atribuyen capacidad de división, invasión y dispersión por el organismo, por lo que deberían de verse menos afectadas por el tratamiento, y en este caso no fue siempre así. Por lo tanto, se tuvo en cuenta otra variable: el tamaño celular.

b) El tamaño celular

No existen muchas publicaciones que indiquen una influencia de este parámetro sobre la citotoxicidad celular pero, según los resultados obtenidos es posible pensar que, a mayor superficie celular, mayor será la internalización de los liposomas por endocitosis, pues más superficie existe para este proceso (Duncan, 2003). Esto se traduce en una mayor concentración de fármaco disponible en el citosol para ejercer su acción en el núcleo celular. Por lo tanto, se buscó, en la Colección Americana

de Cultivos Tipo, el tamaño de cada una de las líneas celulares empleadas en los ensayos *in vitro*, cuyos valores se indican en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Tamaño de las líneas celulares H-460 de cáncer de pulmón, HTC-116 de cáncer de colon, BT-474 de cáncer de mama y HS-5 de fibroblastos sanos probadas en este trabajo.

Línea celular	Tamaño (μm)
Pulmón H-460	20
Colon HTC-116	30
Mama BT-474	60
Fibroblastos HS-5	100

Con estos datos se puede observar que la línea tumoral con un mayor tamaño es la correspondiente a la de cáncer de mama BT-474 (60 μm) que corresponde con la que mayor división celular experimentó y, por lo tanto, la que debería de experimentar mayor efectividad citotóxica, tal y como así ocurre en este trabajo. Después le sigue la línea celular de cáncer de colon HTC-116 (30 μm), por lo que su tamaño de dimensiones medias y su división intermedia hacen que sea posicionada como la tercera línea en eficacia citotóxica (en células tumorales). Posteriormente, se encuentra la línea celular H-460 de cáncer de pulmón con un tamaño muy pequeño (20 μm), pero que debido a su gran capacidad de división (tan alta como las células tumorales de mama), se posiciona en segundo lugar en cuanto a eficacia citotóxica.

De modo similar se podrían explicar los resultados obtenidos con los fibroblastos, que son la línea celular de tamaño más grande (100 μm). Según su tamaño, deberían de padecer una mortalidad elevada, ya que son casi dos veces más grandes que las células de mama pero, en cambio, tienen una velocidad de división mucho menor. En este caso parece que

el tamaño tiene mayor influencia, ya que la mortalidad que producen todos los sistemas empleados es bastante elevada.

Otro motivo que explicaría el aumento en eficacia citotóxica del fármaco en fibroblastos es que las células sanas poseen baja resistencia a la supervivencia, ya que carecen de los mecanismos biológicos que les permiten saltarse los puntos de control para mantenerse vivas. Debido a ello, son más sensibles a la acción de los fármacos citotóxicos (Ertel et al., 2006). Por lo tanto, el objetivo de probar esta línea celular era obtener un resultado complementario que permitiera conocer el efecto de los sistemas con camptotecina en una línea celular sana, pero estos resultados son muy variables en función del tamaño y tasa de división que pueda tener otra línea celular sana cualquiera. Además, todos los sistemas probados no son dirigidos a las células tumorales de los cultivos *in vitro*, ya que no disponen de una direccionalidad activa mediada por anticuerpos o dirigida a receptores sobreexpresados en células tumorales, sino que la direccionalidad es pasiva. Dicha direccionalidad sólo se puede observar en sistemas *in vivo*, porque su ventaja consiste en que se acumulan en el microambiente tumoral, en donde ejercen su acción citotóxica. Por lo tanto, el modo de determinar si estos sistemas afectan o no a las células sanas es realizando estudios *in vivo* (Greish, 2010).

c) La quimiorresistencia

La quimiorresistencia individual de cada línea celular es diferente, ya que cada tipo de célula cancerígena posee un conjunto de mutaciones característico que diferencian sus propiedades proliferativas e invasivas. Aunque todas las células tumorales poseen estas propiedades, los genes que se encuentran mutados son muy diferentes entre unas líneas celulares y otras, repercutiendo en el modo de hacer

frente a las sustancias que intentan destruirlas. Por lo tanto, para saber con certeza los mecanismos moleculares que están implicados en la quimiorresistencia y que generan esta diferencia de resultados serían necesarios estudios complementarios de biología molecular y genómica (Loeb et al., 2003).

4.4. Internalización celular de los liposomas

En esta sección se va a caracterizar el mecanismo de entrada de los liposomas en las células. Es muy importante conocer el modo en que los sistemas de liposomas se internalizan, ya que de ello depende, en gran medida, su potencial citotóxico (Albanese et al., 2012). Para ello, en la formación de los liposomas se utilizó una molécula de colesterol funcionalizada con una sonda fluorescente (25-NBD). Esta sonda absorbe a $\lambda = 488$ nm y emite a $\lambda = 530$ nm (en el verde) (Carter et al., 2010). Los liposomas se prepararon a partir de fosfatidilcolina y colesterol, y un porcentaje de ese colesterol era fluorescente (25-NBD). Por otra parte, se tiñeron los lisosomas de las células de cáncer de mama empleadas para el estudio con un colorante rojo que tiñe los orgánulos celulares ácidos (LysoTrackerTM Rojo, que absorbe a $\lambda = 576$ nm y emite a $\lambda = 590$ nm (Zhitomirsky et al., 2018), a una concentración en el medio de cultivo de 100 nM).

Una vez que se prepararon los liposomas con el colesterol fluorescente, se pusieron en contacto con las células tumorales de cáncer de mama BT-474 (con los lisosomas teñidos con el LysoTrackerTM Rojo) durante 1 hora. El estudio de colocalización se llevó a cabo con una concentración de liposomas en el medio de cultivo de 0,15 mg/mL.

Una colocalización entre las dos señales de fluorescencia de las dos sondas indicaría una internalización por vía endosomal.

En la Figura 4.9.A se observan las células con fluorescencia en el verde que marca a los liposomas, en la Figura 4.9.B se muestra la fluorescencia del LysoTracker™ que marca a los lisosomas con fluorescencia en el rojo. En la Figura 4.9.C se muestra una imagen de las células en campo claro. Finalmente, las imágenes 4.9.A y 4.9.B se superpusieron en campo claro, tal y como puede verse en la Figura 4.9.D, observándose claramente que coinciden ambas fluorescencias, por lo que se generó un color amarillo producto de la mezcla de ambos colores.

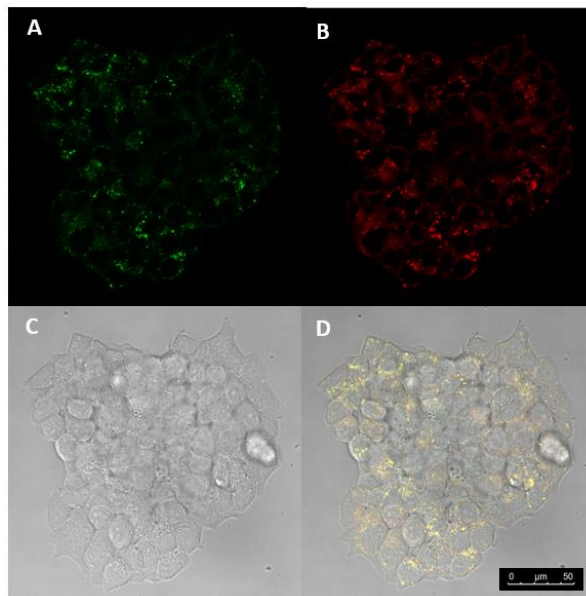


Figura 4.9. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de las células tratadas con los liposomas fluorescentes (A), de las células tratadas con el LysoTracker™ Rojo (B), la imagen de campo claro de las células (C) y la superposición de las imágenes de fluorescencia A y B en campo claro (D).

Este experimento demostró que la internalización de los liposomas en las células se produjo mediante endocitosis, ya que coinciden en espacio los liposomas en el interior de los lisosomas. El tipo de endocitosis utilizado es la pinocitosis, ya que los liposomas poseen un

tamaño de entre 120 y 150 nm de diámetro y partículas de tamaños inferiores a los 250 nm se internalizan siguiendo este mecanismo (Hillaireau et al., 2009; Panarati et al., 2012). El tipo de pinocitosis es endocitosis mediada por clatrina, por dos motivos: por tener tamaños inferiores a 250 nm y porque este tipo de internalización se caracteriza por ser la vía de entrada de las moléculas estructurales de la membrana celular (fosfolípidos y colesterol). Para ello, en las células existe un receptor específico para lipoproteínas de baja densidad (Lu et al., 2016; Ferguson et al., 2017). Todos los liposomas, debido a que su composición es muy similar a la membrana plasmática, son internalizados por este tipo de ruta endocítica (Rivolta et al., 2011).

En este tipo de endocitosis, los liposomas a endocitar actúan como ligandos que se unen a receptores de la membrana plasmática, tal y como se representa en la Figura 4.10, creando un complejo ligando-receptor que se moverá a una región de la membrana plasmática rica en clatrina. En este momento, se formará una invaginación de la membrana plasmática, esquematizada en la Figura 4.11, que generará unas vesículas llamadas pinosomas, ricas en clatrina, tal y como se observa en la Figura 4.12. Una vez en el interior, los receptores de clatrina son eliminados antes de que la vesícula se fusione con los endosomas tempranos, que se unirán posteriormente a los lisosomas por vía endolisosomal (Xiang et al., 2012; Cocucci et al., 2012).

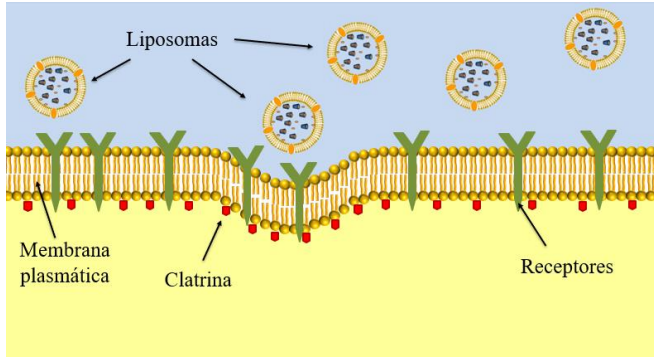


Figura 4.10. Unión de los liposomas a los receptores de membrana.

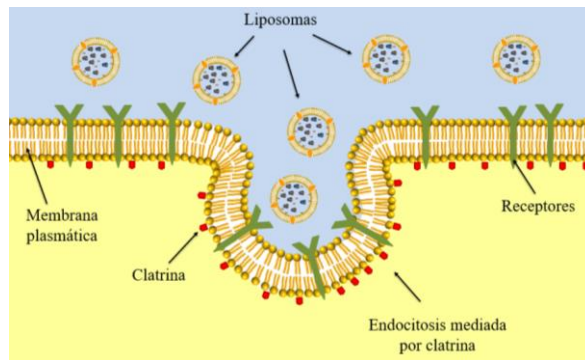


Figura 4.11. Invaginación de la membrana plasmática para internalizar a los liposomas.

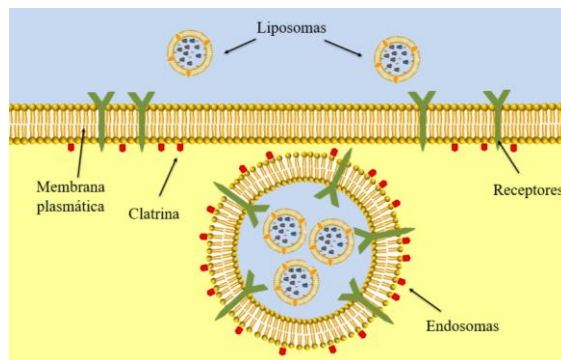


Figura 4.12. Formación del pinosoma en el citosol celular.

Una vez que los liposomas son internalizados y aún están unidos a la membrana, reciben el nombre de endosomas tempranos que, tras un proceso de maduración, se transforman en endosomas tardíos, que se unirán a los lisosomas, formando vesículas endolisosomales con enzimas hidrolíticas, las cuales degradan las nanopartículas atrapadas (Venkatachalam et al., 2015). Una vez que se forman las vesículas endolisosomales es bastante común que se aglomeren en torno al núcleo, liberando su contenido que entrará a su interior y ejercerá su efecto citotóxico (Johnston et al., 2010; Wang et al., 2009).

5. Conclusiones

Como conclusiones más destacables de este capítulo se pueden extraer las siguientes.

- El sistema de camptotecina más eficaz para el tratamiento de las líneas tumorales fue el sistema de los liposomas PEGilados + CMCD-CAMP, con una CI_{50} de entre 6,5 y 11,7 nM para todas las líneas celulares estudiadas.

- El siguiente sistema más eficaz fue el complejo de inclusión CMCD-CAMP, con el que se obtuvieron CI_{50} de entre 10,6 y 33,3 nM.

- En tercer lugar, el sistema más eficaz fue la camptotecina libre ($CI_{50} = 17,0-46,9$ nM), ya que es capaz de entrar en la célula por difusión pasiva y ejercer su efecto citotóxico más rápido, por lo que el sistema de los liposomas convencionales + CMCD-CAMP es el sistema más ineficaz ($CI_{50} = 18,6-67,8$ nM). Esto no debe de ser entendido como que es mejor emplear el fármaco libre, ya que el uso de liposomas se ve favorecido por el efecto de direccionalidad pasiva, por lo que en sistemas *in vivo* es posible que fuera más efectivo.

- El sistema de liposomas convencionales con camptotecina libre encapsulada tuvo que ser descartado para una posible aplicación médica, debido a que la concentración de liposomas necesaria para encapsular el fármaco resultó tóxica para las células.

- Tanto la CMCD como los liposomas PEGilados y convencionales no fueron tóxicos para las líneas celulares a las concentraciones necesarias para su administración.

- La línea celular tumoral más sensible al fármaco fue la BT-474, de cáncer de mama, lo cual podría deberse a su amplia capacidad de proliferación y a su gran tamaño, seguida de la línea H-460 de cáncer de pulmón de un tamaño menor, pero una actividad proliferativa prácticamente idéntica. A estas líneas les siguieron en eficacia la línea celular HTC-116 de cáncer de colon, de menor tamaño y menor actividad antiproliferativa, y los fibroblastos HS-5, que no siguieron un patrón definido.

- A la luz de los resultados, sería apropiado realizar ensayos *in vivo* como vía de continuación de esta investigación, sobre todo comparando los sistemas PEGilados (sistema con mejores resultados) con la camptotecina libre, para determinar el poder citotóxico que poseen estos sistemas terapéuticos en el organismo.

- La internalización de los liposomas en las células se produjo por endocitosis mediada por clatrina.

6. Bibliografía

- Acevedo-Morantes C. Y., Acevedo-Morantes M. T., Suleiman-Rosado D., Ramírez-Vick J. E. (2013). *Evaluation of the cytotoxic effect of camptothecin solid lipid nanoparticles on MCF7 cells*. Drug. Deliv. 1-11.
- Albanese A., Tang P. S., Chan W. C. (2012). *The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems*. Annu. Rev. Biomed. Eng. 14:1-16.
- Baust J. G., Gao D., Baust J. M. (2009). *Cryopreservation: An emerging paradigm change*. Organogen. 5(3):90-96.
- Berg K., Hansen M. B., Nielsen S. E. (1990). *A new sensitive bioassay for precise quantification of interferon activity as measured via the mitochondrial dehydrogenase function in cells (MTT-method)*. APMS. 98:1-6.
- Berridge M. V., Tan A. S. (1993). *Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction*. Arch. Biochem Biophys. 303(2):474-82.
- Binnewies M., Roberts E. W., Kersten K., Chan V., Fearon D. F., Merad M., Coussens L. M., Gaboritovich D. I., Ostrand-Rosenberg S., Hedrick C. C., Vonderheide R. H., Pittet M. J., Jain R. K., Zou W., Howcroft T. K., Woodhouse E. C., Weinberg R. A., Krummel M. F. (2018). *Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy*. Nat. Med. 24(5):541-550.
- Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R. L., Torre L. A., Jemal A. (2018). *Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of*

Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. Ca. Canc. J. Clin. 1-31.

- Burke T. G., Mishra A. K., Wani M. C., Wall M. E. (1993). *Lipid bilayer partitioning and stability of camptothecin drugs.* Biochemistry 32:5352-5364.

- Carter D. M., Ogilvie W. O., Johnston L. (2010). *NBD-cholesterol probes to track cholesterol distribution in model membranes.* Bioch. et Biophysica Acta Biomembr. 1798(3):558-568.

- Caviston J. P., Holzbaur E. L. (2006). *Microtubule motors at the intersection of trafficking and transport.* Trends. Cell Biol. 16(10):530-537.

- Chang J.-S., Kuo H.-P., Chang K. L. B., Kong Z.-L. (2015). *Apoptosis of hepatocellular carcinoma cells induced by nanoencapsulated polysaccharides extracted from Antrodia camphorata.* Plos One. 10(9):6075-6087.

- Chang J.-Y., Guo X., Chen H.-X., Jiang Z., Fu Q., Wang H.-K., Bastow K. F., Zhu X.-K., Guan J., Lee K.-H., Cheng Y.-C. (2000). *Unique Biochemical, Cytotoxic, and Antitumor Activity of Camptothecin and 4b-Amino-49-Odemethylepipodophyllotoxin Conjugates.* Biochem. Pharm. 59:497-508.

- Chauvier D., Kegelaer G., Morjani H., Manfait M. (2002). *Reversal of Multidrug Resistance-Associated Protein-Mediated Daunorubicin Resistance by Camptothecin.* J. of Pharm. Sci. 91(8):1765-1775.

- Cheng J., Khin K. T., Jensen G. S., Liu A., Davis M. E. (2003). *Synthesis of Linear, β -Cyclodextrin-Based Polymers and Their Camptothecin Conjugates.* Bioconjugate Chem. 14:1007-1017.

- Çirpanli Y., Bilensoy E., Dogan A., Calis S. (2009). *Comparative evaluation of polymeric and amphiphilic cyclodextrin nanoparticles for effective camptothecin delivery*. Eur. J. of Pharm. and Biopharm. 73(1):82-89.
- Cocucci E., Aguet F., Boulant S., Kirchhausen T. (2012). *The first five seconds in the life of a clathrin-coated pit*. Cell. 150(3):495-507.
- Cortesi R., Esposito E., Maietti A., Menegatti E., Nastruzzi C. (1997). *Formulation study for the antitumor drug camptothecin: liposomes, micellar solutions and a microemulsión*. Intern. J. of Pharm. 159:95-103.
- Dallavalle S., Delsoldato T., Ferrari A., Merlini L., Penco S., Carenini N., Perego P., De Cesare M., Pratesi G., Zunino F. (2000). *Novel 7-Substituted Camptothecins with Potent Antitumor Activity*. J. Med. Chem. 43:3963-3969.
- Dancey J., Eisenhauer E. A. (1996) *Current perspectives on camptothecins in cancer treatment*. Br. J. Cancer. 74:327-338.
- Dong Y. B., Yang H. L., McMasters K. M. (2003). *E2F-1 overexpression sensitizes colorectal cancer cells to camptothecin*. Cancer Gene Ther. 10:168-178.
- Dos Santos A. G., Bayiha J. C., Migeot-Leclercp M.- P. (2016). *Effect of Cyclodextrins on Membrane Biophysical Properties*. Bioph. Journal. 110(3):75a.
- Duncan, R. (2003). *The dawning era of polymer therapeutics*. Nature Rev. Drug Discov. 2:347-360.
- Ertel A., Verghese A., Byers S. W., Ochs M., Torezen A. (2006). *Pathway-specific differences between tumor cell lunes and normal and tumor tissue cells*. Molecular Cancer. 6(55):1-13.

- Fang J., Nakamura H., Maeda H. (2011). *The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect.* Adv. Drug Deliv. Rev. 63:136-151.
- Ferguson J. P., Huber S. D., Willy N. M., Aygün E., Goker S., Atabey T. Kural C. (2017) *Mechanoregulation of clathrin-mediated endocytosis.* J. Cell Sci. 130(21):3631-3636.
- Foroozandeh P., Aziz A. A. (2018). *Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles.* Nanoscale Res. Lett. 13:(339)1-12.
- Gaur S., Chena L., Yena T., Wanga Y., Zhou B., Davis M., Yen Y. (2012). *Preclinical study of the cyclodextrin-polymer conjugate of camptothecin CRLX101 for the treatment of gastric cancer.* Nanomed.: Nanotechn., Biol., and Med. 8:721-730.
- Gigliotti C. L., Minelli R., Cavalli R., Occhipinti S., Barrera G., Pizzimenti S., Cappellano G., Boggio E., Conti L., Fantozzi R., Giovarelli M., Trotta F., Dianzani U., Dianzani C. (2016). *In Vitro and In Vivo Therapeutic Evaluation of Camptothecin-Encapsulated β -Cyclodextrin Nanosponges in Prostate Cancer.* J. Biomed. Nanotechnol. 12(1):114-27.
- Giovanella B. C., Stehlin J. S., Wall M. E., Wani M. C., Nicholas A. W., Liu L. F., Silber R., Potmesil M. (1989). *DNA topoisomerase I -targeted chemotherapy of human colon cancer in xenografts.* Science. 246:1046-1048.
- Greish K. (2010). *Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting.* Methods Mol. Biol. 624:25-37.

- He Y., Zhu Q., Chen M., Huang Q., Wang W., Li Q., Huang Y., Di W. (2016). *The changing 50% inhibitory concentration (IC50) of cisplatin: a pilot study on the artifacts of the MTT assay and the precise measurement of density-dependent chemoresistance in ovarian cancer.* *Oncotar.* 7(3):70803-70821.
- Hillaireau H., Couvreur P. (2009). *Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery.* *Cell. Mol. Life Sci.* 66(17):2873-2896.
- Hu Y., Xie J., Tong Y. W., Wang C. H. (2007). *Effect of PEG conformation and particle size on the cellular uptake efficiency of nanoparticles with the HepG2 cells.* *J. of control. Rel.* 118:7-17.
- Johnston H. J., Semmler-Behnke M., Brown D. M., Kreyling W., Tran L., Stone V. (2010) *Evaluating the uptake and intracellular fate of polystyrene nanoparticles by primary and hepatocyte cell lines in vitro.* *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 242(1):66-78.
- Jones C. B., Clements M. K., Wasi S., Daoud S. S. (1997). *Sensitivity to camptothecin of human breast carcinoma and normal endothelial cells.* *Canc. Chemoter. Pharmacol.* 40:475-483.
- Koshkina N. V., Gilbert B. E., Waldrep J. C., Seryshev A., Knight V. (1999). *Distribution of camptothecin after delivery as a liposome aerosol or following intramuscular injection in mice.* *Cancer Chemoter. Pharmacol.* 44:187-192.
- Krishnan P., Rajan M., Kumari S., Sakinah S., Priya S. P., Amira F., Danjuma L., Ling M. P., Fakurazi S., Arulselvan P., Higuchi A., Arumugam R., Alarfaj A. A., Munusamy M. A., Hamat R. A., Benelli G., Murugan K., Kumar S. S. (2017). *Efficiency of newly formulated camptothecin with β -cyclodextrin-EDTA-Fe₃O₄*

nanoparticleconjugated nanocarriers as an anticolon cancer (HT29) drug. Sci. Reports. Nature. 1-16.

- Li S. D., Huang F. (2009). *Nanoparticles Evading The Reticuloendothelial System: Role of The Supported Bilayer.* Bioch. Et Bioph. Acta. 1788(10):2259-2266. Li 2017.

- Lin C.-H., Al-Suwayeh S. A., Hung C.-F., Chen C.-C., Fang J.-Y. (2013). *Camptothecin-Loaded Liposomes with α -Melanocyte-Stimulating Hormone Enhance Cytotoxicity Toward and Cellular Uptake by Melanomas: An Application of Nanomedicine on Natural Product.* J. of Trad. and Complem. Med. 3(2):102-109.

- Liu G., Li Q., Ni W., Zhang N., Wang Y., Shao D., Tail G. (2015). *Cytotoxicity of various types of gold-mesoporous silica nanoparticles in human breast cancer cells.* Int. J. of Nanom. 10(9):1-16.

- Loeb L. A., Loeb K. R., Anderson J. P. (2003). *Multiple mutations and cancer.* PNAS. 100(3):776-781.

- Lu R., Drubin D. G., Sun Y. (2016). *Clathrin-mediated endocytosis in budding yeast at a glance.* J. Cell Sci. 129(8):1531-1536.

- Mahmoudi M., Meng J., Xue X., Liang X. J., Rahman M., Pfeiffer C., Hartmann R., Gil P. R., Pelaz B., Parak W. J., Del Pino P., Carregal-Romero S., Kanaras A. G., Selvan S. T. (2014). *Interaction of stable colloidal nanoparticles with cellular membranes.* Biotechnol Adv 32(4):679-692.

- Makaraci P., Kim K. (2018). *Trans-Golgi network-bound cargo traffic.* Eur. J. Cell Biol. 97(3):137-149.

- Marshall N. J., Goodwin C. J., Holt S. J (1995). *A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function.* Growth. Regul. 5(2):69-84.

- Mishra H., Chauhan V., Kumar K., Teotia D. (2018). *A comprehensive review on Liposomes: a novel drug delivery system*. J. of Drug Del. and Ther. 8(6):400-404.
- Miteva M., Kirkbride K. C., Kilchrist K. V., Werfel T. A., Li H., Nelson C. E., Gupta M. K., Giorgio T. D., Duvall C. L. (2015). *Tuning PEGylation of mixed micelles to overcome intracellular and systemic siRNA delivery barriers*. Biomaterials. 38:97–107.
- Mohammad N., Vikram S., Malvi P., Chaube B., Athavale D., Vanuopadath N., Sadasivan S., Nair B., Kumar M. (2015). *Strategy to enhance efficacy of doxorubicin in solid tumor cells by methyl- β -cyclodextrin: Involvement of p53 and Fas receptor ligand complex*. Scientific Reports. 5:1-13.
- Pamujula S., Hazari S., Bolden G., Graves R. A., Chinta D. D., Dash S., Kishore V., Mandal T. K. (2012). *Cellular delivery of PEGylated PLGA nanoparticles*. The J. of Pharm. and Pharmac. 64:61-67.
- Panariti A., Miserocchi G., Rivolta I. (2012). *The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: disrupting or enabling functions?* Nanotechnol. Sci. Appl. 5:87-100.
- Prabhakara P., Zenia T., Marina K., Shama K. P., Girish S. N., Matapady N. H. (2013). *Preparation and evaluation of lipid vesicles of camptothecin as targeted drug delivery system*. Pak. J. Pharm. Sci. 26:(4)779-786.
- Rajan M., Krishnan P., Pradeepkumar P., Jeyanthinath M., Jeyaraj M., Ling M. P., Arulselvan P., Higuchi A., Munusamy M. A., Arumugam R., Benelli G., Murugan K., Kumar S. S. (2017). *Magneto-chemotherapy for cervical cancer treatment with camptothecin loaded Fe_3O_4 functionalized β -cyclodextrin nanovehicle*. RSC Adv. 7:46271-46285.

- Rajendran N. K., Kumar S. S. D., Houreld N. N., Abrahamse H. (2018). *A review on nanoparticle based treatment for wound healing*. J. Drug Deliv. Sci. Technol. 44:421-430.
- Ramsden J. J. (2018). *The Safety of Nanofabrication and Nanomaterials*. In: Applied Nanotechnology, 3rd edn. William Andrew Publishing. Chapter 14:205-223.
- Riss T. L., Moravec R. A., Niles A. L., Duellman S., Benink H. A., Worzella T. J., Minor L. (2016). *Cell Viability Assays*. Ass. Guid. Man.
- Rivolta I., Panariti A., Lettiero B., Sesana S., Gasco P., Gasco M., Masserini M., Miserocchi G. (2011). *Cellular uptake of coumarin-6 as a model drug loaded in solid lipid nanoparticles*. J. Physiol. Pharmacol. 62(1):45-53.
- Romberg B., Hennink W. E., Storm G. (2008). *Sheddable coatings for long-circulating nanoparticles*. Pharm. Res. 25:55-71.
- Rosenbaum A. I., Zhang G., Warren J. D., Maxfield F. R. (2010). *Endocytosis of beta-cyclodextrins is responsible for cholesterol reduction in Niemann-Pick type C mutant cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107(12):5477-5482.
- Skaik Y. *The bread and butter of statistical analysis "t-test": Uses and misuses*. Pak. J. Med. Sci. 31(6):1-2.
- Sooryakumar D., Thomas S., Dexheimer T. S., Beverly A., Teicher B. A., Pommier Y. (2011). *Molecular and cellular pharmacology of the novel noncamptothecin topoisomerase I inhibitor, Genz-644282*. Mol. Cancer Ther. 10(8):1490-1499.
- Strober W. (2001). *Trypan blue exclusion test of cell viability*. Curr. Protoc. Immunol. Suppl. 21.

- Sugarman S. M., Zou Y., Wasan K., Poirot K., Kumi R., Reddy S., Pérez-Soler R. (1996). *Lipid-complexed camptothecin: formulation and initial biodistribution and antitumor activity studies*. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 37:531-538.
- Suh J., Choy K. L., Lai S. K., Suk J. S., Tang B. C., Prabhu S., Hanes J. (2007). *PEGylation of nanoparticles improves their cytoplasmic transport*. *Int. J. of Nanom.* 2:735-741.
- Swaminathan S., Pastero L., Serpe L., Trotta F., Vavia P., Aquilano D., Trotta M., Zara G. P., Cavalli R. (2010). *Cyclodextrin-based nanosponges encapsulating camptothecin: Physicochemical characterization, stability and cytotoxicity*. *Eur. J. of Pharm. and Biopharm.* 74:193-201.
- Szente L., Singhal A., Domokos A., Song B. (2018). *Cyclodextrins: Assessing the Impact of Cavity Size, Occupancy, and Substitutions on Cytotoxicity and Cholesterol Homeostasis*. *Molecules* 23(1228):1-15.
- Takimoto C. H., Wright J., Arbuck S.G. (1998). *Clinical applications of camptothecins*. *Biochem. Biophys. Acta* 1400:107-119.
- Tenzer S., Docter D., Kuharev J., Musyanovych A., Fetz V., Hecht R., Schlenk F., Fischer D., Kiouptsi K., Reinhardt C., Landfester K., Schild H., Maskos M., Knauer S. K., Stauber R. H. (2013). *Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology*. *Nat. Nanotech.* 8:772-781.
- Teske T., Rutteman G. R., van Heerde P., Misdorp W. (1990). *Polyethylene glycol-L-asparaginase versus native L-asparaginase in canine non-Hodgkin's lymphoma*. *Eur. J. Cancer.* 26(8):891-895.
- Thomas, C. J., Rahier, N. J., Hecht, S. M. (2004). *Camptothecin: current perspectives*. *Bioorg. Med. Chem.* 12:1585-1604.

- Torchilin V. P. (2005). *Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers*. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4:145-160.
- Venditto V. J., Simanek E. E. (2010). *Cancer therapies utilizing the camptothecins: a review of the in vivo literature*. *Mol. Pharmaceutics* 7(2):307-349.
- Venkatachalam K., Wong C.-O., Zhu M. X. (2015). *The role of TRPMLs in endolysosomal trafficking and function*. *Cell Calcium.* 58(1):48-56.
- Wang Y., Wang J., Deng X., Wang J., Wang H., Wu M., Jiao Z., Liu Y. (2009). *Direct imaging of titania nanotubes located in mouse neural stem cell nuclei*. *Nano. Res.* 2(7):543-552.
- Watanabe M., Kawano K., Toma K., Hattori Y., Maitani Y. (2008). *In vivo antitumor activity of camptothecin incorporated in liposomes formulated with an artificial lipid and human serum albumin*. *J. Control Rel.* 127, 231-238.
- Xia M., Huang R., Sakamuru S., Alcorta D., Cho M. H., Lee D. H., Park D. M., Lelley M. J., Sommer J., Austin C.P. (2013). *Identification of repurposed small molecule drugs for chordoma therapy*. *Cancer Biol. Ther.* 14(7):638-647.
- Xiang S., Tong H., Shi Q., Fernandes J. C., Jin T., Dai K., Zhang X. (2012). *Uptake mechanisms of non-viral gene delivery*. *J. Contr. Rel.* 158(3):371-378.
- Zhan H., Jagtiani T., Liang J. F. (2017). *Enhanced anticancer activity of drug nanoparticles formulated with β -cyclodextrin*. *Anticancer Drugs.* 28(3):271-280.
- Zhao R., Al-Said N. H., Sternbach D. L., Lown W. (1997). *Camptothecin and Minor-Groove Binder Hybrid Molecules: Synthesis,*

Inhibition of Topoisomerase I, and Anticancer Cytotoxicity in Vitro. J. Med. Chem. 40: 216-225.

- Zhitomirsky B., Farber H., Assaraf Y. G. (2018). *LysoTracker and MitoTracker Red are transport substrates of P-glycoprotein: implications for anticancer drug design evading multidrug resistance.* J. of Cell. and Molec. Med. 22(4):2131-2141.

- Zi C.-T., Yang L., Xu F.-Q., Dong F.-W., Ma R.-J., Li Y., Zhou J., Ding Z.-T., Jiang Z.-H., Hu J.-M. (2019). *Synthesis and antitumor activity of biotinylated camptothecin derivatives as potent cytotoxic agents.* Bioorg. and Med. Chem. Let. 29:234-237.

CONCLUSIONES



Conclusiones

Teniendo en cuenta la descripción y el objetivo general de esta tesis doctoral (desarrollar un vector de naturaleza liposómica que permita aumentar la carga de la camptotecina en forma de complejo de inclusión con la CMCD e incrementar la estabilidad, la solubilidad y la eficacia terapéutica) puede concluirse que:

- 1) El pH jugó un papel importante en el proceso de complejación de la camptotecina con la CMCD, siendo la constante de complejación mucho mayor a pH 3,5 (703 ± 264 M) que a pH 7,4 (70 ± 19 M). Por otra parte, también la temperatura promovió variaciones en la constante de complejación, ya que esta última disminuía a medida que aumentaba la temperatura. Un aumento en la temperatura (entre 25 y 45°C en intervalos de 10°C) promovió un mayor número de vibraciones moleculares que dificultaron la formación del complejo.
- 2) También el pH ejerció una fuerte acción en la solubilidad. Así, la solubilidad de la camptotecina aumentó en 10,9 y 6 veces a pH 3,5 y 7,4, respectivamente, cuando se realizó la complejación con la CMCD. Además, se obtuvo una relación estequiométrica entre la camptotecina y la CMCD de 1:1, según las curvas de Higuchi y Connors, por lo que cada CMCD poseía en su interior una única molécula de camptotecina.
- 3) Tanto los liposomas convencionales (formados por fosfatidilcolina y colesterol en relación molar 50:50) como los PEGilados (formados por fosfatidilcolina, colesterol y PEG en

relación molar 50:45:5) se consiguieron sintetizar con un tamaño próximo a los 100 nm con polidispersión en torno a 0,1, que se mantuvo constante durante 21 días a pH 7,4. Sin embargo, el tamaño de los liposomas PEGilados (120 nm) fue menor que el obtenido en los liposomas convencionales (135 nm). En cuanto al potencial zeta, los liposomas PEGilados poseían valores de $-6,5 \pm 2,2$ mV y los liposomas convencionales de $-21 \pm 4,9$ mV, pero ambos sistemas se mantuvieron estables a lo largo del tiempo. Por último, cabe destacar que los dos tipos de liposomas tuvieron forma esférica.

- 4) Las condiciones óptimas de producción de liposomas fueron un tamaño de poro de filtro de 100 nm, una temperatura de 65°C, el disolvente PBS a pH 7,4 y un número de extrusiones de entre 10 y 12.
- 5) Las condiciones de máxima eficacia de encapsulación de la camptotecina, tanto en los liposomas convencionales como en los PEGilados, consistieron en la internalización del complejo de inclusión CMCD-CAMP de manera directa, en PBS a pH 7,4, durante el proceso de formación de los liposomas. En ambos casos, la concentración de camptotecina encapsulada fue mayor al valor de la CI_{50} (20-150 nM) indicada para el fármaco, por lo que se consideraron aptos para ser utilizados en líneas celulares.
- 6) La liberación de la camptotecina encapsulada en el interior de los liposomas fue nula a pH 7,4 y únicamente del 6% a pH 3,5, lo que significa que el fármaco se mantendrá encapsulado en el interior de los liposomas durante su transporte e internalización

en las células tumorales, sufriendo tan solo una ligera liberación cuando se encuentre en los lisosomas.

- 7) El sistema más eficaz para el tratamiento de las células tumorales fue el de liposomas PEGilados + CMCD-CAMP, con una CI_{50} de 6,5-11,7 nM. A este sistema le siguen en eficacia citotóxica el complejo de inclusión CMCD-CAMP (10,6-33,3 nM), la camptotecina libre (17,0-46,9 nM) y el sistema de liposomas convencionales + CMCD-CAMP (18,6-67,8 nM). La CMCD y los liposomas convencionales y PEGilados no fueron tóxicos para ninguna de las líneas celulares.
- 8) La internalización de los liposomas en el interior celular se produjo por endocitosis mediada por clatrina. El análisis de internalización se realizó utilizando la Microscopía Electrónica de Fluorescencia, mediante el marcaje con sondas fluorescentes de los liposomas y los lisosomas celulares.



Anexo. Determinación de la eficacia citotóxica en líneas celulares utilizando la prueba t de Student

La prueba t de Student o test-T es una prueba en donde el estadístico sigue la distribución t de Student si la hipótesis cierta es nula. Se emplea para diferenciar si dos series de datos, que siguen una distribución normal, son significativamente diferentes. El nivel de significancia prefijado es el utilizado normalmente, es decir, un 95% de confianza, en donde un p-valor menor al 0,05 indicaría la significancia entre dos datos, mientras que valores mayores al 0,05 indicarían una ausencia de significancia.

Existen dos tipos de pruebas T diferentes: prueba T de una cola y prueba T de dos colas. La prueba T de una cola reconoce la superioridad en la media de una muestra sobre la otra, asumiendo desde el principio que la media de una muestra ha de ser superior a la media de la otra. En cambio, la prueba T de dos colas no da por supuesto la superioridad de la media de ninguna de las muestras, sino que cualquiera puede tener dicha superioridad. En los experimentos de esta tesis, debido a que no se podía prefijar ese criterio de superioridad en ninguna de las muestras comparadas, se realizó un test de dos colas.

Significancia estadística del efecto citotóxico de los diferentes sistemas de camptotecina

Tal y como se mencionó en el Capítulo 4, se han determinado las diferencias entre cada uno de los tratamientos en cada una de las líneas celulares testadas. De este modo, se pudo determinar si el efecto de un sistema en comparación con el otro era significativamente mayor o, en cambio, las diferencias entre ambos no eran reales o significativas, pudiendo asumir que el efecto era el mismo.

Por lo tanto, la hipótesis planteada es: hay diferencias significativas en el efecto citotóxico de dos sistemas con camptotecina concretos en una determinada línea celular.

Una vez realizado el citado test estadístico, se obtuvieron p-valores para cada una de las parejas de tratamiento realizadas en las líneas celulares HTC-116 de cáncer de colon (Tabla A), H-460 de cáncer de pulmón (Tabla B), BT-474 de cáncer de mama (Tabla C) y HS-5 de fibroblastos (Tabla D).

Tabla A. Resultados de p-valor para cada pareja de sistemas con camptotecina testados en la línea celular HTC-116 de cáncer de colon.

Sistema	p-valor
DCL sin PEG vs. DCL con PEG	0,016
DCL sin PEG vs. CAMP libre	0,094
DCL sin PEG vs. CMCD-CAMP libre	0,027
DCL con PEG vs. CAMP libre	0,0021
DCL con PEG vs. CMCD-CAMP libre	0,0197
CAMP libre vs. CMCD-CAMP libre	0,0403

Tabla B. Resultados de p-valor para cada pareja de sistemas con camptotecina testados en la línea celular H-460 de cáncer de pulmón.

Sistema	p-valor
DCL sin PEG vs. DCL con PEG	0,00034
DCL sin PEG vs. CAMP libre	0,010
DCL sin PEG vs. CMCD-CAMP libre	0,001
DCL con PEG vs. CAMP libre	0,0188
DCL con PEG vs. CMCD-CAMP libre	0,0164
CAMP libre vs. CMCD-CAMP libre	0,2510

Tabla C. Resultados de p-valor para cada pareja de sistemas con camptotecina testados en la línea celular BT-474 de cáncer de mama.

Sistema	p-valor
DCL sin PEG vs. DCL con PEG	0,014
DCL sin PEG vs. CAMP libre	0,513
DCL sin PEG vs. CMCD-CAMP libre	0,011
DCL con PEG vs. CAMP libre	0,0206
DCL con PEG vs. CMCD-CAMP libre	0,1901
CAMP libre vs. CMCD-CAMP libre	0,0421

Tabla D. Resultados de p-valor para cada pareja de sistemas con camptotecina testados en la línea celular HS-5 de fibroblastos.

Sistema	p-valor
DCL sin PEG vs. DCL con PEG	0,001
DCL sin PEG vs. CAMP libre	0,310
DCL sin PEG vs. CMCD-CAMP libre	0,011
DCL con PEG vs. CAMP libre	0,0206
DCL con PEG vs. CMCD-CAMP libre	0,0015
CAMP libre vs. CMCD-CAMP libre	0,0751

En las tablas correspondientes se obtuvieron valores menores a 0,05 que indican que las diferencias entre cada pareja de tratamientos son significativas, es decir, que cada sistema posee una eficacia citotóxica diferente. Por otra parte, los valores mayores a 0,05 (color rojo) indicaron que las diferencias no son significativas, es decir, que ambos tratamientos consiguieron la misma eficacia citotóxica en esa línea celular concreta.
