

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**SISTEMA DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS
BASADOS EN NANOPARTÍCULAS SITIO-DIRIGIDAS
CON CAMPOS MAGNÉTICOS**

Por

ARTURO SALVADOR VAZQUEZ ORTEGA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Orientación en
Farmacia

Junio, 2014

**SISTEMA DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS
BASADOS EN NANOPARTÍCULAS SITIO-DIRIGIDAS
CON CAMPOS MAGNÉTICOS**

Revisión de la tesis:

Dr. Alberto Gómez Treviño

Dr. Carlos Luna Criado

Dra. Patricia Gonzalez Barranco

Dra. María Elena Cantú Cárdenas

Dr. Benito Mata Cárdenas

El presente trabajo de investigación se desarrolló en las siguientes instituciones:

Laboratorio de Biología Molecular, FCQ, Universidad Autónoma de Nuevo León,
México.

Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), Saltillo, Coah., México.

Universidad de Santiago de Compostela, España.

Instituto de Ciencia de Materiales de Sevilla, España.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
TABLA DE CONTENIDO.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
RESUMEN	ix
CAPÍTULO 1. Introducción.....	1
1.1 Quimioterapia <i>versus</i> Cáncer	1
1.1.1 El cáncer: definición y terapéutica.....	1
1.1.2 Factores que limitan la quimioterapia.....	5
1.1.3 Efectos adversos en la quimioterapia.....	8
1.2 Nanomedicina: Sistemas acarreadores de fármacos	10
1.2.1 Principios básicos de nanotecnología	10
1.2.2 Nanotecnología en medicina.....	12
1.2.3 Nanopartículas como acarreadores de fármacos.....	14
1.2.3.1 Superparamagnetismo	17
1.2.4 Transporte intratumoral de nanopartículas.....	23
1.2.5 Magnetita como núcleo magnético.....	24
1.3 Antecedentes.....	27
1.4 Hipótesis.....	30
1.5 Objetivos	30

CAPÍTULO 2. Materiales y Métodos	31
2.1 Diseño de Nanopartículas con propiedades magnéticas	31
2.1.1 Síntesis de Magnetita.....	31
2.1.2 Estabilización y uniformidad de tamaño	33
2.1.3 Estandarización.....	35
2.2 Formación de complejo Partícula-Droga.....	36
2.2.1 Recubrimiento Polimérico	36
2.2.2 Complejo Partícula-Droga	39
2.2.3 Lavado de partículas	41
2.3 Caracterización	42
2.3.1 Estandarización de las soluciones de trabajo	42
2.3.2 Difracción de Rayos X.....	43
2.3.3 Microscopía Electrónica de Transmisión.....	44
2.3.4 Propiedades Magnéticas.....	45
2.4 Pruebas Biológicas.....	47
2.4.1 Línea celular y medios de cultivo	47
2.4.2 Determinación de Citotoxicidad.....	48
2.4.2.1 Preparación, mantenimiento e inoculación de placas.....	48
2.4.2.2 Ensayo de Rojo Neutro.....	49
2.4.3 Localización de Nanopartículas empleando campos magnéticos	50
2.4.4 Disgregación de Nanopartículas post-exposición a campo magnético .	53
CAPÍTULO 3. Resultados y Discusión	55
3.1 Diseño de Nanopartículas con propiedades magnéticas	55
3.1.1 Síntesis de Magnetita.....	55
3.1.2 Estabilización y uniformidad de tamaño	56

3.1.3 Caracterización morfológica y microestructural de nanopartículas superparamagnéticas.....	59
3.1.4 Caracterización morfológica y microestructural de nanopartículas superparamagnéticas cargadas con paclitaxel	61
3.1.5 Caracterización de muestras mediante Espectroscopía Infrarroja	63
3.1.6 Caracterización magnética	65
3.2 Pruebas Biológicas.....	69
3.2.1 Determinación de Citotoxicidad.....	69
3.2.2 Localización de nanopartículas empleando campos magnéticos.....	73
3.2.3 Disgregación de nanopartículas post-exposición a campo magnético..	75
CAPÍTULO 4. Conclusiones	77
CAPÍTULO 5. Bibliografía	79
APÉNDICES.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.	3
<i>Antineoplásicos de uso común en la práctica clínica y sus diferentes mecanismos de acción.....</i>	
Figura 1.2.	6
<i>Los diferentes factores extracelulares que limitan la llegada del principio activo al tejido afectado.....</i>	
Figura 1.3.	8
<i>Factores intracelulares de resistencia a fármacos.....</i>	
Figura 1.4.	10
<i>Clasificación de efectos adversos de la quimioterapia.....</i>	
Figura 1.5.	14
<i>Nanotecnología en Medicina.....</i>	
Figura 1.6.	19
<i>Fenómeno de Paramagnetismo.....</i>	
Figura 1.7.	20
<i>Fenómeno del ferromagnetismo.....</i>	
Figura 1.8.	22
<i>Tipos de relajación que presentan las SPION.....</i>	
Figura 1.9.	28
<i>Estructura química del Paclitaxel.....</i>	
Figura 2.1.	31
<i>Reacción simplificada no balanceada de la síntesis de magnetita.....</i>	
Figura 2.2.	37
<i>Estructura condensada del Pluronic® F-127.....</i>	
Figura 2.3.	40
<i>Esquema de integración del Complejo Partícula-Droga.....</i>	
Figura 2.4.	45
<i>Ilustración del Magnetómetro de Quantum Design.....</i>	
Figura 2.5.	50
<i>Técnica para viabilidad celular.....</i>	
Figura 2.6.	51
<i>Cultivos en monocapa en dos niveles.....</i>	
Figura 2.7.	54
<i>Disgregación post-exposición a campo magnético.....</i>	
Figura 3.1.	55
<i>Características de las muestras obtenidas de la síntesis de nanopartículas de magnetita.....</i>	
Figura 3.2.	56
<i>Características de las muestras obtenidas de la síntesis con ácido oleico.....</i>	
Figura 3.3.	57
<i>Espectroscopía de Infrarrojo (IR) de los sistemas analizados de PSF.....</i>	
Figura 3.4.	58
<i>Micrografía Electrónica de Transmisión (TEM) de nanopartículas con ácido oleico.....</i>	
Figura 3.5.	60
<i>Caracterización morfológica y microestructural de nanopartículas superparamagnéticas.....</i>	
Figura 3.6.	62
<i>Caract. morfológica y microestructural de nanopartículas superparamagnéticas cargadas con paclitaxel...</i>	
Figura 3.7.	63
<i>Patrón de difracción de rayos X de la muestra PCF-polvo.....</i>	
Figura 3.8.	65
<i>Espectros de de Infrarrojo de las muestras PSF y PCF.....</i>	
Figura 3.9.	67
<i>Comportamiento magnético.....</i>	
Figura 3.10.	69
<i>Microscopía óptica de PSF sobre células A431.....</i>	
Figura 3.11.	71
<i>Representación gráfica de viabilidad celular en presencia de PSF.....</i>	
Figura 3.12.	72
<i>Representación gráfica de viabilidad celular en presencia de PCF.....</i>	

<i>Figura 3.13.</i>	
<i>Representación gráfica de experimentos realizados empleando sistemas de cultivo en dos niveles.....</i>	74
<i>Figura 3.14.</i>	
<i>Representación gráfica de los resultados de capacidad de disgregación.....</i>	75

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 2.1.</i>	
<i>Modificaciones en la reacción de síntesis de nanopartículas de magnetita.....</i>	35
<i>Tabla 2.2.</i>	
<i>Línea celular neoplásica ATCC.....</i>	47
<i>Tabla 2.3.</i>	
<i>Distribución de nanopartículas y campos magnéticos externos.....</i>	52

RESUMEN

Arturo Salvador Vázquez Ortega
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas

Fecha de Graduación: Junio 2014

Título del Estudio: Sistema de liberación de fármacos antineoplásicos basados en nanopartículas sitio-dirigidas con campos magnéticos.

Número de páginas: 85

Candidato para obtener el grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Farmacia.

Área de Estudio: Farmacia

Propósito y Método del Estudio: La experimentación está enfocada en la síntesis de nanopartículas con propiedades magnéticas, mismas que se emplearán como sistema de acarreo de fármacos antineoplásicos. Dichas nanopartículas son funcionalizadas con la adición de un recubrimiento polimérico que permite el transporte del fármaco. A través de la aplicación de técnicas exploratorias se proyecta dirigir, o bien, inmovilizar las nanopartículas mediante campos magnéticos, con lo cual se prevé la liberación de fármaco en sitios específicos. Se determinaron las características físicas de las partículas con y sin recubrimiento, y fueron analizadas mediante Microscopía Electrónica de Transmisión, Espectroscopía de Infrarrojo y Rayos X, además, se estableció el comportamiento magnético de los sistemas nanopartículas-fármaco a temperatura del cuerpo humano. Se diseñó un método de evaluación empleando cultivo celular neoplásico de origen humano, para establecer la factibilidad de las partículas a ser retenidas o direccionadas empleando campos magnéticos externos. La efectividad de liberación del fármaco se estableció mediante el valor de viabilidad celular empleando la línea celular A-431 de carcinoma humano (ATCC: CL1555), como una medida del efecto citotóxico de dicho principio activo. El propósito del presente trabajo de investigación es el desarrollo de un sistema de liberación controlada y sitio dirigida, que permita que fármacos antineoplásicos como el Paclitaxel, que presenta grandes dificultades para su administración, encuentren formas de administración menos agresivas y de mayor efectividad.

Contribuciones y Conclusiones: Se obtuvo un sistema de liberación controlada y sitio dirigido de fármacos basado en partículas recubiertas de un diámetro aproximado de 60 nm. Este sistema presenta actividad citotóxica frente a células neoplásicas humanas en cultivo. Se diseñó un sistema de evaluación *in-vitro* el cual provee una nueva forma de evaluación de partículas con propiedades magnéticas empleadas como sistema de liberación de fármacos sitio dirigido. Se evidenció empleando pruebas biológicas, la capacidad de integración partícula-fármaco, se determinó la concentración necesaria para disminuir la viabilidad en un 50% a 48 horas posteriores a la aplicación del tratamiento.

FIRMA DEL ASESOR: _____

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Quimioterapia *versus* Cáncer

1.1.1 El cáncer: Definición y Terapéutica

En la célula existen múltiples eventos fisiológicos que se encuentran regulando la proliferación, la apoptosis, la diferenciación y el estadio celular; modulando la homeostasis y la funcionalidad de todos los tejidos. Un trastorno en estos eventos secuenciales, que se traduce en la alteración de la relación entre la muerte celular, la diferenciación y proliferación celular, conduce a un aumento en el número de células no reguladas (Chadha *et al.* 2008). El cáncer es el conjunto de estas enfermedades caracterizadas por la alteración del equilibrio entre la proliferación y los mecanismos normales de muerte celular (Galindo *et al.* 2010).

Es considerada como una de las principales causas de muerte a nivel mundial. De acuerdo a las estadísticas oficiales, las neoplasias malignas

constituyen la segunda causa de muerte en la población mexicana reportando 47.6 por cada 100 mil afectados (Mejía *et al.* 2005).

Para combatir este conjunto de enfermedades el ser humano se ha dado a la tarea de encontrar tratamientos que erradiquen de forma efectiva y segura la mayor parte del tejido dañado y así poder evitar la diseminación de esta enfermedad hacia otros órganos y tejidos. Los tratamientos convencionales incluyen cirugía, radioterapia y quimioterapia, siendo esta última la de mayor interés y desarrollo para los investigadores en las últimas décadas.

La quimioterapia antineoplásica consiste en la administración endovenosa de fármacos citostáticos y citotóxicos que tiene como objetivo impedir, retrasar o detener la reproducción de las células de origen neoplásico y provocar su muerte por apoptosis, algunos de estos fármacos y su mecanismo de acción se muestran en la figura 1.1., sin embargo, es bien sabido que poseen también, un efecto tóxico para los tejidos sanos (Galindo *et al.* 2010). Por lo cual, nuevos medicamentos se han incorporado al uso clínico contra cuadros patológicos que antes no admitían tratamiento o se prestaban solo a formas locales de terapia, como la cirugía y radioterapia. Es poco probable que los nuevos tratamientos sustituyan por completo a los fármacos preexistentes, dado que la eficacia de estos incrementa constantemente, y se ha podido controlar y pronosticar su toxicidad (Calabresi y Chabner, 2003).

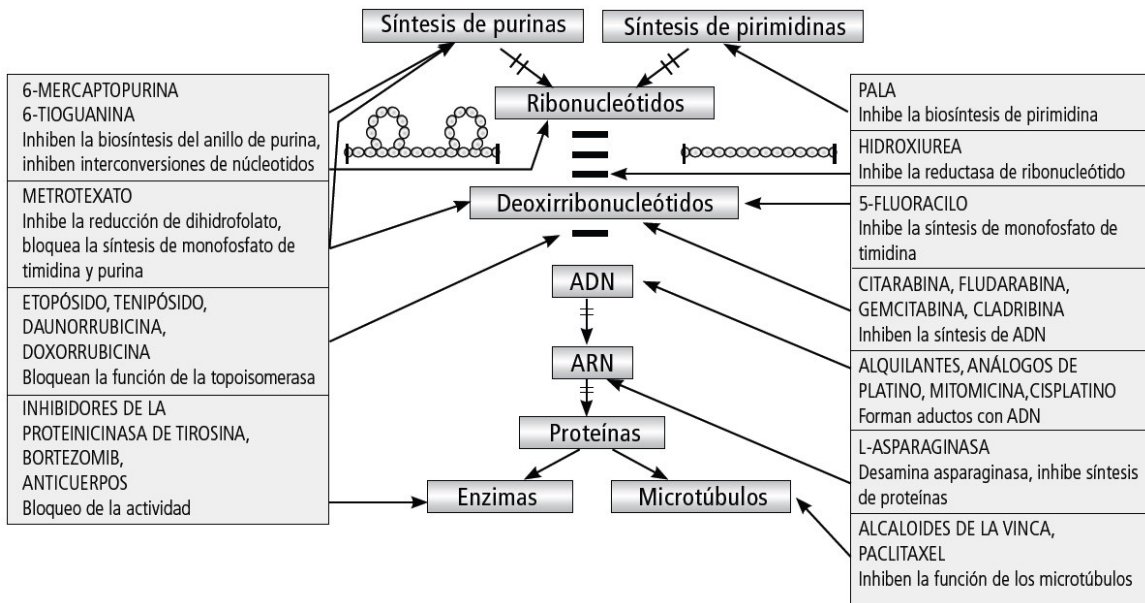


Figura 1.1. Antineoplásicos de uso común en la práctica clínica y sus diferentes mecanismos de acción. Se observan las diferentes dianas moleculares así como el nivel en el cual estos actúan. Tomado de (Osorio, Alarcón y Majilis, 2008).

Las formas más usuales para administrar los tratamientos quimioterapéuticos son las siguientes (Cervantes, 2002):

- a) Quimioterapia de inducción. Se utiliza en el tratamiento de enfermedades avanzadas, su objetivo es conseguir una remisión de la misma, puede tener intención curativa o paliativa.
- b) Quimioterapia adyuvante. Se realiza después del tratamiento loco-regional de un tumor, ya sea quirúrgico o radiológico. Pretende eliminar la enfermedad de micrometástasis residual.
- c) Quimioterapia neo-adyuvante. Se emplea como tratamiento primario del tumor en estadio clínico loco-regional antes de la cirugía, asociado o no a radioterapia concomitante.

De acuerdo a lo anterior se establece que los tratamientos oncológicos varían de acuerdo con el tipo de cáncer y la etapa en la que se encuentre la enfermedad. El tratamiento es multidisciplinario pues a menudo es necesario utilizar diversas modalidades para lograr un mejor control. Por consiguiente, técnicas como la cirugía o la radioterapia, cuyo efecto es loco-regional, suele combinarse con la quimioterapia, que actúa a nivel sistémico (Galindo *et al.* 2010). En algunos de los casos la quimioterapia coadyuvante es el método que complementa sistemáticamente el tratamiento local de tumores como lo son el de mama, colon y recto; así, la quimioterapia se emplea como parte de un procedimiento con modalidades múltiples para el tratamiento inicial de muchas otras neoplasias (Calabresi & Chabner, 2003).

En cualesquiera de los casos anteriores se debe considerar el hecho de que cada individuo responde de manera distinta al tratamiento quimioterapéutico, tomando en cuenta esto, la terapia individualizada se asienta en tres pilares básicos los cuales son: el tipo histológico del tumor, la extensión de la enfermedad y la situación del paciente; en general, el primer tratamiento que se lleva a cabo en pacientes con cáncer es el que tiene mayor impacto sobre la historia natural de la

enfermedad y por tanto sobre la supervivencia y la calidad de vida del paciente (Galindo *et al.* 2010).

1.1.2 Factores que limitan la quimioterapia

El objetivo principal del tratamiento quimioterápico es conseguir la muerte de las células neoplásicas. Para ello es necesario lograr que la mayor cantidad de fármaco activo posible llegue a nivel de su diana molecular en el interior de la célula. Cualquier circunstancia que se interponga o dificulte este objetivo puede ser causa de resistencia.

De acuerdo a lo publicado por Lehnert en 1996, se pueden clasificar a los factores causantes de la resistencia en extracelulares e intracelulares. Ambos grupos no son completamente independientes y pueden influenciarse entre sí, de una manera esquemática puede analizarse este aspecto analizando la figura 1.2 (Lehnert, 1996; Sánchez y Benítez, 2006).

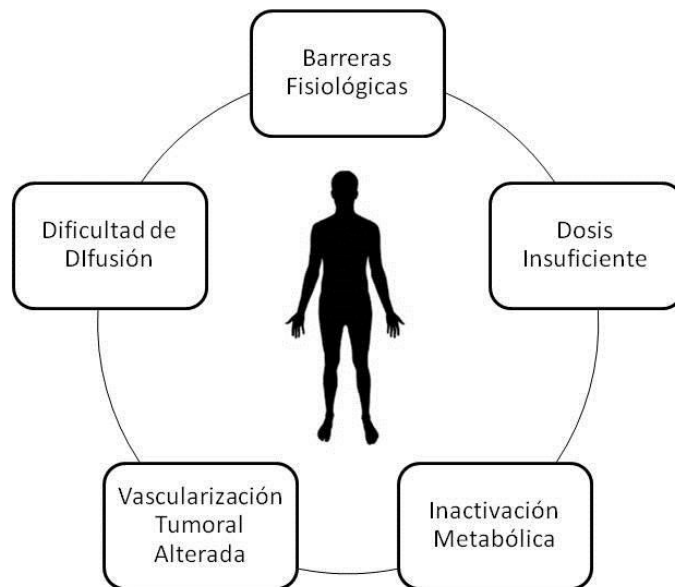


Figura 1.2. Los diferentes factores extracelulares que limitan la llegada del principio activo hacia el tejido afectado. Si la dosis terapéutica circulante no es adecuada o existen barreras fisiológicas que impidan la llegada del fármaco al tejido diana, el tratamiento quimioterapéutico será ineficiente y repercutirá en la salud del paciente y su esperanza de vida (Sánchez y Benítez, 2006; Lehnert, 1996).

A continuación se enlistan los factores generales por los cuales puede existir resistencia a los tratamientos quimioterapéuticos (Sánchez y Benítez, 2006).

i) Factores extracelulares: Entre los factores que pueden alterar la concentración extracelular de un fármaco se encuentran:

- a) La administración de una dosis insuficiente.
- b) La inactivación metabólica.
- c) La dificultad de acceder al tumor por una vascularización tumoral alterada.

- d) Barreras fisiológicas como lo son las existentes en el sistema nervioso central y los testículos.
- e) La presencia de tejido intersticial tumoral de moléculas, como el colágeno, que dificultan la difusión del fármaco.

ii) Factores intracelulares: Las células malignas desarrollan una serie de mecanismos de defensa ante la quimioterapia, tal como se muestra en a figura 1.3, estos mecanismos de resistencia intracelular pueden dividirse en tres grupos principales:

- a) Los que disminuyen la concentración del fármaco a nivel de su diana molecular. Esto puede producirse por su expulsión a través de la membrana celular, por secuestro en vesículas citoplasmáticas, por variaciones en el transporte entre el núcleo y el citoplasma o por alteraciones en el metabolismo intracelular del fármaco.
- b) Aquellos que una vez conseguido el efecto del fármaco sobre su diana, evita la muerte celular. Dos alteraciones destacan a este nivel, la primera un aumento en la capacidad de reparación del DNA y la inhibición de la muerte celular programada (apoptosis).
- c) Las propias alteraciones de la diana molecular; ejemplo de ello tenemos a los inhibidores de la topoisomerasa, en los cuales, estudios demuestran que la resistencia en algunos modelos experimentales se debe a niveles

muy reducidos en la expresión y regulación de las topoisomerasas I y II (Leynald-Jones *et al.* 1993).

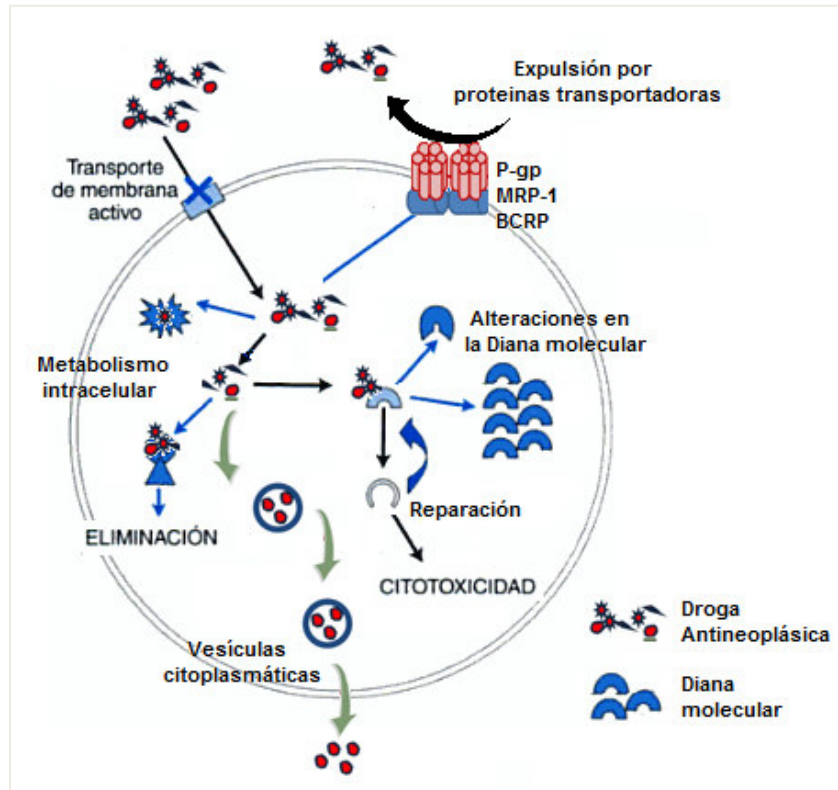


Figura 1.3. Factores intracelulares de resistencia a fármacos, entre los que se destacan, las proteínas MDR (P-gp, MRP-1, BCRP, entre otras) las cuales expulsan el fármaco a través de la membrana celular disminuyendo así su concentración intracelular. Adaptado de (Lanore y Delprat, 2004).

1.1.3 Efectos adversos en la quimioterapia

La quimioterapia constituye un pilar fundamental en el tratamiento de las enfermedades neoplásicas y se dispone de nuevos fármacos y esquemas que nos permiten alcanzar respuestas completas en algunos tumores, aumentar el intervalo libre de enfermedad e incluso la supervivencia en otros casos y,

finalmente, desarrollar tratamientos paliativos eficaces. En los tratamientos quimioterapéuticos los fármacos actúan, por un lado contra la célula tumoral produciendo su efecto citotóxico y por otro contra los tejidos sanos produciendo los efectos tóxicos. Estos dos procesos llevados a su máxima expresión darían lugar a la erradicación total del tumor, en otras palabras, a la curación del paciente, o bien; a toxicidades extremas desencadenando una muerte tóxica. (Barneto Aranda *et al.*, 2000).

Aunque existen diferencias entre las células normales y las neoplásicas, estas diferencias no son lo suficientemente marcadas como para lograr una citotoxicidad selectiva eficiente que impida la toxicidad de tejidos sanos. Es así como los elementos de la médula ósea, el epitelio gastrointestinal, el revestimiento de la boca, los folículos pilosos sufren el efecto tóxico de algunas drogas (Osorio *et al.*, 2008).

Desde la administración del fármaco, la toxicidad puede aparecer a diferentes niveles del tratamiento, comenzando desde la administración, ocasionando reacciones de tipo sistémicas, hasta la generación de enfermedades crónicas, provocadas por un tratamiento quimioterapéutico prolongado.

Inmediata (Horas o días)	<ul style="list-style-type: none"> • Náuseas y vómitos • Reacciones locales: Flebitis química, tromboembolia, hematomas, infiltración o extravasación • Reacciones sistémicas: Anafilaxia, fiebre.
Precoz (Días o semanas)	<ul style="list-style-type: none"> • Alteraciones hematológicas: Leucopenia, trombopenia, anemia. • Alteraciones metabólicas: Secreción inapropiada de la ADH. • Alteraciones cutáneo-mucosas: Alopecia, mucositis. • Toxicidad renal y de vías urinarias. • Alteraciones inmunológicas
Retardada/Tardía (Semanas/meses/años)	<ul style="list-style-type: none"> • Alteraciones cardiovasculares: Micardiopatía. • Alteraciones pulmonares: Fibrosis. • Alteraciones neurológicas: neuropatías • Hipogonadismo, esterilidad, carcinogénesis, osteoporosis.

Figura 1.4. Clasificación de efectos adversos de la quimioterapia en relación al tiempo de tratamiento (Galindo *et al.* 2010).

La figura 1.4 presenta de manera clara y específica, una clasificación de efectos adversos de la quimioterapia en relación al tiempo de tratamiento recibido por el paciente (Galindo *et al.* 2010).

1.2 Nanomedicina: Sistemas acarreadores de fármacos

1.2.1 Principios básicos de nanotecnología

En las últimas dos décadas se han alcanzado grandes progresos en el conocimiento y desarrollo de materiales nanométricos con un gran potencial

tecnológico. De hecho, una gran variedad de nuevos términos con el prefijo “nano”, se han ido incorporando rápidamente al vocabulario científico. De este modo, términos tales como *nanopartículas*, *nanoestructuras*, *nanotecnología*, *nanomateriales*, *nanoclusters*, *nanoquímica*, *nanocoloides*, *nanoreactor*, y *nanomedicina* aparecen cada vez con mayor frecuencia en los artículos de investigación científica (Gubin *et al.* 2005). Si se desea conocer a ciencia cierta la magnitud en la cual, estos materiales se emplean, es importante conocer algunos conceptos básicos, que introduciremos a continuación y que nos darán un enfoque objetivo de la relevancia de estas estructuras.

Un **nano-objeto** es un objeto físico que tiene dimensiones del orden de los nanómetros (no más de 100 nm) y que puede ser de origen orgánico, inorgánico o biológico. Cuando los materiales tienen estos tamaños tan reducidos, presentan propiedades gobernadas principalmente por efectos cooperativos, superficiales y de confinamiento, las cuales pueden distar considerablemente de las observadas en sus análogos macroscópicos (Gubin *et al.* 2005).

Los nanomateriales se clasifican en **materiales compactos** y **nanodispersiones**. El primer tipo incluye a los llamados materiales “nanoestructurados” estos son, unidades de tamaño nanométrico del mismo tipo, las cuales se repiten creando una estructura macroscópica ordenada. En contraste, a diferencia de los materiales nanoestructurados, las nanodispersiones son homogéneas y dispersas en un medio; ya sea vacío, en un líquido, sólido o gas; y se encuentran aisladas unas de otras. Estas pueden variar de acuerdo al

medio en el que estén dispersas y a las características del material (Gubin *et al.* 2005).

La **nanotecnología** es la rama aplicada de la ciencia dedicada a la preparación y manipulación de materiales nanométricos con propiedades diseñadas para su uso práctico en alguna aplicación determinada (Gubin *et al.* 2005).

En resumen, la nanotecnología es una plataforma tecnológica que utiliza las propiedades únicas de la materia en la nanoescala, ya sea, en forma compacta o en nanodispersiones, en las cuales los fenómenos físicos están dominados por fuerzas como: Van der Waals, puentes de hidrógeno, carga electrónica, hidrofobicidad, hidrofiliidad y el efecto túnel de la mecánica cuántica.

1.2.2 Nanotecnología en medicina

Nuestra comprensión de la biología, ciencias de los materiales y la nanotecnología se ha expandido rápidamente. La intersección inevitable de estas tres disciplinas ha puesto en marcha el desarrollo de áreas de investigación emergentes como la nanobiotecnología y las ciencias nanobiomédicas (nanomedicina), que ofrecen interesantes y abundantes oportunidades para el descubrimiento de nuevos procesos y fenómenos.

En particular, los avances en la síntesis y caracterización de materiales nanométricos permite a los científicos comprender y controlar las interacciones entre los nanomateriales (por ejemplo, los nanofilamentos, nanofibras, nanopartículas, nanobarras y nanotubos) y las entidades biológicas (por ejemplo, ácidos nucleicos, proteínas o células) a nivel molecular o celular (Wang *et al.* 2011).

La nanomedicina es el campo de las ciencias biomédicas que involucra la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades y lesiones traumáticas; así como, conservar y mejorar la salud humana, utilizando herramientas y dispositivos que tienen nanomateriales como elementos activos. En otras palabras, la nanomedicina es la aplicación de la nanotecnología a la medicina (Freitas, 2005). Algunas aplicaciones en este campo son ilustradas en la figura 1.5.



Figura 1.5. Nanotecnología en Medicina. En la escala de un nanómetro (la millonésima parte de un metro) los materiales y dispositivos pueden interactuar con las células y las moléculas de una forma única. Las tecnologías de nanoescala ya se utilizan en la investigación o en terapias y son por lo general de tamaños entre 10 nanómetros (el tamaño de un anticuerpo) y 100 nanómetros (el tamaño de un virus). Estos dispositivos y partículas a nanoescala se están aplicando, como sensores para detectar moléculas como proteínas o ADN, como medios de contraste y como acarreadores específicos para la administración de agentes terapéuticos. Adaptado de (Heath, *et al.* 2009).

1.2.3 Nanopartículas como acarreadores de fármacos

Uno de los objetivos en la terapia farmacológica, es lograr que el efecto deseado sea estrictamente sobre las células dañadas o el órgano afectado, esto es lo que la farmacia define como “bala mágica”, el objetivo se produce cuando el vehículo de la droga o drogas puede identificar una característica molecular específica en el área afectada, esto no ha sido alcanzado aún por los métodos actuales de administración de fármacos por lo cual en este punto la

nanotecnología es una herramienta útil de trabajo con la cual se puede alcanzar el objetivo deseado. Desde hace tiempo se reconoce que existe una gran dificultad en la construcción de un sensor químico que pueda discriminar las células diana de células normales en el organismo. Una forma de minimizar el problema de selectividad, aumentando la especificidad, mientras se mejora la eficiencia de la focalización, es manipular físicamente la posición de la droga (Andhariya, 2011). Tomando en cuenta que prácticamente todos los agentes quimioterapéuticos usados en clínica se internalizan en la célula por difusión pasiva; es de suponer que cuanto mayor sea la concentración extracelular del fármaco, mayor será la cantidad que pase al interior de la misma, garantizando el desarrollo de su mecanismo de acción (Sánchez y Benítez, 2006).

La idea del diseño de un sistema de liberación controlada surge en la década de los años sesenta con el uso de implantes mecánicamente robustos para la difusión controlada de sustancias. Con el paso de los años y el desarrollo de nuevos materiales a escalas nanométricas, se ha ampliado el uso de estos como plataformas de administración de fármacos.

El empleo de nanopartículas como sistema de acarreo presenta grandes ventajas (Heath y Davis, 2008) en comparación con los sistemas actualmente empleados puesto que:

- 1) Las nanopartículas pueden acarrear una gran cantidad de principio activo en su superficie y como éste se encuentra unido a la partícula, no participa en el control farmacocinético ni biodistribución dentro del organismo.
- 2) En una nanopartícula se puede controlar la cantidad de fármaco efectiva presente en su superficie, reduciendo así la dosis empleada y por consiguiente los efectos adversos inherentes al metabolismo del fármaco.
- 3) Cuentan con el suficiente espacio como para poder anclar en su superficie múltiples ligandos que provean sitios de unión específica con las células diana (ejemplo: anticuerpos).
- 4) El tamaño de las nanopartículas permite también unir a su superficie diferentes fármacos para terapias multi-droga más eficientes.
- 5) Con el empleo de nanopartículas se puede evitar el proceso de expulsión del fármaco a través de la membrana celular, el cual está relacionado con la actividad de determinadas proteínas transportadoras (ej. glicoproteína P, MDRP, etc.), ya que éstas entran vía endocitosis en las células.

En la farmacia moderna, las investigaciones básicas para la manufactura y caracterización de nuevas formas de dosificación, están enfocadas frecuentemente en el empleo de nanopartículas con propiedades magnéticas como sistemas de acarreo de fármacos, los cuales pueden ser clasificados como fuentes artificiales de campos magnéticos (Silva-Freitas, *et al.* 2011).

El objetivo principal de la liberación controlada de fármacos utilizando nanopartículas magnéticas es el de administrar la cantidad necesaria de fármaco

de manera segura y efectiva a sitios específicos del cuerpo humano. La introducción de nanopartículas superparamagnéticas en la década de 1970 produjo un vehículo de transporte novedoso para la administración de fármacos, el cual puede ser manipulado mediante campos magnéticos externos (Andhariya, *et al.* 2011). Por lo general estos vehículos están basados en el empleo de óxidos de hierro como la magnetita, magemita, hematita, entre otros, que presentan un comportamiento superparamagnético.

1.2.3.1 Superparamagnetismo

Cuando las nanopartículas de óxido de hierro como la magnetita (Fe_3O_4) son suficientemente pequeñas, presentan a temperatura ambiente un comportamiento magnético. Para entender el origen de este fenómeno, sus características y su utilidad en los sistemas de acarreo de fármacos, se debe tener un conocimiento básico acerca de los fenómenos físicos involucrados como son: la formación de dominios magnéticos, la estructura monodominio magnética de las nanopartículas y la activación térmica. En esta sección nos limitaremos a hacer una descripción muy breve del comportamiento superparamagnético. No obstante, en el apéndice A de esta tesis se presentan con mayor detalle varios conceptos básicos relacionados con la física de los materiales magnéticos, esenciales para comprender el fenómeno del superparamagnetismo y de las partículas de óxido de hierro con estas propiedades, también llamadas SPION, que resulta del acrónimo inglés *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles*.

A temperatura ambiente y en ausencia de campos magnéticos, el momento magnético de una partícula superparamagnética oscila muy rápidamente en todas las direcciones debido a la agitación térmica, de este modo, la magnetización neta del material es nula. Sin embargo, si se aplica un campo magnético, H , el momento magnético de cada nanopartícula tiende a alinearse en la dirección de H , y las vibraciones del momento magnético de cada nanopartícula se van reduciendo si la intensidad del campo es aumentada. De esta forma, la magnetización del material aumenta linealmente con H de forma similar a como ocurre en las sustancias paramagnéticas. Esta respuesta lineal, junto a su reducido tamaño, convierten a las nanopartículas superparamagnéticas en excelentes vectores de transporte de agentes terapéuticos dado que se pueden dispersar fácilmente en una suspensión coloidal y se pueden dirigir con la aplicación de un campo magnético externo.

El paramagnetismo es la tendencia de los momentos magnéticos de los espines electrónicos de los átomos a orientarse paralelamente a un campo magnético aplicado. Si estos momentos magnéticos están fuertemente acoplados entre sí, el fenómeno que se presenta se denomina ferromagnetismo (ver figura 1.6).

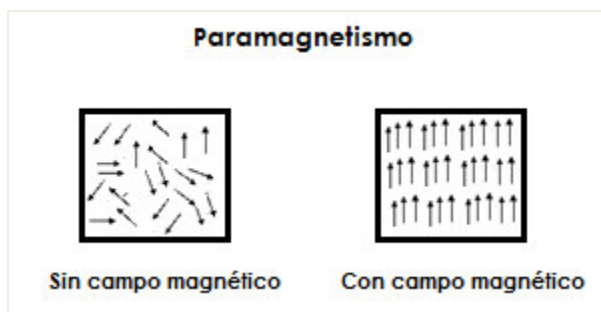


Figura 1.6. Fenómeno de Paramagnetismo en el cual las flechas indican la orientación de los espines electrónicos y la facilidad que estos presentan para orientarse paralelamente en presencia de un campo magnético externo.

En los materiales ferromagnéticos, cada campo magnético de origen atómico es producido por un dipolo o un momento magnético y cada uno está ordenado con los otros, o sea, todos permanecen perfectamente orientados y unidos por una fuerza cohesiva en regiones denominadas dominios magnéticos. Si se quiere cambiar la dirección de uno de los dipolos, los restantes tratarán de mantenerlo en su posición. Esta fuerza o unión juega un papel importante entre los dipolos obligándolos a que actúen en forma cooperativa (Sánchez y Zysler, 2005).

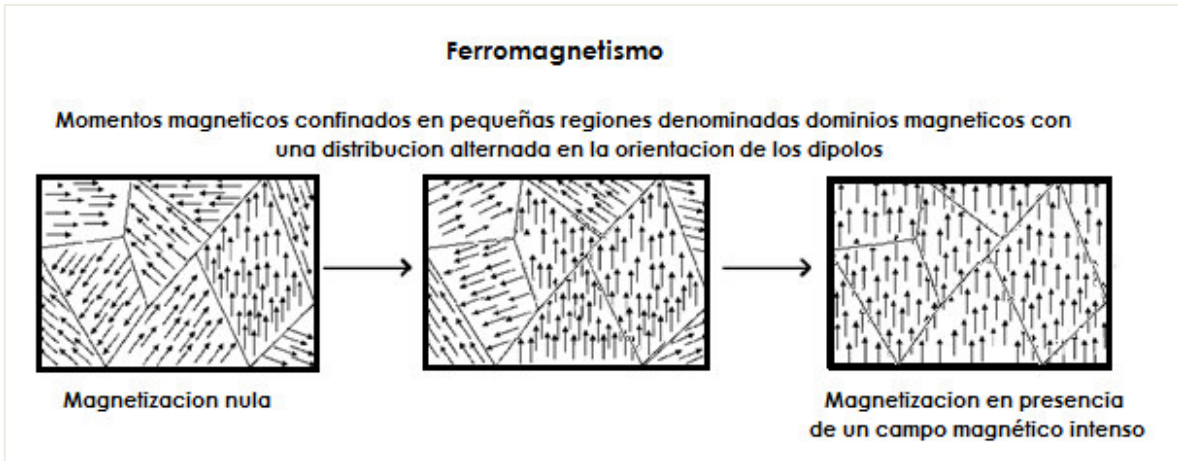


Figura 1.7. Fenómeno del ferromagnetismo. Las propiedades paramagnéticas de los átomos individuales son aplicadas a materiales de mayor tamaño, estos presentan en su interior grupos de átomos con momentos magnéticos orientados en la misma dirección actuando de forma cooperativa.

En la figura 1.7 se puede observar que los dominios magnéticos están separados por las llamadas paredes de dominio, en las cuales se produce la transición en la orientación de los dipolos, dependiendo de la composición de los materiales ferromagnéticos la anchura de la pared de dominio es variable, por lo tanto, se puede suponer que partículas con tamaños inferiores a sus paredes de dominio no tienen el volumen requerido para presentar pared de dominio o estructura de dominios. Con lo cual el superparamagnetismo ocurre cuando estos dominios contienen regiones de spines de electrones no apareados suficientemente grandes para ser considerados termodinámicamente independientes, a esto se le conoce como monodominio de partículas (Wang *et al.* 2001).

Este dominio magnético tiene un dipolo magnético neto que es mayor a la suma de los dipolos producidos por los espines de los electrones no apareados individualmente. En ausencia de un campo magnético aplicado, estos dominios son libres para rotar con un movimiento térmico y están orientadas al azar sin un campo magnético neto.

Un campo magnético externo puede hacer que los dipolos magnéticos de los dominios magnéticos se reorienten, de forma análoga a los materiales paramagnéticos; solo que en éstos el momento magnético de sus dominios es menor, con lo cual, la susceptibilidad magnética de las partículas superparamagnéticas es significativamente superior a la de sus correspondientes especies paramagnéticas solubles debido a este reordenamiento magnético (Wang *et al.* 2011).

En el caso de un fluido magnético, las partículas ferromagnéticas se encuentran dispersas en el medio líquido en forma de coloide. En estas condiciones el regreso del equilibrio de magnetización es determinado por dos diferentes procesos; el primero es un proceso de relajación de Néel y el segundo el de relajación Browniana (Laurent *et al.* 2008). Estos fenómenos de relajación son los que producen el movimiento térmico y la orientación al azar en ausencia de un campo magnético aplicado (Figura 1.8).

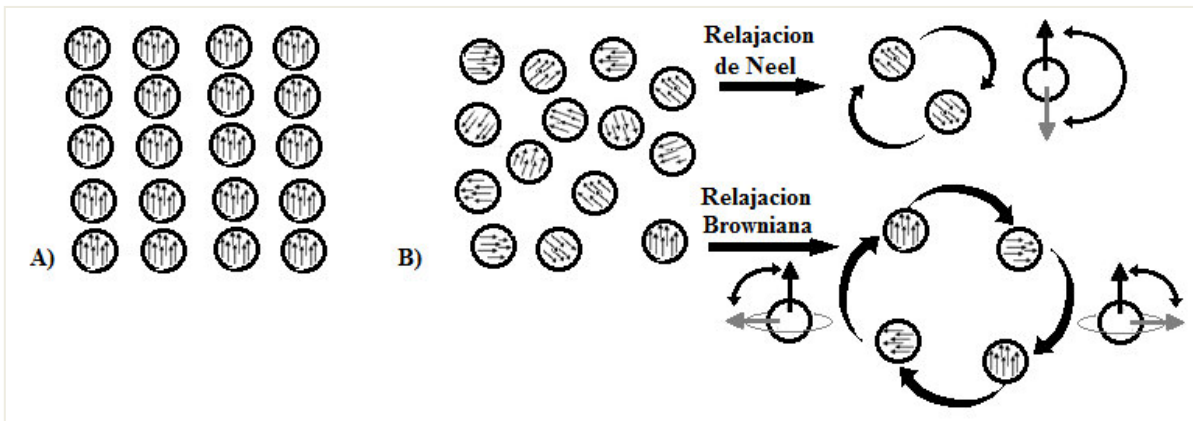


Figura 1.8. Tipos de relajación que presentan las SPION. A) partículas orientadas en presencia de un campo magnético externo, B) al retirar el campo magnético el tiempo de relajación es muy corto y los fenómenos que interfieren en el proceso de relajación influyen en el movimiento que estas presentan

Las nanopartículas superparamagnéticas carecen de magnetización remanente, cuando el campo magnético externo llega a su fin, el momento magnético de los dominios magnéticos individuales pierden la orientación colectiva con lo cual el momento magnético neto se convierte en cero. Esto significa que las SPION no se auto-agregan debido a la atracción magnética (Wang *et al.* 2001).

La notable respuesta de las SPION a una densidad de flujo magnético, es decir, la generación de un gran momento magnético en presencia de un campo magnético externo; permite la orientación y la retención de concentraciones a niveles significativas en el lugar deseado (Gupta y Wells, 2004).

1.2.4 Transporte intratumoral de Nanopartículas

Uno de los principales aspectos a considerar en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos está relacionado con el transporte de oxígeno en el organismo, el cual debe ser distribuido por la sangre a todas las células del cuerpo, estas células necesitan estar localizadas entre 100 a 200 μm de un vaso sanguíneo para poder sobrevivir, por lo tanto si un grupo de células tumorales necesita evadir la inanición, requieren promover el proceso normal de la angiogénesis para formar su propia fuente sanguínea mediante el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos y así, superar la falta de distribución de oxígeno y de nutrientes y evadir una muerte certera. Esta actividad de la angiogénesis conduce a la neo-vascularización del tumor dando como resultado su crecimiento rápido. Los sistemas de acarreo de fármacos utilizan esta neo-vascularización para poder penetrar en el interior del tejido tumoral y así aumentar la disposición de este a las células dañadas y favorecer su muerte (Martínez-Ezquerro y Herrera, 2006). Para sistemas de acarreo de fármacos, se requiere que las nanopartículas circulen por un largo tiempo sin ocluir las arterias, venas o capilares, además, los componentes físicos deben ser no tóxicos, biocompatibles, biodegradables y compatibles en los aspectos relacionados al medicamento a administrar (Arshady *et al.* 1999).

Específicamente para sistemas de liberación de fármacos antineoplásicos, es preferible optar por partículas que tengan un núcleo magnético y un recubrimiento

polimérico biodegradable en el cual se encuentre incorporado el fármaco, esto es, para favorecer el efecto farmacológico en el tejido diana.

1.2.5 Magnetita como Núcleo Magnético

La magnetita es una ferrita de hierro con la fórmula general Fe_3O_4 y una red cristalina de tipo espinela invertida. La estructura del cristal octaédrico es un rasgo característico de la magnetita. En la estructura de la espinela invertida, los sitios tetraédricos están ocupados por iones Fe^{+3} y los sitios octaédricos son compartidos por cantidades iguales de iones Fe^{+2} y Fe^{+3} (Silva-Freitas *et al.* 2011).

Las propiedades magnéticas de las nanopartículas son determinadas por muchos factores, los principales son: la composición química, el tipo y el grado de arreglo estructural de la red cristalina, el tamaño y la forma (estructura de las partículas no homogéneas); la interacción de las partículas con la matriz que las rodea y las partículas vecinas (Gubin *et al.* 2005).

Cualquier sustitución catiónica, además del tamaño de la partícula, hace variar la coercitividad, es decir, la fuerza magnética de la magnetita. Mientras que las partículas entre ~35-120 nm son de dominio único magnético (SMD, es decir, cada partícula se comporta como un imán), las partículas inferiores a 35 nm son superparamagnéticas a temperatura ambiente (no tienen magnetismo permanente a temperatura ambiente). Las que superan los 120 nm presentan un magnetismo

más débil, ya que al presentar varios dominios magnéticos en una misma partícula se anulan entre sí (Pérez *et al.*, 2010).

La distribución e internalización de las partículas de óxido de hierro en el organismo está ligada fuertemente al tamaño que estas presenten. Después de la administración, las partículas con un diámetro mayor a 200 nm son fácilmente secuestradas por el bazo y eventualmente removidas del organismo mediante un proceso de fagocitosis. Las pequeñas partículas con diámetros inferiores a 10 nm se eliminan rápidamente a través de extravasación y aclaramiento o depuración renal. Las partículas cuyo diámetro oscila entre los 10 hasta los 100 nm son las más adecuadas para ser inyectadas vía intravenosa y las que se mantienen por un mayor tiempo en el sistema circulatorio sanguíneo. Estas partículas son lo suficientemente pequeñas como para evadir el Sistema Fagocítico Mononuclear (antes SRE) del cuerpo, así como para penetrar en los pequeños capilares de los tejidos ofreciendo una mayor eficiencia de distribución en tejidos específicos (Laurent *et al.* 2008).

Después de la liberación de la sustancia activa, los cristales de óxido de hierro son susceptibles a la degradación, así, el metabolismo lixiviará el Fe^{+2} contenido en los cristales, el cual circulará en el torrente sanguíneo como un micronutriente (Misra, 2008). El hierro circulante será captado por las células y en el interior del citoplasma, la ceruloplasmina (endoxidasa I) oxida el hierro ferroso a férrico para que sea captado por la apotransferrina. El hierro que excede la

capacidad de transporte intracelular es depositado como ferritina (Forrellat *et al.*, 2000).

Puede considerarse que el hierro en el organismo se encuentra formado parte de dos compartimientos: uno funcional, formado por los numerosos compuestos, entre los que se incluyen la hemoglobina, la mioglobina, la transferrina y las enzimas que requieren el hierro como cofactor o como grupo prostético, ya sea en forma iónica o como grupo hemo, y el compartimiento de depósito, constituido por ferritina y la hemosiderina, que constituyen las reservas corporales de este metal. En individuos con estado nutricional óptimo alrededor del 65% del hierro se encuentra formando parte de la hemoglobina, el 15% está contenido en las enzimas y la mioglobina, el 20% como hierro de depósito y solo entre el 0.1 y 0.2% se encuentra unido a la transferrina como hierro circulante (Forrellat *et al.*, 2000).

1.3 Antecedentes.

En las últimas décadas diversas investigaciones han estado encaminadas en la generación de nuevas moléculas con actividad biológica, las cuales, presentan actividad anticancerígena frente a diversas líneas de tejido tumoral, obteniendo resultados favorables en experimentación *in-vitro*, sin embargo, algunas de estas moléculas presentan una masa molecular alta, así como un Log P elevado, los cuales son factores que contribuyen a la baja o nula solubilidad de estos compuestos en los solventes comúnmente empleados, tal como sucede con fármacos antineoplásicos de uso clínico como el paclitaxel y sus derivados.

El Paclitaxel es un fármaco antineoplásico del grupo de los antimetabólicos, identificado y extraído inicialmente a partir de la corteza del árbol del tejo (*Taxus brevifolia*); cuenta con una estructura química muy compleja en la que destaca un esqueleto hidrocarbonado formado por tres ciclos de 6, 8 y 6 carbonos polisustituido con cuatro metilos y ocho funciones oxigenadas (entre ellas, una β -fenilisosserina que esterifica la posición C-13). La molécula de paclitaxel posee un total de once estereocentros y puede observarse en la figura 1.9.

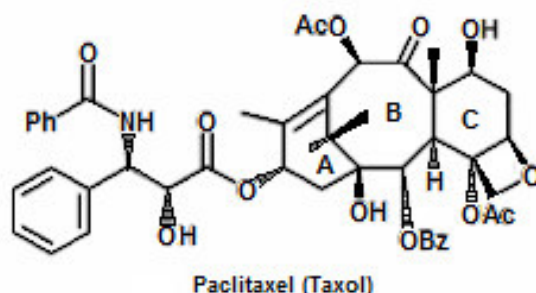


Figura 1.9. Estructura química del Paclitaxel; (A, B, C) muestran el anillo complejo de taxano como núcleo de la molécula; cuenta con una fórmula molecular de $C_{47}H_{51}NO_{14}$ y un peso molecular de 853.92. Tomado de (Guo *et al.*, 2006).

El Paclitaxel es un fármaco utilizado para el tratamiento de cáncer de seno, ovario y pulmón. Actúa uniéndose a la subunidad de β -tubulina de los microtúbulos, promoviendo la polimerización y la inapropiada estabilización de éstos. Este mecanismo de acción provoca que las células se bloqueen en la fase G_2-M del ciclo celular, lo cual conduce a la muerte celular. La dosis usual es de $135-137 \text{ mg/m}^2$ vía intravenosa cada 3 semanas, la infusión convencional es formulada en un vehículo de etanol al 50% y aceite de castor polietoxilado al 50% comercialmente conocido como “*Cremophor EL*” esto para superar el problema de la pobre solubilidad en agua. (Brahmachari *et al.*, 2011)

Enfocado en este tema, en 2004, Rabinow realiza una revisión en la cual establece que un gran porcentaje de nuevas moléculas que surgen de los programas de descubrimiento de fármacos, son insolubles en agua, y por lo tanto presentan una pobre biodisponibilidad (dosis del fármaco que alcanza su diana terapéutica), lo que lleva a abandonar los esfuerzos en el desarrollo potencial de las mismas.

Los enfoques convencionales a menudo tratan de solubilizar fármacos insolubles con el uso de cantidades excesivas de co-solventes, pero esto plantea problemas de toxicidad. Por lo tanto, el objetivo de las investigaciones debiese estar encaminado en el mejoramiento de las formas de dosificación y administración de fármacos, para tratar de resolver los problemas de toxicidad correspondientes a los vehículos empleados.

Rabinow destaca que, la generación de nanosuspensiones puede ser la solución para la administración de aquellos fármacos que presentan una baja solubilidad en agua pero una alta solubilidad en lípidos, así como los que son insolubles tanto en agua como en lípidos. Para ello expone diferentes técnicas de generación de nanosuspensiones así como los criterios a considerar en el empleo de tensoactivos no-iónicos para la formación de nanosuspensiones estables.

Sin embargo, si enfocamos nuestra atención específicamente a fármacos antineoplásicos insolubles, la generación de nanosuspensiones resuelve el inconveniente asociado a la administración, pero no presenta solución alguna en lo concerniente a la especificidad del fármaco, para ello, sistemas de acarreo de fármacos basados en nanopartículas magnéticas representan una solución factible al problema de la acción loco regional.

HIPÓTESIS y OBJETIVOS

1.4 Hipótesis

La aplicación de un campo magnético externo permite dirigir la difusión de complejos partícula-droga en un modelo tisular de células neoplásicas en cultivo.

1.5 Objetivo general

Determinar la capacidad de difusión de un complejo nanopartícula-droga por efecto de campos magnéticos a través de modelo tisular de células neoplásicas en cultivo.

1.6 Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de magnetita mediante la técnica de Massart.
- Caracterizar las nanopartículas obtenidas.
- Integrar complejos Partícula-Paclitaxel.
- Determinar la capacidad de integración Partícula-Paclitaxel.
- Determinar la capacidad de difusión dirigida por campos magnéticos externos de los complejos Partícula-Paclitaxel.
- Evaluar citotoxicidad de los complejos Partícula-Paclitaxel en bioensayos.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Diseño de nanopartículas con propiedades magnéticas

2.1.1 Síntesis de Magnetita

La síntesis de magnetita (Fe_3O_4), se realizó partiendo de soluciones sobresaturadas de Fe^{+2} y Fe^{+3} en una relación molar 1:2 en presencia de una base fuerte (NH_4OH) y a una temperatura constante de $80\text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 2.1). Esta síntesis es una modificación de la realizada por Massart, (1981).

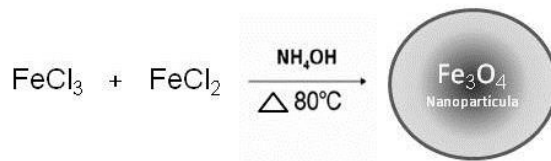


Figura 2.1. Reacción simplificada no balanceada de la síntesis de magnetita.

REACTIVOS:

- ✓ Cloruro ferroso Tetra hidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
BAKER ANALIZED (2064-01) Lote: E117267W
- ✓ Cloruro férrico anhidro (FeCl_3)
ALDRICH (15,774-0) Lote: S29384-175
- ✓ Hidróxido de amonio (NH_4OH)
CTR (03008) Lote: 56SNNH4-231207
- ✓ Agua destilada (H_2O)
CTR (00082) Lote: 43RM1988-1
- ✓ Alcohol Etílico ($\text{CH}_3 \text{CH}_2 \text{OH}$)
CTR (01180) Lote: 42TM1003085261
- ✓ Hexano (C_6H_{14})
CTR (02944) Lote: 15SN16112101
- ✓ Ácido Oleico N.F. ($\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$)
CTR (131820) Lote: 14GNUUC070A

PROCEDIMIENTO:

1. Se llevó a $80 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ en una plancha con agitación magnética 20 ml de agua destilada en un vaso de precipitado de 50 ml con agitación leve.
2. Se pesaron las siguientes cantidades de reactivos: 1.62 g FeCl_3 anhidro, 0.99 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y se disolvieron en 10 ml de agua a 80°C por 5 min. o hasta disolución completa.
3. Se agregaron 7.5 ml de NH_4OH 14M y se procedió a aumentar la agitación a una intensidad moderada.
4. Se deja la mezcla a reaccionar a la temperatura establecida por un periodo de 20 min. Transcurrido el tiempo se retira de la plancha y se deja enfriar.

5. Se procede a recolectar la magnetita obtenida mediante arrastre y decantación magnética empleando un imán redondo de neodimio con una intensidad de 3800 gauss, se lava 1 vez con agua destilada y dos veces con etanol. La muestra obtenida se resuspende en etanol y se conserva para su posterior análisis y caracterización.

2.1.2 Estabilización y uniformidad de tamaño

Una de las etapas importantes en la síntesis de magnetita como sistema de acarreo de fármacos es encontrar el medio de soporte adecuado para la droga seleccionada, puesto que el Paclitaxel es una droga antineoplásica con una baja solubilidad en agua, se propone generar un sitio de anclaje mediante la adición de un ácido graso de cadena larga como el ácido oleico, el cual ha sido utilizado en diferentes investigaciones (Forrellat, *et al.*, 2000; Rabinow, 2004; Chorny, 2010;) esto favorece la estabilización del coloide mediante impedimento estérico (Tapan, 2005) y al dejar expuesta la cadena hidrocarbonada en el exterior de la micela, el fármaco insoluble en agua encuentra porciones hidrocarbonadas para generar anclaje mediante fuerzas de Van der Waals.

PROCEDIMIENTO:

1. Se llevó a $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ en una plancha con agitación magnética 20 ml de agua destilada en un vaso de precipitado de 50 ml con agitación leve.

2. Se pesaron las siguientes cantidades de reactivos: 1.62 g FeCl_3 anhidro, 0.99 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y se disolvieron en 20 ml de agua a 80°C por 5 min. o hasta disolución completa.
3. Se adicionaron 4 ml de ácido oleico y se mantuvo en agitación moderada por 5min. posteriormente se agregaron 7.5 ml de NH_4OH 14M.
4. Se deja la mezcla a reaccionar a la temperatura establecida por un periodo de 20 min. con una agitación de moderada a intensa. Transcurrido el tiempo se retira de la plancha y se deja enfriar.
5. El producto obtenido es de consistencia pastosa a plástica y se observa la separación del producto y el medio de reacción.
6. Se procede a recuperar la magnetita recubierta con ácido oleico retirando primero el medio de reacción por decantación simple y posteriormente se adiciona etanol al residuo para generar una suspensión, mediante la aplicación de un campo magnético utilizando un imán redondo de neodimio con una intensidad de 3800 gauss, se concentra el residuo recuperando el producto y decantando el etanol, este procedimiento se repite 3 veces para retirar el exceso de sales y ácido oleico.
7. Se retira el exceso de etanol y agua que pudiese contener el producto y se resuspende en Hexano, con lo cual se obtiene un ferro-fluido de una coloración café intenso.

Para establecer las condiciones de reacción que proporcionen las características óptimas en el tamaño de partícula, se modificó el procedimiento de

síntesis variando únicamente el momento de adición de ácido oleico tal como se indica en la tabla 2.1.

Tabla 2.1. Modificaciones en la reacción de síntesis de nanopartículas de magnetita.

Experimento	Volumen medio de reacción	Cantidad de NH_4OH 14M	Cantidad de Acido oleico	Adición de acido oleico en la Rx.
#4	20ml Agua	7.5ml	4ml	Antes de la Rx.
#5	20ml Agua	7.5ml	4ml	2 min de Rx.
#6	20ml Agua	7.5ml	4ml	Después Rx.

Las muestras fueron analizadas mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y se evaluó, distribución de tamaño, uniformidad y eficiencia de recubrimiento.

2.1.3. Estandarización

El procedimiento establecido en el punto 2.1.2 con la modificación correspondiente de acuerdo a los resultados obtenidos en la distribución de tamaño (sea añadir el ácido oleico antes, durante o después de la reacción), se repitió bajo las mismas condiciones por triplicado con el fin de obtener la cantidad en peso del producto de síntesis.

La suspensión obtenida en hexano para cada repetición se sometió al siguiente procedimiento:

1. Se pesaron 3 frascos y se colocó dentro de cada uno la suspensión de hexano obtenida en cada reacción.
2. Se colocó un adaptador en la parte superior de cada frasco y se eliminó el hexano presente mediante evaporación con rotación a una temperatura de 26°C por un periodo de 1 hora.
3. Los frascos libres de hexano fueron pesados y por diferencia de peso se determinó la cantidad de producto presente.
4. El resultado obtenido se usa para ajustar la reacción en relación a la cantidad de fármaco que se desea adicionar.

2.2 Formación de complejo Partícula-Droga

2.2.1 Recubrimiento Polimérico

Los polímeros anfifílicos son capaces de formar complejos y solubilizar diferentes clases de moléculas (medicamentos, sondas fluorescentes y fotosensibilizadores) empleadas para múltiples propósitos. Entre los polímeros anfifílicos menos tóxicos están los copolímeros en bloques ternarios óxido de etileno (A) y óxido de propileno (B) del tipo A-B-A (Pluronic) (Shatalova *et al.*, 2008).

El polímero Pluronic[®] F-127 es un surfactante polirol no iónico (con un peso molecular de 12,500 Daltons) el cual es muy utilizado para facilitar la solubilización de colorantes insolubles en agua, formación de dispersiones homogéneas de partículas insolubles, así como de otras sustancias con el propósito de obtener suspensiones o dispersiones homogéneas en medios acuosos o medios fisiológicos (ver Figura 2.2).

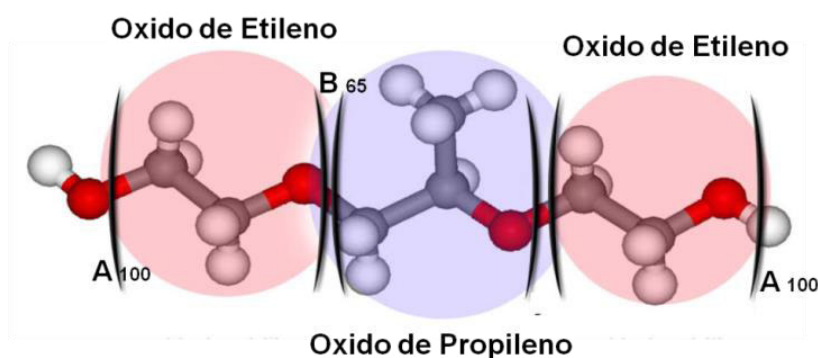


Figura 2.2. Estructura condensada del Pluronic[®] F-127. Adaptado de (Batrakova & Kabanov, 2008)

REACTIVOS:

- ✓ Pluronic[®] F-127 ($C_3H_6O.C_2H_4O$)_x
SIGMA-ALDRICH (9003-11-6) Lote: 119K0073

- ✓ Paclitaxel ($C_{47}H_{51}NO_{14}$)
MP Biomedicals, LLC (193532) Lote: 5398K

En procedimientos anteriores se generaron partículas con un recubrimiento de ácido oleico en la superficie, posterior a su análisis, se determinó en que etapa de la reacción es adecuado adicionar el ácido oleico para una distribución de tamaño homogénea, se determinó la cantidad de producto generado y se ajustó la concentración de reactivos para obtener 1 gramo de partículas recubiertas con ácido oleico.

Partiendo de estas concentraciones se decide incluir en la síntesis en una sola etapa el polímero, para lograr estabilizar las partículas con ácido oleico y así favorecer la solubilidad de estas en solución acuosa.

PROCEDIMIENTO:

1. Llevar a $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, en una plancha con agitación magnética, 12 ml de agua destilada en un vaso de precipitado de 50 ml con agitación leve.
2. Añadir los siguientes cantidades de reactivos: 1.00 g FeCl_3 anhidro, 0.60 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ hasta disolución completa.
3. Añadir 3 ml de ácido oleico y mantener en agitación moderada por 5 min. Posteriormente adicionar 4 ml de NH_4OH 14M.
4. Dejar reaccionar a la temperatura establecida por un periodo de 2 min con una agitación de moderada a intensa.
5. Adicionar 2 volúmenes de agua destilada de 7.5 ml cada uno a 80°C . Dejar reaccionar por un lapso de tiempo aproximado de 5.

6. Se agregan a la suspensión 2 g de Pluronic[®] F-127 removiendo los residuos de polímero que hayan quedado adheridos en el vaso de precipitado y adicionar ~5 ml de agua destilada a 80°C.
7. La mezcla se deja reaccionar por 10 min, se retira de la plancha y se deja enfriar a temperatura ambiente.
8. El producto se diluye con 120 ml de agua destilada a 80°C, se homogeniza en baño sónico por un periodo de 20 min. Se almacena en refrigeración para su posterior lavado y caracterización.

2.2.2 Complejo Partícula-Droga

A continuación se presenta el procedimiento para la obtención de los Complejo Partícula-Droga. El esquema de la figura 2.3 resume este proceso.

PROCEDIMIENTO:

1. Se llevó a 80 °C \pm 3°C, en una plancha con agitación magnética, 12 ml de agua destilada en un vaso de precipitado de 50 ml con agitación leve.
2. Se pesaron las siguientes cantidades de reactivos: 1.00 g FeCl₃ anhidro, 0.60 g FeCl₂ • 4H₂O y se disolvieron en 12 ml de agua a 80°C por 5 min ó hasta disolución completa.
3. Se adicionaron 3 ml de ácido oleico y se mantuvo en agitación moderada por 5 min posteriormente se agregaron 4 ml de NH₄OH 14M.
4. Se deja la mezcla a reaccionar a la temperatura establecida por un periodo de 2 min con una agitación de moderada a intensa.

5. Adicionar 2 volúmenes de 7.5 ml de agua destilada a 80°C, en este punto se incorporan 5 mg de Paclitaxel en polvo, se mantiene la agitación por 5 min para homogenizar la muestra y que el fármaco se incorpore en la superficie de la partícula.
6. Se agregan a la suspensión 2 gr de Pluronic® F-127 removiendo los residuos de polímero que hayan quedado adheridos en el vaso de precipitado y adicionar ~5 ml de agua destilada a 80°C.
7. La mezcla se deja reaccionar por 10 min. Se retira de la plancha y se deja enfriar a temperatura ambiente.
8. El producto se diluye con 120 ml de agua destilada, se homogeniza en baño sónico por 20 min y se almacena en refrigeración para su posterior lavado y caracterización.

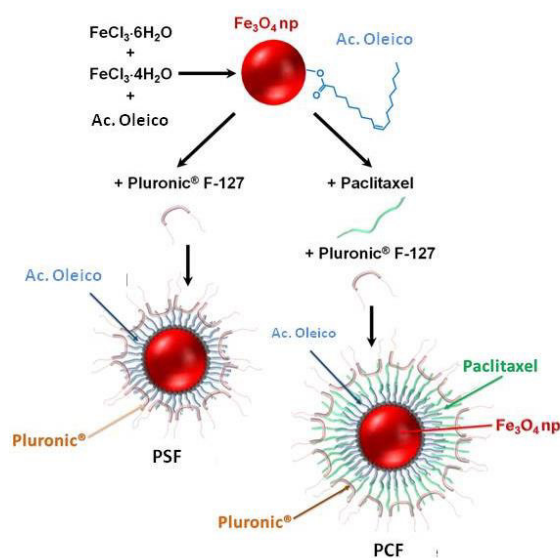


Figura 2.3. Esquema de integración del Complejo Partícula-Droga. Obtención de nanopartículas (np) de magnetita sin fármaco (PSF) funcionalizadas ácido oleico y Pluronic® F-127. La adición del fármaco Paclitaxel acoplado a este ensamblaje genera las partículas con fármaco (PCF).

2.2.3 Lavado de partículas

Los productos obtenidos de PCF (Partículas Con Fármaco) y PSF (Partículas Sin Fármaco) son sometidos a múltiples lavados mediante centrifugación y decantación, empleando una centrifuga Eppendorf modelo 5810R con rotor de ángulo fijo a 12000 rpm en tubos de policarbonato (Nalgene®).

Las muestras diluidas y homogenizadas son distribuidas en cada tubo previamente etiquetado (PCF ó PSF), en volúmenes aproximados de 60 ml, los tubos se equilibran igualando los pesos, se centrifugan a 12000 rpm a 28°C por 4 horas, se retira la mayor parte del sobrenadante dejando 10 ml aprox. procurando no arrastrar el precipitado. Se resuspende el precipitado empleando una solución de PBS/Pluronic (PBS1x–Pluronic® 1%) y homogenizando por 10 min. en baño sónico. Se repite el proceso de lavado en las condiciones establecidas, el precipitado se resuspende con PBS/Pluronic (PBS1x–Pluronic® 3%) y es homogenizado de igual manera. En la última etapa de lavado el tiempo de centrifugación se extiende de 4 a 5 h, al precipitado se le adicionan 7 ml de PBS/Pluronic (PBS1x–Pluronic® 3%), se homogenizan en baño sónico por un

periodo de 20 min, ambas muestras se filtran empleando filtros para jeringa Whatman® (GD/X, nylon ,25 mm diámetro, 0.45 µm tamaño de poro).

El volumen obtenido se dividió en dos fracciones iguales, la primera se estandarizó (se cuantificó peso de las partículas y concentración de fármaco presente) y se empleó para realizar pruebas biológicas así como experimentos de migración y localización magnética. La segunda fracción se empleó para la caracterización de las nanopartículas empleando técnicas como: Espectroscopía de Infrarrojo con Transformadas de Fourier (FTIR), Análisis Termogravimétrico (TGA), Difracción de Rayos X (DRX), Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM), Difracción de Electrones (ED) y propiedades magnéticas empleando magnetómetro SQUID. Ambas fracciones fueron conservadas en solución y almacenadas en refrigeración a 4 °C durante el tiempo que duraron los ensayos.

2.3. Caracterización

2.3.1 Estandarización de las soluciones de trabajo

Con el propósito de poder establecer concentraciones de manera más precisa en forma de dosificaciones en el apartado de pruebas biológicas se estableció la concentración de partículas presentes en la solución determinando el peso seco de cada preparación.

Se emplearon tubos eppendorf con capacidad de 1.5 ml, los cuales se llevaron a peso constante empleando una balanza analítica (AND), en estufa de vacío (SQUAROID) a 70°C, 15 inHg, por periodos de 1 hora. De las soluciones de trabajo previamente filtradas y homogenizadas se dispensaron en cada tubo 100 µl de PCF y PSF por triplicado, se llevaron a congelación por 24 h y se liofilizaron a -53°C a una presión de 1.95×10^{-3} mbar por 48 horas. Terminado el proceso de liofilización los tubos son llevados a peso constante en las condiciones antes descritas, los datos fueron registrados y analizados para determinar la concentración de partículas en µg/µl.

2.3.2 Difracción de Rayos X

Esta técnica de caracterización se empleó para identificar la fase cristalina de las nanopartículas sintetizadas, y el tamaño promedio de cristal, es decir, la región de coherencia cristalina promedio, D , a lo largo de una dirección perpendicular al plano de reflexión de la radiación. Este parámetro, se estimó a partir del ancho de los picos más intensos aplicando la ecuación (1) de Scherrer (B. D. Cullity y S. R. Stock, "Elements of X-ray diffraction" Prentice may, New Jersey, 2001).

$$D = \frac{k\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (1)$$

donde λ es la longitud de onda de la radiación, θ es el ángulo de reflexión de Bragg para el que se encontró la máxima intensidad en el pico de difracción y k es una constante que depende de la forma de los cristales, cuyo valor generalmente está comprendido entre 0.9 y 1. En casos nanocristalinos como el nuestro se suele considerar $k = 0.91$ (N. E. Fenineche, R. Hamzaoui y O. El Kedim. Materials Letters 57 (2003) 4165).

En la investigación presente se empleó un difractómetro Epyrean de la marca PANalytical, que cuenta con un detector XCellerator el cual permite registrar una gran cantidad de cuentas en tiempos de análisis cortos. Las muestras en forma de polvo fino se depositaron sobre un substrato plano y fueron expuestas a una radiación monocromática $K\alpha$ de cobre ($\lambda = 1.54060 \text{ \AA}$), la cual, al incidir en el material sólido es dispersada a causa de los electrones asociados a los átomos o iones ordenados en los cristales, originando así patrones característicos de difracción para cada muestra cristalina. Los datos son representados gráficamente en un espectro de difracción (Ángulo de difracción 2θ vs Intensidad).

2.3.3. Microscopía Electrónica de Transmisión

La microscopía electrónica de transmisión emplea como principio básico la dualidad onda-partícula de un haz de electrones, el cual, es condensado y dirigido a la muestra empleando un sistema de lentes electromagnéticas. El haz de electrones incidentes atraviesa la muestra *in-situ*, con lo cual la sombra de

detalles finos o ultra-estructura es capturada y mostrada en una pantalla; así los fenómenos físicos inducidos por el recorrido del haz de electrones (transmisión y dispersión de electrones elástica e inelásticamente, electrones retro-dispersados, secundarios y de Auger así como, emisión de Rayos X característicos, de frenado o bremsstrahlung y catodoluminiscencia), dan como resultado la posibilidad de caracterizar las propiedades físicas de nanoestructuras individuales (Wang Z. L., 2000).

En esta investigación se empleó un microscopio de transmisión TITAN 80-300 kV de la marca FEI para la determinación de las características morfológicas, micro estructurales y composición de las muestras obtenidas.

2.3.4 Propiedades Magnéticas

El comportamiento magnético de las muestras se estudió mediante un magnetómetro MPMS (Magnetic Property Measurement System) 7 Teslas de Quantum Design. (ver figura 2.4).



Figura 2.4. Ilustración del Magnetómetro de Quantum Design.

Para llevar a cabo estas medidas, se prepararon 28.8 mg de muestra en forma de polvo que fueron introducidos y compactados en una cápsula de gelatina, asegurando la inmovilización de la muestra dentro de la cápsula, la cual se fijó dentro de un porta-muestras. Posteriormente, tras ubicar la muestra en el centro de las bobinas superconductoras que generan el campo magnético excitador, se procedió a registrar la dependencia de la magnetización con la temperatura enfriando la muestra en ausencia o en presencia de un campo magnético externo. En la bibliografía estas curvas se denominan *curvas de enfriamiento sin campo y con campo*, o con los términos en inglés “*Zero Field Cooling (ZFC)*” y “*Field Cooling (FC)*”.

En particular, la transición ferromagnetismo-superparamagnetismo se manifiesta en estas curvas mediante la aparición de propiedades irreversibles. Analizado este tipo de propiedades se puede extraer información sobre la distribución de barreras de energía magnética y la distribución de volúmenes relacionada junto al posible efecto de interacciones entre partículas (J. L. Dormann, D. Fiorani y E. Tronc. “*Advances in Chemical Physics*”, Vol. XCVII, EDs. I. Prigogine y Stuart A. Rice, John Wiley and Sons (1997) 283.). Para obtener estas curvas experimentales primero se enfrió la muestra desde temperatura del cuerpo humano, 310 K, hasta alcanzar 1.8K sin aplicar campo magnético alguno sobre la muestra. Una vez enfriada, se aplicó un campo de 100 Oe. Después, y en presencia de este mismo campo, se calentó la muestra hasta alcanzar de nuevo la temperatura inicial, registrando en este proceso los valores de la magnetización, M , en función de la temperatura.

La curva obtenida es la denominada *curva de enfriamiento sin campo* o simplemente *curva ZFC*. Sin dejar de aplicar el campo de 100 Oe, se enfrió de nuevo la muestra hasta llegar 1.8 K. La dependencia de la magnetización en este último enfriamiento es la denominada *curva de enfriamiento con campo* o simplemente *curva FC*. Para adquirir mayor información acerca de la naturaleza magnética de las muestras, también se realizaron medidas de la dependencia de la magnetización con el campo aplicado (variando este desde +7 T a -7 T y de -7 T a +7T) fijando la temperatura a 310 K y 1.8 K. Esta última medida se obtuvo enfriando la muestra sin aplicar campos excitadores.

2.4 Pruebas Biológicas

2.4.1 Línea celular y medios de cultivo

La línea celular empleada en el desarrollo de esta tesis se encuentra caracterizada y pertenece a la colección de la *American Type Culture Collection* (ATCC). Datos relevantes acerca de esta línea celular se muestran en la tabla 2.2.

Tabla 2.2. Línea celular neoplásica ATCC.

Línea Celular	ATCC No.	Organismo	Tejido	Morfología	Medio de Cultivo
A-431	CRL1555 (Adherentes)	<i>Homo sapiens</i>	Carcinoma	Epitelial	MEM/DMEM 10% SBF

La línea celular empleada en cada uno de los ensayos fue cultivada en condiciones optimas para su desarrollo, es decir, las células se mantuvieron a una temperatura de 37°C, humedad relativa de ≈82%, atmósfera de 95% aire y 5% CO₂ en una incubadora con atmósfera de CO₂ (Shel Lab, TC2323). Se emplearon los medios de cultivo (GIBCO®) recomendados, suplementados con penicilina/estreptomicina (GIBCO®) y suero bovino fetal (SBF, GIBCO®). El mantenimiento de la línea celular empleada se realiza de acuerdo a la información proporcionada por la guía ATCC correspondiente.

2.4.2 Determinación de Citotoxicidad

2.4.2.1 Preparación de placas

Para determinar la citotoxicidad de las PCF y PSF se prepararon placas de cultivo de 24 pozos con células A-431 incubadas en condiciones óptimas de crecimiento. Alcanzado cerca del 100% de confluencia, las células fueron lavadas con PBS 1x y a cada pozo se adicionaron 500 µl de medio de cultivo; posteriormente se prepararon, empleando medio de cultivo MEM/DMEM, soluciones de partículas con una concentración final de 20 µg/µl. Se prepararon placas para PCF, PSF y muestras blanco, se dispensaron en cada pozo 30, 20, 10, 5, 2.5 y 1.25 µl de las soluciones de partículas, todas las preparaciones fueron incubadas por periodos de 24, 48 y 72 horas; al final de cada periodo de tiempo se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo del Rojo Neutro. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

2.4.2.2 Ensayo de Rojo Neutro

Este ensayo se basa en la detección de los daños que producen los compuestos tóxicos sobre la integridad de la membrana de los lisosomas en las células y sobre el control del flujo del colorante a través de la misma. La acumulación del Rojo Neutro ocurre por entrapamiento de la forma protonada del colorante dentro del ambiente ácido del lisosoma o por unión del Rojo Neutro a cargas ácidas fijas, tales como polisacáridos ácidos dentro de la matriz del lisosoma. Como respuesta se observa una disminución en la capacidad de las células para asimilar y retener al colorante Rojo Neutro en el interior de los lisosomas, la cual es indicadora de la viabilidad celular (Valdivieso-García, 1993).

Transcurrido el tiempo de tratamiento, los pozos de la placa fueron lavados tres veces con PBS 1x; se dispensaron 500 µl de una dilución MEM/Rojo Neutro a cada pozo e incubó por 1.5 horas. Transcurrido el tiempo se lavó nuevamente tres veces con PBS 1x, posteriormente se adicionan 500 µl de solución de destinción (1% Acido Acético, 49% Agua destilada, 50% Etanol 96°) homogenizando las muestras con movimientos rotatorios por 15 min. El procedimiento simplificado se muestra en la figura 2.5. La solución obtenida es cuantificada mediante técnica espectrofotométrica a 560 nm en un lector de placas GloMax® de Promega.

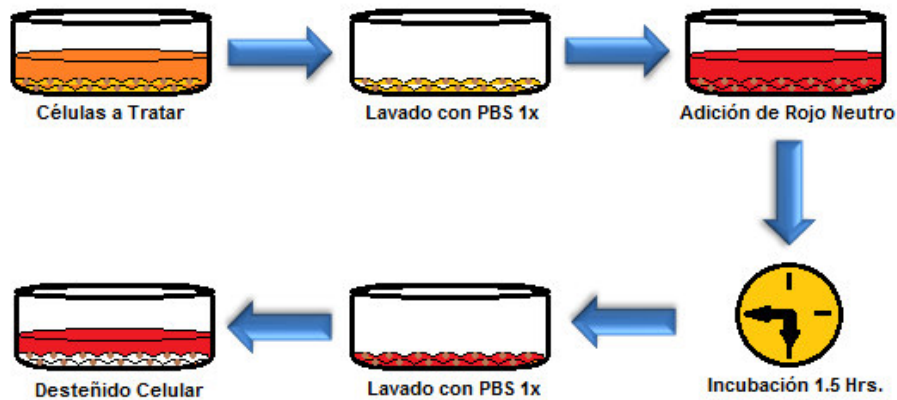


Figura 2.5. Técnica para viabilidad celular. Diagrama ilustrativo que muestra la secuencia de pasos a seguir en la técnica del Rojo Neutro, así como una representación grafica de las etapas específicas de captación y liberación del colorante.

2.4.3 Localización de nanopartículas empleando campos magnéticos

Para determinar la capacidad de localización del complejo Partícula-Droga, se prepararon placas de cultivo de 12 pozos con células A-431 incubadas en condiciones óptimas de crecimiento y con un volumen de medio de 1 ml por pozo. De igual manera se prepararon cultivos en monocapa en las canastillas con membrana porosa.

Con la finalidad de demostrar la facilidad de localización de las partículas así como evidenciar *in vitro*, que el fármaco se encuentra incorporado en la superficie de la partícula, se realizan cultivos en monocapa en dos niveles como se muestra en la figura 2.6.

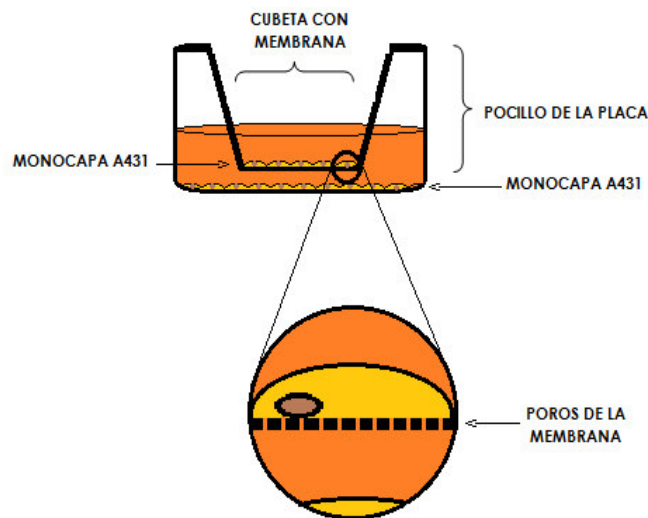


Figura 2.6. Cultivos en monocapa en dos niveles. Se muestra la disposición a dos niveles de cultivos en monocapa, se puede apreciar que el tamaño de poro permite el intercambio de nutrientes entre los dos niveles de cultivo.

Esta disposición permite localizar las partículas en la parte externa de la canastilla aplicando un campo magnético, o por el contrario, no aplicando el campo magnético externo con lo cual se favorecerá el intercambio de las partículas en los dos niveles del cultivo, provocando así el efecto tanto en el pozo de la placa, como en la canastilla de cada pozo.

Se dispensaron 40 μl de nanopartículas en cada pozo de una concentración de 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para obtener una concentración final en el pozo de 0.76 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de partículas dispersas en el medio. Para determinar la capacidad de localización se emplearon imanes redondos de neodimio con una intensidad de 3800 gauss, debajo de las placas correspondientes, la incubación se realizó bajo condiciones óptimas de crecimiento por un periodo de 48 horas. La tabla 2.3 muestra la disposición de las partículas en relación a la exposición a campos magnéticos externos. Los experimentos fueron realizados por triplicado bajo las mismas condiciones de exposición.

Tabla 2.3. Distribución de nanopartículas y campos magnéticos externos.

CON MAGNETISMO			
PCF/POZO	PCF/CANASTA	PSF/POZO	PSF/CANASTA
BLANCO			
SIN MAGNETISMO			
PCF/POZO	PCF/CANASTA	PSF/POZO	PSF/CANASTA

Transcurrido el tiempo de incubación, los magnetos fueron retirados y la viabilidad celular fue determinada empleando la técnica del Rojo Neutro tanto en las canastillas como en los pozos.

2.4.4 Disgregación post-exposición a campo magnético

La capacidad de disgregación de las nanopartículas magnéticas es un factor determinante para favorecer su difusión en un tejido biológico, una vez localizadas mediante campos magnéticos externos, por esta razón se evaluará la viabilidad celular dependiente de la disgregación de las nanopartículas con relación al tiempo de exposición a campos magnéticos.

Se prepararon placas de cultivo de 12 pozos con células A-431 incubadas en condiciones óptimas de crecimiento y con un volumen de medio de 1 ml por pozo. De igual manera se prepararon cultivos en monocapa dentro de las canastillas con membrana porosa con un volumen de medio de 500 μ l por canastilla. Este experimento se realizó por duplicado de la siguiente manera, se colocaron 4 pozos con canastillas para establecer los cultivos a dos niveles, y dos pozos con cultivos en monocapa sin canastillas, dos de los cultivos a dos niveles se emplearon como blanco, los cuatro pozos restantes serán expuestos a un campo magnético en la parte externa de la placa.

Posterior a esto, se dispensaron en cada pozo 40 μ l de nanopartículas de una concentración de 20 μ g/ μ l para obtener una concentración final en el pozo de 0.71 μ g/ μ l de partículas dispersas. Los cultivos a dos niveles tuvieron una

exposición al campo magnético por un lapso de 1 min., mientras que los pozos sin canastillas tuvieron un tiempo de exposición de 5 minutos. Después los imanes se retiraron y la placa fue llevada a incubación en condiciones óptimas de crecimiento por 48 horas. La figura 2.7 muestra la disposición y el tiempo de exposición al campo magnético de los experimentos realizados. Transcurrido el tiempo de incubación, la viabilidad celular fue determinada empleando la técnica del Rojo Neutro tanto en las canastillas como en los pozos.

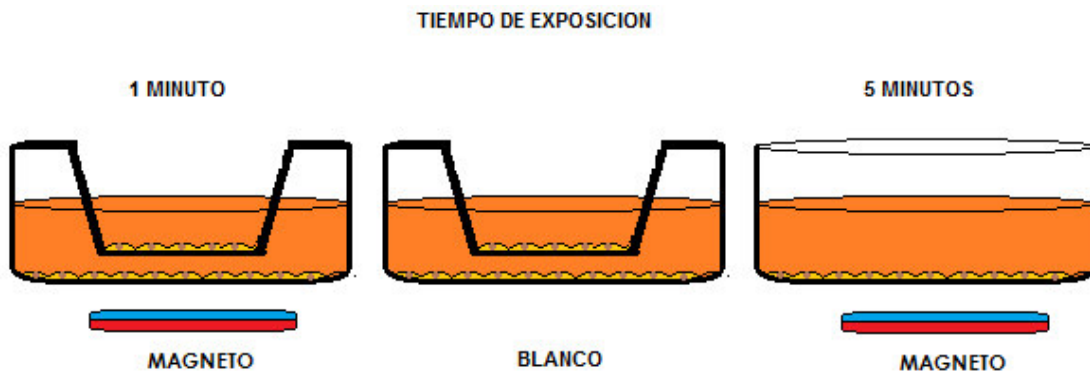


Figura 2.7. Disgregación post-exposición a campo magnético. Representación grafica de la disposición de los experimentos así como los tiempos de exposición a campos magnéticos.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Diseño de nanopartículas con propiedades magnéticas

3.1.1 Síntesis de magnetita

En el proceso de síntesis de nanopartículas de magnetita se obtuvo un precipitado de color negro que presenta propiedades magnéticas. En la figura 3.1A puede apreciarse el producto crudo de la reacción, mismo que responde a las propiedades de un compuesto con propiedades magnéticas al ser expuesto a un campo magnético externo (figura 3.1B).

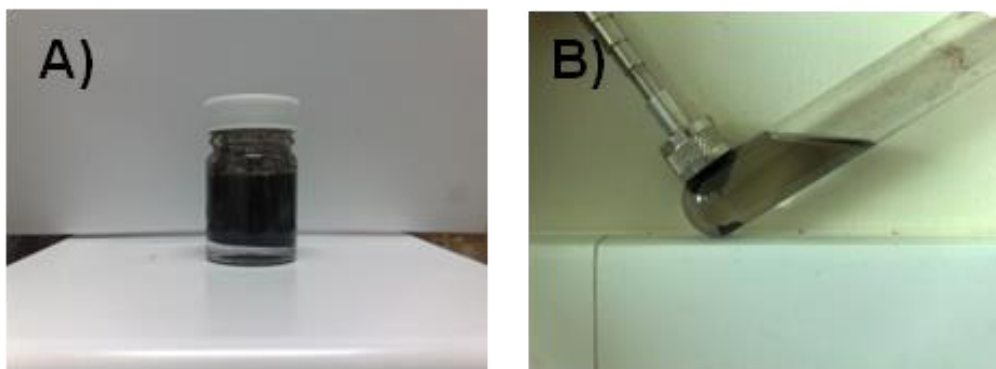


Figura 3.1. Características de las muestras obtenidas de la síntesis de nanopartículas de magnetita. A) Producto crudo de reacción, B) magnetita después de los tratamientos de lavado, nótese la capacidad que presentan para ser atraídas en presencia de un campo magnético externo.

3.1.2 Estabilización y uniformidad de tamaño

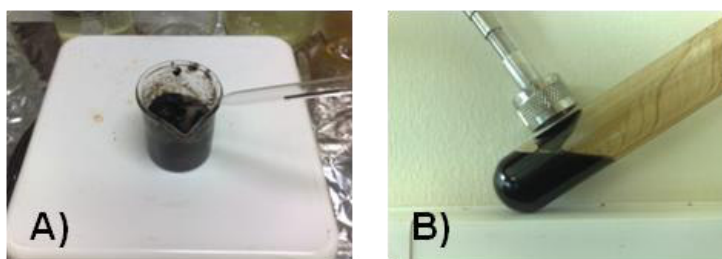


Figura 3.2. Características de las muestras obtenidas de la síntesis con ácido oleico. A) Producto crudo de reacción, B) Magnetita/ac. oleico en Hexano, nótese el comportamiento como ferro-fluido por la presencia de ácido oleico.

Este procedimiento de síntesis mejoró añadiendo el ácido oleico de manera previa al desarrollo de la reacción de formación de magnetita. El resultado más inmediato y evidente de esta variación en el procedimiento de síntesis generó un producto con aspecto de ferrofluido que responde al efecto de campos magnéticos externos (figura 3.2). En lo referente a la uniformidad de tamaño de las nanopartículas obtenidas se pudo observar que se mejora en gran medida con

respecto a esta característica, siendo esta la razón de su elección para la realización de los análisis de caracterización morfológica y microestructural. Las muestras de nanopartículas obtenidas se designaron como *Partículas Sin Fármaco* (PSF). Estas muestras de PSF fueron examinadas mediante espectroscopía de Infrarrojo (IR), Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) además de ser aplicados análisis de Transformada de Fourier y Difracción de Electrones. Los resultados obtenidos de estas muestras PSF se muestran a continuación:

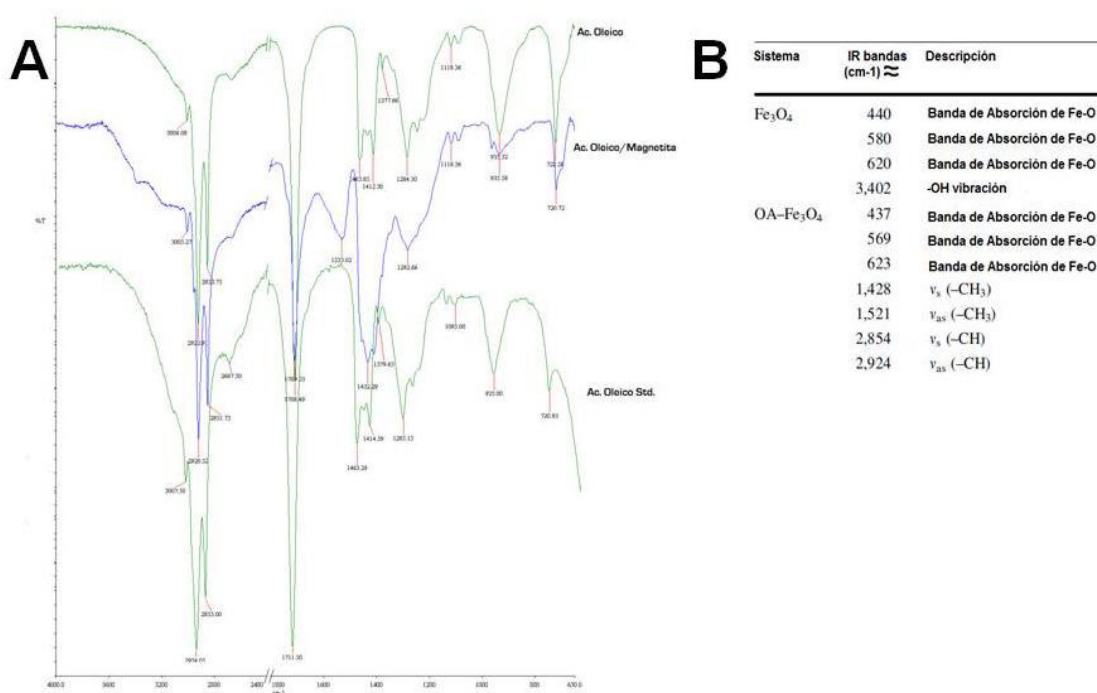


Figura 3.3. Espectroscopía de Infrarrojo (IR) de los sistemas analizados de PSF. Se muestran las señales características del sistema magnetita-ácido oleico. A) y su comparación con las señales características para la fase magnetita y magnetita-ácido oleico, B) sin recubrimiento (Adaptado de Andhariya y Nidhi, 2011).

En la figura 3.3 se presentan los resultados del análisis de IR de los sistemas analizados de PSF. Se muestran las señales características del sistema magnetita-ácido oleico comparado de manera paralela con el espectro de ácido oleico empleado en el ensamblaje del sistema, y ácido oleico estándar como patrón de comparación y análisis de impurezas (A). Asimismo, se muestran las señales características para la fase magnetita sin recubrimiento y magnetita-ácido oleico (B). Si bien las señales réplicas se confirman para cada uno de los espectros, y se corroboran los picos característicos para el sistema magnetita-ácido oleico reportado por Andhariya y Nidhi (2011), en el apartado de caracterización de las PCF (3.1.5) se describe con detalle la caracterización por IR de las PSF en comparación con las PCF.

El efecto surfactante del ácido oleico tiene un impacto tanto en el aspecto de la regularización del tamaño de partícula de las nanopartículas obtenidas. Las imágenes de TEM que se presentan en la figura 3.4 (A y B) reflejan que con la adición del ácido oleico se mejoran aspectos como la distribución de partículas; siendo esta evidente en las imágenes presentadas. Pueden apreciarse espacios o zonas claras entre un núcleo de partícula y otro, además de observarse permitir identificar tamaños relativamente regulares.

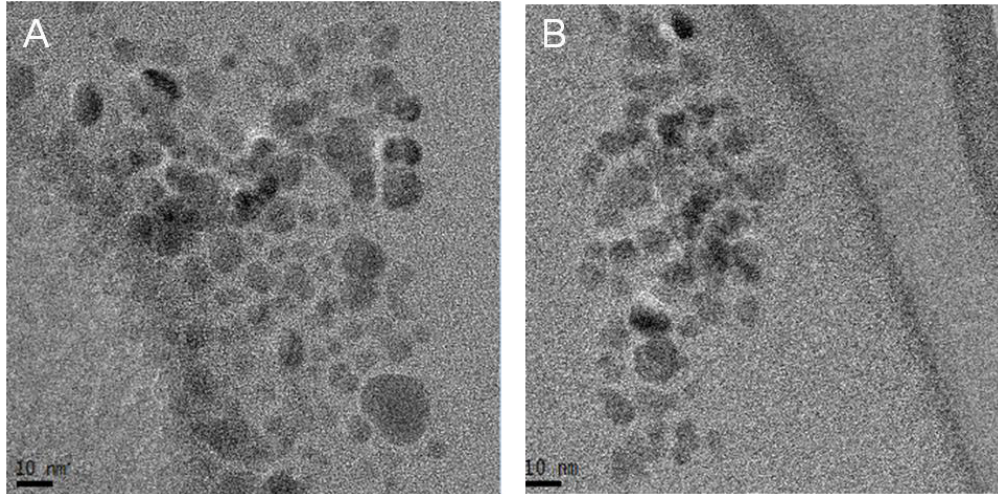


Figura 3.4. Micrografía Electrónica de Transmisión (TEM) de nanopartículas con ácido oleico, se puede apreciar la distribución de partículas, tamaños regulares y espacios entre partículas.

3.1.3 Caracterización morfológica y microestructural de nanopartículas superparamagnéticas

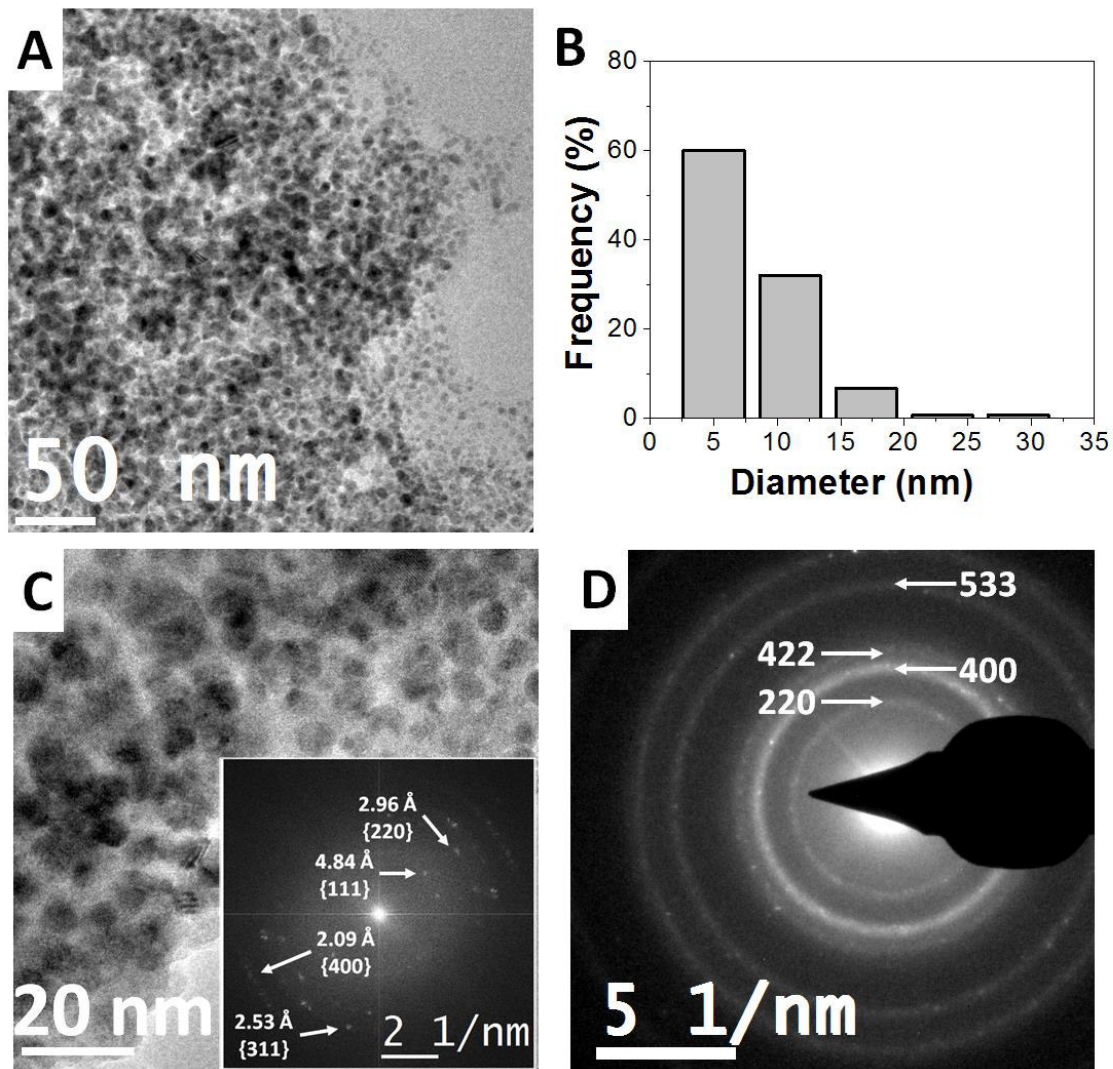
La figura 3.5 muestra una imagen adicional de TEM de la muestra PSF. En ella se pueden distinguir los núcleos de las partículas (figura 3.5 A). El estudio estadístico de los tamaños de estos núcleos indican que el tamaño promedio para esta muestra es de 8.1 nm y su desviación estándar es 3.8 nm. La figura 3.5 B muestra la distribución de tamaños de los núcleos magnéticos obtenida al medir el tamaño de más de 100 partículas.

La figura 3.5 C muestra una micrografía electrónica de transmisión de alta resolución de la muestra PSF. En esta imagen se pueden distinguir planos de átomos cuyas distancias interplanares son consistentes con la estructura de la

magnetita. La imagen interior es la correspondiente transformada rápida de Fourier. En ella se observan puntos brillantes que se pueden asociar a los planos cristalográficos de la magnetita.

La figura 3.5 D muestra un patrón de difracción de electrones obtenido para la muestra PSF, el cual consiste en varios anillos bien definidos los cuales se pueden asociar a la estructura cristalina tipo espinela de la magnetita.

Figura 3.5. Caracterización morfológica y microestructural de nanopartículas superparamagnéticas. A) Muestra una micrografía de microscopía electrónica de transmisión de la muestra PSF. B) Presenta la distribución del tamaño de los núcleos magnéticos de las nanoestructuras híbridas de



la muestra PSF. C) Muestra una micrografía de microscopía electrónica de transmisión de alta

resolución de la muestra PSF. La imagen interior muestra la transformada rápida de Fourier de esta imagen. En ella se observan puntos brillantes que se pueden asociar a una fase de magnetita. D) Muestra el patrón de difracción de electrones obtenido para el área observada en la parte A de la figura.

3.1.4 Caracterización morfológica y microestructural de nanopartículas superparamagnéticas cargadas con paclitaxel

Las muestras de nanopartículas obtenidas asociadas al fármaco antineoplásico paclitaxel se designaron como *Partículas Con Fármaco* (PCF). La figura 3.6 A muestra una imagen de microscopía electrónica de transmisión (MET) de la muestra PCF. En ella se pueden distinguir los núcleos magnéticos de las partículas que aparecen bien dispersados en la rejilla, lo cual es un indicio de que las muestras están funcionalizadas con ligandos surfactantes. Es importante tener presente que los puntos oscuros observados corresponden solamente a la proyección del corazón magnético de las nanoestructuras híbridas debido a que las capas de las moléculas surfactantes presentan una absorción muy pequeña de electrones en la técnica de TEM.

El estudio estadístico de los tamaños de los núcleos de las partículas observados en las imágenes TEM indican que el tamaño promedio de éstos en esta muestra es de 5.7 nm y su desviación estándar es 1.8 nm. La figura 3.6 B muestra la distribución de tamaños de los núcleos magnéticos obtenida al medir el tamaño de más de 100 partículas. La figura 3.6 C muestra una micrografía electrónica de transmisión de alta resolución de la misma. En esta imagen se

pueden distinguir planos cristalográficos cuyas distancias interplanares son consistentes con la estructura de la magnetita. La imagen interior de la figura 3.6 C es la transformada rápida de Fourier de una partícula. El patrón observado puede indexarse al eje de zona [111] de la estructura cúbica de la magnetita. La figura 3.6 D muestra un patrón de difracción de electrones obtenido para la misma muestra, el cual consiste en varios anillos bien definidos, los cuales se pueden asociar a la estructura cristalina tipo espinela de la magnetita.

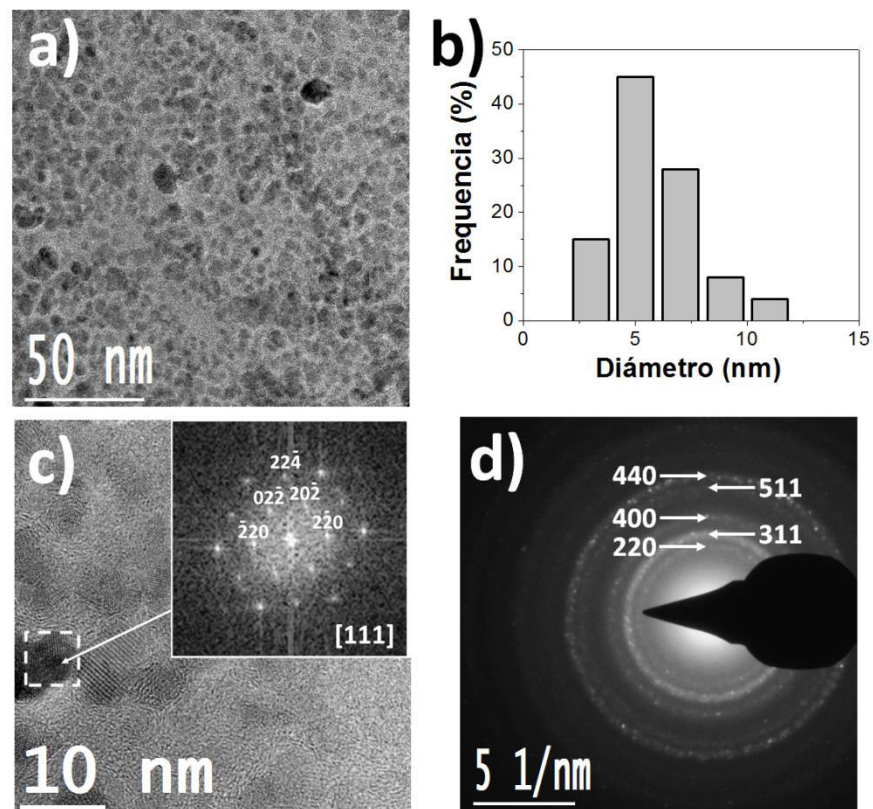


Figura 3.6. Caracterización morfológica y microestructural de nanopartículas superparamagnéticas cargadas con paclitaxel. A) Micrografía de microscopía electrónica de transmisión de la muestra PCF. B) Distribución del tamaño de los núcleos magnéticos de las nanoestructuras híbridas de la muestra PCF. C) Micrografía de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución de la muestra PCF. La imagen interior muestra la transformada rápida de Fourier del área marcada con el recuadro discontinuo. D) Patrón de difracción de electrones obtenido para el área observada en la parte A de la figura.

La figura 3.7 muestra el patrón de difracción de rayos X (DRX) obtenido para la muestra PCF medido en un difractor Emyrean (PANalytical) usando radiación Cu K α radiation ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$). Dicho patrón consiste en varios picos bien definidos que pueden atribuirse a una única fase de magnetita (Joint Committee on Powder Diffraction Standards fichero No. 19-0629).

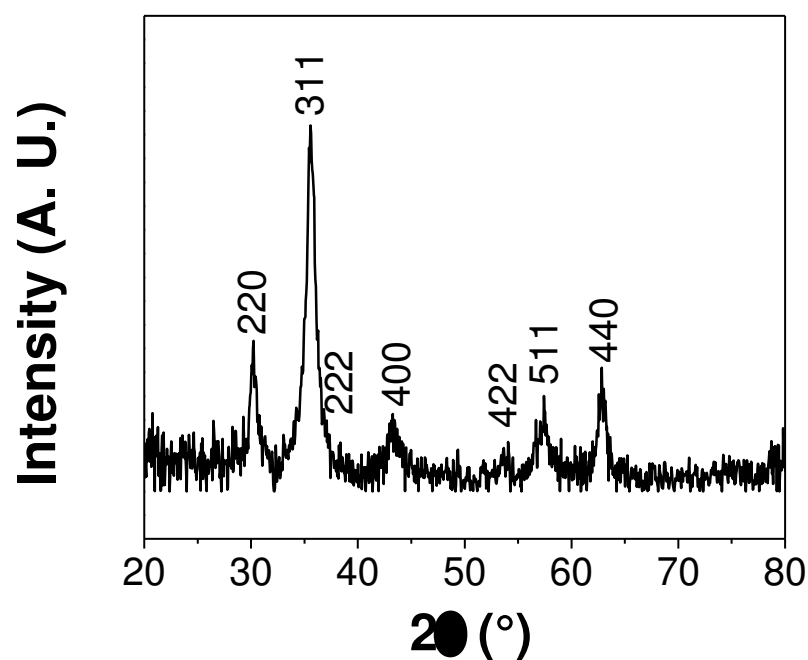


Figura 3.7. Patrón de difracción de rayos X de la muestra PCF-polvo.

El tamaño de cristal estimado usando la ecuación de Scherrer y el pico de difracción más intenso, correspondiente a los planos cristalográficos (311) fue de 7 nm, valor cercano al diámetro promedio de los núcleos magnéticos de las partículas encontrados por TEM.

3.1.5 Caracterización de las muestras mediante Espectroscopía Infrarroja

La figura 3.8 muestra los espectros de las muestras PSF y PCF obtenidos con un espectrofotómetro infrarrojo de transformada de Fourier de la marca Bruker. En ambos espectros se observan bandas estrechas a 2921 y 2852 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones del grupo CH_2 de estiramiento asimétrico y simétrico, respectivamente. Estas bandas aparecen ligeramente desplazadas hacia valores menores (figura 3.3) de número de onda con respecto a las bandas observadas en espectros de moléculas de ácido oleico no ligadas (Zhang, 2006), lo cual es consistente con el hecho de que las nanopartículas de magnetita tienen adsorbida, a manera de recubrimiento, una capa de moléculas de ácido oleico (Zhang, 2006).

Los picos intensos observados a 1103 cm^{-1} en la muestra PSF y 1104 cm^{-1} para la muestra PCF corresponden al estiramiento asimétrico de C-O-C del Pluronic F127 (Du, 2012). La banda observada a 1280 cm^{-1} podría asociarse al estiramiento del grupo C-O y la banda de vibración en el plano de O-H se detecta a 1465 cm^{-1} . Además, los picos observados a 1342, 962 y 842 cm^{-1} son también característicos del Pluronic[®] F127 (PF127) (Lin, 2009).

Es importante remarcar que la banda asociada con el estiramiento C=O del grupo carboxilo, observada a 1710 cm^{-1} en el espectro FTIR reportado para el ácido oleico (Zhang, 2006), no se detecta en los espectros de las muestras PSF y

PCF. La desaparición de esta banda también se ha observado en nanopartículas de magnetita recubiertas con ácido oleico (Zhang, 2006). También se encuentra una banda adicional a 1639 cm^{-1} , la cual se puede asociar al estiramiento asimétrico $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ y cuya aparición es debida a la quimisorción del ácido oleico en la superficie de los núcleos de Fe_3O_4 .

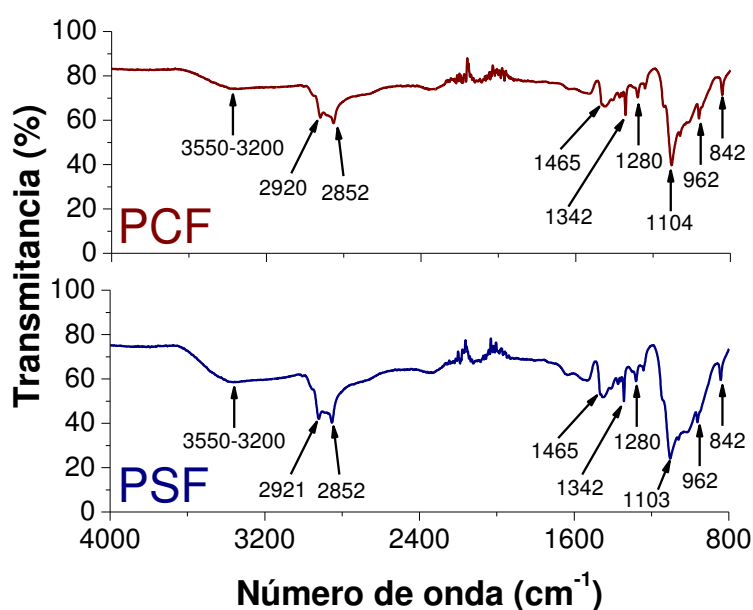


Figura 3.8. Espectros de las muestras PSF y PCF obtenidos con un espectrofotómetro infrarrojo de transformada de Fourier.

3.1.6 Caracterización magnética

El comportamiento magnético de las muestras se estudió mediante un magnetómetro MPMS (“Magnetic Property Measurement System”) 7 Teslas de Quantum Design. Para llevar a cabo estas medidas, 28.8 mg de la muestra PCF en forma de polvo se introducen y compactan dentro de una cápsula de gelatina,

asegurando la inmovilización de la muestra dentro de la cápsula con algodón, la cual se fijó dentro de un porta-muestras. Posteriormente, tras ubicar la muestra en el centro de las bobinas superconductoras que generan el campo magnético excitador, se procedió a registrar las dependencias de la magnetización con la aplicación de un campo excitador y la temperatura.

Las curvas de histéresis magnética se midieron con un campo magnético H máximo aplicado de 3 T a temperatura del cuerpo humano (310 K) y a 1.8 K. La figura 3.9 muestra las curvas experimentales obtenidas. Se observa que la muestra a 1.8 K presenta histéresis magnética con un campo coercitivo de 365 Oe, mientras que a 310 K la muestra no presenta histéresis magnética. Esto indica que la muestra es superparamagnética a la temperatura del cuerpo humano.

Para ganar mayor información sobre el comportamiento superparamagnético de las nanoestructuras híbridas portadoras de paclitaxel, se estudió la dependencia de la magnetización con la temperatura enfriando la muestra en ausencia o en presencia de un campo magnético externo. En la bibliografía estas curvas se denominan *curvas de enfriamiento sin campo y con campo*, o con los términos en inglés “*Zero Field Cooling (ZFC)*” y “*Field Cooling (FC)*”. En particular, la transición ferromagnetismo-superparamagnetismo se manifiesta en estas curvas mediante la aparición de propiedades irreversibles. Analizado este tipo de propiedades se puede extraer información sobre la distribución de barreras de energía magnética y la distribución de volúmenes

relacionada junto al posible efecto de interacciones entre partículas (Dormann, 1997).

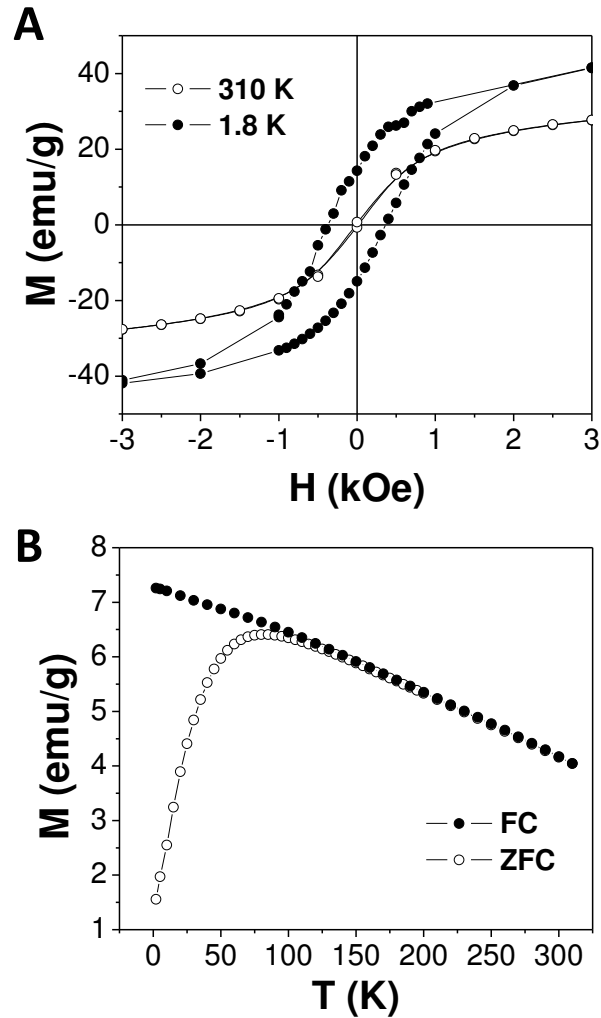


Figura 3.9. Comportamiento magnético. A) Dependencia de la magnetización de la muestra PCF en función de un campo excitador obtenida a temperatura del cuerpo humano (310K) y a 1.8 K. B) Curvas ZFC-FC medidas en la muestra PCF con un campo excitador de 100 Oe.

Para obtener estas curvas experimentales primero se enfrió la muestra desde temperatura del cuerpo humano, 310 K, hasta alcanzar 1.8K sin aplicar campo magnético alguno sobre la muestra. Una vez enfriada, se aplicó un campo

de 100 Oe. Después, y en presencia de este mismo campo, se calentó la muestra hasta alcanzar de nuevo la temperatura inicial, registrando en este proceso los valores de la magnetización, M , en función de la temperatura. La curva obtenida es la denominada *curva de enfriamiento sin campo* o simplemente *curva ZFC*. Sin dejar de aplicar el campo de 100 Oe, se enfrió de nuevo la muestra hasta llegar a 1.8 K. La dependencia de la magnetización en este último enfriamiento es la denominada *curva de enfriamiento con campo* o simplemente *curva FC*. La figura 3.8 B presenta las curvas ZFC-FC obtenidas para la muestra PCF. Se observa que las curvas ZFC y FC se superponen a temperaturas mayores que 100 K. Esto indica que en este rango de temperaturas la muestra permanece siendo superparamagnética, de modo que en ausencia de campos aplicados, la orientación del momento magnético de las nanoestructuras es inestable debido a efectos térmicos. No obstante, por debajo de 100 K, se observa que las curvas ZFC y FC dejan de superponerse. Esto indica que por debajo de 100 K, los momentos magnéticos de las nanoestructuras empiezan a “bloquearse” térmicamente. La curva ZFC presenta un pico con un máximo a 82 K. Al máximo observado en la curva ZFC de un sistema de nanopartículas magnéticas usualmente se le asocia con la temperatura de bloqueo promedio de la muestra.

3.2 Pruebas Biológicas

3.2.1 Determinación de Citotoxicidad

De manera previa a las determinaciones de citotoxicidad se llevaron a cabo ensayos de la sensibilidad de las células A431 a la preparación de las PSF. En dichos ensayos se partió de una suspensión de partículas PSF procediendo tal y como se describe en el capítulo de materiales y métodos. Pudo establecerse que el efecto de las PSF sobre las células A431 es nulo durante las primeras 48 horas. Posterior a este tiempo, la viabilidad celular puede verse comprometida, e ir en decremento de manera clara entre las 48 y las 72 horas posteriores a la puesta en contacto.

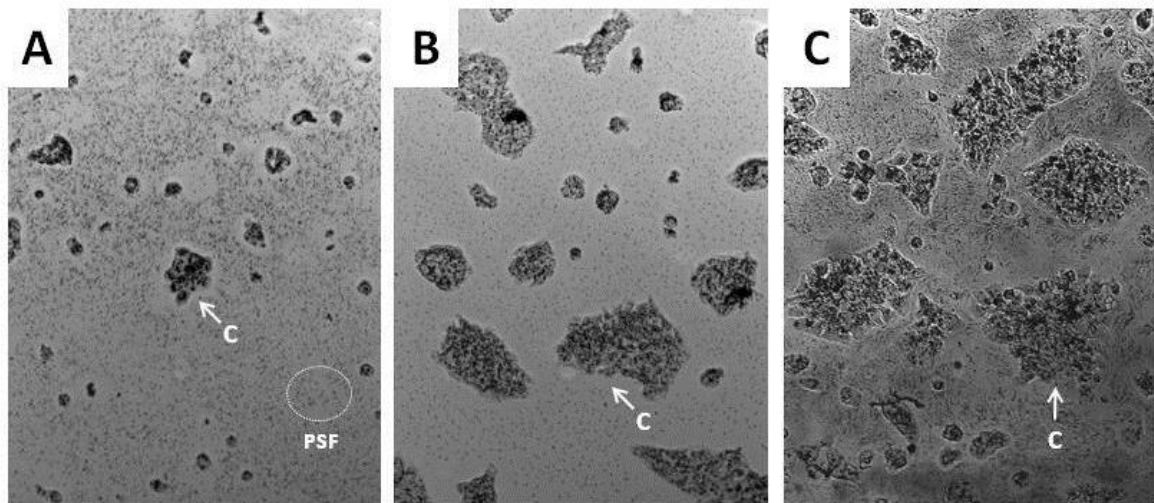


Figura 3.10. Microscopía óptica de PSF sobre las células A431 (20x). Las imágenes corresponden a diferentes poblaciones celulares con distintos períodos de incubación. A) Células A431 con 72 h postincubación, B y C) Células A431 con 24 y 48 h postincubación, respectivamente. Las flechas indican los cúmulos de células (c) y la zona circular en A muestra cúmulos de las PSF depositadas en el fondo de la placa de cultivo.

Las imágenes de microscopía óptica muestran como los cúmulos de células pueden proseguir con su crecimiento regular durante las primeras 48 horas. La figura 3.10 muestra 3 imágenes que corresponden a distintos períodos de incubación en condiciones óptimas de la línea celular. En 3.10 A, se puede apreciar como las células A431 con 72 h posteriores a la incubación, reducen el tamaño del cúmulo de células que forman la colonia, se observaron múltiples células redondeadas en flotación, signo evidente de muerte celular. Sin embargo, la exposición de las células a las PSF pareciera no afectar la viabilidad celular hasta un límite de exposición de tiempo de 48 h. Como puede apreciarse en B y C, de la figura 3.10, las PSF no afectan morfología del conjunto celular.

Debido a que el cultivo celular estático *in vitro* no es un sistema que cuente con un proceso de depuración o recambio, es evidente que las células se ven afectadas por la alteración en el contenido de hierro, que si bien el medio de cultivo cuenta con una concentración ideal (0.1 mg/L), y las PSF no se incorporan de manera completa como hierro en solución, la exposición prolongada a cualquier variación en la composición del medio de cultivo resulta perjudicial.

Los resultados de las pruebas a los tres tiempos, 24, 48 y 72 h con PSF se presentan graficados en función de la viabilidad celular. En la figura 3.11 puede observarse como en los dos primeros tiempos (24 y 48 h), el 100 % de las células permanece viable, mientras que los valores decrecen en cuanto se llega a las 72 h

de incubación, siendo este efecto despreciable únicamente en los ensayos de las concentraciones más diluidas.

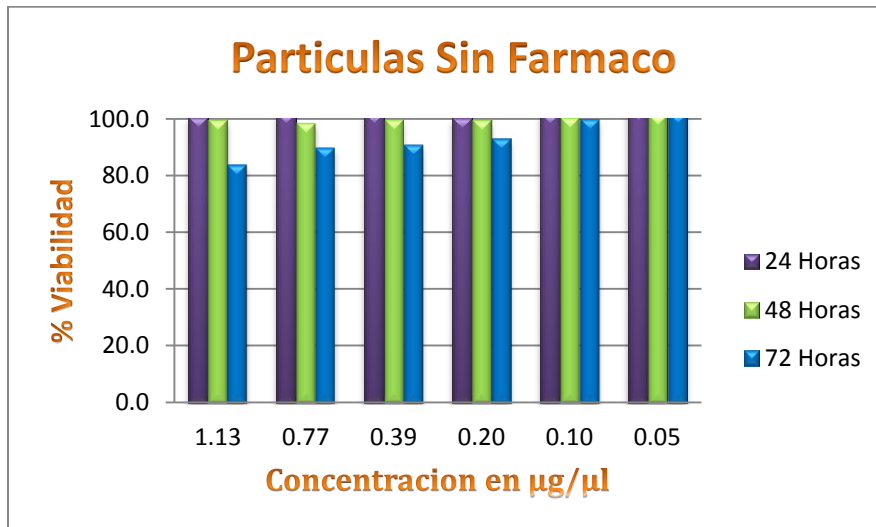


Figura 3.11. Representación gráfica de viabilidad celular en presencia de PSF. Se observa que la viabilidad celular no es afectada por las partículas sin fármaco presentes en el medio a tiempos de 24 h y 48 h, observándose una disminución de la viabilidad celular a tiempo de 72 h.

La misma experiencia fue realizada sobre las células A431 pero empleando PCF en ausencia de campos magnéticos; obteniendo los resultados que se resumen en la figura 3.12. En ella se puede observar claramente que existe un efecto de citotoxicidad en todas las concentraciones ensayadas de PCF. Pero en ninguna de las concentraciones este efecto impacta a más de un 20 % de las células a las 24 h. El efecto citotóxico se hace más evidente después de 24 horas, siendo claramente evidente el efecto en torno al 50 % de las células a las 48 h de contacto. Si bien pudiera considerarse que los valores de citotoxicidad son ideales mientras mayor es el porcentaje de células eliminadas. Existen factores propios de las limitaciones del cultivo estático, como son, falta de un sistema de

depuración, presencia de factores que inducen a la muerte celular por lisis previa, entre muchos otros, que no permiten confiar en que un valor mayor al 50 % de las células, hayan sido afectadas únicamente por efecto del tratamiento ensayado. Aunado a esto, los comprobados efectos de la presencia de PSF por más de 48 h conducen a que todos los ensayos de citotoxicidad de las PCF para determinar su efectividad aplicando campos magnéticos externos se limiten a un tiempo de 24 ó 48 horas.

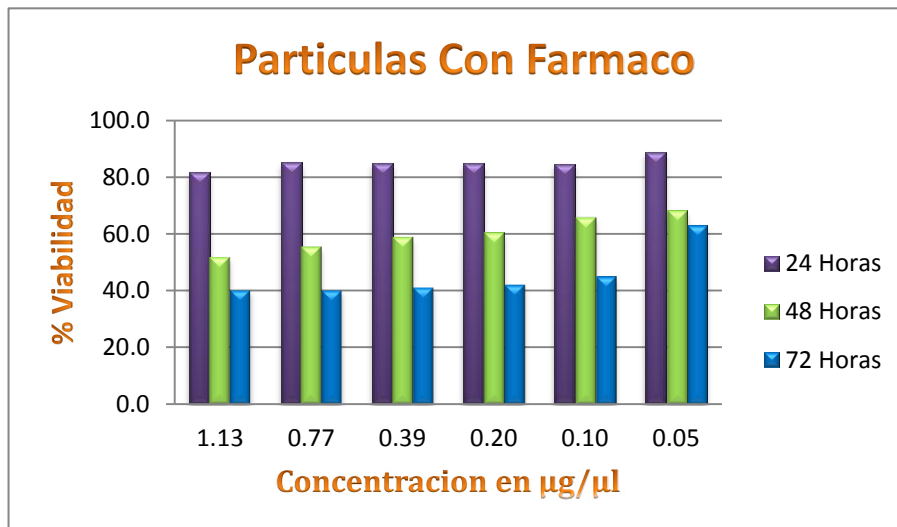


Figura 3.12. Representación gráfica de viabilidad celular en presencia de PCF. Se observa que la viabilidad celular es afectada por las partículas con fármaco en distintos porcentajes a tiempos de 24 y 48 h. Los datos obtenidos a 72 h revelan una meseta no dependiente de la concentración.

3.2.2 Localización de nanopartículas empleando campos magnéticos

Los resultados de las pruebas para evaluar la capacidad de localización del complejo Partícula-Droga demuestran que es posible inducir un emplazamiento del complejo mediante la aplicación de campos magnéticos externos. Siendo esta una aproximación, la primera en este proyecto de investigación, esta deducción en particular resulta de gran interés cuando se proyecta hacia el diseño de sistemas de liberación de fármacos de forma localizada.

Como se muestra en la figura 3.13, los resultados obtenidos en estos ensayos demuestran dicho propósito, las células, que fueron cultivadas en la disposición de dos niveles de cultivo en monocapa, puestas en contacto con PCF y expuestas a un campo magnético externo, se ven afectadas en viabilidad (~25%), únicamente las células de la placa de cultivo (figura 3.13 A), y no así las de la cubeta que funge como reservorio de la segunda población de células compartiendo el mismo medio de cultivo (figura 3.13 B). Por otra parte, las células, tanto de la placa de cultivo como de la cubeta, puestas en contacto con PSF y expuestas a un campo magnético externo no pierden viabilidad (figura 3.13 C y D).

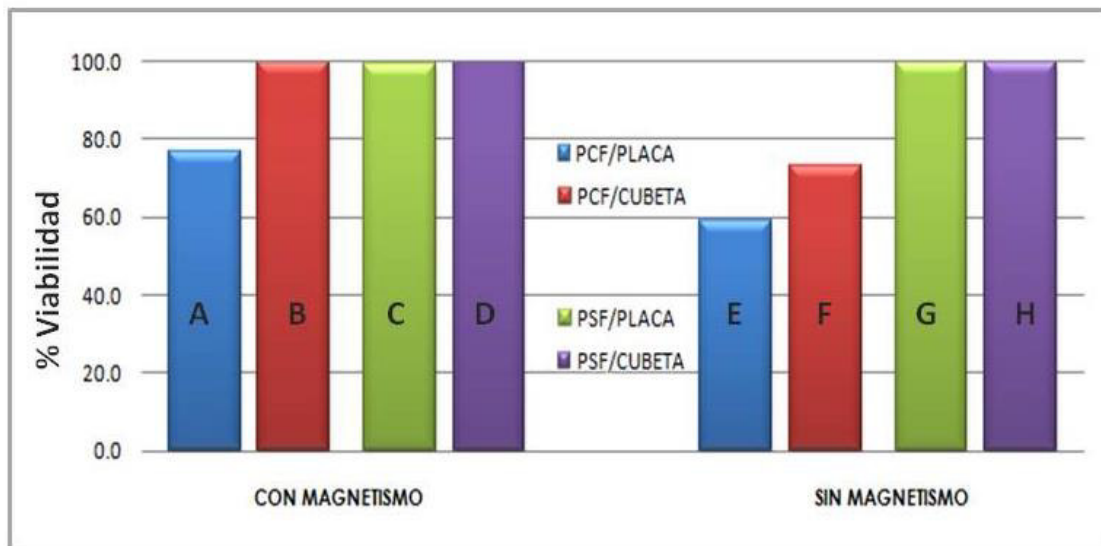


Figura 3.13. Representación gráfica de los resultados de experimentos realizados empleando sistemas de cultivo en dos niveles. Se presentan los resultados de dos esquemas de ensayo en forma de réplica, el primero expuesto a un campo magnético externo (A-D), y el segundo sin exposición a magnetismo. PCF/PLACA se refiere a la placa de cultivo con células expuestas a partículas con fármaco. PCF/CUBETA se refiere a la cubeta de cultivo con células expuestas a partículas con fármaco. PSF/PLACA se refiere a la placa de cultivo con células expuestas a partículas sin fármaco. PSF/CUBETA se refiere a la cubeta de cultivo con células expuestas a partículas sin fármaco.

En cuanto a la réplica de este ensayo en ausencia de magnetismo, los efectos de citotoxicidad del paclitaxel se incrementan en los ensayos llevados a cabo con PCF, poniendo de manifiesto que la disgregación de las partículas y la consecuente difusión del fármaco en el medio de cultivo inducen la muerte tanto en las células (40 %) de la placa de cultivo (figura 3.13 E), como las de la cubeta (25 %) que sostiene a la segunda población de células del ensayo (figura 3.13 F). Así mismo, las células, tanto de la placa de cultivo como de la cubeta, puestas en contacto con PSF y no expuestas a un campo magnético externo no pierden viabilidad (figura 3.13 G y H).

3.2.3 Disgregación de nanopartículas post-exposición a campo magnético

Otro parámetro valorado para determinar la pertinencia del empleo de materiales nanoparticulizados como sistemas de liberación de fármacos es la evidenciación de su capacidad de dispersión o disgregación en el medio de manera posterior a la exposición a un campo magnético. Los experimentos puestos en marcha con este propósito muestran valores del efecto sobre la viabilidad celular en torno al 40 %, siendo estos muy similares a los obtenidos en los ensayos de citotoxicidad.

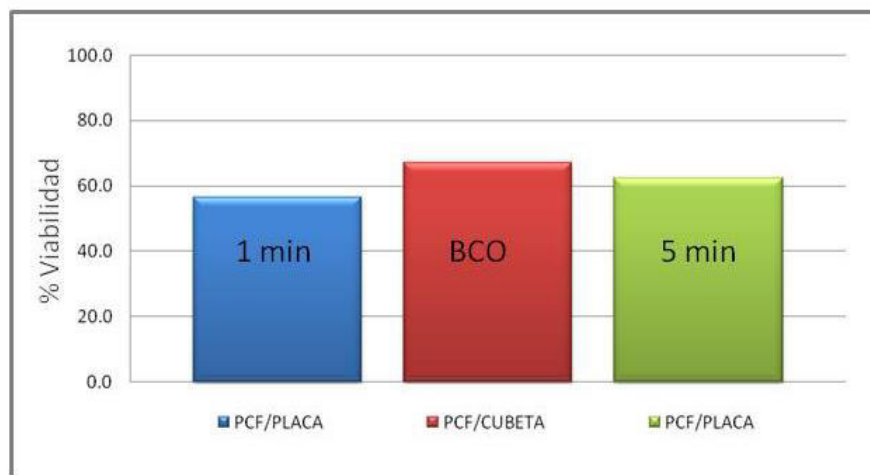


Figura 3.14. Representación gráfica de los resultados de capacidad de disgregación de las PCF en el medio post-exposición a un campo magnético. Se presentan valores de viabilidad celular. PCF/PLACA se refiere a la placa de cultivo con células expuestas a partículas con fármaco. PCF/CUBETA se refiere a la cubeta de cultivo con células expuestas a partículas con fármaco. BCO se refiere al cultivo no expuesto a magnetismo. Se indican los tiempos de exposición de 1 minuto (1 min) y 5 minutos (5 min).

En la figura 3.14 se presentan de manera gráfica los resultados de esta capacidad de disgregación de las PCF en el medio de manera posterior a la exposición a un campo magnético. Se presentan valores de viabilidad celular. Las partículas tienden a disgregarse y a dispersarse uniformemente en todo el sistema.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES

- Se obtuvieron nanopartículas de magnetita con diámetro promedio de 60 nm.
- Se integraron complejos estables de Nanopartícula-Paclitaxel.
- Los complejos Nanopartícula-Paclitaxel presentan propiedades magnéticas que permiten su difusión mediante la aplicación de campos magnéticos externos.
- Los complejos Nanopartícula-Paclitaxel evaluados *in vitro* presentan actividad citotóxica.

Bibliografía

1. Andhariya, Nidhi., Chudasama, B., Mehta, R. y Upadhyay, R. (2011) Biodegradable thermoresponsive polymeric magnetic nanoparticles: a new drug delivery platform for doxorubicin. *Journal of Nanoparticle research*, Vol. 13, 1677-1688.
2. Arshady, R., Monshipouri, M. y Arshady, R. (1999) Microspheres, microcapsules and liposomes. *Citus Books*. Vol. 2. 249-280.
3. Barneto Aranda, I.C., De la Haba Rodríguez, J.R. y Aranda Aguilar, E. Toxicidad de la Quimioterapia. [aut. libro] E. Diaz-Rubio y J. García-Code. *Oncología Clínica Básica*. Madrid: Aran Ediciones, S.A. 2000. p.p. 247-258.
4. Branhmachari, B., Hazra, A. y Majumdar, A. (2011) Adverse drugs reaction profile of nanoparticle versus conventional formulation of paclitaxel: An observational study. *Indian Journal of Pharmacology*. Vol. 43. 126-130.
5. Calabresi, Paul y Chabner, Bruce A. Quimioterapia de las enfermedades neoplásicas. [aut. libro] Joel G. Hardman, Lee E. Limbird y Alfred G. Gilman. Goodman & Gilman. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. México. Ed. McGraw-Hill-Interamericana. 2003. p.p. 1397-1404.
6. Cervantes, A. Principios Generales de la Quimioterapia Antineoplásica. [aut. libro] Juan Rodes, Xavier Carne y Antoni Trilla. *Manual de Terapéutica Médica*. Barcelona. Ed. Masson, S.A. 2002. p.p. 909-918.
7. Chadha, R., Kapoor, V.K., Thakur, D., Kaur, R., Arora, P. y Jain, D.V.S. (2008). Drug carrier systems for anticancer agents: A review. *Journal of Scientific & Industrial Research*. Vol. 67, 185-197.
8. Chorny, M. (2010) Targeting stents with local delivery of paclitaxel loaded magnetic nanoparticles using uniform fields. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 107. 8346-8351.
9. Dormann, J.L., Fiorani, D. y Tronc, E. "Advances in Chemical Physics", Vol. XCVII, Eds. I. Prigogine y Stuart A. Rice, John Wiley and Sons (1997) 283.
10. Du, C.H. Wu, C.J. y Wu L.G. (2012) *Journal of Applied Polymer Science*. Vol. 124 E330-E337.
11. Forrellat Barrios, M., Gautier du Defaix Gómez, H. y Fernández Delgado, N. (2000) Metabolismo del Hierro. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología e Inmunoterapia*. Vol. 16, 149-169.
12. Freitas, R.A. (2005) What is nanomedicine? *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, Vol. 1, 2-9.
13. Galindo, N., Trilla, P. Domínguez, A., Aguilar, C. y Panchi, L. (2010). Prevención y Protocolo de Urgencias ante la Extravasación de Quimioterapia Antineoplásica por Vías Periféricas. *Cancerología*. Vol. 1, 7-16.

14. Gubin, S.P., Koksharov, Yu.A., Khomutov, G.B. y Yurkov G., Yu. (2005). Magnetic nanoparticles: preparation, structure and properties. *Russian Chemical Reviews*. Vol. 74, No. 6, 489-520.
15. Guo, B.H., Kai, G.Y. Jin, H.B. y Tang, K.X. (2006) *African Journal of Biotechnology* Vol. 5 (1) 015-020.
16. Gupta, A. K. y Wells, S. (2004) Surface- modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization, and cytotoxicity studies. *IEEE Trans Nanobioscience*. Vol. 3. 66-73.
17. Heath, James R. y Davis, Mark E. (2008) Nanotechnology and Cancer. *Annual Review of Medicine*, Vol. 59, 251-265.
18. Heath, James R., Davis, Mark E. y Hood., Leroy. (2009). Nanomedicine Targets Cancer. *Scientific American*. Vol. 300, 44-51.
19. Lancaster, S., Kakade, S. Mani, G. (2012) *Langmuir*. Vol.28. 11511-11526.
20. Lanore, D. y Delprat, Ch. Quimioterapia Anticancerosa. Manual de Terapéutica Médica. Barcelona. Ed. Masson, S.A. 2004. p.p. 90-98.
21. Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander, L. y Muller, R. (2008) Magnetic Iron oxide nanoparticles; synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological Applications. *Chemical Reviews*. Vol. 108. 2064-2110.
22. Lehnert, M. (1996). Clinical multidrug resistance in cancer: a multifactorial problema. *European Journal of Cancer*. Vol. 32 A, 912-920.
23. Leyland-Jones, B., Dalton, W., Fisher, G. y Branimir, S. (1993) Reversal of Multidrug Resistance to Cancer Chemotherapy. *Cancer Supplement*. Vol. 72, 3484-3408.
24. Lin, J.J., Chen, J.S., Huang, S.J., Ko, J.-H., Wang, Y. M., Chen, T. L. y Wang. L. F. (2009) *Biomaterials*. Vol. 30. 5114–5124.
25. Luna Criado, C. y Mendoza Reséndez, R. (2008) Formación de Partículas Nanométricas en Soluciones Sobresaturadas. *Ciencia UANL*, Vol. XI. 244-255.
26. Martínez-Ezquerro, J.D. y Herrera, L.A. (2006) Angiogenesis: VEGF/VEGFRs como blancos terapéuticos en el tratamiento contra en Cáncer. *Cancerología*. Vol. 1. 83-96.
27. Mejía, J.M., Ortega, M.C. y Fajardo, A. (2005). Epidemiología de las leucemias Agudas en Niños. Parte 1. *Revista Médica del IMSS*. Vol. 43, 223-233.
28. Misra, R.D.K. (2008) Magnetic Nanoparticle Carrier for Targeted Drug Delivery: Perspective, Outlook and Design. *Magnetic Science and Technology*. Vol. 24. 1011-1019.
29. Mitchel, R. E. (2004) The bystander Effect: Recent Developments and implications for Understanding the Dose Response. *Nonlinearity in Biology, Toxicology, and Medicine*. Vol. 2. 173-183.

30. Osorio, G., Alarcón, G. y Majilis, A. Hematología. Diagnóstico y Terapéutica. México: Mediterráneo, 2008. p.p. 625-665.
31. Pérez González, T., Valverde Tercedor, C. y Jiménez López, C. (2010) Biomineralización Bacteriana de Magnetita y Aplicaciones. Seminario de la Sociedad Española de Mineralogía. Vol. 7. 58-74.
32. Rabinow, B.E. (2004) Nanosuspensions in drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*. Vol. 3. 785-796.
33. Sanchez, Patricia y Benitez, Luis. (2006). Procesos Biomoleculares de la Resistencia a Drogas. *Cancerología*. Vol. 1, 187-199.
34. Sanchez, R. y Zysler, R. (2005) Magnetismo de sistemas nanoscópicos. *Ciencia Hoy*. Vol. 15, 40-51.
35. Silva-Freitas, E., Fernandez Carvalho, J., Pontes, T., Araújo-Neto, R., Silva Carrico, A. y Tabosa Egito, E. (2011) Magnetite content Evaluation on Magnetic Drug Delivery Systems by Spectrophometry. *American pharmaceutical scientists*. Vol. 12, 521-524.
36. Tapan, J. (2005) Magnetic Studies of Iron Oxide Nanoparticles Coated with Oleic Acid and Pluronic Block Copolymer. *Journal of Applied Physics*. Vol. 97. 10Q905-1 a 10Q905-3.
37. Tapan, J. (2006) Iron Oxide Nanoparticles for Sustained Delivery of Anticancer Agents. *Molecular Pharmaceutics*. Vol. 2. 194-205.
38. Valdivieso-Garcia, A., R. C. Clarke, C. Rahn, A. Durette, D. L. MacLeod, y C. L. Gyles. (1993) Neutral Red Assay for Measurement of Quantitative Vero Cell Cytotoxicity. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 59. 1981-1983.
39. Wang, Y., Hussain, S. y Krestin, G. (2001) Superparamagnetic Iron oxide contrast Agents: Physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *European Radiology*. Vol. 11. 2319-2331.
40. Wang, Yi-Xiang., Thibault Quercy-Jouvet, Hao-Hao Wang, Ak-Wai Li, Chun-Pong Chak, Shouhu Xuan, Lin Shi, De-Feng Wang, Siu-Fung Lee, Ping-Chung Leung, Clara B. S. Lau, Kwok-Pui Fung y Ken Cham-Fai Leung. (2011) Efficacy and Durability in Direct Labeling of Mesenchymal Stem Cells Using Ultrasomal Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Organosilica, Dextran, and PEG Coating. *Material*. Vol. 4, 703-715.
41. Zhang, L., He, R. y Gu, H.C. (2006) *Applied Surface Science*. Vol. 253 2611-2617.
42. Shatalova OV, Krivandin AV, Aksenova NA, Solov'eva AB. (2008) Structure of pluronic F-127 and its tetraphenylporphyrin complexes: X-ray diffraction study. *Polymer Sci A*. ;50:417-421.

APÉNDICE A

Símbolo/Abreviatura	Significado/Definición
°C	Grados Celsius
A	Absorbancia
nm	Nanómetros
rpm	Revoluciones por minuto
SBF	Suero Bovino Fetal
ADN	Ácido desoxirribonucleico
<i>et al.</i>	Y otros [(<i>lat.</i>) <i>Et aletri</i>]
ARN	Ácido ribonucleico
MDR	Resistencia a Multi Droga
P-pg	Glicoproteína P
Ag-Ac	Antígeno-Anticuerpo
ADNss-ADNc	Ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla-Ácido desoxirribonucleico complementario
MDRP	Proteína de Resistencia a Multi Droga
<i>H</i>	Campo magnético
SPION	Nanopartículas de óxidos de hierro superparamagnéticas
μm	Micrómetros
SMD	Domínio magnético único
SRE	Sistema Retículo Endotelial
Δ	Temperatura
ml	Mililitros
g	Gramos
min	Minutos

M	Molar
±	Más menos
Rx	Reacción
TEM	Microscopia electrónica de transmisión
mg/m ²	Miligramos/metro cuadrado
mg	Miligramos
PCF	Partículas con fármaco
PSF	Partículas sin fármaco
aprox.	Aproximadamente
PBS	Solución buffer de fosfatos
h	Horas
mm	Milímetros
FTIR	Espectroscopia de infrarrojo con transformadas de Fourier
TGA	Análisis termogravimétrico
DRX	Difracción de rayos X
ED	Difracción de electrones
SQUID	Aparato Superconductor de Interferencia Cuántica
inHg	Pulgadas de Mercurio
μl	Microlitros
mbar	Milibares
<i>D</i>	Región de coherencia cristalina promedio
Å	Armstrongs
<i>in situ</i>	En el sitio [(<i>lat.</i>)]
kV	Kilovolts
K	Kelvin

Oe	Oesters
<i>M</i>	Magnetización
T	Teslas
MEM	Medio Mínimo Esencial
DMEM	Medio Eagle Modificado de Dulbecco
cm	Centímetros
MPMS	Sistema de Medición de la Propiedad Magnética
ZFC	Curvas de enfriamiento sin campo
FC	Curvas de enfriamiento con campo
<i>In vitro</i>	Dentro del vidrio [<i>(lat.)</i>]

APÉNDICE B

1. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS: En nanopartículas suficientemente pequeñas la magnetización puede cambiar aleatoriamente debido a la temperatura. El tiempo medio típico para que se produzca éste cambio se llama tiempo de relajación de Néel. En ausencia de campo magnético externo, cuando el tiempo de medida de la magnetización de las partículas es mucho mayor que el tiempo de relajación, se observa que la magnetización media de la partícula aparenta ser cero; En ése caso se dice que la partícula está en un estado superparamagnético. En éste estado un campo magnético externo es capaz de magnetizar las nanopartículas, de forma similar a como ocurre en un paramagnético. Sin embargo, la susceptibilidad magnética es mucho más elevada que en los paramagnéticos.
2. SUPERPARAMAGNETISMO: El superparamagnetismo es un comportamiento magnético con algunas características del ferromagnetismo y otras del paramagnetismo. Su origen se debe a partículas mesoscópicas, con interacciones ferromagnéticas lo bastante intensas en su interior como para lograr un ordenamiento magnético por debajo de cierta temperatura crítica, pero con interacciones muy débiles entre ellas, con lo que el ordenamiento magnético no puede extenderse a todo el sistema. Así, se comportan como paramagnetos de momento magnético muy grande. A semejanza de los ferromagnetos, pueden exhibir ciclos de histéresis magnéticos o señal ac en la susceptibilidad, pero sólo por encima de cierta frecuencia crítica a partir de la cual el momento magnético inducido no es capaz de seguir la dirección del campo aplicado.