

Potenciación de la actividad antitumoral de doxorrubicina mediante su formulación en nanoplataformas magnéticas

José Luis Arias Mediano, Eva Antonia Sáez Fernández, María Adolfinia Ruiz Martínez, Visitación Gallardo Lara

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. 18071 Granada. Spain.

e-mail: jlarias@ugr.es

RESUMEN

El diseño de sistemas transportadores basados en nanopartículas magnéticas pretende la acumulación en el tejido tumoral de la dosis de fármaco administrada. Así debe obtenerse una mejora significativa del efecto anticanceroso, junto con la minimización de la toxicidad asociada. En este contexto, desarrollamos una metodología reproducible de formulación de nanopartículas constituidas por núcleos de óxido de hierro (magnetita) embebidos en una matriz de poli(ϵ -caprolactona). La extensa caracterización fisicoquímica de estos nanocompuestos permitió definir las condiciones óptimas de formulación para asegurar el transporte eficaz de fármacos. Se estudió la capacidad de la nanoplataforma para desarrollar un efecto antitumoral de hipertermia, su compatibilidad sanguínea y su utilización por vía intravenosa como sistema transportador de doxorrubicina hasta el tejido canceroso. Las nanopartículas magnetita/poli(ϵ -caprolactona) presentaron una adecuada vehiculización de este fármaco, junto con una muy significativa susceptibilidad magnética. Finalmente, se analizó la actividad antitumoral de los nanocompuestos cargados con doxorrubicina en un modelo de tumor subcutáneo EMT6 inducido en ratones. Se observó que éstos presentaban un marcado efecto quimioterápico en comparación con tratamientos alternativos (p.ej., la administración de estas nanopartículas sin guiado magnético hasta la masa tumoral, o el tratamiento con una solución intravenosa de doxorrubicina). Los resultados obtenidos resaltan las interesantes propiedades que presenta la nanoformulación diseñada para el desarrollo de una terapia eficaz contra el cáncer.

Palabras clave: Cáncer; Hipertermia; Nanopartículas compuestas; Nanopartículas magnéticas; Transporte de fármacos.

ABSTRACT

Improvement of the antitumor activity of doxorubicin by the use of magnetic nanoplatforms

The introduction of magnetic nanoplatforms in the cancer arena is intended to optimize the accumulation of the drug dose into the tumor interstitium with the help of a magnetic gradient. As a result, the chemotherapeutic agent may exhibit an enhanced anticancer efficacy and a negligible systemic toxicity. In these contexts, we have developed a reproducible methodology for the design of magnetite/poly (ϵ -caprolactone) core/shell nanoparticles. A detailed physicochemical characterization of these nanocomposites suggested that their heterogeneous structure allows their use in drug delivery, thanks to an excellent responsiveness to magnetic gradients. In vitro heating characteristics (hyperthermia inducing capability) of the core/shell nanoparticles were investigated in a high frequency alternating magnetic gradient. Blood compatibility of the nanoformulation was defined in vitro. Finally, this nanodevice was used to enhance the intravenous delivery of the anticancer agent doxorubicin to the tumor tissue. The nanocomposites were characterized by an adequate doxorubicin loading, a significant magnetic susceptibility, and a low burst drug release. When injected to the EMT6 subcutaneous mice tumor model, these doxorubicin-loaded core/shell nanoparticles were magnetically guided, and they displayed considerably greater anticancer activity than the other anticancer treatments (i.e., doxorubicin-loaded nanocomposites non-magnetically guided, or doxorubicin free in solution). Thus, the here-described stimuli-sensitive nanomedicine possesses important characteristics for effective therapy of cancer.

Keywords: Cancer; Drug delivery; Hyperthermia; Magnetic nanoparticles; Nanocomposites.

1. INTRODUCCIÓN

La necesidad de encontrar tratamientos quimioterápicos eficaces ha hecho que se incrementen las líneas de investigación en esta materia. Esto ha permitido un mayor conocimiento de los orígenes moleculares del cáncer, con la consiguiente identificación de novedosas aproximaciones terapéuticas y el desarrollo de un amplio arsenal de moléculas antitumorales. Sin embargo, los agentes quimioterápicos utilizados en clínica suelen presentar importantes limitaciones que determinan el habitual fracaso del tratamiento incluso en aquellos tipos de cáncer teóricamente más sensibles (1). Un claro ejemplo lo constituye la baja respuesta global ($\approx 10\%$) alcanzada con la utilización de 5-fluorouracilo en el tratamiento del cáncer colorrectal avanzado. Además, se ha descrito que la

combinación de este agente con otros anticancerosos sólo permite mejorar la eficacia antitumoral $\approx 45\%$ de los casos (2).

Entre las principales razones que justifican el fracaso del tratamiento antitumoral destacan (3): i) la farmacocinética desfavorable del agente anticanceroso (rápido aclaramiento plasmático, rápida biodegradación y corta semivida plasmática) determina el uso de dosis altamente tóxicas y una rigurosa pauta de tratamiento para conseguir el efecto terapéutico deseado; ii) la extensa biodistribución y extravasación de la molécula antitumoral en zonas no deseadas determina una elevada toxicidad; iii) la selectividad del fármaco por las células malignas generalmente es muy pobre; iv) la susceptibilidad de desarrollar resistencia a los anticancerosos por parte de las células tumorales; y, v) las propiedades fisicoquímicas desfavorables de los agentes quimioterápicos, por ejemplo su hidrofobia, induce una escasa acumulación en el lugar de acción.

Con el objetivo de solucionar estos problemas se han asociado moléculas antitumorales con coloides para el tratamiento del cáncer. Esta asociación pretende aumentar la acumulación específica del fármaco en la zona tumoral, e incrementar el tiempo de exposición de las células cancerosa al principio activo (3, 4). De esta manera, numerosas investigaciones han perseguido la formulación de coloides, basados principalmente en nanomateriales vesiculares o poliméricos, para conseguir el transporte eficaz de cualquier antitumoral a la zona diana (1, 3-5). Sin embargo, recientes estudios han probado que esta simple asociación no siempre resulta suficiente para dirigir específicamente un fármaco a cualquier zona del organismo, más allá de los órganos pertenecientes al sistema retículo endotelial (3). Este hecho ha determinado que las investigaciones científicas en este terreno se hallan enfocadas al diseño de nanopartículas según novedosas estrategias de transporte pasivos de fármacos (basadas en el efecto de permeación y retención incrementada propio de la masa tumoral) y de transporte activo de fármacos (fundamentadas en interacciones ligando-receptor, y en el uso de nanomateriales sensibles a estímulos externos) (3, 4).

Quizás los coloides magnéticos sean uno de los sistemas que más interesantes posibilidades ofrece en el transporte y liberación controlada de fármacos antitumorales. De forma general, las nanopartículas magnéticas están constituidas por un núcleo magnético englobado en una matriz orgánica (p.ej., un polímero) o inorgánica (p.ej., sílice). Se ha descrito que las características de estos coloides pueden modificarse mediante un procedimiento de síntesis adecuado para definir unas propiedades fisicoquímicas y una capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados, que permitan controlar eficazmente su distribución (y así la del fármaco vehiculizado) hasta el tejido tumoral (6). Los coloides magnéticos presentan numerosas posibilidades en biomedicina ya que pueden (6-9): i) ser visualizados mediante resonancia magnética nuclear y, por lo

tanto, ser utilizados como agentes de contraste debido a su capacidad para reducir los tiempos de relajación $T1^*$, $T2^*$; ii) transportar y acumular un fármaco en el lugar diana mediante la utilización de un gradiente magnético adecuado, aumentando el tiempo de exposición de las células diana al agente quimioterápico; y, iii) producir un efecto de hipertermia en el lugar deseado, ya que generan calor bajo la acción de un gradiente electromagnético alterno.

En el presente trabajo describimos una metodología de síntesis reproducible para la formulación de nanopartículas constituidas por núcleos de óxido de hierro (magnetita) embebidos en una matriz de poli(ϵ -caprolactona), como sistemas transportadores del agente quimioterápico doxorubicina. A pesar de su notable actividad antitumoral, la utilización clínica de esta antraciclina se encuentra seriamente limitada por sus importantes efectos adversos (p.ej., cardiotoxicidad severa) y por el desarrollo de resistencias por las células tumorales (10, 11). La extensa caracterización fisicoquímica a realizar de los nanocompuestos magnéticos permitirá optimizar la eficacia de la estrategia de síntesis desarrollada. La compatibilidad sanguínea de las nanopartículas se investigó *in vitro* en muestras de sangre mediante el análisis del efecto que ejerce el coloide magnético sobre los procesos de hemólisis, activación plaquetaria y activación del complemento. Se analizaron dos estrategias de vehiculización de doxorubicina: adsorción superficial e incorporación en matriz (absorción), así como los principales factores implicados en el proceso, utilizando para ello la técnica de espectrofotometría ultravioleta-visible. A continuación, se investigó *in vitro* el proceso de liberación de doxorubicina desde las nanopartículas. El estudio de las propiedades magnéticas de los nanocompuestos permitió definir su capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados y de desarrollar un efecto antitumoral de hipertermia. Finalmente, se analizó la actividad anticancerosa de las nanopartículas magnetita/poli(ϵ -caprolactona) cargadas con doxorubicina en un modelo de tumor subcutáneo EMT6 inducido en ratones.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Material

Todos los reactivos químicos utilizados tenían calidad analítica (Sigma-Aldrich, Alemania). El agua utilizada en los experimentos fue desionizada y filtrada previamente con un sistema Milli-Q Academic (Millipore, Francia).

2.2. Métodos

2.2.1. Síntesis de las nanopartículas magnetita/poli(ϵ -caprolactona)

La síntesis que proponemos está basada en el método de disposición interfacial de la poli(ϵ -caprolactona), utilizado en la síntesis de nanopartículas de este polímero (véanse, p.ej., las referencias 12 y 13). Básicamente, se trata de

provocar la precipitación de la poli(ϵ -caprolactona) en un medio acuoso que contiene los núcleos del óxido de hierro (magnetita), para que así éstos queden embebidos en la matriz polimérica que se genera. Las nanopartículas de magnetita que constituyen los núcleos magnéticos de los nanocompuestos se prepararon según el método de co-precipitación en solución (14).

El proceso de síntesis de las nanopartículas magnetita/poli(ϵ -caprolactona) comienza con la adición de 10 mL de una solución al 0,3 % (p/v) de polímero en diclorometano sobre 50 mL de una suspensión acuosa de nanopartículas de magnetita (0,3 %, p/v) que contiene una concentración de pluronic® F-68 del 2 % (p/v). La adición de la fase orgánica sobre la fase acuosa se realizó bajo agitación mecánica (1200 rpm), la cuál se mantuvo durante 1 hora más. Finalmente, la limpieza de los nanocompuestos magnéticos obtenidos se realizó mediante sedimentación magnética. Para ello, la suspensión fue sometida a ciclos consecutivos de exposición a un imán de 400 mT durante 5 minutos, procediendo a la eliminación del sobrenadante tras este tiempo, y a la redispersión del sedimento en agua bidestilada. Esta rutina finalizó cuando el sobrenadante obtenido era transparente y presentaba una conductividad $< 10 \mu\text{S}/\text{cm}$.

Finalmente, con el objetivo de establecer comparaciones durante la caracterización fisicoquímica de las nanopartículas magnetita/poli(ϵ -caprolactona), realizamos también la síntesis de nanopartículas de polímero según la metodología indicada en el párrafo anterior, pero sin la utilización de los núcleos de óxido de hierro.

2.2.2. Caracterización de las nanopartículas magnetita/poli(ϵ -caprolactona)

La geometría (forma y tamaño) de las partículas de magnetita (Fe_3O_4), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) y magnetita/poli(ϵ -caprolactona) ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$) fue estudiada mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) [microscopio STEM PHILIPS CM20, Holanda] y mediante microscopía electrónica de barrido de alta resolución (FeSEM) [microscopio Zeiss DSM 950, Alemania]. La determinación del tamaño de partícula medio (\pm desviación estándar) se abordó mediante espectroscopía de correlación de fotones (PCS) [Malvern 4700 analyzer, Malvern Instruments, Inglaterra].

La caracterización de las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ además incluyó: difracción de rayos X, espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier, propiedades eléctricas superficiales (electroforesis: dependencia del potencial zeta con el pH y la fuerza iónica) y termodinámica superficial (análisis de la naturaleza hidrófila/hidrófoba). En primer lugar, realizamos un difractograma de rayos X de los tres tipos de nanopartículas (Fe_3O_4 , PCL y $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$), empleando el método de Debye-Scherrer. El dispositivo utilizado fue un difractómetro Philips

PW1710 (Holanda), y se fijó una longitud de onda de 1,5405 Å (Cu-K α). La masa utilizada en el análisis fue la misma para todos los materiales (0,5 g).

Para la preparación de las muestras a analizar mediante espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier, tomamos 1 mg de material sólido y lo mezclamos con 100 mg de bromuro potásico pulverizado y seco. A continuación, prensamos el material a 15000 kPa para obtener un disco transparente. La obtención del interferograma se realizó utilizando un espectrofotómetro de infrarrojos (Nicolet 20 SXB, EE.UU.), con una resolución de 2 cm⁻¹.

El estudio de las propiedades eléctricas superficiales de las nanopartículas (y su estabilidad en el tiempo a pH 7,4) se basó en la técnica de electroforesis. La determinación de las movilidades electroforéticas (u_e) de las distintas suspensiones acuosas se llevó a cabo utilizando un dispositivo Malvern Zetasizer 2000 (Malvern Instruments, Inglaterra). Este tipo de caracterización ya ha sido ampliamente descrita en bibliografía (13, 15, 16). Se utilizó la teoría de O'Brien y White (17) para convertir los valores de u_e en potencial zeta (ζ). Finalmente, utilizamos la técnica de electroforesis para evaluar la velocidad a la que la PCL se degrada y deja zonas cada vez mayores de magnetita expuestas al medio de dispersión. Las medidas electroforéticas de las suspensiones acuosas de nanopartículas (concentración $\approx 0,1$ %, p/v) se realizaron reproduciendo las condiciones fisiológicas que se encontrarán éstas tras su administración intravenosa (pH 7,4 \pm 0,1, y 37,0 \pm 0,5 °C). El experimento se consideró finalizado cuando los valores de u_e de las nanopartículas Fe₃O₄/PCL coincidían con los de la Fe₃O₄, señal inequívoca de la pérdida del recubrimiento polimérico (15).

El análisis termodinámico superficial de las nanopartículas se basó en el modelo desarrollado por van Oss (15, 18).

2.2.3. Propiedades magnéticas y análisis del efecto de hipertermia

Las propiedades magnéticas de la magnetita y de los nanocompuestos Fe₃O₄/PCL se definen perfectamente mediante el ciclo de histéresis. Esta caracterización macroscópica del comportamiento magnético de los coloides se realizó a 25,0 \pm 0,5 °C con la ayuda de un magnetómetro-susceptibilímetro Manics DSM-8 (Francia). Además, la capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados fue analizada cualitativamente mediante visualización del efecto que ejerce un imán permanente en una suspensión de nanopartículas. Para ello, se prepararon sendas suspensiones acuosas con una concentración del 0,1 % (p/v). A una temperatura de 25,0 \pm 0,5 °C, se puso en contacto la suspensión de Fe₃O₄ y la de Fe₃O₄/PCL con un gradiente magnético de 400 mT, y se siguió la respuesta de las nanopartículas en función del tiempo. Finalmente, el análisis del comportamiento microscópico de las suspensiones de nanocompuestos se llevó a cabo mediante microscopía óptica (magnificación: 40X), y bajo las mismas

condiciones experimentales ya descritas. Con este objetivo, se depositó una gota de suspensión de nanocompuestos en un portaobjetos y, a continuación, se localizó el imán en diferentes posiciones con respecto a la suspensión.

La capacidad de generar calor de las nanopartículas Fe₃O₄/PCL bajo la acción de un gradiente electromagnético alterno se estudió in vitro y por triplicado a 25,0 ± 0,5 °C. Para ello, se prepararon 5 mL de una suspensión acuosa de nanopartículas (10 mg/mL). La frecuencia y la intensidad del gradiente magnético utilizado fueron 250 kHz y 4 kA/m, respectivamente.

2.2.4. Compatibilidad sanguínea

Quizás una de las principales dificultades a la hora de abordar el diseño de un coloide para el transporte de fármacos sea su reducida estabilidad en contacto con la sangre y su rápido aclaramiento plasmático por el sistema retículo endotelial. Ambas circunstancias determinan que el coloide no logre mejorar la actividad del fármaco vehiculado (3, 6). Por este motivo, decidimos investigar la interacción que se produce entre las nanopartículas Fe₃O₄/PCL y los componentes sanguíneos. Para ello, se tomaron muestras de sangre de cinco mujeres adultas sanas (edad: 28–40 años), las cuáles fueron procesadas según una técnica ampliamente descrita que permite elucidar el efecto que un coloide ejerce sobre los eritrocitos, la coagulación y el sistema del complemento (19, 20). En estos experimentos (realizados por triplicado) se utilizó un tampón fosfato salino (PBS) como solución control.

2.2.5. Análisis de la capacidad de vehiculización de doxorrubicina

El diseño de nanocompuestos Fe₃O₄/PCL con el agente quimioterápico doxorrubicina incorporado se basó en dos metodologías clásicas de vehiculización de fármacos. En concreto: i) la adsorción superficial tras la formación e incubación de las nanopartículas en una disolución de principio activo (método de adsorción); y, ii) la incorporación del fármaco en el medio donde se generan las nanopartículas, de forma que quede atrapado principalmente en la matriz de éstas (método de absorción). La cuantificación de la vehiculización de doxorrubicina en los nanocompuestos se realizó mediante espectrofotometría ultravioleta-visible. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada una de las concentraciones molares de fármaco ensayadas (10⁻⁵, 10⁻⁴ y 10⁻³). Estas metodologías se encuentran detalladas en diversos trabajos de investigación (véase, p.ej., la referencia 13). La cantidad de fármaco incorporado en los nanocompuestos se expresó en términos de eficacia de atrapamiento (entrapment efficiency, EE) (%) [(fármaco vehiculado (mg) / cantidad total de fármaco utilizada (mg)) x 100] y de carga de fármaco (drug loading, DL) (%) [(fármaco vehiculado (mg) / masa total utilizada de nanopartículas (mg)) x 100].

Los ensayos de liberación in vitro de doxorubicina se realizaron utilizando las nanopartículas Fe₃O₄/PCL formuladas bajo las condiciones óptimas de vehiculización de este fármaco (ver sección 3.8.). Este ensayo se realizó por triplicado a 37,0 ± 0,5 °C, utilizando el método de diálisis, y un tampón NaOH-KH₂PO₄ (pH = 7,4 ± 0,1) como medio de liberación. Brevemente, las bolsas de diálisis (Spectrum® Spectra/Por® 6, EE.UU.) se dejaron sumergidas en agua bidestilada durante 12 horas antes de comenzar el ensayo. Estas bolsas se caracterizan por un tamaño de poro de 2000 Da, que permite retener las nanopartículas en su interior, dejando pasar únicamente la doxorubicina cedida por las nanopartículas hasta el medio de liberación. Las muestras del medio de liberación (1 mL) se recogieron según el siguiente intervalo de tiempos: 0,08, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 y 12 horas, y 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 días. Las muestras fueron analizadas mediante espectrofotometría ultravioleta-visible a la longitud de onda de máxima absorbancia de la doxorubicina (481 nm). Debe tenerse en cuenta que, para mantener las condiciones sink, es preciso reponer el medio de liberación tras cada toma de muestra con un volumen igual de la solución tampón, conservado a la misma temperatura.

2.2.6. Evaluación de la actividad antitumoral in vivo de las nanopartículas magnetita/poli(ε-caprolactona) con doxorubicina vehiculizada

En este estudio se investigó la actividad antitumoral que se obtiene tras la administración intravenosa de una suspensión de nanopartículas Fe₃O₄/PCL con doxorubicina incorporada (dosis equivalente de fármaco: 8 mg/Kg), las cuáles son guiadas magnéticamente hasta el tejido tumoral mediante un imán permanente de 400 mT. Para ello, se utilizó un modelo de ratones Balb/c con tumor subcutáneo inducido con células murinas EMT6 de cáncer de pulmón.

Los experimentos se realizaron según la normativa europea sobre el cuidado y utilización de animales de experimentación. Se utilizaron ratones Balb/c de 4 – 5 semanas de edad y con un peso medio ≈ 15 gramos, los cuáles disponían de agua y comida estándar para ratón ad libitum. El desarrollo del modelo de tumor subcutáneo en los animales implicó la inyección subcutánea (zona dorsal superior derecha) de células murinas EMT6 (10⁶ células en una suspensión acuosa de Matrigel™ enriquecida con factores de crecimiento). Una vez que los ratones desarrollaron un tumor subcutáneo palpable (tras 5 días), éstos se dividieron en 6 grupos de tratamiento con 6 animales por grupo. En concreto: grupo control (sin tratamiento), grupo tratado con una solución acuosa de doxorubicina (dosis: 8 mg/Kg), grupo (placebo) tratado con nanopartículas Fe₃O₄/PCL sin fármaco cargado y guiadas mediante un imán permanente de 400 mT (misma dosis de nanopartículas y esquema de tratamiento), grupo tratado con nanopartículas Fe₃O₄/PCL con doxorubicina incorporada (dosis equivalente de doxorubicina: 8 mg/Kg) pero sin ser guiadas magnéticamente, y grupo tratado con nanopartículas

Fe₃O₄/PCL con doxorubicina incorporada (dosis equivalente de doxorubicina: 8 mg/Kg) y guiadas mediante un imán permanente de 400 mT hasta la masa cancerosa. Todos los grupos de ratones (excepto el grupo control) recibieron el mismo esquema de tratamiento: 4 dosis intravenosas de un bolo de las formulaciones (días 6, 9, 13 y 16 tras la implantación del tumor). El imán permanente se localizó directamente sobre el tumor subcutáneo durante 2 horas, a contar desde el momento de administración de las formulaciones. La evaluación de la actividad antitumoral en cada uno de los grupos se realizó mediante medida del volumen de la masa tumoral.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Geometría de las nanopartículas magnetita/poli(ε-caprolactona)

El examen de las microfotografías electrónicas de transmisión y de barrido, junto con los datos obtenidos del análisis PCS nos permitió definir el tamaño y geometría de las partículas sintetizadas. En el caso de la magnetita, su tamaño medio de 12 ± 2 nm (Figura 1a y 2a) es característico de nanopartículas superparamagnéticas (21). El diámetro medio de las nanopartículas de polímero es de 97 ± 7 nm. En cuanto a las nanopartículas Fe₃O₄/PCL, tal y como puede apreciarse en la Figura 1c, cabe decirse que la metodología de síntesis desarrollada permite un recubrimiento polimérico eficaz de los núcleos magnéticos. Es más, cuando los núcleos de magnetita quedan embebidos en la matriz polimérica (Figura 2c), adquieren el aspecto externo de las nanopartículas de polímero (Figura 2b). Finalmente, el análisis PCS de los nanocompuestos confirmó el pequeño tamaño de éstos (86 ± 12 nm), el cuál es muy adecuado para asegurar una adecuada biodistribución tras ser administrados por vía parenteral (22).

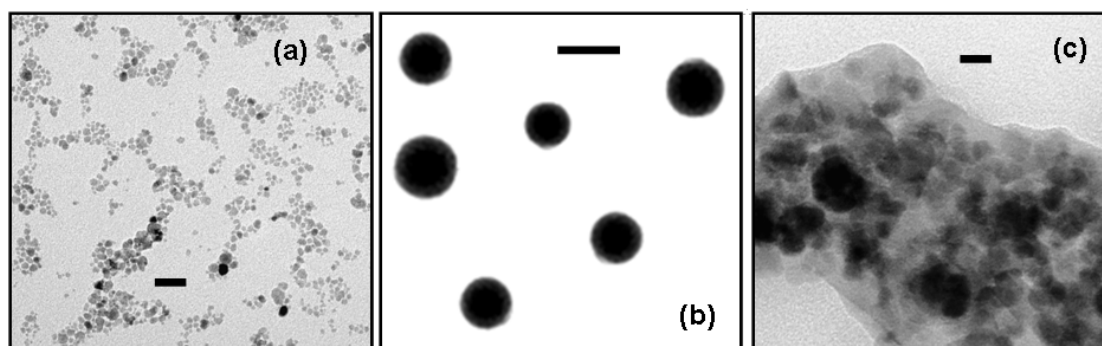


Figura 1.- Imágenes de HRTEM de las nanopartículas de magnetita (a), poli(ε-caprolactona) (b), y magnetita/poli(ε-caprolactona) (c). Longitud de barra: 100 nm (a y b), y 20 nm (c).

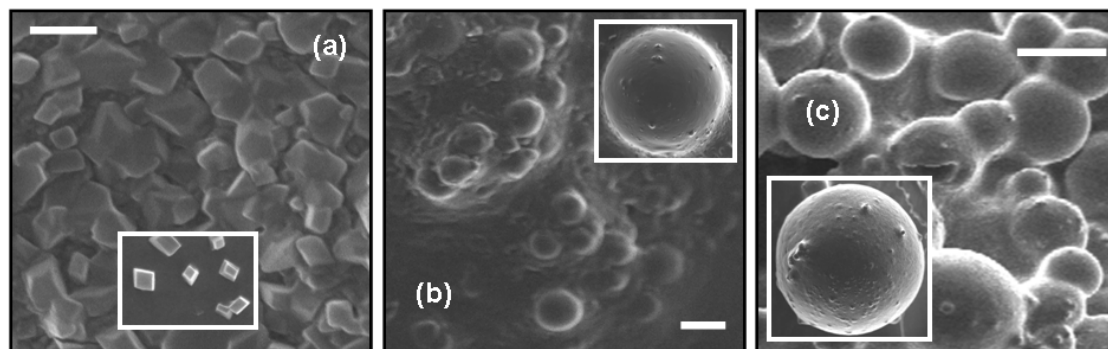


Figura 2.- Imágenes de FeSEM de las nanopartículas de magnetita (a), poli(ϵ -caprolactona) (b), y magnetita/poli(ϵ -caprolactona) (c). (Figuras insertadas: detalles de cada una de las muestras). Longitud de barra: 20 nm (a), y 100 nm (b y c).

3.2. Estructura y composición química

La Figura 3 recoge los difractogramas de rayos X obtenidos para la magnetita, el polímero y los nanocompuestos. Al comparar los difractogramas de la magnetita y de las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ con el patrón de la American Society for Testing and Materials (patrón ASTM) de la magnetita (ver el detalle de la Figura 3), se comprueba la perfecta coincidencia de las líneas de estos difractogramas con las del patrón, lo que permite identificar la muestra como magnetita y observar la elevada cristalinidad de ésta (tamaño de grano $\approx 300 \text{ \AA}$), incluso tras ser recubierta por el polímero. Las características semicristalinas de la PCL (23) quedan también reflejadas en los difractogramas del polímero y los nanocompuestos. Los picos característicos de la PCL se encuentran presentes en el difractograma de las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$, aunque con una menor intensidad. Esto es lógico si consideramos que, a igualdad de masa utilizada en el análisis, la cantidad de polímero presente en la muestra de nanocompuestos debe ser menor. Este análisis constituye una nueva prueba de la eficacia de la técnica desarrollada para la síntesis de los nanocompuestos.

En la Figura 4, se recoge el espectro de infrarrojos de los tres tipos de nanopartículas (Fe_3O_4 , PCL y $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$). Su análisis constituye una nueva prueba de la eficacia del procedimiento de síntesis de los nanocompuestos, dado que permite la identificación de los grupos funcionales del polímero en éstas. Sin embargo, las bandas son menos intensas como consecuencia de la menor cantidad de polímero presente en las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ para la misma masa de muestra. Cabe destacar además cómo la banda característica de la absorción en la magnetita (banda J, 581 cm^{-1}) (24), correspondiente a la frecuencia Restrahl (o rayo residual) de máxima absorbancia de cristales iónicos (o parcialmente iónicos) en el infrarrojo (25), sólo se encuentra además presente en el espectro de los nanocompuestos.

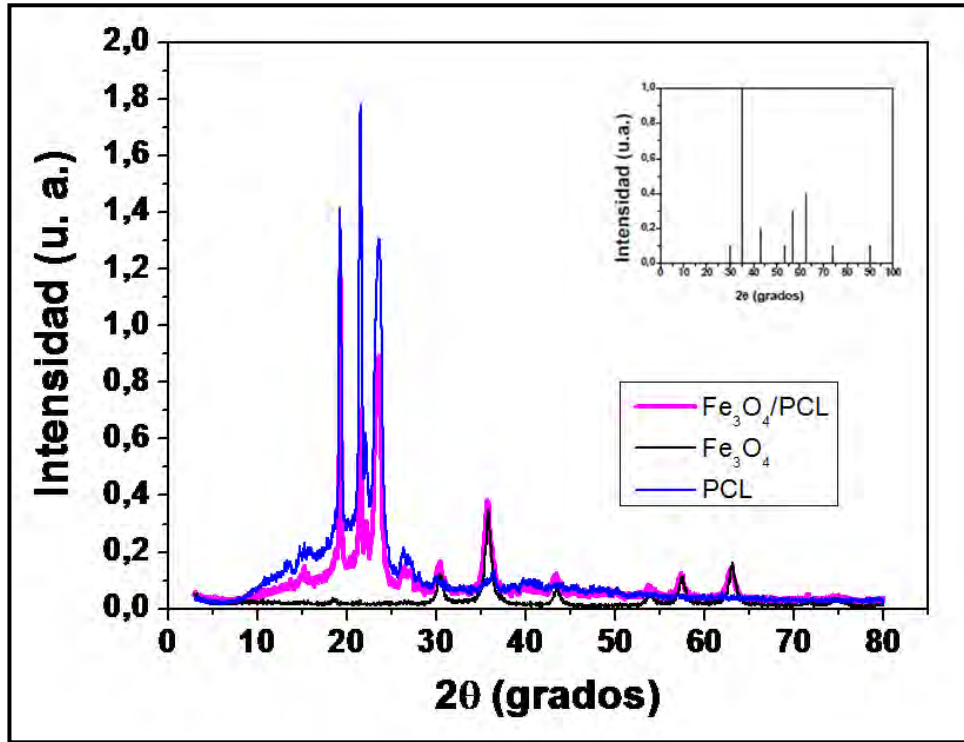


Figura 3.- Difractogramas de rayos X de las nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4 , línea negra), poli(ϵ -caprolactona) (PCL, línea azul) y magnetita/poli(ϵ -caprolactona) ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$, línea magenta). Figura insertada: patrón ASTM de la Fe_3O_4 . La intensidad se indica en unidades normalizadas.

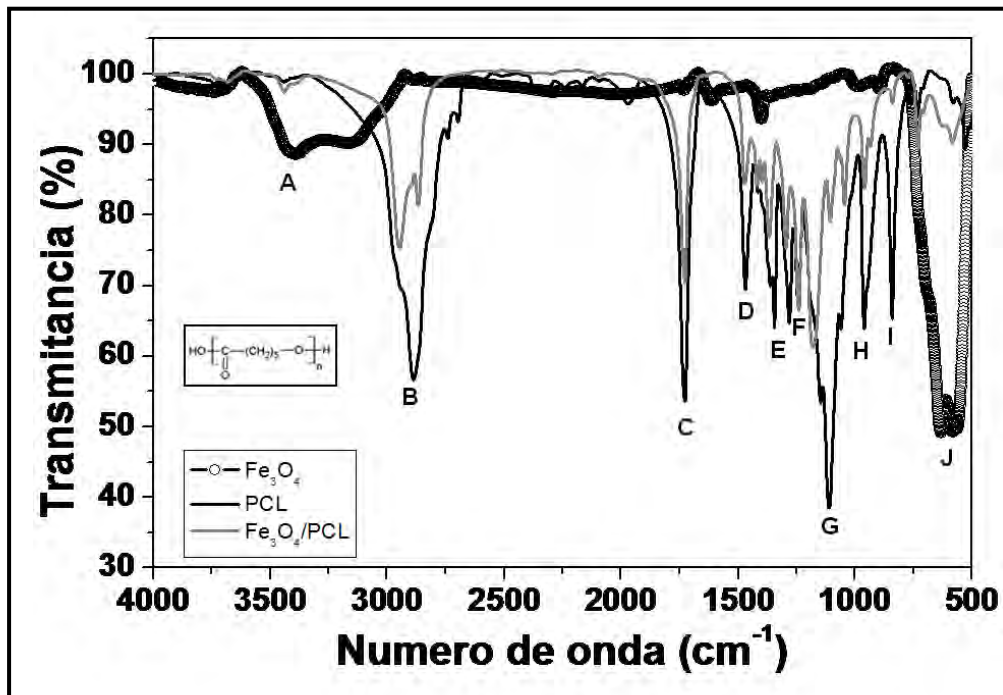


Figura 4.- Espectro de infrarrojos de las nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4 , -o-), de poli(ϵ -caprolactona) (PCL, —) y de magnetita/poli(ϵ -caprolactona) ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$, - -). Figura insertada: estructura química de la PCL.

3.3. Propiedades eléctricas superficiales

Debido a que las propiedades de los óxidos de hierro son extremadamente sensibles a las variaciones del pH (26), lo cuál no es predecible en el caso de la poli(ϵ -caprolactona) debido a la naturaleza de los grupos responsables de su carga eléctrica (ácidos carboxílicos libres) (27, 28), centramos en primer lugar nuestro estudio en el análisis del efecto del pH sobre el potencial zeta (ζ) de las nanopartículas. La Figura 5 muestra la evolución del ζ de las nanopartículas en función del pH (a fuerza iónica moderada constante: KNO_3 10^{-3} M). Como puede observarse, las nanopartículas de magnetita presentan un punto isoeléctrico o pH de potencial zeta cero bien definido \approx pH 7. Resultado que concuerda con trabajos previamente publicados (15, 26). En el caso del polímero, el punto isoeléctrico se encuentra \approx pH 5,5. A partir de estos valores, la carga eléctrica superficial de las nanopartículas poliméricas es negativa. Esta diferencia entre el comportamiento electrocinético de las nanopartículas de Fe_3O_4 y de PCL convierte a la electroforesis en una herramienta cualitativa muy útil para comprobar la eficacia del recubrimiento polimérico de los núcleos magnéticos. De hecho, la Figura 5 muestra claramente cómo las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ presentan un comportamiento casi idéntico a las de polímero puro. Por lo tanto, podemos concluir que el recubrimiento polimérico oculta muy eficazmente a la Fe_3O_4 , haciendo que la superficie de los nanocompuestos sea indistinguible de la de las nanopartículas puras de polímero.

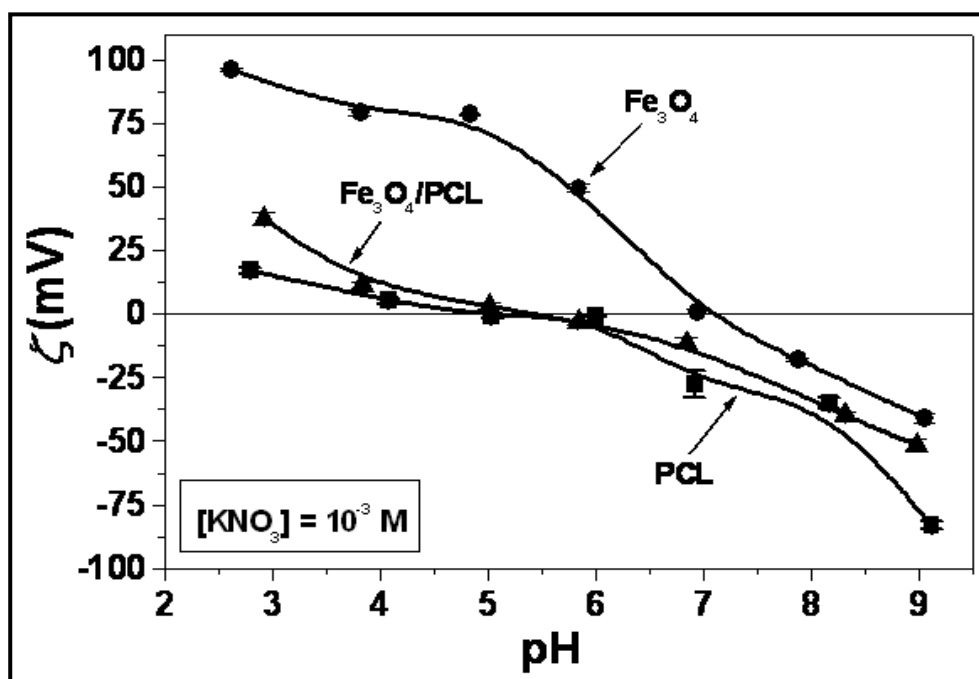


Figura 5.- Potencial zeta (ζ) de las nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4 , ●), poli(ϵ -caprolactona) (PCL, ■), y magnetita/polí(ϵ -caprolactona) ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$, ▲) en función del pH, en presencia de 10^{-3} M KNO_3 .

Para confirmar estos resultados, determinamos el ζ de las nanopartículas en función de la concentración de KNO_3 a pH natural (pH 6) (Figura 6). De nuevo, se observa claramente la similitud entre la electrocinética del polímero y de las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$, y las diferencias con respecto a la magnetita.

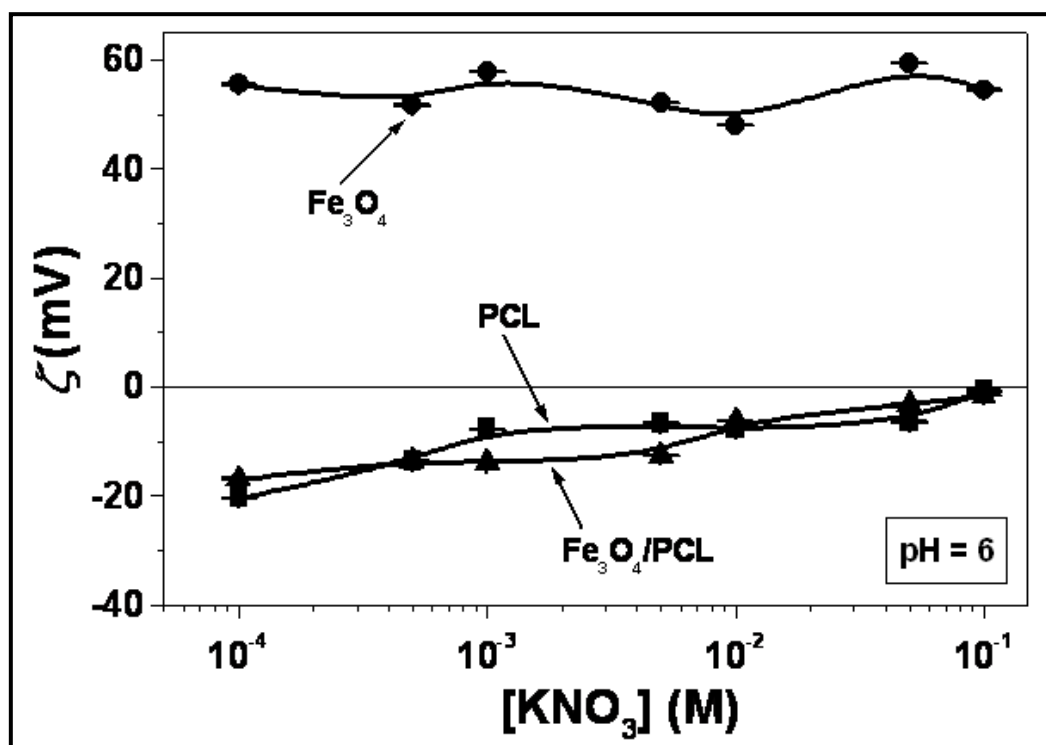


Figura 6.- Potencial zeta (ζ) de las nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4 , ●), poli(ϵ -caprolactona) (PCL, ■), y magnetita/poli(ϵ -caprolactona) ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$, ▲) en función de la concentración de KNO_3 , a pH 6.

Con toda esta información podemos argumentar el mecanismo por el que la matriz de PCL se deposita sobre los núcleos de Fe_3O_4 y los engloba. Pensamos que ocurre una interacción electrostática netamente atractiva entre las nanopartículas de Fe_3O_4 con carga eléctrica positiva y el polímero con carga eléctrica negativa. Recuérdese que las condiciones ligeramente ácidas en las que se formulan los nanocompuestos (pH 6) determinan estas cargas eléctricas superficiales (Figura 5). Gracias a esta interacción atractiva, el polímero se concentra sobre la superficie de la magnetita. Hecho que favorece la inclusión de los núcleos superparamagnéticos en el interior de la matriz polimérica y, por lo tanto, la formación de las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$.

La electroforesis se utilizó también para caracterizar la velocidad a la que se produce la degradación de la matriz de PCL, proceso que deja libre las nanopartículas de Fe_3O_4 . El interés de este estudio radica en que, asumiendo que la

liberación del fármaco podría ocurrir al degradarse la matriz polimérica que lo contiene, mediante esta técnica podríamos acceder a una evaluación preliminar de la cinética de este proceso. En la Figura 7 se aprecia cómo los valores de u_e de la magnetita permanecen constantes durante todo el período del estudio ($u_e \approx -3,5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}/\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$). Estos valores negativos tan elevados pueden atribuirse a la formación sobre su superficie de una fina capa de oxidación (maghemita, un estado más oxidado de la Fe_3O_4) (26). De hecho, los valores de u_e de nanopartículas de maghemita de igual tamaño a la Fe_3O_4 (bajo las mismas condiciones experimentales) son muy similares ($u_e \approx -3,6 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}/\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$). Esta Figura muestra cómo los valores de u_e de nanocompuestos se aproximan progresivamente a los característicos de los núcleos magnéticos. En concreto, se hacen iguales tras 15 días. Por lo tanto, podría decirse que la superficie de los núcleos de Fe_3O_4 de los nanocompuestos queda cada vez más expuesta al medio de dispersión (de ahí los valores cada vez más negativos de u_e), al producirse la degradación progresiva del recubrimiento polimérico. Así, cuando la cubierta de PCL se pierde completamente, ambos valores de u_e se hacen indistinguibles. La velocidad de degradación del polímero (y por lo tanto de liberación del principio activo vehiculizado, ver Figura 15) es lenta, lo que ha sido asociado al alto grado de cristalinidad y a la gran hidrofobia de la PCL (23, 27).

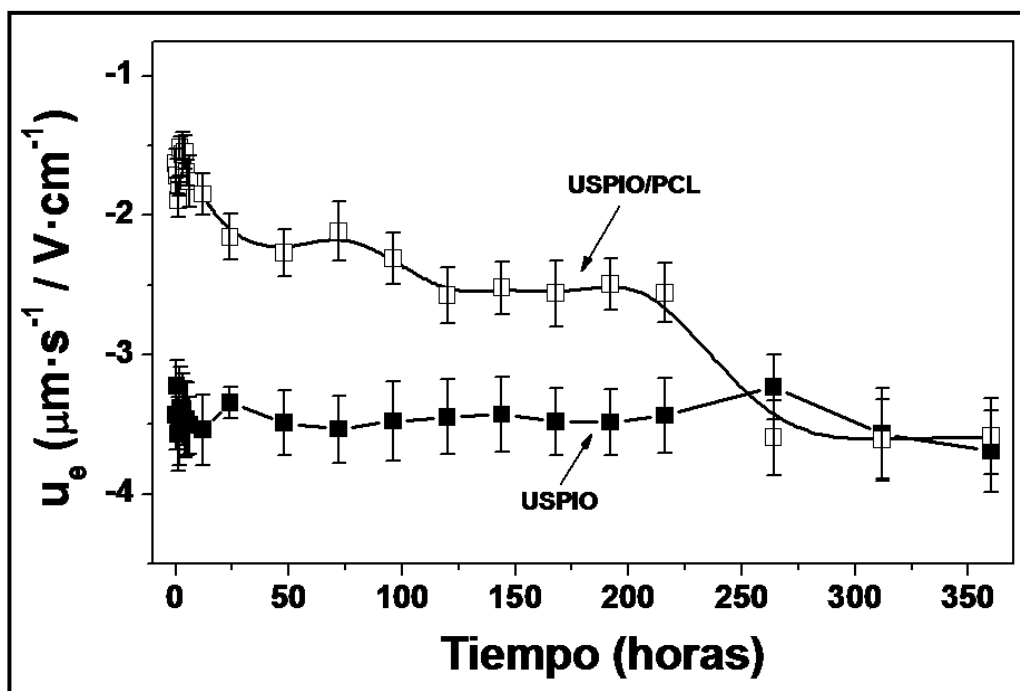


Figura 7.- Movilidad electroforética (u_e) de las nanopartículas de Fe_3O_4 (USPIO, ■) y de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ (USPIO/PCL, □) en función del tiempo, a $\text{pH} = 7,4 \pm 0,1$, y a $37,0 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.4. Termodinámica superficial

La Figura 8 recopila los valores promedio de los ángulos de contacto obtenidos tras realizar 16 determinaciones en las muestras de nanopartículas, midiendo sobre una nueva gota después de cada dos medidas. Los resultados obtenidos destacan la existencia de importantes diferencias entre los núcleos de óxido de hierro y las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$.

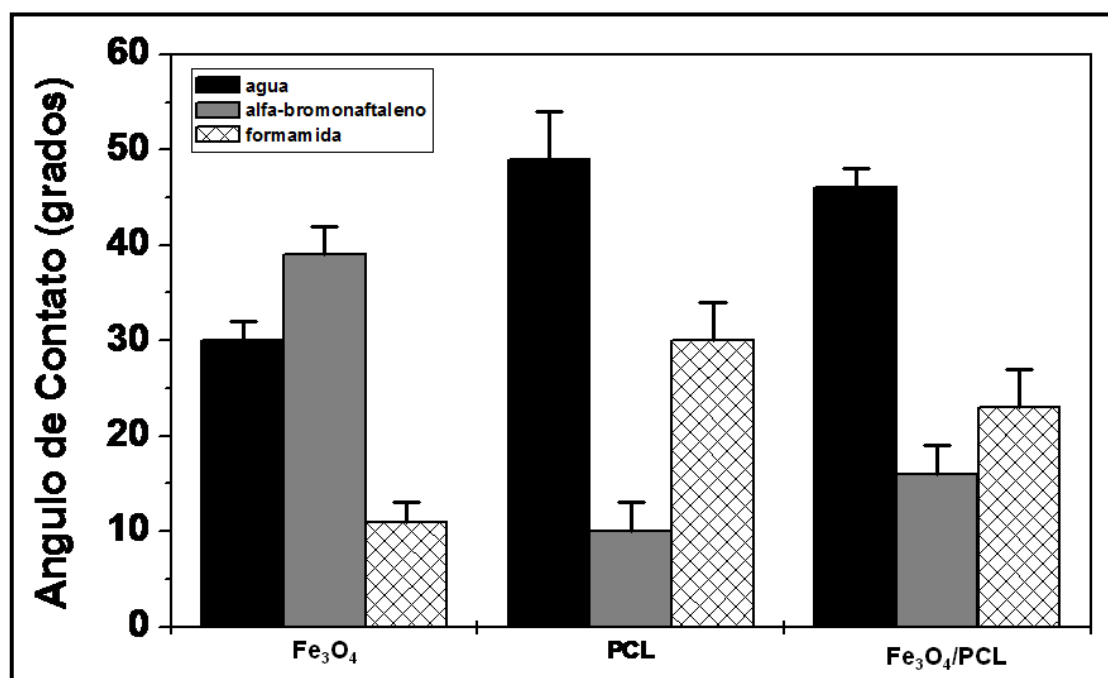


Figura 8.- Ángulos de contacto (grados) de los líquidos utilizados en las determinaciones con nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) y magnetita/poli(ϵ -caprolactona) ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$).

Sin embargo, la obtención de una información física veraz sobre la termodinámica de los tres tipos de nanomateriales hace precisa la evaluación de las componentes de la energía libre superficial (γ_s) de cada uno de ellos. Los datos representados en la Figura 9 confirman las estimaciones basadas en la experiencia de electroforesis sobre la eficacia del recubrimiento de los núcleos magnéticos. En particular, para cualquier componente de la energía libre superficial considerado, sus valores para las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ coinciden casi totalmente con los del polímero puro. Además, a pesar de que la componente Lifshitz-van der Waals (γ_s^{LW}) es la menos afectada por el tratamiento superficial, como suele ser habitual (15, 29). Su valor para los nanocompuestos es casi el mismo que para el polímero. A pesar de que la componente electrón-aceptor (γ_s^+) es muy pequeña para los tres tipos de nanomateriales, su magnitud para las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ es

virtualmente cero e idéntica a la de la PCL. La contribución electrón-donante (γ_s^-) muestra una diferencia mucho más notable entre los núcleos de óxido de hierro y los nanocompuestos. El elevado valor de esta última componente en el caso de la magnetita confirma su carácter monopolar electrón-donante. Según van Oss (18), esto quiere decir que la magnetita puede tener interacciones ácido-base con fases de cualquier polaridad (γ^+ , γ^- , o ambas, diferentes de cero) pero las fuerzas AB no contribuyen a su energía libre de cohesión. A la vista de estos resultados, (junto con el análisis electrocinético de los nanomateriales), podemos afirmar que el recubrimiento de los núcleos magnéticos es completo bajo las condiciones de síntesis propuestas.

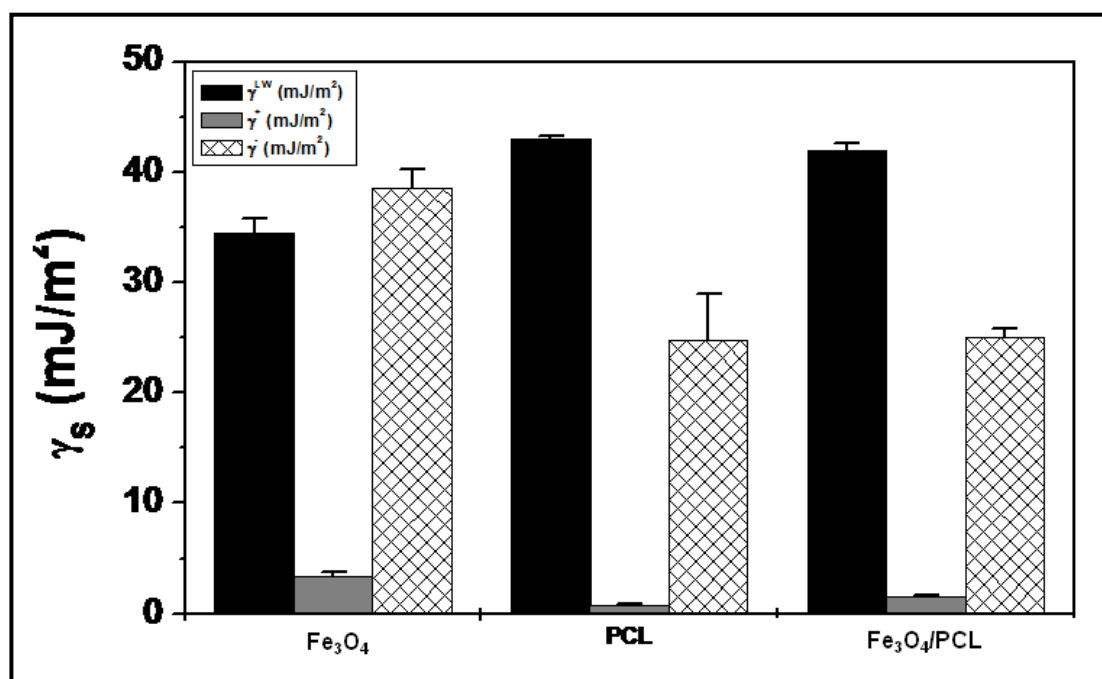


Figura 9.- Componentes de la energía libre superficial (mJ/m²) de las nanopartículas de magnetita (Fe₃O₄), poli(ε-caprolactona) (PCL) y magnetita/poli(ε-caprolactona) (Fe₃O₄/PCL).

Finalmente, la utilización del modelo de van Oss permite relacionar los valores de energía libre superficial de las nanopartículas con su carácter hidrófobo/hidrófilo (18). En concreto si la variación de la energía libre superficial (ΔG_{121}) de los nanomateriales resulta ser negativa, las interacciones interfaciales favorecen la atracción entre sí de las nanopartículas, y se consideran hidrófobas. Por el contrario, la hidrofilia se corresponde con valores positivos de ΔG_{121} . La Figura 10, muestra los resultados obtenidos para los tres tipos de nanomateriales. Como puede apreciarse, la naturaleza hidrófila de la magnetita se pierde al ser recubierta por el polímero hidrófobo, lo que puede considerarse como un indicio

muy claro de la eficacia de la metodología desarrollada de síntesis de nanopartículas Fe₃O₄/PCL.

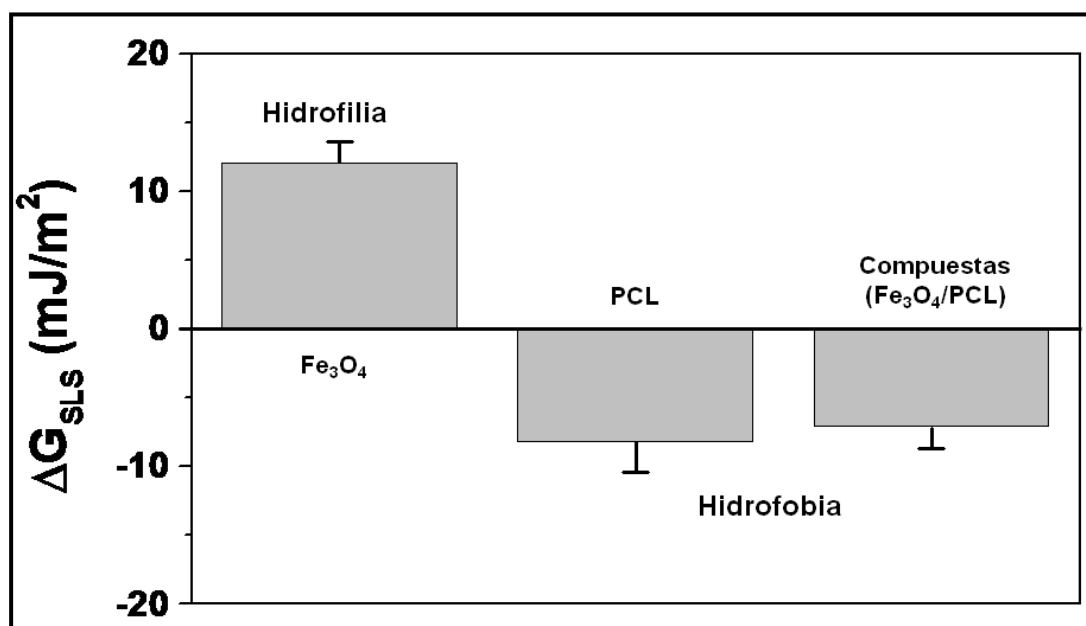


Figura 10.- Valores de ΔG_{121} (mJ/m²) y carácter hidrófilo/hidrófobo de las nanopartículas de magnetita (Fe₃O₄), poli(ε-caprolactona) (PCL) y magnetita/poli(ε-caprolactona) (Fe₃O₄/PCL).

3.5. Propiedades magnéticas

La Figura 11 recoge el ciclo de histéresis de las nanopartículas de Fe₃O₄ y de Fe₃O₄/PCL. En el caso de los núcleos de magnetita, como era de esperar (por su tamaño) no se observa histéresis por el carácter superparamagnético de éstos (21). De la región lineal del ciclo de histéresis (zona de campo magnético bajo) puede estimarse la susceptibilidad magnética inicial (χ_i) de los nanocompuestos: $3,13 \pm 0,17$; y, el valor de la magnetización de saturación 258 ± 7 emu/g. Estas excelentes propiedades magnéticas de las nanopartículas Fe₃O₄/PCL nos hacen pensar que el sistema coloidal diseñado tiene las características adecuadas para su utilización en el transporte de fármacos: un recubrimiento polimérico que permitirá la incorporación de cantidades adecuadas de fármaco y su liberación a una velocidad controlable, junto con una más que adecuada capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados. Esta última propiedad debe mejorar notablemente la concentración de los nanocompuestos en el lugar de acción y, de esta manera, la completa acumulación de la dosis de fármaco en esta región. Bajo estas condiciones debe potenciarse el efecto farmacológico del principio activo vehiculizado, al igual que además debe minimizarse la toxicidad asociada a una extensa biodistribución.

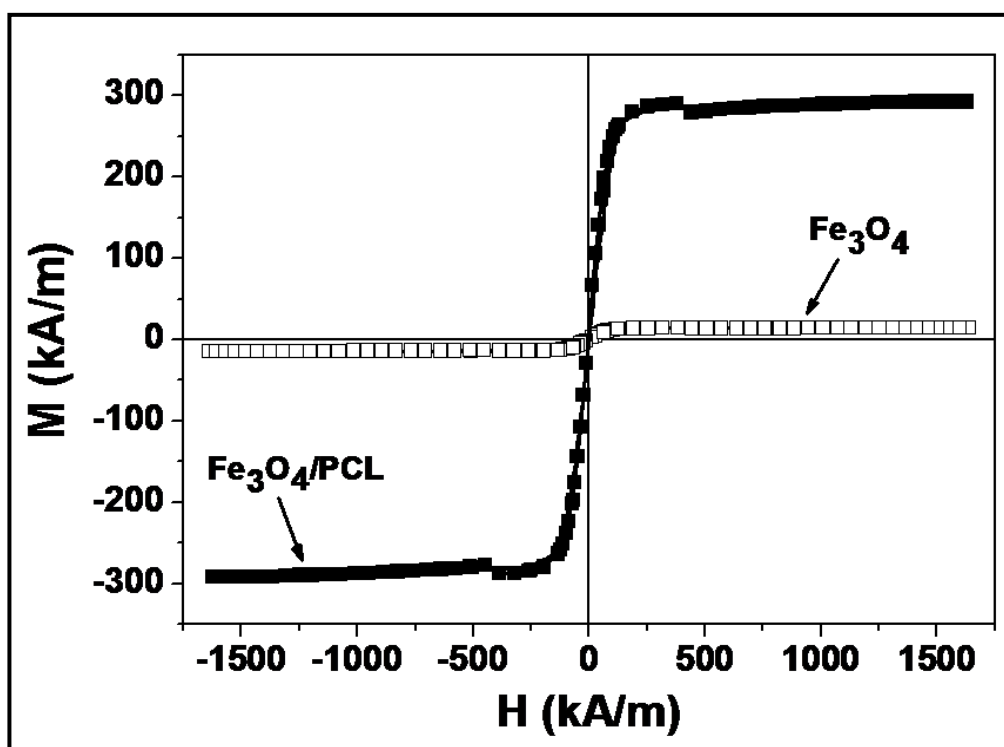


Figura 11.- Ciclo de histéresis de las nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4 , \square) y de magnetita/poli(ϵ -caprolactona) ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$, \blacksquare).

La capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados de las nanopartículas de Fe_3O_4 y de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ se estudió también de forma cualitativa mediante la visualización del efecto que ejerce un imán permanente de 400 mT sobre una suspensión de nanopartículas. Las fotos recogidas en la Figura 12 muestran cómo los nanocompuestos son atraídos muy rápidamente por el imán, quedando el sobrenadante completamente transparente en menos de 1 minuto. Por el contrario, la suspensión de nanopartículas de Fe_3O_4 mantiene su aspecto homogéneo incluso tras 24 horas de exposición al gradiente magnético. El carácter superparamagnético de las nanopartículas de Fe_3O_4 justifica la ausencia de respuesta magnética (21).

Con el fin de analizar el comportamiento microscópico de las suspensiones de nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$, realizamos un seguimiento mediante microscopía óptica de éstas. Como puede apreciarse en la Figura 13a, la suspensión de nanocompuestos es muy homogénea en ausencia del gradiente magnético. Sin embargo, cuando la gota de suspensión queda bajo la influencia del imán permanente de 400 mT, las nanopartículas tienden a formar agregados en forma de cadenas paralelas a la dirección del gradiente magnético (Figura 13b en adelante). Este comportamiento puede explicarse si tenemos en cuenta la mayor

importancia de las interacciones magnéticas en comparación con las interacciones coloidales de tipo DLVO (principalmente, interacciones electrostáticas tipo van der Waals y de hidratación o ácido-base) que se producen entre los nanocompuestos.

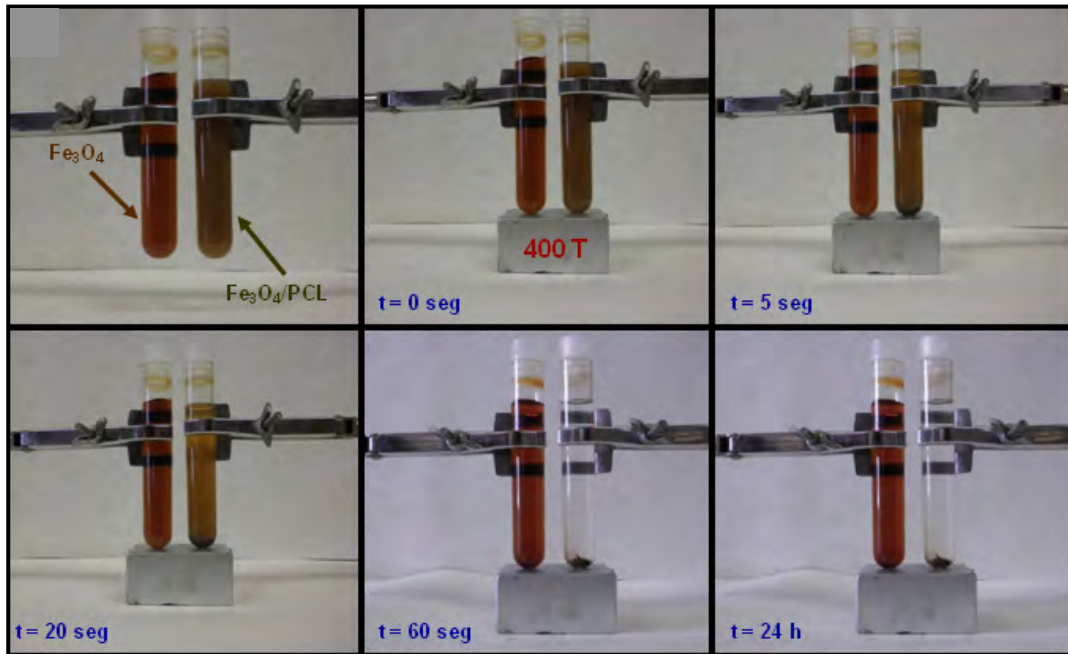


Figura 12.- Observación visual de la decantación magnética de las nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) y de magnetita/poli(ϵ -caprolactona) ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$) bajo la influencia de un imán permanente de 400 mT localizado debajo de las muestras.

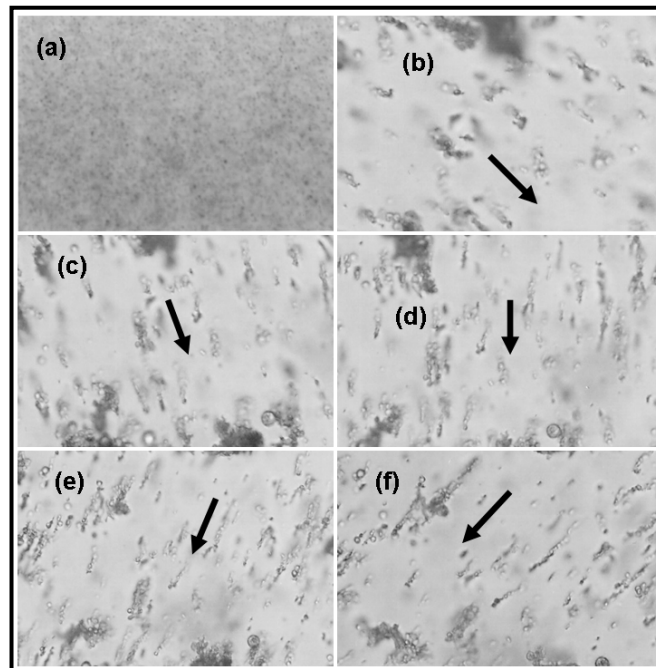


Figura 13.- Microfotografía óptica (magnificación: 40X) de una suspensión acuosa de nanopartículas de magnetita/poli(ϵ -caprolactona) en ausencia (a) o bajo la influencia (b, c, d, e, f) de un gradiente magnético externo de 400 mT (en la dirección de la flecha).

3.6. Efecto de hipertermia

La Figura 14 muestra el calentamiento *in vitro* en función del tiempo de una suspensión acuosa de nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$. Bajo la exposición a un gradiente electromagnético alterno de alta frecuencia, la oscilación de los momentos magnéticos de los nanocompuestos provoca que éstos generen calor, alcanzándose la temperatura mínima de hipertermia ($\approx 41^\circ\text{C}$) tras 25 minutos. La suspensión alcanza una temperatura máxima de 45°C tras 35 minutos. Este efecto de hipertermia es consecuencia de una pérdida de histéresis magnética por parte de las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ (7, 9). Como puede apreciarse en la Figura, la temperatura se mantiene estable hasta la finalización del experimento, circunstancia especialmente interesante ya que el calentamiento a esta temperatura de las células tumorales durante 30 minutos, les provoca daños irreversibles e induce su muerte (30). Este fenómeno demuestra el buen control sobre la temperatura y el flujo de calor que ofrecen los nanocompuestos, un requisito básico para su aplicación en hipertermia. Debe considerarse además que si la temperatura hubiera seguido aumentando sin control ($>48^\circ\text{C}$), los tejidos sanos que rodean la masa tumoral se quemarían y morirían (31). Este efecto también ha sido relacionado con la activación específica de la liberación de fármacos en el intersticio tumoral (32) y con el aumento de la permeabilidad de las membranas biológicas a las nanopartículas (33).

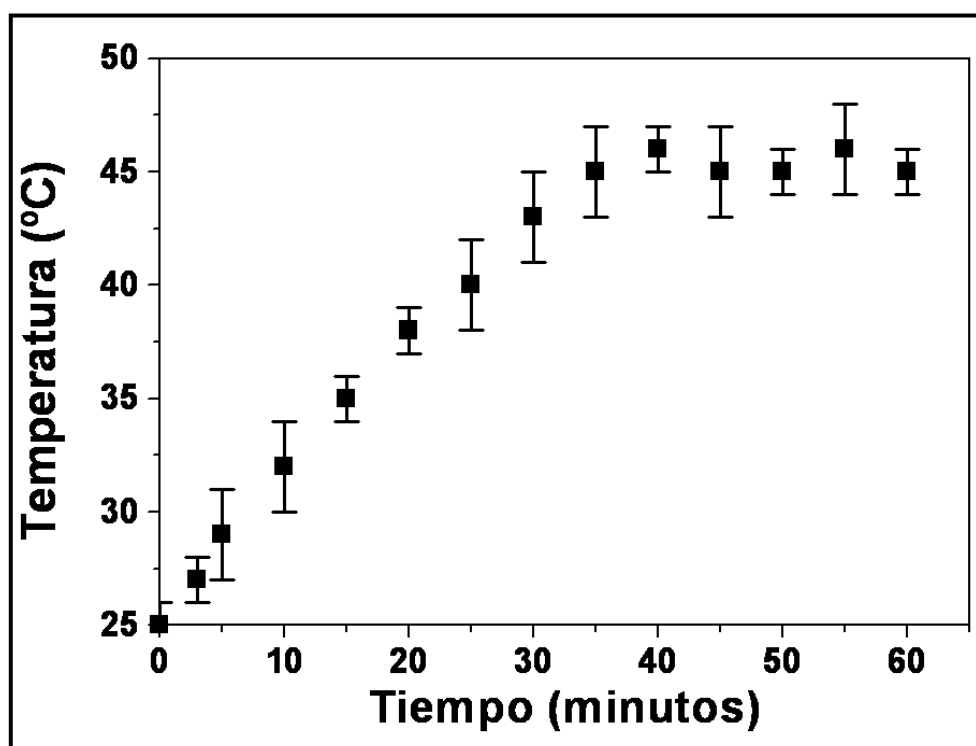


Figura 14.- Curva de calentamiento de una suspensión de nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ (10 mg/mL) bajo la acción de un gradiente electromagnético alterno (frecuencia e intensidad: 250 kHz y 4 kA/m, respectivamente).

3.7. Compatibilidad sanguínea

La Tabla 1 recoge los resultados del test de compatibilidad sanguínea de las nanopartículas Fe₃O₄/PCL. El análisis de estos datos en comparación con los obtenidos para la muestra control, nos revela cómo los nanocompuestos presentan un efecto despreciable sobre los procesos de hemólisis, activación del complemento y generación de selectina P. De esta forma, el test sugiere que las nanopartículas Fe₃O₄/PCL presentan un margen de seguridad in vivo amplio y adecuado para la vía de administración intravenosa (19).

Tabla 1.- Compatibilidad sanguínea de las nanopartículas magnetita/poli(ε-caprolactona) (Fe₃O₄/PCL) en términos de hemólisis (%), activación plaquetaria [generación de selectina P (ng/mL)] y activación del complemento [producción de C3a en la forma del péptido C3a-desArg (ng/mL)]. Los datos se expresan como valor medio ± desviación estándar (n = 5).

Muestra	Hemólisis (%)	Selectina P (ng/mL)	C3a-desArg (ng/mL)
Nanopartículas Fe₃O₄/PCL	1,9 ± 0,1	77 ± 6	296 ± 9
Control (solución PBS)	0	115 ± 4	281 ± 12

3.8. Evaluación de la capacidad de vehiculización de doxorubicina

Los resultados obtenidos en el ensayo de incorporación de doxorubicina sobre la superficie de las nanopartículas Fe₃O₄/PCL se recogen en la Tabla 2. Si bien los valores obtenidos de adsorción pueden considerarse bajos, se observa un efecto positivo de la concentración molar de fármaco utilizada sobre este proceso.

Tabla 2.- Valores de entrapment efficiency (EE, %) y drug loading (DL, %) de la doxorubicina en las nanopartículas Fe₃O₄/PCL, mediante adsorción superficial y en función de la concentración molar de fármaco.

Doxorrubicina (M)	EE (%)	DL (%)
10 ⁻⁵	8,93 ± 0,37	0,05 ± 0,01
10 ⁻⁴	22,62 ± 0,21	0,13 ± 0,02
10 ⁻³	29,36 ± 0,41	1,62 ± 0,11

Una vez caracterizada la escasa incorporación de la doxorubicina en la superficie de los nanocompuestos, nos centramos en el estudio de la contribución del, a priori, principal método de vectorización de fármacos: la incorporación del principio activo en el medio donde se generan las nanopartículas. En este estudio también analizamos el efecto que la concentración de fármaco ejerce sobre la vehiculización en matriz. La Tabla 3 recoge la cantidad de doxorubicina

incorporada en los nanocompuestos para diferentes concentraciones de fármaco utilizadas. Como puede apreciarse, la absorción de doxorubicina en la matriz de las nanopartículas Fe₃O₄/PCL aumenta con la concentración de ésta presente en el medio de síntesis. Los valores obtenidos de incorporación de fármaco son claramente superiores a los alcanzados mediante el procedimiento de adsorción superficial (a iguales concentraciones de principio activo; ver Tabla 2), lo que justifica la selección del método de vehiculización mediante absorción en matriz como el más adecuado para la formulación de nanopartículas Fe₃O₄/PCL cargadas con doxorubicina.

Tabla 3.- Valores de entrapment efficiency (EE, %) y drug loading (DL, %) de la doxorubicina en la las nanopartículas Fe₃O₄/PCL, mediante absorción y en función de la concentración molar de fármaco.

Doxorrubicina (M)	EE (%)	DL (%)
10 ⁻⁵	9,24 ± 0,83	0,07 ± 0,01
10 ⁻⁴	56,12 ± 1,08	0,52 ± 0,06
10 ⁻³	62,34 ± 1,26	0,57 ± 0,08

Las nanopartículas Fe₃O₄/PCL, formuladas bajo las condiciones óptimas de vehiculización de doxorubicina (concentración de fármaco: 10⁻³ M, tanto mediante adsorción como por absorción) se utilizaron en los ensayos in vitro de liberación. Los resultados de este ensayo se recogen en la Figura 15. Se observa cómo cuando se incorpora esta molécula exclusivamente en la superficie de las nanopartículas mediante adsorción, la liberación de la dosis vehiculizada ocurre en sólo 4 horas. Por el contrario, si la incorporación de doxorubicina se realiza mediante el método de absorción en matriz, el 17 % de la dosis vehiculizada se libera durante la primera hora, mientras que el 83 % restante mucho más progresivamente durante 11 días. Para completar el análisis de este proceso de liberación de doxorubicina, conviene recordar que la técnica de electroforesis nos permitió caracterizar cualitativamente un proceso de degradación de la matriz polimérica próximo a las dos semanas de duración (Figura 7), lo cual coincide con el tiempo total preciso para que todas las moléculas de doxorubicina se liberen de los nanocompuestos.

El proceso de liberación de doxorubicina es claramente bifásico cuando la dosis de principio activo se incorpora en las nanopartículas Fe₃O₄/PCL mediante el procedimiento de absorción en matriz. La liberación consta de una fase rápida que probablemente significa la pérdida del principio activo asociado a la superficie o débilmente atrapado (adsorbido en los poros superficiales). La liberación de doxorubicina más sostenida en el tiempo durante la segunda fase, podría deberse

a un proceso combinado de difusión del fármaco a través de la matriz polimérica y de degradación de esta matriz.

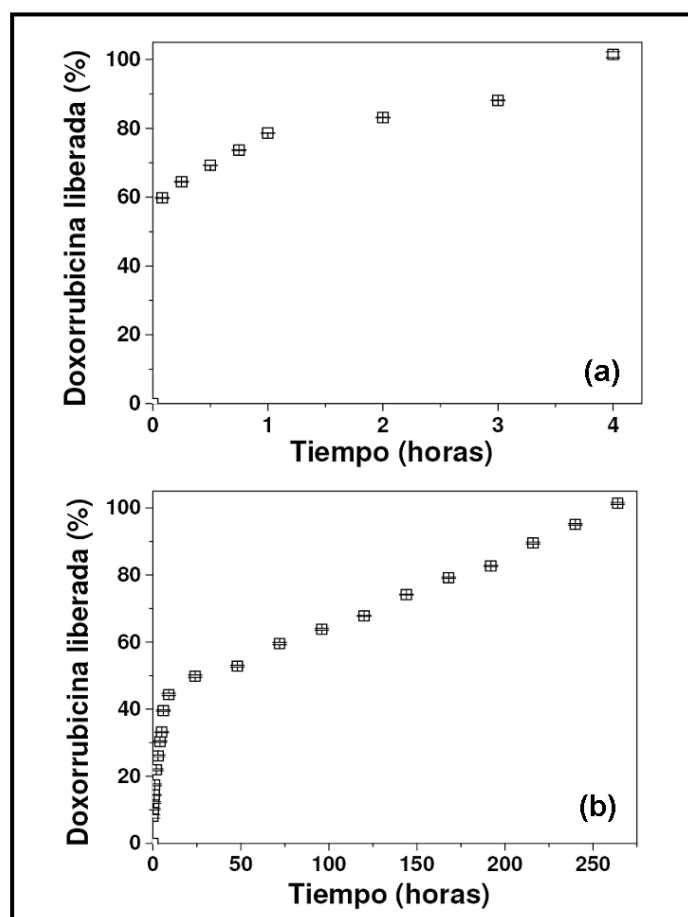


Figura 15.- Liberación de doxorubicina (%) adsorbida (a), y (b) absorbida desde las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ en función del tiempo de incubación en una solución tampón $\text{NaOH-KH}_2\text{PO}_4$ ($\text{pH} = 7,4 \pm 0,1$) a $37,0 \pm 0,5$ °C.

3.9. Evaluación de la actividad antitumoral in vivo de las nanopartículas magnetita/poli(ϵ -caprolactona) con doxorubicina vehiculizada

Este estudio, pretende definir la actividad antitumoral de nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ con doxorubicina incorporada (dosis equivalente de fármaco: 8 mg/Kg) y guiadas mediante un imán permanente de 400 mT. En concreto, en un modelo de ratones Balb/c con tumor subcutáneo inducido con células murinas EMT6 de cáncer de pulmón.

Como puede apreciarse en la Figura 16, no se obtuvo efecto antitumoral alguno en el grupo (placebo) de ratones tratado con nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ (sin fármaco unido) guiadas magnéticamente (misma dosis de nanopartículas y esquema de tratamiento). Se observa además una menor actividad antitumoral en

el grupo tratado con nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ con doxorubicina incorporada (dosis equivalente de fármaco: 8 mg/Kg) pero sin ser guiadas magnéticamente, en comparación con el grupo tratado con una solución acuosa de doxorubicina (dosis: 8 mg/Kg). Sin embargo, la mayor eficacia antitumoral ($p < 0,05$) se observa en el grupo de ratones tratado con nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ con doxorubicina incorporada (dosis equivalente de fármaco: 8 mg/Kg) y guiadas mediante un imán permanente de 400 mT, en comparación con el resto de grupos de tratamiento. Creemos que estos interesantes resultados son consecuencia de una mayor acumulación de las nanopartículas (y, por lo tanto, de la dosis de fármaco) en el tejido tumoral, gracias al menor tamaño de éstas y a su elevada capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados.

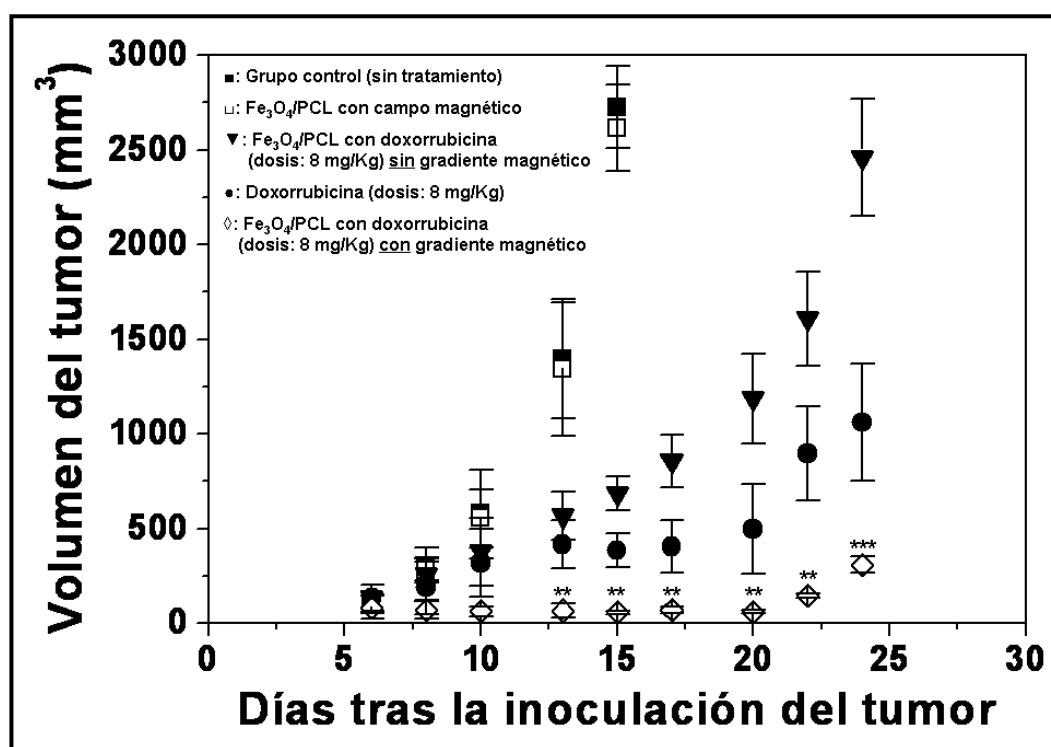


Figura 16.- Actividad antitumoral in vivo (en ratones Balb/c con tumor subcutáneo inducido con células murinas EMT6 de cáncer de pulmón) de las nanopartículas magnetita/poli(ϵ -caprolactona) ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$) con doxorubicina incorporada (dosis equivalente de fármaco: 8 mg/Kg) y guiadas mediante un imán permanente de 400 mT (\diamond), en comparación con un grupo control (sin tratamiento, \blacksquare), nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ (sin fármaco) guiadas mediante el imán permanente (grupo placebo, misma dosis de nanopartículas y esquema de tratamiento, \square), nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ con doxorubicina incorporada (dosis equivalente de fármaco: 8 mg/Kg) pero sin ser guiadas magnéticamente (\blacktriangledown), y una solución acuosa de doxorubicina (dosis: 8 mg/Kg, \bullet). Análisis estadístico realizado utilizando el test t de Student. Los valores marcados con ** $p < 0,05$, y *** $p < 0,001$ se consideran estadísticamente significativos y muy significativos, respectivamente.

4. CONCLUSIONES

El presente trabajo de investigación pone de manifiesto que las nanopartículas magnetita/poli(ϵ -caprolactona) constituyen una plataforma ideal para el transporte de doxorrubicina hasta la masa tumoral, proceso facilitado enormemente por su óptima capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados. La extensa caracterización fisicoquímica realizada ha permitido definir las condiciones óptimas de síntesis de estos nanocompuestos. Consideramos que el método de formulación es reproducible, sencillo y asequible económicamente. La capacidad de las nanopartículas magnetita/poli(ϵ -caprolactona) para la hipertermia, su compatibilidad sanguínea, y los excelentes resultados obtenidos en cuanto a mejora de la actividad antitumoral de doxorrubicina, nos hacen pensar que esta nanoplataforma podría ser utilizada en el diseño de una terapia combinada (quimioterapia optimizada + hipertermia) muy eficaz contra el cáncer.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación económica procedente del proyecto PE2008-FQM-3993 (Junta de Andalucía, España).

6. REFERENCIAS

1. Couvreur, P., & Vauthier, C. (2006). Nanotechnology: Intelligent design to treat complex disease. *Pharmaceutical Research*, 23(7), 1417-1450.
2. Zhang, D. Y., Shen, X. Z., Wang, J. Y., Dong, L., Zheng, Y. L., & Wu, L. L. (2008). Preparation of chitosan-polyaspartic acid-5-fluorouracil nanoparticles and its anti-carcinoma effect on tumor growth in nude mice. *World Journal of Gastroenterology*, 14(22), 3554-3562.
3. Arias, J. L. (2011). Drug targeting strategies in cancer treatment: An overview. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 11(1), 1-17.
4. Davis, M. E., Chen, Z., & Shin, D. M. (2008). Nanoparticle therapeutics: An emerging treatment modality for cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(9), 771-782.
5. Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z., & Shin, D. M. (2008). Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(5), 1310-1316.
6. Durán, J. D. G., Arias, J. L., Gallardo, V., & Delgado, A. V. (2008). Magnetic colloids as drug vehicles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(8), 2948-2983.
7. Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Elst, L. V., & Muller, R. N. (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chemical Reviews*, 108(6), 2064-2110.
8. Arruebo, M., Fernández-Pacheco, R., Ibarra, M. R., & Santamaría, J. (2007). Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today*, 2(3), 22-32.
9. Hergt, R., Dutz, S., Müller, R., & Zeisberger, M. (2006). Magnetic particle hyperthermia: Nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18(38), S2919-S2934.
10. Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., & Gianni, L. (2004). Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, 56(2), 185-229.

11. Sun, J. B., Duan, J. H., Dai, S. L., Ren, J., Zhang, Y. D., Tian, J. S., & Li, Y. (2007). *In vitro* and *in vivo* antitumor effects of doxorubicin loaded with bacterial magnetosomes (DBMs) on H22 cells: The magnetic bio-nanoparticles as drug carriers. *Cancer Letters*, 258(1), 109-117.
12. Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. Ph., Ammoury, N., & Benita, S. (1989). Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, 55(1), R1-R4.
13. Arias, J. L., López-Viota, M., Sáez-Fernández, E., & Ruiz, M. A. (2010). Formulation and physicochemical characterization of poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles loaded with ftorafur and diclofenac sodium. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(1), 204-208.
14. Massart, R. (1981). Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Transactions on Magnetics*, 17(2), 1247-1248.
15. Arias, J. L., Gallardo, V., Gómez-Lopera, S. A., Plaza, R. C., & Delgado, A. V. (2001). Synthesis and characterization of poly(ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core. *Journal of Controlled Release*, 77(3), 309-321.
16. Arias, J. L., Reddy, L. H., & Couvreur, P. (2009). Polymeric nanoparticulate system augmented the anticancer therapeutic efficacy of gemcitabine. *Journal of Drug Targeting*, 17(8), 586-598.
17. O'Brien, R. W., & White, L. R. (1978). Electrophoretic mobility of a spherical colloidal particle. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics*, 74, 1607-1624.
18. van Oss, C. J. (2006). *Interfacial forces in aqueous media* (2nd ed.) Boca Raton: CRC Press.
19. Dash, B. C., Réthoré, G., Monaghan, M., Fitzgerald, K., Gallagher, W., & Pandit, A. (2010). The influence of size and charge of chitosan/polyglutamic acid hollow spheres on cellular internalization, viability and blood compatibility. *Biomaterials*, 31(32), 8818-8197.
20. Arias, J. L., López-Viota, M., Sáez-Fernández, E., Ruiz, M. A., & Delgado, A. V. (2011). Engineering of an antitumor (core/shell) magnetic nanoformulation based on the chemotherapy agent ftorafur. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 384(1-3), 157-163.
21. López-López, M. T., Durán, J. D. G., Delgado, A. V., & González-Caballero, F. (2005). Stability and magnetic characterization of oleate-covered magnetite ferrofluids in different nonpolar carriers. *Journal of Colloid Interface Science*, 291(1), 144-151.
22. Decuzzi, P., Pasqualini, R., Arap, W., & Ferrari, M. (2009). Intravascular delivery of particulate systems: Does geometry really matter? *Pharmaceutical Research*, 26(1), 235-243.
23. Sáez-Fernández, E., Ruiz, M. A., & Arias, J. L. Drug delivery systems base on poly(ϵ -caprolactone) for cancer treatment. *Ars Pharmaceutica*, 50(2), 83-96.
24. Lyon, R. J. P. (1967). Infrared absorption spectroscopy. En J. Zussman (Ed.), *Physical Methods in Determinative Mineralogy* (pp. 371-399). London: Academic Press.
25. Gartstein, E., Cohen, J. B., & Mason, T. O. (1986). Defect agglomeration in Wüstite at high temperatures—II. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 47(8), 775-781.
26. Plaza, R.C., Arias, J. L., Espín, M., Jiménez, M. L., & Delgado, A. V. (2002). Aging effects in the electrokinetics of colloidal iron oxides. *Journal of Colloid Interface Science*, 245(1), 86-90.
27. Sinha, V. R., Bansal, K., Kaumria, R., & Trehan, A. (2004). Poly-(ϵ -caprolactone) microspheres and nanospheres: An overview. *International Journal of Pharmaceutics*, 278(1), 1-23.
28. Lince, F., Marchisio, D. L., & Barresi, A. A. (2008). Strategies to control the particle size distribution of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications. *Journal of Colloid Interface Science*, 322(2), 505-515.
29. Plaza, R. C., Zurita, L., Durán, J. D. G., González-Caballero, F., & Delgado, A. V. (1998). Surface thermodynamics of Hematite/Yttrium Oxide core-shell colloidal particles. *Langmuir*, 14(24), 6850-6854.

30. Huber, D. L. (2005). Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small*, 1(5), 482-501.
31. Lao, L. L., & Ramanujan, R. V. (2004). Magnetic and hydrogel composite materials for hyperthermia applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 15(10), 1061-1064.
32. Purushotham, S., & Ramanujan, R. V. (2010). Thermoresponsive magnetic composite nanomaterials for multimodal cancer therapy. *Acta Biomaterialia*, 6(2), 502-510.
33. Tashjian, J. A., Dewhurst, M. W., Needham, D., & Viglianti, B. L. (2008). Rationale for and measurement of liposomal drug delivery with hyperthermia using non-invasive imaging techniques. *International Journal*.

NOTA DEL EDITOR

Este trabajo obtuvo el Premio del Consejo General de Colegios Oficiales Farmacéuticos de España en el concurso científico 2011 de la Real Academia Nacional de Farmacia.