

VIII

CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

15-17
JUNIO, 2017

“GENERACIÓN DE NUEVAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO”

Auditorio Polivalente de la Facultad de Medicina, UANL
Monterrey, Nuevo León



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

Alberto Gómez Treviño^a, Carlos Luna Criado^b, María Elena Cantú Cárdenas^a Raquel Mendoza Reséndez^b

^aFacultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, jesus.gomeztrv@uanl.edu.mx

^aFacultad de Ciencias Físico-Matemáticas, Universidad Autónoma de Nuevo León, carlos.lunacd@uanl.edu.mx

RESUMEN

La experimentación está enfocada en la síntesis de nanopartículas de Óxidos de Hierro con propiedades superparamagnéticas, mismas que se emplean como sistema de acarreo de fármacos antineoplásicos. Dichas nanopartículas son funcionalizadas con la adición de un recubrimiento polimérico que permite el transporte del fármaco. 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.

1. INTRODUCCIÓN

Nanopartículas como acarreadores de fármacos: Uno de los objetivos en la terapia farmacológica es lograr que el efecto deseado sea estrictamente sobre las células diana o el órgano afectado, esto es lo que la farmacología define como “bala mágica”. El objetivo se produce cuando el vehículo del fármaco 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 que en este punto la nanotecnología se torna una herramienta útil para alcanzar este objetivo. 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).

2. TEORÍA

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 transportar una gran cantidad de principio activo en su superficie y como este 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 estas entran vía endocitosis en las células.

VIII CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

15-17 JUNIO, 2017

“GENERACIÓN DE NUEVAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO”

Auditorio Polivalente de la Facultad de Medicina, UANL
Monterrey, Nuevo León



En la farmacología 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.

3. PARTE EXPERIMENTAL

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. Se obtuvo un sistema de liberación controlada y sitio dirigido de fármacos basado en nanopartículas de Óxidos de Hierro con propiedades superparamagnéticas recubiertas con diámetros promedio de 6.0 ± 2.0 nm. La síntesis de las nanopartículas de Óxidos de Hierro se llevó a cabo mediante la técnica de Massart, fueron funcionalizadas mediante la adición de Ácido Oléico y Pluronic, previo al anclaje del fármaco Paclitaxel.

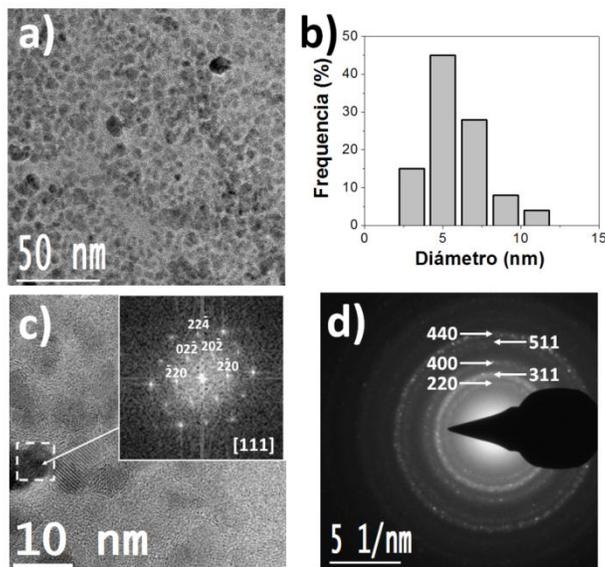


Figura 1

La caracterización morfológica y microestructural de las nanopartículas superparamagnéticas cargadas con Paclitaxel, o bien, Partículas Con Fármaco, (PCF) se presenta en la figura 1. 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.

VIII

CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

15-17
JUNIO, 2017

“GENERACIÓN DE NUEVAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO”

Auditorio Polivalente de la Facultad de Medicina, UANL
Monterrey, Nuevo León



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.

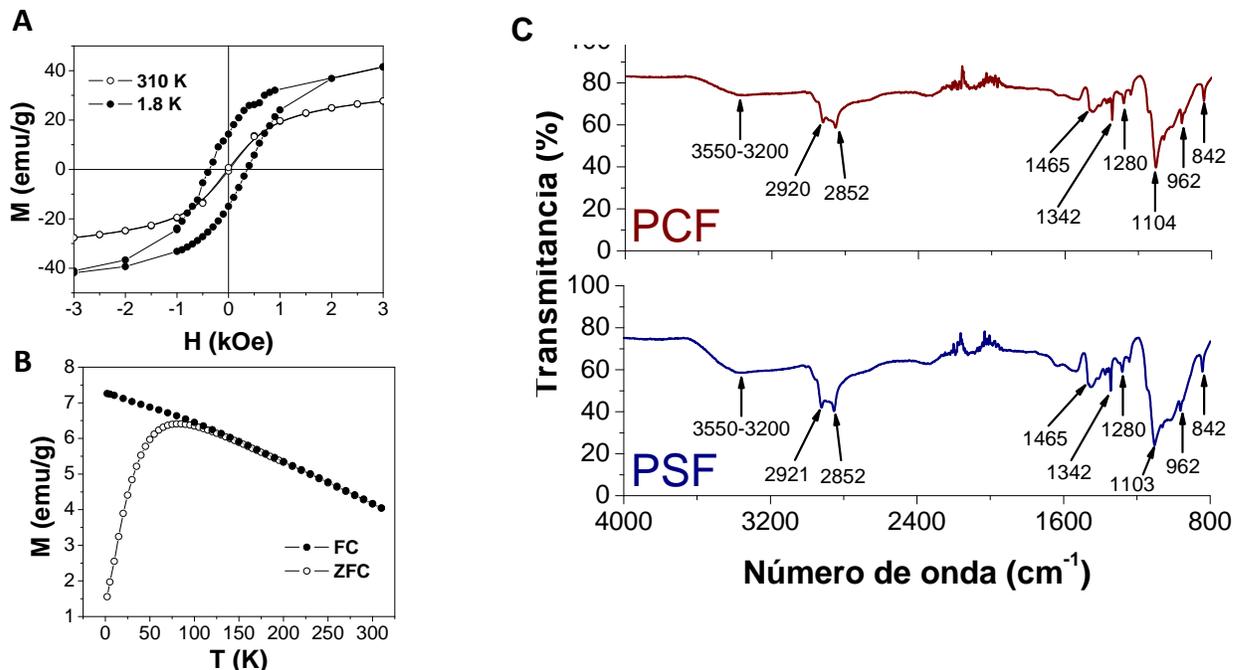


Figura 2

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 (figura 2). 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).

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

VIII

CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

15-17
JUNIO, 2017

“GENERACIÓN DE NUEVAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO”

Auditorio Polivalente de la Facultad de Medicina, UANL
Monterrey, Nuevo León



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. La figura 2 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.

La figura 2 C 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 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 .

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, 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 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 B). Por otra parte, las células, tanto de la placa de cultivo como de la cubeta, puestas en contacto con Partículas Sin Fármaco (PSF) y expuestas a un campo magnético externo no pierden viabilidad (figura 3 C y D).

VIII

CONGRESO
NACIONAL DE
TECNOLOGÍA
APLICADA A
CIENCIAS DE
LA SALUD

15-17
JUNIO, 2017

“GENERACIÓN DE NUEVAS TÉCNICAS
DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO”

Auditorio Polivalente de la Facultad de Medicina, UANL
Monterrey, Nuevo León

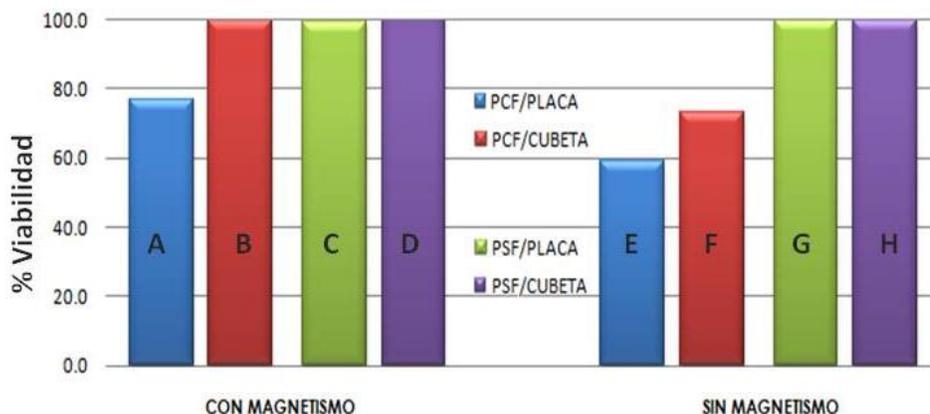


Figura 3

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 E), como las de la cubeta (25 %) que sostiene a la segunda población de células del ensayo (figura 3 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 G y H).

4. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se llegó a las siguientes conclusiones:

- Se obtuvieron nanopartículas de magnetita con diámetro promedio de 6.0 ± 2.0 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. Sanchez, Patricia y Benitez, Luis. (2006). Procesos Biomoleculares de la Resistencia a Drogas. *Cancerología*. Vol. 1, 187-199.
3. Heath, James R. y Davis, Mark E. (2008) Nanotechnology and Cancer. *Annual Review of Medicine*, Vol. 59, 251-265.
4. 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.
5. 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.
6. Zhang, L., He, R. y Gu, H.C. (2006) *Applied Surface Science*. Vol. 253 2611-2617.



VIII CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

15-17 JUNIO, 2017

“GENERACIÓN DE NUEVAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO”

Auditorio Polivalente de la Facultad de Medicina, UANL
Monterrey, Nuevo León



7. 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.
8. Du, C.H. Wu, C.J. y Wu L.G. (2012) *Journal of Applied Polymer Science*. Vol. 124 E330-E337.