

ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Año académico 2017/18

DOCTORANDO: **HUERTA VILLADANGOS, M^a. DE LA CONCEPCIÓN**
D.N.I./PASAPORTE: ****0889K

PROGRAMA DE DOCTORADO: **D423-FARMACIA**
DPTO. COORDINADOR DEL PROGRAMA: **CIENCIAS BIOMÉDICAS**
TITULACIÓN DE DOCTOR EN: **DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ**

En el día de hoy 22/12/17, reunido el tribunal de evaluación nombrado por la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado de la Universidad y constituido por los miembros que suscriben la presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral, elaborada bajo la dirección de **M^a ROSARIO ABERTURAS RAMOS // JESÚS MOLPECERES GARCÍA DEL POZO.**

Sobre el siguiente tema: *ESTUDIOS FARMACOTÉCNICOS Y BIOFARMACÉUTICOS DE FORMULACIONES DE NANOPARTÍCULAS CON FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS*

Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL¹ de (no apto, aprobado, notable y sobresaliente): SOBRESALIENTE

Alcalá de Henares, 22 de Diciembre de 2017

EL PRESIDENTE


Fdo.: Francisco Laguna García

EL SECRETARIO


Fdo.: Consuelo Montep

EL VOCAL


Fdo.: Antonio M. Ramos

Con fecha 24 de enero de 2018 la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

- Conceder la Mención de "Cum Laude"
 No conceder la Mención de "Cum Laude"

La Secretaria de la Comisión Delegada



FIRMA DEL ALUMNO,


Fdo.: Ma Concepción Huerto

¹ La calificación podrá ser "no apto" "aprobado" "notable" y "sobresaliente". El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad.

INCIDENCIAS / OBSERVACIONES:



Universidad
de Alcalá

COMISIÓN DE ESTUDIOS OFICIALES
DE POSGRADO Y DOCTORADO

En aplicación del art. 14.7 del RD. 99/2011 y el art. 14 del Reglamento de Elaboración, Autorización y Defensa de la Tesis Doctoral, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado, en sesión pública de fecha 24 de enero, procedió al escrutinio de los votos emitidos por los miembros del tribunal de la tesis defendida por *HUERTA VILLADANGOS, M^a. DE LA CONCEPCIÓN*, el día 22 de diciembre de 2017, titulada *ESTUDIOS FARMACOTÉCNICOS Y BIOFARMACÉUTICOS DE FORMULACIONES DE NANOPARTÍCULAS CON FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS*, para determinar, si a la misma, se le concede la mención "cum laude", arrojando como resultado el voto favorable de todos los miembros del tribunal.

Por lo tanto, la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado **resuelve otorgar** a dicha tesis la

MENCIÓN "CUM LAUDE"

Alcalá de Henares, 31 de enero de 2018
EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE ESTUDIOS
OFICIALES DE POSGRADO Y DOCTORADO



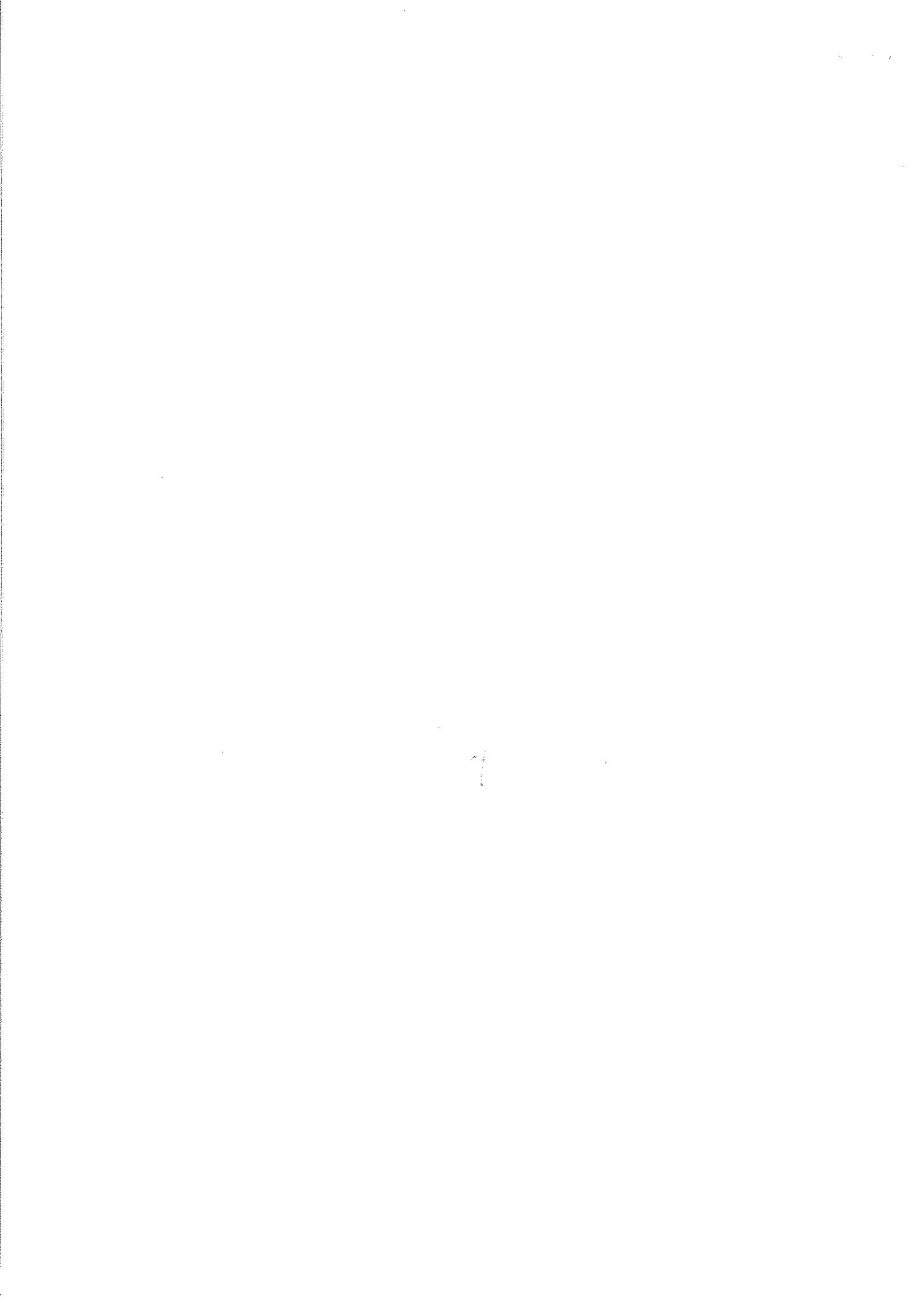
Juan Ramón Velasco Pérez

Copia por e-mail a:

Doctorando: HUERTA VILLADANGOS, M^a. DE LA CONCEPCIÓN

Secretario del Tribunal: M^a. CONSUELO MONTEJO RUBIO. Profesor Agregado. Dpto. Ciencias Farmaceuticas y de la Salud. Universidad San Pablo CEU

Director/a de Tesis: M^a ROSARIO ABERTURAS RAMOS // JESÚS MOLPECERES GARCÍA DEL POZO





Universidad
de Alcalá

ESCUELA DE DOCTORADO
Servicio de Estudios Oficiales de
Posgrado

DILIGENCIA DE DEPÓSITO DE TESIS.

Comprobado que el expediente académico de D./D^a _____
reúne los requisitos exigidos para la presentación de la Tesis, de acuerdo a la normativa vigente, y habiendo
presentado la misma en formato: soporte electrónico impreso en papel, para el depósito de la
misma, en el Servicio de Estudios Oficiales de Posgrado, con el nº de páginas: _____ se procede, con
fecha de hoy a registrar el depósito de la tesis.

Alcalá de Henares a _____ de _____ de 20 _____



Fdo. El Funcionario



Programa de Doctorado en Farmacia

(RD 99/2011)

**ESTUDIOS FARMACOTÉCNICOS
Y BIOFARMACÉUTICOS DE
FORMULACIONES DE
NANOPARTÍCULAS CON
FÁRMACOS
ANTIINFLAMATORIOS**

Tesis Doctoral presentada por

M^a DE LA CONCEPCIÓN HUERTA VILLADANGOS

2017



**Programa de Doctorado en Farmacia
(RD 99/2011)**

**ESTUDIOS FARMACOTÉCNICOS Y
BIOFARMACÉUTICOS DE
FORMULACIONES DE
NANOPARTÍCULAS CON
FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS**

Tesis Doctoral presentada por

M^a DE LA CONCEPCIÓN HUERTA VILLADANGOS

Directores:

Dra. M^a del Rosario Aberturas Ramos

Dr. Jesús Molpeceres García del Pozo

Alcalá de Henares, 2017



Universidad
de Alcalá

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
BIOMÉDICAS
Campus Universitario
Ctra. de Barcelona Km. 33,600
E-28871 Alcalá de Henares (Madrid)
Teléfono: 91 885 46 57

MARÍA DEL ROSARIO ABERTURAS RAMOS Y JESÚS MOLPECERES GARCÍA
DEL POZO, PROFESORES TITULARES DE UNIVERSIDAD DE LA UNIDAD DE
FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA DEL DEPARTAMENTO DE
CIENCIAS BIOMÉDICAS DE LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

CERTIFICAN:

Que la memoria para optar al Grado de Doctor, elaborada por María de la Concepción Huerta Villadangos, cuyo título es:

“Estudios farmacotécnicos y biofarmacéuticos de formulaciones de nanopartículas con fármacos antiinflamatorios”

ha sido realizada en este Departamento y Unidad Docente bajo su dirección y que reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación

Y para que así conste, firman el presente certificado en Alcalá de Henares, a veintiuno de julio de dos mil diecisiete.

Fdo.: María del Rosario Aberturas

Fdo.: Jesús Molpeceres



Universidad
de Alcalá

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
BIOMÉDICAS
Campus Universitario
Ctra. de Barcelona Km. 33,600
E-28871 Alcalá de Henares (Madrid)
Teléfono: 91 885 46 57

DÑA. JOSEFA BEGOÑA ESCALERA IZQUIERDO, COORDINADORA DEL
PROGRAMA DE DOCTORADO "FARMACIA" DE LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

CERTIFICA:

Que la memoria para optar al Grado de Doctor, elaborada por María de la Concepción Huerta Villadangos, ha sido realizada en el Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Alcalá bajo la dirección conjunta de Doña María del Rosario Aberturas Ramos y Don Jesús Molpeceres García del Pozo, Profesores Titulares del Departamento, y se encuentra ya concluida, por lo que autorizo su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Alcalá de Henares, a veintiuno de julio de dos mil diecisiete.

AGRADECIMIENTOS

La realización de la presente Tesis Doctoral es resultado del esfuerzo conjunto de muchas personas a las que quiero expresar mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores de Tesis, la Dra. M^a del Rosario Aberturas Ramos y el Dr. Jesús Molpeceres García del Pozo, la paciencia y el esfuerzo realizado durante estos años, pero en particular durante los últimos meses. Gracias por dejarme trabajar y aprender con vosotros.

A todos los miembros del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la UAH y a todos los alumnos con los que he tenido oportunidad de compartir mi tiempo en el laboratorio, gracias por vuestra ayuda, vuestros ánimos y consejos.

Gracias también a la Dra. M^a Melia Rodrigo López porque, tanto en el ámbito académico como en el personal, siempre se ha preocupado por mi y me ha ayudado en todo lo que ha podido. Tampoco puedo olvidarme de agradecer a la Dra. Alice Luminita Petre, a quien no conocía personalmente, la ayuda prestada para terminar mis estudios.

A los técnicos de las distintas instalaciones que he tenido que utilizar durante estos años: Isabel, Montse, Antonio y José. Gracias por vuestra dedicación.

Durante todos estos años he compaginado la elaboración de esta Tesis con el trabajo como farmacéutica adjunta en la farmacia de mi padre. Para ello he necesitado días libres, flexibilidad en los horarios y unos compañeros capaces de aguantar eso y de aguantarme a mi personalmente, con mis prisas, mis agobios y mi carácter. Gracias por eso a “Antoño”, Mertxe, Mila, Alex, Carlos y Andrea.

No puedo olvidarme de lo que ha sido hasta ahora una parte fundamental de mi vida: la natación. No sólo por el deporte en sí, si no por la gente que forma el CNAH y en particular, por el equipo femenino. Gracias a la parte más joven de este equipo (Olaya, Noa, Andrea, Cynthia y

Marta) porque sin saber muy bien que era eso del doctorado me preguntabais y me animabais como nadie. No puedo olvidarme de “las mayores”, casi se podría decir que son hasta “viejas” para seguir en esto: Jessi, Vane, Elena y Laura (que aunque no nos acompañe dentro del agua, es una más del equipo). Si todo va bien, en unos meses vuelvo a estar con vosotras dándolo todo con cada brazada. Y, por supuesto, gracias al alma de este equipo, a la persona que es como un padre dentro de la piscina y que me ha acompañado a lo largo de toda mi vida deportiva, Manolo Revilla.

A Manolo, Lolo, Manolito, Manoli, Manolín o “mi hipoteca”. Da igual como te llame, para mí todos esos nombres son sinónimo de gratitud. Esta Tesis también es tuya, no solo por haber ejercido de técnico y haber arreglado todos mis desastres informáticos, que no han sido pocos, si no por haberme escuchado cada vez que lo necesitaba, por haberme dado tu apoyo cada día y por haberte alegrado tanto como yo, aunque llorando algo menos, al ver terminado el trabajo de tanto años.

Y por último, a José Félix y a Concha, papá y mamá, no hace falta enumerar los motivos por los que tendría que daros las gracias. Todos sabemos que sin vuestra ayuda y vuestro apoyo esto no hubiera sido posible.

ÍNDICE

I. Introducción	1
1 AINES.....	5
2 Nimesulida	10
2.1 Propiedades farmacológicas.....	11
2.2 Propiedades fisicoquímicas	13
2.3 Farmacocinética	15
2.4 Toxicidad	19
2.5 Datos farmacéuticos.....	21
2.6 Formulaciones alternativas	22
3 Nanopartículas (NP)	24
3.1 NP y cáncer.....	29
3.1.1 NP y cáncer de próstata.....	32
3.2 NP y NS.....	36
II. Objetivos	38
III. Materiales y métodos.....	41
1. Materiales	41
1.1 Ácido poli-láctico-glicólico (RG504)	41
1.2 Quitosano.....	43
1.3 Ácido hialurónico.....	44
2. Métodos.....	46
2.1 Validación del método analítico	46
2.1.1 Análisis de la NS por espectrofotometría UV-visible.....	46
2.1.2 Análisis de la NS por HPLC	48
2.2 Elaboración de formulaciones	49
2.3 Caracterización de las NP	52
2.3.1 Tamaño de partícula.....	52
2.3.2 Determinación de la carga superficial (Potencial Zeta) ...	52
2.3.3 Morfología (SEM y TEM).....	53
2.3.4 Cálculo del PVA residual	54
2.3.5 Determinación del rendimiento del proceso y eficacia de encapsulación	55
2.3.6 Proceso de liofilización	56
2.3.7 Grado de cristalinidad e interacciones fármaco- excipiente. Estudios calorimétricos (DSC).....	57

2.3.8	Análisis mediante espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR).....	57
2.4	Estudios de liberación <i>in vitro</i>	58
2.4.1	Liberación inmediata	58
2.4.2	Liberación en función del tiempo	58
2.5	Estudios de permeabilidad	58
2.5.1	Ensayo de Permeabilidad con Membranas Artificiales en Paralelo (PAMPA)	59
2.5.2	Ensayo de disolución/permeabilidad	61
2.6	Estudios de eficacia terapéutica <i>in vitro</i>	63
2.6.1	Cultivos celulares.....	63
2.6.2	Captación celular <i>in vitro</i> (microscopía confocal y citometría de flujo).....	64
2.7	Estudios farmacocinéticos	67
IV.	Resultados y discusión	72
1.	Validación del método analítico	72
1.1	Análisis de la NS por espectrofotometría UV-visible	72
1.2	Análisis de la NS por HPLC	78
2.	Caracterización de las NP	79
2.1	Ensayos preliminares.....	80
2.2	Tamaño de partícula.....	82
2.3	Determinación de la carga superficial (Potencial Zeta).....	87
2.4	Morfología (SEM y TEM).....	88
2.5	Cálculo del PVA residual	94
2.6	Determinación del rendimiento del proceso y eficacia de encapsulación.....	96
2.7	Proceso de liofilización	101
2.8	Grado de cristalinidad e interacciones fármaco-excipientes. Estudios calorimétricos (DSC).....	104
2.9	Análisis mediante espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)	108
3.	Estudios de liberación <i>in vitro</i>	112
3.1	Liberación inmediata	112
3.2	Liberación en función del tiempo	119
4.	Estudios de permeabilidad	122

4.1 Ensayo de Permeabilidad con Membranas Artificiales en Paralelo (PAMPA)	122
4.2 Estudios de disolución/permeabilidad.....	128
5. Estudios de eficacia terapéutica <i>in vitro</i>	132
5.1 Cultivos celulares.....	132
5.2 Estudios cualitativos de captación celular <i>in vitro</i> (microscopía con focal y citometría de flujo)	139
6. Estudios farmacocinéticos.....	158
V. Conclusiones	170
VI. Referencias.....	173
VII. Anexo I	196

I. Introducción

Según la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC), “cáncer” es el nombre general para un grupo de más de 100 enfermedades con una característica común a todas ellas: la proliferación excesiva y sin control (displasia) de células que pueden llegar a infiltrarse o invadir otros tejidos originando metástasis. Además, estas células suelen presentar variaciones en su forma, tamaño y función por lo que dejan de actuar como deben y adquieren nuevas propiedades. Esto es lo que se conoce como tumor maligno (<http://www.aecc.es>).

Dentro de los cánceres que afectan a estructuras epiteliales, el de próstata representa, aproximadamente, el 12% de los casos de nuevo diagnóstico en Europa. Es uno de los tumores más prevalentes en España y uno de los más frecuentemente diagnosticados en el mundo desarrollado. Las estadísticas actuales lo catalogan como la segunda causa de muerte por cáncer en la población americana masculina después del cáncer de pulmón y establecen que 1 de cada 6 individuos enfermará de cáncer de próstata a lo largo de su vida, si bien la mortalidad se reduce a 1 de cada 36. Según datos de la Asociación Española de Urología (AEU), un millón y medio de españoles, con edades comprendidas entre 50 y 75 años, tienen riesgo de padecer un cáncer de próstata. Hace 15 años, solo el 20% de los carcinomas de próstata se diagnosticaban cuando el tumor estaba localizado en la glándula (potencialmente curable). El 80% restante tenían invasión regional o metástasis. Gracias a campañas informativas, que aumentan el número de varones que acuden al especialista para revisiones rutinarias, por estar en edad de riesgo o por tener modificaciones en el ritmo o en el flujo urinario, esas cifras se han invertido. En la actualidad, el 74% de los carcinomas de próstata se diagnostican cuando no tienen metástasis y pueden tratarse con intención curativa, con cirugía, con radioterapia o con la combinación de ambas. Según un estudio epidemiológico realizado en 2010 por la Sociedad Española de Urología en 25 hospitales públicos españoles se diagnosticaron 4.087 nuevos casos, cubriendo el 21,8% de la población masculina española. La tasa de incidencia estimada estandarizada fue de

82,27 por 100.000 varones y la edad media de detección fue de 69 años (Cózar y col., 2013).

La próstata es un órgano que se encuentra en la pelvis, rodeando la primera parte de la uretra, situado detrás del pubis, delante del recto e inmediatamente por debajo de la vejiga.

Entre los síntomas más comunes asociados al cáncer de próstata se encuentran:

- ✓ Flujo de orina débil o interrumpido.
- ✓ Ganas repentinas de orinar.
- ✓ Aumento de la frecuencia de la necesidad de orinar (en especial, por la noche).
- ✓ Dificultad para iniciar el flujo de orina.
- ✓ Dificultad para vaciar la vejiga por completo.
- ✓ Dolor o ardor al orinar.
- ✓ Presencia de sangre en la orina o el semen.
- ✓ Dolor en la espalda, las caderas o la pelvis que no desaparece.
- ✓ Falta de aire, sensación de mucho cansancio, latidos rápidos del corazón, mareo o piel pálida a causa de anemia.

La detección precoz y los avances realizados en las técnicas de diagnóstico y tratamiento del cáncer han conseguido aumentar en Europa en los últimos años la tasa de supervivencia de los enfermos de un 73.4% a un 83.4% (De Angelis y col., 2014).

La clasificación del cáncer de próstata según la *American Joint Committee on Cancer* se basa en el conocido acrónimo TNM, basada en los siguientes parámetros: tamaño del tumor, localización, porcentaje de la glándula prostática que está ocupado por el tumor y si afecta a los lóbulos (T), estatus nodal (N) y presencia o ausencia de metástasis (M) (Mottet y col., 2015).

Tabla 1.- Clasificación TNM para el cáncer de próstata desarrollada por *American Joint Committee on Cancer*.

T - Primary tumour	
TX	Primary tumour cannot be assessed
T0	No evidence of primary tumour
T1	Clinically inapparent tumour not palpable or visible by imaging
T1a	Tumour incidental histological finding in 5% or less of tissue resected
T1b	Tumour incidental histological finding in more than 5% of tissue resected
T1c	Tumour identified by needle biopsy (e.g. because of elevated prostate-specific antigen (PSA) level)
T2	Tumour confined within the prostate ¹
T2a	Tumour involves one half of one lobe or less
T2b	Tumour involves more than half of one lobe, but not both lobes
T2c	Tumour involves both lobes
T3	Tumour extends through the prostatic capsule ²
T3a	Extracapsular extension (unilateral or bilateral) including microscopic bladder neck involvement
T3b	Tumour invades seminal vesicle(s)
T4	Tumour is fixed or invades adjacent structures other than seminal vesicles: external sphincter, rectum, levator muscles, and/or pelvic wall
N - Regional lymph nodes³	
NX	Regional lymph nodes cannot be assessed
N0	No regional lymph node metastasis
N1	Regional lymph node metastasis ⁴
M - Distant metastasis⁵	
MX	Distant metastasis cannot be assessed
M0	No distant metastasis
M1	Distant metastasis
M1a	Non-regional lymph node(s)
M1b	Bone(s)
M1c	Other site(s)

¹ Tumour found in one or both lobes by needle biopsy, but not palpable or visible by imaging, is classified as T1c.

² Invasion into the prostatic apex, or into (but not beyond) the prostate capsule, is not classified as pT3, but as pT2.

³ The regional lymph nodes are the nodes of the true pelvis, which essentially are the pelvic nodes below the bifurcation of the common iliac arteries.

⁴ Laterality does not affect the N-classification

⁵ When more than one site of metastasis is present, the most advanced category should be used.

Sin embargo, para establecer una clasificación adecuada también debe tenerse en cuenta un indicador numérico (escala de Gleason), relacionado con la agresividad que puede tener el tumor, siendo (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2008):

- ✓ *Gleason 2-4*: tumores de bajo grado.
- ✓ *Gleason 5-7*: tumores de grado intermedio.

✓ *Gleason 8-10*: tumores indiferenciados.

El tratamiento del cáncer de próstata se lleva a cabo considerando su clasificación y las expectativas de vida del paciente. Los tratamientos se pueden dividir en 5 grandes grupos (tabla 2):

Tabla 2.- Agrupación de los distintos tratamientos que existen actualmente para el cáncer de próstata (Brenes y col., 2015).

TRATAMIENTO	MECANISMO DE ACCIÓN	TIPOS	EFECTOS ADVERSOS O SECUELAS
Prostatectomía radical	Extirpación completa de la próstata	<ul style="list-style-type: none"> • Cirugía abierta • Cirugía laparoscópica asistida o no, por robot 	Disfunción eréctil, incontinencia urinaria (normalmente enseguida tras cirugía y mejoran con el tiempo)
Radioterapia	Mediante radiación se acaba con el tumor. También para tratamiento del dolor por metástasis	<ul style="list-style-type: none"> • Radioterapia externa • Braquiterapia (la fuente de radiación se sitúa en el interior de la próstata en forma de pequeños gránulos) 	Incontinencia urinaria, problemas intestinales
Tratamiento farmacológico	Reducir niveles de las hormonas implicadas en el crecimiento del tumor (testosterona, dihidrotestosterona) Objetivo: testosterona sérica <50ng/dL	<ul style="list-style-type: none"> • Agonistas LHRH • Antiandrógenos esteroideos y no esteroideos • Inhibidores de la 17α-hidroxilasa • Quimioterapia intravenosa • Corticosteroides 	Disfunción eréctil, reducción de la libido y de la fertilidad, ginecomastia, sofocos (varían según el tipo de tratamiento). Se verán en los siguientes módulos
Inmunoterapia	Son leucocitos extraídos de la sangre del paciente que se tratan con una proteína y se vuelven a inyectar para inducir una respuesta del sistema inmunitario	<ul style="list-style-type: none"> • Sipuleucel-T 	Dolor de cabeza, escalofríos, fiebre
Radiofármacos	Induce la fragmentación del DNA de las células tumorales a la vez que reduce la exposición de la médula ósea	<ul style="list-style-type: none"> • Radio 223 	

Dentro del apartado del tratamiento farmacológico, cabe diferenciar los fármacos más utilizados en función de su mecanismo de acción (tabla 3):

Tabla 3.- Fármacos utilizados actualmente en el tratamiento del cáncer de próstata y mecanismo de acción. (FFT: indicación fuera de ficha técnica) (Brenes y col., 2015).

GRUPO TERAPÉUTICO	MECANISMO DE ACCIÓN	PRINCIPIOS ACTIVOS
Antagonistas de hormonas (orales)	Inhibidor selectivo de la enzima 17 α -hidroxilasa/C17, 20-liasa (CYP17). Es una enzima necesaria para la producción de DHEA, precursora de testosterona	Abiraterona Ketoconazol (FFT)
No asignado aún (oral)	Inhibidor señalización receptores androgénicos	Enzalutamida
Quimioterapia intravenosa	Diferentes mecanismos de acción	Docetaxel Cabazitaxel Mitoxantrona
Corticosteroides (oral)	Reducen la producción de andrógenos suprarrenales	Prednisona Hidrocortisona Dexametasona
Agonistas LHRH (administración sc,im)	Inhiben secreción hormona luteinizante (LH), reduciéndose las concentraciones de testosterona sérica	Goserelina Leuprorelina Buserelina Triptorelina
Antiandrógenos no esteroideos (orales)	Inhibición competitiva receptores androgénicos	Bicalutamida Flutamida
Antiandrógenos Esteroideos (orales)	Inhibición competitiva receptores androgénicos	Acetato de ciproterona Acetato de megestrol (FFT)
Estrógenos (Oral)	Efecto supresor sobre la liberación de LHRH	Dietilestilbestrol

1. AINEs

Varios autores justifican el uso de los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) en las terapias antitumorales debido a su actividad proapoptótica e inhibidora de la angiogénesis, lo que evita el crecimiento y favorece la desaparición del tumor (Taketo, 1998).

Los AINEs son un grupo de fármacos de elevado consumo entre la población. Actualmente hay más de 50 AINEs diferentes en el mercado mundial. Estos fármacos producen alivio sintomático del dolor y de la inflamación en las artropatías crónicas, como ocurre en la artrosis y en la

artritis reumatoide, así como en enfermedades inflamatorias agudas: fracturas, esguinces, lesiones deportivas y otras lesiones de tejidos blandos. También son útiles para el tratamiento del dolor postoperatorio, dental y menstrual, y de las cefaleas y la migraña. Actualmente, se dispone de muchas formulaciones diferentes: comprimidos, jarabes, geles de aplicación tópica, inyectables, etc (Rang y Dale, 2012).

Todos los AINEs actúan inhibiendo la ciclooxigenasa (COX) evitando así la transformación del ácido araquidónico en mediadores del proceso inflamatorio: prostaglandinas y tromboxanos (figura 1). La COX es la enzima responsable del metabolismo del ácido araquidónico y su conversión a prostaglandina H₂, precursor de los prostanoides (PGD₂, PGE₂, PGF₂, PGI₂, TXA₂). A principios de los años 90 se determinó que la COX correspondía en realidad al menos a dos isoformas COX-1 y COX-2 (Castells y col., 2003).

VIA DE LA CICLOOXIGENASA (COX)

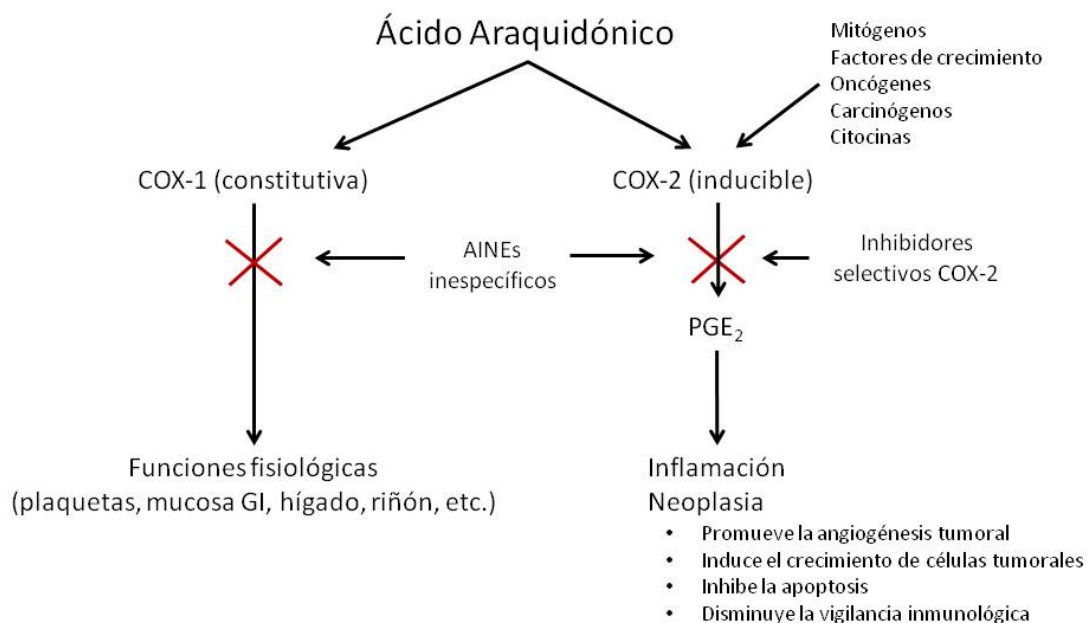


Figura 1.- Representación esquemática del metabolismo del ácido araquidónico (Global Resource for Advancing Cancer Education).

A pesar de que su estructura proteica presenta más de un 90% de similitudes, su función es bien distinta: COX-1 se expresa de forma constitutiva en multitud de tejidos (plaquetas, estómago, riñón, colon...) y parece estar encargada de funciones homeostáticas y fisiológicas (ej.: en la mucosa gástrica tiene una función citoprotectora y de mantenimiento de las secreciones fisiológicas) mientras que la COX-2 solo se detecta de forma constitutiva en el riñón, aparato reproductor y cerebro y sin embargo, se expresa de forma muy significativa (entre 10 y 80 veces más) en tejidos inflamados tras la inducción ejercida por la secreción de mediadores inflamatorios como IL-6, IL-10, TNF-alfa... (Hawkey, 2001). Por este motivo se denominó a la COX-2, forma inducible, y a la COX-1, forma constitutiva. La COX-2 se encuentra fundamentalmente en la región perinuclear y en la membrana nuclear de las células responsables del proceso inflamatorio (macrófagos, monocitos, leucocitos) y participa en la transformación cancerosa, en este caso a través de mecanismos de resistencia a la muerte programada al inducir apoptosis como consecuencia de la alteración en la producción de prostaglandinas y de la disminución de factores angiogénicos (García y col., 2000). Además hay estudios que prueban como la COX-2 modula la proliferación celular y la apoptosis en los tumores sólidos de tipo: cáncer colorectal, de mama, de pulmón y de próstata, y, más recientemente se ha conseguido demostrar su importancia en la aparición de neoplasias hematológicas. La constatación de la participación de la COX-2 en los fenómenos de crecimiento neoplásico, junto con el desarrollo de potentes inhibidores selectivos de esta isoforma, ha generado grandes expectativas acerca de la utilidad de estos fármacos en la prevención y tratamiento de los tumores malignos (Soboleski y col., 2010; Soslow y col., 2000).

Los AINEs se consideran fármacos seguros, pero existe una serie de efectos adversos que limitan su potencial terapéutico (Bidaut-Russell y col., 2001; Brater y col., 2001; Mukherjee y col., 2001; Colville y Gilroy, 2001):

- ✓ *Trastornos digestivos:* El más importante de estos efectos adversos es su toxicidad gastrointestinal (GI); el 35% de los pacientes que los consumen presentan dispepsia y/o ardor esofágico, entre el 15 y el

30% desarrollan úlceras gastroduodenales y el 60% de éstas provocan hemorragias GI. Estos efectos se asocian a la irritación local por contacto del fármaco con la mucosa y a la inhibición de la síntesis de las prostaglandinas por bloqueo de la enzima ciclooxigenasa (COX-1). Si bien el perfil toxicológico de los inhibidores de COX-2 con respecto al tracto GI ha mejorado ostensiblemente frente a los AINEs no específicos, algunas prostaglandinas sintetizadas vía COX-2 tienen un papel regulador y de regeneración de tejidos dañados como revelan observaciones clínicas que demuestran que aunque estos fármacos no inducen la formación de úlceras GI, retardan la curación de las ya existentes.

- ✓ *Reacciones cutáneas*: pueden presentarse como erupciones leves, urticaria y reacciones de fotosensibilidad o como trastornos más graves y potencialmente mortales como el síndrome de Stevens-Johnson o necrólisis epidérmica tóxica.
- ✓ *Efectos adversos renales*: las dosis terapéuticas de los AINEs en sujetos sanos suponen una escasa amenaza para la función renal, si bien, en sujetos susceptibles, pueden provocar una insuficiencia renal aguda reversible tras la interrupción del tratamiento. Esto es debido a la inhibición de los prostanoides implicados en el mantenimiento de la hemodinámica renal. Los neonatos y los ancianos presentan un riesgo particularmente alto, al igual que los sujetos afectados por cardiopatías, hepatopatías o nefropatías, o bien con una reducción del volumen sanguíneo circulante.
- ✓ *Efectos adversos cardiovasculares*: se ha reconocido la capacidad que tienen los AINEs de elevar la presión arterial y, por lo tanto, de predisponer a pacientes hipertensos a padecer complicaciones cardiovasculares como accidentes cerebrovasculares e infartos de miocardio.
- ✓ *Otros efectos adversos*: aproximadamente un 5% de los pacientes tratados con AINEs pueden presentar asma sensible al ácido acetilsalicílico. Otros efectos adversos mucho menos frecuentes incluyen efectos sobre el SNC, alteraciones de la médula ósea y

trastornos hepáticos, siendo estos últimos más frecuentes si el paciente padece insuficiencia renal previa al tratamiento con AINEs. Todos los AINEs (salvo los inhibidores selectivos de la COX-2) impiden la agregación plaquetaria y, por tanto, son prohemorrágicos.

Los hechos anteriormente mencionados condujeron al diseño de formas que evitasen el contacto del fármaco con la mucosa GI (microcápsulas, formas recubiertas...), así como al desarrollo de moléculas con una mayor especificidad hacia la isoenzima COX-2, responsable de la síntesis de prostaglandinas (PGH₂ y derivadas) directamente asociadas al proceso inflamatorio. Esta segunda alternativa dio lugar a la aparición de los inhibidores selectivos de COX-2. Las aplicaciones terapéuticas para las que están aprobados estos fármacos son las clásicas de AINEs no selectivos y tras unos años de utilización clínica la hipótesis inicial de la COX-2 se muestra algo más complicada de lo que se pensó en un principio. Así, tanto COX-1 como COX-2 están implicadas en procesos fisiológicos y patológicos. (Chandrasekharan y col., 2002)

La prostaglandina E₂ (PGE₂) presenta actividad proinflamatoria y proangiogénica. Después de comprobar que la concentración de PGE₂ en tejidos tumorales de cáncer de colon era elevada, la posibilidad de utilizar los AINEs para reducir el crecimiento y la proliferación de ese tipo de tumores y otros como el de mama o el de próstata, cobró bastante interés. Por otra parte, estudios epidemiológicos retrospectivos han demostrado que los pacientes en tratamiento crónico con AINEs muestran menor riesgo de padecer algunos tipos de cáncer (pulmón, gástrico, esofágico, colon, hígado...). En concreto, el riesgo de muerte por cáncer se reduce hasta un 50% en usuarios crónicos de aspirina y otros AINEs. Ello sugiere que la inhibición de la COX puede constituir una terapia preventiva contra algunos tipos de cáncer. Es más, el hallazgo de elevados niveles de COX-2 y de prostanoides en las lesiones premalignas que evolucionan a los cánceres epiteliales mencionados, ha motivado la puesta en marcha de varios estudios preclínicos y clínicos para evaluar el potencial terapéutico de inhibidores de COX-2 como prevención y tratamiento coadyuvante a largo plazo de distintos tipos de cáncer. Modelos experimentales en

animales (genéticos y de inhibición enzimática) demuestran un claro papel de la COX-2 en la evolución de lesiones pretumorales. Se ha demostrado que existe un efecto proapoptótico, inmunoregulador e inhibidor de angiogénesis para los fármacos inhibidores de COX-2, los cuales poseen una gran capacidad invasiva sobre las células tumorales (Giercksky, 2001; Koki y col., 2002; Dannenberg, 2001; Subongkot y col., 2003; Hawk y col., 2002).

La asociación entre la expresión de la COX y el cáncer de próstata ha sido estudiada por Yoshimura (Yoshimura y col, 2000) quien han puesto de manifiesto la baja expresión de COX-1 y la sobreexpresión de COX-2 en células tumorales. Por el contrario, la expresión de COX-2 en tejido prostático normal, con hiperplasia benigna de próstata o lesiones intraepiteliales prostáticas fue baja y similar a la de COX-1. La expresión de COX-2 en tejido tumoral prostático incluyendo los vasos sanguíneos y el estroma de las muestras analizadas, se asocia al grado de diferenciación celular. Todo esto sugiere que la inhibición en el desarrollo de la COX-2 podría conducir no solo a la inhibición de la proliferación y metástasis del cáncer de próstata, sino a la reducción o desaparición del propio cáncer.

2. Nimesulida

La Nimesulida (NS) es un fármaco desarrollado en 1971, antes de descubrir la COX-2 y la función de las prostaglandinas en los procesos inflamatorios, cuya estructura química responde al grupo de las sulfonanilidas (Figura 2) (Rainsford y col., 2006). Llegó a comercializarse en 50 países pero el primer país en autorizar la venta de NS fue Italia, donde llegó a convertirse en el fármaco más prescrito en el tratamiento del dolor agudo, de la artritis reumatoide y la dismenorrea primaria. En la práctica clínica, la dosis habitual en adultos son 100 mg de fármaco administrado dos veces al día por vía oral. La dosis habitual en niños de 6 a 12 años es de 50 mg dos veces al día.

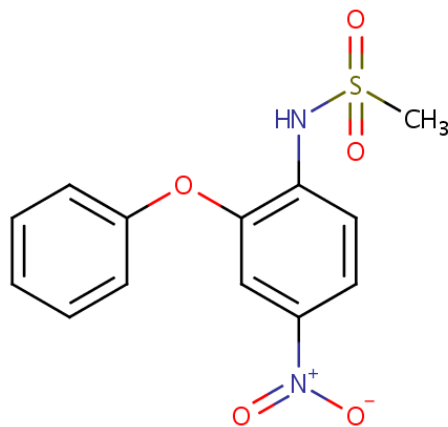


Figura 2.- Estructura química de NS

2.1. Propiedades farmacológicas

Principalmente la NS y sus principales metabolitos actúan de forma selectiva sobre la COX-2, aunque también se ha comprobado que presentan otras vías farmacológicas para paliar el dolor, la inflamación y la fiebre.

Swingle (Swingle y col., 1976) y Tanaka (Tanaka y col., 1992) realizaron estudios de eficacia donde la NS demostró tener una actividad semejante o incluso más potente que la de otros antiinflamatorios.

Gupta (Gupta y col., 1999) evaluó la actividad antiinflamatoria en ratas de una formulación de NS administrada por vía intramuscular en dosis crecientes, lo cual produjo efectos farmacológicos a las 2 horas (coincidiendo con el pico que presentaban los niveles de fármaco en sangre). Dichos efectos fueron dependientes de la dosis que se había administrado.

Nakatsugi (Nakatsugi y col., 1996) evaluó el efecto de la NS sobre la producción de prostaglandinas en la cavidad pleural de ratas con actividad similar a indometacina y 10 veces superior a ibuprofeno. Tofanetti (Tofanetti y col., 1989) obtuvo resultados que corroboraban los ya existentes destacando una disminución en la acumulación de leucocitos con dosis más elevadas que las requeridas para el efecto antiinflamatorio.

Steiner (Steiner y col., 2001) mostró la capacidad de NS para atravesar la barrera hematoencefálica.

Un estudio realizado en ratas y en humanos con artritis reumatoide por Bianchi (Bianchi y col., 2002) reveló que la NS era más eficaz que rofecoxib sugiriendo que otros mecanismos de acción sobre la óxido nítrico sintetasa (NOS) y la modulación sobre los receptores NMDA (receptores ionotrópicos de glutamato), también tienen cierta importancia en el proceso.

La NS también inhibe o previene *in vitro*, en función de las concentraciones plasmáticas de fármaco, diversas actividades de los neutrófilos humanos, que van desde la migración y la explosión oxidativa a la degranulación y la producción de mediadores proinflamatorios (Rainsford y col., 2005).

Bourgeois (Bourgeois y col., 1994) realizó un estudio en el que se administró NS a un grupo de 392 pacientes con osteoartritis durante un mes. Las dosis más eficaces fueron las de 100 y 200 mg pero las mejor toleradas por los pacientes fueron las de 50 y 100 mg. Teniendo en cuenta dichos resultados y el balance beneficio/riesgo de la NS, se recomendó su administración dos veces al día en dosis de 100 mg.

Un estudio clínico en el que se administró NS por vía oral (400 mg) o rectal (200 mg), demostró, actividad similar a diclofenaco en el control del dolor oncológico (Corli y col., 1993).

Estudios *in vitro* (Özalp y col., 2012) demuestran que la NS tiene un efecto inhibitor de la proliferación celular tiempo y concentración dependiente como el cisplatino, aunque a concentraciones mas elevadas (80 μ M vs 200-300 μ M) y que el efecto proapoptótico de la NS estaría relacionado con la activación de la caspasa-3. Estos hallazgos podrían encontrar su justificación en la capacidad de la NS de inhibir de forma específica la prostaglandina PGE₂. Por el contrario, Liang (Liang y col., 2009) demostró que la capacidad inhibitoria de la NS sobre la expresión superficial del ligando programado de muerte celular-1 (PD-L1) en células de cáncer de mama MDA-MB-468 es independiente de la vía COX-2/PGE₂. Esto sugiere que la NS presenta distintos mecanismos para inhibir el

crecimiento de células cancerosas e inducir su apoptosis, lo que la convierte en un fármaco adecuado para el tratamiento de tumores localizados, impedir su crecimiento, la aparición de metástasis y promover respuestas inmunológicas contra los mismos.

También mediante estudios *in vitro* se ha demostrado que la NS puede actuar de forma sinérgica con la doxorubicina y el cisplatino, o con la terapia fotodinámica en el tratamiento de distintos tipos de cáncer (células A549, C26...) algunos de los cuales sobreexpresaban COX-2. Estudios *in vivo* de carcinogenesis inducida por distintos factores químicos en modelos animales que utilizan roedores también han mostrado la capacidad inhibitoria de la NS sobre el desarrollo del tumor, generalmente asociada a la sobreexpresión de la COX-2 en los mismos. Con respecto a los mecanismos de acción, además de la inhibición de la secreción de PGE₂ mediada por COX-2, se han citado los efectos proapoptóticos sobre los genes Par-4, Bax, receptor superficial celular VEGF, o la expresión de c-Jun (Rainsford, 2005).

Con respecto al cáncer de próstata, Pan (Pan y col., 2003) demostró que NS y celecoxib reducen de forma dramática la expresión de genes inducibles por andrógenos como el PSA, hK2 y FKBP51 en células LNCaP y LAPC-4. Estos resultados sugieren que ambos fármacos muestran un potencial terapéutico por sobreexpresión de c-Jun para la prevención y/o el tratamiento del cáncer de próstata. Por otra parte, estos autores ponen de manifiesto que las concentraciones necesarias de NS en la terapia antitumoral deben ser mucho más altas (25 mM) que las necesarias para inhibir la actividad de la COX2 (aproximadamente 1 mM o inferiores). Por lo tanto, si utilizamos las formulaciones de NS destinadas a la administración sistémica disponibles en el mercado para el tratamiento del cáncer, este tipo de terapias iría asociado de forma inevitable a la aparición de efectos tóxicos inaceptables.

2.2. Propiedades físicas y químicas

La NS, N-(4-Nitro-2-fenoxifenil)metanesulfonamida, es un polvo cristalino fotosensible de color amarillo (Kovaíkova, 2003). Presenta un

punto de fusión entre 147 y 149°C y un peso molecular de 308,31 Da. Tiene un pKa de 6,4-6,8 y es soluble en acetona, cloroformo y acetato de etilo. La solubilidad de la NS puede verse modificada con el pH y/o la temperatura (tabla 4) (Bernareggi y col., 2005).

Tabla 4.- Datos de solubilidad de la NS en función del solvente y la temperatura (Bernareggi y col., 2005).

Solvent	Temperature	Solubility (mg/L)
Water	25 °C	5.5
	37 °C	11.4
Saline (0.9% NaCl)	25 °C	5.5
	37 °C	12.2
Buffer, pH 1	25 °C	4.5
	37 °C	7.8
Buffer, pH 6.8	25 °C	12.0
	37 °C	27.6
Buffer, pH 7.4	25 °C	33.6
	37 °C	82.9

Es soluble en disolventes moderadamente polares y su solubilidad disminuye con disolventes de mayor polaridad como el metanol (tabla 5).

Tabla 5.- Datos de solubilidad de la NS en función del solvente (Bernareggi y col., 2005).

Solvent System	Solubility (mg/mL)
Methanol	9.43
Dichloromethane	163.0
Acetone	162.4
Acetonitrile	92.7
Ethanol (95%)	3.6
Ethyl acetate	89.3

La NS es un fármaco lipófilo, con un coeficiente de reparto octanol-agua de 1,788. Es un fármaco BCS clase II (baja solubilidad y alta permeabilidad). Facino y col., (1993) mostraron que tanto la NS como dos de sus principales metabolitos poseen poder antioxidante.

La NS se considera un compuesto no higroscópico cuando se expone a humedades relativas entre 60-70% (a una temperatura de equilibrio que va desde 25°C a 40°C), durante siete días (Amarjit y col., 2001).

2.3. Farmacocinética

La NS se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal. El coeficiente de permeabilidad del fármaco a través de la mucosa colónica es de $48,04 \times 10^{-6}$ cm/sec. En base a esto se clasifica a la NS como un fármaco altamente permeable. Es previsible que dicho coeficiente de permeabilidad se modifique en función del pH del medio dado que su coeficiente de partición lo hace de forma que disminuye cuando este aumenta (tabla 6). A pH 6 y 7 el porcentaje de NS no ionizada es del 72 y el 20% respectivamente.

Tras la administración del fármaco en forma de comprimidos, suspensiones o granulados a individuos sanos, se comprobó que no existían diferencias estadísticamente significativas entre C_{max} , t_{max} y los valores de AUC debido a las propiedades fisicoquímicas del fármaco que confieren a la NS una elevada biodisponibilidad similar a una administración IV. El 40% de la absorción total de la NS en el tracto gastrointestinal se produce en el estómago y en la mitad proximal del intestino delgado.

Tabla 6.- Variación del coeficiente de permeabilidad de la NS en función del medio (Bernareggi y col., 2005).

Solvent	LogP, 25 °C
Water	2.5
Saline (0.9% NaCl)	2.5
Buffer, pH 1	2.6
Buffer, pH 6.8	2.2
Buffer, pH 7.4	1.8

Dicho porcentaje puede parecer elevado teniendo en cuenta el breve periodo de tiempo que permanece allí el fármaco en comparación con el que pasa en la parte distal del intestino, donde se absorbe aproximadamente un 50%. El 10% restante se absorbe en el colon ascendente.

Tras la administración oral de 100 mg de NS a sujetos sanos los valores promedio de C_{max} (3-4 mg/l) se alcanzan en las 2 primeras horas pero los efectos farmacológicos pueden observarse antes que el t_{max}. Ni el t_{max} ni el AUC (20-35 mg h/l) sufren modificaciones significativas por la ingesta simultánea de alimentos. Tampoco existen diferencias entre estas cifras cuando se administran 100 mg de fármaco 2 veces al día durante 7 días consecutivos. El aumento proporcional de C_{max} y AUC como consecuencia de un aumento de dosis, nos sugiere que la cinética de la NS sea lineal hasta una dosis máxima de 100 mg, siendo no lineal para dosis más elevadas, probablemente debido al alto porcentaje de unión a proteínas plasmáticas del fármaco. La administración oral de dosis múltiples de 100 mg (2 veces al día durante 7 días) no modifica las propiedades farmacocinéticas de la NS, en las que tampoco influye significativamente el sexo del paciente. La única excepción es C_{max} y t_{max}, que pueden ser ligeramente menores en las mujeres, lo que sugiere una absorción más rápida de la NS en el sector femenino de la población estudiada.

En este sentido, NS muestra un alto porcentaje de unión a proteínas plasmáticas, llegando a alcanzar un 97,5%, fundamentalmente a la

albúmina sérica, de forma que menos del 3% de la concentración plasmática está en forma libre y disponible para distribuirse a los tejidos extravasculares. Estudios realizados en ratas macho después de una única administración intravenosa de NS demuestran una distribución corporal completa alcanzando concentraciones más altas en el tejido graso, hígado, riñones, pulmones, glándulas suprarrenales, intestino y corazón entre la primera y la cuarta hora después de su administración. Como la mayor parte de los AINEs, la NS muestra un bajo volumen de distribución (V/F entre 0,18 y 0,39 l/kg), que representa entre un 10 y un 20% del volumen corporal total y que sugiere una distribución preferente en el compartimento que representa el líquido extracelular. El modelo farmacocinético que mejor representa la distribución del fármaco en el organismo debido a su rápida distribución es el monocompartimental.

La NS se metaboliza en su mayoría en el hígado mediante múltiples vías, incluyendo el citocromo P-450 (isoenzima 2C9), lo que genera un gran número de posibles interacciones con fármacos que utilicen la misma vía metabólica. Se han llegado a encontrar hasta 16 metabolitos procedentes principalmente de tres vías distintas: la escisión de la molécula en el enlace éter, la reducción del grupo NO₂ a NH₂ y la hidroxilación del anillo fenoxi. Se han realizado pruebas farmacológicas que demuestran que los metabolitos M1 a M5 poseen actividad antiinflamatoria y analgésica, siendo M1 el que mayor actividad presenta en comparación con M2, M3 o M4; mientras que M5 resultó ser prácticamente inactivo.

La figura 3 muestra un esquema con las principales rutas metabólicas del fármaco en humanos:

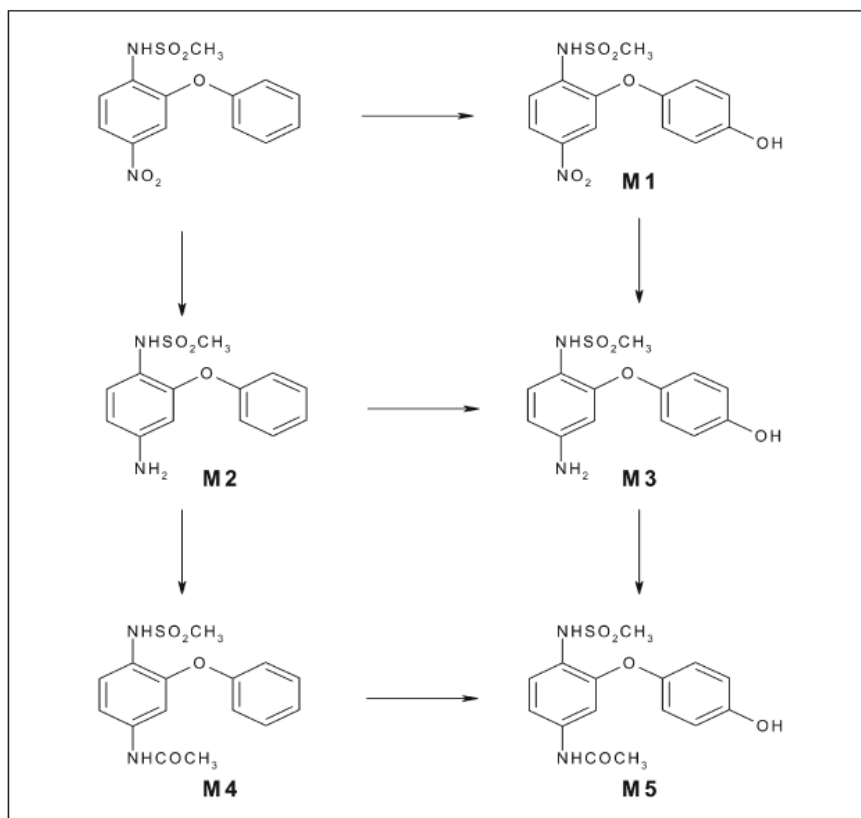


Figura 3.- Principales metabolitos de la nimesulida.

Después de una dosis de 100 mg de NS por vía oral, la vida media de eliminación es próxima a las 4 h (intervalo 1,80-4,73 horas). La eliminación de NS se produce principalmente por vía renal después de su transformación metabólica. Los metabolitos mayoritarios son el 4-nitro-2-(4' hidroxifenoxi)-metano-sulfon-anilida, que es el único metabolito detectado en plasma, y el 4-N acetilamino-2-(4' hidroxifenoxi)-metano-sulfon-anilida. La excreción de la molécula sin biotransformar en orina y heces es despreciable (entre un 6 y un 9%). El aclaramiento total del fármaco en el organismo, atribuido casi en su totalidad al aclaramiento metabólico, para una dosis de 100 mg varía desde los 31,02 hasta los 106,16 ml/h/Kg. Los metabolitos de la NS excretados en heces y orina reflejan, al menos en parte, la dosis administrada que se absorbe por el tracto gastrointestinal y pasa después de la biotransformación hepática a la circulación sistémica antes de ser excretado.

Estudios realizados en pacientes con insuficiencia hepática grado B o C según la escala de Pugh demostraron que la velocidad de eliminación de la NS y sus principales metabolitos se reducía significativamente mientras que C_{max} y AUC se incrementaron con respecto al grupo de individuos sanos que se incluyeron en este estudio, por lo que se deduce que es necesario realizar un ajuste posológico en este tipo de pacientes. Por el contrario, estudios de dosis múltiples y de una única dosis de NS, demuestran que los pacientes con insuficiencia renal con un aclaramiento de creatinina $> 1,6$ l/h no requieren ningún ajuste de dosis puesto que el fármaco se elimina casi completamente por biotransformación metabólica (Bernareggi y col., 2005).

La edad no resultó ser un factor que causase modificaciones clínicamente relevantes en el perfil farmacocinético de la NS. Únicamente, tras la administración oral del fármaco a niños de entre 4 y 15 años, los valores de C_{max} y AUC, después de normalizarse en función del peso corporal, fueron considerablemente más bajos que en adultos, lo que puede deberse a un mayor aclaramiento sistémico y volumen de distribución (debido a una unión a proteínas plasmáticas menor que en adultos). En personas de hasta 80 años no se requiere ningún ajuste posológico.

2.4. Toxicidad

El mayor número de reacciones adversas descritas con NS se refiere al ámbito cutáneo y gastrointestinal. Con respecto a algunos AINEs los problemas gastrointestinales son considerablemente menores, aunque la hepatotoxicidad aumenta. Las reacciones adversas de tipo renal, cardiovascular y cutáneas de tipo grave ocurren con menor frecuencia (tabla 7) (Bjarnason y col., 2005).

Tabla 7.- Principales efectos adversos producidos por NS.

Body/Organ Systems	Number of Cases	Percent of Total
Skin and immune	708	35.3
Gastrointestinal disorders	315	15.7
Hepatobiliary disorders	287	14.3
Hepatic investigations	133	6.6
General disorders	110	5.5
Nervous system & psychiatric disorders	98	4.9
Renal and urinary disorders	94	4.7
Blood and lymphatic system disorders	43	2.1
Vascular disorders	56	2.8
Injury and poisoning	36	1.8
Respiratory, thoracic and mediastinal disorders	34	1.7
Cardiac disorders	21	1.1
Pregnancy, puerperium and perinatal conditions/reproductive/congenital	20	1.0
Endocrine disorders [§]	18	0.9
Ear or eye disorders	18	0.9
Investigations	14	0.7
Number of Cases	2005	–

[§] Includes musculoskeletal, metabolism and nutrition, infections and neoplasms.

En 2002 se sometió a la NS a un procedimiento artículo 31 tras la suspensión de la autorización de comercialización en Finlandia, y posteriormente en España, al detectarse los primeros casos de hepatotoxicidad que requirieron trasplante hepático (Subongkot y col., 2003). En enero de 2012 la Agencia Europea del Medicamento (EMA) publicó un documento (European Medicines Agency, 2012) que establece la eficacia clínica del fármaco para uso sistémico en tratamientos a corto plazo, aunque no se establecen ventajas respecto al uso de otros AINEs. El Comité de Medicamentos de Uso Humano (CMH) constató que los estudios de eficacia de la NS para el alivio del dolor agudo, demostraron que, en esos casos, era comparable a otros analgésicos AINEs tales como el diclofenaco, el ibuprofeno y el naproxeno. La EMA concluye en su informe que la NS muestra un cociente beneficio-riesgo positivo en el tratamiento a corto plazo (menos de 15 días) de patologías agudas como el dolor agudo y la dismenorrea. Sin embargo, la información disponible sobre el uso prolongado del fármaco indica que dicho cociente no es

favorable para el tratamiento crónico sintomático de la osteoartritis (Brater y col., 2001).

En el año 2015 se publicó un estudio sobre la adecuación del uso de la NS en pacientes con dolor inflamatorio en nueve países (Bulgaria, República Checa, Grecia, Hungría, Italia, Polonia, Portugal, Rumanía y Eslovaquia). En la mayoría de los casos, las prescripciones de la NS no excedieron la dosis diaria recomendada de 200 mg (administrado como 100 mg dos veces al día). El número medio de días de tratamiento fue siempre menor que 15. En promedio, el 72% de las prescripciones de NS eran para el tratamiento sintomático de las enfermedades osteoarticulares. La presencia de efectos gastrointestinales (incluyendo úlceras) y la insuficiencia hepática fueron las principales razones para que los médicos que participaron en este estudio no prescribieran NS, con lo que se pudo comprobar cómo las recomendaciones dadas por la EMA en 2012 se siguen en un elevado porcentaje de los casos estudiados (Franchi y col., 2015).

Estudios (Ward y col., 1988) en pacientes con artritis reumatoide que incluían dosis de hasta 800 mg diarios de NS mostraron eficacia en cuanto al alivio del dolor pero una elevación considerable de los niveles plasmáticos de las enzimas hepáticas. En el año 2002, Balabanova (Balabanova y col., 2002) realizó un nuevo ensayo clínico de una duración de 12 semanas con dosis menores de fármaco (200-400 mg) en el que se demostró una alta eficiencia del mismo con una buena tolerancia puesto que solo 8 pacientes describieron efectos secundarios que remitieron al terminar el tratamiento.

En el año 2003, Barskova (Barskova y col., 2003) demostró alteraciones de la tasa de sedimentación eritrocítica (ESR) pero los valores de ácido úrico, glucosa o enzimas hepáticas se mantuvieron inalterados.

2.5. Datos farmacéuticos

La NS se ha formulado en diversas formas farmacéuticas. En todas ellas se ha prestado una especial atención a incrementar la absorción y

minimizar al mismo tiempo el contacto del fármaco con la mucosa gástrica para reducir la irritación gastrointestinal mediante su inclusión en ciclodextrinas (CD), formulando formas de administración transcutánea o parenterales para administración IV o IM (Rainsford, 2005). El mayor problema que presenta este fármaco es su baja solubilidad. Por ello, se han desarrollado y patentado (Bietti y col., 1991) diversos métodos para obtener formulaciones de complejos NS-CD entre las que cabe destacar las propuestas por Nalluri (Nalluri y col., 2003) quien utilizó ciclodextrinas del tipo α -, β - y γ - para mejorar considerablemente las propiedades de disolución y la biodisponibilidad. En la actualidad se encuentra comercializada una formulación de NS con CD en países iberoamericanos (Nimecox®).

Las formas disponibles con NS libre a nivel comercial son: comprimidos convencionales, recubiertos, solubles o efervescentes, cápsulas, gránulos o polvo para suspensión oral en dosis de 50 y 100 mg y suspensiones orales al 1, 2 y 5%. En países como Ecuador existen también supositorios con 50 y 100 mg de NS (Rainsford, 2005). También en países iberoamericanos existe una formulación que incorpora NS micronizada en forma de gel al 2-3%. En la actualidad se comercializan medicamentos que contienen NS en más de 50 países de todo el mundo, principalmente en Europa y Sudamérica. Con respecto a Europa, existe autorización para su comercialización bajo prescripción en 17 estados miembros y está comercializado en 15 de ellos (Bulgaria, República Checa, Chipre, Francia, Grecia, Hungría, Italia, Latvia, Lituania, Malta, Polonia, Portugal, Rumania, Eslovaquia y Eslovenia).

2.6. Formulaciones alternativas

También se han investigado formulaciones líquidas inyectables de NS para uso IM que contienen disolventes como dimetilacetamida (DMA), benzoato de bencilo, alcohol bencílico y oleato de etilo o formas para uso oral que utilizan sales de NS más solubles (lisinato de NS) o excipientes solubilizantes como compuestos efervescentes y tensioactivos (tween 80, cremophor EL,...), hidrotropizantes (ascorbato, benzoato o salicilato

sódico, piperazina, nicotinamida...), codisolventes (etanol, glicerina...) y correctores de pH (bicarbonato, sacarinato, benzoatos...) (Rainsford, 2005).

De Tommaso patentó una formulación de un aducto de NS con N-metilglucamina que incrementaba notablemente la solubilidad de la misma en agua consiguiendo una rápida disolución y asegurando que los pacientes recibieran dosis iguales de fármaco en cada toma. Dicho aducto proporcionó una mayor estabilidad y un incremento en la biodisponibilidad de la NS, lo que facilitó la elaboración de formulaciones para administración parenteral (De Tommaso, 1999).

La micronización es otra alternativa para incrementar la absorción y minimizar la irritación de la mucosa. Monti y Mossi (Monti y Mossi, 1999) han patentado una serie de sales de NS con sodio, potasio, calcio, magnesio o zinc obtenidas mediante precipitación a baja temperatura o mediante secado por congelación o por atomización.

En cuanto a las formas de liberación modificada de NS para vía oral se ha conseguido controlar la liberación de la NS, aumentar su absorción y disminuir la irritación GI. Entre ellas cabe destacar micropartículas de ácido poliláctico y pellets de polisorbato. Son varios autores los que defienden que tanto los sistemas matriciales como los osmóticos ayudarían a reducir los inconvenientes relacionados con la lenta disolución de la NS ejerciendo al mismo tiempo un control programado sobre su velocidad de liberación.

La incorporación de NS en liposomas liofilizados elaborados con colesterol y lecitina hidrogenada y su inclusión en cápsulas de gelatina recubiertas con Eudragit permitió también ralentizar la liberación del fármaco tras su administración por vía oral. Con respecto a la administración percutánea de NS se han estudiado dos alternativas de formulación: el empleo de solubilizantes y promotores de la absorción y el uso de geles.

La NS o su sal sódica se puede utilizar en el tratamiento tópico de lesiones mucosas para lo que se diseñó una formulación mucoadhesiva

con una capa protectora para evitar filtraciones en la cavidad bucal (Rainsford, 2005).

La NS también se ha incorporado en niosomas para mejorar su contacto e interacción con la superficie cutánea. En concreto, el empleo de tween 80 o Span 20 y colesterol en un gel de Carbopol 934 con polipropileno-glicol y glicerina cuadruplicó el efecto alcanzado con un gel de NS libre o la formulación en gel disponible en el mercado (Shahiwala y col, 2002).

3. Nanopartículas (NP)

La nanotecnología es la ciencia que estudia el diseño, síntesis, manipulación y/o aplicaciones de materiales, aparatos y sistemas funcionales de tamaño nanométrico, ya sean naturales o elaborados. Su peculiaridad reside en que presentan propiedades físicas, químicas y biológicas que difieren de forma importante de las propiedades que presentan a escala micro- o macroscópica. Estas características derivan principalmente de la gran superficie específica que ofrecen estos materiales al reducir considerablemente su tamaño. La nanotecnología puede utilizarse para introducir mejoras en campos muy diversos como la agricultura, la informática o la biomedicina (Roco, 2003). Dentro de este último, el uso de la nanotecnología en farmacia se aplica a la prevención, diagnóstico y/o tratamiento de enfermedades, así como a la mejora de la salud y funcionamiento del organismo humano. Sus aplicaciones incluirían el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos o su vectorización, la regeneración de tejidos, la fabricación de implantes, la terapia génica, el diagnóstico mediante imágenes obtenidas a nivel molecular o la fabricación de biosensores (Jain, 2007). La clasificación de los nanosistemas más utilizados en nanotecnología farmacéutica se realiza según sus componentes y características estructurales, siendo los más utilizados los conjugados y micelas poliméricas, liposomas, dendrímeros, NP sólidas lipídicas o NP poliméricas (figura 4).

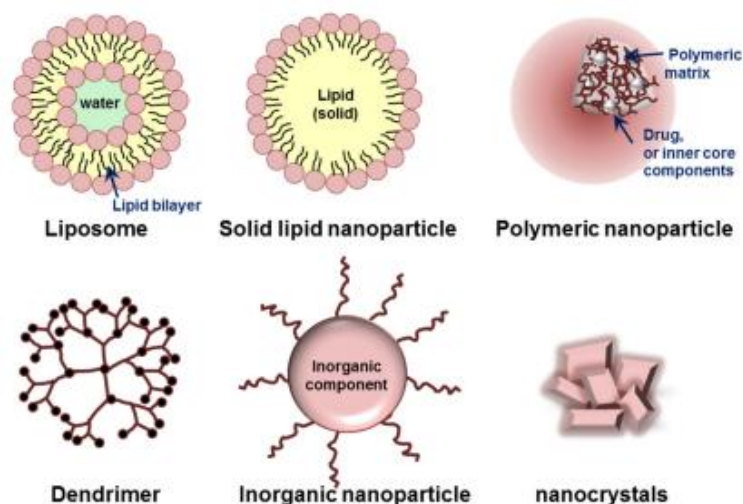


Figura 4.- Representación esquemática de varios tipos de nanosistemas empleados en nanotecnología farmacéutica (Yhee y col., 2016).

Las NP son sistemas coloidales muy versátiles de un tamaño inferior a 1000 nm, que se pueden obtener utilizando distintos procedimientos y materiales. Los métodos de obtención pueden ser clasificados en los de polimerización de monómeros y los que emplean polímeros preformados. Entre los primeros cabe mencionar la polimerización de una emulsión (Bourgeois y col., 1994) o la polimerización interfacial a partir de monómeros (Gao y col., 2004). Entre los que emplean polímeros preformados (Reis y col., 2006; Lal y col., 2011) están la gelificación iónica, nanoprecipitación, emulsión y evaporación del solvente, emulsión espontánea y evaporación del solvente (es una versión modificada del método anterior), salting-out, uso de fluidos supercríticos (Barichello y col., 1999; Yoo y col., 1999; Song y col., 2008; Meziani y col., 2004; Fan y col., 2012).

Las NP ofrecen la posibilidad de incorporar en su interior o adsorbidos en su superficie, fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos, incrementando así su estabilidad y solubilidad, y alterando también su permeabilidad. Atendiendo a su estructura, las NP se clasifican en nanocápsulas o nanoesferas (figura 5).

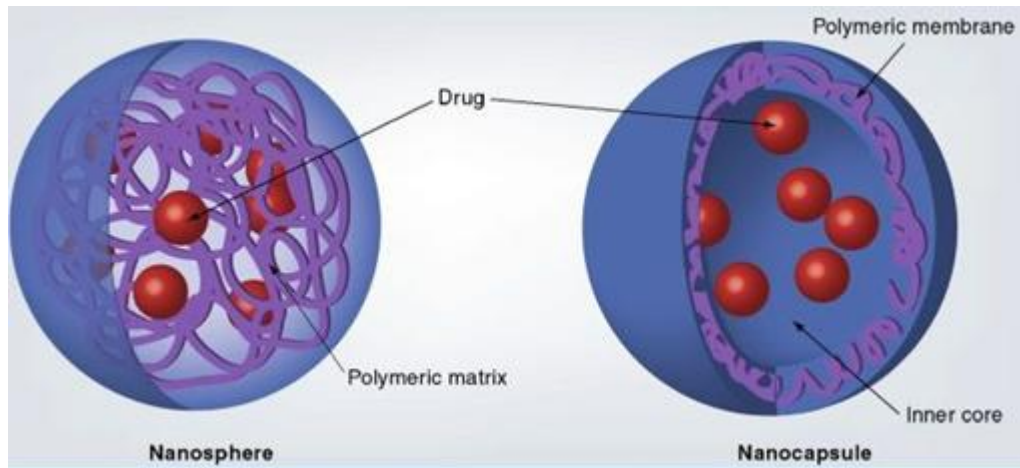


Figura 5.- Representación esquemática de nanocápsulas y nanoesferas.

Las nanocápsulas son sistemas de tipo reservorio constituídos por un núcleo rodeado de una membrana. En este caso el principio activo suele encontrarse en el interior, aunque también puede estar adsorbido en la superficie de la partícula; en cambio, las nanoesferas son sistemas matriciales constituídos por el entrecruzamiento de los componentes de la matriz, donde el fármaco puede encontrarse disperso o, como en el caso de las nanocápsulas, adsorbido en la superficie (Rocha y col., 2009).

Desde el punto de vista de su elaboración (Kumari y col., 2010), se han utilizado una amplia gama de materiales, como por ejemplo: lípidos, polímeros, monómeros, metales o materiales cerámicos. Entre los más utilizados se encuentra el ácido poli-láctico-glicólico (PLGA) por tratarse de un polímero muy bien caracterizado, biodegradable, biocompatible y ya incorporado en productos farmacéuticos comercializados. Idealmente, estos compuestos deben ser no tóxicos, biocompatibles, libres de impurezas y fácilmente procesables. Es importante señalar que el polímero seleccionado para elaborar las NP puede modificar de manera importante las propiedades y estructura de las mismas, y condicionar sus posibles aplicaciones e incluso su vía de administración.

Las NP presentan ventajas frente a otras formulaciones, algunas de las cuales resultan muy destacables en terapéutica y diagnóstico. Kumari. (Kumari y col., 2010) destacó la reducción de efectos adversos y el control de la liberación de fármacos, proteínas u hormonas en el tratamiento

farmacológico o en la prevención de enfermedades entre las que destaca el cáncer. En este sentido, es importante tener en cuenta que, su comportamiento *in vitro* e *in vivo* depende de factores como la vía de administración y el sustrato biológico con el que interactúa, la concentración de NP en la formulación, la carga superficial y su densidad, el peso molecular o el tipo de polímero, su biodegradabilidad, el tamaño de partícula, o la presencia de moléculas de funcionalización superficial. Por ello, para conseguir el objetivo terapéutico deseado, el perfil de liberación o un comportamiento farmacocinético óptimo habrá que realizar una adecuada selección de los componentes de la formulación y del método de obtención. Por tanto, resulta crítico disponer de técnicas de caracterización que permitan determinar las propiedades de las NP a fin de predecir su comportamiento.

Así, Chandrate (Chandrate y Dash, 2015) evaluó la citotoxicidad de NP sólidas lipídicas y de NP de PLGA sin fármaco sobre 2 líneas celulares de cáncer de próstata (DU-145 y DU-145 TXR). Las NP de PLGA no mostraron citotoxicidad significativa sobre ninguna de las líneas celulares estudiadas, mientras que las NP sólidas lipídicas blancas mostraron una citotoxicidad sustancial. Estos resultados contrastan con los obtenidos con otras líneas celulares de cáncer de mama o páncreas en las que su efecto citotóxico fue mínimo.

Li (Li y Huang, 2008) demostró la influencia que pueden tener estos parámetros sobre la farmacocinética y biodistribución de los fármacos encapsulados si se pretende conseguir una vectorización celular activa y/o pasiva tras la administración *in vivo* de la formulación.

Los resultados de Alexis (Alexis y col., 2008) muestran que las NP mejoran el índice terapéutico y reducen la toxicidad de fármacos antineoplásicos, incrementan su solubilidad y estabilidad, e incluso permiten conseguir un efecto selectivo sobre determinadas células mediante su vectorización.

Otra de las ventajas que presentan las NP es su capacidad para mejorar la internalización celular de fármacos poco solubles y poco

permeables, incrementando así su biodisponibilidad y eficacia terapéutica (Perera y col., 2009; Rieux y col., 2006).

La interacción de las NP con las membranas celulares da lugar generalmente a su endocitosis (mediada por receptores, pinocitosis o fagocitosis) aunque también se han descrito procesos de exocitosis (Vasir y Labhassetwar, 2007). Las NP han demostrado su capacidad para evitar el efecto de transportadores de secreción en la membrana, como la p-glicoproteína, que expresan un número importante de células cancerosas (Dong y col., 2009).

Las formulaciones de NP también presentan algún inconveniente asociado a las características anteriormente mencionadas: son inestables cuando se mantienen como suspensiones acuosas por la contaminación microbiana y la agregación, por lo que es habitual su liofilización en presencia de los crioprotectores adecuados (Abdelwahed y col., 2006). Zimmermann (Zimmermann y col., 2000) recurrió a la liofilización de NP sólidas lipídicas destinadas a ser administradas por vía IV para conservar su tamaño y estabilidad durante su almacenamiento. Para optimizar el proceso de liofilización, se estudió como afectaban parámetros como la velocidad de congelación, la concentración del crioprotector, o la temperatura empleada durante el proceso a las características finales de la formulación reconstituida.

El proceso de opsonización que sufren las NP (Owens y Peppas, 2006) en el organismo es otro de los grandes problemas que plantean este tipo de formulaciones a la hora de ser administradas por vía IV. Los fagocitos eliminan de la circulación sanguínea a las NP marcadas previamente por las opsoninas. Este proceso ocurre en muchas ocasiones antes incluso de que las NP hayan llegado al lugar de acción. Para evitarlo, se puede recurrir a la administración intratumoral de las formulaciones, como describe Al-Ghananeem (Al-Ghananeem y col., 2009) o al recubrimiento por adsorción de polímeros como el polietilenglicol (PEG) (Mishra y col., 2016; Jokerst y col., 2011; Champion y col., 2008), que consigue enmascarar las NP frente al sistema retículo endotelial.

3.1. NP y cáncer

El mayor problema que plantean los tratamientos antitumorales a día de hoy es la falta de selectividad celular en cuanto a su actividad farmacológica. La nanotecnología ha demostrado ser capaz de limitar el efecto de los fármacos antineoplásicos a las células tumorales, reduciendo los daños causados en las células sanas y mejorando así el perfil farmacológico de dichos principios activos.

La mayoría de los tumores sólidos poseen características fisiopatológicas únicas que no se observan en tejidos u órganos normales. La angiogénesis suele ser la causa de una arquitectura vascular defectuosa, del deterioro en el drenaje linfático, y del aumento en la producción de mediadores que modifican la permeabilidad endotelial. Las NP pueden aprovecharse de estas características propias de los tumores sólidos para actuar como vehículo farmacológico y conseguir así una acción selectiva sobre las células tumorales. El artículo de Cho (Cho y col., 2008) resume y clasifica, los tipos y características de las NP descritas hasta la fecha, revisando las diferentes estrategias que se pueden seguir para que estos transportadores sean más eficaces y seguros en terapias antitumorales y, por último, plantea alternativas para superar las limitaciones que tiene la nanotecnología.

Fonseca (Fonseca y col., 2002) elaboró NP de PLGA con paclitaxel para aumentar su citotoxicidad *in vitro* en células humanas de cáncer de pulmón, observando efectos más acusados con tiempos de incubación prolongados. Otro principio activo muy empleado en las terapias antitumorales es el docetaxel. Este fármaco fue encapsulado en NP sintetizadas por el método de nanoprecipitación utilizando un copolímero de metoxi-polietilenglicol (MePEG) y PCL (Zheng y col., 2009) cuya cubierta exterior hidrofílica facilita su distribución y aumenta su permanencia en el torrente sanguíneo, mientras que su núcleo interior proporciona una mayor estabilidad al fármaco. Los estudios *in vitro* en células de melanoma B16 mostraron una liberación continua y sostenida de docetaxel y una citotoxicidad dependiente del tiempo y la dosis administrada. Los estudios *in vivo* demostraron un mayor efecto antitumoral y una reducción considerable de los efectos adversos con NP

frente al fármaco libre. El docetaxel también fue encapsulado por Jaina (Jaina y col., 2014) en NP de liberación sostenida de quitosano con un tamaño que oscilaba entre los 170 y los 227 nm. Las NP de quitosano se adsorben a la superficie celular incrementando la cantidad de fármaco en el exterior, generando así un gradiente de concentración que favorece el paso de docetaxel al interior de las células tumorales. El proceso de endocitosis se incrementa en las células tumorales, lo que produce un aumento de la internalización de las NP. Ambos procesos favorecen la entrada de fármaco al interior celular y por tanto tienen un efecto sinérgico sobre el efecto citotóxico de dicho principio activo, lo que explica la diferencia que existe entre su citotoxicidad cuando se administra en su forma libre y encapsulado en las NP.

Brigger (Brigger y col., 2012) describió varios ejemplos de formulaciones de NP destinadas a ser administradas por vía IV o intratumoral para el tratamiento del melanoma, el cáncer de vejiga o mama. Las NP también se aplican en la detección y el diagnóstico de tumores actuando como biomarcadores. Dos ejemplos de formulaciones de NP comercializadas con un fin diagnóstico son Lumirem® (partículas de óxido de hierro revestidas de silicio con un diámetro de 300 nm) y Endorem® (nanopartículas de magnetita de 150 nm de diámetro, recubiertas con dextrano). Se utilizan como contraste y son, respectivamente, utilizados para generar imágenes del tracto gastrointestinal y para la detección de enfermedades del hígado y del bazo.

En los últimos años, algunas formulaciones basadas en sistemas nanoparticulares han dado lugar a medicamentos registrados para aplicaciones oncológicas y otras muchas se encuentran en distintas fases de ensayos clínicos con resultados prometedores (Wang y col., 2013).

Pillai en 2014 (Pillai, 2014) resumió algunas de las formulaciones con NP, liposomas o micelas aprobadas por la FDA para el tratamiento del cáncer. Una de ellas es una formulación de doxorubicina encapsulada en liposomas unilamelares recubiertos con PEG, lo que permite que el fármaco permanezca más tiempo en el torrente sanguíneo (Barenholz, 2012). Dichos liposomas tienen un tamaño aproximado de 80-90 nm. Esta

formulación está aprobada por la FDA para el tratamiento del cáncer de ovario metastásico y el sarcoma de Kaposi y se encuentra comercializada bajo los siguientes nombres: Doxil® (Johnson & Johnson, EE.UU, 1995), Caelyx® (Janssen-Cilag, Europa), Evacet® (Liposome Company INC.) y Lipodox® (Sun Pharma). Myocet® (Enzon Pharmaceuticals) (European Medicines Agency) fue aprobado por la FDA en Europa y Canadá en el año 2000. Es otra formulación de doxorubicina en liposomas aunque, a diferencia de las anteriores, no tiene PEG. Se utiliza como tratamiento de primera línea del cáncer de mama metastásico en combinación con ciclofosfamida. Gracias a estas formulaciones que limitan la actividad farmacológica a las células tumorales, se consigue reducir considerablemente uno de los principales y más graves efectos adversos de la doxorubicina: su cardiotoxicidad.

La daunorrubicina es un antibiótico de la familia de las antraciclinas con actividad antineoplásica que también fue encapsulado en liposomas y aprobado por la FDA en abril de 1996 para el tratamiento del sarcoma de Kaposi asociado al VIH bajo el nombre comercial de DaunoXome® (Gilead Sciences) (Forssen, 1997). Los estudios realizados con radiomarcadores demostraron una captación selectiva de las células tumorales gracias a este tipo de formulación.

Hasta la fecha, la única formulación de taxanos en NP aprobada por la FDA, está comercializada como Abraxane® (Abraxis Bioscience / Celgene) (Yardley, 2013) y es una variante del paclitaxel convencional, en la cual el fármaco está unido a la albúmina en forma de NP. La albúmina participa en la transcitosis caveolar endotelial de componentes plasmáticos, y estudios *in vitro* han demostrado que su presencia favorece el transporte del paclitaxel a través de las células endoteliales. Este transporte está mediado por el receptor de albúmina gp-60 y resulta en una acumulación de paclitaxel en el área tumoral. Las células tratadas con paclitaxel sufren disfunción del ensamblamiento de los microtúbulos, segregación cromosómica y división celular. Abraxane® fue aprobado por la FDA para el tratamiento del cáncer de mama metastásico (2005), como tratamiento de primera línea para el cáncer avanzado de pulmón no microcítico (2012) en combinación con carboplatino en pacientes a los que

no se les recomienda recurrir a la cirugía curativa o quimioterapia, y en combinación con gemcitabina como primera línea de tratamiento en pacientes con adenocarcinoma pancreático en estado metastásico (2013).

Marqibo® es una formulación de liposomas que contiene sulfato de vincristina en una cubierta de colesterol y esfingomiolina aprobada en 2012 para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda Ph-recidivante o refractaria a otros tratamientos (Silverman, 2013.)

3.1.1. NP y cáncer de próstata

Hay un interés sustancial en el desarrollo de opciones terapéuticas basadas en el uso de nanodispositivos para el tratamiento del cáncer de próstata así como para la detección precoz de las lesiones precancerosas y malignas (Sanna, 2012).

Su uso pretende superar la falta de especificidad de los agentes quimioterapéuticos convencionales. Entre ellas, se han encontrado dos tendencias claramente diferenciadas:

1.- la utilización de NP magnéticas para el tratamiento del tumor prostático mediante hipertermia, para lo cual se utilizan NP de ferrita que, tras ser inyectadas a nivel prostático intersticial, se someten a campos magnéticos alternos, lo que provoca su calentamiento y la muerte de las células adyacentes sin llegar a ser tratamientos con una elevada toxicidad y que solo modifican ligeramente y de manera puntual la calidad de vida del paciente (Johannsen y col., 2005; Johannsen y col., 2007; Johannsen y col., 2010; Du y col., 2009; Krishnan y col., 2010); y

2.- el diseño de formulaciones basadas en NP que contienen fármacos antitumorales o combinaciones de ellos. Gryparis (Gryparis y col., 2007) demostró recientemente que la administración intravenosa de NP de PLGA y PEG cargadas con cisplatino en ratones consiguió prolongar su permanencia en la circulación sistémica. La actividad antitumoral *in vitro* de las NP con cisplatino en células LNCaP fue comparable a la del fármaco libre. Por otra parte, las NP blancas demostraron tener una

citotoxicidad baja, que se incrementó de manera proporcional a la relación de PLGA / PEG utilizada para prepararlas.

El docetaxel es otro de los fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer de próstata. Su encapsulación en (Sanna y col., 2011) NP de copolímeros de ácido poliláctico (PLA) y policaprolactona (PCL) o de PLGA y PCL mediante nanoprecipitación mostró que las NP de PLGA-PCL tenían un efecto citotóxico sobre células PC-3 superior al obtenido con fármaco libre.

Cellax® (Li y col., 2012) es el nombre comercial por el que se conoce al compuesto que contiene carboximetilcelulosa acetilada (CMC-Ac) unida covalentemente a PEG y a un fármaco hidrófobo, como podría ser el docetaxel. Hoang (Hoang y col., 2014) realizó estudios *in vivo* utilizando xenotransplantes generados a partir de la inoculación de células PC3 en ratones a los que se les administró una única dosis por vía subcutánea de Cellax® cargado con docetaxel. Se comprobó que los ratones con dicho tratamiento mostraron una reducción del tumor prácticamente del 100%, mientras que los ratones tratados con fármaco libre mostraron una reducción inicial que se detuvo a los 20 días y permitió que el tumor incrementase de nuevo su tamaño. Los efectos adversos provocados por el docetaxel se redujeron considerablemente en los ratones tratados con la formulación de NP. En un estudio comparativo realizado por Ernsting (Ernsting y col., 2012) entre esta formulación y Abraxane®, Cellax®-DTX incrementó la exposición sistémica del fármaco y consiguió una captación selectiva por el tumor, el hígado y el bazo, a diferencia del fármaco aprobado por la FDA. Además, la concentración de docetaxel liberado después de 10 días fue muy superior al IC_{50} , mientras que la concentración de paclitaxel liberado por Abraxane® a las 24 horas, fue prácticamente indetectable. Bteich (Bteich y col., 2016) evaluó la eficacia de una formulación de NP con cabazitaxel y Cellax® sobre células LNCaP resistentes al tratamiento con docetaxel y sobre células PC3. Los ratones a los que se les había inducido un tumor con células LNCaP, tuvieron una respuesta parcial al tratamiento con cabazitaxel, con una supervivencia media de 61 días mientras que para los tratados con placebo, la supervivencia fue de 34 días. Los ratones tratados con las NP mostraron

una mayor tolerabilidad y una mejora significativa con respecto a los anteriores consiguiendo un porcentaje de cura del 70%. Los resultados fueron similares en los estudios con células PC3, consiguiendo una reducción total del tumor en los ratones tratados con NP mientras que, en los tratados con fármaco libre, el volumen del tumor se incrementó a partir del día 82.

Como ya se ha mencionado, Chandrate (Chandrate y Dash, 2015) encapsuló paclitaxel y ciclopamina en NP sólidas lipídicas y en NP de PLGA evaluando sus efectos antitumorales y citotóxicos en 2 líneas celulares de cáncer de próstata (DU-145 y DU-145 TXR). El porcentaje de lisis celular obtenido con ambas formulaciones fue superior al conseguido con la administración de la combinación de los fármacos en solución, lo que demuestra la importancia del efecto farmacológico en NP.

Además del efecto que se puede conseguir mediante la vectorización pasiva, se están diseñando nanotransportadores que contienen ligandos específicos para receptores que son constitutivos de la membrana celular de células tumorales o que son sobreexpresados en éstas, permitiendo de este modo una distribución selectiva, que disminuya los posibles efectos secundarios del principio activo sobre las células sanas.

En la actualidad no hay ninguna formulación de NP aprobada por autoridades regulatorias para su uso clínico en tumores malignos urológicos. Sin embargo, sí existen formulaciones de NP modificadas en distintas fases de investigación para dirigir el fármaco específicamente hasta las células tumorales en los cánceres urológicos (Haley y Frenkel, 2008). Por ejemplo, Dhara (Dhara y col., 2008) desarrolló una formulación de NP de PLGA y PEG con cisplatino con aptámeros de antígeno prostático de membrana (PSMA) en su superficie. Un estudio comparativo realizado con PC3 (PSMA-) y LNCaP (PSMA+) mediante microscopía de fluorescencia demostró que las NP entraban por endocitosis de manera específica en las células PSMA+. Estos resultados coincidían con los que obtuvieron Farokhzad y cols. (Farokhzad y col., 2004; Farokhzad y col., 2006; Gu y col., 2008; Gu y col., 2009) con NP de PLGA-*b*-PEG-COOH conjugadas con el aptámero A10 RNA cargadas con cisplatino. Estudios *in vivo* empleando

estas NP con docetaxel, administradas por inyección intratumoral a ratones con tumores LNCaP implantados a nivel dorsal, mostraron que las partículas conjugadas con el aptámero, redujeron considerablemente el tamaño del tumor aumentando la eficacia terapéutica 3 veces respecto a la obtenida con el fármaco libre. Hasta la fecha esta es la única formulación con NP poliméricas que ha superado con éxito los estudios preclínicos de la fase I para el tratamiento de tumores urológicos. Actualmente esta formulación se encuentra en la fase II y se está evaluando su eficacia y seguridad (Hrkach y col., 2012; Autio y col., 2016).

Se ha constatado que la sobreexpresión del PSMA favorece la captación de folato para conseguir una división celular rápida, lo que algunos autores han aprovechado para el diseño de sistemas nanoparticulares como el formado por 3([N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil] colesterol en los que se incorporó el complejo DSPE-PEG-folato y DNA plasmídico (nanoplex). Los estudios *in vitro* en células LNCaP sugieren que estas partículas podrían ser buenos vectores específicos para la terapia génica (Hattori y col., 2004). Otro de los ligandos que más se emplean en el diseño de estas nuevas NP es la transferrina ya que su receptor correspondiente se encuentra sobreexpresado en muchos tipos de cáncer. Sanjeeb (Sanjeeb y col., 2004) demostró que las NP con paclitaxel tenían una actividad antitumoral sobre células PC3 mayor que las mismas NP que no incorporaban dicho ligando en su superficie.

Deeken (Deeken y col., 2013) desarrolló estudios de fase I (dosis máxima tolerada, respuesta clínica, toxicidad y farmacocinética) con una formulación para administración IV de docetaxel incorporado en liposomas.

También se han realizado estudios de fase II con la formulación Abraxane® (Shepard y col., 2009), anteriormente mencionada, con la finalidad de emplearlo en el tratamiento de tumores de origen urológico. Este estudio se realizó en pacientes sometidos a prostatectomía radical, si bien sus resultados son similares a los alcanzados con paclitaxel libre.

3.2. NP y NS

Considerando las propiedades farmacológicas de la NS, sus propiedades físicoquímicas y las ventajas que ofrecen los sistemas nanoparticulares, algunos autores han desarrollado y evaluado su incorporación en estos sistemas.

Pushpendra (Pushpendra y col., 2009) obtuvo una liberación sostenida de la NS en NP sólidas lipídicas en comparación con el fármaco libre. Raffin (Raffin y col., 2012) obtuvo efectos farmacológicos modificados empleando NP sólidas lipídicas elaboradas con manteca de karité. También con NP sólidas lipídicas, Bondi (Bondi y col., 2008) han mostrado un incremento en el potencial terapéutico oncológico del fármaco gracias al perfil de liberación obtenido.

Dashora (Dashora y col., 2007) estudió el efecto que tenían las condiciones de preparación (proporción de polímero: fármaco, velocidad y tiempo de agitación, etc.) de micropartículas de etilcelulosa sobre su morfología y sobre la liberación de la NS. Del mismo modo, Sengel-Turk (Sengel-Turk y col., 2014), Ravikumara (Ravikumaray col., 2009) y Krishna (Krishna y Amareshwar, 2013) estudiaron también la importancia del porcentaje de tensioactivo empleado y la proporción fármaco:polímero sobre la eficiencia de la encapsulación, el tamaño de partícula, el índice de polidispersidad y la carga superficial de las NP cargadas con NS.

Freitas (Freitas y Marchetti, 2005) desarrolló una formulación de NS encapsulada en micropartículas (MP) biodegradables de PLA para administración parenteral. En su estudio se caracterizan las MP con respecto a capacidad de encapsulación, tamaño de partícula, eficiencia, morfología, perfil de liberación y propiedades cinéticas. Los resultados indican que podría ser una formulación adecuada si se busca administrar la NS por vía IM.

Khan y cols (Khan y col., 2010; Khan y col., 2010; Khan y col., 2011; Khan y col., 2010) han desarrollado y optimizado formulaciones de NS en MP de hidroxipropilmetilcelulosa o etilcelulosa con la finalidad de controlar su liberación.

Gülsün (Gülsün y col., 2013) elaboró y caracterizó formulaciones de nanocristales de NS con pluronic F127 observando un incremento de la solubilidad del fármaco. También se describe el hecho de que la NS sea un fármaco altamente permeable.

Debuigne y col., (2000) desarrollaron y caracterizaron dos formulaciones de NP de NS a partir de 2 sistemas de microemulsiones distintos: uno compuesto por E170 / miristato de isopropilo / agua / n-butanol y otro, por E170 / miristato de isopropilo / agua / isopropanol. En ambos casos el tamaño fue independiente de la concentración de fármaco, de la relación del factor R: [agua] / [E170] y del uso de n-butanol o isopropanol. Las NP se formaron de manera instantánea y se mantuvieron estables durante varios meses.

Por tanto, no existen trabajos que evalúen la aplicación de las formulaciones nanoparticulares de NS en cáncer de próstata.

II. Objetivos

Como se ha descrito anteriormente, una buena parte de los trabajos que evalúan la eficacia antitumoral de las NP *in vitro* lo hacen empleando cultivos celulares en los que las partículas están en contacto directo con las células. Sin embargo, para que esta situación se produzca *in vivo* es necesario que éstas alcancen la diana celular tras atravesar barreras biológicas diversas dependiendo de la vía de administración. Así, es frecuente encontrar artículos en los que los autores optan por una administración intratumoral en tumores implantados en el dorso de animales inmunodeprimidos, una situación que con frecuencia es diferente de la que se produciría en la práctica clínica, en la que los tratamientos se administran por vía sistémica para el tratamiento de tumores distantes de la zona de administración, lo que conlleva una distribución poco selectiva.

La localización selectiva del medicamento en el tejido canceroso y más concretamente en aquellas zonas de éste que presenten la lesión tisular supondría una gran ventaja al disminuir la exposición al fármaco de aquellas áreas sanas del organismo. Esto se puede lograr mediante la administración intraarterial de la formulación o mediante una inyección intratumoral. En este sentido, existe la posibilidad de realizar una administración intratumoral en condiciones similares a las que se emplearían en el ámbito clínico para tratar tumores de órganos accesibles desde la superficie cutánea, como la próstata o la mama. En el primer caso, esta aproximación es una de las opciones en el tratamiento del cáncer de próstata mediante braquiterapia. Por tanto, la tecnología y procedimientos asociados al tratamiento del cáncer de próstata mediante braquiterapia resultarían totalmente aplicables y adaptables a la administración de formulaciones de liberación controlada de NS destinadas a estar en contacto con el tejido tumoral.

Asimismo, resulta también deseable que estas formulaciones controlen la liberación del principio activo dando lugar a un comportamiento farmacocinético reproducible que proporcione niveles de fármaco constantes en la biofase.

El diseño de formulaciones capaces de controlar la liberación y vectorizar fármacos ha sido el objeto de numerosos estudios. La mayor parte de ellos combinan varias estrategias para conseguirlo como la utilización de materiales poliméricos que reaccionan ante cambios del pH o de fuerza iónica, polímeros biodegradables por los sistemas enzimáticos del organismo, moléculas que actúan en un sistema ligando-receptor o antígeno-anticuerpo, etc. Con respecto a la forma farmacéutica, se han utilizado tanto sistemas monolíticos (cápsulas, comprimidos o implantes) como sistemas multiparticulares (pellets, micro y nanopartículas). Sin embargo, conseguir una interacción selectiva del sistema con las lesiones del tejido prostático mediante una administración con técnicas de braquiterapia parece más factible si se incorpora el fármaco en sistemas transportadores multiparticulares del tipo NP y MP al tratarse de sistemas farmacéuticos muy versátiles en cuanto a aplicaciones y vías de administración. Una de las ventajas de estos sistemas es la posibilidad de administrarlos por vía parenteral. Además, si lo que se pretende es una internalización del sistema que transporta el fármaco por parte de la célula tumoral para incrementar aún más la concentración de fármaco a nivel citoplasmático es más conveniente seleccionar transportadores de tamaño más pequeño, como las NP e incluso añadir ligandos específicos dirigidos a receptores de superficie.

Por tanto, la finalidad de este trabajo es evaluar el potencial terapéutico de la NS para el tratamiento coadyuvante y prevención del cáncer de próstata como modelo de cáncer epitelial, mediante su incorporación en sistemas transportadores poliméricos del tipo NP, elaboradas a partir de polímeros farmacéuticos biocompatibles y biodegradables, capaces de actuar como depósito del principio activo y de dirigirlo de forma selectiva a nivel de las lesiones inflamatorias, premalignas o malignas de la próstata.

La localización específica de las NP en las regiones de la próstata que presenten dichas alteraciones mediante modificación de la superficie de las mismas y su administración por vía parenteral perineal, proporcionaría elevadas concentraciones intracelulares de fármaco en el tejido prostático lesionado.

Con ello, podría además conseguirse una prevención de los efectos adversos hepáticos y gastrointestinales asociados al fármaco.

Para conseguir el objetivo propuesto se plantean las siguientes etapas experimentales:

- Desarrollo de un método analítico para determinar NS.
- Desarrollo y caracterización de las formulaciones de NP con NS.
- Evaluación del efecto de las NP sobre la permeabilidad del fármaco mediante la utilización de un modelo de membrana.
- Evaluación de la citotoxicidad de la NS *in vitro* mediante cultivos celulares (células PC3 y DU-145).
- Evaluación de la captación de las NP *in vitro* en cultivos celulares (células PC3 y DU-145).
- Evaluación farmacocinética de la NS tras inyección intravenosa e intraprostática en ratas albinas.

III. Materiales y métodos.

1. Materiales.

La NS y el alcohol polivinílico (PVA, Pm 30000-70000) se obtuvieron de Sigma-Aldrich. El ácido poli-láctico-glicólico (PLGA RG-504, Resomer, Pm 45000) se obtuvo de Boehringer Ingelheim. Los crioprotectores empleados (sacarosa, glucosa anhidra y trehalosa dihidratada) durante el proceso de liofilización, el ácido fosfotúngstico que se utilizó en la tinción negativa para las muestras que se observaron al microscopio electrónico de transmisión, y tanto el quitosano de alto como el de bajo peso molecular se obtuvieron de Fluka Chemie. El hialuronato sódico se adquirió en Fagron y la lecitina de soja que se utilizó para formar las membranas de los estudios de permeabilidad, en MP Biomedicals. Los disolventes empleados fueron agua ultrapura obtenida de un equipo milliQ, diclorometano, dodecano, ácido clorhídrico, etanol 96% y PEG 300 de Panreac y ácido acético, dimetilsulfóxido, metanol y acetonitrilo calidad HPLC de Scharlau. De este mismo laboratorio se obtuvieron el bromuro potásico utilizado en la elaboración de las pastillas para el análisis por espectrofotometría de infrarrojos y el hidrogenofosfato de sodio, dihidrogenofosfato de potasio y el cloruro sódico (Panreac) empleados para preparar el tampón PBS pH 7,4 (según Farmacopea Española). El yoduro de potasio se adquirió en Guinama mientras que el ácido bórico y el yodo molecular o diyodo necesarios para la valoración del PVA residual de las NP se obtuvo en Quimipur.

De todos los materiales empleados merecen una breve descripción aquellos que dan lugar a la estructura y características de las NP.

1.1 Acido poli-láctico-glicólico (RG-504)

El ácido poli-láctico-glicólico (PLGA) se obtiene por copolimerización del ácido poliláctico (PLA) y ácido poliglicólico (PGA). La proporción de ambos monómeros modifica la cristalinidad del producto. Como norma general cuanto mayor es la proporción de poli (ácido glicólico) (PGA), mayor es la velocidad de degradación, con una excepción:

la proporción 50:50 es la que presenta una mayor velocidad de degradación (<http://www.sigmaaldrich.com>).

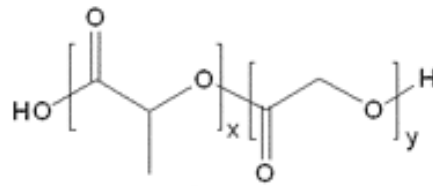


Figura 6.- Estructura del PLGA.

El PLGA es un polímero amorfo sintético biodegradable. Se utiliza en tecnología farmacéutica (Danhier y col., 2012) por su seguridad y baja toxicidad con la finalidad de encapsular fármacos y modular su liberación. Se degrada en el organismo por reacciones de hidrólisis que dan lugar a compuestos no tóxicos que se eliminan por vías de excreción fisiológicas.

Su peso molecular oscila entre los 38000 y los 54000 Da y su densidad es de 0,45-0,60 dl/g. Además de la composición y el peso molecular, la temperatura necesaria para alcanzar el estado vítreo (rígido y frágil) de estos biopolímeros, conocida como temperatura de transición vítrea (T_g), es una propiedad muy importante que se ha de tener en cuenta en la preparación de las partículas y es esencial para la evaluación de la estabilidad morfológica, propiedades de difusión y velocidad de biodegradación. La T_g tiene relación directa con el peso molecular del biopolímero. La presencia de humedad o solventes orgánicos residuales en estos sistemas puede alterar la T_g en varios grados centígrados y llegar a un valor cercano a la temperatura corporal, lo cual podría afectar la velocidad de degradación de las NP y por consiguiente al perfil de liberación del fármaco encapsulado en ellas. Lo más habitual será encontrar una temperatura de transición vítrea en el análisis calorimétrico del PLGA de entre 46 y 50 °C.

1.2 Quitosano

El quitosano (CS) es un copolímero formado por unidades de 2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucosa y 2-amino-2-desoxi- β -D-glucosa unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 4). Se obtiene de la quitina, uno de los biopolímeros más abundantes de la naturaleza junto con la celulosa, que forma parte de la estructura de soporte de numerosos organismos vivos, tales como artrópodos (crustáceos e insectos), moluscos y hongos. La obtención del CS a partir de quitina se realiza por desacetilación de la misma. El peso molecular del CS se expresa como una media de los pesos de las moléculas presentes en la muestra. Las dos formas más comunes de expresar el peso molecular son: M_w , que es peso molecular promedio en peso (normalmente más empleado) y M_n , que es peso molecular promedio en número.

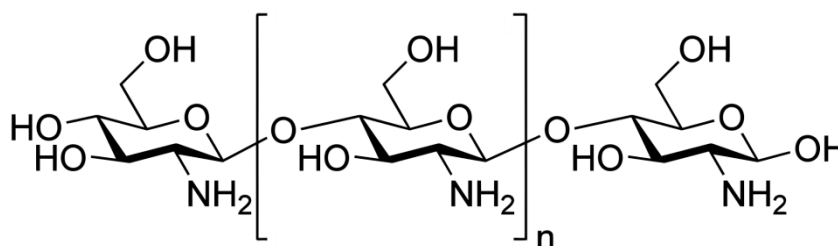


Figura 7.- Estructura del quitosano.

El CS se ha utilizado ampliamente en la investigación y desarrollo de sistemas potencialmente innovadores para la liberación de fármacos (Krishna y col., 2010) e ingeniería de tejidos y comercialmente en la fabricación de parches cicatrizantes. Más del 50% del número total de solicitudes de patentes registradas en 2006 que reivindican el uso de este biopolímero como una parte sustancial de la invención, están relacionadas con la liberación de fármacos, ingeniería de tejidos y cicatrización de heridas.

Desde el punto de vista fisicoquímico, el CS es un biopolímero hidrosoluble que puede formar películas, hidrogeles, micro y NP en condiciones y medio ácido suave.

El CS se ha utilizado en la investigación farmacéutica centrada en el desarrollo de vehículos nanoparticulares innovadores. En este sentido, son de destacar en estos sistemas tanto la capacidad para proteger macromoléculas bioactivas frente a la degradación, como la habilidad para transportarlas a través de las barreras de las mucosas.

Además del empleo del CS en la obtención de NP como material matricial, una alternativa es su incorporación en superficie, bien de forma aislada o junto a otros oligo y polisacáridos como ciclodextrinas, alginato, ácido hialurónico o glucomanano. La base racional para la incorporación de dichos componentes en las NP es la de mejorar la interacción con barreras mucosas y por tanto, incrementar la biodisponibilidad de macromoléculas terapéuticas al administrarlas por vía transmucosa (Goycoolea y col., 2009). Este tipo de recubrimiento puede realizarse por simple interacción electrostática entre polímeros con carga negativa como el PLGA, y el CS, que está cargado positivamente (Guo y Gemeinhart, 2008).

1.3 Ácido hialurónico

El ácido hialurónico (HA) es un aminopolisacárido que existe en la matriz extracelular de los tejidos conectivos de animales vertebrados. El HA tradicionalmente se extrae del humor vítreo de bovinos, de la cresta de gallos o de cordones umbilicales. El mismo polisacárido se produce actualmente a gran escala a partir de las bacterias *Streptococcus zooepidermicus* y *Streptococcus equi*, por lo que su precio ha disminuido notablemente.

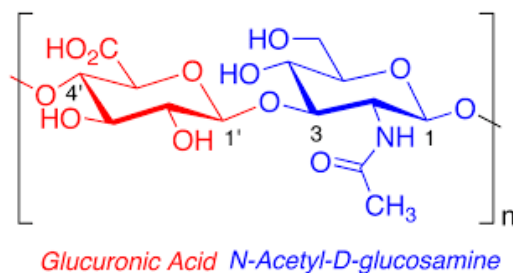


Figura 8.- Estructura ácido hialurónico.

La estructura química del HA se define como un heteropolisacárido lineal copolimérico tipo AB constituido por unidades de ácido D-glucurónico unidas por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ y por residuos 2-acetamido-2-deoxi- β -Dglucosa enlazadas de acuerdo a un patrón $\beta(1\rightarrow3)$.

Desde un punto de vista biofarmacéutico, el principal interés que despierta este polisacárido se centra en sus propiedades bio y mucoadhesivas, y de forma más específica, debido a la afinidad que existe entre los receptores celulares CD44 y el HA (Knudson y col., 2002).

El CS y el HA han sido asociados conjuntamente en NP híbridas co-gelificadas con el propósito de mejorar las propiedades para el transporte de macromoléculas.

La figura 9 muestra un esquema de la modificación superficial de las NP como consecuencia de la interacción electrostática de los polímeros descritos según la tecnología *layer by layer deposition* (Ai y col., 2003). Existe la posibilidad de utilizar más de dos componentes y seguir añadiendo capas con una única condición: alternar adecuadamente los compuestos con carga positiva y negativa.

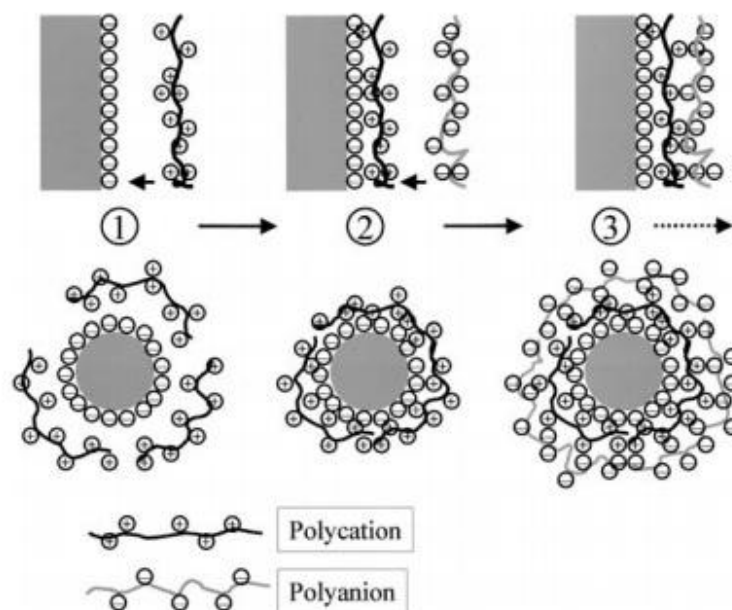


Figura 9.- Nanopartículas elaboradas mediante la tecnología *layer by layer deposition*.

2. Métodos

2.1. Validación del método analítico

2.1.1. Análisis de la NS por espectrofotometría UV-visible.

La determinación cuantitativa de la NS se llevó a cabo mediante espectrofotometría UV-Vis (Shimadzu UV-PC2101). Para ello se determinó el máximo de absorción de una solución de NS (5 µg/ml) en una mezcla de acetonitrilo:agua (50:50) y en una mezcla de acetonitrilo: tampón PBS pH 7,4 (50:50). En el primer caso se observa un máximo a 230 nm, sin embargo, cuando se sustituye el agua por PBS se observa un cambio que desplaza la señal característica hasta los 402 nm. Se han obtenido curvas de calibrado con estas dos mezclas disolventes para la determinación de la encapsulación tras la preparación de las NP y para evaluar su comportamiento en condiciones fisiológicas simuladas de pH 7,4.

La concentración de fármaco en cada muestra se calculó utilizando la ecuación de la recta obtenida a partir de una batería de patrones externos de concentración variable, desde 1 hasta 25 µg/ml.

✓ **Especificidad**

Para evaluar la especificidad del método analítico se analizaron muestras placebo de NP obtenidas según el protocolo de elaboración de la formulación. La señal obtenida se tuvo en cuenta a la hora de calcular la concentración de NS presente en las formulaciones con fármaco.

✓ **Exactitud**

Para determinar la exactitud del método analítico se prepararon por triplicado soluciones de fármaco con las 2 mezclas disolventes mencionadas (acetonitrilo:agua y acetonitrilo:PBS) a 3 concentraciones: 1, 5 y 25 µg/ml. El contenido de NS en dichas muestras se expresó como porcentaje recuperado respecto al contenido teórico. El porcentaje de recuperación deberá estar entre un 98 y un 102%, lo que correspondería con un error relativo de ± 2 .

✓ **Precisión intermedia**

La precisión intermedia o precisión intra-laboratorio se ha estimado a partir de 5 patrones, con concentraciones de 1, 2, 5, 10 y 25 µg/ml para evaluar la precisión del método frente a variaciones internas del laboratorio (analista, día, instrumento, etc.). Para ello, se han utilizado 2 espectrofotómetros (Shimadzu UV-PC2101 y Thermo Spectronic Helios Gamma 110-240 V) y se ha utilizado el coeficiente de variación como referencia para comprobar la precisión intermedia del método analítico (Fernández, 2012).

✓ **Linealidad**

Para evaluar la linealidad, se prepararon un mínimo de 3 series utilizando las dos mezclas disolventes anteriormente mencionadas. Las concentraciones de NS empleadas como patrones de calibración fueron: 1, 2, 5, 10 y 25 µg/ml.

El análisis de los resultados se llevó a cabo mediante el programa informático Statgraphics Centurion aplicando el análisis de la varianza de un factor (ANOVA).

✓ **Determinación de los límites de detección y cuantificación**

De los distintos métodos para establecer el límite de detección se ha optado por calcular la cantidad promedio de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco (\bar{Y}_n) más tres veces la desviación estándar del blanco (S_n), siendo “n” el número de veces que se repite la medida:

$$L_D = \bar{Y}_n + 3 \cdot S_n$$

Con respecto al límite de cuantificación, se ha procedido a calcular la cantidad promedio de analito que proporciona una señal igual a la señal

del blanco (Y_n) más diez veces, en este caso, la desviación estándar del blanco (S_n).

$$L_D = \bar{Y}_n + 10 \cdot S_n$$

2.1.2. Análisis de la NS por HPLC

Como alternativa a la espectrofotometría, se utilizó la técnica de HPLC para valorar y cuantificar la NS en el estudio de permeabilidad-disolución realizado con fármaco libre en disolución, debido a que las concentraciones de fármaco fueron inferiores al límite de cuantificación de la técnica espectrofotométrica.

Este método ha sido desarrollado y validado en un trabajo realizado anteriormente (datos sin publicar) y por ello, en este trabajo, solo se comprobó la linealidad del método utilizando 3 curvas de calibrado a partir de 3 soluciones madre patrón con concentraciones de: 0,1; 0,25; 0,5; 1 y 1,5 $\mu\text{g/ml}$. El equipo utilizado fue un Agilent 1090 y las condiciones en las que se realizó el análisis por HPLC fueron:

- Fase estacionaria: se eligió como fase estacionaria una columna de fase reversa C18, con partículas de relleno de 5 μm de diámetro y dimensiones de 150x4,6 mm (Kromasil®).
- Volumen de inyección: 20 μl .
- Temperatura: 40°C.
- Fase móvil: se ha utilizado una fase móvil compuesta por agua:acetonitrilo:metanol (50:30:20).
- Flujo: 1ml/min.
- Longitud de onda de análisis: 230 nm.

2.2. Elaboración de las formulaciones.

✓ NP de ácido poli-láctico-glicólico (NP)

Las NP han sido elaboradas a partir de PLGA por un método de evaporación del disolvente.

Se disolvieron 100 mg de PLGA en 2 ml de diclorometano junto con 10 mg de NS. Esta fase orgánica se dispersa en 10 ml de una disolución de PVA al 0,25 o al 1% mediante una sonda de ultrasonidos (Braun) a una potencia de 250 W durante 5 minutos. Posteriormente, se eliminó el disolvente orgánico residual en un rotavapor (Heidolph) a temperatura ambiente y se centrifugó el volumen acuoso restante a 8000 o 12000 g dependiendo de la concentración del tensioactivo, respectivamente, a 20° C durante 15 minutos. Tras la retirada del sobrenadante que contiene el tensioactivo se resuspendieron los pellets de NP en el mismo volumen de agua milliQ utilizando la sonda de ultrasonidos a 250 W en modo intermitente cada 0,5 segundos a lo largo de 1 minuto, aproximadamente. Como formulaciones control se prepararon, NP placebo siguiendo el mismo esquema experimental pero omitiendo la adición de la NS y suspensiones del fármaco al no introducir el PLGA en la fase orgánica.

✓ NP de PLGA recubiertas con quitosano (NPCS y NPCSlmw)

Las NP recubiertas con CS de alto (NPCS) y bajo peso molecular (NPCSlmw) se elaboraron de forma similar pero, tras la centrifugación inicial para eliminar el exceso de PVA, los pellets de NP se redispersaron en una disolución acuosa del correspondiente CS al 0,1% en una disolución de ácido acético al 0,5%. Tras una incubación de 15 minutos a 37° C en un baño de agitación, se eliminó el exceso de CS mediante centrifugación durante 15 minutos a 20° C y diferentes velocidades según el peso molecular del CS (tabla 8). Los pellets de NP se resuspendieron finalmente en agua milliQ para obtener las formulaciones finales. Como control se prepararon, NP placebo siguiendo el mismo esquema experimental sin NS y suspensiones del fármaco al no introducir el PLGA.

✓ **NP de PLGA recubiertas con quitosano y ácido hialurónico (NPCSHA)**

Para recubrir con HA las NP de PLGA previamente recubiertas con CS (alto peso molecular), se utilizó una solución del polímero al 0,05% en una fase acuosa de pH=5. De forma similar a lo descrito para CS, el exceso de HA no adsorbido se eliminó mediante centrifugación (tabla 8) y posterior resuspensión en agua.

Tabla 8.- Velocidades de centrifugación (g) para el aislamiento de las NP.

Formulación	%PVA	
	0,25	1
NP	8000	12000
NPCS	12000	20000
NPCSI _{mw}	8000	15000
NPCSHA	10000	18000
NPCSI _{mw} HA	10000	18000

Como controles se prepararon, al igual que en los dos casos anteriores, NP placebo siguiendo el mismo esquema experimental pero sin NS, y suspensiones del fármaco con los recubrimientos de CS y HA.

Durante el proceso de elaboración de las distintas formulaciones de NP se toman muestras para observarlas al microscopio óptico y comprobar que en ellas no existe fármaco no encapsulado en forma de cristales.

A continuación se muestra un esquema (figura 10) que sirve como resumen del método de elaboración de las formulaciones definitivas de NP y de las condiciones en las que se prepararon.

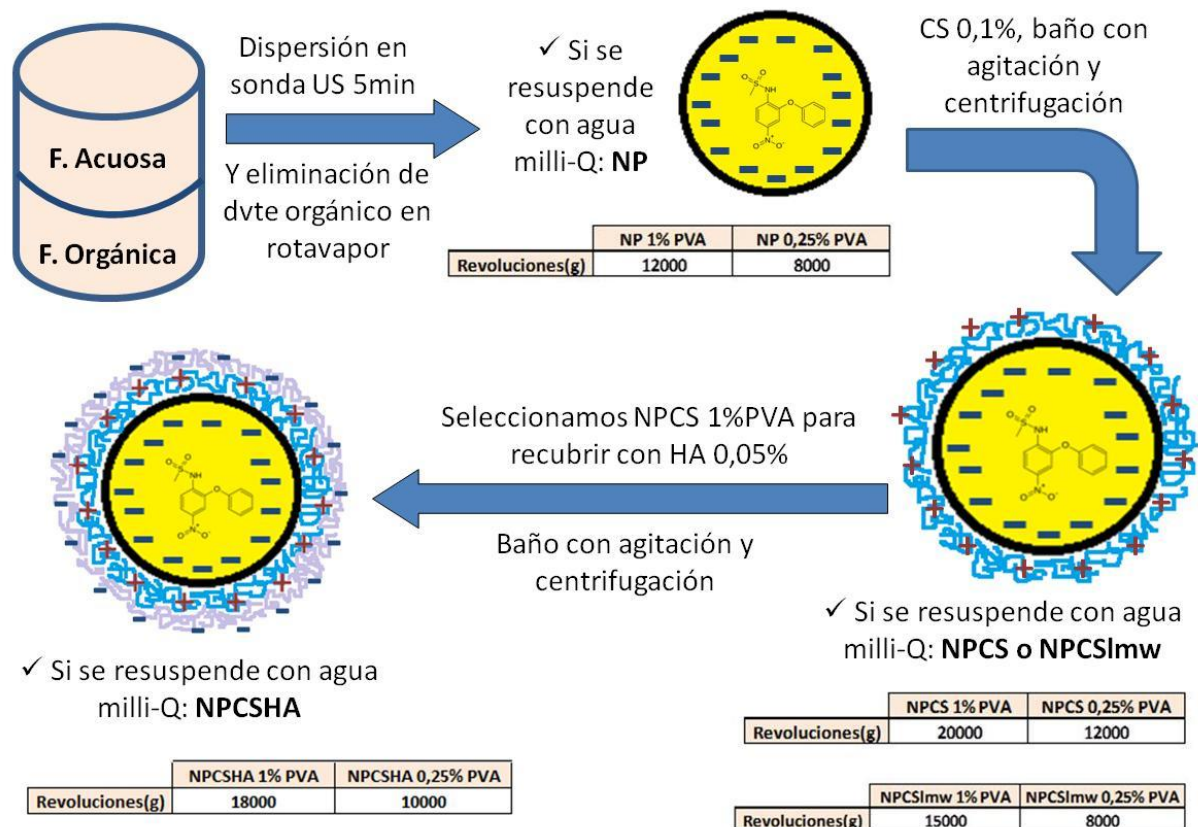


Figura 10.- Esquema del método seguido para elaborar las NP.

Las condiciones de elaboración descritas son el resultado de una serie de ensayos preliminares en los que se evaluó la influencia de modificar los siguientes factores:

- ✓ Sustitución de PLGA por policaprolactona (PCL)
- ✓ Variación de la cantidad de NS incorporada en la preparación: 5 y 10 mg de fármaco.
- ✓ Concentración del tensioactivo utilizado: se ensayaron también concentraciones de 0,1 y 0,5% PVA.
- ✓ Modificación de las revoluciones a las que se realizaban los procesos de centrifugación según la concentración de PVA y el polisacárido utilizado en cada recubrimiento para conseguir sedimentar las partículas y al mismo tiempo evitar la agregación entre las mismas durante el proceso de resuspensión.

- ✓ Presencia de NaCl en la fase acuosa de la emulsión. Se añadieron 500 mg en el caso de las formulaciones elaboradas con 1% de PVA y 100 mg en las formulaciones que contenían PVA al 0,25% para comprobar si de esta forma podía incrementarse la eficacia de encapsulación del fármaco en las NP.

2.3. Caracterización de NP

2.3.1. Tamaño de partícula

El tamaño de partícula ha sido evaluado con un equipo analizador Microtrac (Leeds & Northrup) que consta de dos bancos ópticos que abarcan conjuntamente un rango entre 3 nm y 700 µm.

Las medidas se realizaron con volúmenes de muestra entre 100 y 200 µl de partículas dispersos en 5 ml de agua milliQ a fin de obtener un rango óptimo de dispersión de la luz.

Los valores de span o índice de polidispersión de cada una de las distribuciones obtenidas se han calculado a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Span} = \frac{D_{0,9} - D_{0,1}}{D_{0,5}}$$

donde $D_{0,1}$, $D_{0,5}$ y $D_{0,9}$ son los diámetros de partícula determinados correspondientes al percentil 10, 50 y 90, respectivamente.

Un valor elevado de span indica una distribución heterogénea de tamaños. Se considera que una población de NP es monodispersa cuando se obtienen valores de span próximos a 1.

2.3.2. Determinación de la carga superficial (Potencial Zeta)

La carga superficial de las NP en suspensión se determinó mediante el cálculo del potencial zeta. El potencial zeta es un parámetro fundamental que controla la interacción de las partículas en suspensión.

Este potencial viene determinado, principalmente, por la naturaleza de la superficie de las partículas y el medio de dispersión.

Su medida en las NP se realizó en un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments), que relaciona su movilidad electroforética y el potencial zeta. Las muestras se midieron por triplicado y se prepararon mediante dilución de 100 μl de la suspensión original con agua milliQ en la celda de medida del equipo hasta un nivel de señal necesario para realizar la determinación con fiabilidad.

2.3.3. Morfología (SEM y TEM)

✓ Microscopio electrónico de barrido (SEM)

El estudio morfológico de las distintas formulaciones de NP desarrolladas se llevó a cabo en un microscopio electrónico de barrido (SEM, Philips XL-20).

Para la observación se procedió a realizar una extensión sobre un soporte de aluminio mediante frotis. Una vez que las muestras se secaron a T^a ambiente (24h) se recubrieron en un evaporador catódico (Polaron) con oro coloidal en unas condiciones que garantizan un recubrimiento de 50 nm de espesor.

✓ Microscopio electrónico de transmisión (TEM)

El microscopio electrónico de transmisión (TEM) se empleó para analizar de forma más precisa la estructura que presentan las NP tras una tinción negativa con un metal pesado.

Para la tinción, se depositó una gota de la formulación de NP sobre un rejilla de cobre recubierta con una membrana Formvar. Tras 1 minuto se retiró el exceso de líquido con papel de filtro y se añadió una gota de una solución de ácido fosfotúngstico (PTA) al 2%. El exceso de esta solución se retira del mismo modo tras 10 segundos en contacto con las NP. Por último y antes de observar las muestras con el TEM (JEOL JEM-

2000 FX), se dejan secar durante al menos 24 horas a temperatura ambiente (Silva y col., 2016).

2.3.4. Cálculo del PVA residual

Para calcular la cantidad de PVA que permanecía asociada a las NP, se utilizó un método colorimétrico basado en la formación de un complejo de color entre dos grupos hidroxilo adyacentes en la estructura del PVA y una molécula de yodo (Sahoo y col., 2002). A 100 µl de NP se añadieron 2 ml de NaOH 1 M. Tras incubación en estufa a 60° C durante 15 minutos se neutralizó la muestra con 1,5 ml de HCl 1 N. El pH final debe ajustarse a un valor de 5-6 y después, añadir a cada muestra 3 ml de una solución de ácido bórico 0,6 M, 0,5 ml de una solución de I₂ / KI y agua milliQ hasta un volumen final de 10 ml. Finalmente, se midió la absorbancia de las muestras a 680 nm en el equipo Thermo Spectronic Helios Gamma, para lo que hubo que construir previamente la correspondiente recta de calibrado en un rango de concentraciones que fueron desde los 250 hasta los 2000µg/ml.

2.3.5. Determinación del rendimiento del proceso y eficacia de encapsulación

El rendimiento del proceso de elaboración de las NP se determinó a partir del peso de los residuos secos (PRs) obtenidos tras centrifugar 500 µl de suspensión de NP durante 15 minutos a 20° C y a las revoluciones que se han especificado anteriormente para cada formulación (tabla 8), según la siguiente ecuación:

$$\% R_{tO} = \frac{PRs * 100}{Q_{PLGA} + Q_{NS} * 0,5 / V_F}$$

donde Q_{PLGA} y Q_{NS} son las cantidades de polímero y fármaco, respectivamente utilizadas en la elaboración de las NP y V_F representa el volumen final de la formulación.

El grado de encapsulación de fármaco en las NP (%) se determinó utilizando el método espectrofotométrico validado anteriormente para calcular las cantidades de fármaco presentes en las suspensiones de NP (Q_{SUSP}) y las presentes en el sobrenadante (Q_{STE}) tras su centrifugación durante 15 minutos a 20 °C a las revoluciones que se han especificado anteriormente para cada formulación (tabla 8):

$$\% \text{ captado1} = Q_{SUSP} * 100 / (Q_{SUSP} + Q_{STE})$$

Para la determinación del contenido de principio activo de las NP cargadas con NS a 100 µl de las NP se añaden, en primer lugar, 2 ml de acetonitrilo para romper la estructura del sistema polimérico y a continuación, se diluye y agita la muestra con 1,9 ml de agua milliQ. La absorbancia de esta mezcla se mide mediante espectrofotometría UV-visible y se calcula la concentración de fármaco presente utilizando la recta de calibrado obtenida a 230 nm utilizando como disolvente acetonitrilo:agua (50:50).

Del mismo modo se determinó la cantidad de NS no encapsulada en las NP utilizando la misma técnica espectrofotométrica y la misma recta de calibrado aplicada a los sobrenadantes. A 1 ml del sobrenadante se le añadieron 2 ml de acetonitrilo y posteriormente, 1 ml de agua milliQ. Si la muestra presentaba turbidez después de agitarse en el agitador de tubos, como ocurrió con las NP preparadas con un 1% de PVA, se centrifuga durante 15 minutos a 20000 g y 20° C.

La resuspensión de las NP puede suponer una pérdida en el porcentaje de fármaco encapsulado. Para valorarlo se calcula el porcentaje captado final a partir de las cantidades de fármaco presentes en las suspensiones de la NP (Q_{SUSP}) y las halladas en el sobrenadante obtenido en la preparación del residuo seco ($Q_{STE RS}$):

$$\% \text{ captado2} = (Q_{SUSP} - Q_{STE RS}) * 100 / Q_{SUSP}$$

El porcentaje de fármaco recuperado se calculó con la cantidad de NS presente en las suspensiones de NP y la hallada en los sobrenadantes correspondientes a dichas suspensiones con respecto a la cantidad de fármaco añadida inicialmente (Q_T):

$$\% \text{ Recuperación} = (Q_{SUSP} + Q_{STE}) * 100 / Q_T$$

2.3.6. Proceso de liofilización

Uno de los principales problemas que presentan las NP es su inestabilidad física (formación de agregados entre las partículas) y química (degradación de los componentes que forman las partículas o pérdida de fármaco encapsulado). La liofilización es un proceso muy utilizado para incrementar la estabilidad de soluciones y suspensiones. Es frecuente añadir agentes crioprotectores durante el proceso de liofilización.

El proceso de liofilización se ha llevado a cabo en un equipo Virtis Unitop 400 SL, USA en dos etapas:

- ✓ desecación primaria: las muestras previamente congeladas en nitrógeno líquido (-196° C) se introducen en la cámara del liofilizador a -40° C y una presión de 4×10^{-5} atm durante 24 horas.
- ✓ desecación secundaria: Se aumentó la temperatura de la cámara hasta 15° C durante 48 horas y a 30° C durante las siguientes 24 horas.

Se estudió el uso de distintos agentes crioprotectores como trehalosa, glucosa y sacarosa a concentraciones de 1 y 5%. Se valoró también el efecto del proceso de liofilización sobre las formulaciones estudiadas sin crioprotector. Los crioprotectores ensayados se añadieron directamente a la suspensión de NP antes de la congelación con nitrógeno líquido. Los liofilizados se resuspendieron en agua milliQ por agitación manual suave.

Por otro lado, se estudió la congelación utilizando nitrógeno líquido y almacenando dichas muestras en un arcón a -80° C como procedimiento de estabilización alternativo. Estas NP se descongelaron a temperatura ambiente y, en los casos en los que fue necesario, se utilizó la sonda de ultrasonidos para conseguir una suspensión sin agregados.

Tras cada proceso, las formulaciones se compararon con sus formulaciones de origen desde el punto de vista de presencia de agregados, porcentaje de NS captado por las NP, tamaño de partícula, y presencia o no de efecto Tyndall.

2.3.7. Grado de cristalinidad e interacciones fármaco-excipientes. Estudios calorimétricos (DSC).

Los estudios de DSC se han llevado a cabo en un equipo Mettler DSC-30, TA 4000 calorimeter (Mettler-Toledo) utilizando Indio como patrón de calibración. Se utilizaron muestras de aproximadamente 5 mg, que en el caso de las NP correspondían a los sedimentos obtenidos tras centrifugación a 20000 g de 500 μ l de la suspensión. Una vez secos, los residuos se dispusieron en cápsulas de aluminio con dos orificios en la cubierta. El estudio se realizó a una velocidad de calentamiento de 5 $^{\circ}$ C por minuto entre 20 y 300 $^{\circ}$ C manteniendo una corriente de N₂ en el interior del dispositivo.

2.3.8. Análisis mediante espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía infrarroja se utiliza para la identificación (análisis cualitativo) de los distintos componentes presentes en una muestra y de sus potenciales interacciones (Berthomieu y Hienerwadel, 2009).

En este estudio se obtuvieron los espectros de absorción de la NS, PLGA, PVA, CS, HA y de las distintas formulaciones de NP elaboradas. Para ello se utilizó un equipo Perkin Elmer 2200 *Spectrometer* y las muestras se prepararon con una mezcla de la materia prima o formulación correspondiente y KBr en una proporción 1:10. Las medidas se realizaron en un intervalo de longitud de onda de 400-4000 cm^{-1} y una resolución de 4 cm^{-1} . El detector se purgó cuidadosamente con helio para incrementar el nivel de la señal emitida con cada muestra y reducir la humedad.

2.4. Estudios de liberación *in vitro*

Para obtener información sobre el mecanismo de liberación de la NS encapsulada en las formulaciones de NP, se han realizado varios estudios *in vitro* complementarios entre sí, con la finalidad de contrastarlos con aquellos obtenidos en los estudios de cultivos celulares *in vitro* y farmacocinéticos *in vivo*.

2.4.1. Liberación inmediata

En los ensayos de liberación inmediata se disponen en tubos eppendorf volúmenes variables de las suspensiones de NP (10, 100, 500 μ l) con tampón fosfato pH 7,4 o agua milliQ como medios de dilución para obtener un volumen final de 1 ml. Inmediatamente después se procede a la centrifugación de las muestras a 20000 g durante 15 minutos y se determinan las concentraciones de fármaco en el sobrenadante mediante espectrofotometría a 402 nm o 230 nm, respectivamente. Se establece así la capacidad que las NP tienen para retener la NS frente a la dilución.

2.4.2. Liberación en función del tiempo

En estos estudios se puso en contacto la formulación con un medio acuoso (PBS pH 7,4) y se evaluó en condiciones *sink* (20 μ l de cada formulación en 1,5 ml de PBS pH 7,4) la cinética de liberación de la NS a 37° C. Se prepararon por triplicado 5 muestras iguales para analizar la cantidad de fármaco cedida a distintos tiempos (2, 4, 7, 15 y 24 horas). Transcurrido el tiempo indicado, las muestras se centrifugan a 20000 g durante 15 minutos a 37° C y se valora la NS cedida por espectrofotometría a 402 nm.

2.5. Estudios de permeabilidad

La NS es un fármaco BCS clase II que atraviesa las barreras biológicas mediante difusión transcelular. Por tanto, la influencia que su

formulación en NP pueda tener sobre su permeabilidad se puede evaluar *in vitro* empleando membranas artificiales. En este sentido, se han llevado a cabo estudios con la técnica PAMPA y otros combinando la permeabilidad y la liberación del fármaco a partir de las NP.

2.5.1. Ensayo de Permeabilidad con Membranas Artificiales en Paralelo (PAMPA)

Estos estudios se han realizado con el sistema patentado por Millipore previamente validado con ketoprofeno (datos no mostrados). El compartimento donador tiene un volumen final de 150 μl que contiene tampón PBS pH 7,4 como medio de dilución y NS en las distintas formulaciones objeto de estudio. La forma libre de la NS utilizada como control consistió en una disolución del fármaco en DMSO de forma que la concentración final del disolvente en el medio fuera del 5% y la del fármaco 100, 200 o 400 μM . Con respecto a las formulaciones de NP se han evaluado volúmenes de 7,5, 15 y 25 μl . El compartimento receptor está constituido por 300 μl de PBS pH 7,4 en el que, para evitar la retrodifusión en los estudios realizados con NS en solución, se añadió DMSO en la misma concentración que en el compartimento donador (5%). La membrana se formó *in situ* al adicionar 5 μl de una solución de lecitina al 2% en dodecano sobre el soporte microporoso de fluoruro de polivinilo que hay en la parte inferior del compartimento donador. El protocolo experimental se inicia con la adición del medio receptor, la formación de la membrana y finalmente, la adición del producto a ensayar en el compartimento donador y ensamblaje del sistema, que se incubó durante 6 horas a temperatura ambiente; como puede verse en la figura 11.

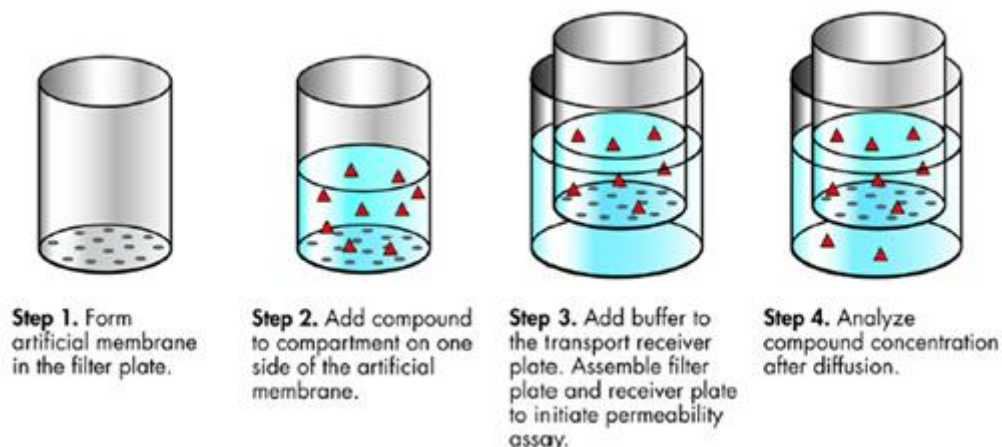


Figura 11.- Detalles del protocolo experimental del sistema PAMPA.

Las concentraciones de NS en el compartimento receptor se determinaron por espectrofotometría a 402 nm. Con los valores de absorbancia obtenidos y siguiendo las indicaciones del fabricante del *kit* (www.millipore.com), se calcularon los coeficientes de permeabilidad P_e empleando la siguiente ecuación:

$$\log P_e = \log \left[C * \left(-\ln \left(1 - \frac{C_{NSR}}{C_{NSE}} \right) \right) \right]$$

donde C es:

$$C = \left[\frac{V_D * V_R}{(V_D + V_R) * A * t} \right]$$

V_D y V_R son los volúmenes de los compartimentos donador y receptor, respectivamente, A el área de difusión y C_{NSR} la concentración de fármaco en el compartimento receptor a tiempo t. La concentración en el equilibrio C_{NSE} se refiere a la que alcanza la NS cuando se mezclan los compartimentos donador y receptor.

Para determinar el balance de masas al finalizar el experimento, el fármaco remanente en el compartimento donador y retenido en la membrana fue extraído y analizado mediante las mismas técnicas espectrofotométricas descritas anteriormente.

En aquellos casos en los que el proceso de extracción producía muestras con algo de turbidez, estas se midieron también a 500 nm, en las que la absorbancia real de cada una de ellas se obtuvo mediante la diferencia $A_R = A_{402nm} - A_{T 500nm}$ (Castanho y col., 1997; Elsayed y Cevc., 2011).

2.5.2. Ensayo de disolución/permeabilidad

El sistema PAMPA presenta ciertas limitaciones para predecir la permeabilidad real de un fármaco a través de membranas, por lo que, para contrastar los resultados obtenidos y basándonos en el modelo propuesto por Kataoka y cols. (Kataoka y col., 2011) se diseñó el sistema que aparece esquematizado en la figura 12 con el que se pretende estudiar la influencia que puede tener el proceso de liberación del fármaco encapsulado en las NP sobre la permeabilidad del mismo a través de una membrana como la utilizada en el experimento PAMPA.

Este sistema está compuesto por 2 cámaras, una donadora y otra receptora, y una membrana que las separa impregnada con una disolución de lecitina al 2% en dodecano, respetando la misma composición y concentración de lípido por cm^2 que en PAMPA. El experimento se realizó a una temperatura constante de 37° C. Se añadió un volumen de 1,35 ml de formulación en el compartimento donador. El volumen del compartimento receptor se mantuvo en constante agitación mediante el uso de agitadores magnéticos y, para mantener condiciones *sink*, se empleó un reservorio externo de tampón PBS pH 7,4 (volumen total 50 ml) conectado a la cámara basal de forma que la velocidad de recirculación simulara el flujo sanguíneo prostático empleando una bomba peristáltica (Gilson). La cantidad del fármaco permeado se determinó a partir de alícuotas del reservorio tomadas a diferentes tiempos. Tras cada toma de muestra se procedió a reponer el mismo volumen extraído con medio de dilución nuevo (300 μ l). Para realizar el balance de masas correspondiente a cada estudio, al tomar la última muestra, se introdujo la membrana dentro de 12 ml de una solución de acetonitrilo y PBS (50:50) para extraer y cuantificar la NS retenida en dicha membrana.

Este estudio se realizó con las distintas formulaciones de NP y con una cantidad equivalente de NS libre para comparar la diferencia de comportamiento. La solución de NS libre se preparó utilizando DMSO como disolvente pero, debido a la elevada solubilidad del fármaco en dicho disolvente y su baja solubilidad acuosa, al diluir el DMSO en tampón PBS, se obtuvo un precipitado. Por ello, además de las formulaciones de NP, se analizó la disolución/permeabilidad al compartimento receptor del sistema, del fármaco no disuelto, que formaría un depósito que iría liberando NS de forma progresiva, y la del fármaco en disolución obtenido previa centrifugación de la suspensión para eliminar el precipitado formado.

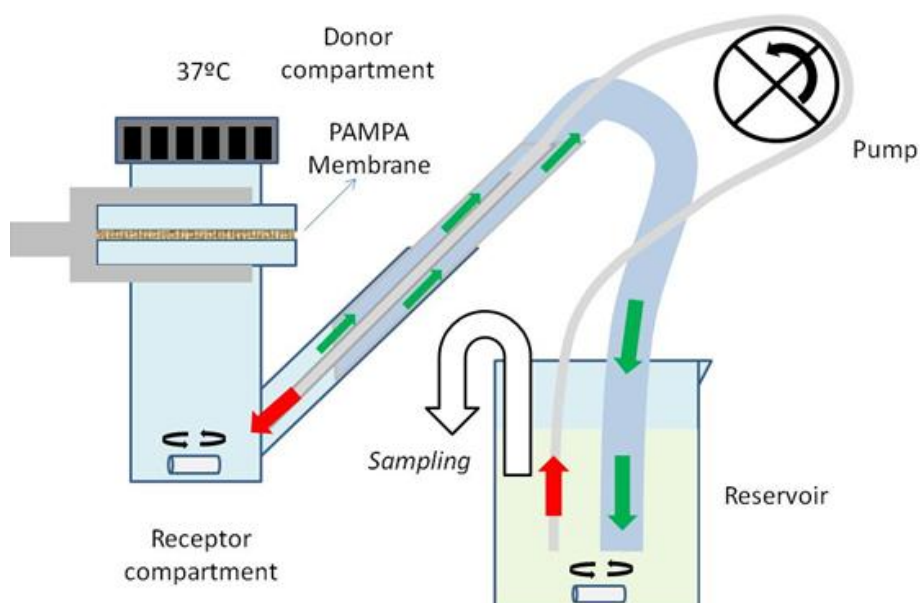


Figura 12.- Detalles del sistema diseñado para estudiar la disolución/permeabilidad.

Las muestras correspondientes a las formulaciones de NP se valoraron mediante la técnica espectrofotométrica descrita anteriormente, utilizando la recta de calibrado obtenida con una longitud de onda de 402 nm, mientras que las muestras correspondientes a los estudios realizados con NS libre se valoraron mediante HPLC. En este último caso fue necesario añadir un 0,2% de ácido clorhídrico con respecto al volumen total de la muestra antes de inyectar en el HPLC. Para

eliminar de las muestras analizadas mediante espectrofotometría la interferencia generada por su propia turbidez, al igual que en el estudio realizado con el sistema PAMPA se midió la absorbancia a 402 nm y se le restó la señal obtenida a 500 nm.

2.6. Estudios de eficacia terapéutica *in vitro*

Una vez caracterizadas las formulaciones de NP, se procedió a evaluar su comportamiento y eficacia *in vitro* en cultivos celulares.

2.6.1. Cultivos celulares

En este trabajo se han utilizado líneas celulares PC-3 y DU-145 (carcinoma de próstata) para realizar los estudios de viabilidad celular y se han incubado las células en presencia de concentraciones crecientes de NS libre y encapsulada en NP, NP-CS, NPCSHA y las mismas NP sin fármaco, utilizando como controles células no tratadas. El ensayo de viabilidad realizado es un ensayo colorimétrico denominado MTT. Dicho procedimiento es un método colorimétrico que mide cuantitativamente la actividad metabólica de las células viables y que se basa en la capacidad que tienen las deshidrogenasas mitocondriales de las células metabólicamente activas de reducir la sal de tetrazolio (MTT), de color amarillo e hidrofílica, a un compuesto hidrofóbico (formazán), de color azul oscuro. Tras la captación del MTT, las células se rompen y se puede proceder a la lectura de la absorbancia de cada muestra a 570/630 nm, que será directamente proporcional al número de células viables.

Las células se sembraron en placas de poliestireno de 24 pocillos/1 ml (Beckton Dickinson) a una densidad de 15000 cel/pocillo. El medio empleado en los cultivos celulares fue RPMI 1640 (Invitrogen Ref. 21875) suplementado con suero bovino fetal (10%) (Invitrogen Ref. 10499) y una mezcla antibiótica de Penicilina/Estreptomicina/Anfotericina B (Invitrogen Ref. 15240). Para poder realizar la siembra de células correctamente fue necesario levantarlas del *flask* de mantenimiento añadiendo una mezcla Trypsina/EDTA durante un minuto y ajustando la concentración de forma

que 1 ml de medio añadido en cada pocillo representase 15000 células aproximadamente. Para ello, previamente es necesario cuantificar las células vivas. Pasadas 72 horas desde la siembra de células en sus correspondientes pocillos, se retiró y renovó el medio de cultivo y se adicionaron los diferentes volúmenes de formulaciones a ensayar (10, 20, 40, 80, 160 µl en el caso de NP cargadas con NS y 20, 40, 80 y 160 µl para las NPB). En el caso de NS libre, la adición de fármaco al medio de cultivo en concentraciones crecientes (5-400 µM) se realizó en DMSO de forma que este alcanzara una concentración del 0,5% v/v. Las lecturas de absorbancia se realizaron tras 48 horas de tratamiento mediante el siguiente procedimiento: en primer lugar se retira y se renueva el medio de cultivo para evitar interferencias causadas por la turbidez que puedan generar las NP, después se añade el reactivo MTT a cada pocillo y tres horas después se vuelve a retirar el medio para reemplazarlo por DMSO.

La viabilidad celular se expresa como porcentaje según la siguiente ecuación:

$$\%Viabilidad = \frac{Abs_{muestra} * 100}{Abs_{control}}$$

Abs_{muestra} es la absorbancia correspondiente a las células tratadas con NS libre o en NP mientras que Abs_{control} es la correspondiente a las células sin tratamiento (medio de cultivo o DMSO 0,5%).

2.6.2. Captación celular *in vitro* (microscopía confocal y citometría de flujo)

Para analizar con más detalle el tipo de interacción que existe entre las NP y las células de cáncer de próstata estudiadas en el apartado anterior, fue necesario recurrir a la microscopía confocal. El objetivo es la obtención de imágenes fluorescentes de alta resolución que permitan obtener información sobre los mecanismos de interacción de las NP marcadas con algún componente fluorescente.

✓ Microscopía confocal

Para poder realizar los estudios correspondientes a la internalización de las NP, se utilizó la 6-cumarina (CUM), un compuesto lipofílico y biocompatible, que se incorporó en las NP como marcaje fluorescente. La CUM, un polvo cristalino de color rojizo, es el fluorescente más utilizado en los marcajes de internalización celular. Una de sus ventajas frente a otros compuestos es que, con una baja inclusión en las partículas (< 0,5%; p/p) es capaz de presentar una elevada fluorescencia. Además, la CUM, por su alta solubilidad lipídica, puede ser extraída de células lisadas y de muestras de tejido usando disolventes orgánicos, como el metanol o el acetato de etilo con una eficacia de extracción del 95% (López, 2011) y puede ser fácilmente cuantificada por HPLC o por otras técnicas como la espectrofotometría por fluorescencia o la fluorimetría (Hroboňova y col., 2012).

Para obtener las NP cargadas con CUM se preparó una disolución de dicho compuesto fluorescente en diclorometano con una concentración de 0,4 mg/ml. Para no modificar las características de las partículas desarrolladas en este trabajo, el método elegido para su elaboración fue el de evaporación del disolvente, en el que se sustituyeron 500 µl del diclorometano empleado para preparar la emulsión inicial por el mismo volumen de la disolución de CUM previamente preparada.

Fue necesario elaborar una recta de calibrado para poder caracterizar las NP de CUM y para ello se valoraron dos métodos: espectrofotometría UV-Visible (461,5 nm) o espectrofotometría por fluorescencia (emisión: 504 nm, excitación: 460 nm) (Raikara y col., 2006).

Para realizar la recta de calibrado mediante espectrofotometría por fluorescencia se prepararon varias diluciones, desde 5 ng/ml hasta 25 ng/ml, utilizando como disolvente una mezcla de H₂O: diclorometano: acetonitrilo (1:1:8). En el caso de espectrofotometría UV-Visible, se utilizó como disolvente la misma mezcla pero las concentraciones seleccionadas fueron 1, 2, 3, 4 y 5 µg/ml.

Se caracterizaron las NP cargadas con CUM en cuanto a captación, tamaño de partícula, liberación en función del tiempo o liberación

inmediata. Los análisis de fluorescencia han requerido obtener un medio disolvente en el que todos los componentes sean solubles. Para la determinación de la cantidad de CUM no encapsulada presente en el sobrenadante y la captada por las NP, se procede de la siguiente manera: a 500 μ l de las NP o del sobrenadante se añaden, en primer lugar, 500 μ l de diclorometano y a continuación, se diluye la muestra con 4 ml de acetonitrilo y se mezclan las 2 fases con la ayuda de un agitador tipo Vórtex. Para estudiar el porcentaje de CUM liberado en condiciones *sink* se utilizó una dilución 1:10 (NP:PBS). Pasadas 24 y 48 horas se centrifugaron las muestras durante 15 minutos a 20000 g hasta obtener el sobrenadante del que se toman 500 μ l y se diluyen en 4 ml de acetonitrilo. Para evitar la separación de fases debida a las sales presentes en el PBS, la muestra preparada se centrifugó de nuevo a 20000 g durante 15 minutos. Al sobrenadante obtenido se añadieron 500 μ l de diclorometano antes de medir la fluorescencia de la muestra.

El resto de estudios realizados para la caracterización de las NP cargadas con NS no son necesarios en este caso puesto que para elaborar las NP cargadas con CUM no se realizan modificaciones en el método ni en las cantidades utilizadas de PVA, PLGA, CS o HA.

Para sembrar las células se utilizaron placas de cultivo cuya superficie había sido tratada de manera específica para ser usada en el microscopio confocal de alta resolución e inmersión. Son placas de 35 x 10 mm con un área de crecimiento de 9,4 cm² y un volumen de trabajo de 3 ml. Se sembraron 50000 células por placa a las que se les añadieron 40 μ l y 80 μ l de NP. Después de 2, 4 y 48 horas, se retiró el medio de cultivo y se añadió el marcaje fluorescente (Hoechst) que se utiliza para ver los núcleos y mitocondrias por su capacidad para unirse al ADN. Este compuesto emite fluorescencia azul/cíán con un máximo de emisión alrededor de 461 nm. Las células se mantuvieron en contacto con este colorante durante 10-15 minutos antes de observarlas al microscopio (Leyca TCS SP5) (Chazote, 2010).

✓ Citometría de flujo

Es una técnica que permite obtener información sobre poblaciones celulares a partir de un estudio individualizado de un gran número de células (habitualmente entre 5000 y 10000). La suspensión de células en solución isotónica se hace pasar a través de un pequeño orificio de modo que cuando salen lo hacen una a una formando parte de una corriente continua o flujo cilíndrico. Sobre esta corriente de células se hace incidir un haz de luz láser, cuya dispersión y reflexión son analizadas en duración e intensidad (Maros y Díaz, 2011; <http://wwwuser.cnb.csic.es>).

Estos estudios se realizaron con las mismas células después de teñirlas con el colorante Hoechst y de observarlas al microscopio confocal. Para ello, se retiró el medio y se añadió 1 ml de PBS con la intención de eliminar las NP que no hubieran sido captadas por las células y pudieran incrementar la señal obtenida en el citómetro. A continuación, se sustituyó el PBS por 1 ml de tripsina con lo que se consiguió levantar las células adheridas a la placa de cultivo. Después de 5 minutos se retiró la tripsina y se añadieron 2 ml de medio. Las células se centrifugaron a 1400 rpm durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante que se sustituyó por 350 μ l de medio de cultivo limpio. A continuación las muestras se midieron en el citómetro (Becton Dickinson FACSCalibur) y los resultados se trataron con ayuda del programa informático Cyflogic CV 1.2.1. El porcentaje de captación de NP se expresa como la media de la fluorescencia emitida por todas las partículas captadas por las células analizadas por el citómetro.

2.7. Estudios farmacocinéticos

El estudio se ha realizado en 17 ratas albinas macho (250-500 g) proporcionadas por el centro de experimentación animal. El experimento ha sido sometido a aprobación por el comité ético de experimentación animal con número de protocolo [OH-UAH 2017/005/000](#).

El plasma de rata sin fármaco para el desarrollo de la técnica analítica se obtuvo por exanguinación aórtica de animales anestesiados con halotano.

✓ **Vías de administración y formulaciones**

Los ensayos farmacocinéticos se han llevado a cabo empleando 2 vías de administración alternativas, la vía intravenosa como vía de referencia y la inyección intraprostática con la finalidad de determinar el comportamiento de la formulación en esta glándula y su potencial para retener el fármaco de forma local.

Se han elaborado varias formulaciones en función de las vías de administración seleccionadas de acuerdo con el siguiente esquema:

- vía intravenosa: se administra la NS en disolución a una concentración de 2 mg/ml empleando como vehículo una mezcla de EtOH, PEG 300 y NaCl 0,9% en proporciones (0,2:0,54:0,26).
- vía intraprostática: para la administración de las formulaciones de NS en el interior de la próstata es necesario considerar que el volumen de formulación a administrar está limitado por el volumen de la glándula. Por ello, y siguiendo recomendaciones del centro de experimentación animal, se ha procedido a obtener formulaciones más concentradas que permitieran administraciones de dosis similares a las de las vías de referencia en volúmenes inferiores a los 100 µl. Como referencia se preparó una disolución de NS en el mismo vehículo empleado para la administración intravenosa pero a una concentración de 5 mg/ml y sustituyendo el NaCl por PBS pH 7,4. En el caso de administrar la NS en NP, se seleccionó la formulación elaborada con 0,25% de PVA en base a los resultados obtenidos. Para administrar las formulaciones de NP, éstas se concentraron hasta alcanzar concentraciones de fármaco próximas a 2mg/ml (1,8-2,4 mg/ml).

En todos los casos, la dosis administrada fue de 1 mg/kg, si bien, debido a las restricciones de volumen de inyección que plantea la

administración intraprostática, en algunos casos se produjeron desviaciones de la dosis prevista que han sido corregidas normalizando las concentraciones plasmáticas medidas para 1mg/kg dada la linealidad farmacocinética en este rango de dosis.

✓ **Administración y obtención de las muestras**

Para administrar las distintas formulaciones se procedió mediante inyección con una jeringa y aguja (16/5) en la vena yugular (IV) o en la próstata a animales anestesiados con halotano. En este último caso, fue necesario realizar una intervención quirúrgica en la zona abdominal inferior para poder acceder a la glándula. Se administró el volumen de dosis en dos alícuotas, una en cada lóbulo ventral, comprobando que no se produjeran modificaciones de la morfología externa de la próstata por el volumen inyectado antes de proceder a suturar la herida.

Las muestras de sangre (200 µl) se obtuvieron a partir de la vena yugular en los experimentos por vía intravenosa y de la vena de la cola en los de administración intraprostática. Previo a la administración de cada formulación, se obtuvo una muestra pre-dosis y posteriormente muestras a 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480, 540 y 1440 minutos tras la administración. En las administraciones intraprostáticas, los tiempos de muestreo se prolongaron hasta las 48 h para comprobar si se producía una liberación más lenta y/o una eliminación también modificada.

✓ **Desarrollo analítico**

✓ Condiciones cromatográficas

El equipo HPLC empleado fue un HP 1050 Series equipado con una bomba cuaternaria y un inyector automático. La columna para cromatografía en fase reversa fue una Kromasil C18 (5µm; 150x4.6 mm) termostaticada a 40°C de Scharlab (Barcelona, Spain). La fase móvil consistió en una mezcla agua:acetonitrilo:metanol en proporciones

50:30:20 que se bombeó a 1 ml/min, monitorizando la señal en un detector UV-Vis a 230 nm. La integración de los picos se lleva a cabo empleando el programa ChemStation Rev A 10.02 [1757].

✓ Curva de calibración y patrones

Se prepararon disoluciones madre de NS 1 mg/ml en metanol. Los patrones de calibración y los controles se obtuvieron mediante dilución de la solución madre con fase móvil hasta alcanzar concentraciones de 0,025, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 5, 10 y 20 µg/ml. Éstos fueron posteriormente utilizados para preparar los patrones de concentración en plasma. Para ello, se añadieron volúmenes predeterminados de patrones de NS en fase móvil a muestras de 0,1 ml de plasma virgen de forma que el volumen añadido no superase el 10% del volumen total. Las concentraciones finales de NS en plasma fueron 0,025, 0,05, 0,1, 0,5, 1 y 2 µg/ml. Las curvas de calibración corresponden a la relación entre áreas de pico y concentración de NS. Para cada punto de la curva de calibración se analizaron 5 muestras independientes.

✓ **Procesado de las muestras de plasma**

Para el análisis cromatográfico, se tomaron muestras de plasma de rata (0,1 ml) en tubos eppendorf y se sometieron a un proceso de extracción líquido-líquido con 0,2 ml de diclorometano durante 2 minutos mediante agitación manual intensa. Posteriormente, la muestra se centrifuga a 5000 rpm durante 10 minutos. La fase orgánica inferior (0,18 ml) se transfiere a otro tubo eppendorf para su evaporación durante la noche y reconstitución en 0,15 ml de fase móvil mediante agitación. Finalmente, 0,13 ml se transfieren a viales y se inyectan 0,1 ml en el equipo HPLC.

✓ **Validación de la técnica analítica**

Se realizó un análisis de regresión lineal de los resultados obtenidos con los patrones de NS en fase móvil para determinar la pendiente, la ordenada y el coeficiente de determinación de las curvas de calibración. La linealidad se estableció estadísticamente mediante ANOVA empleando el estadístico F ($p < 0,05$) y los gráficos de residuales para identificar desviaciones sistemáticas. La eficacia del proceso de extracción del plasma (% recuperación) fue establecida comparando las concentraciones teóricas de los patrones de NS en plasma con las calculadas utilizando la curva de calibración externa en el mismo rango de calibración (0,025-2 $\mu\text{g/ml}$). La especificidad del método se comprobó tras analizar en cada rata una muestra previa a la administración de la dosis para confirmar la ausencia de interferencias. La exactitud se determinó a partir de cuatro muestras control ensayadas por quintuplicado. La reproducibilidad inter e intra-día se estimó a partir de los patrones de calibración de las 5 curvas analizadas y las muestras control analizadas en varios días o en el mismo día.

✓ **Límite de cuantificación**

El límite de cuantificación se ha definido como la concentración más baja ensayada en la calibración que proporcione una reproducibilidad y exactitud inferiores al 20%.

✓ **Análisis farmacocinético**

El análisis farmacocinético de los datos obtenidos se llevó a cabo empleando un modelo no compartimental. Las ecuaciones para calcular los diferentes parámetros farmacocinéticos son las habitualmente empleadas para dicho modelo de ajuste (Domenech y col, 2001).

IV. Resultados y discusión

1. Validación del método analítico

1.1. Análisis de la NS por espectrofotometría UV-visible.

✓ Linealidad

La figura 13 muestra la recta de calibrado obtenida a 230 nm utilizando como disolvente una mezcla acetonitrilo:agua (50:50).

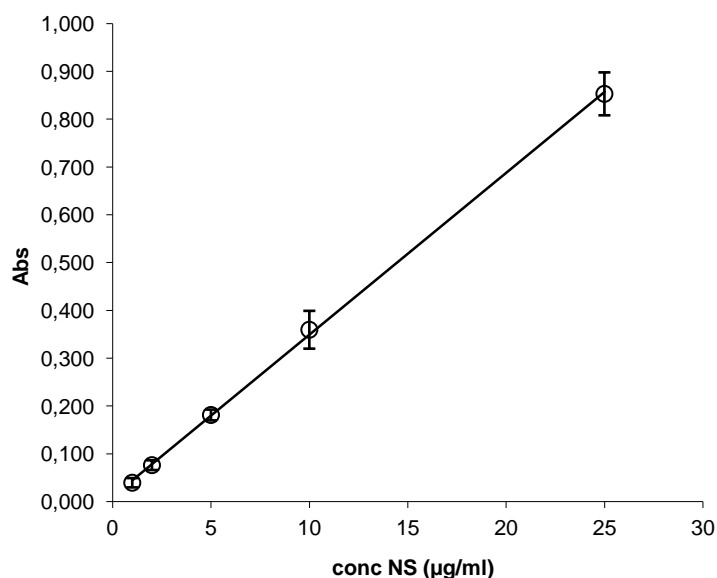


Figura 13.- Recta de calibrado para NS en acetonitrilo:agua (1:1).

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre absorbancia y concentración con un nivel de confianza del 95%.

El estadístico R-Cuadrado indica que el modelo ajustado explica 99,26% de la variabilidad en Abs. El coeficiente de correlación es igual a 0,9963, indicando una relación entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 0,027. Este valor puede usarse para construir límites de predicción para nuevas

observaciones. El error absoluto medio (MAE) de 0,018 es el valor promedio de los residuos.

Tabla 9.- Resultados del estudio de linealidad del método espectrofotométrico en agua:acetonitrilo (1:1) realizada a 230 nm.

Regresión Simple - Abs vs. Concentración

Variable dependiente: Abs

Variable independiente: Concentración

Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Coefficientes

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	0,0118287	0,00627364	1,88547	0,0668
Pendiente	0,0339144	0,000468213	72,4338	0,0000

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	4,04507	1	4,04507	5246,66	0,0000
Residuo	0,0300682	39	0,00077098		
Total (Corr.)	4,07514	40			

Coefficiente de Correlación = 0,996304

R-cuadrada = 99,2622 porciento

R-cuadrado (ajustado para g.1) = 99,2432 porciento

Error estándar del est. = 0,0277665

Error absoluto medio = 0,0187149

La figura 14 muestra la recta de calibrado obtenida a 402 nm utilizando como disolvente una mezcla acetonitrilo:tampón PBS pH 7,4 (50:50).

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre absorbancia y concentración con un nivel de confianza del 95%.

El estadístico R-Cuadrado indica que el modelo ajustado explica el 99,84% de la variabilidad en Abs. El coeficiente de correlación es igual a 0,9992, indicando una relación entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 0,013. El error absoluto medio (MAE) de 0,010 es el valor promedio de los residuos.

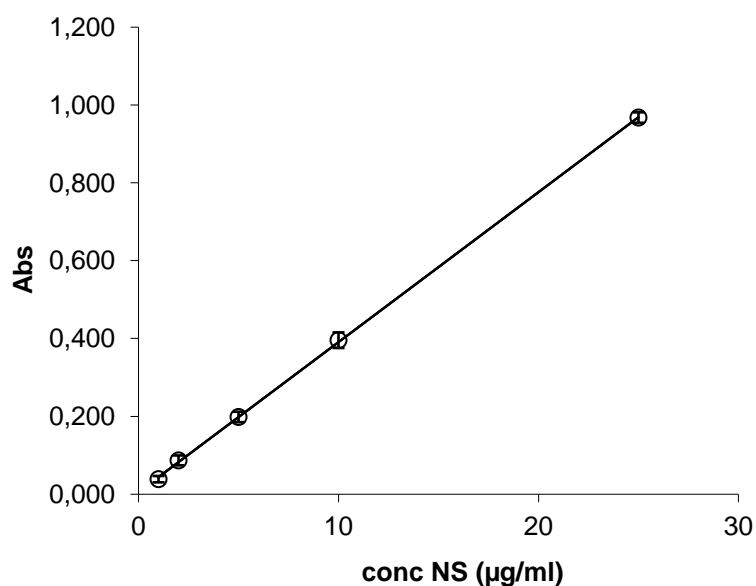


Figura 14.- Recta de calibrado NS en tampón PBS pH 7,4:acetonitrilo (1:1).

Tabla 10.- Resultados del estudio de linealidad de la espectrofotometría realizada a 402 nm.

Regresión Simple - Abs vs. Concentración

Variable dependiente: Abs

Variable independiente: Concentración

Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Coefficientes

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	0,00542914	0,0037786	1,43681	0,1655
Pendiente	0,0385452	0,00328129	117,469	0,0000

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	2,43853	1	2,43853	13799,07	0,0000
Residuo	0,00371106	21	0,000176717		
Total (Corr.)	2,44225	22			

Coefficiente de Correlación = 0,99924

R-cuadrada = 99,848 porciento

R-cuadrado (ajustado para g.1) = 99,8408 porciento

Error estándar del est. = 0,0132935

Error absoluto medio = 0,0104507

✓ **Especificidad**

Las tablas 11 y 12 muestran los valores de absorbancia medidos a 230 nm obtenidos con las distintas formulaciones de NPB elaboradas utilizando un 0,25 y 1% de PVA en las condiciones descritas para valorar la captación de NS en las NP.

Tabla 11.- Absorbancia NPB 1% PVA a 230 nm.

Formulación	NPB	NPBCS	NPBCSImw	NPBCSHA
media	0,17	0,10	0,11	0,11
d.e.	0,06	0,07	0,07	0,03

Tabla 12.- Absorbancia NPB 0,25% PVA a 230 nm.

Formulación	NPB	NPBCS	NPBCSImw	NPBCSHA
media	0,17	0,05	0,07	0,13
d.e.	0,04	0,01	0,06	0,03

Los resultados obtenidos indican que algún componente de la formulación interfiere con la señal proporcionada por el fármaco por lo que estos valores han sido incorporados en las determinaciones analíticas de NS realizadas para cada tipo de NP.

Esto prueba que existen interferencias entre la señal proporcionada por el fármaco y la correspondiente al resto de componentes de la formulación. Para cada estudio realizado que fuera susceptible de modificar sus resultados por dicha interferencia (estudio de captación de NS por las NP y estudio de dilución), ésta fue calculada de forma experimental (resultados no mostrados en tablas) y tomada en cuenta a la hora de presentar los resultados finales.

✓ **Exactitud**

Los resultados referentes al estudio de exactitud se muestran en las tablas 13 y 14:

Tabla 13.- Porcentaje de recuperación de NS para la recta de calibrado con acetonitrilo:agua (50:50) a 230 nm.

Conc. Teórica	% recuperación	d.e.	C.V.
$\mu\text{g/ml}$	media		
1	99,61	9,45	9,49
5	98,75	5,00	5,07
25	99,56	0,76	0,76

Tabla 14.- Porcentaje de recuperación de NS para la recta de calibrado con acetonitrilo:PBS (50:50) a 402 nm.

Conc. Teórica	% recuperación	d.e.	C.V.
$\mu\text{g/ml}$	media		
1	98,27	15,00	15,26
5	98,61	4,71	4,78
25	99,27	0,63	0,64

Como puede apreciarse, en ambos casos, la recuperación media obtenida resultó ser superior al 98%, y por ello podemos considerar que este método analítico es un método exacto.

✓ **Precisión intermedia**

Para calcular la precisión intermedia se analizaron 3 rectas de calibrado en cada equipo utilizado (Shimadzu UV-PC2101: equipo 1 y Thermo Spectronic Helios Gamma 110-240 V: equipo 2) y se comprobó que los coeficientes de variación obtenidos fuesen en todos los casos menores al 5%, de esta forma, podemos afirmar que la curva de calibración obtenida en nuestros ensayos es adecuada y válida para realizar nuestro trabajo.

Tabla 15.- Resultados del análisis de precisión intermedia obtenidos con el método analítico a 230 nm utilizando como disolventes una mezcla de acetonitrilo:agua (50:50).

Conc (µg/ml)	Equipo 1	Equipo 2	Media	d.e.	c.v.
1	0,04	0,04	0,04	0,002	4,76
	0,04	0,04			
	0,04	0,04			
2	0,08	0,08	0,08	0,004	4,77
	0,08	0,07			
	0,08	0,08			
5	0,19	0,18	0,18	0,006	3,50
	0,18	0,18			
	0,17	0,17			
10	0,38	0,37	0,36	0,018	4,96
	0,35	0,36			
	0,34	0,34			
25	0,84	0,92	0,86	0,035	4,09
	0,88	0,86			
	0,87	0,81			

Tabla 16.- Resultados del análisis de precisión intermedia obtenidos con el método analítico a 402 nm utilizando como disolventes una mezcla de acetonitrilo:PBS (50:50).

Conc (µg/ml)	Equipo 1	Equipo 2	Media	d.e.	c.v.
1	0,04	0,04	0,04	0,001	4,94
	0,04	0,04			
	0,04	0,04			
2	0,09	0,08	0,08	0,004	4,95
	0,08	0,08			
	0,08	0,08			
5	0,19	0,19	0,19	0,007	3,69
	0,20	0,19			
	0,20	0,19			
10	0,41	0,38	0,39	0,017	4,37
	0,38	0,38			
	0,42	0,39			
25	0,97	0,96	0,96	0,024	2,53
	0,96	0,97			
	0,99	0,91			

✓ Determinación de los límites de detección y cuantificación

Se realizaron 3 medidas del blanco para cada recta de calibrado utilizada. Los resultados obtenidos fijaron el límite de detección para las rectas de calibrado con acetonitrilo:agua a 230 nm y acetonitrilo:tampón PBS a 402 nm en 0,270 $\mu\text{g/ml}$ y en 0,017 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Los límites de cuantificación correspondientes se establecieron en 0,746 y 0,295 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

1.2. Análisis de la NS por HPLC

La figura 15 muestra la recta de calibrado obtenida a 230 nm en el equipo Agilent 1090 utilizando como fase móvil una mezcla compuesta por agua:acetonitrilo:metanol (50:30:20):

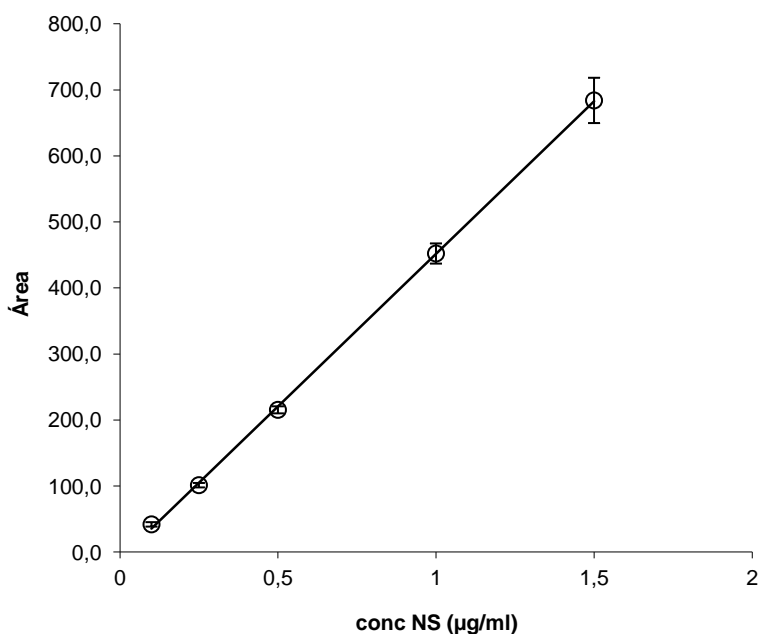


Figura 15.- Recta de calibrado NS en HPLC a 230 nm.

Tabla 17.- Resultados del estudio de linealidad del método HPLC.

Regresión Simple - Área vs. Concentración

Variable dependiente: Área

Variable independiente: Concentración

Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Coefficientes

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	-10,8347	6,61807	-1,63714	0,1275
Pendiente	462,207	7,94361	58,186	0,0000

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	826197,	1	826197,	3385,62	0,0000
Residuo	2928,38	12	244,032		
Total (Corr.)	829126,	13			

Coefficiente de Correlación = 0,998232

R-cuadrada = 99,6468 porciento

R-cuadrado (ajustado para g.1) = 99,6174 porciento

Error estándar del est. = 15,6215

Error absoluto medio = 10,0894

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre área de pico y concentración con un nivel de confianza del 95%.

El estadístico R-Cuadrado indica que el modelo ajustado explica el 99,64% de la variabilidad del área de pico. El coeficiente de correlación es igual a 0,9982, indicando una relación entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 15,62. El error absoluto medio (MAE) de 10,09 es el valor promedio de los residuos.

2. Caracterización de las NP

La síntesis de las NP se llevó a cabo por el método de emulsión y evaporación del disolvente tal y como se ha descrito previamente (sección 2.2. del apartado III).

2.1. Ensayos preliminares

Las condiciones experimentales empleadas en el desarrollo de las formulaciones investigadas en esta memoria han sido seleccionadas tras la realización de una serie de ensayos preliminares. A continuación se describen de forma breve los resultados más destacables obtenidos en cada experimento.

Con respecto a la concentración de PVA, además de las concentraciones 0,25 y 1%, descritas en esta memoria, se evaluó el efecto de otras 2 concentraciones, 0,1 y 0,5% sobre las características de las NP obtenidas con y sin cubierta de CS. La primera tuvo que ser descartada por no ser suficiente para formar la emulsión inicial y la segunda proporcionó NP con tamaños intermedios entre los obtenidos con 0,25 y 1%. Con respecto a la encapsulación del fármaco, se observaron valores de captación superiores a los obtenidos con 1% de PVA, pero muy similares a los que presentan las NP elaboradas con la menor concentración de PVA capaz de formar la emulsión inicial. Sin embargo, los rendimientos obtenidos eran similares a los alcanzados con 0,25% de PVA. La capacidad de las formulaciones elaboradas con 0,5% de PVA para retener la NS en los estudios de liberación inmediata fue similar a la obtenida con las elaboradas a otras concentraciones de PVA siendo el efecto del recubrimiento con CS también de la misma magnitud.

El hecho de disminuir la cantidad de fármaco empleado para elaborar las formulaciones no modificó el tamaño de las NP obtenidas con 1% de PVA. Sin embargo, la captación inicial se redujo aproximadamente en un 7% con respecto a la misma formulación que contenía 10 mg de NS. El rendimiento, la captación definitiva y la recuperación no mostraron cambios significativos.

Por el contrario, las revoluciones empleadas en las distintas etapas de centrifugación para sedimentar las NP resultaron tener una gran importancia para evitar agregados y obtener formulaciones con un tamaño de partícula monodispersa tras su redispersión. Por ello, las revoluciones empleadas para obtener las NP elaboradas con una

concentración de PVA del 0,25% son diferentes a las del 1% y también difieren las aplicadas a NPCSlmw con respecto a las NPCS.

Otro factor evaluado fue la presencia de NaCl en la fase externa de la emulsión inicial. Los resultados de Dinarvand (Dinarvand y col, 2005) con naltrexona, sugerían que la adición de NaCl a la fase acuosa de la emulsión podría incrementar la captación inicial de la NS por un efecto de salting-out. El NaCl no produjo ni variaciones significativas en el tamaño ni en la captación de la NS en NP ni en NPCS elaboradas con 1 y 0,25% de PVA. Sin embargo, sí que aumento el rendimiento por un mecanismo no conocido. La presencia de NaCl en la fase acuosa de la emulsión inicial dio lugar también a un perfil de liberación del fármaco muy similar al de aquellas a las que no les añadió ningún electrólito. Se comprueba así que el hecho de añadir NaCl no incrementa la captación de NS por las NP ni modifica su capacidad de retención. Por todo esto, y al igual que ocurriera al estudiar las variaciones en el tamaño de partícula y en los porcentajes de captación, se puede decir que las diferencias encontradas al caracterizar las NP no son suficientes para justificar la adición de NaCl a las formulaciones desarrolladas puesto que su uso no supone ninguna ventaja añadida.

La sustitución del PLGA por otro polímero biodegradable pero semicristalino como la PCL, dio lugar a distribuciones de tamaño de partícula con varias poblaciones y valores de diámetro mv que superaban considerablemente los adecuados para las aplicaciones terapéuticas investigadas e esta memoria. En este caso se obtuvo un porcentaje de captación inicial ligeramente menor al que presentaban las NP de PLGA con 1% de PVA. Dicho porcentaje se redujo en más de un 16% cuando comparamos las formulaciones de PCL recubiertas con CS con sus equivalentes de PLGA. Al calcular el rendimiento del proceso de elaboración de las partículas de PCL observamos que siguió el mismo patrón: el porcentaje obtenido con las NPCS de PLGA supera en más de un 20% al obtenido con las NP de PCL, mientras que con las NP sin recubrimiento no se modificaron los resultados obtenidos. Por otro lado, los porcentajes de recuperación del fármaco no son diferentes ya que en todos los casos fueron elevados.

2.2. Tamaño de partícula

La figura 16 ilustra las distribuciones de tamaños de partícula obtenidas con las distintas formulaciones de NP con NS elaboradas utilizando 1% de PVA. Como se puede comprobar éstas presentan una única población de partículas que podrían considerarse monodispersas ya que los valores de span obtenidos son próximos a 1 (tablas 18 y 19). Éstas recogen también los tamaños medios, percentiles 10, 50, 90 y la desviación estándar asociadas a las formulaciones de NP, blancas y con NS.

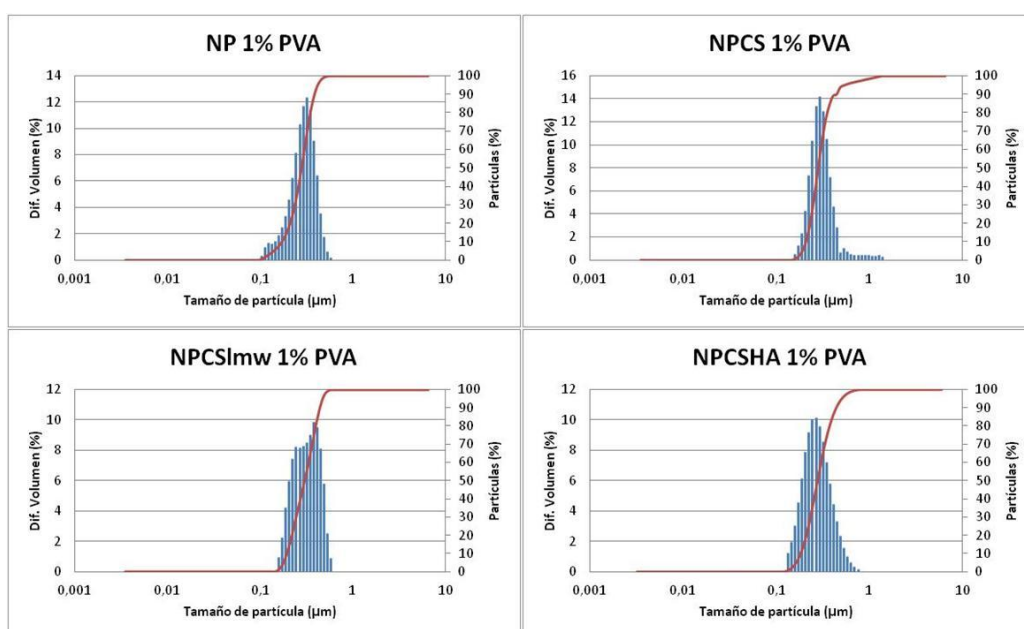


Figura 16.- Distribución de tamaños de las NP elaboradas con PVA al 1%.

Tabla 18.- Tamaños de NP elaboradas con 1% PVA (nm) (datos medios y d.e.)

	mv	de	10%	50%	90%	Span
NP	292	73,7	199,6	278,6	400,6	0,73
	15,9	21,1	16,9	19,2	54,9	0,28
NPCS	322,9	88,7	192,2	300,3	438,1	0,78
	45,4	28,5	10	36,7	83,3	0,17
NPCSI mw	302,1	82,5	196,2	294,8	413,6	0,73
	38,4	19,8	18,4	25,7	75,1	0,14
NPCSHA	291,5	90,7	186	270	426,1	0,89
	11,8	21,7	5,8	14,6	39,3	0,13

Tabla 19.- Tamaños de NPB elaboradas con 1% PVA (nm) (datos medios y d.e.)

	mv	de	10%	50%	90%	Span
NPB	291,4	123,7	123,8	249,3	445,1	1,33
	22,1	7,8	27,8	53,1	30,6	0,26
NPBCS	328,8	136,2	188,3	321,6	566	1,21
	16,5	27,6	3,3	65,4	92,8	0,41
NPBCSImw	308,9	83,7	198,7	294,3	411,1	0,72
	22,9	15,9	16,1	10,9	28,2	0,09
NPBCSHA	288,7	83,8	188,9	276,8	404,4	0,78
	8,3	21,1	16,2	1,7	39,2	0,19

Los resultados indican que la incorporación de NS en las NP no modifica el tamaño de partícula en ninguna de las formulaciones. Las formulaciones recubiertas con CS muestran una tendencia a que el tamaño de partícula se incremente como consecuencia del recubrimiento de forma que, la cubierta de CS de alto peso molecular podría representar entre 30 y 37 nm y la de bajo peso molecular en torno a 10 y 17 nm. Otros autores (Guo y col, 2008) han constatado también incrementos en el tamaño de partícula como resultado de adsorción superficial de CS en las NP. No obstante, estos resultados deben ser interpretados con cautela ya que la adición de otro recubrimiento de HA da lugar a partículas con un tamaño similar al de partida (NP sin recubrir). Este hecho podría tener alguna explicación relacionada con las interacciones electrostáticas que tienen lugar en la superficie de las NP entre los polímeros contraiónicos pero como se observa en la tabla 20 no existen diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones realizadas, tanto con medias en volumen (mv) como con anchos de la distribución (de).

Tabla 20.- Prueba de múltiples rangos ($p < 0,05$) realizada con los datos de mv (A) y de (B) correspondientes a NP 1% PVA siendo el grupo 1: NP, 2: NPCS, 3: NPCSlmw y 4: NPCSHA.

A

Contraste	Diferencia	+/-Límites
1-2	-0,03	0,04
1-3	-0,01	0,05
1-4	0,00	0,05
2-3	0,02	0,05
2-4	0,03	0,05
3-4	0,01	0,06

B

Contraste	Diferencia	+/-Límites
1-2	-0,02	0,03
1-3	-0,01	0,04
1-4	-0,02	0,04
2-3	0,01	0,03
2-4	0,00	0,03
3-4	-0,01	0,04

Por otra parte, se comprueba que las formulaciones elaboradas utilizando la menor concentración de PVA (0,25%) siguen mostrando distribuciones unimodales monodispersas (figura 17), si bien, muestran un tamaño de partícula superior (tablas 21 y 22). El aumento promedio del tamaño de partícula es próximo a los 120-140 nm para NP o NPCS, aumentando hasta los 260 nm cuando se añade HA a la cubierta (NPCSHA). El recubrimiento de las NP con CS de alto peso molecular incrementa el diámetro entre 13 y 20 nm y el de bajo peso molecular entre 4 y 12 nm.

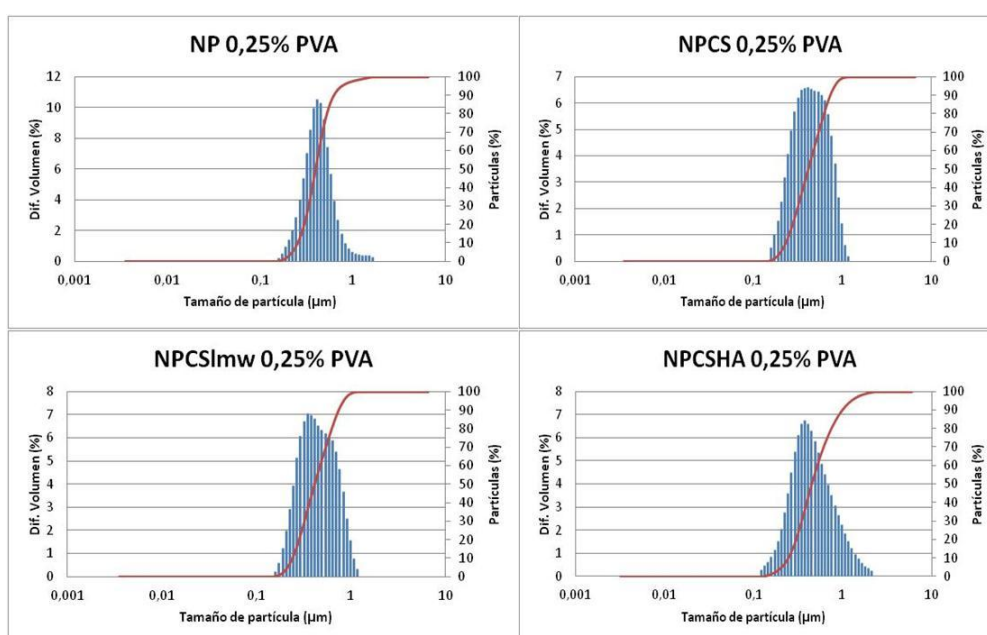


Figura 17.- Distribución de tamaños de las NP elaboradas con PVA al 0,25%.

Tabla 21.- Tamaños de NP elaboradas con 0,25% PVA (nm) (datos medios y d.e.)

	mv	de	10%	50%	90%	Span
NP	433	153,1	237,7	382,3	640,1	1,05
	35,4	29	20,7	47,3	63,5	0,2
NPCS	454,8	199,6	246	388,4	791,2	1,41
	42	42,9	14,9	30,5	160,1	0,41
NPCSI_{mw}	445	203,4	221,9	386	762,7	1,31
	83,3	55,9	35	71,1	161,8	0,12
NPCSHA	559,9	285,3	256,3	447,4	1050,5	1,78
	19,1	12,4	10,7	18,4	66	0,1

Tabla 22.- Tamaños de NPB elaboradas con 0,25% PVA (nm) (datos medios y d.e.)

	mv	de	10%	50%	90%	Span
NPB	417	147,1	239	360,8	720,4	1,34
	22,6	39,8	6	8	144,3	41,2
NPBCS	430	147,1	242,2	373,1	664,4	1,13
	6,7	20,5	7,7	9,6	45,7	0,09
NPBCSI_{mw}	421,5	169,7	231,9	411,1	660,5	1,04
	17,2	36,8	14,1	19,6	77,8	0,18
NPBCSHA	552,3	273,7	269,2	433	1025	1,74
	48,3	44	10,9	17,8	141,6	0,25

Tabla 23.- Prueba de múltiples rangos ($p < 0,05$) realizada con los datos de mv (A) y de (B) correspondientes a NP 0,25% PVA siendo el grupo 1: NP, 2: NPCS, 3: NPCSI_{mw} y 4: NPCSHA.

Las celdas marcadas con (*) presentan diferencias estadísticamente significativas.

A

Contraste	Diferencia	+/-Límites
1-2	-0,02	0,07
1-3	-0,01	0,08
1-4*	-0,13	0,08
2-3	0,01	0,07
2-4*	-0,11	0,07
3-4*	-0,11	0,08

B

Contraste	Diferencia	+/-Límites
1-2	-0,05	0,06
1-3	-0,05	0,07
1-4*	-0,13	0,07
2-3	0,00	0,07
2-4*	-0,09	0,07
3-4*	-0,08	0,08

El análisis estadístico para comparar las mv y de de las NP elaboradas con menor concentración de PVA (tabla 23) muestra que únicamente existen diferencias estadísticamente significativas entre las NPCSHA y el resto de formulaciones. En consecuencia se puede decir que

el recubrimiento con HA en la formulación de NP elaboradas con una concentración de PVA inicial del 0,25% es el único caso en el que se produce un aumento significativo en el tamaño de partícula. Además, al realizar el mismo test estadístico con las formulaciones de las tablas 18 y 21 se observa que es el único grupo de NP diferente al resto de formulaciones. Este análisis estadístico, que se presenta en la tabla 24, sirve para confirmar la hipótesis de que el hecho de disminuir la cantidad de tensioactivo empleada inicialmente para preparar las NP tiene como consecuencia un aumento estadísticamente significativo en el tamaño de las mismas.

Tabla 24.- Prueba de múltiples rangos ($p < 0,05$) realizada con la mv correspondiente a las formulaciones elaboradas con 1 y 0,25 % de PVA.

Formulación	Media	Grupos Homogéneos
NPCSHA1%	0,291	X
NPCSI _{mw} 1%	0,302	X
NP1%	0,292	X
NPCS1%	0,322	X
NPCSI _{mw} 0,25%	0,445	X
NPCS0,25%	0,454	X
NP0,25%	0,433	X
NPCSHA0,25%	0,559	X

El recubrimiento con HA se ha llevado a cabo sólo con las NP recubiertas con CS de alto peso molecular. Aunque se comprobó que no existía una gran diferencia entre los tamaños obtenidos con las NPCS y las NPCSI_{mw}, los resultados obtenidos por Almalik (Almalik y col, 2013) demuestran que la porosidad de las NP variaba en función del peso molecular del CS y que como consecuencia también se modificaba la adsorción del HA en la superficie de las NP. Así, las NP elaboradas con CS de alto peso molecular presentan una estructura menos compacta que cuando se emplea un polímero más fragmentado, lo que facilitaría una interacción y penetración del HA. Como ya se ha dicho, es importante destacar la reducción de entre 32 y 40 nm obtenida en el tamaño de las NPCSHA con respecto a NPCS cuando se utiliza 1% PVA. Estos autores describen que el HA puede llegar a interactuar de manera tan intensa

con el CS como para que las NP recubiertas presenten un tamaño menor que las de origen.

Por otra parte, el PVA residual presente en la superficie de las NP también podría condicionar la capacidad de penetración e interacción del HA en la cubierta de quitosano.

2.3. Determinación de la carga superficial (Potencial Zeta)

El potencial zeta de las NP está relacionado con la carga eléctrica superficial de las mismas y su valor influye en muchas de las propiedades fisicoquímicas características de estas formulaciones como pueden ser su estabilidad o las interacciones con electrolitos.

En la tabla 25 se recogen los valores de potencial zeta para las NP estudiadas. Aquellas sin recubrimiento muestran una carga superficial negativa, tal y como se ha descrito en la bibliografía para el PLGA. Sin embargo, la incorporación de la cubierta de CS invierte el signo del potencial zeta hasta valores de 55 y 33 mV en el caso de las NPCS y NPBCS, respectivamente, formuladas con un 1% de PVA. Cuando se redujo la concentración de PVA al 0,25% los valores fueron de 44 y 49, respectivamente, por ser CS un polímero catiónico. Cuando el recubrimiento se realiza con CS_{lmw} el potencial zeta alcanza valores de 26 y 37 mV para las NP con 1% de PVA y 26 y 39 mV en el caso de las NP con 0,25% de PVA, respectivamente. Del mismo modo, la adición del HA sobre las NP recubiertas con CS, independientemente de la presencia de NS, invierte nuevamente la carga superficial de éstas llegando incluso a valores inferiores a los de las NP de partida.

Los cambios en los valores de potencial zeta demuestran la adsorción superficial de los polímeros empleados en el recubrimiento de las NP. Sahoo (Sahoo y col, 2002) comprobó que la capa de PVA que recubre las NP de PLGA puede modificar la adhesión mediante interacción electrostática de otras moléculas a su superficie, afectando a la inversión del signo del potencial zeta de las NP tras su recubrimiento. Ello confirma el hecho de que el PVA residual supondría un impedimento a la hora de

recubrir las NP mediante interacciones electrostáticas generando una mayor variabilidad en las cubiertas conseguidas.

Tabla 25.- Potencial zeta de NP (datos medios y d.e.)

PVA	Potencial Z (mV)	
	1% PVA	0,25% PVA
NP	-10,73	-30,1
	0,38	0,55
NPCS	54,8	44,7
	0,96	0,67
NPCSImw	26	26,8
	0,61	0,96
NPCSHA	-49,97	-32,13
	0,4	0,4
NPB	-14,6	-19,8
	0,17	1,28
NPBCS	33,3	49,33
	1,27	4,26
NPBCSImw	36,97	39,8
	0,62	1,14
NPBCSHA	-28,2	-38,43
	0,5	0,96

2.3. Morfología (SEM y TEM)

✓ Microscopio electrónico de barrido (SEM)

La figura 18 muestra el aspecto de la NS al SEM. Se observa una estructura cristalina acicular con un ancho de 15-20 μm y longitudes variables no inferiores a los 50 μm . Por ello, su encapsulación en NP sugiere la selección de un método de elaboración que implique la disolución del principio activo en una fase orgánica como el diclorometano.

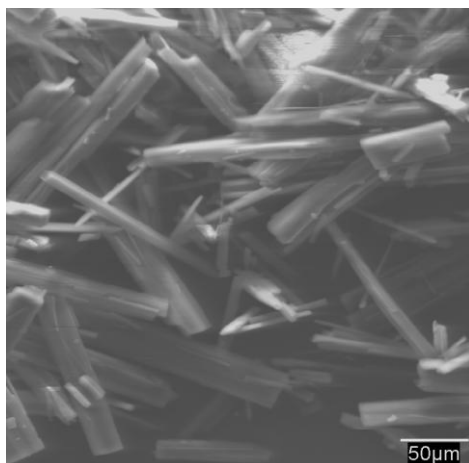


Figura 18.- Microfotografía SEM de NS

En la figura 19 se muestran los cristales de NS obtenidos tras el proceso de preparación de las NP en ausencia del polímero. Como se ha comentado se obtienen suspensiones del fármaco en las que se observa el efecto de la aplicación de ultrasonidos y la recrystalización en el medio acuoso. En este caso la longitud de los cristales no supera los 20 μm . Los cristales de NS obtenidos en presencia de CS y HA fueron similares a los que se muestran en la figura 19.

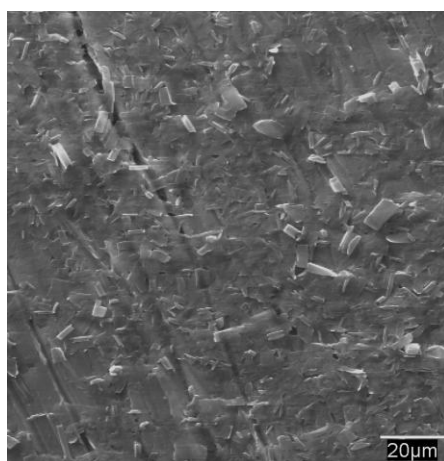


Figura 19.- Microfotografía SEM de las suspensiones de NS obtenidas aplicando el protocolo de obtención de las NP.

En relación con la morfología de las NP, todas demostraron tener forma esférica y compacta, sin poros visibles en su superficie.

La figura 20A muestra una fotografía de NP con NS elaboradas con una solución de PVA al 1%. En ella se puede constatar que el tamaño de partícula coincide con los datos obtenidos mediante la técnica de dispersión de luz láser. No se observan partículas con diámetro superior a 0,5 μm , ni tampoco cristales de fármaco sin encapsular que pudieran falsear los cálculos de grado de encapsulación de la NS.

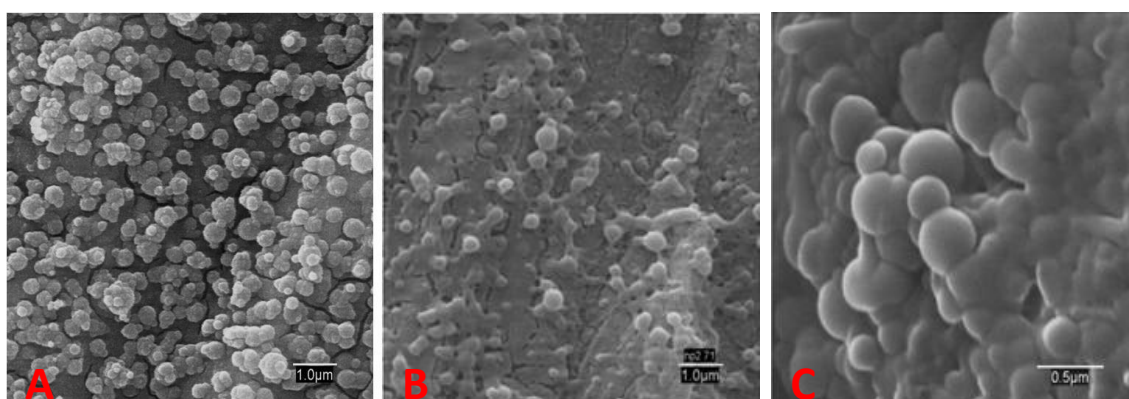


Figura 20.- Microfotografía SEM de NP (A), NPCS (B) y NPCSHA (C) 1% PVA con NS.

Las figuras 20 (B y C) y 21 (A, B y C) también muestran imágenes de NPCS, NPCSHA, NPB, NPBCS y NPBCSHA, todas ellas elaboradas con una solución de PVA al 1%. Es importante destacar la similitud en cuanto al aspecto general y a la distribución de tamaños entre ellas y las que aparecen en la figura 20A. Por tanto, se puede decir que el método utilizado en la elaboración de las NP conduce a la obtención de partículas esféricas y de superficie aparentemente lisa. Sin embargo, es destacable que las NP y NPB muestran mayor número de partículas individualizadas (figuras 20A y 21A) frente a la tendencia de las NP con cubierta, que tienen a unirse entre sí durante el proceso de desecación de la muestra, lo que dificulta su observación individualizada. Este efecto puede estar favorecido por el residuo de PVA que queda asociado a la superficie de las NP y de los polisacáridos de recubrimiento empleados que forman una

película que engloba a las NP en su interior. Como puede verse en las figuras 20C y 21C, la unión entre las partículas se ve incrementada al recubrirlas con HA (Almalik y col, 2013).

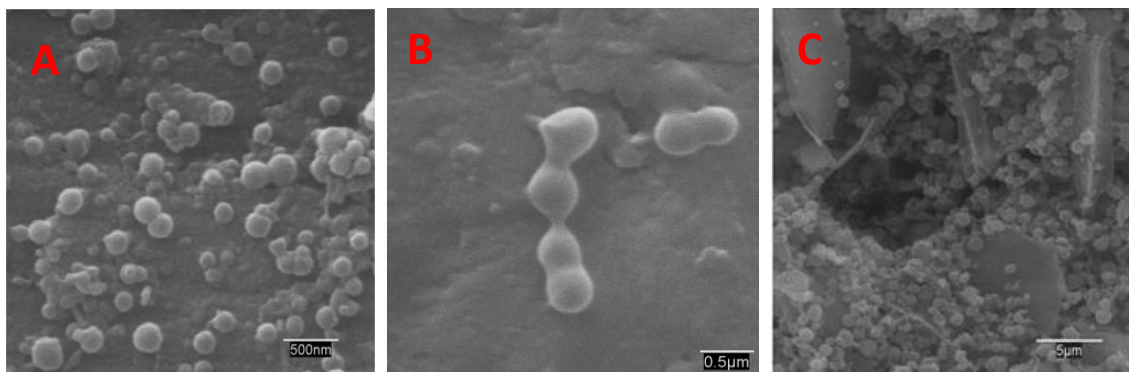


Figura 21.- Microfotografía SEM de NPB (A), NPBCS (B) y NPBCSHA (C) 1% PVA.

En las figuras 22 (A, B y C) que muestran las NP elaboradas con una menor concentración de tensioactivo, se puede observar cómo las partículas no parecen estar englobadas dentro de la película que forma el PVA residual junto con los polisacáridos de recubrimiento y cómo la presencia de dicha película se ha reducido considerablemente y en algunos casos, incluso se ha llegado a eliminar.

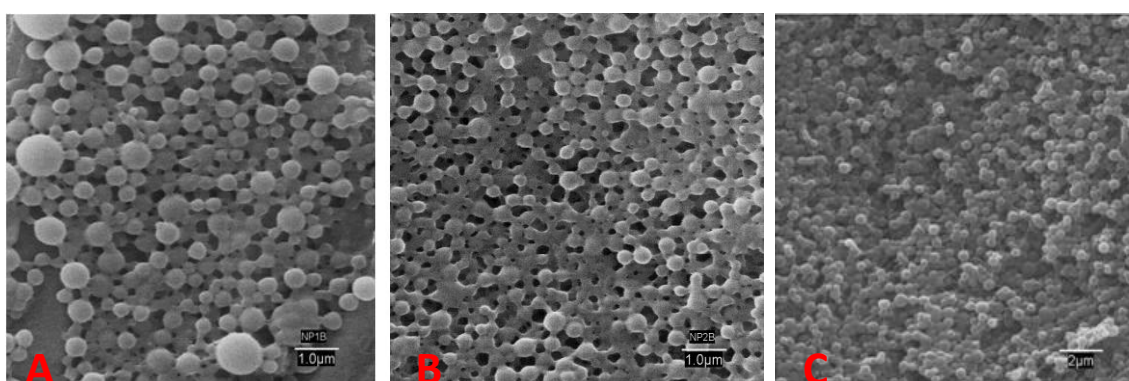


Figura 22.- Microfotografía SEM de NPB (A), NPBCS (B) y NPBCSHA (C) 0,25% PVA.

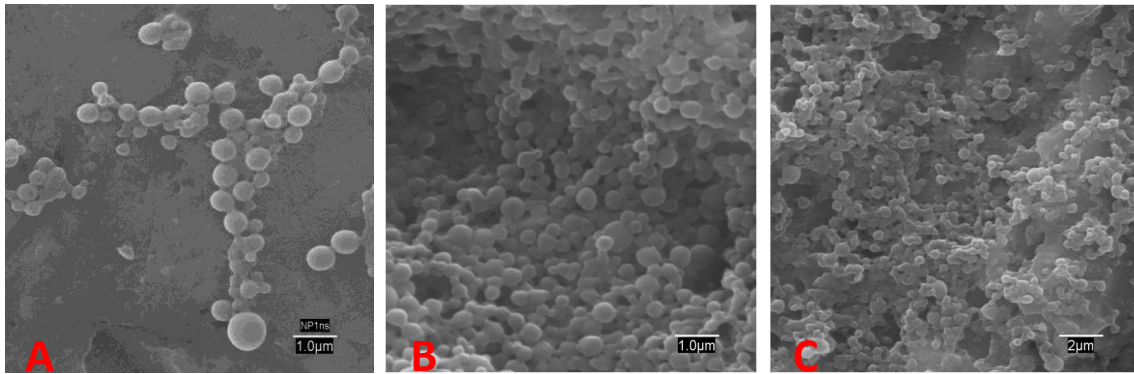


Figura 23.- Microfotografía SEM de NP (A), NPCS (B) y NPCSHA (C) 0,25% PVA con NS.

✓ Microscopio electrónico de transmisión (TEM)

En la figura 24 se muestra una microfotografía TEM de las NP elaboradas con menor concentración de PVA. Como se puede observar las NP siguen mostrando tendencia a la agregación por la técnica de preparación de la muestra y los fenómenos de superficie que afectan a suspensiones con una elevada concentración de la fase interna y un pequeño tamaño. Las NP tienden a superponerse en distintos planos si bien se observan esferas con tamaños similares a los determinados por difracción láser (400-500 nm).

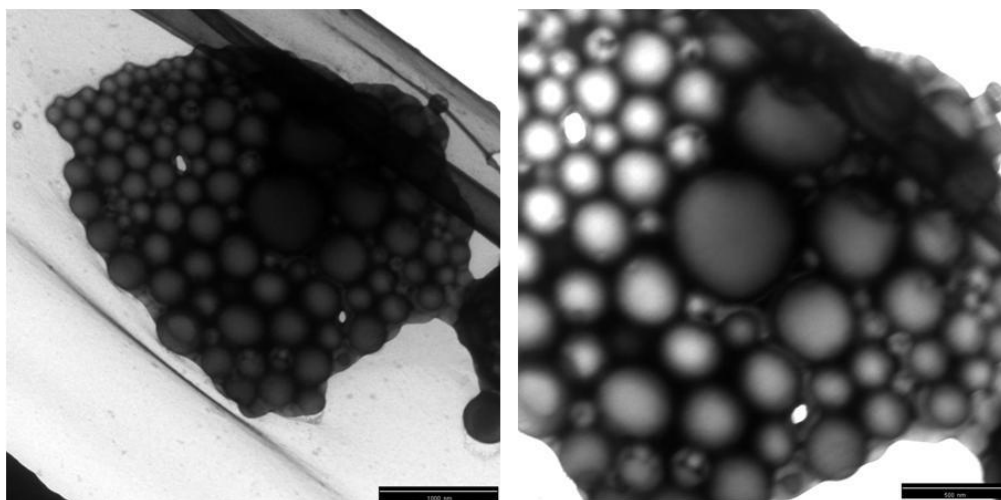


Figura 24.- Microfotografía TEM de NP 0,25% PVA. (Izquierda, barra: 1000 nm; Dcha, barra: 500 nm).

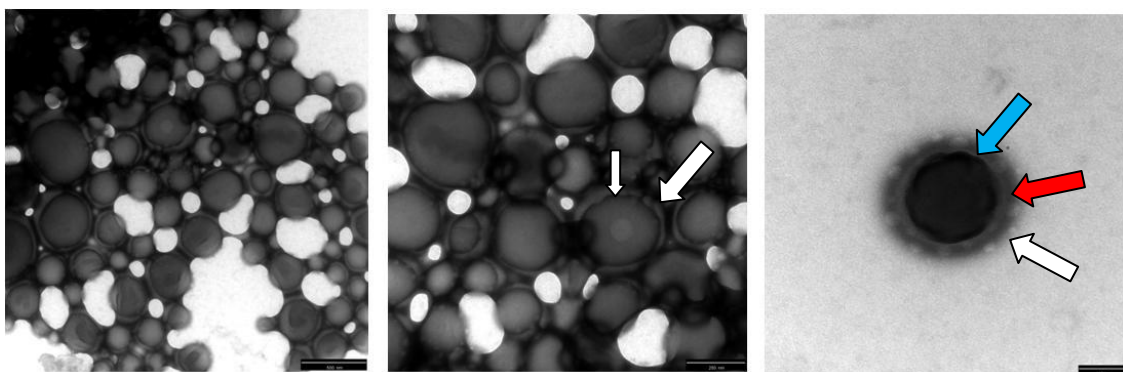


Figura 25.- Microfotografía TEM de NPCSHA 0,25% PVA. (Izqda, barra: 500 nm, Centro, barra: 250 nm y Dcha, barra: 100 nm).

Es importante destacar la diferencia que puede verse entre las NP de la figura 24 y las de la figura 25. Estas últimas están rodeadas por una cubierta correspondiente a los dos polisacáridos empleados en su recubrimiento (CS y HA) que pueden apreciarse de forma más clara en las partículas que no se encuentran agregadas con otras. En este caso, pueden verse 2 halos teñidos rodeando la partícula siendo el exterior más oscuro (flecha blanca) que el que se encuentra (flecha roja) más próximo al núcleo (flecha azul). Las imágenes obtenidas por Hu (Hu y col, 2015) al exponer sus partículas de PLGA y HA a un entorno más reductor fueron similares a las que se muestran en la figura 25. Al romper los enlaces disulfuro de la molécula de cistamina que une el PLGA con el HA se produce un aumento en el tamaño de partícula y, como puede observarse en las imágenes tomadas con el TEM, esto genera la aparición de una cubierta claramente diferenciada del núcleo. De esta forma se obtiene una morfología similar a la que presentan las NP cubiertas con HA que se han elaborado y caracterizado en este trabajo.

La observación de las NP con mayor concentración de PVA (microfotografías no mostradas) muestra tamaños aproximados de 300 nm, lo que confirma el hecho de que al añadir mayor cantidad de tensioactivo para preparar la emulsión inicial con la que se obtendrán las NP se consiguen esferas de menor tamaño que aquellas preparadas con una concentración inferior de PVA.

Las fotos obtenidas al TEM corroboran los resultados obtenidos al medir el potencial zeta de las partículas y, en el caso de las NPCSHA, confirman la formación de una cubierta homogénea alrededor de las mismas.

2.4. Cálculo del PVA residual

Existe un porcentaje mínimo de PVA que penetra en la matriz polimérica de las NP durante el proceso de evaporación del disolvente orgánico utilizado para formar la emulsión inicial y que permanece unido al PLGA por muchas etapas de lavado que se realicen.

Para poder valorar la cantidad de PVA residual presente en la formulación final de NP mediante espectrofotometría UV visible, es necesario elaborar una recta de calibrado a partir de varios patrones de concentración de PVA conocida desde 250 $\mu\text{g/ml}$ hasta 2000 $\mu\text{g/ml}$. El tratamiento de estos patrones es el mismo que reciben las muestras que se analizarán posteriormente. La figura 26 representa la recta de calibrado obtenida:

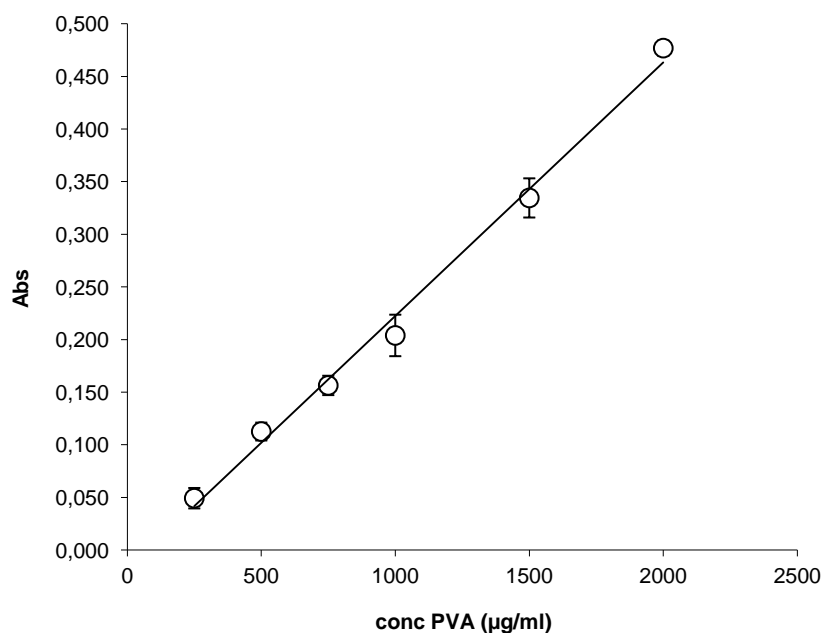


Figura 26.- Recta de calibrado de PVA a 680 nm.

Se ha comprobado que la señal medida en el espectrofotómetro a 680 nm para el CS o el HA era mínima y poco significativa.

Después de analizar las muestras se comprobó que, para las NP elaboradas con mayor concentración de PVA inicial, el PVA residual que permanece asociado a ellas era $9,50 \pm 2,48\%$ del inicial, mientras que, en el caso de las NP elaboradas con una concentración inicial de PVA del 0,25% dicho porcentaje era del $21,83 \pm 2,01\%$. A pesar de que con la formulación elaborada con un 1% de PVA inicial se consigue eliminar un 90% del total añadido, aproximadamente, y que ese porcentaje no llega al 80% para las NP elaboradas con una concentración inicial de PVA del 0,25%, la concentración de PVA residual para estas últimas formulaciones no llegó a los 550 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y, por tanto, es un valor mucho menor que el encontrado en las formulaciones elaboradas con mayor concentración inicial de tensioactivo, en las que llegó hasta los 950 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Considerando las diferencias en los tamaños de partícula al modificar la concentración de PVA y asumiendo una densidad igual a 1 g/ml, se pueden calcular la superficie total de 1 partícula y el número total de partículas en cada formulación, de forma que corrigiendo el PVA retenido con estos parámetros, se obtiene que la cantidad de PVA asociada por unidad de superficie en NP elaboradas con 1% del tensioactivo sería 1,2 veces la asociada al transportador preparado con 0,25%.

Sahoo (Sahoo y col, 2002) comprobó que la cantidad de PVA residual en superficie está relacionada con las condiciones del método de preparación como su propia concentración y el tipo de disolvente orgánico utilizado. El PVA residual puede influir o modificar diferentes propiedades de las NP, tales como el tamaño de partícula, el potencial zeta, el índice de polidispersidad, su hidrofobicidad e incluso podría influir ligeramente sobre la liberación del fármaco encapsulado en las NP. Estos autores también destacan que las NP con mayor cantidad de PVA residual tuvieron una captación celular más baja a pesar de tener menor tamaño de partícula, lo que justificaría el desarrollo de formulaciones con una concentración de PVA inferior al 1%.

2.5. Determinación del rendimiento del proceso y eficacia de encapsulación.

La capacidad de las NP para incorporar un fármaco en su interior es uno de los parámetros más importantes que deben estudiarse durante su caracterización, puesto que un contenido elevado en principio activo implicará una menor cantidad de NP necesarias para alcanzar la dosis mínima eficaz.

Los resultados recogidos en la tabla 26 muestran que más de un 80% del fármaco incorporado en la preparación está encapsulado en las respectivas formulaciones de NP (captación 1). Con respecto a los datos reflejados en la columna “captación 2” se refieren al porcentaje de NS que permanece encapsulado después del proceso de re-suspensión que da lugar al producto final. En este caso, la práctica totalidad (>98%) de la NS inicialmente encapsulada permanece como tal en la suspensión final de NP. Con respecto a las preparaciones obtenidas en ausencia de PLGA (suspensiones de NS: NS, NSCS, NSCSImw, NSCSHA) los datos de captación se refieren a la proporción de fármaco que no se ha disuelto en la fase acuosa externa respecto al añadido (captación 1) y al porcentaje de NS que permanece no disuelta en la formulación final (captación 2). En todos los experimentos el porcentaje de recuperación de la NS es superior al 91%.

Tabla 26.- Porcentajes de captación y recuperación (datos medios y d.e.) correspondientes a las formulaciones elaboradas con un 1% de PVA.

	Captación 1 (%)		Captación 2 (%)		Recuperación (%)	
		sd		sd		sd
NP	88,26	4,59	98,28	1,43	96,72	13,67
NS	95,35	2,57	97,4	1,37	98,33	14,1
NPCS	85,48	4,74	98,38	1,13	94,25	9,45
NSCS	90,48	4,18	98,89	0,18	91,31	6,32
NPCSImw	82,79	4,06	98,04	1,07	91,83	15,29
NSCSImw	86,54	0,32	98,51	0,52	98,01	4,77
NPCSHA	80,68	1,35	98,45	0,85	92,25	7,14
NSCSHA	90,58	0,66	98,35	0,75	95,28	3,54

Los rendimientos del proceso de preparación de cada formulación no fueron muy elevados (entre el 68 y el 85%). Esto está relacionado con las sucesivas etapas de lavado y re-suspensión de las NP, la presencia de PVA que facilita la disolución del fármaco en la fase acuosa y la adsorción de las NP a las paredes de los distintos dispositivos y materiales con los que entra en contacto.

En la tabla 27 se muestra el análisis estadístico comparativo entre los porcentajes de captación 1 de las NP y las formulaciones sin polímero elaboradas con un 1% de PVA. La prueba de múltiples rangos muestra que el porcentaje de fármaco captado por las partículas resultó ser significativamente menor que la NS no disuelta en las suspensiones equivalentes, lo que sugiere que la solubilidad no es el único factor que influye en su encapsulación. Al comparar las captaciones de las distintas formulaciones de NP entre sí se observó que las que no tenían ningún recubrimiento eran distintas al resto. También se comprobó que el hecho de realizar el recubrimiento de las NP con CS de alto o bajo peso molecular no implicaba diferencias estadísticamente significativas. En cuanto a los porcentajes de recuperación de NS, resultaron no presentar diferencias en ninguna de las formulaciones estudiadas elaboradas con un 1% de PVA inicial.

Tabla 27.- Prueba de múltiples rangos ($p < 0,05$) realizada con los porcentajes de captación 1 (A) y recuperación (B) correspondientes a las formulaciones elaboradas con un 1% de PVA.

A

Muestra	Media	Grupos Homogéneos
NPCSHA	80,68	X
NPCSI _{mw}	82,79	X X
NPCS	85,48	XX
NSCSI _{mw}	86,54	XXX
NP	88,26	X
NSCS	90,48	XX
NSCSHA	90,58	XXX
NS	95,35	X

B

Muestra	Media	Grupos Homogéneos
NPCSI _{mw}	91,83	X
NSCS	91,31	X
NPCSHA	92,25	X
NPCS	94,25	X
NSCSHA	95,28	X
NP	96,72	X
NSCSI _{mw}	98,01	X
NS	98,33	X

En la tabla 28 se muestran los porcentajes de rendimiento obtenidos con las formulaciones de NP y NPB elaboradas con un 1% de PVA y el análisis estadístico de dichos resultados. Según éste, al analizar de manera independiente las NP y las NPB solo se obtienen diferencias estadísticamente significativas en el rendimiento del proceso cuando el recubrimiento se realiza con HA, siendo en estos casos superior al resto.

Tabla 28.- Rendimiento (datos medios y d.e.) (A) y prueba de múltiples rangos ($p < 0,05$) (B) obtenido con las formulaciones elaboradas con un 1% de PVA.

A

	Rendimiento (%)	
		sd
NP	71,09	13,03
NPB	68,35	8,31
NPCS	73,52	15,26
NPBCS	70,04	8,04
NPCSI_{mw}	79,26	8,85
NPBCSI_{mw}	79,16	16,86
NPCSHA	85	9,75
NPBCSHA	81,46	6,16

B

Muestra	Media	Grupos Homogéneos
NP	71,09	X
NPCS	73,52	X
NPCSI_{mw}	79,26	X X
NPCSHA	85	X
Muestra	Media	Grupos Homogéneos
NPB	68,35	X
NPBCS	70,04	X
NPBCSHA	81,46	X
NPBCSI_{mw}	79,16	X X

La tabla 29 muestra los porcentajes de captación y recuperación cuando las formulaciones fueron elaboradas con 0,25% de PVA. Los resultados indican que más de un 92% del fármaco incorporado en la preparación es inicialmente encapsulado o no se disuelve en la fase acuosa (captación 1). Al reducir un 75% la cantidad de PVA utilizada para elaborar la emulsión inicial se produce un incremento en la cantidad de NS retenida en el interior de las NP o no disuelta debido a un descenso en la solubilidad del fármaco en la fase externa de dicha emulsión. Este es el motivo por el que los datos de captación 1 de las formulaciones que aparecen en la tabla 29 son superiores a los de la tabla 26. La cantidad de NS captada y el porcentaje de PVA utilizado en la formulación no modifican los datos reflejados en la columna captación 2, que siguen siendo superiores al 98%. El porcentaje de recuperación fue similar al

obtenido en las formulaciones elaboradas con 1% PVA y en todos los casos fue superior al 86%.

Tabla 29.- Porcentajes de captación y recuperación (datos medios y d.e.) correspondientes a las formulaciones elaboradas con un 0,25% de PVA.

	Captación 1 (%)		Captación 2 (%)		Recuperación (%)	
		sd		sd		sd
NP	95,86	1,76	98,46	0,87	97,22	10,28
NS	96,76	2,46	98,38	1,42	92,64	10,19
NPCS	92,78	2,59	98,31	1,2	90,88	6,27
NSCS	92,95	1,62	98,93	0,69	88,87	5,29
NPCSI_{mw}	94,36	2,17	98,2	0,53	86,37	8,5
NSCSI_{mw}	93,92	1,44	99,24	0,41	90,89	8,69
NPCSHA	92,21	4,11	98,68	0,49	88,34	9
NCSHA	92,23	0,84	98,98	0,18	92,26	5,45

En el caso de las formulaciones elaboradas con una concentración de PVA del 0,25%, al realizar el análisis estadístico de las formulaciones de NP y de las suspensiones de NS se puede ver que, en ambos casos y a diferencia de las formulaciones con mayor concentración de PVA, no existen diferencias estadísticamente significativas entre las formulaciones con CS_{mw} y las que no tienen recubrimiento, pero sí hay diferencias entre estas últimas y las demás. Por otro lado, si se comparan los porcentajes de captación de las NP con las correspondientes suspensiones de fármaco (tabla 30A), no existen diferencias estadísticamente significativas y por lo tanto puede decirse que la solubilidad de la NS es el factor que condiciona su encapsulación. En la tabla 30B puede verse el resultado del análisis estadístico aplicado a los porcentajes de recuperación que se muestran en la tabla 29.

Tabla 30.- Prueba de múltiples rangos ($p < 0,05$) realizada con los porcentajes de captación 1 (A) y recuperación (B) correspondientes a las formulaciones elaboradas con un 0,25% de PVA.

A			B		
Muestra	Media	Grupos Homogéneos	Muestra	Media	Grupos Homogéneos
NCSHA	92,23	X	NPCSI _{mw}	86,37	X
NPCSHA	92,21	XX	NPCSHA	88,34	X
NPCS	92,78	XX	NSCS	88,37	X
NSCS	92,95	XX	NPCS	90,88	X
NCS _{SI_{mw}}	93,92	XXX	NCS _{SI_{mw}}	90,89	XX
NPCSI _{mw}	94,36	XX	NCSHA	92,26	XX
NP	95,86	X	NS	92,64	XX
NS	96,76	X	NP	97,22	X

En este caso, todas las formulaciones de NP con recubrimiento, independientemente de su composición, no mostraron diferencias entre sí ni con las formulaciones obtenidas sin utilizar PLGA. La única formulación que presentó diferencias estadísticamente significativas con el resto de NP fue aquella en la que no se realizó ningún recubrimiento con polisacáridos.

El análisis estadístico del rendimiento obtenido con las formulaciones de 0,25% PVA demostró que solo hay diferencias estadísticamente significativas entre NPCSHA y NPCSI_{mw} (tabla 31).

Tabla 31.- Rendimiento (datos medios y d.e.) (A) y prueba de múltiples rangos ($p < 0,05$) (B) obtenido con las formulaciones elaboradas con un 0,25% de PVA.

A			B		
	Rendimiento (%)		Muestra	Media	Grupos Homogéneos
		sd			
NP	87,35	6,61	NPCSI _{mw}	84,76	X
NPB	88,48	11,25	NPCS	86,14	XX
NPCS	86,14	4,74	NP	87,35	XX
NPBCS	90,23	1,91	NPCSHA	91,32	X
NPCSI _{mw}	84,76	4,85	Muestra	Media	Grupos Homogéneos
NPBCSI _{mw}	92,06	3,19	NPB	88,48	X
NPCSHA	91,32	3,88	NPBCS	90,23	X
NPBCSHA	98,7	1,41	NPBCSI _{mw}	92,06	X
			NPBCSHA	98,7	X

2.6. Proceso de liofilización

Tras la resuspensión en agua milliQ de las NP liofilizadas con distintos agentes crioprotectores se observó que todas ellas presentaban efecto Tyndall y no mostraban agregados ni características macroscópicas diferentes a las de la formulación original.

Para valorar si el proceso de liofilización era eficaz y no suponía modificaciones en el tamaño de partícula, se calculó la relación existente (Sf/Si) entre mv y d.e. antes y después liofilizar las muestras (Aberturas y col, 2002). En la tabla 32 pueden verse los resultados que demuestran que, tanto para las NP como para las NPCS, el crioprotector que mejor mantiene las características iniciales de la muestra es la sacarosa. En el caso de las NP sin recubrimiento, no se produjeron cambios considerables en las medidas obtenidas, sin embargo, con las NPCS a las que se les añadió trehalosa como agente crioprotector, sí se obtuvo un aumento significativo en el tamaño de partícula.

Tabla 32.- Relación entre mv y de antes y después del proceso de liofilización realizado con NP (A) y NPCS (B) elaboradas con un 1% de PVA.

A	Sacarosa		Glucosa		Trehalosa	
	Sf/Si (mv)	Sf/Si (de)	Sf/Si (mv)	Sf/Si (de)	Sf/Si (mv)	Sf/Si (de)
1%	0,91	0,83	0,97	1,14	0,96	0,77
5%	0,87	0,82	0,93	0,66	0,99	1,13

B	Sacarosa		Glucosa		Trehalosa	
	Sf/Si (mv)	Sf/Si (de)	Sf/Si (mv)	Sf/Si (de)	Sf/Si (mv)	Sf/Si (de)
1%	0,68	0,94	1,77	0,71	1,19	1,13
5%	0,63	0,56	1,16	1,08	1,81	3,26

Para comprobar que no había pérdidas en la cantidad de fármaco captada por las NP se valoraron antes y después del proceso de liofilización. Los porcentajes que se presentan en las tablas 33 A y B han sido calculados considerando como referencia la concentración de NS en las formulaciones de NP obtenida el día de su preparación.

Tabla 33.- Relación entre concentración de fármaco encapsulado en las NP antes y después del proceso de liofilización realizado con NP (A) y NPCS (B) elaboradas con un 1% de PVA.

A

Liofilización	1% sacarosa	5% sacarosa	1% glucosa	5% glucosa	1% trehalosa	5% trehalosa
	0,96	0,93	1,00	0,88	0,99	0,90

B

Liofilización	1% sacarosa	5% sacarosa	1% glucosa	5% glucosa	1% trehalosa	5% trehalosa
	0,95	0,94	1,00	0,92	0,93	0,88

Estos resultados muestran como, después del proceso de liofilización, entre un 88 y un 98% del fármaco captado en el momento de la preparación de las NP, permaneció encapsulado. Aunque no existe una gran diferencia, parece que el hecho de utilizar concentraciones más elevadas de crioprotectores provoca una ligera disminución en los porcentajes de NS encapsulada, por lo que sería más acertado utilizar concentraciones más bajas de cualquiera de ellos, y en particular, de la sacarosa, ya que fue el crioprotector que menos cambios provocó en el tamaño de partícula tras la liofilización de la muestra.

Otra alternativa estudiada para el almacenamiento de las NP fue la de liofilizarlas sin añadir a la muestras ningún agente crioprotector. A diferencia de las muestras liofilizadas con glucosa, trehalosa o sacarosa, tras resuspenderlas con agua milliQ y medir su tamaño, se obtuvieron agregados y las medidas obtenidas no fueron unimodales. Estas muestras se observaron al microscopio electrónico y se comprobó como las NP se unían entre sí perdiendo su morfología característica dando lugar a estructuras de mayor tamaño. Cuando las muestras liofilizadas no tienen una estructura porosa puede deberse al colapso de la misma debido a las condiciones en las que se ha realizado el proceso de liofilización. La consecuencia de esto será una mayor dificultad a la hora de redispersar la muestra (Konan y col, 2002; Fonte y col, 2012).

Cuando se empleó la congelación como alternativa para estabilizar las NP, se comprobó que la captación se modificó en menos de un 2% con respecto a los datos obtenidos el día de su preparación. Del mismo modo, se calculó el incremento que se produjo en el tamaño de partícula debido a la congelación de las muestras siendo este del 4% aproximadamente

(tabla 34). Como puede verse en la figura 27, las formulaciones de NP congeladas se observaron en el SEM sin apreciar cambios en su estructura ni en su morfología.

Tabla 34.- Relación entre mv y de y relación entre la concentración de fármaco encapsulado antes y después del proceso de congelación en NP y NPCS 1% PVA.

	Tamaño		Captación
	Sf/Si (mv)	Sf/Si (de)	%
NP	1,04	0,96	0,98
NPCS	1,05	1,25	0,99

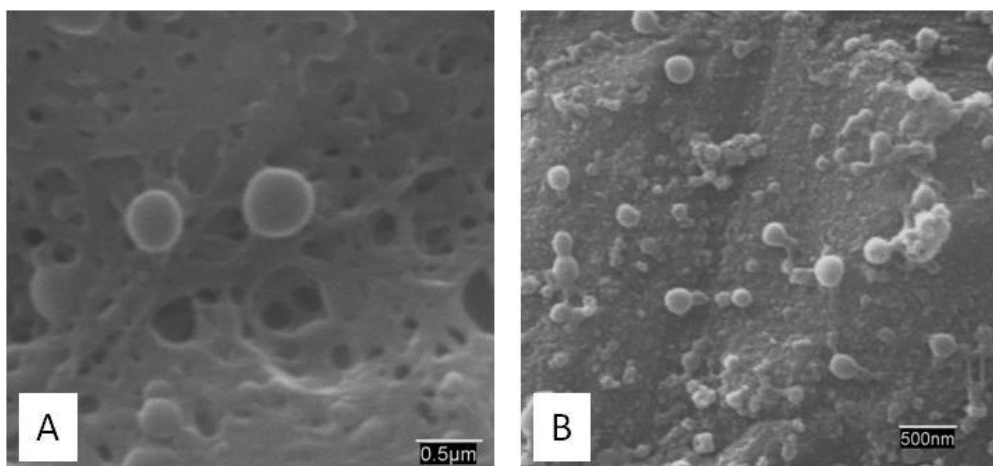


Figura 27.- Residuo seco de NP en suspensión sin congelar (A) y NP después de la congelación rápida (B), ambas sin ningún tipo de recubrimiento y elaboradas con una concentración inicial de PVA del 1%.

Por todo ello, se decidió evitar el proceso de liofilización de las muestras recurriendo a la congelación rápida con nitrógeno líquido y al almacenamiento de las mismas a -80°C , reduciendo así el tiempo de elaboración de las distintas formulaciones de NP.

2.7. Grado de cristalinidad e interacciones fármaco-excipiente. Estudios calorimétricos.

Los resultados obtenidos con la técnica DSC se encuentran reflejados en las figuras 28 a 32.

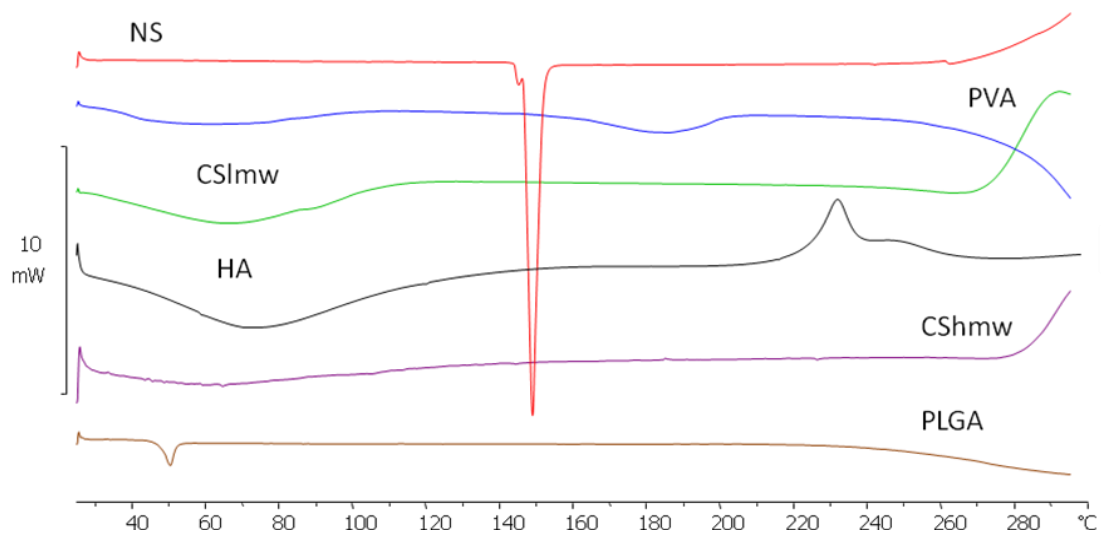


Figura 28.- Termogramas correspondientes a las materias primas.

El termograma del PLGA muestra como la Tg del polímero aparece a los 48° C. Con respecto a la NS, el análisis térmico de la materia prima pone de manifiesto la existencia de 2 eventos endotérmicos. Los estudios calorimétricos de Di Martino (Di Martino y col, 2007) utilizando distintas velocidades de calentamiento sugieren que el primer pico a 140° C (más pequeño) corresponde a un polimorfo metaestable de NS mientras que el pico mayoritario resulta de la fusión de otro polimorfo más estable a 148° C. Guinesi (Guinesi y Gomes, 2006) realizó un estudio calorimétrico del CS en el que describieron los dos eventos térmicos que pueden verse en la figura 28. Tanto el CS de alto como el de bajo peso molecular presentan un pico endotérmico próximo a los 70° C que podría atribuirse a la pérdida de agua y un segundo evento térmico que, aunque no se aprecia en su totalidad, comienza a los 290° C aproximadamente, y que podría estar relacionado con la descomposición del grupo amina del CS. La Tg del PVA se detecta por un ligero cambio en la línea base y está

representada por un pico endotérmico próximo a los 62° C. El segundo pico que aparece en el termograma del PVA a 188° C, corresponde a la temperatura de fusión del polímero. En el estudio publicado por Koosha (Koosha y col, 2015) se realizaron los análisis calorimétricos del CS y del PVA que confirman los resultados presentados en la figura 28. Ravari (Ravari y col, 2016) también realizó un recubrimiento con CS y HA para incrementar la afinidad de las NP hacia las células tumorales gracias a los receptores CD44. Al realizar el análisis calorimétrico del HA obtuvieron un pico exotérmico característico cercano a los 230° C.

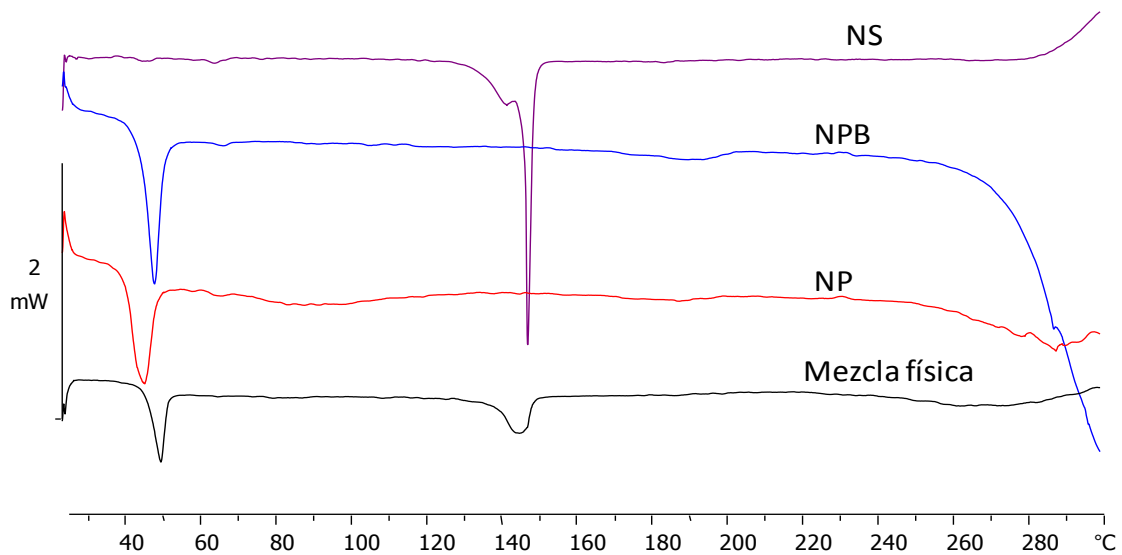


Figura 29.- Termogramas de NP con 1% PVA (NS cristales: morado, NPB: azul, Mezcla física NS y PLGA: negro, NP: rojo)

El termograma correspondiente a la mezcla física de NS y PLGA, que se obtuvo utilizando las mismas proporciones que las que se emplearon para preparar las NP (1:10), muestra un ligero aumento de la Tg del polímero (figura 29). También se observa un pico entre los 140 y 150° C, próximo a la temperatura de fusión de la NS, si bien el ligero desplazamiento y el cambio en su morfología sugerirían la existencia de algún tipo de interacción entre el polímero y el fármaco cuando éste se

encuentra encapsulado en las NP o como consecuencia del proceso de calentamiento.

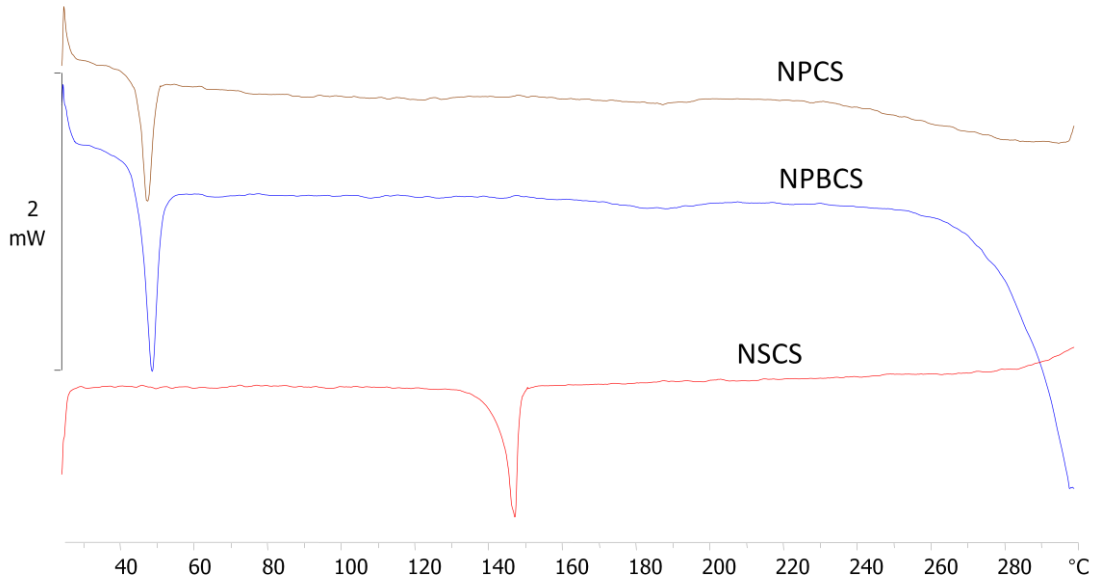


Figura 30.- Termogramas de formulaciones recubiertas con CS elaboradas con 1% PVA (cristales NSCS: rojo, NPBCS: azul, NPCS: marrón).

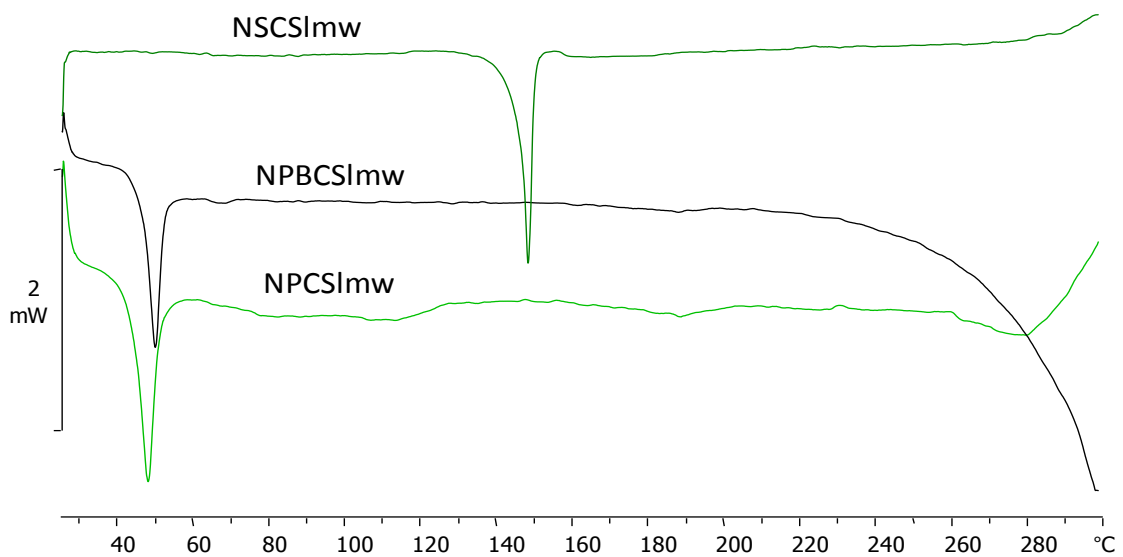


Figura 31.- Termogramas de formulaciones recubiertas con CSImw elaboradas con 1% PVA (cristales NSCSImw: verde oscuro, NPBCSImw: negro, NPNSCSImw: verde claro).

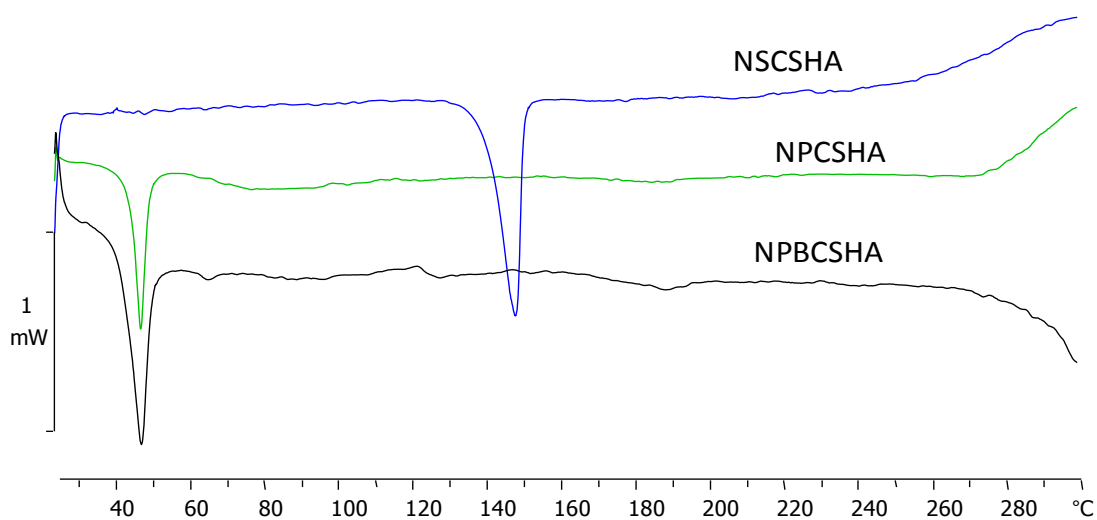


Figura 32.- Termogramas de formulaciones recubiertas con CS y HA con 1% PVA (NSCSHA cristales: azul, NPBCSHA: negro, NPNSCSHA: verde).

En las formulaciones de NP estudiadas la Tg del PLGA muestra cierta variabilidad, si bien las oscilaciones alrededor de los 50° C parecen más bien debidas a algún factor durante la preparación de las NP que a la presencia de NS, CS o HA. Recientemente, Sengel-Turk (Sengel-Turk y col, 2014) publicó resultados obtenidos con NP de PLGA cargadas con NS que fueron preparadas en condiciones experimentales muy similares a las descritas en este trabajo, y que han confirmado el hecho de que la NS se encuentra en un estado amorfo dentro del polímero.

No existen diferencias en los termogramas de las NP que aparecen en las figuras 29 a 32 con respecto a los resultados obtenidos con las NP sin recubrimiento (figura 28), pero sí en los correspondientes a las formulaciones de cristales con CS, CSImw y CSHA en los que desaparece el primer pico que se obtiene en el termograma cercano a los 140° C, correspondiente a la fusión del primer polimorfo de la NS, dando lugar a un único pico más próximo a los 148° C. Esto podría deberse al proceso de disolución y recristalización de la NS durante el proceso de preparación de las formulaciones.

El único evento térmico destacable en los termogramas de todas las formulaciones de NP es el que corresponde a la Tg del PLGA (50° C). La

ausencia del pico a 148° C, que indica la presencia del fármaco en los termogramas de las mezclas físicas, nos confirma que la NS se encuentra dispersa a nivel molecular en la estructura matricial de las NP.

El análisis calorimétrico de las formulaciones elaboradas con una concentración inicial de PVA del 0,25% condujo a los mismos resultados y conclusiones discutidos para las formulaciones con 1% de PVA, por lo que no se han incluido.

2.8. Análisis mediante espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

La técnica FTIR permite identificar la existencia de interacciones entre los componentes de una formulación mediante el análisis de los picos que conforman el espectro en base a las transiciones vibracionales de tensión o estiramiento y de flexión que reflejan cambios en las distancias interatómicas o los ángulos de enlace.

En la figura 33 se muestran los espectros obtenidos para los diferentes componentes de las formulaciones analizadas:

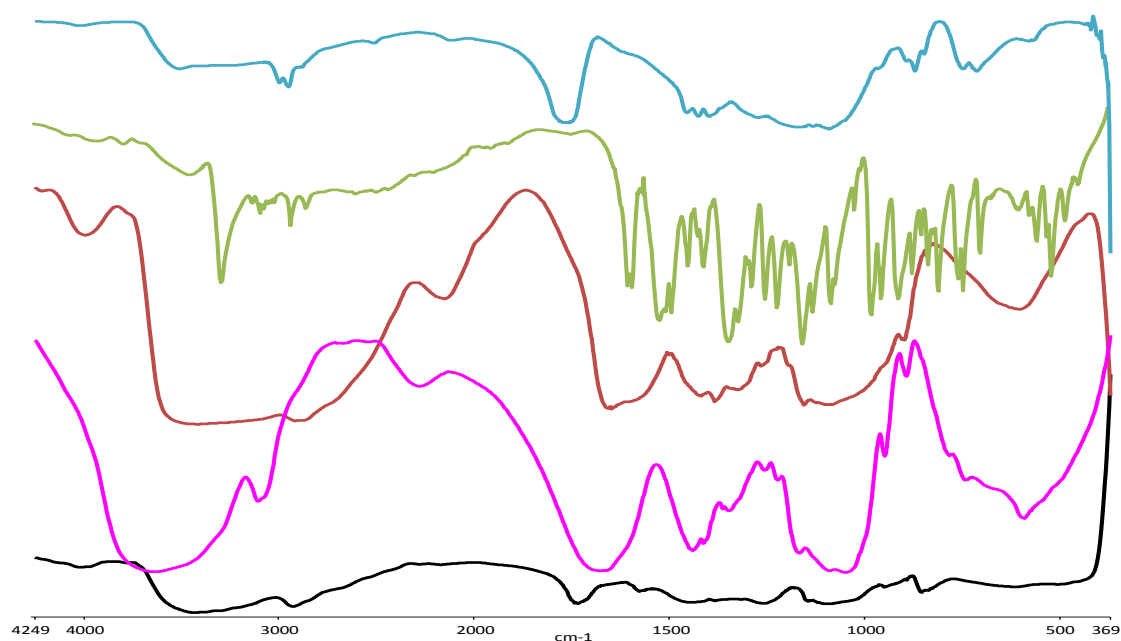


Figura 34.- Espectros FTIR de materias primas: PLGA (azul), NS (verde), CS (rojo), PVA (negro) y HA (rosa).

Como puede apreciarse, el CS muestra en su espectro una banda característica a 3454 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de tensión de los grupos -NH y -OH , y a 1628 cm^{-1} se observó un gran pico de absorción que se atribuyó a la vibración de flexión del grupo -NH (Ramya y col, 2012). En la figura 34 solo se muestra el espectro del CS de alto peso molecular puesto que los grupos que generan los picos necesarios para identificarlo son los mismos que en el caso del CS_{lmw}. Al analizar el espectro del PLGA se encontró una banda característica entre los 2800 y los 3000 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de tensión producidas por el estiramiento del grupo -CH . Los metilenos (-CH_2) tienen una absorción característica de 1450 a 1485 cm^{-1} producida por una vibración de flexión, mientras que los grupos metilo (-CH_3) presentan la misma vibración en un pico a $1375\text{-}1380\text{ cm}^{-1}$. Además, entre 1650 y 1750 cm^{-1} aparece un gran pico de absorción relacionado con las vibraciones debidas al estiramiento del grupo carbonilo C=O (Singh y col, 2014). El PVA también mostró unas bandas de absorción características a $3200\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ y a 1731 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones producidas por los grupos OH y C=O , respectivamente (Mansur y col, 2008). Por último, a 3286 cm^{-1} la NS presentó unos picos correspondientes a la vibración producida por el estiramiento del grupo -NH y entre los 1560 y los 1640 cm^{-1} apareció la banda debida a la flexión del mismo grupo, mientras que los picos característicos del grupo N=O aparecieron a 1586 cm^{-1} (Dantu y col, 2013). La tensión por estiramiento de los hidrocarburos aromáticos se produce en torno a los 3000 cm^{-1} . En el espectro correspondiente al HA puede verse un pico entorno a los 3450 cm^{-1} que indica la presencia de grupos -OH en la molécula. Este pico podría aparecer solapado junto con el que representa la vibración producida por el estiramiento del grupo -NH , cercano a los 3300 cm^{-1} para dar lugar a un único pico en el espectro. A los 1700 cm^{-1} , aparece otro pico que correspondería a las vibraciones producidas por el grupo C=O que presenta el HA en su estructura.

A continuación, para confirmar la presencia de los distintos componentes utilizados en la elaboración de las NP, se llevaron a cabo análisis de FTIR de las distintas formulaciones desarrolladas.



Figura 35.- Espectros FTIR de NP con PVA 1%: mezcla física NPB+NS (azul), NP (rojo) y NPB (negro).

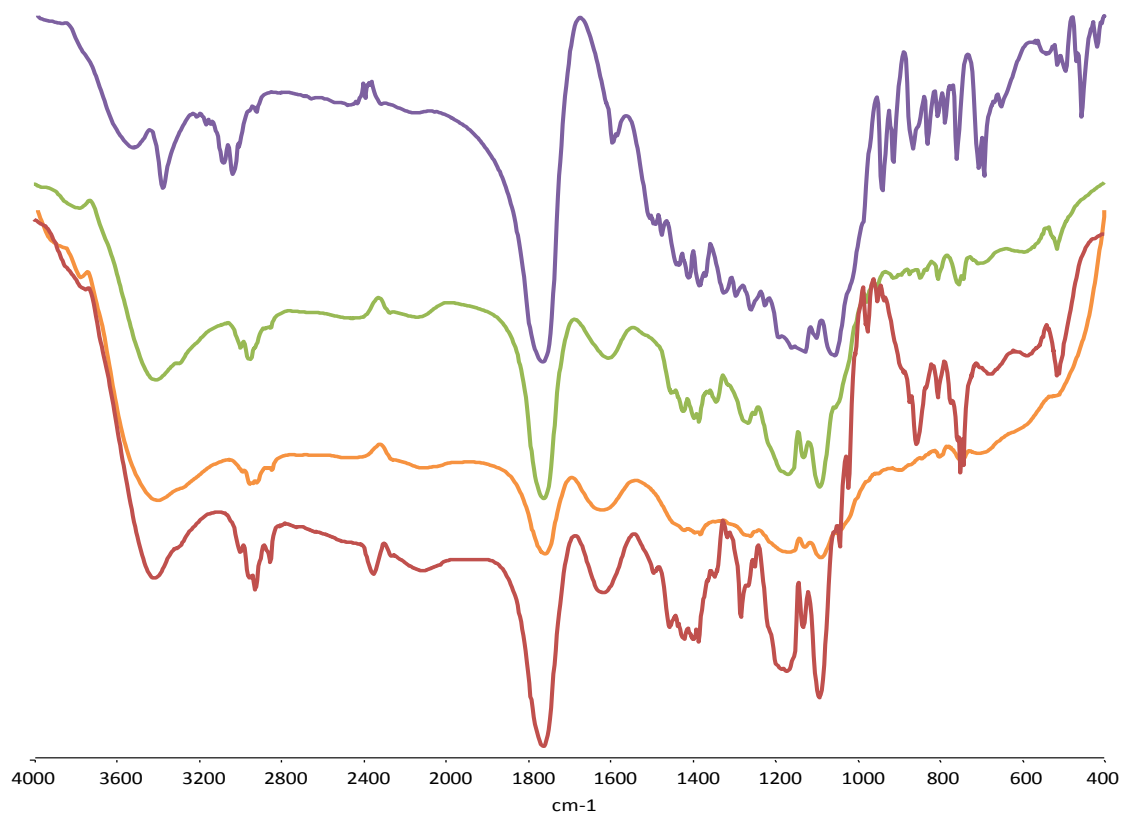


Figura 36.- Espectros FTIR de NP con CS y PVA 1%: mezcla física NPBCS+NS (morado), NPBCS (verde), NPBCS (naranja) y NPBCSImw (rojo).

El espectro obtenido al analizar la muestra de NPCSlmw fue muy similar al obtenido con las NP recubiertas con el mismo polisacárido de mayor peso molecular, por lo que no se llevó a cabo el estudio con NPBCSlmw ni la mezcla física correspondiente de las NPBCSlmw y la NS.

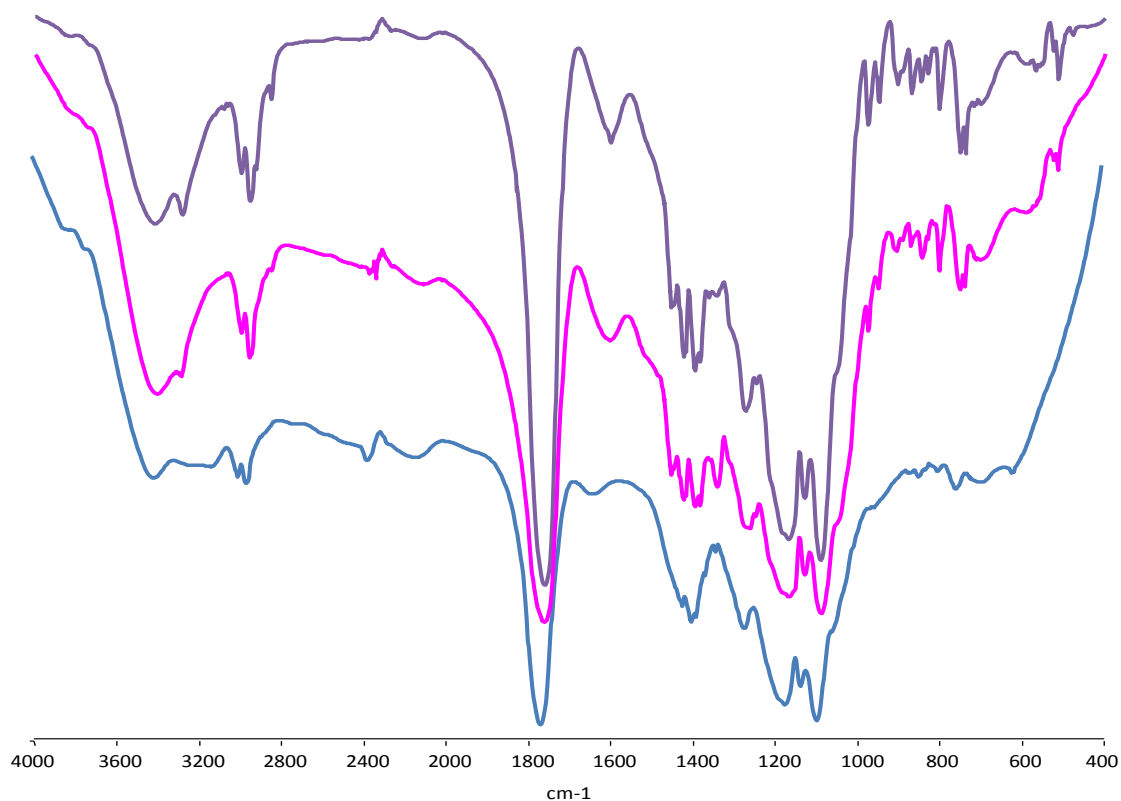


Figura 37.- Espectros FTIR de NP con CS y HA con PVA 1%: mezcla física NPBCSHA+NS (morado), NPBCSHA (azul) y NPCSHA (rosa).

En todos los casos se pueden apreciar los picos característicos del PLGA a $2800-3000\text{ cm}^{-1}$ y a 1750 cm^{-1} que ya se han comentado anteriormente, siendo los de las NPB con y sin CS los más parecidos al espectro del PLGA puro. Las principales diferencias con éste se producen en el pico que puede apreciarse a 3400 cm^{-1} correspondiente al $-\text{OH}$ del PVA (NPB) y al $-\text{NH}$ y $-\text{OH}$ del CS y del HA (NPBCS y NPBCSHA), cuya presencia en unas u otras partículas produce un incremento más significativo en los picos obtenidos. En los espectros de las mezclas físicas de NPB o NPBCS con NS libre, puede observarse como ambos aparecen superpuestos dando lugar a un único espectro en el que se aprecian los

picos característicos del fármaco junto con los más representativos de dichas NP. Al contrastar los espectros obtenidos con las mezclas físicas y los correspondientes a las NP cargadas con NS, las únicas diferencias destacables que se pudieron apreciar fueron la ausencia del pico a 1628 cm^{-1} que representa la flexión del grupo -NH del CS, lo que sugiere algún tipo de interacción entre la NS y el CS, y la desaparición o reducción del pico a 3286 cm^{-1} característico de la vibración producida por el estiramiento del grupo -NH de la NS en los espectros correspondientes a las formulaciones de NP.

El análisis de las muestras preparadas con las formulaciones de NP con menor concentración de tensioactivo condujo a los mismos resultados y conclusiones discutidos para las formulaciones con 1% de PVA, por lo que no se han incluido.

✓ **Estudios de liberación *in vitro***

Los estudios de liberación *in vitro* proporcionan información sobre el comportamiento que la formulación estudiada puede tener una vez administrada *in vivo*. En particular, con los estudios para fármacos BCS clase II cabe esperar buenas correlaciones *in vitro-in vivo* si las velocidades de disolución en ambos casos coinciden razonablemente. Las formulaciones investigadas se orientan a la administración intraprostática de la NS de forma que se forme un depósito en el lugar de inyección que proporcione elevadas concentraciones a nivel local. Ello implica que, tras la administración, las condiciones en las que se libere el fármaco en la glándula no tendrá lugar en condiciones *sink* y que se puede producir una dilución variable de la formulación en el punto de inyección. Por ello, se han planteado, además de los estudios de disolución clásicos, otros de liberación inmediata en condiciones de dilución secuencial.

.1. Liberación inmediata

Los resultados de los estudios de liberación inmediata realizados en PBS pH 7,4 con suspensiones de NS o NP elaboradas con una

concentración de PVA del 1% (figura 38) muestran que para que se produzca una liberación significativa del fármaco a partir de las NP es necesario alcanzar una dilución superior al 50%, independientemente de que estas estén o no recubiertas con CS o HA. Sin embargo, al alcanzar una dilución del 90% o superior la liberación de la NS muestra una clara dependencia de los polisacáridos utilizados en la obtención de las NP. Se observa que la naturaleza hidrofílica del CS o del HA facilitan la penetración del agua en su estructura y favorecen la liberación de la NS hasta reducir el porcentaje retenido a valores de 60 y 50%, respectivamente, cuando la dilución es del 90%. Estos valores se reducen al 20% en ambos casos cuando se trabaja con la dilución más alta estudiada. Los estudios realizados por Wang (Wang y col, 2013) demostraron que las NP de PLGA recubiertas con CS presentaban una liberación mayor y más rápida que las mismas NP sin recubrir. El CS presente en la superficie de las NP modifica la carga superficial de los nanotransportadores obteniendo valores de potencial zeta positivos, lo que, debido a distintas interacciones electrostáticas, podría acelerar la liberación del fármaco (5-Fluorouracilo) que tiene carga negativa, al igual que podría ocurrir con la NS en este trabajo.

Por el contrario, las NP de PLGA sin ningún tipo de recubrimiento muestran una gran capacidad para retener hasta un 60% de la NS encapsulada aunque la dilución alcance el 99%. El efecto está relacionado con la baja solubilidad del fármaco en medio acuoso, aunque no exclusivamente, ya que el mismo experimento llevado a cabo con suspensiones del fármaco sin PLGA demuestra que más de un 40% de este se puede disolver si la dilución empleada alcanza el 90%. Sin embargo, cuando la dilución empleada es del 99%, la NS se disuelve prácticamente en su totalidad, algo que no ocurre si el fármaco está asociado a las NP con o sin recubrimiento, las cuales son capaces de retener entre un 17 y un 53% más de fármaco que las suspensiones de NS equivalentes obtenidas sin polímero. Los resultados con las NPCSI_{mw} utilizando como medio de dilución tampón PBS son muy similares a los obtenidos con las NP cubiertas con el mismo polisacárido de alto peso molecular o con las NPCSHA.

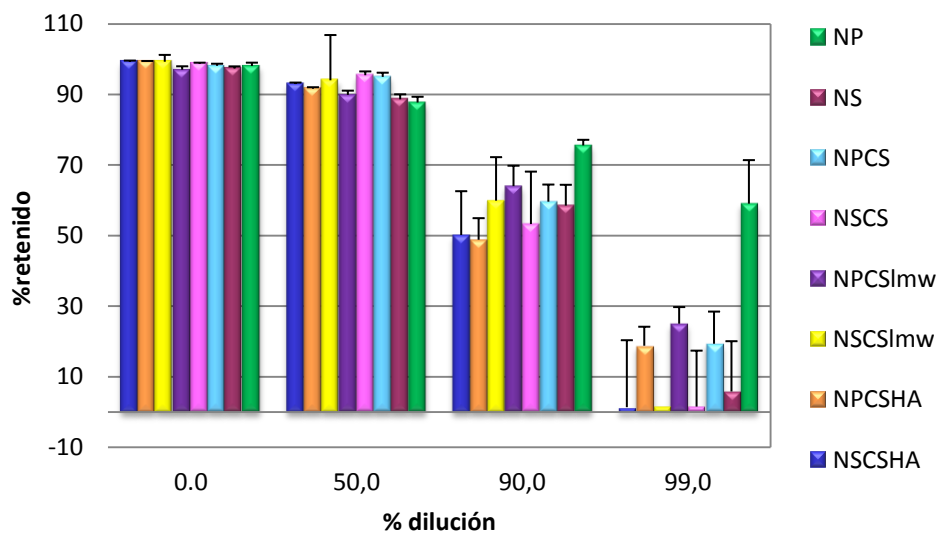


Figura 38.- NS sin disolver o retenida en formulaciones elaboradas sin PLGA o NP, respectivamente con un 1% de PVA en tampón PBS pH 7,4.

El tejido prostático normal tiene un pH fisiológico cercano a 7,2-7,5, mientras que en el tejido tumoral se produce la acidificación del medio como resultado de la excreción de ácido láctico (Ippolito y col, 2016). Para simular estas condiciones y comprobar la influencia del pKa de la NS (6,5-6,8) sobre la solubilidad y la liberación del fármaco encapsulado en las NP, se realizó el mismo estudio de dilución sustituyendo el PBS de pH 7,4 por agua milliQ (figura 39). La solubilidad pH dependiente que presenta la NS se muestra en la tabla 4, donde aparece reflejado el incremento de solubilidad que sufre el fármaco al cambiar el agua (5,5 mg/ml) por un tampón pH 6,8 (12 mg/ml) o pH 7,4 (33,6 mg/ml) como medio de disolución. Como puede verse en la figura 39, al sustituir el tampón PBS pH 7,4 por agua milliQ y trabajar con la dilución más significativa en cuanto a diferencias de liberación se refiere (dilución 1/100), se observó un incremento de los porcentajes de NS no disuelta o retenida en todas las formulaciones, pero de forma más significativa en las que tenían CS de alto peso molecular y en las que no tenían recubrimiento. En las formulaciones que contenían CSI_{mw} y HA se obtuvo prácticamente el mismo porcentaje de retención que en el experimento realizado con tampón PBS, lo que indica que este tipo de recubrimientos más

hidrofílicos facilitan la disolución de la NS independientemente del pH que tenga el medio.

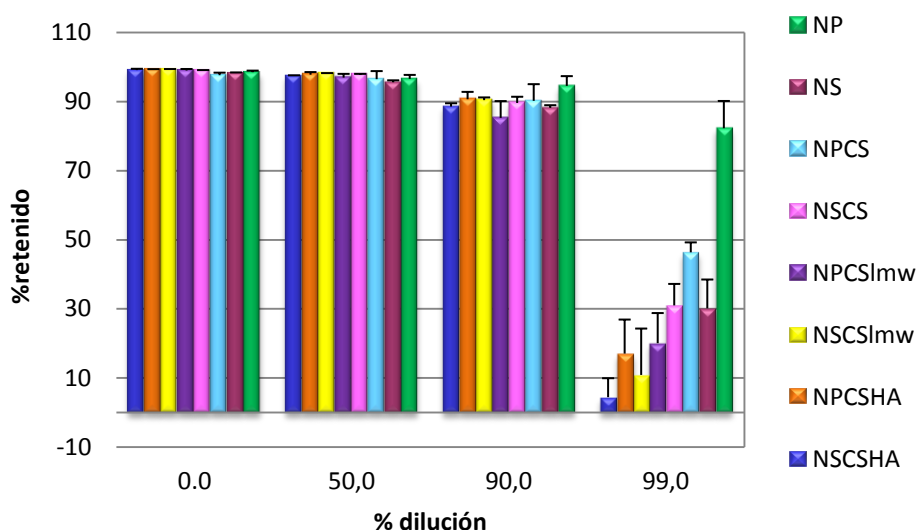


Figura 39.- NS sin disolver o retenida en formulaciones elaboradas sin PLGA o NP, respectivamente con un 1% de PVA en agua milliQ.

El CS es un polímero insoluble en agua a pH neutro o básico ($\text{pH} \geq 7$) pero soluble en medio ácido ($\text{pH} \leq 6$). Choudari (Choudhari y col, 2014) discute como el peso molecular y el grado de desacetilación del CS empleado en el recubrimiento de las NP puede modificar de forma significativa distintos aspectos funcionales de dichos nanotrasportadores como por ejemplo su solubilidad, viscosidad o su carga superficial. El empleo de agua milliQ como medio de dilución produce un incremento en la retención de NS por las NPCS con respecto a los resultados que se muestran en la figura 38. Sin embargo, el hecho de utilizar CSImw para recubrir las NP no modifica el porcentaje de fármaco que permanece encapsulado. Este hallazgo puede deberse a la estructura más compacta que presentan las NPCS y a la menor solubilidad del CS de alto peso molecular y a la mayor viscosidad de la capa de gel formada alrededor de las partículas al entrar en contacto con el medio de disolución acuoso ligeramente ácido. Por otra parte, la alta solubilidad en agua del CSImw, así como la del HA, y su baja viscosidad en solución facilitan la liberación y la disolución de la NS en las NPCSIW y en las NPCSHA y en sus

correspondientes formulaciones elaboradas sin PLGA. Yang (Yang y Hon, 2009) obtuvo en sus estudios una liberación más lenta del fármaco en las NP elaboradas con CS de alto peso molecular en relación a la liberación obtenida con las NPCSlmw, lo que confirma los resultados obtenidos en este trabajo e indica que al utilizar un CS de mayor peso molecular para recubrir las partículas, la matriz polimérica podría ejercer un mayor control sobre la liberación del principio activo encapsulado.

Se realizó el mismo estudio con NP elaboradas con una concentración de PVA del 0,25% obteniendo datos muy similares a los anteriores.

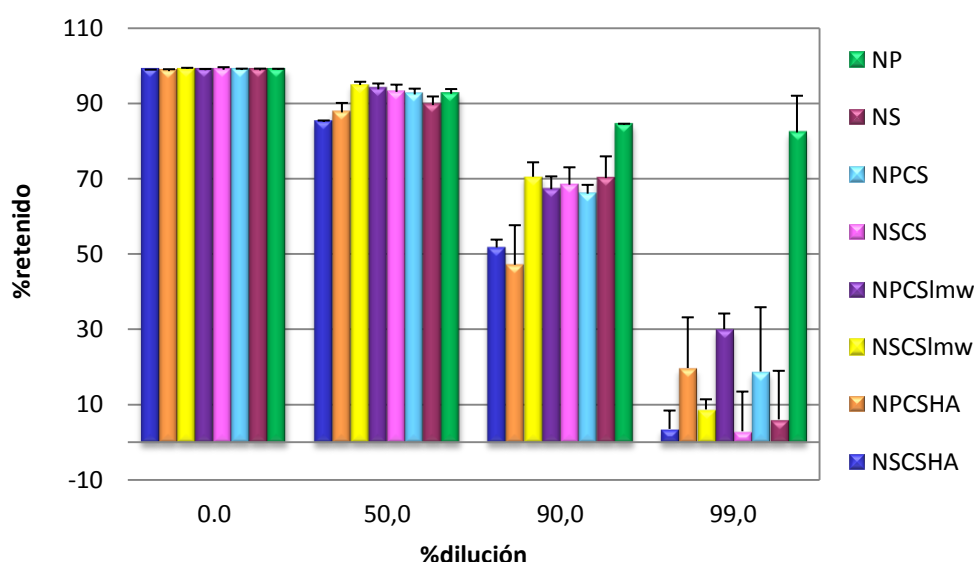


Figura 40.- NS sin disolver o retenida en formulaciones elaboradas sin PLGA o NP, respectivamente con un 0,25% de PVA en tampón PBS pH 7,4.

Como se muestra en la figura 40, la única diferencia encontrada en cuanto al porcentaje de NS retenida por las NP aparece cuando se trabaja con la dilución más alta estudiada (99%). En este caso, se obtiene un incremento del fármaco que permanece encapsulado del 20% aproximadamente con respecto al obtenido con las NP elaboradas con mayor concentración de PVA.

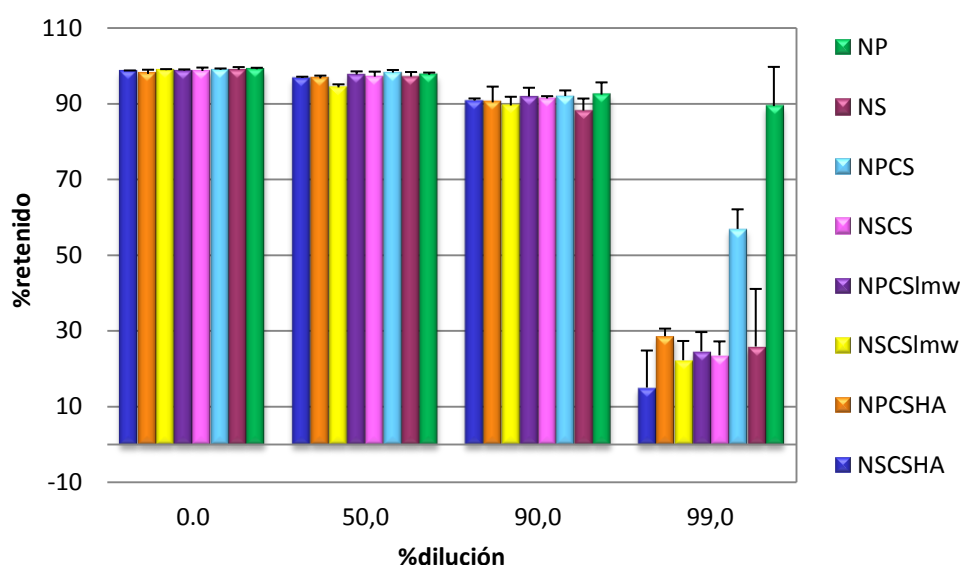


Figura 41.- NS sin disolver o retenida en formulaciones elaboradas sin PLGA o NP, respectivamente con un 0,25% de PVA en agua milliQ

La figura 41 pone de manifiesto otra vez que las NP y las que poseen el recubrimiento de CS presentan la mayor capacidad de retención en agua.

Por ello, y puesto que las NP elaboradas con una concentración de PVA del 0,25% demostraron tener una mayor capacidad de retención de la NS que las otras formulaciones, se seleccionaron para posteriores estudios *in vivo*.

Con la finalidad de comparar de forma más clara la capacidad de retención de las formulaciones de NP elaboradas con diferente concentración de tensioactivo, las figuras 50 y 51 muestran reagrupados los resultados correspondientes a una dilución 1:100.

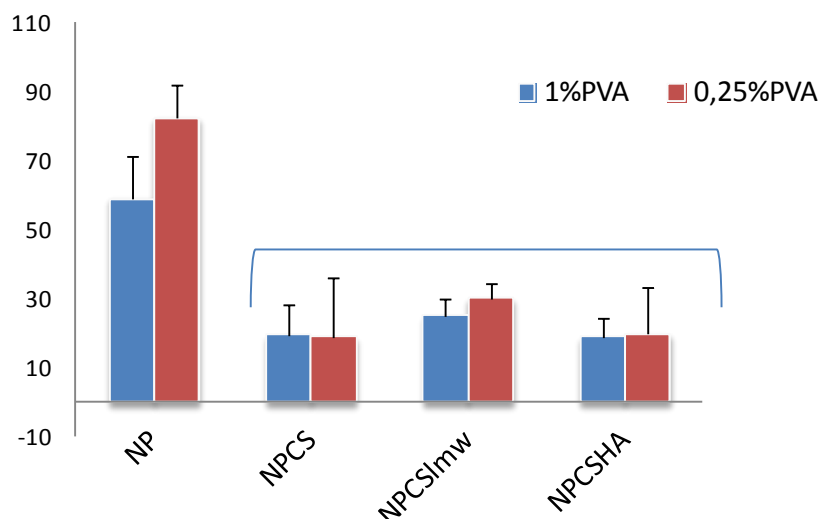


Figura 42.- NS retenida en las NP con una dilución del 99% en los estudios de liberación inmediata realizados con PBS pH 7,4. El corchete agrupa las formulaciones que presentan un perfil de liberación sin diferencias estadísticamente significativas.

Los datos que se presentan en la figura 42 ponen en evidencia que son las NP sin recubrimiento, las que retienen NS de forma más eficaz mostrando además diferencias en función de la concentración de PVA empleado en su elaboración. La incorporación de una cubierta, ya sea de CS o de CSHA disminuye la capacidad de retención en tampón pH 7,4.

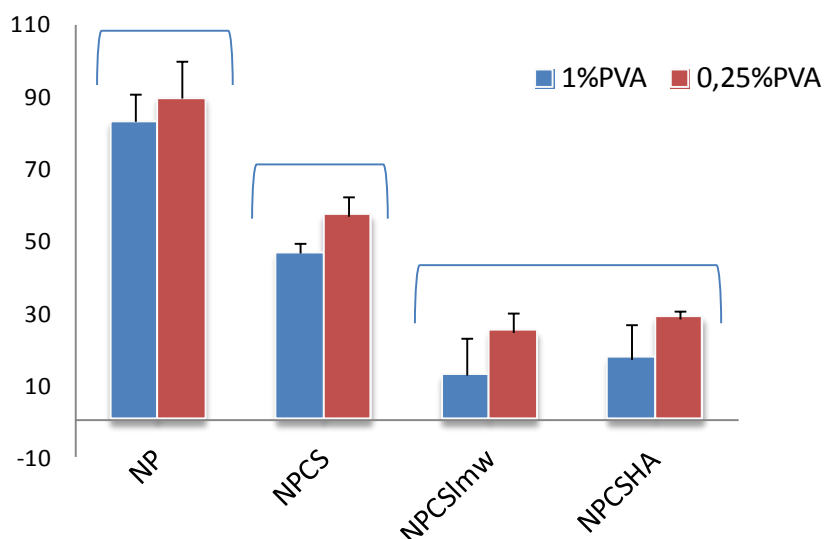


Figura 43.- NS retenida en las NP con una dilución del 99% en los estudios de liberación inmediata realizados con agua milliQ. Los corchetes agrupan las formulaciones que presentan un perfil de liberación sin diferencias estadísticamente significativas.

Cuando el medio de dilución es el agua, las NP sin recubrimiento siguen mostrando la mayor capacidad de retención aunque en este caso no existen diferencias debidas a la concentración de tensioactivo (figura 43). Sin embargo, la incorporación de una cubierta de CS de alto peso molecular mejora la capacidad de retención de las partículas si se compara con el comportamiento observado en tampón pH 7,4. Este efecto se puede explicar considerando que la NS es menos soluble en medio acuoso a pH ácido (tabla 4) que en el tampón de pH 7,4. Por otra parte, el hecho de que solamente el CS de alto peso molecular mantenga mayor capacidad de retención en el agua sugiere que factores como el pKa de la NS y del CS y/o su solubilidad pH dependiente podría favorecer su interacción y retención en el transportador.

.2. Liberación en función del tiempo

Los dos principales mecanismos de liberación asociados a los sistemas elaborados con PLGA son la difusión y la erosión/degradación. Normalmente, la velocidad de liberación es controlada inicialmente por el mecanismo de difusión mientras que los procesos de erosión/degradación controlan la etapa final del periodo de liberación. Además influyen otros muchos factores en la velocidad de difusión del fármaco y en la cinética de degradación por ejemplo, las interacciones polímero-fármaco, la absorción de agua o la porosidad del sistema. Fredenberg (Fredenberg y col, 2011) realizó una extensa revisión bibliográfica sobre los mecanismos de liberación de fármacos a partir de sistemas de dosificación elaborados con PLGA.

La figura 44 muestra las curvas de disolución de NS a partir de NP y NPCS elaboradas con 1% de PVA. Los resultados muestran que una dilución próxima al 99% (20 μ l de NP en 1,5 ml de PBS pH 7,4), produce una liberación instantánea del fármaco y que en condiciones *sink* a 37° C no existen restricciones a la liberación de la NS ni por parte del PLGA ni del CS.

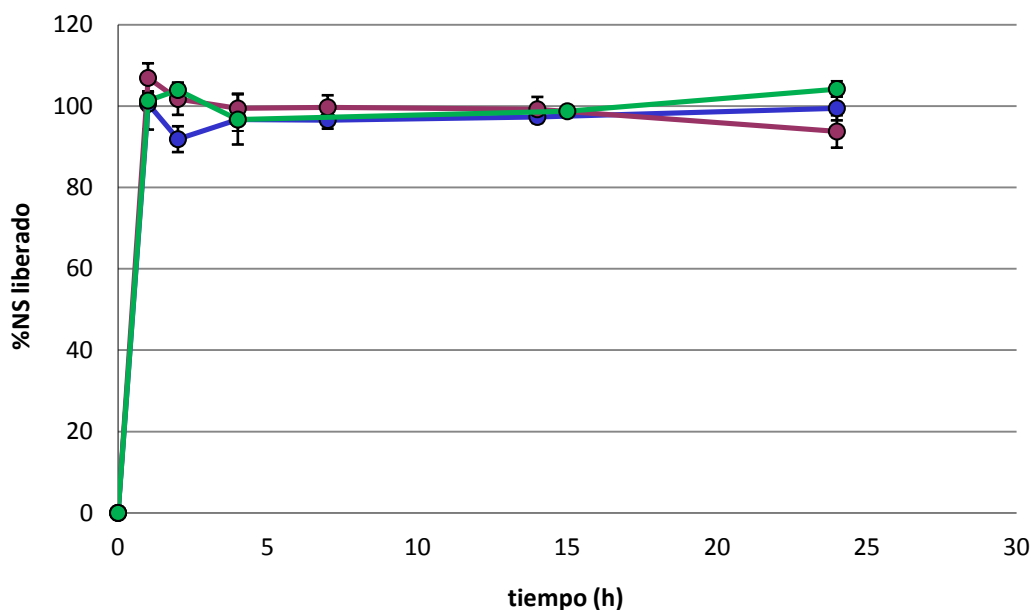


Figura 44.- NS liberada en los estudios de cesión a partir de las NP elaboradas con una concentración de PVA del 1% (NP: azul, NPCS: rojo y NPCSHA: verde).

Los estudios de liberación llevados a cabo con las formulaciones elaboradas con 0,25% de PVA y aquellas que incorporaban CSLmw dieron lugar a los mismos resultados por lo que no se han incluido. Tan solo las NP sin recubrimiento elaboradas con 0,25% de PVA parecen liberar como máximo un 80% del fármaco encapsulado durante la primera hora de duración del estudio y retener el 20% restante durante las siguientes 24 horas.

Aunque la concentración de NP y NS con la que se trabaja en los estudios de dilución al 99% es prácticamente igual a la utilizada en los estudios de cesión a lo largo del tiempo, el incremento en la liberación de fármaco que se ha obtenido en estos últimos podría deberse a la temperatura a la que se realiza este estudio, ya que a una temperatura de 37° C la NS duplica su solubilidad con respecto a la que presenta a 25° C (tabla 4).

Por tanto, cabe concluir que aunque la NS pudiera interaccionar con alguno de los componentes de las formulaciones, éstas son débiles y

reversibles no constituyendo en ningún caso una limitación para que el fármaco se libere y ejerza su efecto farmacológico.

Los estudios de liberación deben intentar reproducir las condiciones que soportará la formulación desarrollada tras su administración. En el artículo publicado por Bunjes (Bunjes, 2010) en el año 2010 se pone de manifiesto la importancia que tiene, a la hora de diseñar los estudios de liberación del fármaco en base a las condiciones que existan en la biofase, el saber si la vía de administración causará la dilución de la formulación estudiada. Siewert (Siewert y col, 2003) recomienda realizar el estudio de liberación en el caso de las soluciones y dispersiones sólidas en condiciones *non-sink*. Hacerlo así contribuye a caracterizar correctamente el proceso de liberación del fármaco puesto que este tipo de formulaciones a menudo conducen a condiciones de sobresaturación del medio. Esta situación está representada por los estudios de liberación inmediata realizados con distintas diluciones. En base a los resultados obtenidos se puede prever que tras la inyección intraprostática de las NP se producirá un depósito con una elevada concentración de NS en el que, al menos temporalmente, existirán condiciones *non-sink*. La hidrólisis que tiene lugar en los sistemas elaborados con PLGA se produce mediante la escisión de enlaces éster y la posterior disminución del peso molecular y se inicia de manera inmediata cuando la formulación se diluye en un medio acuoso. No obstante, este es un proceso que tiene lugar en periodos de tiempo más largos que los determinados en este trabajo. Uno de los factores que contribuye a una rápida liberación es una alta relación fármaco-polímero (Huang y Brazel, 2001) que provocaría una elevada concentración de NS en la superficie de las NP. Las NP no tienen una gran capacidad para difundir en un tejido sólido, por lo que tras la administración de la formulación habría un elevado porcentaje de la NS encapsulada que permanecerá retenida. Posteriormente, el arrastre que el flujo sanguíneo pueda hacer del fármaco inicialmente liberado provocará la disolución adicional de la NS que quedaba encapsulada. La liberación de la NS bajo condiciones *sink* unida a la capacidad de las NP para retener el fármaco cuando se trabaja con una dilución del 99% (en comparación con la más rápida y completa disolución que presentan los cristales de NS) sugieren que el proceso de liberación se producirá

mediante la difusión de manera progresiva de las moléculas de NS, empezando por las más cercanas a la superficie en la matriz polimérica de las NP (Wang y col, 2012). Este fenómeno estará controlado principalmente por el coeficiente de reparto de la NS en el medio. Por ello, tras estudiar su mecanismo de liberación se comprueba que nuestra formulación reúne las condiciones necesarias para alcanzar elevadas concentraciones de fármaco en la biofase y cumplir así el objetivo marcado para este trabajo.

✓ Estudios de permeabilidad

.1. Ensayo de Permeabilidad con Membranas Artificiales en Paralelo (PAMPA)

Los estudios de permeabilidad se emplean habitualmente en el desarrollo de nuevas moléculas para identificar fármacos candidatos con buenas características de permeabilidad. El sistema BCS delimita como fármacos Clase I y II (permeables) a aquellas moléculas que presentan una absorción superior al 85% o que presentan un coeficiente de permeabilidad *in vivo* superior a 10^{-4} cm/s. Este valor trasladado a un sistema *in vitro* como es el sistema PAMPA corresponde a coeficientes de permeabilidad entorno a 10^{-5} o 10^{-6} cm/s. La NS está catalogada como un fármaco Clase II y por tanto, con buena permeabilidad. En este sentido, los estudios llevados a cabo muestran que la permeabilidad de la NS es buena (entre 1 y $1,5 \times 10^{-5}$ cm/s) e independiente de la concentración del fármaco hasta la concentración de $400 \mu\text{M}$ (figura 45). Meriani (Meriani y col, 2004) obtuvo coeficientes de permeabilidad *in vitro* similares para la NS en su forma libre a través de membranas de intestino de rata evertidas ($1,7 \times 10^{-3}$ cm/min, lo que equivale a $2,8 \times 10^{-5}$ cm/s). Babu (Babu y col, 2003) también estudió el coeficiente de permeabilidad de la NS a través de una muestra de piel de rata sin pelo obteniendo un resultado de $3,22 \times 10^{-2}$ cm/h, lo que equivalía a $8,9 \times 10^{-6}$ cm/s. Por último, Bernareggi y Reinsford (Bernareggi y Rainsford, 2005), utilizaron cámaras *Ussing* obteniendo un coeficiente de permeabilidad de NS libre a través de la mucosa de colon de conejos de $4,8 \times 10^{-5}$ cm/s. En todos los casos se obtuvieron valores

correspondientes al coeficiente de permeabilidad muy similares a los obtenidos en nuestro estudio realizado con el modelo PAMPA.

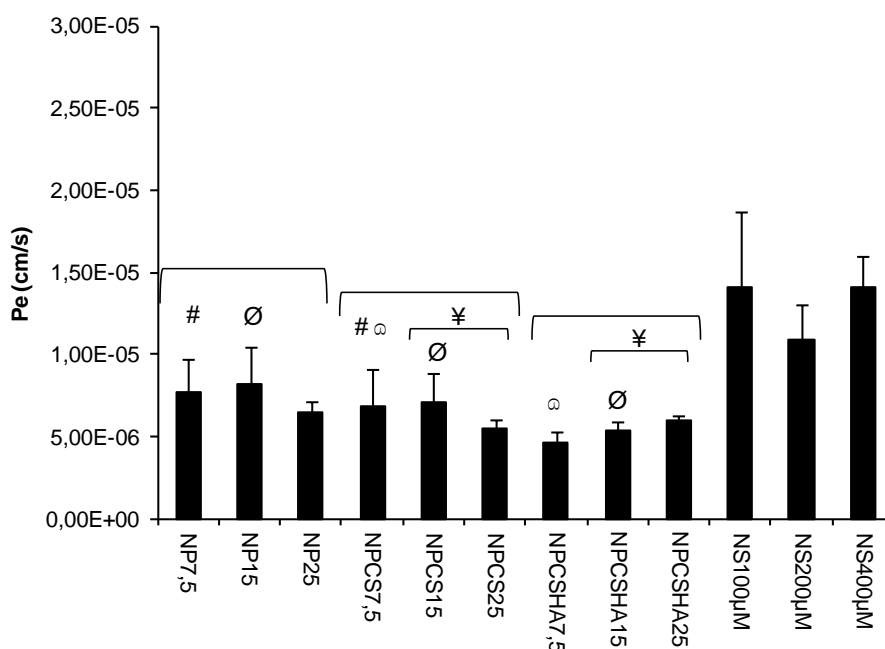


Figura 45.- Permeabilidad de NS en forma libre o encapsulada en NP, NPCS o NPCSHA elaboradas con una concentración de PVA del 1%. (Los símbolos y corchetes identifican grupos estadísticamente homogéneos).

Sin embargo, cuando la NS se incorpora en NP se observa una disminución generalizada de la permeabilidad del fármaco con la excepción de la formulación NPCSlmw, ensayada a la mayor concentración, que no la modifica (figuras 45 a 47).

Para las formulaciones elaboradas con 1% de PVA los valores de los coeficientes para cada formulación son: NP ($Pe=6,5-8,2 \times 10^{-6}$ cm/s), NPCS ($Pe=5,5-7,1 \times 10^{-6}$ cm/s) y NPCSHA ($Pe=4,6-6,0 \times 10^{-6}$ cm/s). Esta disminución no muestra una clara dependencia de la concentración de NP en el compartimento donador ni de la presencia del recubrimiento. Sin embargo, comparando con las NP, el recubrimiento con CS o HA parece reducir, aunque no siempre de forma significativa, la permeabilidad de la NS a través de la membrana.

Sin embargo, las NP elaboradas con una concentración de PVA del 0,25% mostraron el menor coeficiente de permeabilidad (figura 54), detectándose en este caso, que el recubrimiento sí que supone un incremento considerable sobre la permeabilidad de la NS. Como se pudo comprobar en los estudios de liberación inmediata y en los realizados en condiciones *sink*, las NP sin recubrimiento y una concentración de PVA del 0,25% son las que mayor capacidad de retención muestran, lo que concuerda con la considerable reducción observada en los estudios de permeabilidad PAMPA, independientemente de la concentración de partículas en el compartimento donador.

Con respecto al efecto que las NP tienen sobre la permeabilidad de los fármacos encapsulados Nkabinde (Nkabinde y col, 2012) mostró que los nanotrasportadores poliméricos poseen un papel restrictivo sobre la permeabilidad de fármacos como la isoniazida o la rodamina 6G utilizando dos modelos *in vitro* diferentes (PAMPA y células Caco-2).

Por el contrario, Vaculikova (Vaculikova y col, 2016) describe un incremento de 10 veces en la permeabilidad de un fármaco clase III al transformarlo en NP.

Alves (Alves y col, 2007) desarrolló un gel hidrófilo con nanocápsulas de PCL que demostró favorecer la permeabilidad de la NS en el estrato córneo hasta capas de la piel más profundas, presentando un coeficiente de permeabilidad de $9,42 \times 10^{-4}$ cm/h (que equivale a $2,61 \times 10^{-7}$ cm/s), que resultó ser un orden de magnitud menor que el obtenido con NS libre en esta memoria. La razón de esta diferencia está probablemente relacionada con la restricción que la viscosidad del gel ejerce a la difusión y el diferente modelo de membrana.

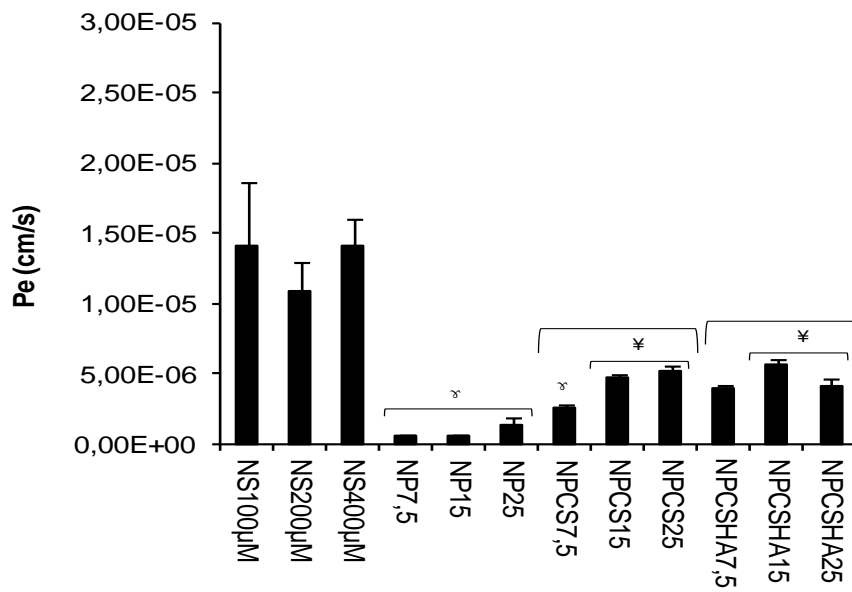


Figura 46.- Permeabilidad de NS en forma libre o encapsulada en NP, NPCS o NPCSHA elaboradas con una concentración de PVA del 0,25%. (Los símbolos y corchetes identifican grupos estadísticamente homogéneos).

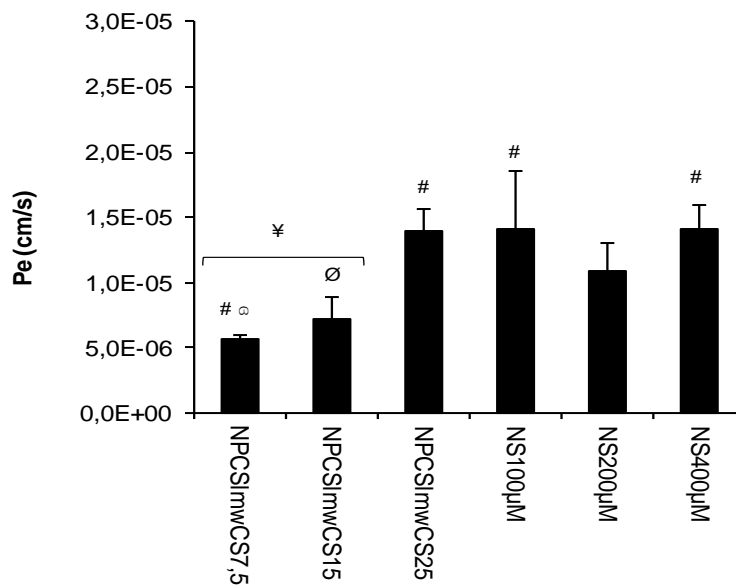


Figura 47.- Permeabilidad de NS en forma libre o unido a NPCSlmw elaboradas con una concentración inicial de PVA del 1%. (Los símbolos y corchetes identifican grupos estadísticamente homogéneos).

En todos los experimentos de permeabilidad se determinaron los balances de masas que validaran los resultados obtenidos. La figura 48 muestra como la NS se encuentra preferentemente en el compartimento donador en las NP mientras que pasa al compartimento receptor con mayor efectividad en la forma libre.

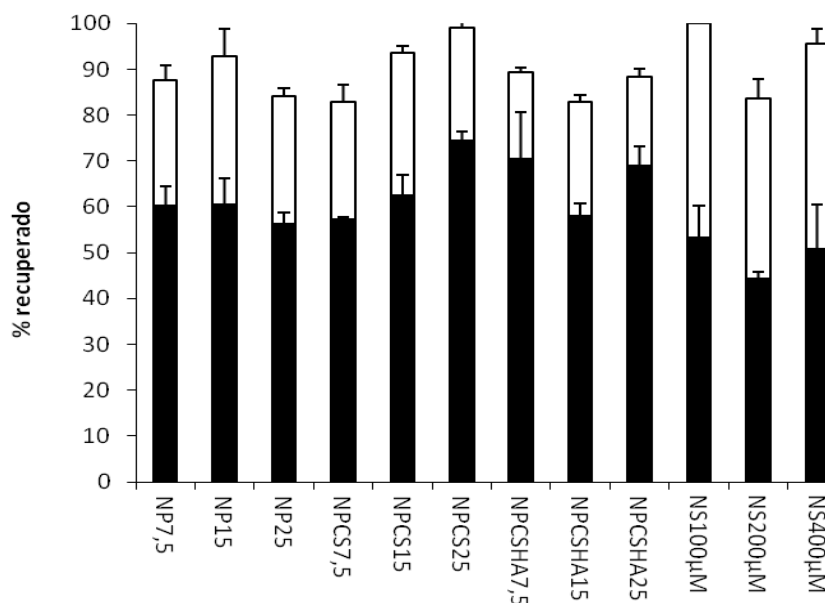


Figura 48.- Balance de masas para NS en el experimento PAMPA realizado con el fármaco en forma libre o unido a NP elaboradas con una concentración de PVA del 1%. (Blanco: Comp. Receptor; Negro: Comp. Donador)

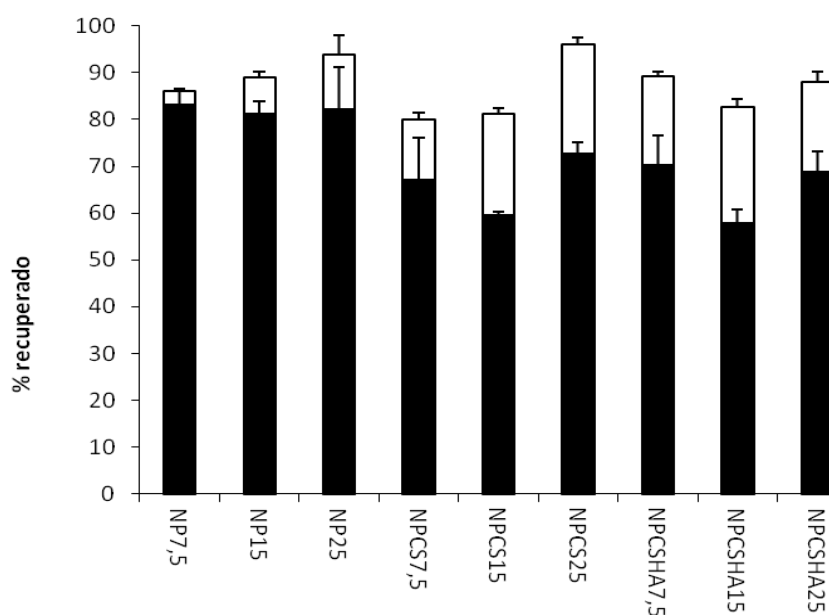


Figura 49.- Balance de masas para NS en el experimento PAMPA realizado con el fármaco en forma libre o unido a NP de PLGA elaboradas con una concentración inicial de PVA del 0,25%. (Blanco: Comp. Receptor; Negro: Comp. Donador)

Cabe destacar que la recuperación de NS supera en todos los casos el 80% de lo añadido inicialmente. Chen (Chen y col, 2008) mejoró el sistema PAMPA (Corning® Gentest™ Precoated PAMPA Plate System) empleado tradicionalmente para evitar, entre otros, los problemas de adhesión de los componentes utilizados en las formulaciones debido fundamentalmente a la afinidad que muestran las NP por el material que forma las paredes de los pocillos y la membrana. Estudiaron cómo algunos compuestos como la amitriptilina, el ketoconazol o la fenazopiridina pueden permanecer unidos al plástico que forma la placa del sistema PAMPA o quedar atrapados dentro de la membrana artificial, y cómo con el nuevo sistema desarrollado por ellos mismos se consigue reducir hasta en un 50% la cantidad de fármaco retenida.

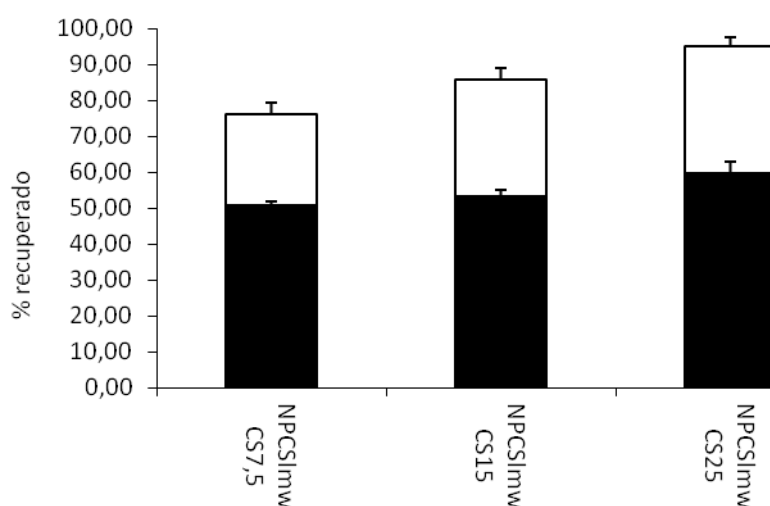


Figura 50.- Balance de masas para NS en el experimento PAMPA realizado con el fármaco encapsulado en NP de PLGA recubiertas con CSImw y elaboradas con una concentración inicial de PVA del 1%. (Blanco: Comp. Receptor; Negro: Comp. Donador)

Para poder establecer una adecuada comparación entre los resultados obtenidos con el fármaco libre y las NP, en la siguiente tabla (tabla 35) se recogen las concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) en el equilibrio para cada formulación, donde se observa que 7,5, 15 y 25 μl de NP elaboradas con una concentración de PVA del 1%, representan concentraciones de NS que se encuentran en el mismo rango que las alcanzadas con NS libre 100,

200 y 400 μ M, respectivamente. Puesto que el porcentaje de NS captada por las NP obtenidas con menor concentración de PVA es mayor, las concentraciones en el equilibrio también lo son y por ello superan ligeramente los valores de referencia con el fármaco en solución.

Tabla 35.- Concentraciones de NS en el equilibrio en el experimento PAMPA (μ g/ml) (cursiva) realizado con NP con 0,25% de PVA, 1 % de PVA y NS libre y % de dilución alcanzado en compartimento donador.

		7,5 μ l		15 μ l		25 μ l	
		Dilución	Conc. Eq.	Dilución	Conc. Eq.	Dilución	Conc. Eq.
1% PVA	NP	95	14,77	90	28,1	83,3	49,89
	NPCS	95	14,41	90	28,05	83,3	38,51
	NPCSI_{mw}	95	13,76	90	27,55	83,3	39,51
	NPCSHA	95	13,38	90	23,16	83,3	39,09
0,25% PVA	NP	95	19,24	90	32,45	83,3	48,49
	NPCS	95	17,42	90	30,11	83,3	45,57
	NPCSHA	95	17,01	90	30,57	83,3	48,8
NS		100		200		400	
		-----	11,76	-----	23,61	-----	40,28

.2. Ensayo de disolución/permeabilidad

Los resultados obtenidos con los estudios de dilución inmediata, cesión y permeabilidad (PAMPA) no permiten establecer un mecanismo claro que caracterice la liberación de la NS desde las NP. Posiblemente, el mecanismo de difusión tenga mucha importancia sobre dicho proceso, pero puede que no sea el único mecanismo implicado. Para complementar la información obtenida con los de dilución inmediata, cesión y permeabilidad (PAMPA) se han diseñado estos estudios de disolución permeabilidad en los que la NS y/o las NP se han incluido en un compartimento donador sin medio de disolución simulando la administración intra-prostática. Tras la inyección, éstas estarán en el espacio intersticial rodeadas de membranas celulares que el fármaco libre puede atravesar por difusión al tratarse de un fármaco clase II. Por ello, en

este estudio se evalúa el comportamiento de difusión de la NS a través de un modelo de membrana similar al PAMPA pero bajo condiciones dinámicas al incorporar un sistema reservorio de recirculación.

Las muestras tomadas del medio de disolución en el compartimento receptor durante la realización de los estudios con el sistema de disolución/permeabilidad fueron analizadas para calcular el porcentaje de NS que pasaba la barrera situada entre las dos celdas que forman el sistema. La figura 51 muestra los resultados de porcentaje de fármaco que permea en función del tiempo para cada formulación en los que cabe destacar que solo cuando se emplea el fármaco disuelto se supera el 60%.

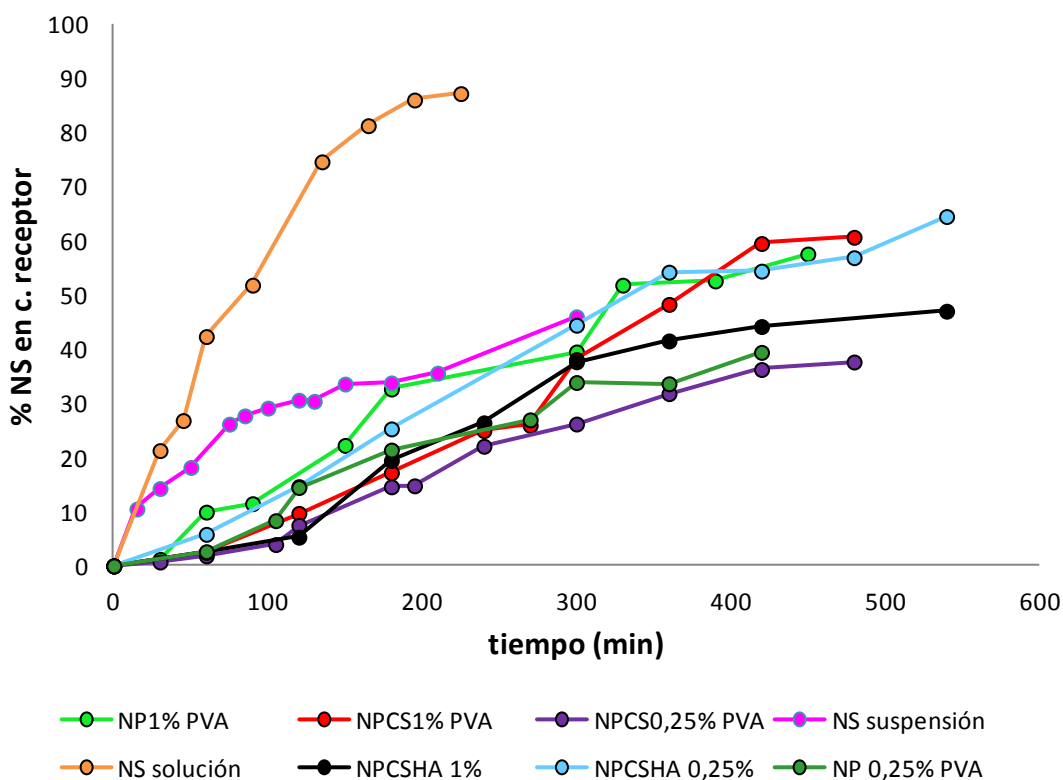


Figura 51.- Resultados obtenidos en el estudio de disolución/permeabilidad con distintas formulaciones de NP.

El ajuste de los datos obtenidos a algunos de los modelos cinéticos más comunes (orden cero, orden uno, Higuchi, Kormeyer-Peppas, Hixon Crowell) y la selección de los que mejor ajuste proporcionaban en cada

caso en base al r^2 más elevado, considerando la posibilidad de un periodo de latencia, se recogen en la tabla 36.

Cuando la NS se añade en forma de disolución se obtiene un mejor ajuste con el modelo de orden 1, algo que cabía esperar si consideramos que el único proceso cinético que tiene lugar es la difusión de la NS disuelta a través de la membrana en condiciones *sink*. Comparativamente, se observa que no existe un periodo de latencia y que es el proceso más rápido con una constante cinética de orden 1 $k_1 = 0,0044 \text{ min}^{-1}$.

Cuando se emplean mayores concentraciones de NS en el compartimento donador, parte de ésta precipita de forma que el perfil de disolución/permeabilidad se modifica. En este caso existen dos procesos cinéticos de disolución de la NS y permeabilidad del fármaco disuelto a través de la membrana. El primero se puede explicar como una cinética de orden 1 considerando la ecuación de Noyes-Whitney con variaciones del área superficial debidas a la disolución de los cristales. El segundo es el proceso previamente caracterizado con el fármaco disuelto, también de orden 1. Sin embargo, el modelo de ajuste óptimo en este caso fue Higuchi o Korsmeyer y Peppas. Este último proporciona un valor $n=0,65$ lo que indica que el proceso global respondería a una cinética de difusión próxima a la fickiana. Las desviaciones observadas de un proceso de difusión puro pueden deberse a la morfología acicular de los cristales de NS y/o a la erosión de estos durante el proceso de disolución.

Cuando se procede al ajuste de las cinéticas obtenidas con las formulaciones de NP se detecta que, globalmente, el modelo que mejor explica los resultados obtenidos es el de Higuchi si bien, en algunos casos la cinética de orden 1 es equiparable a la de Higuchi. Con la finalidad de establecer comparaciones homogéneas entre formulaciones, se ha considerado el modelo de Higuchi (Higuchi, 1963) como modelo de ajuste para las formulaciones de NP a excepción de las NPCCS 1% PVA que se han ajustado mejor con el modelo de Korsmeyer y Peppas. En todos los casos, excepto con NS disuelta o NS en suspensión, los mejores ajustes consideran un periodo de latencia variable entre 30 y 65 min.

Tabla 36.- Modelos, ecuaciones y valores de r^2 obtenidos con los mejores ajustes de las curvas de permeabilidad/disolución.

Formulación	Modelo óptimo	Ecuación	r^2
NS disolución	orden 1	$y = -0,0044 x + 2,03$	0,986
NS suspensión	Higuchi	$y = 2,5902 x + 1,13$	0,978
	Korsmeyer-Peppas	$y = 0,6521 x + 0,12$	0,97
NP 1% PVA	Higuchi	$y = 3,698 x - 20,25$	0,978
NPCS 1% PVA	Korsmeyer-Peppas	$y = 1,5488 x - 2,30$	0,987
	Higuchi	$y = 4,4863 x - 39,24$	0,939
NPCSHA 1% PVA	Higuchi	$y = 3,3327 x - 25,12$	0,95
NP 0,25% PVA	Higuchi	$y = 2,8719 x - 18,88$	0,98
NPCS 0,25% PVA	orden 1	$y = -0,0005 x + 2,02$	0,987
	Higuchi	$y = 2,8125 x - 22,65$	0,986
NPCSHA 0,25% PVA	orden 1	$y = -0,0009 x + 2,01$	0,982
	Higuchi	$y = 3,9252 x - 25,69$	0,983

De los datos obtenidos se deduce que cuando las NP se elaboran con 1% de PVA la incorporación de la cubierta no modifica o incluso incrementa la velocidad de liberación del fármaco. Teniendo en cuenta que los datos cinéticos que describen la permeabilidad de la NS libre a través de la membrana aproximadamente duplican ($7,53 \% / t^{1/2}$) la pendiente obtenida con las NP con 1% de PVA, se puede considerar que las cinéticas obtenidas con éstas responderán a la liberación del fármaco de las NP y constituyen la etapa limitante del proceso de permeabilidad.

Las velocidades de liberación con NP elaboradas con 0,25% de PVA se reducen en un 30% aproximadamente respecto a las anteriores, excepto las que incorporan HA en la cubierta en las que se alcanzan velocidades similares. En estos casos la cinética de orden 1 también proporciona buenos ajustes por lo que la liberación obedece a un mecanismo mixto o transporte anómalo, en el que influyen, en distinta proporción, tanto la difusión según Fick como la relajación/erosión de la matriz polimérica, aunque esta última sería de poca importancia.

Con respecto a las NPCS 1% PVA el ajuste de Korsmeyer y Peppas (Korsmeyer y col, 1983) con un exponente $n=1,5$ se denomina “transporte de Supercaso II” y aparece cuando el tiempo de liberación es demasiado

largo (Viseras, 2008). Ello sugiere un proceso de liberación complejo en el que además de la difusión observada en los demás sistemas de NP podría existir una contribución de otros mecanismos de erosión y/o hinchamiento asociados a la exposición de la cubierta de CS. Frisch (Frisch y col, 1969) propuso que la cinética de liberación en estos casos era resultado de la contribución simultánea de la difusión y la disolución, por lo que ni la cinética de primer orden, ni la ecuación de Higuchi, proporcionan un ajuste adecuado del perfil de disolución.

✓ **Eficacia terapéutica *in vitro***

.1. Cultivos celulares

En el presente trabajo se evaluó la citotoxicidad *in vitro* de las distintas formulaciones de NP desarrolladas sobre 2 líneas celulares de cáncer de próstata (PC3 y DU145) y se comparó con el de la NS libre y las NP sin fármaco.

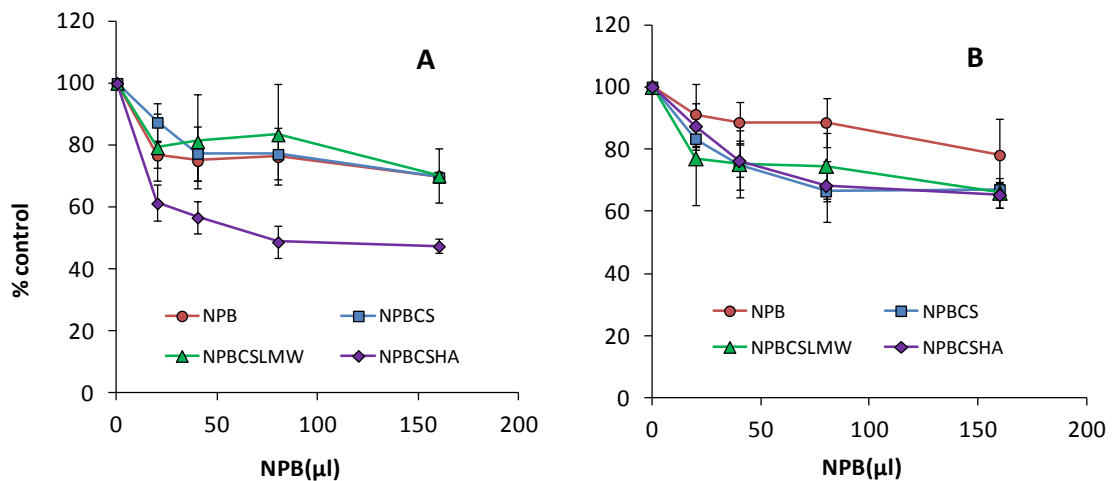


Figura 52.- Viabilidad celular de células DU145 (A) y células PC3 (B) a las 48 h en presencia de NPB con una concentración de PVA del 0,25% (n≥3) (media ± de).

En la figura 52, se representan los resultados obtenidos para incubaciones de 48 horas realizadas con las 2 líneas celulares estudiadas con NP sin fármaco elaboradas con una concentración del 0,25% de PVA.

En la figura 53 se muestran los resultados obtenidos al realizar el mismo estudio con las NPB elaboradas con mayor porcentaje de PVA.

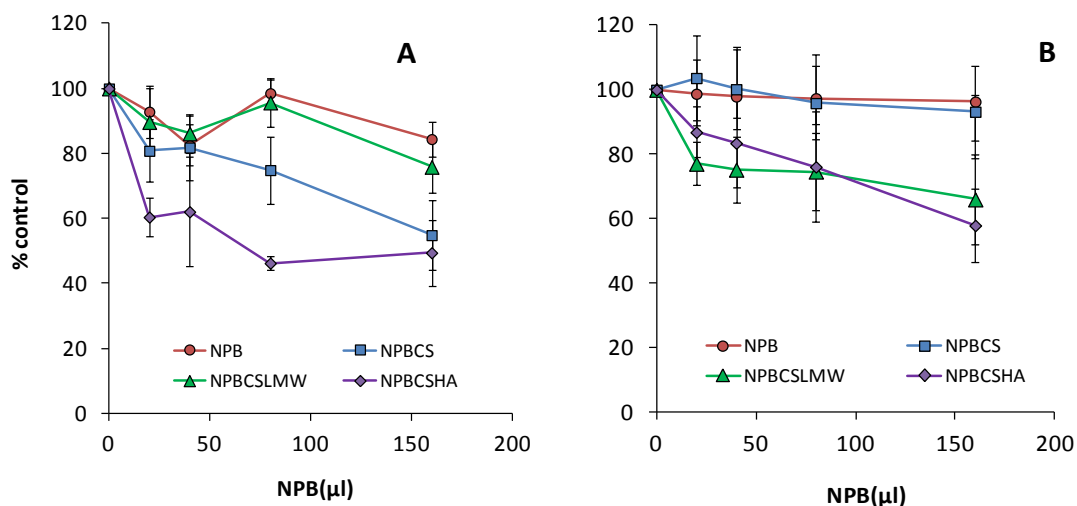


Figura 53.- Viabilidad celular sobre células DU145 (A) y células PC3 (B) a las 48 h en presencia de NPB con una concentración de PVA del 1% (n≥6) (media ± de).

En ambos casos se observa que las NP sin NS muestran un efecto citotóxico sobre las dos líneas celulares. Éste es dependiente de la concentración de partículas y de su composición, siendo también evidentes algunas diferencias entre ambas líneas celulares. En células DU 145 presentaron un mayor efecto citotóxico las NPBCSHA, que redujeron el porcentaje de células vivas hasta un 50% aproximadamente, de forma independiente a la concentración de PVA empleado en su elaboración. En esta línea celular también es destacable una menor viabilidad celular cuando la concentración de NPBCS obtenidas con 1% PVA supera 700 μg/ml. En células PC3 el efecto citotóxico observado es menor aunque la viabilidad se reduce hasta el 70% cuando las NP presentaban cubierta de CS y/o HA.

En la figura 54, se representan los resultados obtenidos para incubaciones con NP cargadas con NS elaboradas con una concentración del 0,25% de PVA y en la 55 los obtenidos para las NP con mayor porcentaje de PVA. En todos los casos se muestran como referencia los

porcentajes de inhibición de la proliferación celular obtenidos con el fármaco en solución. Para facilitar las comparaciones, los volúmenes de NP adicionados se han reflejado en las figuras como las concentraciones de NS equivalentes. Además, con el propósito de facilitar la discusión la tabla 37 muestra las equivalencias numéricas entre los volúmenes de NP adicionados al medio de cultivo, las concentraciones totales de NS y NP que éstos representan, las diluciones alcanzadas en cada caso y las concentraciones aproximadas de fármaco libre que se alcanzarían según los resultados obtenidos en los estudios de liberación inmediata.

Tabla 37.- Concentraciones de NS (μM) y NP ($\mu\text{g}/\text{ml}$) en el medio de cultivo, % de dilución alcanzado y concentraciones de NS libre obtenidas con NP 1% PVA.

Vol. NP	Conc. NS	Dilución	Conc. NS libre extrapoladas	Conc. NP
μl	μM	%	μM	$\mu\text{g}/\text{ml}$
10	27,04	98	9,73	99
20	54,07	96	17,30	196
40	108,15	92	24,87	385
80	216,30	84	49,75	741
160	432,60	68	77,87	1379

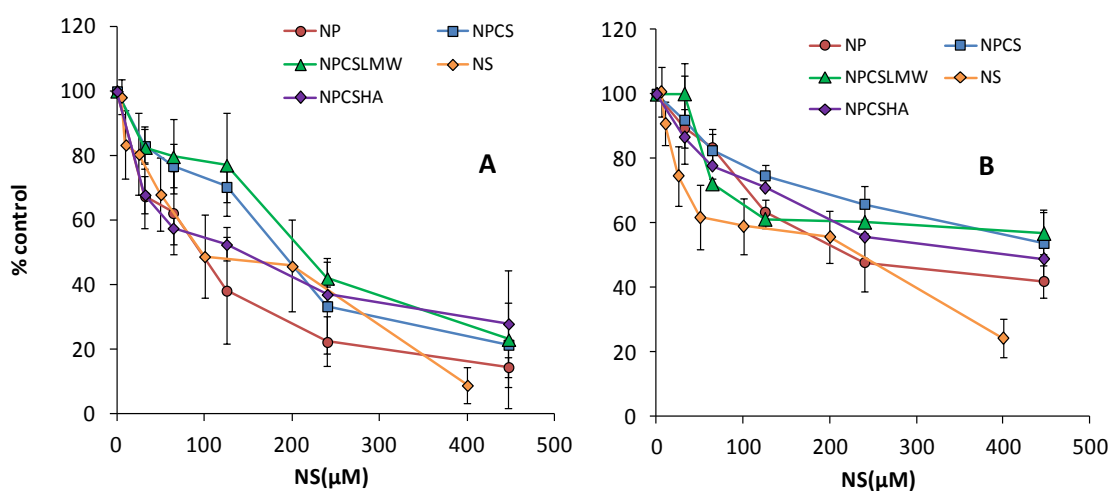


Figura 54.- Viabilidad celular sobre células DU145 (A) células PC3 (B) a las 48 h en presencia de NS libre o NP con una concentración inicial de PVA del 0,25% ($n \geq 3$) (media \pm de).

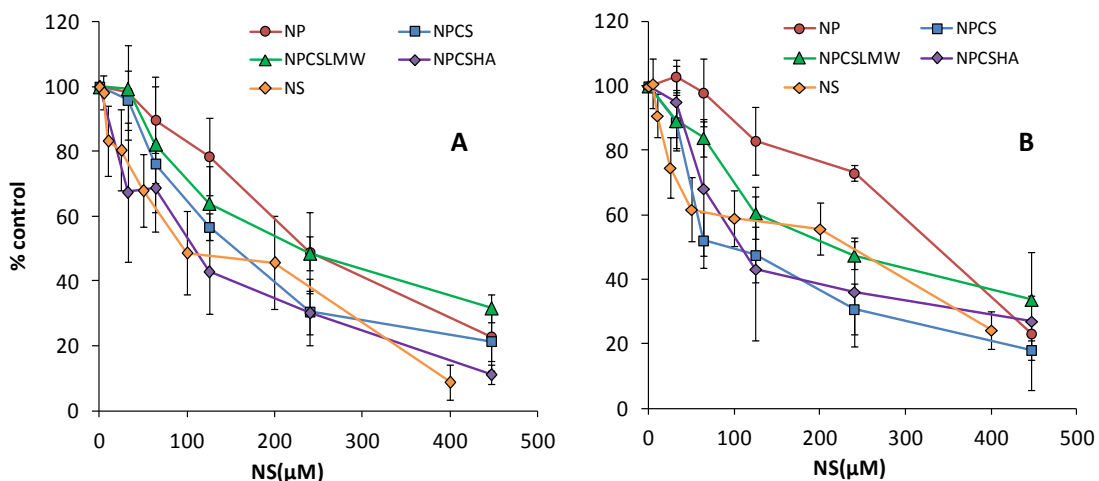


Figura 55.- Viabilidad celular sobre células DU145 (A) y células PC3 (B) a las 48 h en presencia de NS libre o NP con una concentración inicial de PVA del 1% ($n \geq 5$) (media \pm de).

Las comparaciones entre formulaciones se han llevado a cabo con el parámetro IC_{50} . Los valores obtenidos para NS libre han sido $139,47 \mu M$ y $90,66 \mu M$ para los cultivos realizados con células PC3 y DU145, respectivamente. Al analizar los valores de IC_{50} obtenidos para las formulaciones de NP (tabla 38), puede verse que el efecto citotóxico de la NS sobre las células DU145 es del mismo orden de magnitud que el del fármaco libre cuando se incorpora en NPCSHA y ligeramente inferior en NPCS. Las NP que menor efecto citotóxico producen son las recubiertas con CSLmw o las que no tienen recubrimiento con 1% de PVA. Por el contrario, estas últimas pero elaboradas con 0,25% de PVA aumentan la citotoxicidad de NS en un 20% aproximadamente.

Con respecto a las células PC3, la mayor parte de las formulaciones muestran una reducción en el potencial citotóxico de la NS llegando incluso a cuadruplicar el valor IC_{50} de la NS libre, en especial aquellas elaboradas con 0,25% de PVA. Solamente las NPCS con 1% PVA disminuyen de forma clara este valor ($84,31 \mu M$).

Comparando los resultados obtenidos en ambas líneas celulares se observa que las DU145 son más sensibles al efecto de la NS.

Tabla 38.- Valores de IC₅₀ (μM) obtenidos en los cultivos celulares para las distintas formulaciones de NPNS estudiadas.

Células	%PVA	NP	NPCS	NPCSI _{mw}	NPCSHA
PC3	1	288,3	84,31	176,69	129,42
	0,25	275,63	609,22	437,86	388,3
DU145	1	204,71	116,54	178,76	85,02
	0,25	65,71	125,8	173,52	97,99

El hecho de recubrir con CS las NP elaboradas con un 1% de PVA reduce en todos los casos la IC₅₀ obtenida con respecto a las NP sin recubrimiento. Este hecho podría explicarse gracias a la capacidad que poseen las células cancerosas para capturar con mayor eficacia las NP cargadas positivamente mediante la interacción con las proteínas de carga negativa presentes en la membrana celular (Park y col, 2010; Kim y col, 2008). A continuación, las NP quedarían incluidas en el interior de vesículas revestidas por una proteína llamada clatrina y entrarían en el citoplasma hasta fusionarse con orgánulos celulares como los lisosomas donde comenzarán a liberar el fármaco retenido en su interior. Huang (Huang y col, 2004) demostró que la cinética que gobierna este proceso resultó ser saturable y que el hecho de utilizar un CS con menor peso molecular y grado de desacetilación influía negativamente sobre el proceso de captación de las NP. Además, los resultados obtenidos en los estudios de liberación inmediata mostraron que la capa externa de CS facilita la liberación de la NS encapsulada. Por ello, el incremento conseguido en el efecto citotóxico observado con NPCS podría deberse a una combinación de ambos efectos.

El tamaño de las NP tiene una gran importancia sobre el mecanismo de entrada en las células. De hecho, se ha sugerido que la captación mediada por clatrina está limitada para partículas próximas a los 200 nm, por lo que las que presenten un tamaño más próximo a los 500 nm, como las NPCS elaboradas con una concentración de PVA de 0,25%, necesitarán una vía alternativa para ser internalizadas (Rejman y col, 2004). Al igual que ocurría en la endocitosis mediada por clatrina, en la mediada por caveolina se forman vesículas que incorporan en su interior las NP. La diferencia entre ambos procesos es que esta vía es mucho más lenta

aunque es cierto que mejora la eficacia terapéutica de las NP al conseguir que lleguen directamente al núcleo o al retículo endoplasmático evitando orgánulos de degradación como los lisosomas (Kou y col, 2013). Estos argumentos indican que el efecto citotóxico de las NPCS con menor porcentaje de PVA residual podría aumentar considerablemente si prolongamos el estudio realizado obteniendo valores de IC_{50} menores que los presentados para las NP elaboradas con mayor porcentaje de PVA.

En el caso de las NPCSHA, la presencia del HA que recubre las partículas persigue una interacción con los receptores celulares CD44, y por tanto una internalización selectiva de las NP mediada por receptores. En las figuras 52 y 53 se muestra como las NPBCSHA presentan un efecto citotóxico propio, que puede atribuirse a su internalización. Patrawala (Patrawala y col, 2006) estudió la presencia de los receptores CD44 en células de cáncer de próstata PC3, DU145 y LNCaP siendo indetectables en las últimas, apareciendo en el 100% de las células PC3 y en menor medida, en las DU145. Huang (Huang y col, 2016) comprobó que las NP de HA que habían desarrollado, se unían de manera específica a los receptores CD44 de las células PC3 consiguiendo una reducción significativa de la inflamación del tejido tumoral y una disminución en la actividad tumoral de dichas células.

La figura 56 muestra el efecto citotóxico que se obtiene al añadir de forma conjunta a cada pocillo 80 o 160 μ l de las distintas formulaciones de NPB y NS libre a una concentración de 200 o 400 μ M. Se confirmó la mayor sensibilidad de las células DU-145 al tratamiento con NS. Los porcentajes obtenidos con las NP sin recubrimiento son muy similares a los correspondientes a NS libre y muestran un efecto citotóxico superior al de las NP cargadas con NS. Los datos más significativos que se muestran en la figura 56 se encontraron al combinar las NPBCSHA con el fármaco libre, ya que se obtuvo una reducción del efecto citotóxico de la NS de entre un 20 y un 40% con respecto al encontrado en los estudios realizados con las NPCSHA cargadas con NS. Esto confirma el hecho de que la cubierta de HA favorece la entrada en las células del transportador polimérico con la NS en su interior. Sin embargo, cuando la NS libre entra en contacto con las NP ya formadas podría adsorberse en su superficie

limitando la difusión del fármaco libre al interior celular y también la internalización de las NP al modificar su superficie evitando así una interacción eficaz con los receptores CD44.

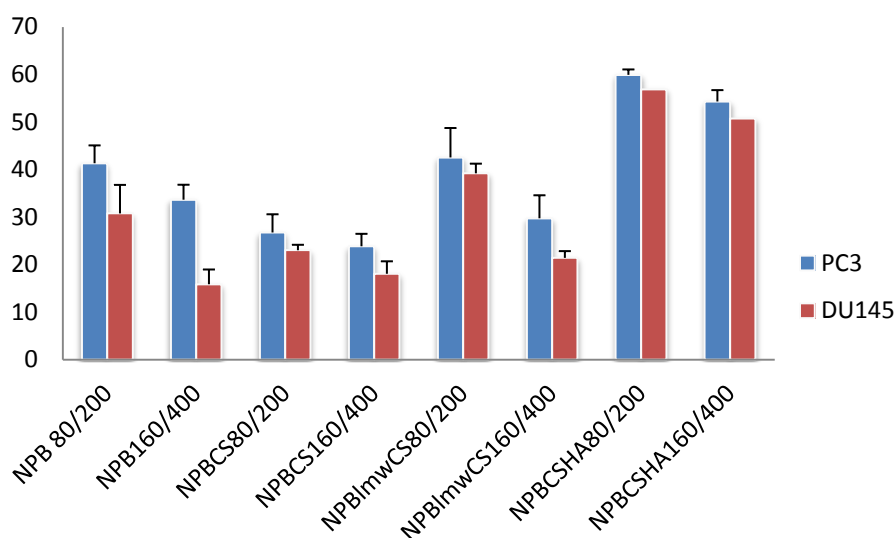


Figura 56.- Porcentaje de viabilidad celular obtenido con mezclas físicas de NS y NPB elaboradas con un 1% de PVA en las células PC-3 y DU-145 después de 48 horas de incubación ($n \geq 6$) (media \pm de).

Bondi (Bondi y col, 2008) encontró un comportamiento similar al estudiar el efecto que tenían las NP sólidas lipídicas cargadas con NS sobre células HT29 y SW480 en un intervalo de concentración de 0-200 μ M. A pesar de que las incubaciones celulares se prolongaron durante 72 h y la liberación del fármaco encapsulado fue del 100%, sus resultados mostraron que la actividad de la NS encapsulada no era estadísticamente diferente o incluso llegaba a ser menor que la que presentaba el fármaco libre. Sin embargo, Mukerjee (Mukerjee y col, 2009) investigó el potencial terapéutico de la curcumina encapsulada en NP de PLGA sobre las mismas líneas celulares de cáncer de próstata empleadas en este trabajo (DU145 y PC3), y demostraron que las formulaciones de liberación sostenida tenían un valor de IC_{50} menor al de la curcumina libre en todas las líneas celulares estudiadas. Al realizar el mismo estudio con NP no cargadas, no se obtuvo efecto citotóxico alguno, si bien es cierto que los volúmenes empleados fueron considerablemente menores que los probados en los estudios de viabilidad celular que se presentan en este trabajo.

La discusión y comparación de los resultados obtenidos en cultivos celulares se ha desarrollado considerando las concentraciones de NS totales en el medio de cultivo. No obstante, los resultados de los estudios de liberación inmediata y los de permeabilidad/disolución han mostrado distinta capacidad de retención del fármaco en función de la dilución de cada formulación y de su composición. Por tanto, cabe especular con el hecho de que, tras añadir las NP al medio de cultivo, la concentración de NS libre no será la total y así, el efecto citotóxico obtenido correspondería al de los nanotransportadores sin fármaco más el que hubiera producido el fármaco liberado en cada circunstancia. Ello implica que los valores de IC_{50} calculados en cada caso serían mucho menores a los estimados en la tabla 38. Por otra parte, y teniendo en cuenta que una parte del fármaco continúa encapsulado en condiciones *non-sink*, podemos suponer que la liberación de la NS tras la administración *in vivo* de las formulaciones de NP tendría lugar de forma más progresiva y prolongada en el tiempo con respecto al fármaco libre.

Finalmente, es conveniente comentar que la situación en el medio de cultivo es mucho más compleja que una simple dilución en un medio acuoso del mismo pH debido a la presencia de células y suero fetal bovino, que muy probablemente tienen capacidad para fijar fármaco y desplazar los equilibrios en el sentido de una mayor cesión de NS al medio.

.2. Estudios cualitativos de captación celular *in vitro*

Los resultados obtenidos en los cultivos celulares han demostrado que las NP interactúan con las células dando lugar a un efecto citotóxico *per se* e incrementando el efecto citotóxico de la NS sobre ellas. Con objeto de explicar con más detalle el mecanismo que sigue dicho proceso se ha recurrido a la microscopía confocal. Para ello es necesario marcar las NP con algún compuesto fluorescente, que sirva como trazador del destino de las NP, como por ejemplo, la cumarina (CUM).

✓ Método analítico para la determinación de CUM

Para poder realizar una correcta caracterización de las NP cargadas con CUM es necesario seleccionar un método analítico que permita cuantificar el compuesto fluorescente. Para ello se obtuvieron dos rectas de calibrado, una mediante espectrofotometría UV-Visible a 461,5 nm (figura 57) en el intervalo de concentración 1 a 5 $\mu\text{g/ml}$ y otra mediante espectrofotometría por fluorescencia con $\lambda_{\text{emisión}}$: 504 nm y $\lambda_{\text{excitación}}$: 460 nm (figura 58) en el intervalo 5-25 ng/ml.

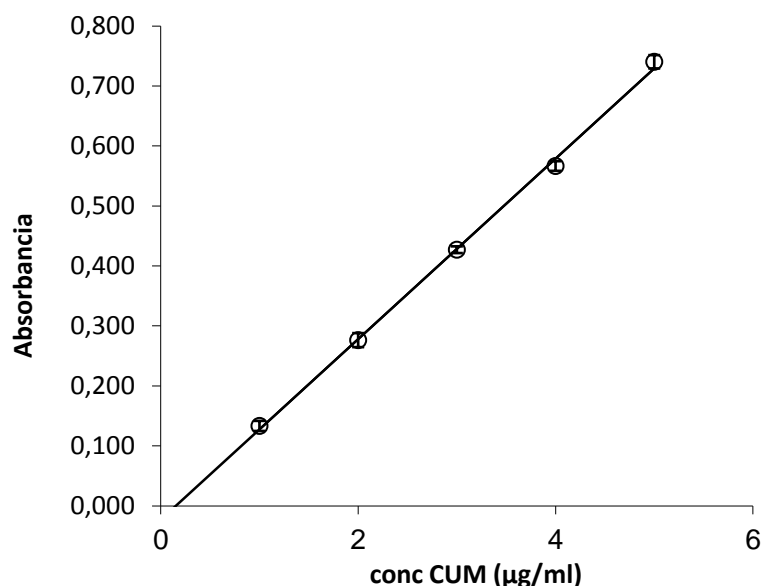


Figura 57.- Recta de calibrado CUM por espectrofotometría UV-Visible en agua: diclorometano: acetonitrilo(1:1:8) (461,5 nm).

Ambos métodos son válidos para realizar una correcta caracterización de las distintas formulaciones de NP cargadas con CUM, pero la decisión de utilizar uno u otro vendrá dada por las concentraciones con las que se trabaje en cada estudio, es decir, la recta obtenida en la calibración realizada mediante espectrofotometría UV-Visible se utilizará para concentraciones de CUM mayores, y la recta obtenida por espectrofotometría por fluorescencia, para las más bajas.

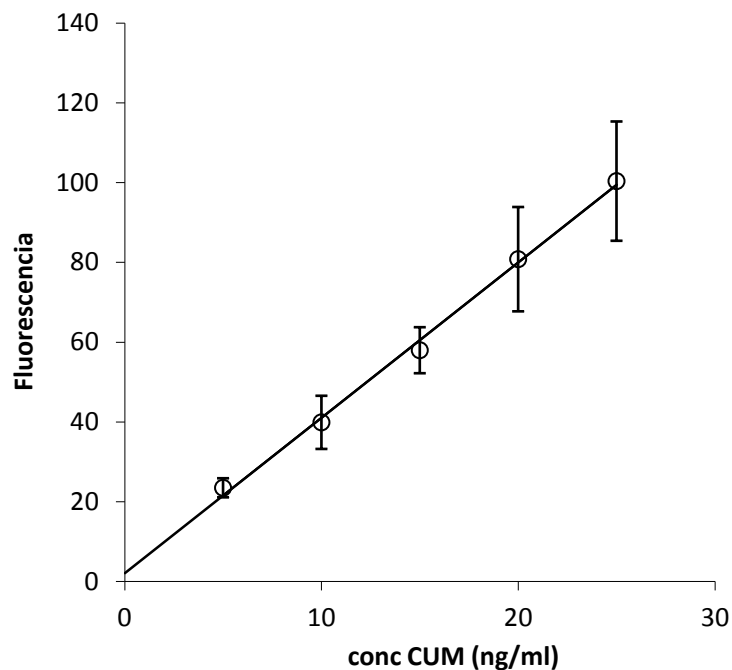


Figura 58.- Recta de calibrado CUM por espectrofluorimetría en agua: diclorometano:acetonitrilo (1:1:8) (emisión: 504 nm, excitación: 460 nm).

En este caso la validación de los dos métodos analíticos utilizados se ha realizado analizando la linealidad para poder determinar de forma cuantitativa la presencia del compuesto fluorescente en las NP a pesar de las diluciones utilizadas. Las tablas 39 y 40 muestran los resultados estadísticos del estudio. Los valores obtenidos de R^2 indican que con ambos métodos se pueden obtener resultados de absorbancia o fluorescencia fiables.

Tabla 39.- Resultados estadísticos del estudio de linealidad de la espectrofotometría realizada a 230 nm con CUM.

Regresión Simple – Absorbancia vs. Concentración

Variable dependiente: Col_3

Variable independiente: Col_4

Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Coefficientes

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	-0,022625	0,00620401	-3,64684	0,0018
Pendiente	0,030085	0,000374116	80,4163	0,0000

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	0,905107	1	0,905107	6466,78	0,0000
Residuo	0,00251932	18	0,000139962		
Total (Corr.)	0,907627	19			

Coefficiente de Correlación = 0,998611

R-cuadrada = 99,7224 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99,707 por ciento

Error estándar del est. = 0,0118306

Error absoluto medio = 0,008615

Tabla 40.- Resultados estadísticos del estudio de linealidad de la espectrofluorimetría (emisión: 504 nm, excitación: 460 nm).

Regresión Simple - Fluorescencia vs. Concentración (B)

Variable dependiente: Col_1

Variable independiente: Col_2

Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Coefficientes

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	2,25924	4,39777	0,513724	0,6128
Pendiente	3,88417	0,264153	14,7042	0,0000

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	18104,1	1	18104,1	216,21	0,0000
Residuo	1758,38	21	83,7323		
Total (Corr.)	19862,5	22			

Coefficiente de Correlación = 0,954711

R-cuadrada = 91,1472 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 90,7257 por ciento

Error estándar del est. = 9,15054

Error absoluto medio = 6,64551

✓ Eficacia de encapsulación

El grado de encapsulación de la CUM en las NP (%) se calculó utilizando el método espectrofotométrico (UV-Visible) para valorar las cantidades de fármaco presentes en las suspensiones de NP y las presentes en los sobrenadantes. Los métodos y ecuaciones para obtener los distintos valores de concentración fueron los mismos que los utilizados para valorar la captación de NS por las NP (Apartado III, Sección 2.3.5).

Tabla 41.- Porcentajes de captación y recuperación (datos medios y d.e.) correspondientes a las formulaciones de CUM elaboradas con un 0,25% de PVA.

	Captación 1 %		Captación 2 %		Recuperación %	
	media	de	media	de	media	de
NPCUM	87,42	2,95	90,10	0,84	102,67	12,79
NPCSCUM	78,29	7,93	91,04	1,83	102,66	9,53
NPCSHACUM	74,95	2,01	91,16	0,21	104,25	3,34

Como puede verse en la tabla 41, el porcentaje de captación es en todos los casos superior al 74% y el proceso de resuspensión de las muestras mediante ultrasonidos solo supone la pérdida de entre un 9 y un 10% de la CUM captada por las NP. El porcentaje de recuperación de la CUM fue del 100% para todas las formulaciones estudiadas. De esta forma se comprueba que las NP son capaces de captar el compuesto fluorescente que servirá para su identificación en los estudios realizados con el microscopio confocal. Se asume un rendimiento del proceso similar al obtenido con las NPNS, al no modificar los métodos de elaboración ni las cantidades de polímero ni polisacáridos de recubrimiento utilizadas.

✓ Tamaño de partícula

Las tres formulaciones estudiadas mostraron distribuciones similares, correspondientes a poblaciones monodispersas de tamaños de partícula.

Tabla 42.- Tamaños de NP 0,25% PVA (nm) cargadas con CUM (datos medios y d.e.).

	NPCUM		NPCSCUM		NPCSHACUM	
	media	de	media	de	media	de
mv	378,5	19,7	408,5	21	457,7	51,4
de	130,8	24,3	133,4	22,5	166,5	29,3
10%	230,1	5,4	238,8	8,1	239,5	2
50%	317,3	52,9	359,4	2,8	390,6	6
90%	521,3	143,4	599,5	21,4	731	132
Span	0,96	0,54	1,0	0,09	1,25	0,32

Las distribuciones de tamaños de partícula de las distintas formulaciones de NP elaboradas con CUM coinciden en más de un 97% con las obtenidas para las NP cargadas con NS. Esto indica que los hallazgos asociados al empleo de estas formulaciones serán extrapolables y permitirán explicar las interacciones entre las células y las NP cargadas con NS.

✓ Estudios de liberación en función del tiempo

Para la realización del estudio de cesión de CUM a lo largo del tiempo (24 y 48 horas) en condiciones *sink*, fue necesario utilizar la espectrofotometría por fluorescencia como método analítico por tratarse de concentraciones considerablemente inferiores a las analizadas en el estudio de captación.

Tabla 43.- Porcentajes de CUM liberada después de 24 y 48 horas a 37° C en condiciones *sink* con NP 0,25% PVA.

	Media 24H	D.E. 24H	Media 48H	D.E. 48H
NPCUM	6,7	1,575	8,2	1,628
NPCSCUM	9,5	3,643	9,8	1,529
NPCSHACUM	9,8	3,393	9,1	4,457

El porcentaje de CUM liberado después de 48 horas es, en todos los casos, inferior al 10% del total, lo que asegura que la señal fluorescente que se observa en los estudios realizados con el microscopio confocal

procederá de las NP. Win y Feng (Wing y Feng, 2005) elaboraron NP de PLGA cargadas con 6-cumarina con las que comprobaron cómo, al realizar el estudio de liberación con PBS pH 7,4 a 37°C con agitación durante 24 horas, se obtuvo una cantidad máxima liberada de CUM del 3,75% con respecto a la cantidad captada por las partículas. Además, para descartar la posibilidad de que ese pequeño porcentaje de CUM liberada al medio sea captado por las células causando un incremento en la señal de fluorescencia emitida, estos mismos autores comprobaron que la CUM libre no puede ser internalizada directamente por las células (Caco-2).

✓ Microscopía confocal

Para estudiar de manera cualitativa la captación de las NP por las células PC3 o DU145 se observaron con el microscopio confocal los cultivos realizados con ambas líneas celulares y NP marcadas con CUM.

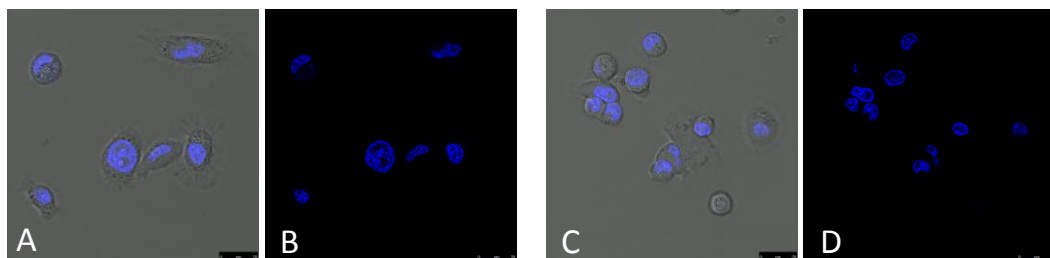


Figura 59.- Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal (A, C: overlay) (B, D: Hoechst). Cultivos utilizados como control de células PC3 (A, B) y DU145 (C, D).

En la figura 59 (B, D) se observan las células PC3 y DU145 marcadas con el colorante Hoechst, el cual se excita a 350 nm de luz ultravioleta produciendo una fluorescencia azul cuando se encuentra unido al ADN. Esta tinción permite diferenciar los núcleos de las células. En las otras dos imágenes (A, C) se pueden apreciar también los citoplasmas de las dos líneas celulares estudiadas gracias a la superposición de las imágenes en blanco y negro y las obtenidas con el láser azul de emisión a 405 nm que se utiliza para poder observar la tinción de los núcleos con el agente

intercalante del ADN. En las imágenes obtenidas con el laser verde de emisión a 488 nm no se observó ningún compuesto que pudiera interferir con las NP cargadas con CUM.

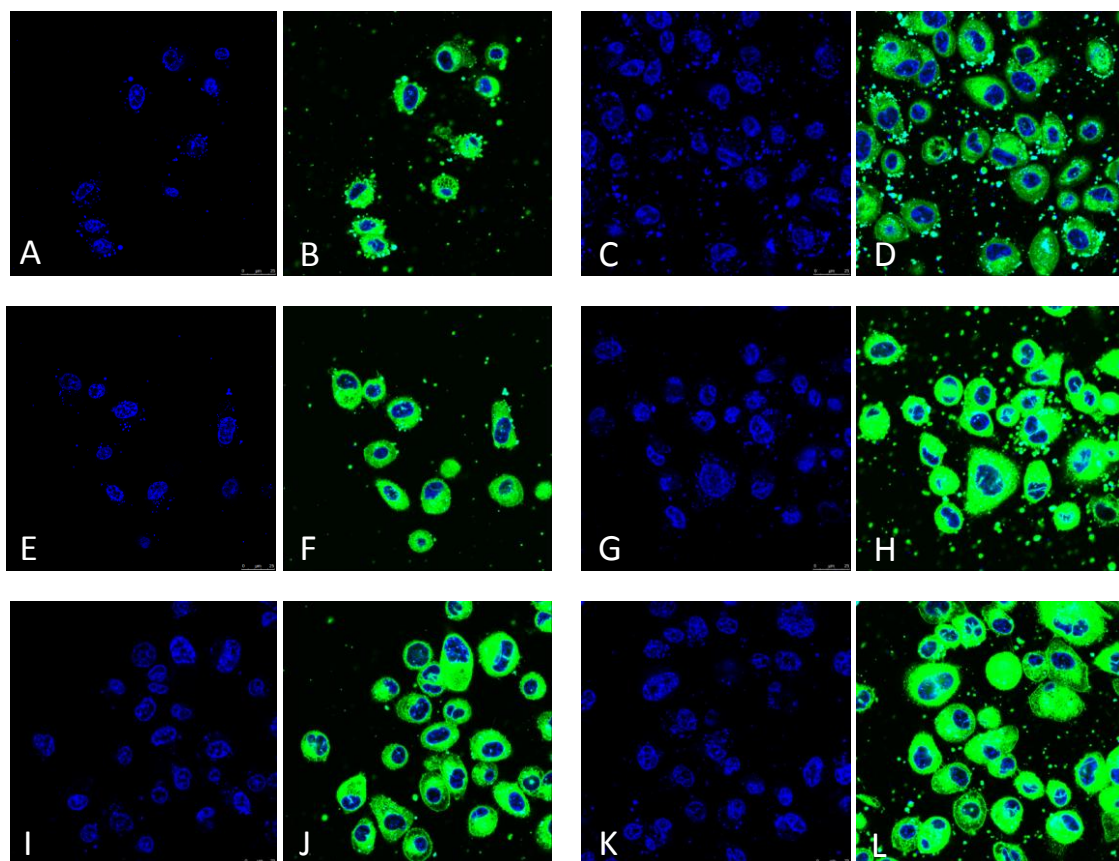


Figura 60.- Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de cultivos de células PC3 con 40 (A, B, E, F, I, J) y 80 μ l (C, D, G, H, K, L) de NPCSHACUM elaboradas con 0,25% de PVA durante 2 h (A-D), 4 h (E-H) y 48 h (I-L).

Se estudió la adición de 40 y 80 μ l de NPCSHACUM elaboradas con una concentración de PVA del 0,25% a cultivos de células PC3 y DU145. El volumen de los pocillos de las placas utilizadas en el microscopio confocal duplicó el utilizado en las empleadas para realizar el ensayo MTT con cultivos celulares, por lo que las concentraciones de NP utilizadas para observar los cultivos en el microscopio confocal se corresponden con las investigadas con 20 y 40 μ l en el estudio de viabilidad celular.

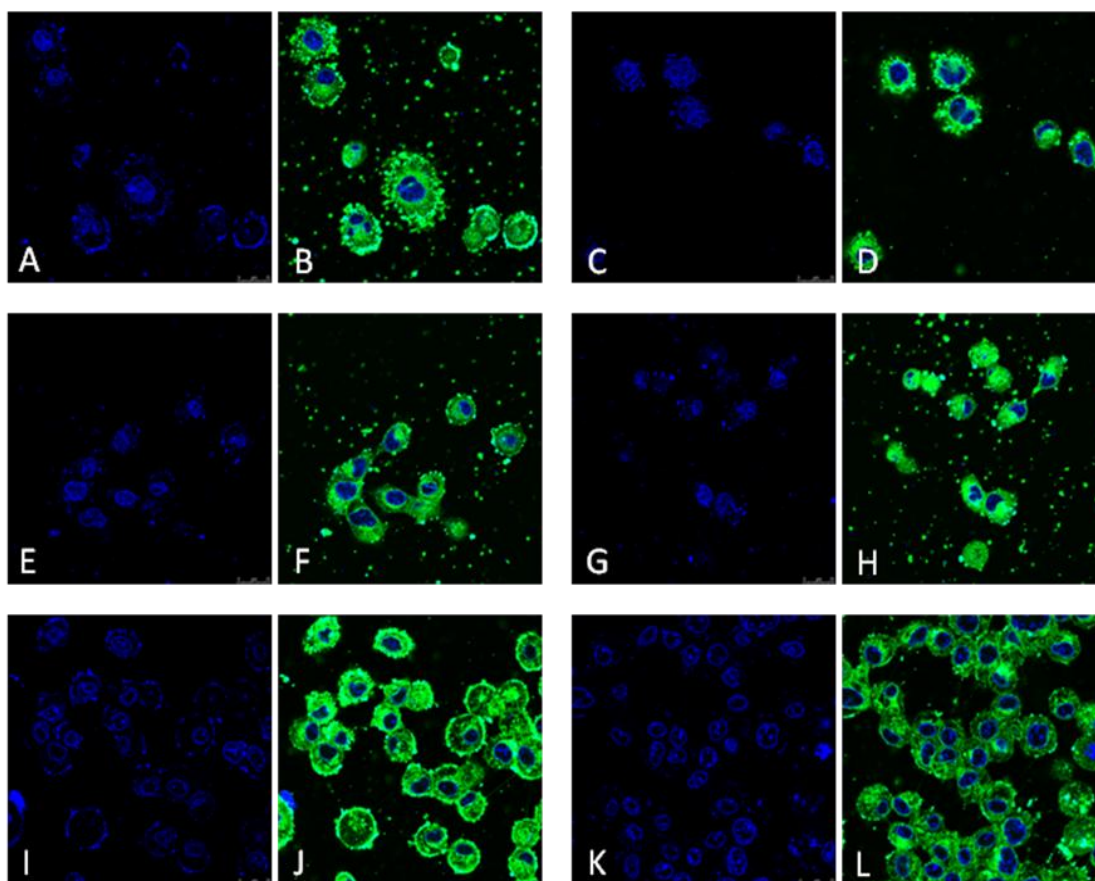


Figura 61.- Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal en cultivos de células DU145 con 40 (A, B, E, F, I, J) y 80 µl (C, D, G, H, K, L) de NPCSHACUM elaboradas con 0,25% de PVA durante 2 h (A-D), 4 h (E-H) y 48 h (I-L).

Ni en el caso de las PC3 ni en el de las DU145 se observaron diferencias en las imágenes entre los dos volúmenes de NP estudiados. Por otro lado, sí se observaron diferencias en la captación de los nanotransportadores en cada línea celular, siendo esta mayor en el caso de las PC3 que en el de las DU145. A pesar de todo, y como ya se comprobó al calcular la IC_{50} de la NS libre, las DU145 presentan una mayor sensibilidad al compuesto que las PC3, por lo que un descenso en la captación de las NP no implica una reducción directa en el efecto citotóxico de las mismas. Estudios recientes publicados por Korang-Yeboah (Korang-Yeboah y col, 2015) confirmó que la captación de NP de policaprolactona y maltodextrina por líneas celulares de cáncer de próstata se incrementaba de manera proporcional a la agresividad y tumorigénesis que presentasen dichas células, de forma que las PC3

fueron las que mostraron una mayor internalización, seguidas de las DU145 y las LNCaP. Si además se tiene en cuenta el hecho de que las PC3 son la línea celular que más receptores CD44 expresa en su superficie (Patrawala y col, 2006), se puede explicar fácilmente el hecho de que sean éstas las que presenten mayor porcentaje de captación para las NPCSHACUM.

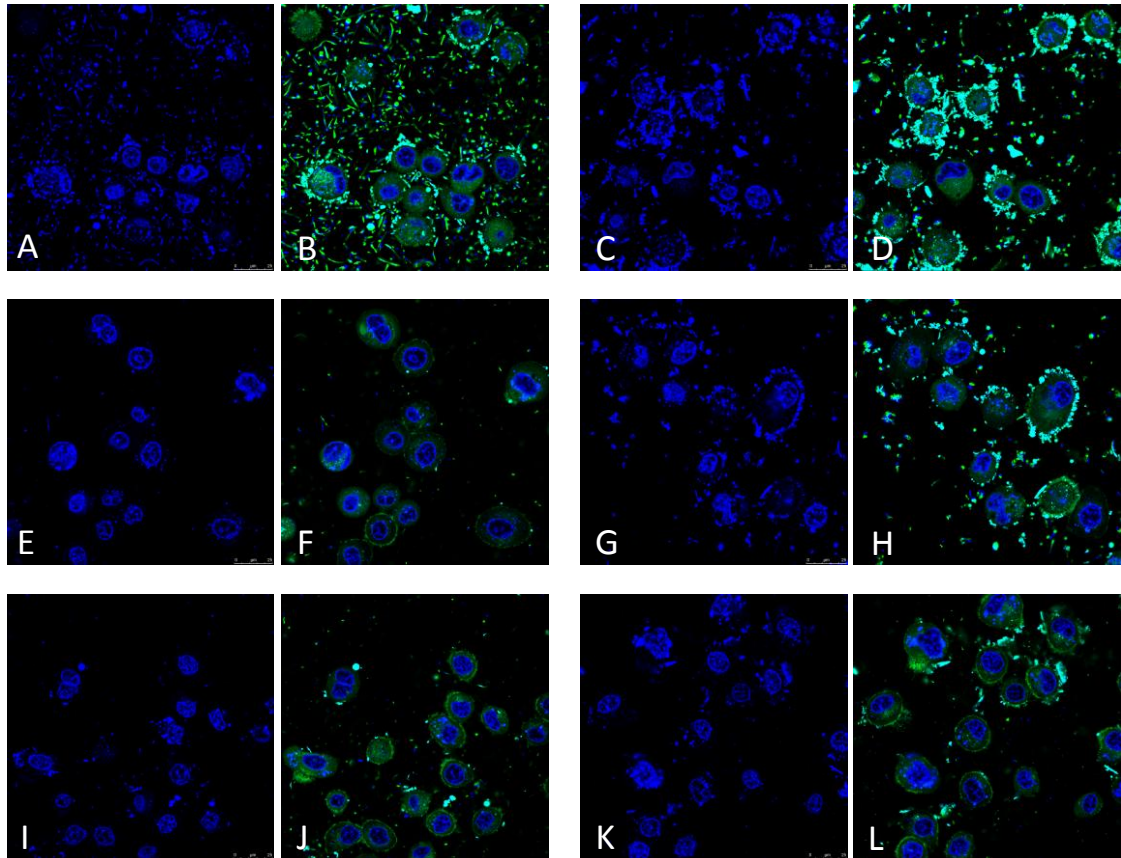


Figura 62.- Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal en cultivos de células PC3 con 80 μ l de NPCUM 0,25% PVA (A, B, E, F, I, J) y 80 μ l de NPCSCUM 0,25% PVA (C, D, G, H, K, L) durante 2 h (A-D), 4 h (E-H) y 48 h (I-L).

Al no obtener diferencias entre los dos volúmenes de NP estudiados con las NPCSHACUM, se decidió repetir el ensayo con las formulaciones de NPCUM y NPCSCUM únicamente con el mayor de los volúmenes empleados, 80 μ l. Como ya se explicó en el estudio de viabilidad celular, las NPCSCUM de mayor tamaño obtenidas con una menor concentración de PVA, se internalizan en las células mediante un proceso de endocitosis mediado

por la proteína caveolina, el cual resultó ser un proceso más lento que el mediado con clatrina. Es por esto que, incluso después de 48 horas, podemos ver NPCSCUM adheridas a la superficie celular. Al comparar estas imágenes con las obtenidas al realizar el tratamiento con NPCUM puede verse como no hay una gran diferencia en cuanto a la internalización de ambas NP durante las dos primeras horas. Sin embargo, el proceso de internalización de las NP sin recubrimiento es mucho más rápido que el de las NPCS y por ello la IC_{50} obtenida en los estudios MTT es considerablemente menor en el caso de las primeras.

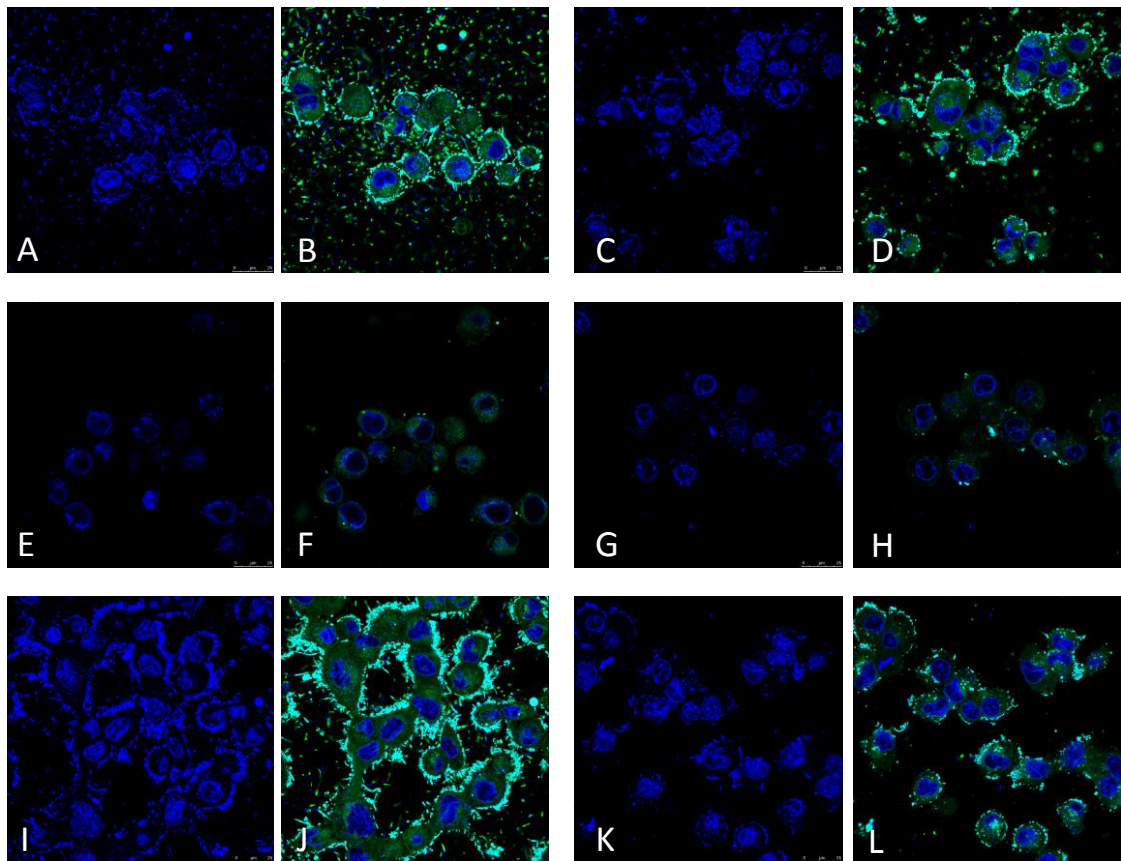


Figura 63.- Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal en cultivos de células DU145 con 80 μ l de NPCUM 0,25% PVA (A, B, E, F, I, J) y 80 μ l de NPCSCUM 0,25% PVA (C, D, G, H, K, L) durante 2 h (A-D), 4 h (E-H) y 48 h (I-L).

En el caso de las células DU145 tratadas durante 48 horas con NPCUM, pudo apreciarse un incremento en la intensidad de la fluorescencia alrededor de las partículas con respecto a lo observado en la muestra anterior tomada a las 4 horas. A diferencia de los agregados que

forman las NP cuando se unen a la superficie celular, las estructuras que aparecen en la imagen tienen una forma más alargada que puede estar relacionado con un problema de contaminación del cultivo por Mycoplasmas (Rottem y col, 2012).

En las imágenes en las que se muestra la tinción azul de los núcleos con el agente intercalante del ADN y en las que las NP se encuentran pegadas a la superficie celular, se observa que los nanotransportadores también aparecen teñidos de color azul. Para comprobar si se trataba de una interferencia causada por el espectro de emisión de la CUM, se observaron al microscopio confocal con las mismas longitudes de onda empleadas en las imágenes 60 a 63, a modo de ejemplo, las NPCSHACUM.

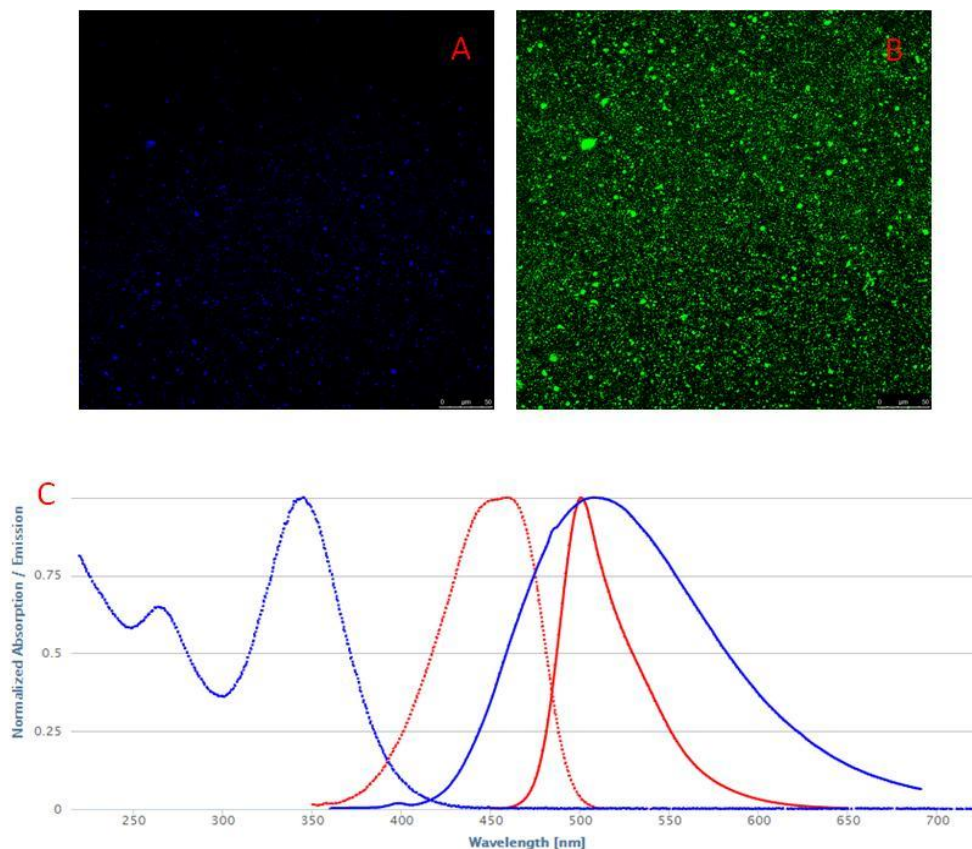


Figura 64.- (A y B) Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de NPCSHACUM y (C) espectros de emisión (líneas continuas) y absorción (líneas discontinuas) de CUM (rojo) y colorante Hoechst (azul).

Como puede verse en la figura 64 (A y B), las zonas con mayor concentración de NPCSHACUM pueden verse con la coloración azul características del colorante Hoechst. La explicación se encuentra al observar los espectros de emisión de ambos compuestos que tienen sus máximos en longitudes de onda muy similares (500 nm para la CUM y 507 para el colorante Hoechst) (Korang-Yeboah y col, 2012). Tras observar al microscopio confocal una muestra de NPBCSHA la cual se había incubado previamente con Hoechst durante 15 minutos, se comprobó que ninguno de los componentes de las NP se teñía con el colorante.

✓ Citometría de flujo

Para estudiar de manera cuantitativa la captación celular de las NP y confirmar los resultados obtenidos con el microscopio confocal, se analizaron mediante citometría de flujo los cultivos realizados con células PC3 y DU145 con NP elaboradas con una concentración de PVA del 0,25%.

En primer lugar, se comprobó que la señal de fluorescencia emitida de manera endógena por cualquiera de las células estudiadas fuese nula o muy baja (3,47 para PC3 y 2,53 para DU145).

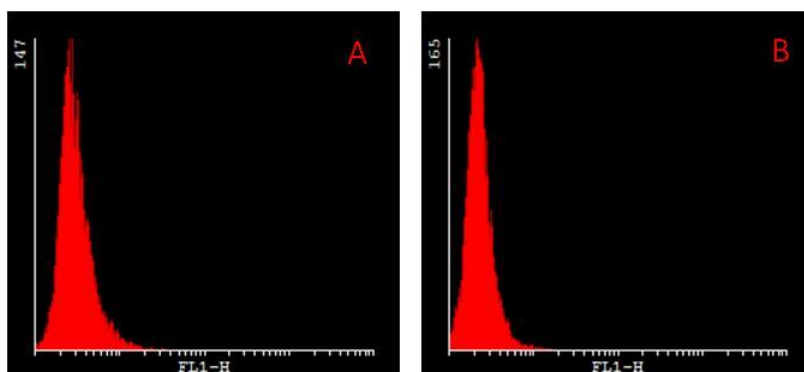


Figura 65.- Histogramas correspondientes a la fluorescencia basal obtenida en células PC3 (A) y DU145 (B).

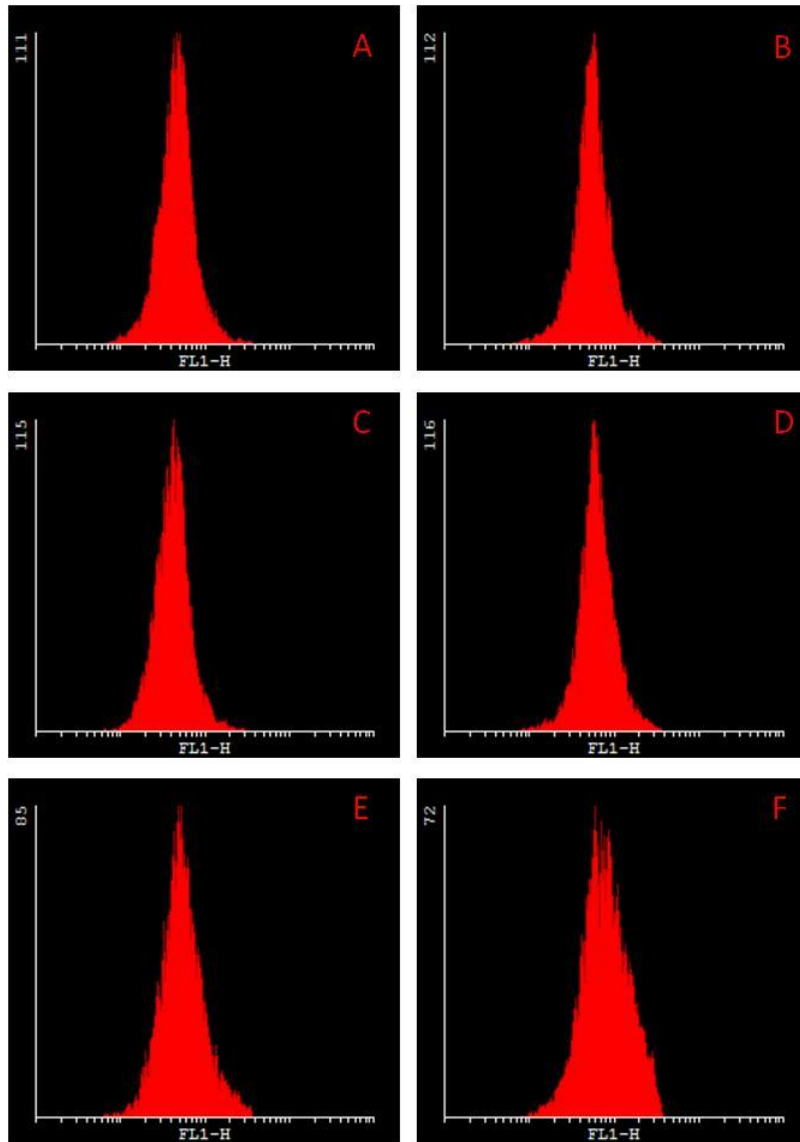


Figura 66.- Histogramas correspondientes a la fluorescencia obtenida en el estudio por citometría de flujo realizado con células PC3 tratadas con 40 µl (A, C y E) y 80 µl de NPCSHACUM 0,25% PVA (B, D y F) durante 2 h (A y B), 4 h (C y D) y 48 h (E y F).

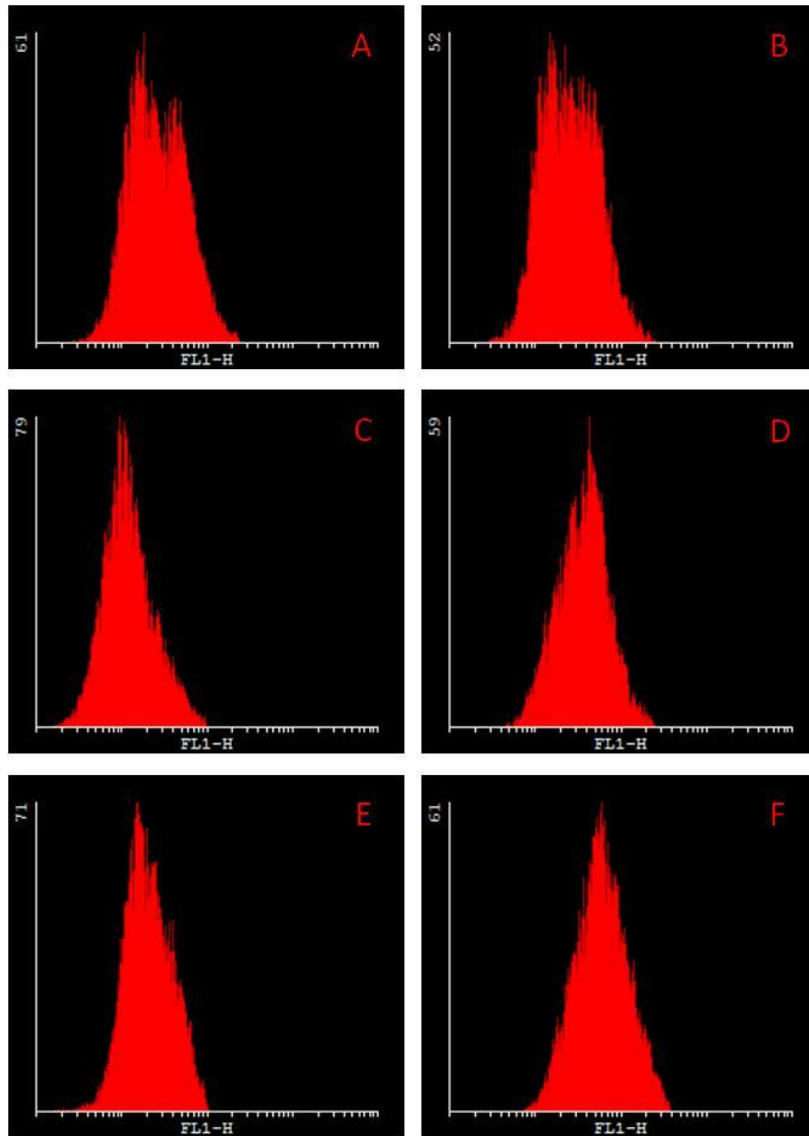


Figura 67.- Histogramas correspondientes a la fluorescencia obtenida en el estudio por citometría de flujo realizado con células DU145 tratadas con 40 µl (A, C y E) y 80 µl de NPCSHACUM 0,25% PVA (B, D y F) durante 2 h (A y B), 4 h (C y D) y 48 h (E y F).

Después de analizar los datos correspondientes a la fluorescencia emitida por las células tratadas con NPCSHACUM, se puede observar cómo, durante las dos primeras horas del estudio, no existe diferencia entre los dos volúmenes de NP estudiados, pero sí se confirma el hecho de que las células PC3 tengan una mayor capacidad para internalizar los nanotransportadores desarrollados en este trabajo. Pasadas 4 y 48 horas, el volumen de formulación añadido a los cultivos empieza a generar diferencias entre los datos de captación obtenidos, incrementándose de manera proporcional al volumen añadido. Huang (Huang y col, 2014)

valoró la captación que dos líneas celulares (MCF-7 y MDA-MB-231) que sobreexpresan el receptor CD44 mostraban para dos formulaciones de NP de PLGA cargadas con CUM, incorporando una de ellas HA en su composición. La captación de ambas formulaciones fue en todos los casos superior a la de la CUM libre pero se incrementó considerablemente en el caso de las células MDA-MB-231 tratadas con las NP con HA. Como podría ocurrir con las células PC3, se confirmó la participación del receptor CD44 en el proceso de internalización de estas partículas al comprobar la reducción de la fluorescencia intracelular obtenida mediante un estudio competitivo en el que se añadió al cultivo HA libre junto con la formulación de NP.

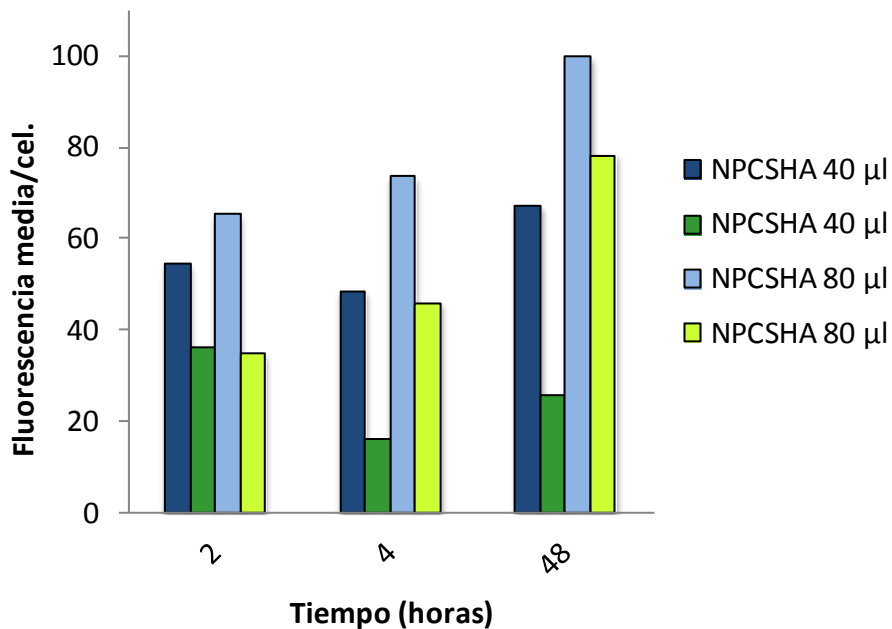


Figura 68.- Valores de fluorescencia media por célula para cultivos PC3 (azul) y DU145 (verde) con NPCSHA.

Los resultados obtenidos con las formulaciones de NPCSCUM y NPCUM sin recubrimiento no pueden compararse directamente con los obtenidos con las NPCSHACUM. En estas últimas, la señal obtenida se corresponde con las NP internalizadas por las células, pero en el caso de las NPCUM y NPCSCUM, y a pesar de los sucesivos lavados que se hicieron con PBS antes de realizar el estudio por citometría de flujo, las NP

permanecieron unidas a la membrana contribuyendo a incrementar la señal de fluorescencia real de las células PC3 y DU145. Esto también causó un incremento en la densidad del cultivo celular dificultando el recuento de células realizado por el citómetro y generando resultados que impiden analizar correctamente el proceso de internalización de las NPCUM y NPCSCUM en las células estudiadas. No obstante, otros autores como Wang (Wang y col, 2013) estudiaron las diferencias de captación entre dos formulaciones de PLGA cargadas con 6-cumarina estando una de ellas cubierta por CS. Para descartar la señal emitida por las NP adheridas a la superficie celular fue necesario lavar varias veces los cultivos con PBS antes de medir la fluorescencia en el citómetro. Finalmente se comprobó que el hecho de recubrir las NP con CS incrementaba la captación y favorecía el transporte de las partículas al interior de la célula.

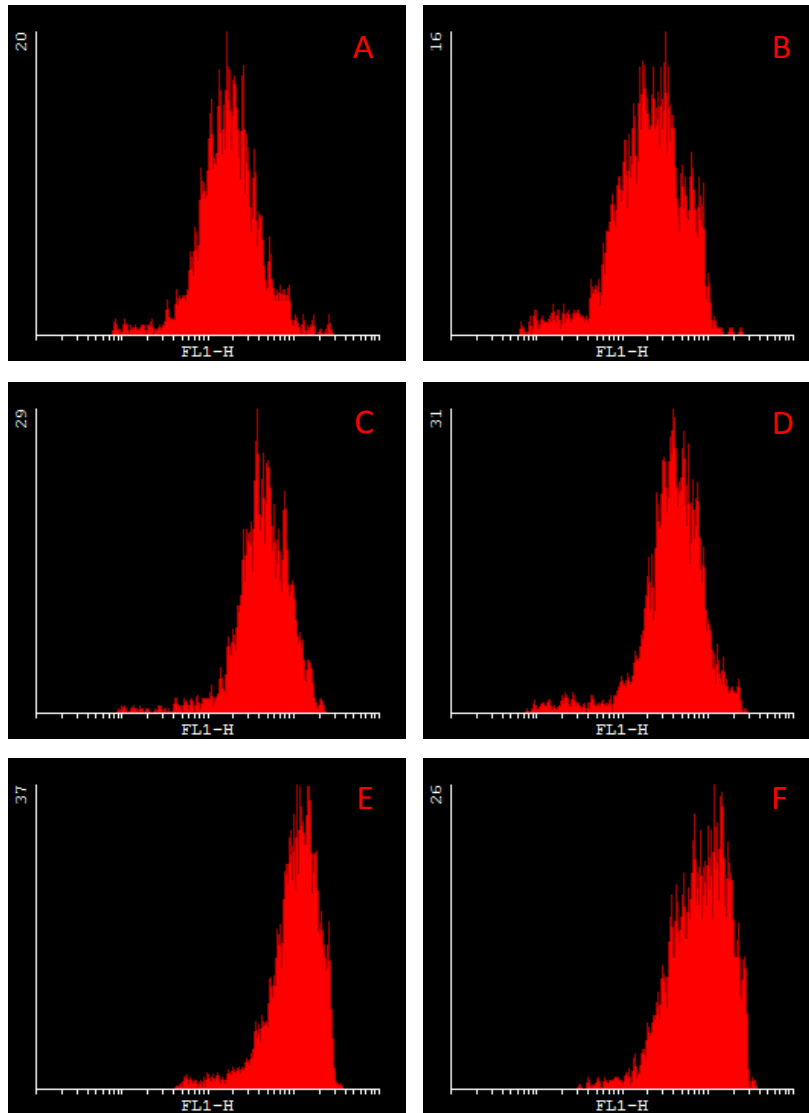


Figura 69.- Histogramas correspondientes a la fluorescencia obtenida en el estudio por citometría de flujo realizado con células PC3 tratadas con 80 μ l de NP 0,25% PVA (A, C y E) y 80 μ l de NPCS 0,25% PVA (B, D y F) durante 2 h (A y B), 4 h (C y D) y 48 h (E y F).

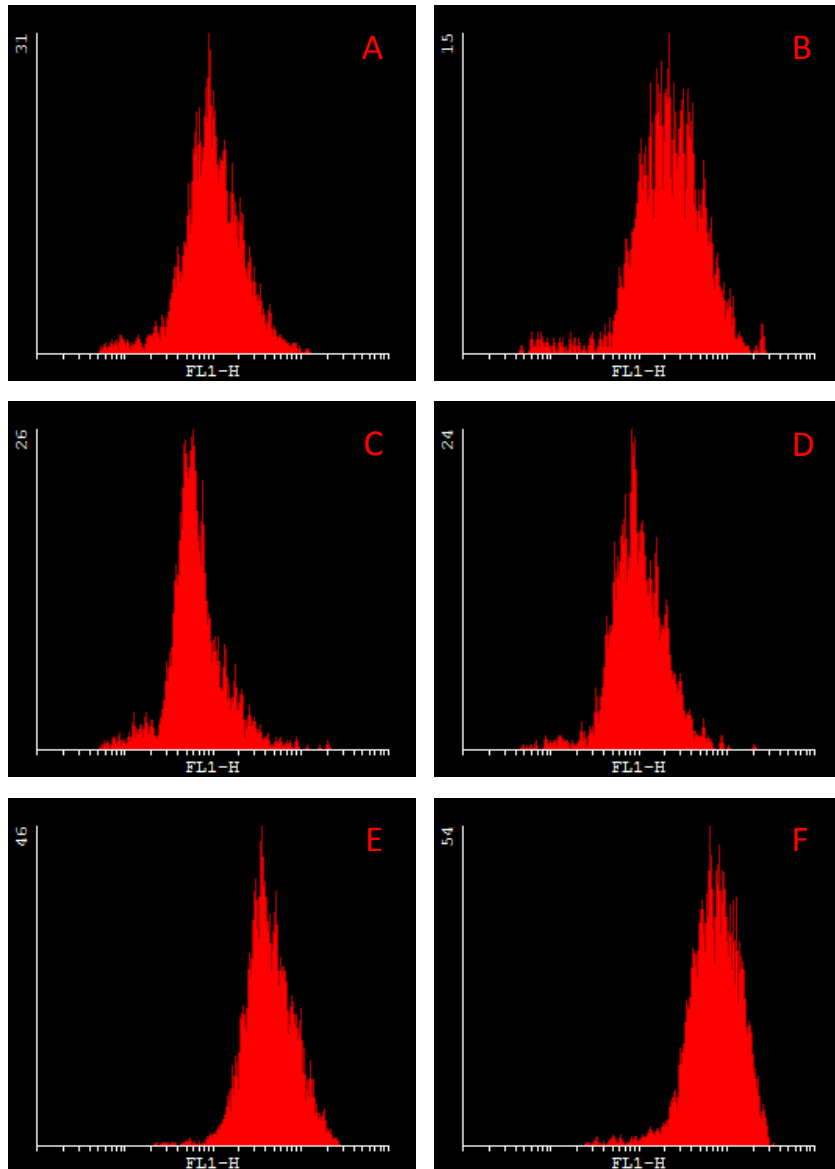


Figura 70.- Histogramas correspondientes a la fluorescencia obtenida en el estudio por citometría de flujo realizado con células DU145 tratadas con 80 μ l de NP 0,25% PVA (A, C y E) y 80 μ l de NPCS 0,25% PVA (B, D y F) durante 2 h (A y B), 4 h (C y D) y 48 h (E y F).

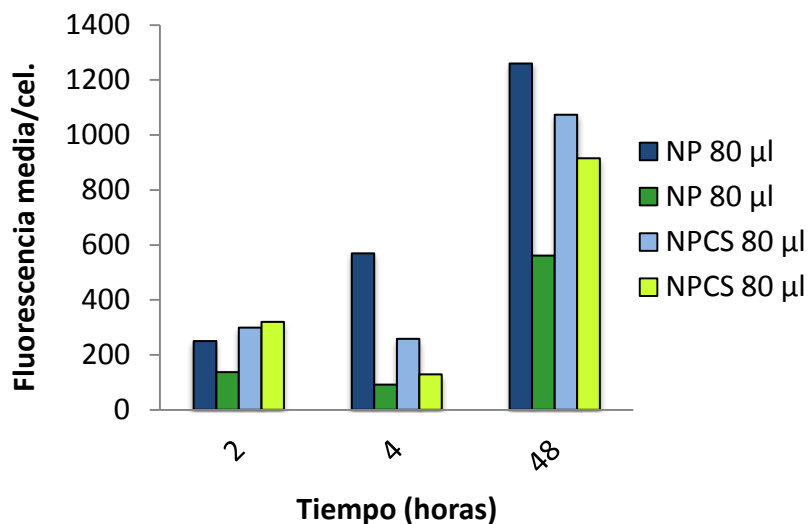


Figura 71.- Valores de fluorescencia media por célula para cultivos PC3 (azul) y DU145 (verde) con NP y NPCS.

✓ Estudios farmacocinéticos

En los estudios farmacocinéticos se han empleado 2 vías de administración que permitiesen la caracterización farmacocinética de la formulación de NP con NS seleccionada para su administración intra-prostática. Para ello, se desarrolló y validó una técnica analítica HPLC que permitiera cuantificar NS en un volumen de plasma reducido compatible con la realización de estudios farmacocinéticos en ratas en régimen de dosis única.

.1. Validación del método HPLC para determinar NS en plasma de rata

La figura 72 muestra la recta de calibración obtenida con los patrones de NS en fase móvil.

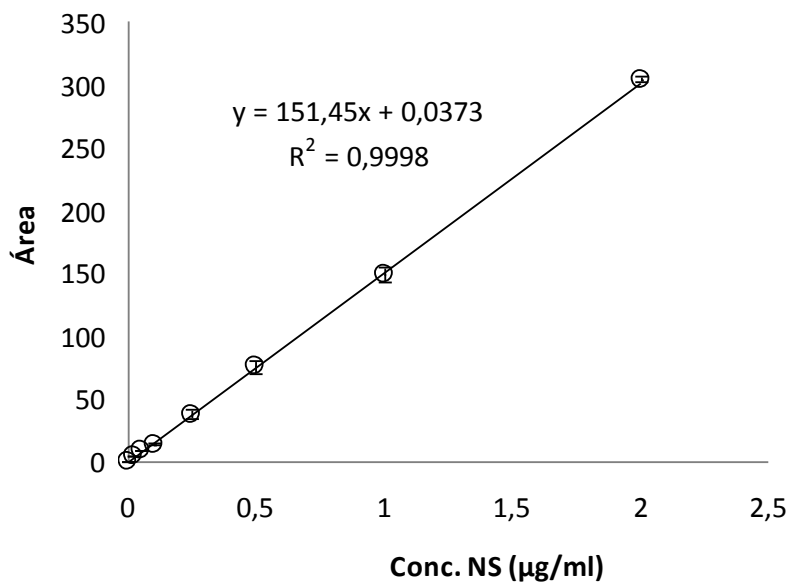


Figura 72.- Curva de calibración de NS con estándar externo.

La figura 73 recoge varios cromatogramas que representan plasma blanco, y una muestra problema con una concentración calculada de 0,90 µg/ml para NS.

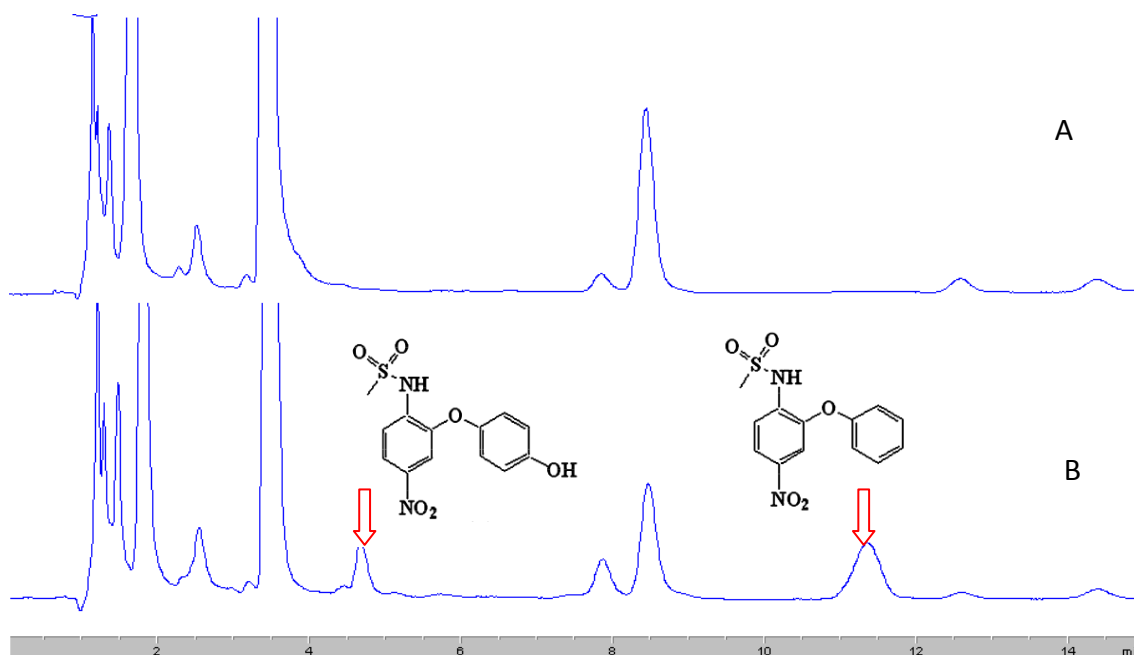


Figura 73.- Cromatogramas de NS en plasma: A) plasma blanco y B) plasma problema.

Los cromatogramas muestran la ausencia de picos de interferencia (A) y los correspondientes a NS y su principal metabolito en plasma, la 4-OHNS (B), que eluyen a 11 y 4,8 minutos, respectivamente presentes solo en la muestra problema. La asignación de este pico al metabolito se ha realizado mediante el análisis de la bibliografía (Bernareggi and Reinsford, 2005).

Las tablas 44 a 46 recogen los datos relacionados con la validación del método HPLC empleando como referencia la curva de calibración de estándar externo.

Tabla 44.- Datos del ensayo de validación: Linealidad, recuperación y precisión intra e interdía

Cantidad NS añadida (ng)	Cantidad NS hallada (media ± d.e.)	% Recuperación	Intra-día % DTR	Inter-día % DTR
25	26,2±3,0	105.0	8	11
50	45,8±4,7	91.6	6	10
100	95,1±9,7	95.1	11	10
500	482,1±27,2	96.4	3	6
1000	951,6±39,7	95.2	5	4
2000	2059,2±55,7	103.0	2	3

Tabla 45.- Datos del ensayo de validación: Controles (n=5)

Concentracion µg/ml	Conc. detectada µg/ml	% Exactitud media	Precisión % DTR
0,075	0,074±0,006	-1	8
0,200	0,192±0,017	-4	9
0,600	0,587±0,053	-2	9
1,5	1,534±0,154	2	10

Tabla 46.- Datos del ensayo de validación: robustez (n=3)

	Concentración teórica añadida $\mu\text{g/ml}$	Conc. detectada $\mu\text{g/ml}$	% Exactitud media	% DTR
Dilución 1/5	5	4,80 \pm 0,64	-4,1	13
	7,5	7,50 \pm 0,11	0,1	1
	10	9,88 \pm 0,54	-1,2	5
20 μl V.iny.	5	4,84 \pm 0,40	-3,1	8
	7,5	7,40 \pm 0,29	-1,4	4
	10	9,71 \pm 1,20	-2,9	12
50 μl plasma 20 μl V. iny.	5	4,79 \pm 0,60	-4,2	12
	7,5	6,56 \pm 1,38	-12,6	18
	10	10,04 \pm 0,83	0,4	8

En todos los casos se encuentran porcentajes de recuperación, exactitud y reproducibilidad generalmente inferiores al 10% y en ningún caso superiores al 20% por lo que se considera un método adecuado para la determinación de NS en plasma de rata. Con respecto a la robustez se han ensayado condiciones de dilución de la muestra 1:5 o procesamiento e inyección de un volumen de plasma y de inyección reducidos, a la mitad y a una quinta parte, respectivamente. Estas condiciones pretenden establecer la validez del método en el caso de la administración bolus IV en la que se produce una variación de las concentraciones en un amplio rango, siendo el límite superior de la curva de calibración 2 $\mu\text{g/ml}$, por lo que procediendo de cualquiera de estas maneras se evitan extrapolaciones fuera del intervalo de calibración.

✓ Administración intravenosa IV

La figura 74 muestra el perfil farmacocinético obtenido tras la administración IV de 1 mg/kg de NS en disolución a ratas Wistar.

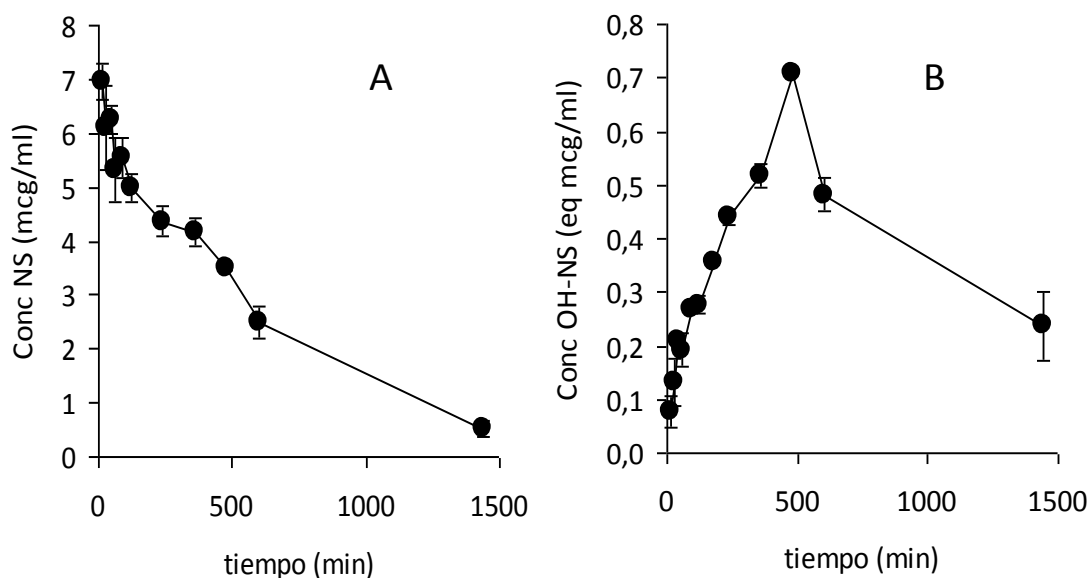


Figura 74.- Concentraciones de (A) NS ($\mu\text{g}/\text{ml}$) y (B) OH-NS (eq. $\mu\text{g}/\text{ml}$) en plasma de rata tras administración IV de 1mg/kg en solución. (media \pm e.e.m.) n=5.

Los perfiles farmacocinéticos muestran una disminución de la concentración de forma monoexponencial, compatible con un modelo monocompartmental tal y como se ha descrito por otros autores (Bernareggi y Rainsford, 2005). Es destacable la presencia de un intervalo de tiempo entre los 240 y los 600 minutos en el que las concentraciones plasmáticas de NS son superiores a lo que cabría esperar considerando el ajuste lineal de las concentraciones en una curva semi-logarítmica. Ello podría estar justificado por la presencia de un ciclo enterohepático ya que la NS se elimina fundamentalmente por metabolismo hepático (Bernareggi and Rainsford, 2005). El principal metabolito de la NS detectado en plasma de rata es el 4-OHNS. Por ello, el pico identificado en plasma a los 4,8 min se ha atribuido a este metabolito. Su perfil farmacocinético (figura 74B) muestra una curva ascendente hasta los 480 minutos donde se alcanza la máxima concentración, coincidiendo con el

intervalo en el que se ha identificado un potencial ciclo enterohepático. Las concentraciones de 4-OHNS se sitúan en un orden de magnitud 10 veces inferior a las del fármaco patrón asumiendo que el coeficiente de extinción molar fuera el mismo que el de la NS. Por ello, sus concentraciones se identifican como concentraciones equivalentes a NS. El análisis farmacocinético no compartimental de las curvas dio lugar a los parámetros mostrados en la tabla 49.

Tabla 47.- Parámetros farmacocinéticos no compartimentales que caracterizan las curvas plasmáticas IV de NS y 4-OHNS.

Parámetro	unidades	media	d.e.
k_{eNS}	min^{-1}	0,0017	0,0006
$t_{1/2NS}$	min	448,79	150,11
AUC_{0NS}^t	$\mu\text{g min/ml}$	3873,41	442,61
AUC_{0NS}^{inf}	$\mu\text{g min/ml}$	4260,00	606,35
V_d	ml/kg	157,11	28,07
V_{dss}	ml/kg	103,13	16,69
CI	ml/min Kg	0,239	0,034
MRT	min	435,34	65,74
k_{eOHNS}	min^{-1}	0,0009	0,0005
$t_{1/2OHNS}$	min	958,62	511,26
AUC_{0OHNS}^t	$\mu\text{g min/ml}$	708,91	318,32
AUC_{0OHNS}^{inf}	$\mu\text{g min/ml}$	1077,76	546,03
MRT	min	589,69	95,12
C_{max}	$\mu\text{g/ml}$	0,709	0,03
t_{max}	min	480	0

La disposición de la NS determinada en este estudio corrobora datos publicados con anterioridad en ratas (Bernareggi and Rainsford, 2005). Se observa que el tiempo de muestreo empleado en el experimento es adecuado para caracterizar la farmacocinética IV de NS ya que el % AUC extrapolada es en promedio 9%. Sin embargo, el análisis de la curva de OHNS requeriría prolongar el experimento ya que se extrapola un 34% el AUC. En las condiciones del estudio se observa que la velocidad

de eliminación del metabolito es aproximadamente la mitad que la del fármaco patrón y que su correspondiente AUC_0^{1440} representa un 18% de la de NS.

✓ **Administración intraprostática de la solución de NS (IPrS)**

La figura 75 muestra el perfil farmacocinético obtenido tras la administración IPr de 1 mg/kg de NS en disolución a ratas Wistar.

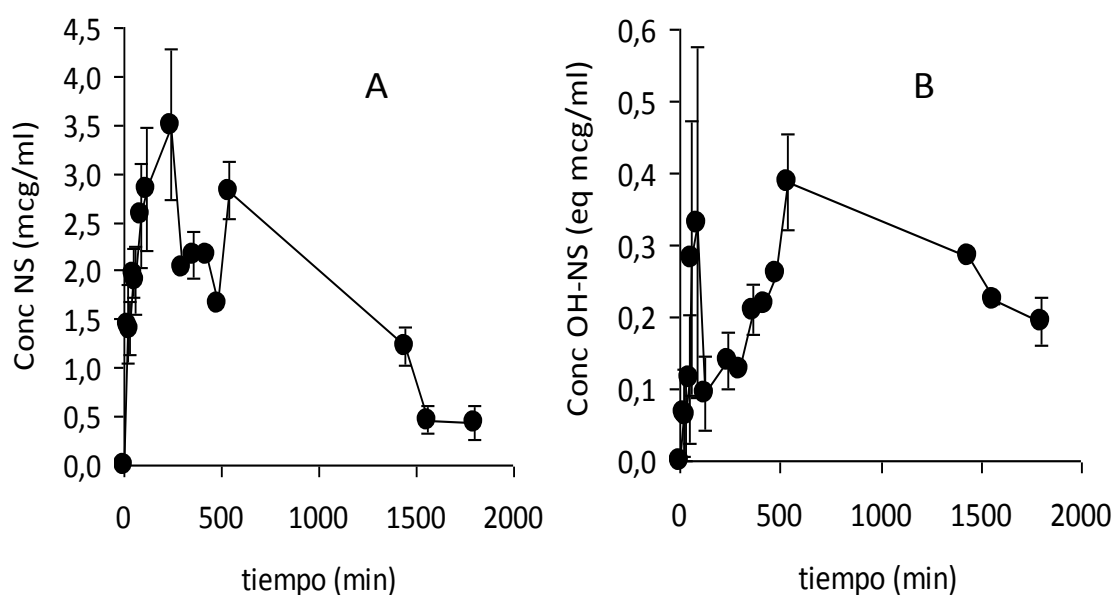


Figura 75.- Concentraciones de (A) NS ($\mu\text{g}/\text{ml}$) y (B) OH-NS (eq. $\mu\text{g}/\text{ml}$) en plasma de rata tras administración IPr de 1mg/kg en solución. (media \pm e.e.m.) $n=5$. Las concentraciones en algunos animales han sido normalizadas a la dosis mencionada.

Los perfiles farmacocinéticos muestran una curva extravascular con tres máximos, el primero a 240 minutos, el segundo a 420 minutos y un tercero a 540 minutos, todos relativamente próximos en concentración (3,5, 2,2 y 2,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente). Estos picos secundarios sugieren, como ocurría tras la administración IV, la existencia de un ciclo enterohepático por los motivos ya discutidos anteriormente, si bien este parece tener una mayor entidad tras administrar por esta vía. El perfil farmacocinético del metabolito muestra también más de un máximo, a 90

y 540 minutos entre 0,3 y 0,4 $\mu\text{g/ml}$, caracterizándose el primero por una amplia variabilidad que supera el 100%. Las concentraciones de 4-OHNS se sitúan nuevamente en un orden de magnitud 10 veces inferior a las del fármaco patrón. El análisis farmacocinético no compartimental de las curvas dio lugar a los parámetros mostrados en la tabla 48.

Tabla 48.- Parámetros farmacocinéticos no compartimentales que caracterizan las curvas plasmáticas IPrS de NS y 4-OHNS.

Parámetro	unidades	media	d.e.
k_{eNS}	min^{-1}	0,0017	0,0006
$t_{1/2NS}$	min	437,91	130,76
AUC_{0NS}^t	$\mu\text{g min/ml}$	3247,19	413,00
AUC_{0NS}^{inf}	$\mu\text{g min/ml}$	3709,22	591,40
V_d	ml/kg	139,63	40,40
Cl	ml/min Kg	0,222	0,003
MRT	min	566,57	76,01
C_{max}	$\mu\text{g/ml}$	3,50	1,74
t_{max}	min	240	0
F		0,82	0,13
k_{eOHNS}	min^{-1}	0,0010	0,0001
$t_{1/2OHNS}$	min	677,05	86,87
AUC_{0OHNS}^t	$\mu\text{g min/ml}$	473,78	120,81
AUC_{0OHNS}^{inf}	$\mu\text{g min/ml}$	829,20	358,28
MRT	min	861,21	73,19
C_{max}	$\mu\text{g/ml}$	0,388	0,148
t_{max}	min	540	0

Los parámetros de disposición de la NS tras administración intraprostática son muy similares a los estimados tras la administración IV. Ello es lógico si consideramos que se trata de un fármaco que atraviesa barreras biológicas con facilidad (BCS clase II) y que la próstata en la rata es una glándula con buena perfusión sanguínea (aproximadamente 1/12 de la del riñón; 28 ml/100 g/min) (Gatenbeck y col, 1987). Se observa que el tiempo de muestreo empleado en el experimento es adecuado para

caracterizar la farmacocinética IPr de NS ya que el % AUC extrapolada es en promedio 12%. Sin embargo, el análisis de la curva de 4-OHNS requeriría prolongar el experimento ya que se extrapola más de un 40% el AUC. En las condiciones del estudio también se observa que la velocidad de eliminación del metabolito es aproximadamente la mitad que la del fármaco patrón y que su correspondiente AUC_0^{1800} representa un 15% de la de NS. La biodisponibilidad en magnitud indica una absorción casi completa ($0,82 \pm 0,13$) como se ha descrito para la vía oral y la comparación de los valores de tiempo medio de residencia (MRT) tras administración de una solución por vía IV e IPr permite estimar un tiempo medio de absorción (MAT) igual a 132 minutos que correspondería en un modelo monocompartimental a una $k_a = 0,0075 \text{ min}^{-1}$. Sin embargo, estas afirmaciones deben ser interpretadas con precaución ya que la inyección IPr podría dar lugar a una precipitación de parte de la NS por la elevada concentración de la solución y la posible difusión tisular del etanol que actúa como cosolvente en la formulación. En este caso el valor estimado para MAT correspondería al tiempo medio de entrada (MIT) y para conocer la k_a sería necesario conocer el tiempo medio de disolución (MDT) *in vivo*.

✓ **Administración intraprostática de las NP (IPrNP)**

La figura 76 muestra el perfil farmacocinético obtenido tras la administración IPr de 1 mg/kg de NS en NP elaboradas a partir de PLGA empleando 0,25% de PVA a ratas Wistar.

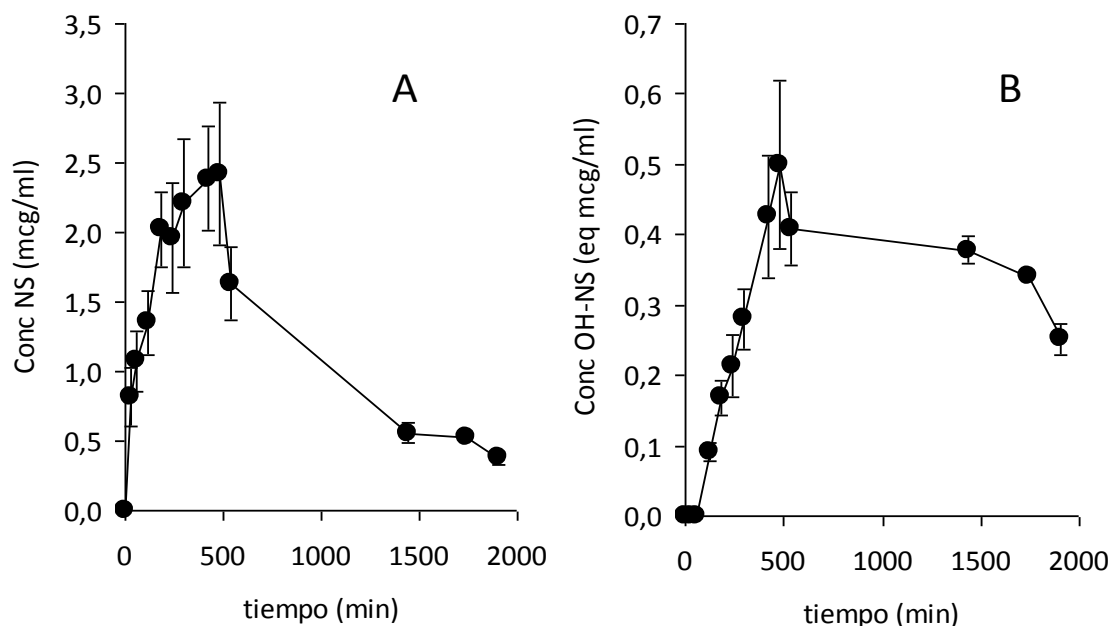


Figura 76.- Concentraciones de (A) NS ($\mu\text{g}/\text{ml}$) y (B) 4-OHNS (eq. $\mu\text{g}/\text{ml}$) en plasma de rata tras administración IPr de 1mg/kg en NP 0,25% PVA. (media \pm e.e.m.) n=5. Las concentraciones en algunos animales han sido normalizadas a la dosis mencionada.

Los perfiles farmacocinéticos muestran una curva extravascular con un solo máximo a 480 minutos de concentración 2,42 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El perfil farmacocinético del metabolito muestra también un solo máximo al mismo tiempo, en el que alcanza una concentración de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. En esta ocasión las concentraciones de 4-OHNS se sitúan algo por encima de lo observado en los dos experimentos anteriores (18% frente al 10%) con respecto a la NS. El análisis farmacocinético no compartimental de las curvas dio lugar a los parámetros mostrados en la tabla 49.

Tabla 49.- Parámetros farmacocinéticos no compartimentales que caracterizan las curvas plasmáticas IPrNP 0,25% PVA de NS y OH-NS.

Parámetro	unidades	media	d.e.
k_{eNS}	min ⁻¹	0,0012	0,0004
$t_{1/2NS}$	min	596,81	162,90
$AUC_{0\ NS}^t$	µg min/ml	2447,51	838,48
$AUC_{0\ NS}^{inf}$	µg min/ml	2835,23	787,80
V_d	ml/kg	203,94	70,47
Cl	ml/min Kg	0,234	0,025
MRT	min	670,14	118,34
C_{max}	µg/ml	2,42	1,15
t_{max}	min	480	0
F		0,66	0,16
k_{eOHNS}	min ⁻¹	0,0006	0,0002
$t_{1/2OHNS}$	min	1316,49	376,14
$AUC_{0\ OHNS}^t$	µg min/ml	672,80	171,42
$AUC_{0\ OHNS}^{inf}$	µg min/ml	1177,33	336,16
MRT	min	1061,23	254,22
C_{max}	µg/ml	0,5	0,27
t_{max}	min	480	0

Los parámetros de disposición de la NS tras administración intraprostática han variado de forma significativa respecto a la administración IV. La constante de eliminación disminuye hasta un 70% del valor de referencia pero mantiene su variabilidad alrededor del 35%. La eliminación del metabolito sigue mostrando una constante de velocidad que es la mitad de la de NS. Se observa que el tiempo de muestreo empleado en el experimento es adecuado para caracterizar la farmacocinética IPr de NP 0,25% PVA ya que el % AUC extrapolada es en promedio 14%. Sin embargo, el análisis de la curva de 4-OHNS requeriría prolongar el experimento ya que se extrapola más de un 40% el AUC. No obstante, a este respecto es necesario tener en cuenta que la

biodisponibilidad absoluta promedio fue de $0,66 \pm 0,16$ por lo que habría todavía una parte importante de la dosis pendiente de absorberse que podría modificar las estimaciones de los parámetros farmacocinéticos. El AUC_0^{1900} correspondiente al metabolito aumenta hasta un 27% de la de NS, lo que sugiere una mayor exposición al mismo por acumulación más que por aumento de su producción ya que la constante de velocidad de eliminación de NS se reduce y proporcionalmente la de su metabolito. La comparación de los valores MRT tras administración de la solución por vía IV y las NP 0,25% PVA IPr permite estimar un MIT igual a 235 minutos, aproximadamente 100 minutos mayor que el estimado con la administración IPr de la solución. Por tanto, se puede predecir que el TMD *in vivo* de las NP a nivel prostático estará próximo a ese valor de 1,5 horas. La biodisponibilidad absoluta promedio observada y corregida con las diferencias de constante de velocidad de eliminación se vería reducida a un valor de 0,46. Por otra parte, aunque debido a la variabilidad que el sustrato biológico aporta a los parámetros farmacocinéticos de disposición es difícil obtener diferencias con significancia estadística, los valores de C_{max} y t_{max} asociados a las NP son menores y más largos, respectivamente que los obtenidos con la disolución. Ello sugiere que las NP modulan la cantidad y la velocidad con la que la NS accede al torrente circulatorio y consigue mantener el fármaco a nivel de la glándula durante intervalos de tiempo más largos.

V. Conclusiones

Como se indicó previamente, el objetivo de este trabajo de investigación era obtener sistemas de NP poliméricas cargadas con NS destinadas a la administración intraprostática para su aplicación terapéutica. Para conseguirlo se plantearon una serie de estudios y de los resultados obtenidos se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- 1.- Es viable la obtención de NP cargadas con NS a partir de PLGA utilizando el método de evaporación del disolvente. Así mismo, es posible dotarlas de una cubierta o varias cubiertas empleando polisacáridos contra-iónicos como el CS o el HA.
- 2.- Las condiciones experimentales empleadas dan lugar a NP esféricas, aparentemente no porosas, que en todos los casos muestran tamaños medios de partícula en volumen inferiores a 0,7 μm .
- 3.- La concentración de PVA empleada en la elaboración de NP condiciona su tamaño de modo que, aquellas elaboradas con una concentración del 1%, presentaron un tamaño medio próximo a 290 nm. La adición de CS de alto y bajo peso molecular lo incrementó hasta 320 y 300 nm, respectivamente. Por el contrario, la incorporación posterior de HA, produjo una compactación en la estructura de la cubierta y una reducción en su tamaño hasta recuperar el tamaño inicial.
- 4.- La reducción de la concentración de PVA al 0,25% produjo un aumento del tamaño de partícula hasta 430 nm, tamaño que se ve incrementado en 15 y 25 nm aproximadamente al incorporar CS de bajo y alto peso molecular, respectivamente. La adición de HA también incrementa el tamaño hasta los 560 nm.
- 5.- La captación de NS en las NP es superior al 80% en todos los casos si bien, se observa un incremento próximo al 7% cuando se reduce la concentración de PVA al 0,25%. Además, las formulaciones definitivas evaluadas garantizan que más del 98% del fármaco inicialmente incorporado permanece encapsulado.

6.- La caracterización físico-química de los nanotransportadores muestra que la NS esta esencialmente dispersa a nivel molecular en la matriz polimérica y que las potenciales interacciones entre el fármaco y los excipientes son de naturaleza débil.

7.- Los estudios de liberación inmediata constatan una diferente capacidad de retención del fármaco en función de la composición de las NP, siendo las elaboradas con 0,25% de PVA sin recubrimiento las más eficaces.

8.- Los estudios de liberación demuestran que la NS se libera en su totalidad y de forma rápida de las NP en condiciones *sink* sin que ninguno de los componentes de las mismas afecte dicho comportamiento.

9.- Según los estudios de permeabilidad a través de membrana artificial (PAMPA), la permeabilidad de la NS se reduce tras su incorporación en las NP de modo general, aunque son las NP elaboradas con 0,25% de PVA las que presentan un efecto más acusado.

10.- Las cinéticas combinadas de disolución/permeabilidad empleando condiciones *non sink* en el compartimento donador confirman que la encapsulación de la NS en las NP modula su liberación y que son las NP obtenidas con 0,25% PVA sin recubrimiento las mas eficaces.

11.- Los estudios de citotoxicidad *in vitro* en células de cáncer de próstata PC3 y DU145, demuestran una mayor sensibilidad de la línea DU145 al fármaco libre con IC_{50} próximas a 90 μ M. También se demuestra la citotoxicidad de las NP sin NS, especialmente las que incorporan HA en su superficie, en células DU145. En todos los casos se obtiene un efecto inhibitorio de la proliferación celular con las NP, aunque este es de distinta magnitud.

12.- La combinación de la microscopía confocal y la citometría de flujo han permitido comprobar que la presencia de HA en la superficie de las NP favorece de forma específica su internalización en las células tumorales posiblemente debido a una interacción con receptores CD44.

13.- Se ha desarrollado y validado una técnica analítica HPLC para la determinación de NS en plasma aplicable a la realización de estudios farmacocinéticos en ratas a dosis terapéuticas con volúmenes de muestra reducidos a 100 μ l.

14.- La administración intraprostática de NS en solución a ratas wistar no modifica los parámetros farmacocinéticos que caracterizan el proceso de disposición.

15.-La administración intraprostática de NS en NP elaboradas con 0,25% de PVA y sin recubrimiento han reducido la biodisponibilidad del fármaco en magnitud y en velocidad, reteniendo una mayor fracción de la dosis en el punto de inyección.

16.- Como conclusión general, las NP evaluadas representan una herramienta potencial para la administración intratumoral de fármacos a nivel prostático, que además de modular la liberación de la molécula encapsulada, permiten localizar ésta de forma selectiva en el interior de las células tumorales, lo que podría suponer una alternativa eficaz a los tratamientos actuales para cáncer de próstata.

VI. Referencias

Abdelwahed W., Degobert G., Stainmesse S., Fessi H. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 58(15): 1688-1713, 2006.

Aberturas M. R., Molpeceres J., Guzmán M. y García F. Development of a new cyclosporine formulation based on poly(caprolactone) microspheres, *J. Microencapsul.*, 19 (1): 61-72, 2002.

Ai H., Jones S. A., Lvov Y. M. Biomedical applications of electrostatic layer-by-layer nano-assembly of polymers, enzymes, and nanoparticles, *Cell Bioch. Biophys.*, 39(1): 23-43, 2003.

Alexis F., Rhee J. W., Richie J. P., Radovic-Moreno A. F., Langer R., Farokhzad O. C. New frontiers in nanotechnology for cancer treatment, *Urol. Oncol.*, 26(1): 74-85, 2008.

Al-Ghananeem A. M., Malkawi A. H., Muammer Y. M., Balko J. M., Black E. P., Mourad W., Romond E. Intratumoral delivery of paclitaxel in solid tumor from biodegradable hyaluronan nanoparticle formulations, *AAPS PharmSciTech*, 10(2): 410–417, 2009.

Almalik A., Donno R., Cadman C. J., Cellesi F., Day P. J., Tirelli N. Hyaluronic acid-coated chitosan nanoparticles: Molecular weight-dependent effects on morphology and hyaluronic acid presentation, *J. Control. Release*, 172(3): 1142-1150, 2013.

Alves M. P., Scarrone A. L., Santos M., Pohlmann A. R., Guterres S. S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers, *Int. J. Pharm.*, 341 (1-2): 215-220, 2007.

Amarjit S., Paramjeet S., Vijay K. K. Nimesulide, *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*, 28: 197–249, 2001.

Asociación Española Contra el Cáncer. Disponible en: <https://www.aecc.es/SobreElCancer/elcancer/Paginas/Elcancer.aspx>.

Fecha de último acceso: mayo 2016.

Asociación Española de Urología. Disponible en: <http://www.aeu.es>. Fecha último acceso: abril 2016.

Autio K. A., Garcia J. A., Alva A. S., Hart L. L., Milowsky M. I., Posadas E. M., Ryan C. J., Summa J. M., Youssoufian H., Scher H. I., Dreicer R. A phase 2 study of BIND-014 (PSMA-targeted docetaxel nanoparticle) administered to patients with chemotherapy-naïve metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC), *J. Clin. Oncol.*, 34 (2): 233, 2016.

Babu R. J., Kanikkannan N., Kikwai L., Ortega C., Andega S., Ball K., Yim S., Singh M. The influence of various methods of cold storage of skin on the permeation of melatonin and nimesulide, *J. Control. Release*, 86(1): 49-57, enero 2003.

Balabanova R. M., Belov B. S., Chichasova N. V., Oliunin IuA, Badokin V. V., Pchelintseva A. O., Fedina T. P., Gukasian D. A., Lopatina N. E., Korshunov N. I. Baranova Ela, Ilivanova E. P., Trifonova S. E., Matsievskaia G. K. Nimesil effectiveness in rheumatoid arthritis, *Klinicheskaia Meditsina (Moskva)*, 80: 49–52, 2002.

Barenholz Y. Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned, *J. Control. Release*, 160(2): 117-134, 2012.

Barichello J. M., Morishita M., Takayama K., Nagai T. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method; *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 25(4): 471-476, 1999.

Barskova V. G., Iakunina I. A., Nasonova V. A. Nimesil treatment of gouty arthritis, *Terapevt rkhiv*, 75(5): 60–64, 2003.

Bernareggi A., Rainsford K. D. Nimesulide-Actions and Uses, Pharmacokinetics of nimesulide, Ed. Birkhäuser Verlag, Basilea, 63-120, 2005.

Berthomieu C., Hienerwadel R. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, *Photosynth. Res.*, 101 (2): 157-170, 2009.

Bianchi M., Brogginini M. Anti-hyperalgesic effects of nimesulide: studies in rats and humans, *Int. J. Clin. Pract. Suppl.*, 57(128): 11–19, 2002.

Bidaut-Russell M., Gabriel S. E. Adverse gastrointestinal effects of NSAIDs: consequences and costs, *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 15(5): 739–753, 2001.

Bietti G., Dubini E., Maffione G., Vidi A. Inclusion compounds of nimesulide with cyclodextrins, WO1991017774 A1, Boehringer Ingelheim Italia S. P. A., 1991.

Bjarnason I., Bissoli F., Conforti A., Maiden L., Moore N., Moretti U., Rainsford K. D., Takeuchi K., Velo G. P. Nimesulide-Actions and Uses, Adverse reactions and their mechanisms from nimesulide, Ed. Birkhäuser Verlag, Basilea, 315-415, 2005.

Bondi M. L., Azzolina A., Craparo E. F., Capuano G., Lampiasi N., Giammona G., Cervello M. Solid lipid nanoparticles containing nimesulide: preparation, characterization and cytotoxicity studies, *Curr. Nanosci.*, 4, 2008.

Bourgeois P., Dreiser R. L., Lequesne M. G., Macciocchi A., Monti T. Multi-centre double-blind study to define the most favourable dose of nimesulide in terms of efficacy/safety ratio in the treatment of osteoarthritis, *Eur. J. Rheumatol. Inflamm.*, 14(2): 39–50, 1994.

Brater D. C., Harris C., Redfern J. S., Gertz B. J. Renal effects of Cyclooxygenase-2-selective inhibitors, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens*, 21(1):1-15, 2001. (68) Boguslavsky L., Baruch S., Margel S. Synthesis and characterization of polyacrylonitrile nanoparticles by dispersion/emulsion polymerization process; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 289(1): 71-85, 2005.

Brenes Bermúdez F. J., Cózar Olmo J. M., Lara Jiménez P. C., Miñana López B., Rodríguez Antolín A., Rodríguez Melcón J. I., Unda Urzaiz M., Vazquez Alonso F. Pautas de actuación y seguimiento. *Cáncer de próstata*, 2015.

Brigger I., Dubernet C., Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 64 (Suplemento), 24-36: 2012.

Bteich J., Hoang B., Undzys E., Mohammed M., Su A. L., Ou K., Emerson D., Sokoll K., Li S-d., Trikha M., Lowman H., Ernsting M. J. A Production-Scalable Cabazitaxel Cellulose Nanoparticle Exhibits Significant Efficacy in a Bone Model of Docetaxel-Resistant Prostate Cancer, 107th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR-2016), Nueva Orleans, Luisiana, E.E.U.U.

Bunjes H. Lipid nanoparticles for the delivery of poorly water-soluble drugs, *J.Pharm. Pharmacol.*, 62(11): 1637-1645, 2010.

Castanho M. A. R. B., Santos N. C., Loura L. M. S. Separating the turbidity spectra of vesicles from the absorption spectra of membrane probes and other chromophores, *Eur. Biophys. J.*, 26: 253-259, 1997.

Castells A., Rodríguez-Moranta F. y Soriano A. Implicación de ciclooxigenasa 2 en el cáncer: utilidad de los coxib, *Revista Española de Reumatología*, 30(7): 386-92, 2003.

Centro Nacional de Biotecnología. Disponible en: http://wwwuser.cnb.csic.es/~fotonica/Photonic_en/Review/citometria_d_e_flujo.htm. Fecha último acceso: junio 2017.

Champion J. A., Walker A., Mitragotri S. Role of Particle Size in Phagocytosis of Polymeric Microspheres, *Pharm. Res.*, 28(8): 1815-1821, 2008.

Chandrasekharan N. V., Dai H., Roos L. T., Evanson N. K., Tomsik J., Elton T. S., Simmons D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99(21): 13926-13931, 2002.

Chandratre S.C., Dash A. K. Multifunctional Nanoparticles for Prostate Cancer Therapy, *AAPS PharmSciTech*, 16(1): 98-107, 2015.

Chazote B. Labeling Nuclear DNA with Hoechst 33342, *Imaging: A Laboratory Manual*, Yuste, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2010.

Chen X., Murawski A., Patel K., Crespi C. L., Balimane P. V. A Novel Design of Artificial Membrane for Improving the PAMPA Model, *Pharm. Res.*, 25(7): 1511-1520, 2008.

Cho K., Wang X., Nie S., Chen Z., Shin D. M. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer, *Clin. Cancer Res.*, 14 (5): 1310-1316, 2008.

Choudhari Y., Kulthe S., Inamdar N., Shirolikar S., Borde L., Mourya V. Combination of Low and High Molecular Weight Chitosans for the Preparation of Nanoparticles: A Novel Approach Towards Sustained Drug Delivery, *J. Nanopharm. Drug Deliv.*, 1: 1-12, 2014.

Colville N., Gilroy D. W. Potential adverse effects of cyclooxygenase-2 inhibition: evidence from animal models of inflammation, *Biodrugs*, 15(1): 1-9, 2001.

Corli O., Cozzolino A., Scabicabarozzi I. Nimesulide and diclofenac in the control of cancer-related pain. Comparison between oral and rectal administration, *Drugs*, 46(1): 152–155, 1993.

Cózar J. M., Miñana B., Gómez-Veiga F., Rodríguez Antolín A., Villavicencio H., Cantalapiedra, A. Pedrosa E. Registro nacional de cáncer de próstata 2010 en España, *Actas Urológicas Españolas*, 37(1):12-19, 2013.

Danhier F., Ansorena E., Silva J. M., Coco R., Le Breton A., Prétat V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications, *J. Control. Release*, 161(2): 505-522, 2012.

Dannenberg A. J., Altorki N. K., Boyle J. O., Dang C., Howe L. R., Weksier B. B., Subbaramaiah K. Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer, *The Lancet Oncol.*, 2(9): 544-551, 2001.

Dantu A. S., Durai R., Vedha Hari B. N. Effect of impact and attrition milling on nimesulide for solubility enhancement, *Int. J. App. Pharm.*, 5(2): 1-7, 2013.

Dashora K., Saraf S., Saraf S. Effect of Processing Variables on Micro Particulate System of Nimesulide, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, *Braz. J.Pharm. Sci.*, 43(4), 2007.

De Angelis R., Sant M., Coleman M. P., Francisci S., Baili P., Pierannunzio D., Trama A., Visser O., Brenner H., Ardanaz E., Bielska-Lasota M., Engholm G., Nennecke A., Siesling S., Berrino F., Capocaccia R. EUROCORE-5 Working Group. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EUROCORE-5 a population-based study, *Lancet Oncol.*, 15(1): 23-34, 2014.

De Tommaso V. A watersoluble nimesulide adduct also for injectable use, Patent No. WO 9941233, Micio Pharma Chemica Aktienge, 1999.

Debuigne F., Cuisenaire J., Jeunieu L., Masereel B., Nagy J. B. Nagy. Synthesis of monodisperse nimesulide nanoparticles in microemulsions E170/isopropyl myristate/water/n-butanol (or isopropanol), *J. pharm. Belgiq.*, 55(2): 59-60, 2000.

Deeken J. F., Slack R., Weiss G. J., Ramanathan R. K., Pishvaian M. J., Hwang J., Lewandowski K., Subramaniam D., He A. R., Cotarla I., Rahman A., Marshall J. L. A phase I study of liposomal-encapsulated docetaxel (LE-DT) in patients with advanced solid tumor malignancies, *Cancer chemother. Pharmacol.*, 71(3): 627-633, 2013.

Dhara S., Gub F. X., Langer R., Farokhzad O. C., Lipparda S. J. Lipparda. Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt(IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles, *PNAS*, 105(45): 17356-17361, 2008.

Dinarvand R., Moghadam S. H., Sheikhi A., Atyabi F. Effect of surfactant HLB and different formulation variables on the properties of poly-D,L-lactide microspheres of naltrexone prepared by double emulsion technique, *J. Microencapsul.*, 22(2): 139-151, 2005.

Di Martino P., Censi R., Barthélémy C., Gobetto R., Joiris E., A.Masic, Odou P., Martelli S. Characterization and compaction behaviour of nimesulide crystal forms, *Int. J. Pharm.*, 342(1 y 2): 137-144, 2007.

Domenech Berrozpe J., Martinez Lanao J., Plá Delfina J.M., *Biofarmacia y Farmacocinética. Vol I: Farmacocinética. Ed Síntesis, Madrid, 391-420, 2001.*

Dong X. W., Mattiingly C. A., Tseng M. T., Cho M. J., Liu Y., Adams V. R., Mumper R. J. Mumper. Doxorubicin and Paclitaxel-loaded lipid-based nanoparticles overcome multidrug resistance by inhibiting P-Glycoprotein and depleting ATP, *Cancer Res.*, 69(9): 3918-3926, 2009.

Du L., Zhou J., Wang X., Sheng L., Wang G., Xie X., Xu G., Zhao L., Liao Y., Tang J. Effect of local hyperthermia induced by nanometer magnetic fluid on the rabbit VX2 liver tumor model, *Prog. Nat. Sci.*, 19(12): 1705–1712, 2009.

Elsayed M. M., Cevc G. Turbidity Spectroscopy for Characterization of Submicroscopic Drug Carriers, Such as Nanoparticles and Lipid Vesicles: Size Determination, *Pharm. Res.*, 28(9): 2204-2222, 2011.

Ernsting M. J., Murakami M., Undzys E., Aman A., Press B., Li S. D. A docetaxel-carboxymethylcellulose nanoparticle outperforms the approved taxane nanoformulation, Abraxane, in mouse tumor models with significant control of metastases, *J. Control. Release*, 162(3): 575-581, 2012.

European Medicines Agency. Science Medicines Health. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000297/WC500031811.pdf. Fecha de último acceso: junio 2016.

European Medicines Agency. Science Medicines Health. EMA/73856/2012. Patient Health Protection. 2012.

Facino R. M., Carini M., Aldini G. Antioxidant activity of nimesulide and its main metabolites, *Drugs*, 46 (1): 15–21, 1993.

Fan W., Yan W., Xu Z., Ni H. Formation mechanism of monodisperse low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique, *Colloids and Surf. B: Biointerfaces*, 90 (1): 21-27, 2012.

Farokhzad O. C., Cheng J., Teply B. A., Sherifi I., Jon S., Kantoff P. W., Richie J. P., Langer R. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo, *PNAS*, 103(16): 6315–6320, 2006.

Farokhzad O. C., Jon S., Khademhosseini A., Tran T. N., Lavan D. A., Langer R. Nanoparticle-aptamer bioconjugates: a new approach for targeting prostate cancer cells, *Cancer Res.*; 64: 7668–7672, 2004.

Fredenberg S., Wahlgren M., Reslow M., Axelsson A. Axelsson. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems-a review, *Int. J. Pharm.*, 415(1-2): 34-52, 2011.

Fernández Román M. Estabilidad de Iso preparados oficinales Minoxidil, Sulfato de Cobe y Eosina. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, 2012.

Fonseca C., Simoes S., Gaspar R. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity, *J. Control. Release*, 83: 273–286, 2002.

Fonte P., Soares S., Costa A., Andrade J. C., Seabra V., Reis S., Sarmiento B. Effect of cryoprotectants on the porosity and stability of insulin-loaded PLGA nanoparticles after freeze-drying, *Biomatter*, 2(4): 329-339, 2012.

Forsen E. A. The design and development of DaunoXome® for solid tumor targeting in vivo, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 24(2-3): 133-150, 1997.

Franchi S., Heiman F., Visentin E., Sacerdote P. Survey on appropriateness of use of nimesulide in nine European countries, *Drug Healthc. Patient. Saf.*, 7: 51–55, 2015.

Freitas M. N., Marchetti J. M. Nimesulide PLA microspheres as a potential sustained release for the treatment of inflammatory diseases, *Int. J. Pharm.*, 295(1-2): 201-211, 2005.

Frisch H. L., Wang T. T., Kwei T. K. Diffusion in glassy polymers III, *J. Polymer Sci., Part: A-2*, 7(12): 2019-2028, 1969.

Gao H., Jiang T., Han B., Wang Y., Du J., Liu Z., Zhang J. Aqueous/ionic liquid interfacial polymerization for preparing polyaniline nanoparticles; *Polymer*, 45(9): 3017-3019, 2004.

García Meijide J. A., Gómez-Reino Carnota J. J. Fisiopatología de la ciclooxigenasa-1 y ciclooxigenasa-2, Revista Española de Reumatología, 27(1), 2000.

Gatenbeck L., Johansson B., Stromberg L. Blood perfusion of the male genital organs - an experimental study in the rat, Urol. Res. 15: 291-295, 1987.

Giercksky K. E. COX-2 inhibition and prevention of cancer, Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol., 15(5): 821-833, 2001.

Global Resource for Advancing Cancer Education. COX-2 Inhibitor Therapy: Potential Relevance as Cancer Treatment? Disponible en: <http://cancergrace.org/lung/2007/04/10/cox2-inhibition-and-cancer-intro/> . Fecha última consulta: mayo 2016.

Goycoolea F. M., Remuñán-López C., Alonso M. J. Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano, Monografía XXVIII: Nanotecnología farmacéutica, Real Academia Nacional de Farmacia, 103-131, 2009.

Gryparis E.C., Hatziapostolou M., Papadimitriou E., Avgoustakis K. Anticancer activity of cisplatin-loaded PLGA-mPEG nanoparticles on LNCaP prostate cancer cells, Eur. J. Pharm. Biopharm., 67(1): 1–8, 2007.

Gu F., Langer R., Farokhzad O.C. Farokhzad. Formulation/preparation of functionalized nanoparticles for *in vivo* targeted drug delivery, Methods Mol. Biol., 544: 589–598, 2009.

Gu F., Zhang L., Teply B. A., Mann N., Wang A., Radovic-Moreno A. F., Langer R., Farokhzad O. C. Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers, PNAS, 105(7): 2586–2591, 2008.

Guinesi L. S., Gomes Cavalheiro É. T. The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples, Thermochim. Acta, 444(2): 128-133, 2006.

Gülsün T., Budak C., Vural I., Sahin S., Öner L. Preparation and characterization of nimesulide containing nanocrystal formulations, Pharm. Dev. Technol., 18(3): 653-9, 2013.

Guo C., Gemeinhart R. A. Understanding the adsorption mechanism of chitosan onto poly(lactide-co-glycolide) particles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 70 (2): 597-604, 2008.

Gupta S. K., Bhardwaj R. K., Tyagi P., Sengupta S., Velpandian T. Anti-inflammatory activity and pharmacokinetic profile of a new parenteral formulation of nimesulide, *Pharmacol. Res.*, 39(2): 137–141, 1999.

Haley B., Frenkel E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment, *Urol. Oncol.*, 26(1): 57-64, 2008.

Hattori Y., Maitani Y. Enhanced in vitro DNA transfection efficiency by novel folate-linked nanoparticles in human prostate cancer and oral cancer, *J. Control. Release*, 97(1): 173– 183, 2004.

Hawk E. T., Viner J. L., Dannenberg A., DuBois R. N. COX-2 in cancer: a player that's defining the rules, *J. Natl. Cancer Inst.*, 94(8): 545–546, 2002.

Hawkey C. J. COX-1 and COX-2 inhibitors, *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 15(5): 801-820, 2001.

Higuchi T. Mechanism of sustained action mediation. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices, *J. Pharm. Sci.*, 52: 1145-1149, 1963.

Hoang B., Ernsting M. J., Murakami M., Undzys E. Docetaxel-Carboxymethylcellulose Nanoparticles Display Enhanced Anti-tumor Activity in Murine Models of Castration Resistant Prostate Cancer, *Int. J. Pharm.*, 471(1–2): 224–233, 2014.

Hrkach J., Von Hoff D., Ali M. M., Andrianova E., Auer J., Campbell T., De Witt D., Figa M., Figueiredo M., Horhota A., Low S., McDonnell K., Peeke E., Retnarajan B., Sabnis A., Schnipper E., Song J. J., Song Y. H., Summa J., Tompsett D., Troiano G., Van Geen Hoven T., Wright J., LoRusso P., Kantoff P. W., Bander N. H., Sweeney C., Farokhzad O. C., Langer R., Zale S. Preclinical Development and Clinical Translation of a PSMA-Targeted Docetaxel Nanoparticle with a Differentiated Pharmacological Profile, *Sci. Trans. Med.*, 4(128): 128-39, 2012.

Hroboňova K., Lehotay J., Čižmárik J., Sádecká J. Comparison HPLC and fluorescence spectrometry methods for determination of coumarin derivatives in propolis, *J. Liq. Chromatogr.*, 36(4): 486-503, 2012.

Hu K., Zhou H., Liu Y., Liu Z., Liu J., Tang J., Li J., Zhang J., Sheng W., Zhao Y., Wu Y., Chen C. Hyaluronic acid functional amphipathic and redoxresponsive polymer particles for the co-delivery of doxorubicin and cyclopamine to eradicate breast cancer cells and cancer stem cells, *Nanoscale*, 7: 8607-8618, 2015.

Huang J., Zhang H., Yu Y., Chen Y., Wang D., Zhang G., Zhou G., Liu J., Sun Z., Sun D., Lu Y., Zhong Y. Biodegradable self-assembled nanoparticles of poly (D,L-lactide-co-glycolide)/hyaluronic acid block copolymers for target delivery of docetaxel to breast cancer, *Biomaterials*, 35(1):550-66, 2014.

Huang M., Khor E., Lim L. Y. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation, *Pharm. Res.*, 21: 344–53, 2004.

Huang W. Y., Lin J. N., Hsieh J. T., Chou S. C., Lai C. H., Yun E. J., Lo U. G., Pong R. C., Lin J. H., Lin Y. H. Nanoparticle Targeting CD44-Positive Cancer Cells for Site-Specific Drug Delivery in Prostate Cancer Therapy, *ACS App. Mater. Interfaces*, 8(45): 30722–30734, 2016.

Huang X., Brazel C. S. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems, *J. Control. Release*, 73: 121–136, 2001.

Ippolito J. E., Brandenburg M. W., Ge X., Crowley J. R., Kirmess K. M., Som A., D'Avignon D. A., Arbeit J. M., Achilefu S., Yarasheski K. E., Milbrandt J. Extracellular pH Modulates Neuroendocrine Prostate Cancer Cell Metabolism and Susceptibility to the Mitochondrial Inhibitor Niclosamide, *PLoS One*, 11(7): e0159675, 2016.

Jain N. K., *Pharmaceutical Technology*, 2007. Council of Scientific and Industrial Research. National Institute of Science Communication and Information Resources (SIR-NISCAIR, India). National Science Digital Library (NSDL). Disponible en: http://nsdl.niscair.res.in/jspui/handle/123456789/748?mode=full&submit_simple=Show+full+item+record.

Fecha de ultimo acceso: junio 2016.

Jaina A., Thakur K., Kusha P., Jain U. K. Docetaxel loaded chitosan nanoparticles: Formulation, characterization and cytotoxicity studies, *Int. J. Biol. Macromol.*, 69: 546-553, 2014.

Johannsen M., Gneveckow U., Eckelt L., Feussner A., Waldofner N., Scholz R., Deger S., Wust P., Loening S.A., Jordan A. Clinical hyperthermia of prostate cancer using magnetic nanoparticles: presentation of a new interstitial technique, *Int. J. Hyperthermia*, 21(7): 637–647, 2005.

Johannsen M., Gneveckow U., Thiesen B., Taymoorian K., Hee Cho C., Waldofner N., Scholz R., Jordan A., Loening S. A., Wust P. Thermotherapy of Prostate Cancer Using Magnetic Nanoparticles: Feasibility, Imaging, and Three-Dimensional Temperature Distribution, *Eur. Urol.*, 52(6): 1653–1662, 2007.

Johannsen M., Thiesen B., Wust P., Jordan A. Magnetic nanoparticle hyperthermia for prostate cancer, *Int. J. Hyperthermia*, 26(8): 790-5, 2010.

Jokerst J. V., Lobovkina T., Zare R. N., Gambhir S. S.. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy, *Nanomedicine*, 6(4): 715-728, 2011.

Kataoka M., Isubata S., Masaoka Y., Sakuma S., Yamashita S. Yamashita. In vitro dissolution/permeation system to predict the oral absorption of poorly water-soluble drugs: effect of food and dose strength on it, *Biol.Pharm. Bull.*, 34(3): 401-407, 2011.

Khan S. A., Ahmad M., Aamir M. N., Murtaza G., Rasool F., Akhtar M. Study of nimesulide release from ethylcellulose microparticles and drug polymer compatibility analysis, *Lat. Am. J. Pharm.*, 29(4): 554-561, 2010.

Khan S. A., Ahmad M., Murtaza G., Aamir M. N., Rehman N., Kousar R., Rasool F., Akhtar M. Formulation of Nimesulide Floating Microparticles Using Low-viscosity Hydroxypropyl Methylcellulose, *Trop. J. Pharm. Res.*, 9(3): 293-299, 2010.

Khan S. A., Ahmad M., Murtaza G., Aamir M. N., Rehman N., Madni A. U. Sustained release nimesulide microparticles: evaluation of release modifying property of ethylcellulose. *JCSP*, 33(1): 75-81, 2011.

Khan S. A., Ahmad M., Shoaib H. M., Murtaza G., Aamir M. N., Kousar R., Rasool F., Madni A. Development of in vitro-in vivo correlation for nimesulide loaded ethylcellulose microparticles, *Lat. Am. J. Pharm.*, 29(6): 1029-1034, 2010.

Kim B. S., Kim C. S., Lee K. M. The Intracellular Uptake Ability of Chitosan-coated Poly (D,L-lactide-co-glycolide) Nanoparticles, *Arch. Pharm. Res.*, 31(8): 1050-1054, 2008.

Knudson W., Chow G. and Knudson C. CD-44 mediated uptake and degradation of hyaluronan, *Matrix biol.*, 21(1): 15-23, 2002.

Koki A. T., Khan N. K., Woerner B. M., Seibert K., Harmon J. I., Dannenberg A. J., Soslow R. A., Masferrer J. L. Characterization of cyclooxygenase-2 (COX-2) during tumorigenesis in human epithelial cancers: evidence for potential clinical utility of COX-2 inhibitors in epithelial cancers, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 66(1): 13-18, 2002.

Konan Y. N., Gurny R, Allémann E. Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles, *I. J. Pharm.*, 233 (1-2), 239-252, 2002.

Koosha M., Mirzadeh H., Shokrgozarb M. A., Farokh M. Nanoclay-reinforced electrospun chitosan/PVA nanocomposite nanofibers for biomedical applications, *RSC*, 5: 10479–10487, 2015.

Korang-Yeboah M., Gorantla Y., Paulos S. A., Sharma P., Chaudhary J., Palaniappan R. Polycaprolactone/maltodextrin nanocarrier for intracellular drug delivery: formulation, uptake mechanism, internalization kinetics, and subcellular localization, *Int. J. Nanomedicine*, 29 (10):4763-81, 2015.

Korsmeyer R. W., Gurny R., Doelker E., Buri P., Peppas N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers, *Int. J. Pharm.*, 15(1): 25-35, 1983.

Kou L., Sun J., Zhai Y., He Z. The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design, *Asian J. Pharm. Sci.*, 8: 1–8, 2013.

Kováčková P., Mokřý M., Klime J. Photochemical stability of nimesulide, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 31(4): 827-832, 2003.

Krishna S. A., Amareshwar P. J. Preparation and characterization of nimesulide loaded cellulose acetate hydrogenphthalate nanoparticles by salting out technique, *WJPPS*, 1(1): 21–27, 2013.

Krishna S. A., Amareshwar P., Chakravarty P. Chitosan nanoparticles as a drug delivery system, *RJPBCS*, 1(3): 474–484, 2010.

Krishnan S., Diagaradjane P., Cho S.H. Nanoparticle-mediated thermal therapy: evolving strategies for prostate cancer therapy, *Int. J. Hyperthermia*, 26(8): 775–789, 2010.

Kucukguzel S.G., Kucukguzel I., Oral B., Sezen S., Rollas S., Detection of nimesulide metabolites in rat plasma and hepatic subcellular fractions by HPLC-UV/DAD and LC-MS/MS studies. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 30 (1-2): 127-134, 2005.

Kumari A., Yadav S.K., Yadav S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, *Colloids and Surf. B: Biointerfaces*, 75(1): 1-18, 2010.

Lal Pal S., Jana U., Manna P.K., Mohanta G.P., Manabalan R. Nanoparticle: an overview of preparation and characterization, *J. Appl. Pharm. Sci.*, 1(6): 228-234, 2011.

Li S., Huang L. Pharmacokinetics and Biodistribution of Nanoparticles, *Mol. Pharm.*, 5(4): 496-504, 2008.

Li S-D., Ernsting M. J., Tang W-L. Cellulose-based nanoparticles for drug delivery, US 20120219508 A1, Estados Unidos, 2012.

Liang M., Llang H., Fu J. Nimesulide inhibits IFN- γ induced programmed death-1-ligand surface expression in breast cancer cells by COX-2 and PEG2 independent mechanisms, *Cancer Let.*, 276(1): 47-52, 2009.

López Gasco P. Preparación, caracterización y evaluación biológica de nanopartículas poliméricas para la liberación controlada del paclitaxel. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, 2011.

Mansur H. S., Sadahira C. M., Souza A. N., Mansur A. A. P. FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde, *Mate. Sci. Eng.*, 28: 539-548, 2008.

Maros M. C., Díaz Martínez V. Citometría de flujo: midiendo células. BiotechSpain: técnicas, 2011. Disponible en: https://biotechspain.com/?iid=1104a_tecnica_citometra&itid=5&lan=es. Fecha último acceso: julio 2017.

Meriani F., Coceani N., Sirotti C., Voinovich D., Grassi M. In vitro nimesulide absorption from different formulations. *J. Pharm. Sci.*, 93(3): 540-552, 2004.

Meziani M. J., Pathak P., Hurezeanu R., Thies M. C., Enick R. M., Sun Y-P. Supercritical-Fluid Processing Technique for Nanoscale Polymer Particles; *Angewandte Chemie Int. Ed.*, 43(6): 704-707, 2004.

Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, Guía de Práctica Clínica sobre Tratamiento de Cáncer de Próstata, ISBN: 978-84-612-5322-7, 2008.

Mishra P., Nayak B., Dey R. K. PEGylation in anti-cancer therapy: An overview, *Asian J. Pharm. Sci.*, 11(3): 337-348, 2016.

Monti T., Mossi W. Nimesulide micronized salts, Patent, No. EP O937709, Helsinn Healthcare S. A., 1999.

Mottet N., Bellmunt J., Briers E., Van den Bergh R. C. N., Bolla M., Van Casteren N. J., Cornford P., Culine S., Joniau S., Lam T., Mason M. D., Matveev V., Van der Poel H., Van der Kwast T. H., Rouvière O., Wiegel T. Guidelines on Prostate Cancer, European Association of Urology, 2015.

Mukerjee A., Wishwanatha J. K. Formulation, Characterization and Evaluation of Curcumin-loaded PLGA Nanospheres for Cancer Therapy, *Anticancer Res.*, 29(10): 3867-3876, 2009.

Mukherjee D., Nissen S. E., Topol E. J. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors, *JAMA*, 286(8): 954-959, 2001.

Nakatsugi S., Terada N., Yoshimura T., Horie Y., Furukawa M. Effects of nimesulide, a preferential cyclooxygenase-2 inhibitor, on carrageenan-induced pleurisy and stress-induced gastric lesions in rats, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 55(6): 395–402, 1996.

Nalluri B. N., Chowdary K. P., Murthy K. V., Hayman A. R., Becket G. Physicochemical characterization and dissolution properties of nimesulide-cyclodextrin binary systems, *AAPS PharmSciTech*, 4(1): E2, 2003.

Nkabinde L. A., Shoba-Zikhali L. N., Semete-Makokotlela B., Kalombo L., Swai H. S., Hayeshi R., Naicker B., Hillie T. K., Hamman J. H. Permeation of PLGA Nanoparticles Across Different in vitro Models, *Curr. Drug Deliv.*, 9(6): 617-627, 2012.

Owens D. E., Peppas N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles, *Int. J. Pharm.*, 307(1): 93-102, 2006.

Özalp S. S., Eren C. Y., Bostancıoğlu R. B., Koparal A. T. Koparal. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by the cyclooxygenase enzyme blocker-nimesulide in the Ishikawa endometrial cancer cell line, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 164(1): 79-84, 2012.

Pan Y., Zhang J-S., Gazi M.H., Young C. Y. F. Young. The cyclooxygenase 2-specific nonsteroidal anti-inflammatory drugs celecoxib and nimesulide inhibit androgen receptor activity via induction of c-Jun in prostate cancer cells, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 12(8): 769-774, 2003.

Patrawala L., Calhoun T., Schneider-Broussard R., Li H., Bhatia B., Tang S., Reilly J. G., Chandra D., Zhou J., Claypool K., Coghlan L., Tang D. G. Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells, *Oncogene*, 25: 1696–1708, 2006.

Park J. H., Saravanakumar G., Kim K., Kwon I. C. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives, *Adv. Drugs Deliv. Rev.*, 62(1): 28- 41, 2010.

Perera G., Greindl M., Palmberger T. F., Bernkop-Schnurch A. Insulin-loaded poly(acrylic acid)-cysteine nanoparticles: Stability studies towards digestive enzymes of the intestine, *Drug Deliv.*, 16(5): 254-260, 2009.

Pillai G. Nanomedicines for Cancer Therapy: An Update of FDA Approved and Those under Various Stages of Development, *SOJ Pharm. Pharm. Sci*, 1(2): 1–13, 2014.

Pushpendra J., Amit M., Yadav S. K., Patlvik, Baghel U. S. Formulation development and characterization of solid lipid nanoparticles containing nimesulide, *IJDDT*, 1(1): 24-27, 2009.

Raffin R. P., Lima A., Lorenzoni R., Antonow M. B., Turra C., Alves M. P., Fagan S. B. Fagan. Natural lipid nanoparticles containing nimesulide: synthesis, characterization and in vivo antiedematogenic and antinociceptive activities, *J. Biom. Nanotechnol.*, 8(2): 309–315, 2012.

Raikara U. S., Renukaa C. G., Nadafa Y. F., Mulimania B. G., Karguppikara A. M., Soudagar M. K. Solvent effects on the absorption and fluorescence spectra of coumarins 6 and 7 molecules: Determination of ground and excited state dipole moment, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 65(3–4): 673–677, 2006.

Rainsford K. D. Nimesulide-Actions and Uses, The discovery, development and novel actions of nimesulide, Ed. Birkhäuser Verlag, Basilea, 1-61, 2005.

Rainsford K. D., Bevilacqua M., Dallegri F., Gago F., Ottonello L., Sandrini G., Tassorelli C., Tavares I. G. Pharmacological properties of nimesulide, Nimesulide – Actions and Uses, Birkhäuser, Verlag, Basilea/Suiza, 133-244, 2005.

Rainsford K. D. and Members of the Consensus Report Group on Nimesulide, Nimesulide – a multifactorial approach to inflammation and pain: scientific and clinical consensus, *Curr. Med. Res. Opin.*, 22(6): 1161-1170, 2006.

Ramya R., Sudha P. N., Mahalakshmi J. Preparation and Characterization of Chitosan Binary Blend, *International Journal of Scientific and Research Publications*, 2(10), 2012.

Rang H. P., Dale M. M. Rang y Dale. *Farmacología*. Elsevier España, S.L. Séptima edición, 318-326. 2012.

Ravari N. S., Goodarzi N., Alvandifar F., Amini M., Sourì E., Khoshayand M. R., Mirzaie Z. H., Atyabi F., Dinarvand R. Fabrication and biological evaluation of chitosan coated hyaluronic acid-docetaxel conjugate nanoparticles in CD44+ cancer cells, *J. Pharm. Sci.*, 24(21), 2016.

Ravikumara N. R., Madhusudhan B., Nagaraj T. S., Aditya N. P., Hiremat S., Raina G. Raina. Preparation and evaluation of nimesulide-loaded ethylcellulose and methylcellulose nanoparticles and microparticles for oral delivery, *J. Biomater. Appl.*, 24(1): 47–64, 2009.

Reis C. P., Neufeld R. J., Ribeiro A. J., Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles; *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2(1): 8-21, 2006.

Rejman J., Oberle V., Zuhorn I. S., Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis, *Biochem. J.*, 377: 159-169, 2004.

Rieux A., Fievez V., Garinot M., Schneider Y., Pr at V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach, *J. Control. Release*, 116(1): 1–27, 2006.

Rocha Formiga F., Ansorena E., Estrella-Hermoso de Mendoza A., Imbuluzqueta E., González D., Blanco Prieto M. J. Nanosistemas a base de poli steres, Monograf a XXVIII: Nanotecnología farmacéutica, Real Academia Nacional de Farmacia, 41-101, 2009.

Roco M. C. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 14(3): 337-346, 2003.

Rottem S., Kosower N. S., Kornspan J. D. Contamination of Tissue Cultures by Mycoplasmas, *Biomedical Tissue Culture*, Dr. Luca Ceccherini-Nelli (Ed.), 2012.

Sahoo S. K., Panyam J., Prabha S., Labhasetwar V. Residual polyvinyl alcohol associated with poly (d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake, *J. Control. Release*, 82(1): 105-114, 2002.

Sanjeeb S. K., Wenxue M. A.; Labhasetwar V. Efficacy of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles in a murine model of prostate cancer, *Int. J. Cancer*, 112(2): 335–340, 2004.

Sanna V., Roggio A. M., Posadino A. M., Cossu A., Marceddu S., Mariani A., Alzari V., Uzzau S., Pintus G., Sechi M. Novel docetaxel-loaded nanoparticles based on poly(lactide-co-caprolactone) and poly(lactide-co-glycolide-co-caprolactone) for prostate cancer treatment: formulation, characterization, and cytotoxicity studies, *Nanoscale Res. Lett.*, 6(1): 260, 2011.

Sanna V., Sechi M. Nanoparticle therapeutics for prostate cancer treatment. *Maturitas*, 73: 27–32, 2012.

Sengel-Turk C. T., Can Oz U., Serim T. M., Hascicek C. Formulation and optimization of nonionic surfactants emulsified nimesulide-loaded PLGA-based nanoparticles by design of experiments, *AAPS PharmSciTech*, 15(1): 161–176, 2014.

Shahiwala A., Misra A. Studies in topical application of niosomally entrapped nimesulide, *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 5: 220-225, 2002.

Sharma N., Madan P., Lin S. Effect of process and formulation variables on the preparation of parenteral paclitaxel-loaded biodegradable polymeric nanoparticles: A co-surfactant study, *Asian Journal of Pharm. Sci.*, 11(3): 404-416, 2016.

Shepard D. R., Dreicer R., Garcia J., Elson P., Magi-Galluzzi C., Raghavan D., Stephenson A. J., Klein E. A. Phase II trial of neoadjuvant nab-paclitaxel in high risk patients with prostate cancer undergoing radical prostatectomy, *J. Urology*, 181(4): 1672-1677, 2009.

Siewert M., Dressman J., Brown C. K., Shah V. P.. FIP/AAPS guidelines for dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms, *AAPS PharmSciTech*, 4(1): E7, 2003.

Sigma Aldrich. RESOMER® Biodegradable Polymers for Medical Device Applications Research. Disponible en: <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/polymerscience/resomer.html>. Fecha última consulta: junio 2016.

Silva C. O., Molpeceres J., Batanero B., Fernandes A. S., Saraiva N., Costa J. G., Rijo P., Figueiredo I. V., Faísca P., Reis C. P. Functionalized diterpene parvifloron D-loaded hybrid nanoparticles for targeted delivery in melanoma therapy. *Ther. Deliv.*, 7 (8): 521-544, 2016.

Silverman J.A., Deitcher S.R. Marqibo® (vincristine sulfate liposome injection) improves the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vincristine, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 71: 555-564, 2013.

Singh G., Kaur T., Kaur R., Kaur A. Recent biomedical applications and patents on biodegradable polymer PLGA, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 1(2): 30-42, 2014.

Sobolewski C., Cerella C., Dicato M., Ghibelli L., Diederich M. The Role of Cyclooxygenase-2 in Cell Proliferation and Cell Death in Human Malignancies, *Int. J. Cell. Biol.*, 2010.

Song X., Zhao Y., Wu W., Bi Y., Cai Z., Chen Q., Li Y., Hou S. PLGA nanoparticles simultaneously loaded with vincristine sulfate and verapamil hydrochloride: Systematic study of particle size and drug entrapment efficiency, *Int. J. Pharm.*, 350(1-2): 320-329, 2008.

Soslow R. A., Dannenberg A. J., Rush D., Woerner B. M., Khan K. N., Masferrer J., Koki A. T. COX-2 is expressed human pulmonary, colonic and mammary tumors, *Cancer*, 89(12): 2637–2645, 2000.

Steiner A. A., Li S., Llanos Q., Blatteis C. M. Differential inhibition by nimesulide of the early and late phases of intravenous and intracerebroventricular LPS-induced fever in guinea pigs, *Neuroimmunomodulation*, 9(5): 263–275, 2001.

Subongkot S., Frame D., Leslie W., Drajer D. Selective cyclooxygenase-2 inhibition: a target in cancer prevention and treatment, *Pharmacotherapy*, 23(1): 9-28, 2003.

Swingle K. F., Moore G. G. I., Grant T. 4-Nitro-2-phenoxy methane sulfonanilide (R805), a chemically novel antiinflammatory agent, *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, 221(1): 132-139, 1976.

Taketo M. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part I), *J. Natl. Cancer Inst.*, 90(20):1529–36, 1998.

Tanaka K., Shimotori T., Makino S., Aikawa Y., Inaba T., Yoshida C., Tanako S. Pharmacological studies of the new anti-inflammatory agent 3-formylamino-7-methyl-sulfonylamino-6-phenoxy-4H-1- benzopyran-4-one, 1st Communication: Antiinflammatory, analgesic and other related properties. *Arzneimittel Forschung*, 42: 935–944, 1992.

Tofanetti O., Casciarri I., Cipolla P. V., Cazzulani P., Omini C. Effect of nimesulide on cyclooxygenase activity in rat gastric mucosa and inflammatory exudates, *Med. Sci. Res.*, 17: 745–746, 1989.

Vaculikova E., Cernikova A., Placha D., Pisarcik M., Dedkova K., Peikertova P., Devinsky F., Jampilek J. Cimetidine Nanoparticles for Permeability Enhancement, *JNN*, 16(8): 7840-7843, 2016.

Vasir J. K., Labhassetwar V. Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 59(8): 718-728, 2007.

Viseras Iborra M. T. Desarrollo galénico de preparados obtenidos por interacción del ácido 5-aminosalicílico con halloysita. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, 2008.

Wang R., Billone P. S., Mullett W. M. Nanomedicine in Action: An Overview of Cancer Nanomedicine on the Market and in Clinical Trials, *J. Nanomater.*, 2013.

Wang J., Wang B. M., Schwendeman S. P. Characterization of the initial burst release of a model peptide from poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres, *J. Control. Release*, 82: 289–307, 2012.

Wang M., Zhang Y., Feng J., Gu T., Dong Q., Yang X., Sun Y., Wu Y., Chen Y., Kong W. Preparation, characterization, and in vitro and in vivo investigation of chitosan-coated poly (d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles for intestinal delivery of exendin-4, *Int. J. Nanomedicine*, 8:1141-54, 2013

Wang Y., Li P., Kong L. Chitosan-modified PLGA nanoparticles with versatile surface for improved drug delivery, *AAPS PharmSciTech*, 14: 585–592, 2013.

Ward A., Brogden R. N. Nimesulide: a preliminary review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in inflammation on pain states, *Drugs*, 36(6): 732–753, 1988.

Win K. Y., Feng S-S. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs, *Biomaterials*, 26 (15): 2713-2722, 2005.

Yang H-C., Hon M-H. The effect of the molecular weight of chitosan nanoparticles and its application on drug delivery, *Microchemical Journal*, 92(1): 87-91, 2009.

Yardley D.A. Nab-paclitaxel mechanism of action and delivery, *J. Control Release*, 170 (3): 365-372, 2013.

Yhee J. Y., Im J., Nho R. S. Advanced Therapeutic Strategies for Chronic Lung Disease Using Nanoparticle-Based Drug Delivery, *J. Clin. Med.*, 5(9): 82, 2016.

Yoo H. S., Oh J. E., Lee K. H., Park T. G. Biodegradable nanoparticles containing PLGA conjugate for sustained release; *Pharm. Res.*, 16(7): 1114-1118, 1999.

Yoshimura R., Sano H., Masuda C. Expression of cyclooxygenase-2 in prostate carcinoma, *Cancer*, 89(3): 589–596, 2000.

Zheng D., Li X., Xu H., Lu X., Hu Y., Fan W. Study on docetaxel-loaded nanoparticles with high antitumor efficacy against malignant melanoma, *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 41(7): 578-587, 2009.

Zimmermann E., Muller R. H., Madder K. Influence of different parameters on reconstitution of lyophilized SLN, *Int. J. Pharm.*, 196(2): 211-213, 2000.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

Pharmaceutical nanotechnology

Nimesulide-loaded nanoparticles for the potential adjuvant treatment of prostate cancer



Concepción Huerta, María del Rosario Aberturas, Jesús Molpeceres*

Unit of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Department of Biomedical Sciences, School of Pharmacy, Ctra A-2 km 33.600, University Campus, University of Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 April 2015
 Received in revised form 7 July 2015
 Accepted 9 July 2015
 Available online 20 July 2015

Keywords:

Nimesulide
 nanoparticles
 prostate cancer
 chitosan
 PLGA
 PAMPA

ABSTRACT

Nimesulide (NS)-loaded nanoparticles (NPNS) were prepared from poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and eventually coated with chitosan (NPNSCS). Nanoparticles (NP) were spherical with sizes 379 ± 59 nm for NPNS and 393 ± 66 nm for NPNSCS and zeta potentials of -15 ± 3 mV for NPNS to 10 ± 4 mV for NPNSCS, suggesting an efficient coating. Drug encapsulation rate was high ($88 \pm 5\%$ and $83 \pm 7\%$ of added drug) for NPNS and NPNSCS, respectively. After NP washing and re-suspension, $98 \pm 2\%$ and $99 \pm 1\%$ of the drug initially entrapped remained associated to NP. NS was dispersed in amorphous state within the polymeric matrix. Two-fold dilution of NP with pH 7.4 PBS provoked no drug release. However, 30–40% NS was released after a 1/10 dilution. NPNSCS and NPNS diluted 1/100 reduced the encapsulated drug to around 30% and 70%, respectively. In contrast, 100% NS was released from NP under sink conditions in less than 2 h. The permeability of free-NS ($1-1.5 \times 10^{-5}$ cm/s) was compared with NPNS (NPNS = $6.4-8.1 \times 10^{-6}$ cm/s and NPNSCS = $5.5-7.0 \times 10^{-6}$ cm/s) using the PAMPA assay. The cytotoxicity of free-NS and NS in NP on model prostate cancer cells PC-3 and DU-145 showed the highest cytotoxic effect with NPNSCS on PC-3 cells ($IC_{50} = 89 \mu\text{M}$).

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

NS (*N*-(4-nitro-2-phenoxyphenyl)methanesulfonamide) is a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) with preferential inhibition of the COX-2 isoform (Bernareggi and Rainsford, 2005). Accordingly, it is used for the relief of pain, symptomatic treatment of painful osteoarthritis, extra-articular disorders and other acute pain states (Rainsford, 2005). NS overall gastrointestinal toxicity is comparable to other NSAIDs but it is associated with an increased risk for hepatotoxicity. To minimise these risks, EMA considered that the maximum duration of treatment with NS must be 15 days (EMA, 2001).

It has been suggested that NSAIDs at high doses show a potential in cancer treatment (Hawk et al., 2002). Prostate cancer is the most common male malignancy and the second leading cause of cancer death in Western industrialized countries (Jemal et al., 2009). It has been shown that the COX-2 isoform is over-expressed

in different epithelial cancers such as the prostate (Soslow et al., 2000) but Pan et al. (2003) have clearly shown that the effect mediated by NS requires far higher concentrations ($25 \mu\text{M}$) than that (at approximately $1 \mu\text{M}$ or lower levels) to inhibit COX-2 activity. Therefore, the high doses of NS needed for cancer treatment using the commercially available formulations intended for systemic administration would be associated to unacceptable toxic effects.

An alternative approach to systemic administration of drugs for the treatment of some epithelial cancers affecting tissues or organs readily accessible from the skin surface could be loco-regional administration. This can be achieved by intra-arterial infusion of the chemotherapeutic agents upstream of the tumor and also through direct intra-tumor injection (Al-Ghananeem et al., 2009).

Colloidal drug carriers are being increasingly investigated for sustained release effects and to achieve targeted delivery, particularly focused on anticancer drugs. In addition, nanodevices with optimal bio-physicochemical properties for treatment and diagnosis of prostate cancer are under extensive research (Sanna et al., 2011; Sanna and Sechi, 2012). One of the most advanced approaches is the BIND-014 PLGA NP-Docetaxel formulation developed by Langer, (Farokhzad et al., 2006; Alexis et al., 2010) that recently showed positive results in phase II clinical trials.

Abbreviations: NP, nanoparticles; PLGA, poly-lactide-co-glycolide acid; NS, nimesulide; CS, chitosan; PVA, polyvinyl alcohol; NPB, empty nanoparticles; NPBCS, empty nanoparticles coated with chitosan; NPNS, nimesulide-loaded nanoparticles; NPNSCS, nimesulide-loaded nanoparticles coated with chitosan.

* Corresponding author. Fax: +34 918854658.

E-mail address: jesus.molpeceres@uah.es (J. Molpeceres).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.07.027>
 0378-5173/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

The nanotransformation of NS has been previously investigated by different authors. Debuigne et al. (2001) reported the formation of solid NS nanocrystals around 4–6 nm from biocompatible microemulsions for drug delivery applications. NS has also been incorporated in NP made from cellulose polymers (Krishna and Amareshwar, 2013; Madhusudhan et al., 2009) or PLGA (Sengel-Turk et al., 2014). These formulations ensured a sustained drug release reducing the dosing requirements and adverse effects. The incorporation of NS into solid lipid nanoparticles (SLN) improved its therapeutic efficacy against cancer (Bondi et al., 2009) or inflammation by modulating drug dissolution (Raffin et al., 2012; Jain et al., 2009). NS was also incorporated into hydrophilic semisolid NP formulations showing an increased anti-inflammatory effect as compared to free-drug (Alves et al., 2007; Lenz et al., 2012).

Although intra-tumor administration of NP guarantees high local drug concentrations, NP can be targeted to cancer cells within the prostate if they are surface modified (Al-Ghananeem et al., 2009; Farokhzad et al., 2006; Alexis et al., 2010; Alexis et al., 2010). Different studies report on the surface coating of PLGA NP by hydrophilic polymers such as CS to improve NP-cell interactions (Krishna et al., 2010; Parveen and Sahoo, 2011; Nafee et al., 2005).

Therefore, the lower cost of NS and its potent pharmacological effect as compared to other COX-2 inhibitors seem to be good arguments to investigate the design and development of NP-based formulations loading NS for intra-prostate administration able to target the drug to cancer cells, thereby achieving high drug concentrations at the tumor site and reducing systemic exposure and hepatotoxicity. The objective of the present work has been the development and characterization of biodegradable NS-loaded NP for intra-prostate injection in the adjuvant treatment of prostate cancer.

2. Materials and methods

2.1. Materials

NS, PVA (mw 30,000–70,000), high molecular weight CS and MTT were purchased from Sigma–Aldrich (Spain). PLGA (RG-504, Resomer, mw 45,000) was purchased from Boehringer Ingelheim (Germany). The solvents used were Milli-Q ultrapure water, dichloromethane and dodecane from Panreac (Spain) and acetic acid, DMSO and acetonitrile HPLC grade from Scharlab (Spain). Lecithin was purchased from MPBio (Spain). RPMI 1640 (Invitrogen Ref. 21,875), 10% fetal bovine serum (Invitrogen Ref. 10,499) and the antibiotic mixture containing 1% Penicillin/ Streptomycin/ Amphotericin B (Invitrogen Ref. 15,240) were obtained from Life Technologies (Argentina). PC-3 and DU-145 cells were obtained from the ATCC (Spain).

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of NP

NPNS were obtained by the emulsion-solvent evaporation method (Win et al., 2003; Molavi et al., 2009). An organic phase containing the polymer and the drug was emulsified with a 1% PVA aqueous phase by using an ultrasonic tip for 5 minutes at 250W. After organic solvent evaporation, excess PVA was removed by centrifugation at $12,000 \times g$ for 15 min and NP pellet re-suspended in ultrapure water. NPNSCS were obtained in the same way but re-suspending the pellet in a 0.1% CS solution in 0.5% acetic acid followed by an incubation period of 15 min at 37 °C. After, excess CS was removed by centrifugation at $20,000 \times g$ for 15 min and NPNSCS pellet was re-suspended in ultrapure water. These procedures were also reproduced in the absence of NS to obtain placebo NP (NPB or NPBCS) that were used as control. NS aqueous

suspensions were also prepared by the same method in the absence of PLGA.

2.2.2. NP size and zeta potential

Particle size and zeta potential of NP dispersed in milli-Q water (1:10) were measured by means of dynamic light scattering (Microtrac UPA and Zetatrac equipments, respectively). Scanning electron microscopy (SEM, Carl Zeiss DSM 950) was used to confirm NP size and to determine their morphology. SEM studies were carried out on sputter gold-coated NP pellets (Polaron E-5000) obtained after dilution, centrifugation and gradual drying on top of aluminum stubs.

2.2.3. Determination of the drug encapsulation rate

The drug encapsulation rate (%ER) was assessed by UV–vis spectrometry (Shimadzu UV-PC2101) at a wavelength of 230 nm. ER was estimated from the total amount of NS found in the NP (Q_{susp}) and the drug lost in the supernatant after NP washing for PVA ($12,000 \times g$ 15 min) and/or CS ($20,000 \times g$ 15 min) excess removal (Q_{ste}), according to the following equation:

$$\%ER = \frac{(Q_{\text{susp}}) \times 100}{(Q_{\text{susp}} + Q_{\text{ste}})}$$

The yield was determined by comparing the weight of the dry residues (W_{RS}) obtained after centrifugation of NP (500 μl aliquots) at $20,000 \times g$ for 15 min and the theoretical weight of drug and polymer in the same volume calculated by using the final formulation volume (V_{F}):

$$\%Yield = \frac{W_{\text{RS}} \times 100}{[(Q_{\text{PLGA}} + Q_{\text{NS}}) \times (0.5/V_{\text{F}})]}$$

2.2.4. Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC scans of raw materials, physical mixtures, empty and NS-loaded NP were performed on a DSC Mettler DSC-30, TA 4000 calorimeter (Mettler-Toledo). Indium was used to calibrate the instrument. The thermograms of samples were obtained at a scanning rate of 5 °C/min in a temperature range from 20 to 300 °C under a N_2 purge.

2.2.5. FTIR studies

The samples' infrared spectra were tested with FTIR (PerkinElmer 2200 Spectrometer). Scans were recorded in the standard wave-number range of 400–4000 cm^{-1} at a resolution of 4 cm^{-1} . NP and raw materials powder samples were mixed with dry KBr at 1/10 dilutions. The detector was carefully purged by clean dry helium gas to increase the signal level and reduce moisture.

2.2.6. In vitro drug release studies

Immediate release in water and pH 7.4 PBS was studied at room temperature whereas drug release over time was evaluated in pH 7.4 PBS at 37 °C. For immediate release assays, different volumes of NP formulations (10, 100, 500 μl) were made up to a final volume of 1 ml in eppendorf tubes. Immediately, the tubes were centrifuged at $20,000 \times g$ for 15 min and drug concentrations in the supernatant determined by UV–vis spectrophotometry at 230 nm and 402 nm in water and pH 7.4 PBS media, respectively. These experiments were also reproduced with free-NS to evaluate the effect of drug solubility in the release medium.

Drug release studies were performed under sink conditions by incubating 20 μl of NPNS and NPNSCS in 1.5 ml of pH 7.4 PBS at 37 °C. Samples were taken at 2, 4, 7, 15 and 24 h and centrifuged at

20,000 × g for 15 min. The NS released was quantified by UV–vis spectrophotometry at 402 nm.

2.2.7. Permeability studies

Permeability studies were performed by the PAMPA method. The assay was carried out on 96-well plates where donor and acceptor compartments are separated by a PVDF membrane filter pre-treated with a lipid-containing organic solvent (5 μl of 2% lecithin in dodecane). The donor compartment (total volume 150 μl) contained 100, 200, and 400 μM free-NS dissolved in 5% DMSO/pH 7.4 PBS or 7.5, 15 and 25 μl of NPNS or NPNSCS. The receptor compartment comprised 300 μl of 5% DMSO in pH 7.4 PBS. After 6 h of incubation at room temperature the amounts of NS in the donor and receptor compartments were determined by UV–vis spectrometry at a wavelength of 402 nm. Apparent permeability coefficients (P_e) were calculated with the following equation:

$$\log P_e = \log \left[C \left(- \ln \left(1 - \left(\frac{NS_{acc}}{NS_{eq}} \right) \right) \right) \right]$$

where C is calculated from the volumes of donor (V_D) and acceptor (V_A) compartments, active surface area and incubation time according to:

$$C = \frac{V_D \times V_A}{(V_D + V_A) \times \text{Area} \times \text{Time}}$$

The reference equilibrium concentration (NS_{eq}) is the resulting concentration if the donor and acceptor media were combined and NS_{acc} is the initial concentration of drug in the acceptor compartment.

Mass balance and the amounts of NS present in donor and acceptor compartment were also calculated using the following equations:

$$Q_{INS} = NS_{eq} \times V_t$$

where Q_{INS} is the initial amount of NS present in each well, Q_{donor} and $Q_{acceptor}$ stand for total amount of NS in donor and acceptor compartment and V_t is the sum of both, donor and acceptor compartment volumes

$$\%NS \text{ total} = \frac{(Q_{donor} + Q_{acceptor}) \times 100}{(Q_{INS})}$$

$$\%NS \text{ donor} = \frac{(Q_{donor}) \times 100}{(Q_{INS})}$$

$$\%NS \text{ receptor} = \frac{(Q_{acceptor}) \times 100}{(Q_{INS})}$$

2.2.8. In vitro therapeutic efficacy: cell cultures

Drug efficacy was assayed in two cell culture models of prostate cancer (PC-3 and DU-145 cells) using the MTT test. Both types of cells were seeded at a 15,000 viable cells/well density in 24-well plates. The cells were re-suspended in RPMI 1640 with 10% fetal bovine serum and an antibiotic mixture containing 1% Penicillin/Streptomycin/ Amphotericin B.

Cells were incubated ($n \geq 4$) for 48 h with increasing concentrations of free-NS added in 5 μl DMSO (equivalent to 5, 10, 25, 50, 100, 200 and 400 μM) and variable volumes (10–160 μl) of empty and drug-loaded NP formulations equivalent to 32, 64, 125, 240 and 447 μM NS concentrations and 50–1380 μg/ml for NP.

Incubations with empty NP (80 and 160 μl) plus free-drug (200 and 400 μM) were used as reference. Cells treated with 5 μl DMSO were used as control. Cell viability was calculated using the following equation:

$$\%Viability = \frac{Abs_{sample} \times 100}{Abs_{control}}$$

2.2.9. Statistical analysis

Statistical analysis of data was performed with ANOVA and multiple range test by using the Statgraphics Plus software version 5.1.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of NP

The emulsion-solvent evaporation method described above appeared to be a suitable technique to formulate NS loaded NP based on PLGA. Table 1 shows the average particle size and zeta potentials obtained for all NP formulations. As shown, the average size of NP increased and the zeta potential turned from negative to positive values when coated with CS, thereby suggesting an efficient adsorption due to ionic interaction between the cationic CS and the negative surface of PLGA NP (Kumar et al., 2012). SEM observations confirmed these results with particle diameters smaller than 0.7 μm and absence of drug crystals outside NP. As shown in Fig. 1a–d, NP were spherical in shape with smooth surfaces and no changes due to NS or CS. Fig. 1e and f shows raw and processed NS crystals. It is remarkable that the particle size was reduced due to ultrasound and re-crystallization in the absence of polymer.

Most NP preparation methods based on O/W emulsions show spherical particles but cross-comparisons are difficult because of the several parameters influencing NP characteristics. Keum et al. (2011) have reported particle size around 500 nm when using ultrasound emulsification and 1% PVA concentration which is relatively close to those used in our study; however, a 60% weaker ultrasound power (130W) and different PLGA (Resomer 502H), drug (docetaxel), and PVA molecular weight were used. They conclude that the use of different surfactant types and/or concentrations, kind of organic solvent, evaporation time and temperature or phase ratios, have a strong influence on NP characteristics.

3.2. Determination of the drug encapsulation rate

ER was high and showed small but significant differences ($p = 0.012$) between NPNS and NPNSCS (Table 1). NP washing and re-suspension had no effect on this parameter ($98 \pm 2\%$ and $99 \pm 1\%$ of the drug initially entrapped remained in NPNS and NPNSCS, respectively). However, yields were not very high (around 70%), probably due to these preparation steps (Table 1). NS recovery was close to 90% in all experiments. In the absence of polymer the total amount of un-dissolved drug crystals recovered in the pellets was

Table 1
Encapsulation rate, particle size, zeta potential and yield of NP formulations.

	ER (%)	Size (nm)	Zeta potential (mV)	Yield (%)
NPNS	88 ± 5	379 ± 59	−15 ± 3	71 ± 13
NPNSCS	83 ± 6	393 ± 66	10 ± 4	74 ± 15
NPB	–	343 ± 39	−9 ± 3	68 ± 8
NPBCS	–	373 ± 7	7 ± 2	70 ± 8

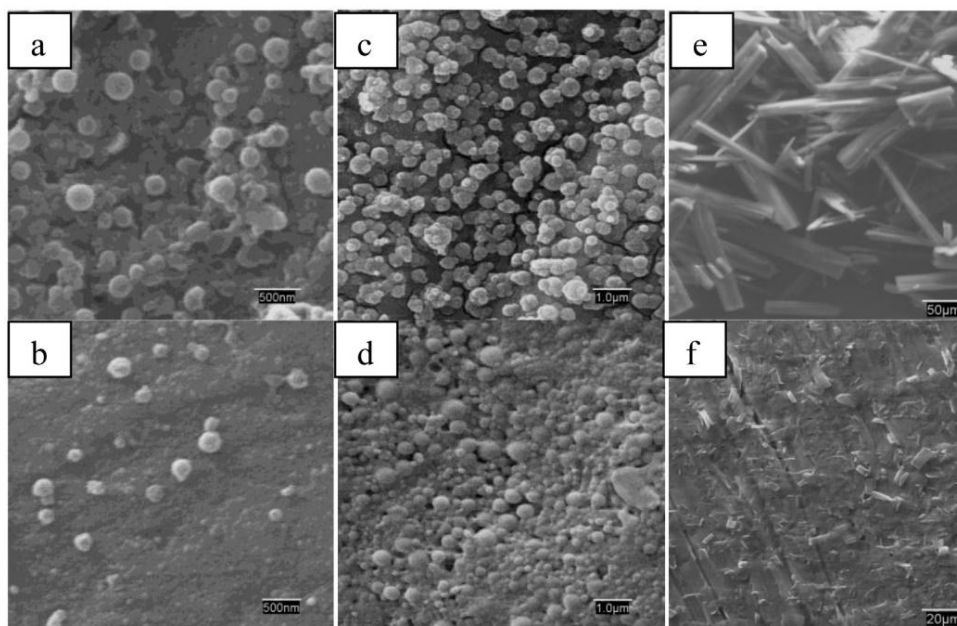


Fig. 1. Scanning electron micrographs of (a) NPNS, (b)NPNSCS, (c)NPB, (d) NPBCS, (e) raw NS and (f) processed NS.

close to the values shown for NP in accordance to the low solubility of the drug in the external aqueous medium. As no drug crystals were observed under SEM in NP formulations, this suggests solubility of NS plays a key role in ER. Keum et al. (2011) also showed very high encapsulation rates for the hydrophobic drug docetaxel in PLGA NP when using PVA as surfactant, dichloromethane as organic solvent and high sonication power.

3.3. DSC results

The physical status of NS inside NP was characterized by DSC analysis (Fig. 2). Pure drug showed two endothermic peaks corresponding to an enantiotropic system of two polymorphs. The

smallest endotherm stands for the melting point of form II (onset of 140 °C) and the second one is the other stable polymorph form I (onset at 144 °C) (Sanphui et al., 2011). All NP formulations exhibited the characteristic glass transition temperature (T_g) of amorphous PLGA at about 50 °C whereas no peaks corresponding to NS melting were detected, thus evidencing the absence of crystalline drug in the samples. Recently, Sengel-Turk et al. (2014) have reported similar findings for NS loaded PLGA NP prepared under closely related experimental conditions concluding that NS is in an amorphous state within the polymer. The thermogram corresponding to the physical mixture of PLGA and NS shows a slight baseline depression at about 120–130 °C and a slight increase in PLGA T_g suggesting some kind of interaction between the drug

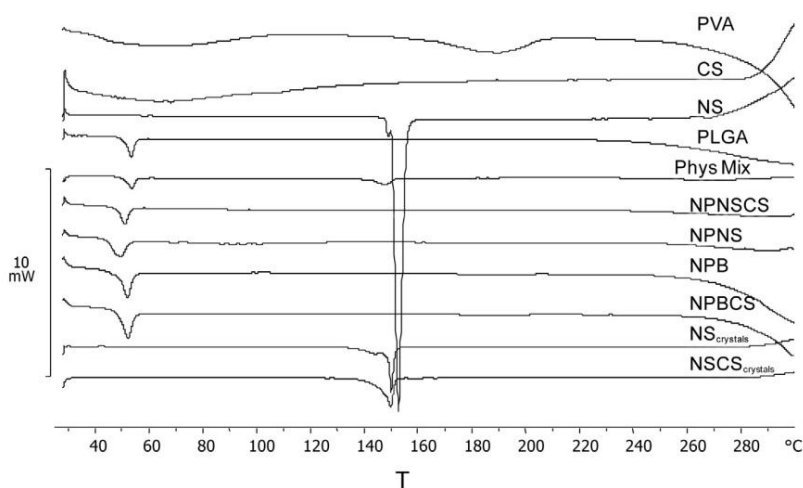


Fig. 2. DSC thermograms of raw materials, mixture of NS and PLGA according to NP drug loading, NP formulations and drug crystals.

and the polymer. However, no changes were detected in DSC scans of NPNS and NPNSCS.

3.4. FTIR studies

The IR spectrum of pure CS showed broad absorption bands at 3454 cm^{-1} and 1628 cm^{-1} corresponding to OH, NH stretching and C=O in amide group stretching vibration. Main peaks corresponding to PLGA were stretching in $-\text{CH}$, $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$ ($2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$) and carbonyl C=O ($1650\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$). PVA also showed broad absorption bands at $3200\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ and 1731 cm^{-1} for OH and C=O stretching, respectively. NS showed characteristic peaks at 3286 cm^{-1} for the amino (N–H stretching) and at 1586 cm^{-1} and 1514 cm^{-1} for N=O stretching (Fig. 3a).

Spectra of NP formulations (Fig. 3b) showed the strong C=O band at 1750 cm^{-1} from the major component (PLGA). However, this band was broader for NPB than the rest. In addition, NPB showed the broad 3300 cm^{-1} band of PVA $-\text{OH}$ whereas NPBCS showed more intense bands at 3300 cm^{-1} and 1600 cm^{-1} due to the contribution of CS coating (OH, NH and NO, respectively).

When NS was mixed with NPB and NPBCS additive spectra were obtained except for the broad CS band at 1628 cm^{-1} expected for NPBCS. NS loaded NP formulations revealed the same findings but again it is remarkable the absence of the CS peak at 1628 cm^{-1} in NPNSCS or the physical mixture NPBCS + NS suggesting some kind of interaction between NS and CS. In fact, ionic interactions between the oppositely charged NS and CS should not be discarded.

3.5. In vitro drug release studies

Fig. 4 shows the dissolution of NS from the different formulations upon sequential dilution. As shown in Fig. 4a, 1/2 dilutions in pH 7.4 PBS provoked neither a significant release of NS from NP nor a significant dissolution of free-drug crystals. However, after 1/10 dilution the amount of NS as un-dissolved crystals or encapsulated in NP was reduced to around 70% of their initial values. It is noticeable that NPNS retained slightly more NS than NPNSCS. It might be that the positively charged CS promotes the release of NS and its dissolution in PBS media. These findings

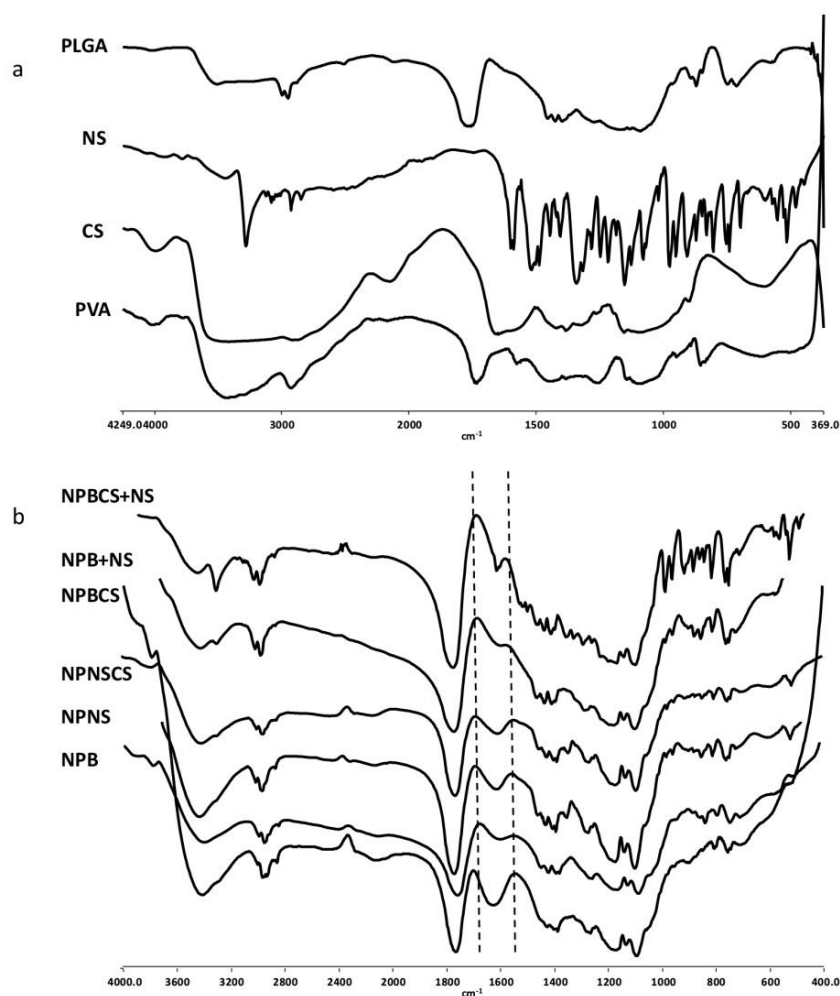


Fig. 3. (a) FTIR scans of raw materials. (b) FTIR scans of empty, NS-loaded NP and physical mixtures.

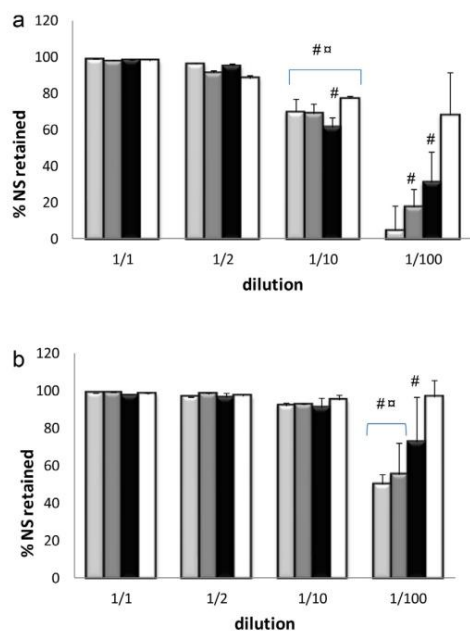


Fig. 4. Immediate release studies. NS retention upon sequential dilution with (a) pH 7.4 PBS or (b) milliQ water for NP (white bars) and NPCS (black bars) ($n=3$). Dissolved NS crystals (dark grey bars) and NS crystals with CS (light grey) upon sequential dilution in (a) pH 7.4 PBS or (b) milliQ water ($n=3$). Key for statistics (a) # significantly different ($p < 0.05$) than corresponding results at 0 and 50% dilution. # Significantly different ($p < 0.05$) than NPNS and NSCS crystals. (b) # Significantly different ($p < 0.05$) than 1/10 dilution and NS or NSCS at other dilutions. # significantly different ($p < 0.05$) than NPNS at 1/100 dilution and NPNS or NPNSCS at other dilutions.

were further confirmed at 1/100 dilution since NPNS still retain on average 70% of the drug initially encapsulated (although higher variability), whereas NPNSCS only retained around 30%. Therefore, NS was efficiently retained by both NP formulations since only ~15% and ~5% free-NS remained un-dissolved at 1/100 dilution, depending on CS coating ($p < 0.05$) (Fig. 4a). Wang et al. (2013) have reported CS coating of 5-FU-loaded PLGA NP exhibited heavier burst release than the untreated PLGA NP. They speculate that positively charged CS on the NP surface can accelerate the release of negatively charged 5-FU drug due to electrostatic actions. In addition, the CS coating makes NPNSCS surface more hydrophilic facilitating PBS penetration into the NP matrix, thus provoking more drug release. As discussed in the previous section, FTIR studies confirm some kind of interaction between NS and CS that could be involved in faster dissolution under non-sink conditions when CS was incorporated to the formulation.

In contrast, when milli-Q water was used as dilution media, significant dissolution was only detected at 1/100 dilution for free-drug or NPNSCS (Fig. 4b). This behavior is very likely related to the pH dependent solubility profile of the drug. Bernareggi and Reinsford, (2005) reported a solubility of NS in water at 25 °C of 5.5 mg/L whereas this value increases by a factor of 6 at pH 7.4.

Drug release under sink conditions (dilution higher than 1/100) was almost complete after 2 h regardless of the CS coating (Fig. 5). Therefore, neither PLGA nor CS restricted drug release under sink conditions.

Although drug release studies are usually carried out under sink conditions, they should mimic the environment the formulation will meet after administration (Bunjes, 2010). Therefore, NP formulations intended for intratumoral administration are likely

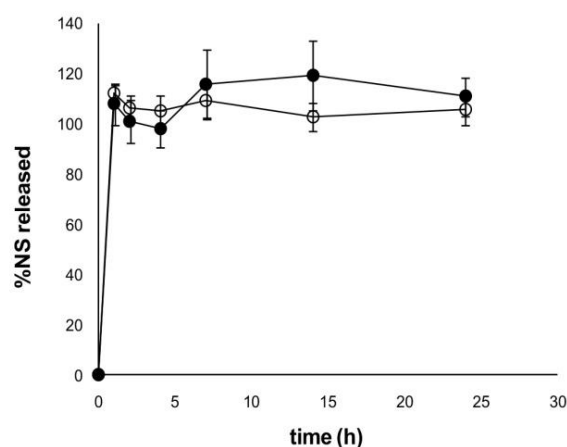


Fig. 5. Time-release studies. NS released from NP (black circles) and NPCS (white circles).

to produce supersaturation (Siewert et al., 2003) around the injection site making dissolution tests under non-sink conditions very relevant to predict and characterize the drug release process *in vivo*. The rapid release of NS under sink conditions and the ability of NP to retain the drug after the 1/100 dilution (NS crystals dissolved completely) suggest the process is mostly controlled by drug partition rather than diffusion through the polymeric matrix. Therefore, a sustained NS release can be expected after intraprostate injection of NPNS and NPNSCS. First, a deposit with high NS concentration would be obtained and later, the drug initially released would be swept along by blood flow causing an additional dissolution of encapsulated NS.

Different authors (Konishi et al., 2003; Kulkarni, 2011) have shown that the intratumoral injection of drugs incorporated in hydrogels and/or NP provided sustained antitumor activity getting higher dose and exposure time leading to slower tumor growth and longer survival times.

3.6. Permeability studies

The PAMPA model is an experimental approach to determine the ability of chemical compounds to pass through biological barriers by trans-cellular passive diffusion. PAMPA experiments confirmed NS was highly permeable across lipid barriers by passive diffusion (range $1-1.5 \times 10^{-5}$ cm/s), regardless of drug concentration in the donor compartment (Fig. 6a). Meriani et al. (2003) reported *in vitro* permeability coefficients through everted rat intestine within the same range (1.7×10^{-3} cm/min eq. 2.8×10^{-5} cm/s). Babu et al. (2003) reported a permeability coefficient of 3.22×10^{-2} cm/h (8.9×10^{-6} cm/s) across fresh hairless rat skin. Bernareggi and Reinsford, 2005 reported a value of 4.8×10^{-5} cm/s across colon rabbit mucosa in Ussing chambers.

Kokate et al. (2008) reported the high permeability coefficient of NS (3×10^{-5} cm/s) in buccal mucosa is partly contributed by the polar ionized acidic NS. This behavior has been previously shown for polar molecules by using the PAMPA model.

NS permeated at a significantly slower rate when it was associated to PLGA NP. Lindiwe et al. (2012) have shown the same restrictive role of polymeric carriers (PLGA NP) on the permeability of isoniazid and rhodamine 6G in two different *in vitro* models (PAMPA and Caco-2 cells).

In contrast, poly- ϵ -caprolactone nanocapsules (NC) in a hydrophilic gel increased the permeability of NS into human

deeper skin layers ($P_e = 9.42 \times 10^{-4}$ cm/h (2.61×10^{-7} cm/s)) as compared to free-NS (Alves et al., 2007).

Mass balance studies showed drug recovery was greater than 80% in all cases (Fig. 6b). This means there is neither significant NS membrane retention nor drug binding to plastic surfaces. Therefore, the use of the proposed one-way flux equation to calculate P_e is adequate.

3.7. In vitro therapeutic efficacy: cell cultures

As shown in Fig. 7a, free-NS exerted a significant dose-dependent effect on both PC-3 and DU-145 cells proliferation, being the later more sensitive (IC_{50} 139 and 90 μ M, respectively). The effect of NPNS and NPNSCS on DU-145 cells was less pronounced than the one obtained with free-drug below 200 μ M (IC_{50} 207 and 159 μ M, respectively) (Fig. 7a and b). However, the inhibitory effect of NPNSCS was significantly higher than NPNS within 64–240 μ M NS concentration (Fig. 7b). In

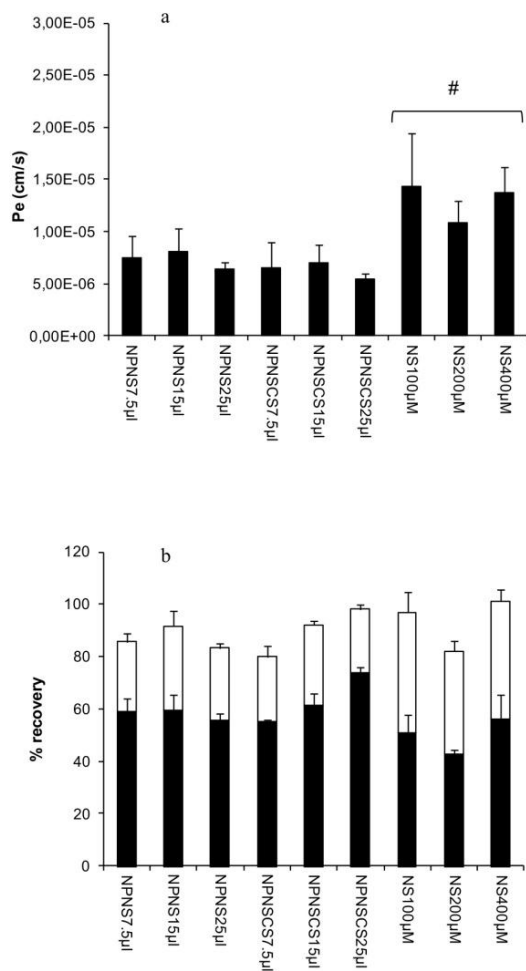


Fig. 6. Permeability studies. (a) Permeability coefficients for NS as free-drug, NPNS or NPNSCS ($n=4$). (b) Mass balance for NS as free-drug, NPNS or NPNSCS ($n=4$) (white bars represent acceptor compartment and black bars represent donor compartment).

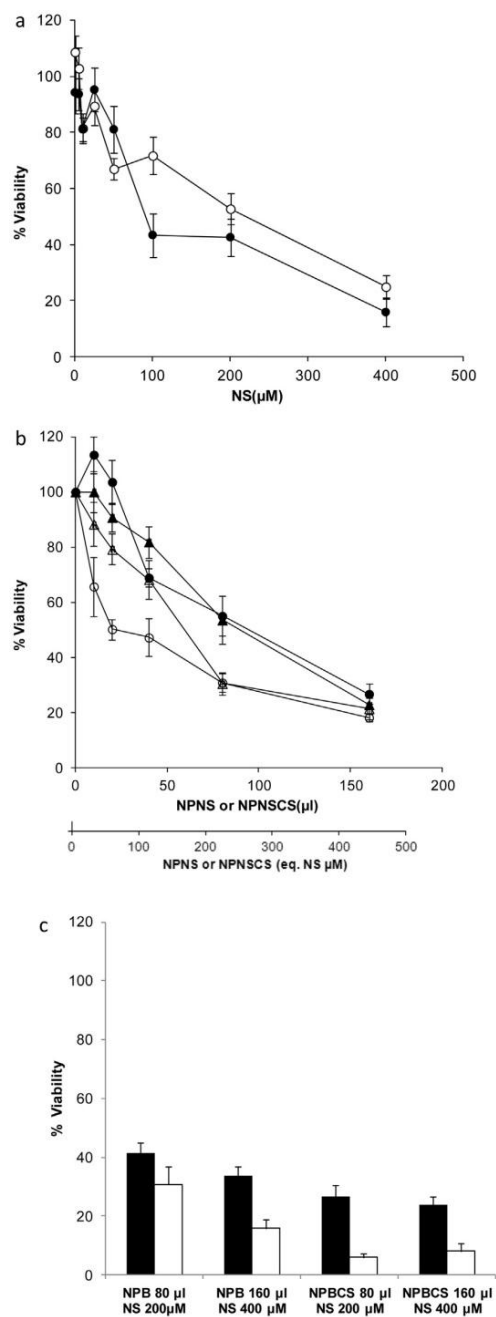


Fig. 7. Cell culture studies. (a) Effect of free-NS on PC-3 (empty circles) and DU-145 (black circles) cell proliferation *in vitro* after 48 h of incubation ($n>6$); (b) Effect of NPNS and NPNSCS on PC-3 (circles), and DU-145 (triangles) cell proliferation *in vitro* after 48 h of incubation ($n>6$). Key: black symbols (NPNS) and empty symbols (NPNSCS); (c) Effect of free-NS and empty NP physical mixtures on PC-3 (black bars) and DU-145 (white bars) cell proliferation *in vitro* after 48 h of incubation ($n>6$).

contrast, NPNS incubated with PC-3 cells showed less inhibitory effect than free-drug within the whole concentration range (IC_{50} 242 μ M) whereas the NPNSCS provoked the same inhibitory effect

as free-drug under 50 μM and significantly higher inhibition above this concentration (IC_{50} 89 μM) (Fig. 7a and b). This fact could be explained considering cancer cells efficiently uptake NPNSCS in vitro due to the positively charged surface, which allows for a stronger interaction with the membrane before endocytosis (Park et al., 2010; Kim et al., 2008). In addition, immediate release studies showed the CS external layer promotes the release of NS. Then, the improved cytotoxic effect observed with NPNSCS might be caused by a combination of both effects. Empty NP did not affect PC3 cell growth at concentrations below 750 $\mu\text{g}/\text{ml}$ but about 30–40% inhibition was observed above this concentration regardless of the CS coating. On the other hand, NPB had no effect on DU-145 cells whereas 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of NPBCS inhibited cell growth by nearly 40% (results not shown). Figure 7c shows the combined inhibitory effect of empty NP (750 and 1400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and free-NS concentrations (200 and 400 μM). As shown, DU-145 cells were more sensitive to NS treatment and the viability matches expected values. In contrast, PC3 cells viability was higher than expected. The dilution effect when NP are added to culture media provoke more drug release from NPNSCS (Fig. 4a,b). In summary, our findings confirm the pharmacological activity of NS is preserved after encapsulation. Empty NP showed a slight effect on cell growth in PC3 and DU145 cells not dependent on NP concentration. However, NPNS showed a very significant effect on cell growth. It is remarkable the inhibitory potential of NPNSCS on PC3 cell growth that reaches a 50% inhibition for NS and NP concentrations around 60 μM and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. Bondi et al. (2009) have found a similar behavior using NS loaded SLN on HT29 and SW 480 cells in the concentration range 0–200 μM . However, they report similar or even less effect of NS in SLN than free-drug. In addition, the apparent lower toxicity of empty SLN as compared to NPB and NPBCS might be associated to different experimental conditions and cell density (100,000 cells/ml). Mukerjee and Wishwanatha (2009) investigated the therapeutic potential of curcumin PLGA-NP in the same prostate cancer cell lines, DU145 and PC3, and their results confirmed that sustained release formulations exhibited a lower IC_{50} value in comparison to free-curcumin in all cancer cell lines studied. In addition, they reported no effect of empty NP on cell growth. However, the maximum NP concentrations (~90 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were much lower than those used in our study.

Pre-clinical trials with intra-tumor administration of drug-loaded NP is common practice to evaluate their *in vivo* therapeutic efficacy. Nevertheless, these NP formulations are usually conceived to be given by IV infusion in clinical practice. Therefore, promising pre-clinical *in vitro* and *in vivo* results might be difficult to reproduce under clinical use due to the several limitations associated to NP delivery to solid tumors after IV administration (Prabhakar et al., 2013).

Al-Ghananeem et al. (2009) significantly reduced mammary tumor growth after intratumor administration of paclitaxel-loaded cross-linked hyaluronan NP to rats as compared to free-drug. Xie et al. (2012) have recently demonstrated the lowest body exposure and higher local accumulation of nanosized carriers after intratumoral administration to rats.

According to our *in vitro* results, intra-prostate injection of NPNS or NPNSCS would result in the localization and sustained release of a greater NS load at the tumor site thus reducing drug distribution to other body sites such as the liver.

4. Conclusions

The aim of the study was to design NP loaded with NS. NP prepared by the emulsion-solvent evaporation method have spherical shape with size less than 0.7 μm . NS was incorporated in the PLGA NP with encapsulation rates higher than 83%.

Both NP formulations loaded with NS exhibit retention ability upon dilution but do not restrict drug release under highly diluted sink conditions at 37 °C. NP also show some ability to interfere in the permeability of the highly permeable NS and show evidence of a low carrier cytotoxicity but preserved pharmacological activity of the encapsulated drug. In summary, PLGA NP loaded with NS can be used in the co-adjutant treatment of prostate cancer to achieve tumor targeted drug delivery via intra-tumor injection.

Conflict of interest

The authors declare to have no conflict of interest.

Acknowledgement

The authors are grateful to Isabel Trabado from the cell culture unit for her collaboration in cell culture studies.

References

- Alexis, F., Pridgen, E.M., Langer, R., Farokhzad, O.C., 2010. Nanoparticle technologies for cancer therapy. *Handb. Exp. Pharmacol.* 197, 55–86.
- Al-Ghananeem, A.M., Malkawi, A.H., Muammer, Y.M., et al., 2009. Intratumoral delivery of paclitaxel in solid tumor from biodegradable hyaluronan nanoparticle formulations. *AAPS PharmSciTech* 10, 410–417.
- Alves, M.P., Scarrone, A.L., Santos, M., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., 2007. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. *Int. J. Pharm.* 341, 215–220.
- Babu, R.J., Kanikkannan, N., Kikwai, L., et al., 2003. The influence of various methods of cold storage of skin on the permeation of melatonin and nimesulide. *J. Control. Release* 86, 49–57.
- Bernareggi, A., Rainsford, K.D., 2005. Pharmacokinetics of nimesulide. In: Rainsford, K.D. (Ed.), *Nimesulide-Actions and Uses*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 63–120.
- Bondi, M.L., Azzolina, A., Craparo, E.F., et al., 2009. Solid lipid nanoparticles containing nimesulide: preparation, characterization and cytotoxicity studies. *Curr. Nanosci.* 5, 39–44.
- Bunjes, H., 2010. Lipid nanoparticles for the delivery of poorly water-soluble drugs. *J. Pharm. Pharmacol.* 62, 1637–1645.
- Debuigne, F., Cuisenaire, J., Jeuniaux, L., Masereel, B., Nagy, J.B., 2001. Synthesis of nimesulide nanoparticles in the microemulsion epikuron/isopropyl myristate/water/*n*-butanol (or isopropanol). *J. Colloid Interface Sci.* 243, 90–101.
- EMA, 2001. Assessment report for Nimesulide containing medicinal products for systemic use. Pursuant to Article 31 of Directive 2001/83/EC, as amended. International Non-proprietary Name: nimesulide. Procedure number: EMEA/H/A-31/1261.
- Farokhzad, O.C., Cheng, J., Teply, B.A., et al., 2006. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 6315–6320.
- Hawk, E.T., Viner, J.L., Dannenberg, A., DuBois, R.N., 2002. COX-2 in cancer: a player that's defining the rules. *J. Natl. Cancer Inst.* (Bethesda) 94, 545–546.
- Jain, P., Mishra, A., Yadav, S.K., Patil, U.K., Baghel, U.S., 2009. Formulation, development and characterization of solid lipid nanoparticles containing nimesulide. *Int. J. Drug Deliv. Technol.* 1, 24–27.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Thun, M.J., 2009. Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 59, 225–249.
- Keum, C.G., Noh, Y.W., Baek, J.S., et al., 2011. Practical preparation procedures for docetaxel-loaded nanoparticles using polylactic acid-co-glycolic acid. *Int. J. Nanomed.* 6, 2225–2234.
- Kim, B.S., Kim, C.S., Lee, K.M., 2008. The intracellular uptake ability of chitosan-coated poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Arch. Pharm. Res.* 31, 1050–1054.
- Kokate, A., Li, X., Jasti, B., 2008. Effect of drug lipophilicity and ionization on permeability across the buccal mucosa: a technical note. *AAPS PharmSciTech* 5, 501–504.
- Konishi, M., Tabata, Y., Kariya, M., et al., 2003. *In vivo* anti-tumor effect through the controlled release of cisplatin from biodegradable gelatin hydrogel. *J. Control. Release* 92, 301–313.
- Krishna, S.A., Amareshwar, P., Chakravarty, P., 2010. Chitosan nanoparticles as a drug delivery system. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 1, 474–484.
- Krishna, S.A., Amareshwar, P.J., 2013. Preparation and characterization of nimesulide loaded cellulose acetate hydrogenphthalate nanoparticles by salting out technique. *World J. Pharm. Sci.* 1, 21–27.
- Kulkarni, A., 2011. Modification of gold markers with Doxorubicin as radiosensitizer encapsulated in sustained release PLGA nanoparticles to enhance Image Guided Radiotherapy (IGRT). Master's Thesis. Department of Pharmaceutical Sciences, Northeastern University, August August.
- Kumar, M., Khar, R.K., Jain, G.K., Kumar, P., Malik, A., 2012. Ocular delivery of acyclovir via mucoadhesive nanoparticles. *Int. J. Drug. Discov. Med. Res.* 2, 49–55.
- Lenz, Q.F., Guterres, S.S., Pohlmann, A., Alves, M.P., 2012. Semi-solid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules showed *in-vivo* anti-

- inflammatory activity in chronic arthritis and fibrovascular tissue models. *Inflamm. Res.* 61, 305–310.
- Lindiwe, A.N., Lungile, N.N.S., Semete-Makokotela, B., et al., 2012. Permeation of PLGA nanoparticles across different in vitro models. *Curr. Drug Deliv.* 9, 617–627.
- Madhusudhan, B., Ravikumara, N.R., Nagaraj, T.S., Aditya, N.P., Hiremat, S., Raina, G., 2009. Preparation and evaluation of nimesulide-loaded ethylcellulose and methylcellulose nanoparticles and microparticles for oral delivery. *J. Biomater. Appl.* 24, 47–64.
- Meriani, F., Coceani, N., Sirotti, C., Voinovich, D., Grassi, M., 2003. In vitro nimesulide absorption from different formulations. *J. Pharm. Sci.* 93, 540–552.
- Molavi, O., Mahmud, A., Hamdy, S., et al., 2009. Development of a Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticle formulation of STAT3 inhibitor JSI-124 implication for cancer immunotherapy. *Mol. Pharm.* 7, 364–374.
- Mukerjee, A., Wishwanatha, J.K., 2009. Formulation, characterization and evaluation of curcumin-loaded PLGA nanospheres for cancer therapy. *Anticancer Res.* 29, 3867–3876.
- Nafee, N., Taetz, S., Schneider, M., Schaefer, U.F., Lehr, C.L., 2005. Chitosan-coated PLGA nanoparticles for DNA/RNA delivery: effect of the formulation parameters on complexation and transfection of antisense oligonucleotides. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 295, 201–211.
- Pan, Y., Zhang, J., Gazi, M.H., Young, C.Y.F., 2003. The cyclooxygenase 2-specific nonsteroidal anti-inflammatory drugs celecoxib and nimesulide inhibit androgen receptor activity via induction of C-Jun in prostate cancer cells. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12, 769–774.
- Park, J.H., Saravanakumar, G., Kim, K., Kwon, I.C., 2010. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62, 28–41.
- Parveen, S., Sahoo, S.K., 2011. Long circulating chitosan/PEG blended PLGA nanoparticle for tumor drug delivery. *Eur. J. Pharmacol.* 670, 372–383.
- Prabhakar, U., Maeda, H., Jain, R.K., et al., 2013. Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention (EPR) effect for nanomedicine drug delivery in oncology. *Cancer Res.* 73, 2412–2417.
- Raffin, R.P., Lima, A., Lorenzoni, R., et al., 2012. Natural lipid nanoparticles containing nimesulide: synthesis, characterization and in vivo anti-edematogenic and antinociceptive activities. *J. Biomed. Nanotechnol.* 8, 309–315.
- Rainsford, K.D., 2005. The discovery, development and novel actions of nimesulide. In: Rainsford, K.D. (Ed.), *Nimesulide-Actions and Uses*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 1–49.
- Sanna, V., Roggio, A.M., Posadino, A.M., et al., 2011. Novel docetaxel-loaded nanoparticles based on poly(lactide-co-caprolactone) and poly(lactide-co-glycolide-co-caprolactone) for prostate cancer treatment: formulation, characterization, and cytotoxicity studies. *Nanoscale Res. Lett.* 6, 260.
- Sanna, V., Sechi, M., 2012. Nanoparticle therapeutics for prostate cancer treatment. *Maturitas* 73, 27–32.
- Sanphui, P., Sarma, B., Nangia, A., 2011. Phase transformation in conformational polymorphs of nimesulide. *J. Pharm. Sci.* 6, 2287–2299.
- Sengel-Turk, C.T., Can Oz, U., Serim, T.M., Hascicek, C., 2014. Formulation and optimization of nonionic surfactants emulsified nimesulide-loaded PLGA-based nanoparticles by design of experiments. *AAPS PharmSciTech* 2, 161–176.
- Siewert, M., Dressman, J., Brown, C., Shah, V.P., 2003. FIP/AAPS guidelines for dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms. *Diss. Technol.* 10, 6–15.
- Soslow, R.A., Dannenberg, A.J., Rush, D., et al., 2000. COX-2 is expressed human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer* 89, 2637–2645.
- Wang, Y., Li, P., Kong, L., 2013. Chitosan-modified PLGA nanoparticles with versatile surface for improved drug delivery. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 14, 585–592.
- Win, K.Y., Mu, L., Wang, C.H., Feng, S.S., 2003. Nanoparticles of biodegradable polymers for cancer chemotherapy. Summer Bioengineering Conference, Sonesta Beach Resort in Key Biscayne, Florida, June, pp. 25–29.
- Xie, H., Goins, B., Bao, A., Wang, Z.J., Phillips, W.T., 2012. Effect of intratumoral administration on biodistribution of ⁶⁴Cu-labeled nanoshells. *Int. J. Nanomed.* 7, 2227–2238.