

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Caracterización de la interacción de
moléculas hidrotópicas con drogas
oncológicas como una estrategia de
vehiculización de fármacos en medios
acuosos**

por

Bioq. Victoria Leonhard

Director: Dr. Dante Miguel Beltramo

Co-Director: Dr. Ismael Darío Bianco

CEPROCOR - Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba

FACULTAD DE CIENCIAS EXÁCTAS, FÍSICAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, Argentina

2013

COMISIÓN ASESORA

- **Dra. Miriam Strumia**, Dpto. de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas UNC, IMBIV (Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal), CCT-CONICET-CÓRDOBA (Centro Científico Tecnológico Conicet Córdoba).
- **Dra. María Angélica Perillo**, Dpto. de Química, Facultad de Cs. Exactas Físicas y Naturales UNC, IIBYT (Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas), CCT-CONICET- CÓRDOBA (Centro Científico Tecnológico Conicet Córdoba).
- **Dr. Dante M. Beltramo** (Director de tesis), CEPROCOR (Centro de Excelencia en Productos y Procesos Córdoba) - Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Prov. de Córdoba- Sede Santa María de Punilla, Córdoba.
- **Dr. Ismael Bianco** (Co-director de tesis), CEPROCOR (Centro de Excelencia en Productos y Procesos Córdoba)- Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Prov. de Córdoba- Sede Santa María de Punilla, Córdoba.

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma: Aclaración:

Firma: Aclaración:

Firma: Aclaración:

*A mi familia,
en especial a Jose,
mi mayor logro y
el mejor regalo
que me dio la vida*

AGRADECIMIENTOS

Inicialmente, me gustaría agradecer a mis amigas de la facultad, en especial a Anita, Mari y Peti, por esos lindos momentos que pasamos juntas los últimos años de la carrera, una de las mejores épocas de mi vida. Sin ellas no estaría hoy donde estoy, no me hubiera presentado a las tecno-becas otorgadas por el CEPROCOR y no hubiera encontrado mi lugar de trabajo, ni descubierto que la investigación era lo mío, ni hubiera conocido a quién hoy es mi director de tesis, mi mentor, mi “jefe”, Dante Beltramo.

Dante... su pasión por la ciencia, por saber, conocer, descubrir, por innovar.... son la inspiración de cada día, el motor de todo el laboratorio, el empujoncito que necesitamos todos para avanzar, para superarnos, para alcanzar nuestras metas. Realmente no encuentro las palabras justas para agradecerle lo mucho que me ayudó, inspiró y alentó, depositando su confianza en mi trabajo. Me ayudó no sólo en lo académico, sino también en lo personal, en el día a día, por hacerme sentir bien y parte del grupo, por hacerme reír con sus chistes “fáciles”, por acompañarme siempre, por hacer el seguimiento día a día de mi trabajo, por perseguirme para que le muestre resultados... algunas veces más de la cuenta!! Por explicarme, por compartir conmigo sus conocimientos, por asesorarme... realmente muchas gracias... por todo!!

Isma... volvería a repetir muchas de las frases escritas en el párrafo anterior, porque se aplican a vos también, que más decir... muchas gracias por todo, por tu apoyo, tus consejos, tus ideas, por tu “enciclopedia de datos inútiles” que nos ayuda y nos hace reír día a día, por tu gran conocimiento de inglés y tu ayuda con las publicaciones, congresos y demás, transformando frases in-entendibles (escritas por Dante, Toti o yo) en párrafos perfectos, por tu facilidad para escribir las cosas de manera sencilla... sinceramente ... muchas gracias!!

A mis compañeros del laboratorio, por ayudarme continuamente, explicarme de todo un poco y por los lindos momentos compartidos. Ariel, muchas gracias por toda la ayuda con el HPLC. Vale, muchas gracias por poner a punto la técnica y ayudarme con los ensayitos de los huevos. Toti... sin vos no se qué hubiera hecho, me enseñaste de todo y me seguís enseñando día a día, sinceramente... muchas gracias!!

A mis amigos del Ceprocór, muchas gracias por los momentos compartidos, dentro y fuera del trabajo, por los asados, los festejos, las charlas y los consejos, por hacerme reír y por hacer que las horas pasen volando... Gracias!!

A mis amigas del cole, mis amigas del alma, las de siempre, de toda la vida, Meli, Fer, Yani, Emi y Lu, que no entienden nada de ciencia y aún así me han alentado, apoyado y felicitado por mis logros a lo largo de toda mi carrera!! Las adoro amigas!!

A mi familia, sin la cual hoy no estaría donde estoy... Muchas gracias, mami y papi, por hacerme la persona que soy hoy, por ayudarme y acompañarme siempre, por escucharme, por aguantarme... los amo!! A mis hermanos, gracias por compartir tantos momentos junto a mí, buenos y no tan buenos, por los juegos y las peleas, los quiero mucho!! A vos Gusta, por ser más que un hermano, un compañero, un confidente, un amigo!! A vos Gera, gracias por estar siempre, por preocuparte, por defenderme y por regalarme una cuñada excelente y a mi primer sobrino, Rami, a quienes adoro!!

A mi familia "política", ustedes son mi segunda familia, siempre presentes, atentos, y cariñosos conmigo, los quiero mucho!!

Por último, gracias Martín por entrar en mi vida, por acompañarme siempre, por darme fuerza, por contenerme, por soportarme, por apoyarme, por tu paciencia, por tu cariño, por creer en mí y principalmente... por darme el regalo más hermoso que me podías dar... por nuestra pequeña Jose, cuya sonrisa y simpatía iluminan nuestra vida día a día... Los amo!!

***LISTADO DE PUBLICACIONES
DERIVADAS DE LA TESIS***

PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS:

1. Leonhard V, Alasino RV, Bianco ID, Beltramo DM (2012) Self-assembled micelles of monosialogangliosides as nanodelivery vehicles for taxanes. *Journal of Controlled Release*, 162 (3) 619-627.
2. Leonhard V, Alasino RV, Bianco ID, Beltramo DM (2012) Selective binding of albumin to gm1 ganglioside micelles containing paclitaxel. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 4: 159.

PATENTES:

1. Leonhard V, Beltramo DM, Alasino RV, Bianco ID (2011) Water-soluble pharmaceutical composition comprising at least one therapeutically active substance having hydrophobic properties and at least one compound selected from among sialoglycosphingolipids, glycosphingolipids or a mixture of sialoglycosphingolipids and glycosphingolipids. WO 2011/113981 A1.

ÍNDICE

1. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	1
1.1 Índice de tablas	2
1.2 Índice de figuras	3
2. ABREVIATURAS	7
3. RESUMEN	10
4. INTRODUCCIÓN	13
4.1 Aspectos generales	14
4.1.1 Liposomas	16
4.1.2 Microemulsiones	18
4.1.3 Ciclodextrinas	19
4.1.4 Dendrímeros	21
4.1.5 Nanopartículas	23
4.1.6 Micelas	24
4.2 Antecedentes	31
4.3 Gangliósidos	33
4.4 Fármacos oncológicos de interés	35
4.4.1 Taxanos	37
4.4.2 Doxorrubicina	41
4.5 Bibliografía	44
5. OBJETIVOS	52
5.1 Objetivo general	54
5.2 Objetivos específicos	54
5.3 Bibliografía	55
6. CAPÍTULO 1: Micelas auto-ensambladas de monosialogangliósidos como nanovehículos de taxanos	56
6.1 Resumen	57
6.2 Introducción	58
6.3 Materiales y Métodos	60
6.3.1 Materiales	60
6.3.1.1 Reactivos	60
6.3.1.2 Líneas Celulares	61
6.3.2 Métodos	62

6.3.2.1	Procedimiento estándar para la preparación de micelas mixtas de gangliósidos y taxanos	62
6.3.2.2	Determinación de la concentración de Ptx o Dtx	63
6.3.2.3	Determinación de la concentración de gangliósidos	63
6.3.2.4	Caracterización estructural de micelas GM1/Ptx	64
6.3.2.4.1	Difracción de rayos X	64
6.3.2.4.2	Análisis cromatográfico	64
6.3.2.4.3	Microscopía electrónica	64
6.3.2.5	Estabilidad física de micelas GM1/Ptx	64
6.3.2.5.1	Ensayo de diálisis	64
6.3.2.5.2	Ensayo de centrifugación	64
6.3.2.5.3	Efecto de la temperatura en la estabilidad de las micelas mixtas GM1/Ptx	65
6.3.2.5.4	Efecto de ciclos de congelado-descongelado y de liofilización	65
6.3.2.6	Estabilidad química del Ptx en micelas de GM1	65
6.3.2.7	Capacidad de micelas de GM1 y de liposomas mixtos para la solubilización de Ptx	65
6.3.2.8	Caracterización de la captación celular de Ptx por microscopía de fluorescencia	66
6.3.2.9	Citotoxicidad “ <i>in-vitro</i> ” de micelas GM1/Ptx sobre líneas celulares tumorales y no-tumorales	67
6.3.2.10	Efecto tóxico de micelas GM1/Ptx y de Taxol comercial “ <i>in-vivo</i> ”	67
6.3.2.11	Actividad biológica de micelas GM1/Ptx y de Taxol comercial “ <i>in-vivo</i> ”	67
6.3.2.12	Actividad biológica de micelas GM1/Ptx y de Taxol comercial “ <i>in-vivo</i> ” usando el modelo de angiogénesis en membrana corioalantoidea de embriones de pollo	68
6.4	Resultados	68
6.4.1	Solubilización de taxanos en micelas de gangliósidos	68
6.4.2	Efecto de la temperatura de incubación en la solubilización del Ptx por GM1	74
6.4.3	Caracterización estructural de micelas GM1/Ptx	75

6.4.4	Estabilidad física de micelas GM1/Ptx	78
6.4.5	Estabilidad química del Ptx en las micelas de GM1	80
6.4.6	Comparación de la capacidad de solubilización del Ptx entre micelas de GM1 y liposomas mixtos	81
6.4.7	Caracterización de la captación celular y actividad biológica del Ptx “ <i>in-vitro</i> ”	82
6.4.8	Caracterización de la actividad biológica del Ptx “ <i>in-vivo</i> ”	83
6.5	Discusión	86
6.6	Conclusiones	88
6.7	Bibliografía	90
7.	CAPÍTULO 2: Estudios sobre la interacción de Albúmina con micelas de GM1 que contienen Paclitaxel	93
7.1	Resumen	94
7.2	Introducción	95
7.3	Materiales y Métodos	96
7.3.1	Materiales	96
7.3.1.1	Reactivos	96
7.3.1.2	Líneas Celulares	97
7.3.2	Métodos	97
7.3.2.1	Interacción de micelas GM1/Ptx con células sanguíneas	97
7.3.2.2	Interacción de micelas GM1/Ptx con plasma humano	97
7.3.2.2.1	Electroforesis en SDS-PAGE	98
7.3.2.2.2	Cromatografía en capa delgada	98
7.3.2.3	Procedimiento estándar para la preparación de micelas mixtas de GM1, Ptx y Alb	98
7.3.2.4	Determinación de la concentración de Ptx	98
7.3.2.5	Determinación de la concentración de GM1	99
7.3.2.6	Determinación de la concentración de Alb	99
7.3.2.7	Estabilidad física de micelas GM1/Ptx/Alb	99
7.3.2.7.1	Ensayo de diálisis	99
7.3.2.7.2	Estabilidad de micelas mixtas en solución	99
7.3.2.7.3	Efecto de ciclos de congelado-descongelado y	

de liofilización	99
7.3.2.8 Caracterización estructural de micelas GM1/Ptx/Alb	100
7.3.2.8.1 Análisis cromatográfico	100
7.3.2.8.2 Microscopía electrónica	100
7.3.2.9 Estabilidad química del Ptx en micelas GM1/Ptx/Alb	100
7.3.2.10 Detección de la captación celular de Ptx-fluorescente (Flu-tax) por microscopía de fluorescencia	100
7.3.2.11 Efecto citotóxico de micelas GM1/Ptx/Alb sobre líneas celulares tumorales y no-tumorales in-vitro	101
7.4 Resultados	101
7.4.1 Interacción de micelas GM1/Ptx con componentes sanguíneos humanos	101
7.4.2 Caracterización de la interacción de micelas GM1/Ptx con Alb	103
7.4.3 Estabilidad física de las micelas mixtas GM1/Ptx/Alb	108
7.4.4 Estabilidad química del Ptx en micelas GM1/Ptx/Alb	109
7.4.5 Análisis “in-vitro” de la captación celular y actividad biológica del Ptx incorporado en micelas de GM1	111
7.5 Discusión	112
7.6 Conclusiones	115
7.7 Bibliografía	116
8. CAPÍTULO 3: Micelas auto-ensambladas de GM1 como nanovehículos de Doxorrubicina	119
8.1 Resumen	120
8.2 Introducción	120
8.3 Materiales y Métodos	122
8.3.1 Materiales	122
8.3.1.1 Reactivos	122
8.3.1.2 Líneas Celulares	123
8.3.2 Métodos	123
8.3.2.1 Procedimiento estándar para la preparación de micelas mixtas de GM1 y Doxorrubicina (DOX)	123
8.3.2.2 Determinación de la concentración de DOX	124

8.3.2.3	Determinación de la concentración de GM1	124
8.3.2.4	Procedimiento estándar para la preparación de micelas mixtas de GM1, DOX y Alb	124
8.3.2.5	Determinación de la concentración de Alb	124
8.3.2.6	Caracterización estructural de micelas GM1/DOX	124
8.3.2.6.1	Análisis cromatográfico	124
8.3.2.6.2	Microscopía electrónica	124
8.3.2.7	Estabilidad física de micelas GM1/DOX	125
8.3.2.7.1	Ensayo de centrifugación	125
8.3.2.7.2	Efecto de la temperatura en la estabilidad de las micelas mixtas GM1/DOX en solución acuosa	125
8.3.2.7.3	Efecto de ciclos de congelado-descongelado y de liofilización	125
8.3.2.8	Estabilidad química de la DOX en micelas de GM1	125
8.3.2.9	Caracterización de la captación celular de DOX por microscopía de fluorescencia	126
8.3.2.10	Citotoxicidad “ <i>in-vitro</i> ” de micelas GM1/DOX y GM1/DOX/Alb sobre líneas celulares tumorales	126
8.4	Resultados	126
8.4.1	Incorporación de DOX en micelas de GM1	126
8.4.2	Caracterización estructural de micelas GM1/DOX	129
8.4.3	Estabilidad física de micelas GM1/DOX	131
8.4.4	Estabilidad química de DOX en micelas de GM1	132
8.4.5	Interacción de micelas GM1/DOX con Alb	133
8.4.6	Estudios “ <i>in-vitro</i> ” para evaluar los procesos de liberación, captación celular y actividad biológica de DOX	134
8.5	Discusión	136
8.6	Conclusiones	137
8.7	Bibliografía	138
9.	CAPÍTULO 4: Incorporación de Paclitaxel, Doxorubicina y Albúmina en micelas auto-ensambladas de GM1	140
9.1	Resumen	141
9.2	Introducción	142

9.3	Materiales y Métodos	144
9.3.1	Materiales	144
9.3.1.1	Reactivos	144
9.3.1.2	Líneas Celulares	144
9.3.2	Métodos	144
9.3.2.1	Procedimiento estándar para la preparación de micelas mixtas de GM1, Paclitaxel (Ptx) y Doxorrubicina (DOX)	144
9.3.2.2	Determinación de la concentración de DOX	145
9.3.2.3	Determinación de la concentración de GM1	146
9.3.2.4	Determinación de la concentración de Ptx	146
9.3.2.5	Procedimiento estándar para la preparación de micelas mixtas de GM1, Ptx, DOX y Alb	146
9.3.2.6	Determinación de la concentración de Alb	146
9.3.2.7	Caracterización estructural de micelas GM1/Ptx/DOX	146
9.3.2.7.1	Análisis cromatográfico	146
9.3.2.7.2	Microscopía electrónica	146
9.3.2.8	Estabilidad física de micelas GM1/Ptx/DOX	146
9.3.2.8.1	Ensayo de centrifugación	146
9.3.2.8.2	Efecto de la temperatura en la estabilidad de las micelas mixtas GM1/Ptx/DOX en solución acuosa	147
9.3.2.8.3	Efecto de ciclos de congelado-descongelado y de Liofilización	147
9.3.2.9	Estabilidad química de DOX y Ptx en micelas GM1/Ptx/DOX	147
9.3.2.10	Caracterización de la captación celular de Ptx-Fluorescente y DOX por microscopía de fluorescencia	148
9.3.2.11	Citotoxicidad “<i>in-vitro</i>” de micelas GM1/Ptx/DOX sobre líneas celulares tumorales	148
9.4	Resultados	148
9.4.1	Incorporación de DOX en micelas GM1/Ptx	148
9.4.2	Caracterización estructural de micelas GM1/Ptx/DOX	150
9.4.3	Estabilidad física de micelas GM1/Ptx/DOX	152
9.4.4	Estabilidad química de DOX en micelas GM1/Ptx/DOX	153
9.4.5	Interacción de micelas GM1/Ptx/DOX con Alb	153

9.4.6 Estudios “in-vitro” para evaluar los procesos de liberación, captación celular y actividad biológica de DOX y Ptx incorporados en micelas de GM1	155
9.5 Discusión	157
9.6 Conclusiones	158
9.7 Bibliografía	159
10. CONCLUSIÓN	162
11. APÉNDICES	166
11.1 Apéndice I	167
11.2 Apéndice II	168

1. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

1.1 ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Parámetro de empaquetamiento de surfactantes y varias de las estructuras que forman en soluciones acuosas.	26
Tabla 2. Ventajas y desventajas de distintos sistemas de administración de fármacos.	30
Tabla 3. Estructura química de los principales gangliósidos.	34

CAPÍTULO 1

Tabla 1. Efecto de la diálisis en la estabilidad de micelas de GM1 y complejos GM1/Ptx.	79
Tabla 2. Efecto de la centrifugación en la estabilidad de micelas GM1/Ptx.	79
Tabla 3. Efecto de la temperatura de almacenamiento en la estabilidad de micelas GM1/Ptx.	80

CAPÍTULO 2

Tabla 1. Interacción de las micelas GM1/Ptx con linfocitos.	102
Tabla 2. Interacción de Ptx con micelas de GM1 y con micelas de GM1 previamente incubadas con Alb en distintas condiciones de pH.	107
Tabla 3. Efecto de la diálisis exhaustiva en la estabilidad de micelas de GM1 y complejos GM1/Ptx y GM1/Ptx/Alb.	108

CAPÍTULO 3

Tabla 1. Efecto de la centrifugación en la estabilidad de micelas GM1/DOX.	132
---	-----

CAPÍTULO 4

Tabla 1. Efecto de la centrifugación en la estabilidad de micelas GM1/Ptx/DOX.	152
---	-----

1.2 ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Esquema de un liposoma y su capacidad para vehicular fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos.	17
Figura 2. Esquema de microemulsiones O/W y W/O y sus componentes.	19
Figura 3. Representación esquemática de la estructura de las ciclodextrinas y de su capacidad para solubilizar fármacos hidrofóbicos.	21
Figura 4. Representación esquemática de la estructura del dendrímero y sus componentes básicos.	22
Figura 5. Representación esquemática de la estructura de nanoesferas y nanocápsulas y su capacidad para vehicular fármacos.	23
Figura 6. Representación esquemática de una micela en solución acuosa.	27
Figura 7. Estructura química del Ptx.	37
Figura 8. Estructura química de la DOX.	41

CAPÍTULO 1

Figura 1. Incorporación del Ptx en micelas de GT.	69
Figura 2. Estructura química y modelo molecular de los monosialogangliósidos GM1, GM2 y GM3.	70
Figura 3. (A) Incorporación de Ptx en micelas de gangliósido.	71
(B) Capacidad de micelas de GM1 para solubilizar taxanos.	71
Figura 4. (A) Estructura química del gangliósido GM1 y representación del proceso de lactonización.	72
(B) Incorporación de Ptx en micelas de GM1.	72
Figura 5. (A) Estructura química de los gangliósidos GM1 y LIGA.	73
(B) Incorporación del Ptx en micelas de gangliósidos.	73
Figura 6. Efecto del pH en la incorporación de Ptx en micelas de GM1.	73
Figura 7. Efecto de cambios en el contraión de GM1 en la incorporación de Ptx en micelas de GM1.	74
Figura 8. Efecto de la temperatura en la incorporación de Ptx en micelas GM1.	75
Figura 9. Patrones de difracción de rayos X de: (A) GM1 sólido,	
(B) Ptx sólido, (C) mezcla de Ptx y GM1 en estado sólido y	

(D) solución de micelas GM1/Ptx liofilizada.	76
Figura 10. Patrones cromatográficos de micelas de GM1 y de complejos GM1/Ptx.	77
Figura 11. Microscopía electrónica e histogramas de frecuencia de:	
(A) micelas de GM1,	77
(B) GM1/Ptx y	78
(C) GM1 calentado a 55 °C.	78
Figura 12. Efecto del pH en la estabilidad del Ptx en solución e incorporado en los complejos GM1/Ptx.	81
Figura 13. Comparación de la incorporación de Ptx en micelas de GM1 y liposomas mixtos.	81
Figura 14. Captación celular de Ptx partir de una solución en DMSO, y desde micelas GM1/Ptx.	82
Figura 15. Efecto citotóxico in vitro de GM1, Ptx y GM1/Ptx sobre células: (A) Vero y (B) Hep-2.	83
Figura 16. Fotos de cortes histológicos.	84
Figura 17. Actividad antiangiogénica del Ptx contenido en el Taxol y en los complejos micelares GM1/Ptx.	86
CAPÍTULO 2	
Figura 1. Patrones cromatográficos de micelas GM1/Ptx, plasma y de complejos GM1/Ptx+plasma.	103
Figura 2. (A) Perfil cromatográfico	103
(B) Electroforesis en SDS-PAGE	103
(C) Cromatografía en capa fina, de las alícuotas de elución 7 a 14 de la muestra GM1/Ptx + plasma 4 hs a 37 °C.	103
Figura 3. Patrones cromatográficos de micelas GM1/Ptx+Alb incubados a:	
(A) 4 °C	105
(B) 37 °C	105
(C) 55 °C, por 1, 4 y 24 hs.	106
Figura 4. Patrones cromatográficos de micelas de GM1/Ptx a 4 °C, 55 °C, e incubadas con Alb a 55 °C por 1h.	106
Figura 5. Patrones cromatográficos de micelas GM1/Ptx incubadas con Alb a pH 7, 5 y 3 por 24 hs a 37 °C.	107

Figura 6. Patrones cromatográficos de micelas GM1/Ptx incubadas con cantidades crecientes de Alb a pH3 y 37 °C por 24 hs.	108
Figura 7. Efecto del pH 10 en la estabilidad del Ptx en solución e incorporado en los complejos GM1/Ptx y GM1/Ptx/Alb.	110
Figura 8. Microscopía electrónica e histograma de frecuencia de micelas GM1/Ptx/Alb.	110
Figura 9. Captación celular de Ptx partir de una solución en DMSO y desde micelas GM1/Ptx y GM1/Ptx/Alb.	111
Figura 10. Efecto citotóxico in vitro de GM1, Ptx, GM1/Ptx y GM1/Ptx/Alb sobre células: (A) Vero y (B) Hep-2.	112
CAPÍTULO 3	
Figura 1. (A) Incorporación de DOX en micelas de GM1.	127
(B) Capacidad de micelas de GM1 para solubilizar DOX.	127
Figura 2. Efecto del pH en la incorporación de DOX en micelas de GM1.	128
Figura 3. Efecto de la temperatura en la incorporación de DOX en micelas GM1.	129
Figura 4. Patrones cromatográficos de micelas de GM1 y de complejos GM1/DOX.	130
Figura 5. Microscopía electrónica e histogramas de frecuencia de:	
(A) micelas de GM1, (B) GM1/Ptx y (C) GM1/DOX.	131
Figura 6. Efecto del pH en la estabilidad de DOX en solución e incorporada en micelas GM1/DOX.	132
Figura 7. Patrones cromatográficos de micelas GM1/DOX incubadas con Alb a pH 3 y 37 °C por 24 hs.	133
Figura 8. Microscopía electrónica e histograma de frecuencia de micelas GM1/DOX/Alb.	134
Figura 9. Captación celular de DOX desde una solución control y a partir de complejos GM1/DOX y GM1/DOX/Alb.	135
Figura 10. Efecto citotóxico in vitro de GM1, DOX, GM1/DOX y GM1/DOX/Alb sobre células Hep-2.	135
CAPÍTULO 4	
Figura 1. Capacidad de micelas de GM1 y GM1/Ptx para incorporar DOX.	149

Figura 2. Incorporación de Ptx en micelas GM1 y GM1/DOX.	150
Figura 3. Patrones cromatográficos de micelas de GM1 y de complejos GM1/Ptx/DOX.	151
Figura 4. Microscopía electrónica e histograma de frecuencia de micelas GM1/Ptx/DOX.	152
Figura 5. Efecto del pH 10 en la estabilidad de DOX y Ptx en solución, y de DOX y Ptx incorporados en micelas GM1/Ptx/DOX.	153
Figura 6. Patrones cromatográficos de micelas GM1/Ptx/DOX incubadas con Alb a pH 3 y 37 °C por 24 hs.	154
Figura 7. Microscopía electrónica e histograma de frecuencia de micelas GM1/Ptx/DOX/Alb.	155
Figura 8. Captación celular de DOX y Ptx desde una solución control y a partir de complejos GM1/Ptx/DOX y GM1/Ptx/DOX/Alb.	156
Figura 9. Efecto citotóxico in vitro de Ptx, DOX, GM1/Ptx/DOX y GM1/Ptx/DOX/Alb sobre células Hep-2.	177

2. ABREVIATURAS

a	Área del grupo polar
ABI-007 (nab)	Nanopartículas de albúmina con Paclitaxel
ABI-008	Nanopartículas de albúmina con Docetaxel
ABI-009	Nanopartículas de albúmina con Rapamicina
Alb	Albúmina sérica humana
BHL	Balance Hidrofilico-Lipofilico
CAM	Membrana corioalantoidea
CD	Ciclodextrina
CMC	Concentración micelar crítica
Col	Colesterol
DHA	Ácido graso docosahexaenoico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
dsPG	Diestearoil fosfatidil glicerol
Dtx	Docetaxel
EPR	“Enhanced Permeation and Retention”
FDA	“Food and drug administration” - Administración de alimentos y medicamentos
GM1	Monosialogangliósido GM1
GM2	Monosialogangliósido GM2
GM3	Monosialogangliósido GM3
GM4	Monosialogangliósido GM4
Gp60	Receptor específico de albúmina en células endoteliales
GR	Glóbulos rojos
GT	Gangliósidos totales
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HeLa	Células humanas de epiteloma de cuello de útero
Hep-2	Células humanas de epiteloma laríngeo
HSPC	Fosfatidilcolina de soja hidrogenada
HPLC	“High-performance liquid chromatography” - Cromatografía líquida de alta eficiencia
IC50	Inhibición del crecimiento celular en un 50 %
l	Longitud de la cola hidrofóbica
LIGA	Gangliósido LIGA-20

MA	Células epiteliales de riñon de mono
MEM	Medio esencial mínimo
N	Número de agregación
NIH 3T3	Células fibroblásticas de embrión de ratón
O	“oil” - aceite
p	Parámetro de empaquetamiento crítico
PAGE	Geles de poliacrilamida
PBS	Buffer salino fosfato
PEG	Polietilenglicol
PM	Peso molecular
PPE	Eritrodisestesia palmar plantar
Ptx	Paclitaxel
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SPARC(BM40)	Proteína secretada ácida rica en cisteína
TMC	Temperatura de micelización crítica
v	Volumen molecular
VERO	Células de mono verde africano
W	“water” - agua

3. RESUMEN

En este trabajo de investigación, se evaluó la capacidad que tienen los gangliósidos, moléculas hidrotópicas que forman estructuras micelares de manera espontánea, para vehicular fármacos en medio acuoso.

Se estudiaron en particular a los monosialogangliósidos, de los cuales el GM1 resultó ser el más apropiado para la encapsulación de fármacos oncológicos como Paclitaxel, Docetaxel y Doxorubicina. Las estructuras micelares formadas resultaron ser muy estables en medio acuoso, de tamaño menor a 50 nm y con un radio hidrodinámico equivalente al de una proteína globular de 300 kDa, características con las que evitarían dos de los problemas fundamentales que tiene la administración endovenosa de fármacos: la rápida eliminación de circulación por el sistema retículo endotelial y la exclusión renal.

Se determinó que el tipo de asociación que existe entre las micelas de GM1 y los fármacos es dominada principalmente por interacciones de tipo hidrofóbicas. Además se estudiaron las condiciones físico-químicas óptimas para la formación de los complejos y la estabilidad química y estructural de éstos en medios acuosos.

Debido a que estos fármacos oncológicos se administran por vía endovenosa, se estudió la interacción de los complejos GM1-droga con componentes plasmáticos humanos. Se determinó que éstos: 1- No presentan un efecto lítico sobre los glóbulos rojos 2- No influyen en la actividad plaquetaria y 3- Interaccionan espontáneamente con la albúmina. Esto último resultó ser una cualidad beneficiosa debido a que se ha demostrado que en los tejidos tumorales se encuentra incrementada la secreción de una proteína fijadora de albúmina (SPARC) que permitiría la acumulación de los complejos en el sitio específico de acción, incrementando la eficiencia del fármaco antitumoral.

Finalmente se evaluó el efecto citotóxico *in-vitro* de las formulaciones obtenidas sobre cultivos celulares, en donde se demostró que los principios activos estudiados son liberados desde las micelas al entrar en contacto con las células y que los mismos mantienen su efecto biológico, resultando éste muy similar al de las drogas libres.

Los resultados obtenidos nos permitieron considerar a las micelas de GM1 como un modelo factible para la vehiculización de fármacos de distinta naturaleza polar.

SUMMARY

In this work we assessed the ability of gangliosides, hydrotropic molecules that spontaneously form micellar structures, to deliver drugs in aqueous media.

We studied particularly the monosialogangliosides, of which GM1 was the most appropriate for encapsulation of cancer drugs such as paclitaxel, docetaxel and doxorubicin. The formed micellar structures were found to be very stable in aqueous medium, smaller than 50 nm and with an hydrodynamic radius equivalent to that of a globular protein of 300 kDa, features that would prevent two of the key problems in the intravenous administration of drugs: rapid clearance of circulating by the reticuloendothelial system and renal filtration.

It was determined that the type of association between GM1 micelles and the drugs is mainly based on hydrophobic interactions. In addition we studied the optimal physico-chemical conditions for complex generation as well as their chemical and structural stability in aqueous media.

Subsequently, on the basis that these cancer drugs are administered intravenously, we studied the interaction of GM1-drug complexes with human plasma components. It was determined that these complexes: 1-Do not have a lytic effect on red blood cells, 2- Do not have an influence on platelet activity and 3- Spontaneously interact with albumin. The latter proved to be a beneficial quality because it has been shown that in tumor tissue the secretion of an albumin binding protein (SPARC) is increased allowing the accumulation of complexes in the specific site of action, thus increasing the antitumor efficiency of the drug.

Finally, we evaluated the *in-vitro* cytotoxic effect of the formulations obtained on cell cultures, which showed that the active principles studied are released from the micelles when they are in contact with cells retaining a similar biological effect, than the free drugs.

The findings reported herein let us to consider GM1 micelles as a feasible model for drug delivery of active ingredients of different polar nature.

4. INTRODUCCIÓN

4.1 Aspectos generales

El valor terapéutico de muchas moléculas biológicamente activas está limitado por propiedades tales como la baja solubilidad, limitada biodisponibilidad y rápida eliminación [1]. Además, mientras los efectos beneficiosos de muchos fármacos ocurren a través de su interacción con tejidos específicos, su exposición a otros tipos celulares conduce frecuentemente a efectos secundarios no deseados y a una marcada toxicidad [2]. Esta problemática ha llevado al desarrollo de múltiples sistemas de administración de fármacos con el objeto de mejorar las propiedades de los compuestos terapéuticos, aumentar su eficacia y reducir sus efectos secundarios dañinos.

En general, se espera que los vehículos para el transporte de fármacos, especialmente aquellos usados en la administración parenteral, sean biodegradables, fáciles y relativamente baratos de preparar, que tengan un tamaño de partícula pequeño (preferentemente menor de 100 nm), que posean una alta capacidad de carga, que presenten un tiempo de circulación prolongado y que idealmente se acumulen específicamente en los sitios requeridos del cuerpo [3]. Para mejorar el rendimiento, estos vehículos se pueden hacer lentamente biodegradables, estímulo-reactivos (sensibles al pH o temperatura), y dirigidos (mediante la conjugación con ligandos específicos para ciertos componentes característicos de la zona patológica).

La circulación prolongada de estos vehículos [4,5], permite mantener el nivel terapéutico requerido del fármaco en sangre durante intervalos de tiempo prolongados y su acumulación en sitios patológicos con una vasculatura afectada y permeable, como en el caso de tumores, inflamaciones y áreas infartadas, debido al efecto conocido como “Enhanced Permeation and Retention (EPR)” [6,7]. Además, un tiempo prolongado de circulación permite conseguir un mejor efecto de direccionamiento para aquellos vehículos que han sido modificados con ligandos específicos, ya que aumenta la cantidad de veces que el vehículo pasa a través del objetivo e interacciona con él. Esta característica es fundamental para el éxito del direccionamiento en áreas patológicas que presentan un suministro de sangre disminuido y/o con una baja concentración del componente específico [8].

El desarrollo de vehículos biocompatibles y biodegradables para el transporte de fármacos hidrofóbicos, que posean las características mencionadas previamente, aún tiene muchas cuestiones sin resolver. La aplicación terapéutica de agentes hidrofóbicos se asocia

con algunos problemas graves ya que la baja solubilidad resulta en una pobre absorción y una baja biodisponibilidad, principalmente en administración por vía oral [9]. Además, el fenómeno de agregación tras la administración intravenosa de fármacos poco solubles puede dar lugar a complicaciones como embolia [10] y toxicidad local en los sitios de deposición del agregado [11]. Por otro lado, la hidrofobicidad y baja solubilidad en agua parecen ser propiedades intrínsecas beneficiosas de muchos medicamentos (incluidos los agentes oncológicos, muchos de los cuales son compuestos policíclicos voluminosos, tales como camptotecina, paclitaxel o tamoxifeno) [12], ya que estas características ayudan a la molécula del fármaco a penetrar membranas celulares y alcanzar sus objetivos intracelulares [13,14]. También se ha observado que ciertas moléculas biológicamente activas pueden necesitar un grupo lipofílico para adquirir una afinidad suficiente hacia el receptor apropiado. Aún así, la pobre solubilidad acuosa plantea un problema grave que lleva a algunas compañías farmacéuticas líderes a hacer un esfuerzo para excluir compuestos muy poco solubles al principio de su proceso de selección sin importar que tan activos sean éstos hacia sus blancos moleculares [9,15].

Para superar la pobre solubilidad de algunos fármacos se usan determinados disolventes orgánicos clínicamente aceptables, como Cremophor EL (aceite de ricino polietoxilado), y/o ciertos agentes tensioactivos [11]. También, la formación de sales o ajuste de pH en algunos casos facilita la disolución de los fármacos poco solubles si es que contienen grupos ionizables [16]. Sin embargo, la administración de muchos co-solventes o tensioactivos causan toxicidad y efectos secundarios indeseables. Otra desventaja del uso de co-solventes y tensioactivos es el peligro de precipitación de las drogas por dilución de las formulaciones con soluciones acuosas (tales como los fluidos fisiológicos para la administración parenteral), ya que los tensioactivos no pueden retener el material solubilizado en concentraciones inferiores a su concentración micelar crítica (CMC) valor que es típicamente bastante alto en los casos de tensioactivos convencionales de bajo peso molecular [17].

Actualmente son múltiples los sistemas de administración de fármacos que se encuentran en pleno desarrollo, tanto para la vehiculización de drogas hidrofílicas como hidrofóbicas. De ellos, cabe destacar a los siguientes: liposomas, microemulsiones, ciclodextrinas, dendrímeros, nanopartículas y micelas.

4.1.1 Liposomas

Son vesículas nanométricas formadas por una o más bicapas lipídicas, estructuras típicas de las membranas biológicas, formadas por dos filas de lípidos enfrentadas por sus colas hidrofóbicas. El interior acuoso de estas estructuras brinda la posibilidad de encapsular fármacos de naturaleza polar. Por otro lado, las moléculas lipofílicas y anfifílicas se pueden solubilizar dentro de la bicapa lipídica de acuerdo a su afinidad con los fosfolípidos (Figura 1).

Los procedimientos actuales de elaboración de liposomas son bastante numerosos, pudiéndose seleccionar el método en función del tipo de liposoma que se desea obtener, la necesidad o no de utilizar disolventes orgánicos, etc. En general éstos son métodos tediosos y largos; sin embargo se ha logrado la reproducibilidad de los mismos mediante el uso de técnicas de sonicación y extrusión a través de membranas de policarbonato con diferente tamaño de poro. Por otro lado, estos preparados se desestabilizan con bastante rapidez en solución, por lo que deben ser estabilizados por medio de la liofilización [18] en presencia de crioprotectores como carbohidratos u oligómeros de glucosa, o mediante la formación de los llamados proliposomas [19], particularmente los obtenidos por secado en lecho fluido [20]. En ambas estrategias se asume que la forma de evitar la inestabilidad, tanto física como química, es la conservación en ausencia de agua.

Una desventaja importante que tiene el uso de liposomas en la administración endovenosa de fármacos es la desestabilización que sufren éstos cuando alcanzan el torrente sanguíneo, relacionada con la interacción con las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Aunque esta interacción no es totalmente conocida, se sabe que las HDL actúan removiendo bicapas lipídicas, lo cual facilita la adsorción o inclusión de opsoninas como fibronectina, proteína C reactiva, α -2 macroglobulina, etc., que juegan un papel importante en el reconocimiento de los liposomas y otras partículas por parte de los macrófagos del sistema retículo-endotelial [21]. Esta problemática ha conducido al desarrollo de los llamados liposomas “stealth” o estéricamente estabilizados, recurriendo al recubrimiento de éstos con polímeros hidrofílicos y flexibles [22]. Entre los polímeros que presentan estas características y son biocompatibles, están los polietilenglicoles (PEG) [23], los que han suscitado mayor interés y sobre los que se han centrado los esfuerzos de un gran número de investigadores. De esta manera, la presencia de PEG en la superficie de los liposomas previene la adsorción de proteínas siendo ésta propiedad la responsable de la larga vida media que presentan in-vivo [24]. Sin embargo, la estabilidad de los liposomas

con PEG, llamados “pegilados”, no siempre es deseable para conseguir una adecuada liberación del fármaco. Si el sistema es internalizado por endocitosis, la presencia de la cubierta de PEG puede impedir la liberación del fármaco del endosoma. Por ello se ha propuesto la utilización de sistemas que tengan una unión lábil PEG-lípido que se rompa en el medio ácido de la vacuola endocítica o en el medio ácido de la masa tumoral [25].

La utilización de los liposomas como vehículos para contener fármacos oncológicos ha sido ampliamente estudiada tanto para fármacos de bajo peso molecular como para péptidos y proteínas así como para citoquinas y otros inmunomoduladores, con objeto de activar macrófagos y convertirlos en tumorocidas. También han sido incluidos en los liposomas material genético como ADN, oligonucleótidos y ribosomas. Una amplia variedad de fármacos citostáticos han sido incluidos en liposomas y aunque en algunos casos se ha encontrado un incremento de la toxicidad, en otros, fundamentalmente los que contienen antraciclinas, ésta se ha visto disminuida.

El hecho de que los vasos resultantes de la respuesta angiogénica inducida por las células tumorales presenten una mayor permeabilidad, permite el paso de liposomas de un tamaño de 50 nm; ello, unido a un menor drenaje linfático determina que estos nanosistemas se acumulen en el sitio del tumor. Esta idea es la base en la que se fundamentan las especialidades comercializadas conteniendo doxorubicina (Doxil® y Doxopeg®), daunorrubicina (Daunoxome®), citarabina (Depocyt®) y vincristina (Marqibo®) que ha sido recientemente aprobada por FDA para el tratamiento de pacientes con leucemia linfoblástica aguda negativa para cromosoma Filadelfia.

Además de ser usados en terapia contra el cáncer, los liposomas han sido ampliamente utilizados como sistemas de liberación de fármacos para tratar múltiples procesos infecciosos producidos por bacterias, hongos, virus y parásitos.

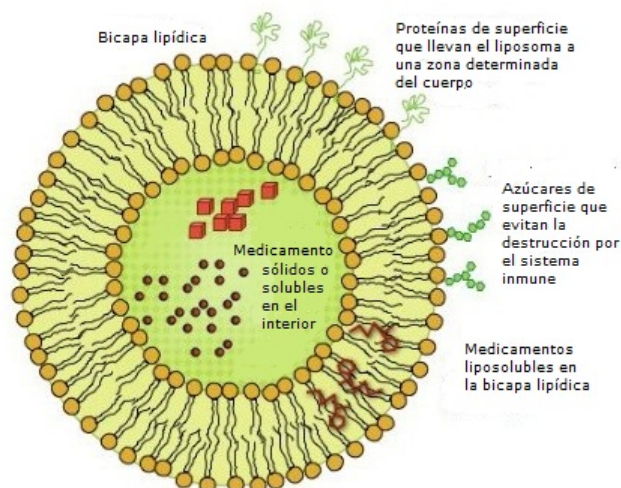


Figura 1. Esquema de un liposoma y su capacidad para vehicular fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos.

4.1.2 Microemulsiones

Ciertas sustancias naturales y numerosos productos fabricados por el hombre son sistemas dispersos líquido-líquido no miscibles, estabilizados por un surfactante. Éstos son reunidos bajo el término genérico de emulsión y son utilizados como vehículos de acondicionamiento mixto, acuoso-orgánico, de pinturas, productos alimenticios, productos farmacéuticos, productos cosméticos y de higiene, combustibles, fluidos industriales o de perforación y productos sanitarios.

Se utiliza el término de macroemulsión o simplemente emulsión para designar sistemas dispersos fuera del equilibrio, constituidos por dos fases líquidas no miscibles llamadas simbólicamente agua (W) y aceite (O). El diámetro de gota de las emulsiones clásicas excede el micrómetro, valor correspondiente aproximadamente al tamaño mínimo accesible por agitación mecánica. Cuando el tamaño de gota se encuentra por debajo de 100 nm, se habla de mini o nanoemulsiones. Sin embargo, cualquiera que sea la dimensión de sus gotas, todas estas emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables que se separan, más o menos rápidamente, en dos fases.

En cuanto a las microemulsiones, estas no son emulsiones constituídas por pequeñas gotas, como creyó Schulman cuando él propuso esta denominación en 1959 [26]; sino sistemas monofásicos dentro de los cuales un surfactante particularmente eficaz hace posible la coexistencia, a escala casi molecular, de aceite y agua. Así, las microemulsiones presentan microdominios deformables de agua y de aceite, separados por una película delgada y fluctuante de surfactante (Figura 2). A menudo estos microdominios están interconectados y no son necesariamente esféricos, poseen pequeñas dimensiones y fluctúan rápidamente dentro del tiempo y el espacio. Contrariamente a las macro / mini / nanoemulsiones, las microemulsiones son termodinámicamente estables. Además, son ópticamente isotrópicas y transparentes y poseen una baja viscosidad.

Dependiendo de las propiedades físico-químicas de los constituyentes y de la composición, la estabilidad de la microemulsión puede verse afectada por la adición de buffers, electrolitos, conservantes, polímeros y drogas, que pueden alterar su estructura y la región/intervalo de existencia de la misma. La temperatura usualmente también ejerce un efecto sobre la formación y existencia de región de microemulsiones ya que el Balance Hidrofílico/Lipofílico (BHL) de los surfactantes puede cambiar con la temperatura y desestabilizar la interfase. Por lo tanto, la estabilidad de la formulación microemulsiva

final debe ser siempre examinada dentro de los rangos de temperatura de almacenamiento y aplicación.

Comúnmente en el caso de microemulsiones de aplicación farmacéutica, éstas contienen componentes adicionales tales como un co-surfactante y/o una droga. El co-surfactante es también anfifílico con afinidad tanto por el aceite como por la fase acuosa y se particiona en la monocapa que forma junto con el surfactante en la interfase aceite-agua. Sin embargo, no necesita obligatoriamente ser capaz de formar estructuras de asociación por sí mismo. Una amplia variedad de moléculas pueden funcionar como co-surfactantes incluyendo surfactantes no iónicos, alcoholes, ácidos alcanoicos, alcanodiolos y aminas alquílicas [27].

Lo atractivo de los sistemas microemulsivos o/w reside en su habilidad para incorporar drogas hidrofóbicas en la fase oleosa apolar, aumentando de esta manera su solubilidad aparente [28,29]. Éstos han sido usados para solubilizar drogas esteroideas tales como corticoides (prednisolona, hidrocortisona y betametasona) y hormonas sexuales como testosterona, progesterona y sus ésteres [30]. Cabe destacar que las drogas hidrofóbicas necesitan tener una solubilidad significativa en la fase oleosa utilizada para que el sistema microemulsivo o/w ofrezca ventajas sobre el sistema micelar clásico. Las microemulsiones w/o también fueron utilizadas para drogas peptídicas lábiles; se han vehiculizado prodrogas de ibuprofeno y ácido flufenámico en microemulsiones fosfolipídicas.

Sigue existiendo, sin embargo, una considerable necesidad de continuar trabajando en la caracterización del comportamiento físico-químico de este tipo de formulaciones para que sean empleadas como vehículos de administración de drogas multipropósito.

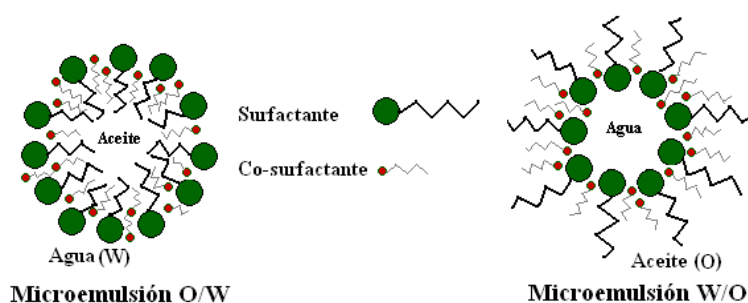


Figura 2. Esquema de microemulsiones O/W y W/O y sus componentes.

4.1.3 Ciclodextrinas (CD)

Son una familia de oligosacáridos cíclicos formados por 6 (α), 7 (β) u 8 (γ) unidades de α -D-[1,4] glucosa, que resultan de la degradación enzimática del almidón,

catalizada por la ciclomaltodextrina glucanotransferasa. Las tres ciclodextrinas tienen una estructura similar, considerando la longitud y orientación de sus enlaces, que es toroidal y rígida en la que los grupos 3-OH, 2-OH y 6-OH se encuentran en los bordes (Figura 3). Estos grupos hidroxilo libres situados en el exterior de la superficie de los anillos hacen que las ciclodextrinas sean hidrofílicas y solubles en agua, resultado de la capacidad de interacción de dichos grupos hidroxilo con el medio acuoso, siendo mayor para la γ -ciclodextrina y la α -ciclodextrina.

La cavidad formada en las diferentes CDs tienen distinto diámetro dependiendo del número de residuos de glucosa, sin embargo la profundidad es la misma en las tres. Esta cavidad interna de naturaleza hidrofóbica, es una característica estructural fundamental de la ciclodextrinas, que le proporciona la capacidad de formar complejos con otras moléculas de muy diversa naturaleza que deberán tener un tamaño compatible con la cavidad interna de la CD, permitiendo formar así un complejo de inclusión estable.

Las CDs son moléculas química y físicamente muy estables con capacidad de formar complejos con una gran variedad de compuestos orgánicos. El mayor porcentaje de CDs usadas comercialmente corresponde a la alimentación [31], a la cosmética y aseo personal [32] como, por ejemplo, la eliminación de olores formados en la degradación microbiana del sudor, incorporándose con este fin en desodorantes de barra. Sin embargo, es indudable que el mayor esfuerzo en investigación está relacionado con su potencial aplicación farmacéutica [33].

Tal como se mencionó, la mayoría de los fármacos son poco solubles en agua y, consecuentemente, su absorción biológica es lenta y frecuentemente poco eficaz; son sensibles a la oxidación y pueden descomponerse por la luz y el calor. Muchas de estas moléculas son capaces de formar fácilmente complejos con las ciclodextrinas, logrando mejorar así su biodisponibilidad y estabilidad frente a condiciones externas adversas.

Con frecuencia, es necesario combinar múltiples sustancias o fármacos activos dentro de una formulación, para conseguir efectos sinérgicos. Sin embargo, algunos de los compuestos son incompatibles en el medio y en estos casos la microencapsulación de los ingredientes incompatibles dentro de las ciclodextrinas, permite estabilizar la formulación mediante la separación física de los componentes, evitando así la interacción química entre ellos.

En general, las ciclodextrinas y sus derivados ofrecen, en la actualidad, otras posibilidades de aplicación: son eficaces en la separación cromatográfica mediante reconocimiento molecular de mezclas de sustancias complejas, incluyendo la

diferenciación de moléculas enantioméricas; tienen actividad catalítica, siendo de interés como modelos enzimáticos; se utilizan como receptores de nucleótidos; precursores de tubos moleculares; sensores químicos, etc. [34].

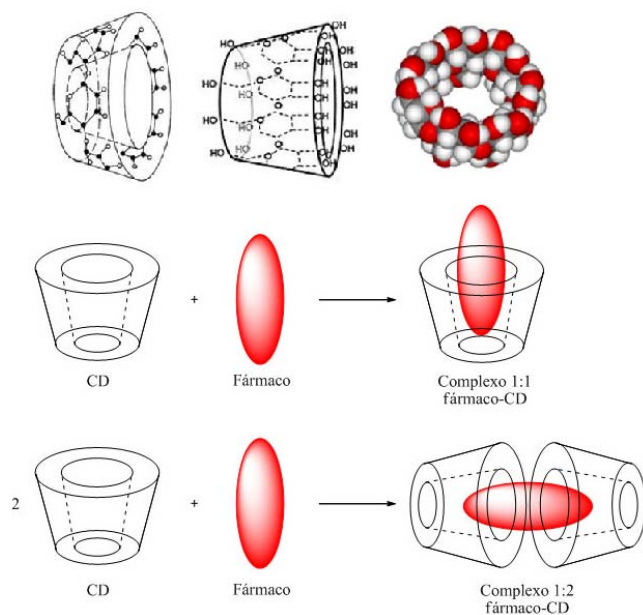


Figura 3. Representación esquemática de la estructura de las ciclodextrinas y de su capacidad para solubilizar fármacos hidrofóbicos

4.1.4 Dendrímeros

Son macromoléculas de tamaño nanométrico, con muchas ramificaciones, una estructura globular o semiglobular, una baja polidispersión en comparación con los polímeros tradicionales, y un pequeño volumen molecular [35].

La estructura de los dendrímeros se caracteriza por la existencia de un núcleo, que determina el tamaño, forma, dirección y multiplicidad, una zona intermedia de capas concéntricas o capas de amplificación y una superficie con un número previsto de grupos funcionales. Además, poseen otras características como son su alta estabilidad y la capacidad de funcionalizar su superficie, que los convierten en buenos candidatos para la vehiculización de fármacos.

Cada una de las capas existentes entre el núcleo y la superficie de la estructura determina lo que se conoce con el nombre de generación de la estructura dendrítica. A medida que aumenta la generación del dendrímero se modifica su estructura y la distancia entre los grupos superficiales (Figura 4).

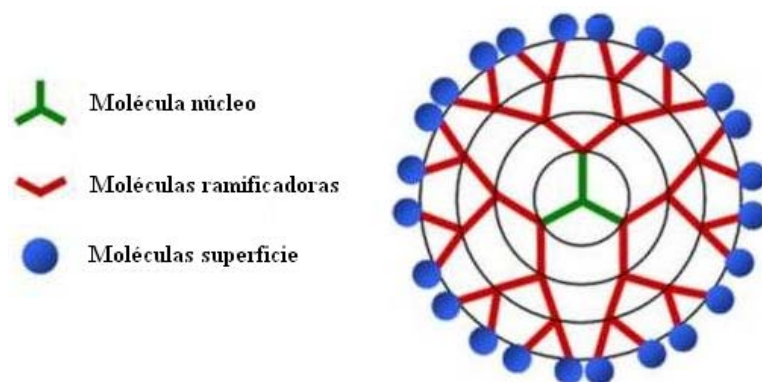


Figura 4. Representación esquemática de la estructura del dendrímero y sus componentes básicos.

Actualmente están comercializados diversos dendrímeros PAMAM, conocidos con el nombre de Starburst, y de PPI con el nombre de Astramol, pero el diseño de dendrímeros puede basarse en una gran variedad de uniones como por ejemplo poliaminas, poliamidas y aminas o con subunidades más hidrofóbicas de poliariléter. Otras modificaciones prometedoras dan origen a los llamados glicodendrímeros; éstos pueden producirse por la asociación, en la superficie, con PEG o L-arginina, con ligandos como el factor de crecimiento epitelial o con β -ciclodextrina. Finalmente también se están estudiando nuevos dendrímeros bifuncionales obtenidos con la combinación de péptidos catiónicos y lípidos [36].

Las investigaciones no se limitan al campo de liberación de fármacos, los dendrímeros están siendo estudiados como vectores para la liberación de genes, como agentes de contraste para las diferentes técnicas de imagen molecular y como nanosportes [37]. Los agentes bioactivos, que tienen que ser transportados, pueden ser encapsulados en el interior del dendrímero o pueden unirse a su superficie por medio de interacciones químicas o físicas. Sin embargo, el interés que los dendrímeros han despertado en la tecnología farmacéutica y en numerosos campos de la ciencia no ha ido acompañado, en muchos casos, de los correspondientes estudios de biocompatibilidad y toxicidad. En general las macromoléculas y estructuras policationicas producen una desestabilización de las membranas celulares y causan su lisis.

Los dendrímeros PAMAM aniónicos, con grupos carboxilo en la superficie, tienen menor citotoxicidad y efecto hemolítico e incluso los de baja generación no presentan éstos efectos [38]. Para mejorar la biocompatibilidad de los dendrímeros PAMAM se ha procedido a una derivatización parcial de los grupos amino con uniones PEG o ácidos grasos obteniéndose una importante reducción en la citotoxicidad y efecto hemolítico si bien la introducción de un elevado número de cadenas lipídicas o de PEG aumenta la citotoxicidad [39].

4.1.5 Nanopartículas

Son partículas coloidales sólidas con un tamaño de 10 a varios cientos de nanómetros constituidas por polímeros naturales o sintéticos. Dependiendo del proceso seguido en su elaboración se pueden obtener dos tipos de estructuras: nanoesferas o nanocápsulas. Las primeras tienen una estructura tipo matriz polimérica, en la que el principio activo se encuentra dispersado, mientras que las segundas poseen un núcleo de carácter oleoso, que contiene el fármaco, rodeado de una cubierta polimérica. Debido a la elevada superficie específica de estos sistemas el fármaco también puede ser adsorbido en la superficie del sistema nanoparticular (Figura 5).

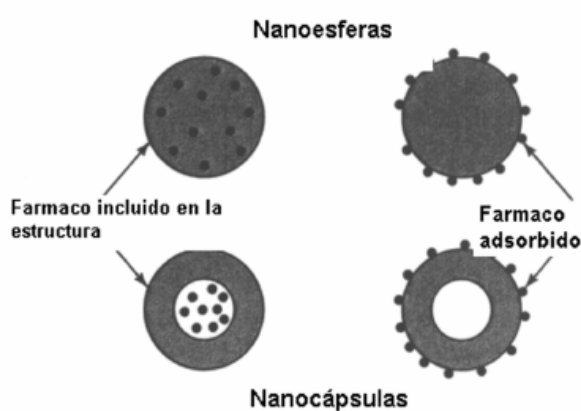


Figura 5. Representación esquemática de la estructura de nanoesferas y nanocápsulas y su capacidad para vehicular fármacos.

Los métodos de preparación de las nanopartículas son actualmente muy numerosos, pudiendo agruparlos en aquellos en los que se realiza una polimerización a partir de monómeros o bien aquellos que parten del polímero. La elección del método de preparación depende de las características del material formador del sistema y de las características de solubilidad del principio activo que se desea incorporar. Las propiedades del material en aspectos como la biocompatibilidad, características de degradación, características de liberación deseadas para el principio activo son fundamentales a la hora de definir el tipo de aplicación biomédica.

La conservación estable de estos sistemas se logra mediante la liofilización, siendo necesaria la incorporación de crioprotectores como la trehalosa que impidan la agregación de las nanopartículas durante el proceso, hecho que se presenta frecuentemente en las nanocápsulas o con ciertos polímeros.

La primera formulación de nanopartículas poliméricas comercializada ha sido la de nanopartículas de albúmina para la vehiculización de paclitaxel, con un tamaño medio de 130 nm. Esta formulación, denominada Abraxane®, fue aprobada por la FDA (*Food and*

Drug Administration) en 2005 para el tratamiento del cáncer de mama metastásico. La mayor eficacia de Abraxane sobre la formulación clásica de paclitaxel (Taxol®) fue atribuida, en principio, al hecho de que los pacientes podían recibir dosis más elevadas debido a la ausencia de Cremophor, solvente tóxico y principal causante de los efectos secundarios de esta formulación. Sin embargo estudios posteriores han puesto de manifiesto que la albúmina interacciona con dos proteínas que la transportan, junto al paclitaxel, hacia la masa tumoral. La primera proteína, llamada gp60, se localiza en la superficie de las células del endotelio vascular y a consecuencia de esta interacción tienen lugar una serie de procesos bioquímicos que determinan que las nanopartículas se acumulen en el fluido intersticial que rodea el tumor [40-42]. La segunda proteína, denominada SPARC (proteína secretada ácida y rica en cisteína) o BM40 u osteonectina, se encuentra en la superficie de muchas células tumorales e interacciona con la albúmina lo que da lugar a una mayor concentración de paclitaxel en estas células [43].

Los estudios clínicos demostraron que el Abraxane® consigue ralentizar el curso de la enfermedad, aumentando la supervivencia de los pacientes de cáncer de mama [44]. Abraxis Bioscience ha empleado esta misma tecnología para la formulación de nanopartículas de albúmina con el fármaco citostático docetaxel (ABI-008) y con el antibiótico rapamicina (ABI-009), que se encuentran actualmente en fase clínica II y I, respectivamente [45].

4.1.6 Micelas

Éstas representan dispersiones coloidales con partículas normalmente de tamaño entre los 5 y 100 nm y pertenecen a una familia numerosa de sistemas de dispersión que consta de partículas (llamada fase dispersa), distribuidas en una fase continua (denominada medio de dispersión).

Las micelas se forman espontáneamente bajo cierta concentración y temperatura a partir de agentes anfífilicos o surfactantes, moléculas que consisten en dos regiones claramente diferenciadas, una hidrofílica y otra hidrofóbica. A bajas concentraciones en un medio acuoso, tales moléculas anfífilicas existen por separado (monómeros), sin embargo, a medida que su concentración se incrementa, la agregación se lleva a cabo dentro de un intervalo de concentración bastante estrecho. La concentración de un monómero anfífilico a la cual aparecen las micelas se llama concentración micelar crítica (CMC); mientras que la temperatura por debajo de la cual las moléculas anfífilicas existen como monómeros y

por encima existen como agregados se llama temperatura de micelización crítica (TMC). Encima de la CMC, toda molécula de surfactante se encuentra formando micelas y la concentración de surfactante en estado monomérico o no asociado, queda prácticamente constante. Sin embargo se debe destacar que el equilibrio monómero-micela es de tipo dinámico, es decir, que existe un intercambio permanente de moléculas entre las micelas y la fase acuosa.

Las micelas se caracterizan por estar formadas por un número constante de unidades monoméricas, llamado número de agregación (N), que depende del tipo de anfífilo y del ambiente físico-químico en que éstos se encuentren (electrolitos, temperatura, etc.).

La arquitectura de la molécula anfifílica y la carga del grupo polar desempeñan importantes papeles en la forma de la micela. Se puede demostrar que ésta depende de los valores relativos de la longitud de la cola hidrofóbica (l), área de la cabeza o grupo polar (a) y del volumen molecular de la molécula (v). Israelachvili et al. [46] han argumentado que, dependiendo del valor del parámetro de empaquetamiento $p (= v/a.l)$, los agregados de surfactante podrían adquirir diferentes formas. Estos autores demostraron que, en general, las micelas adoptan forma esférica cuando $p < 1/3$ y son elipsoidales y cilíndricas cuando $1/3 < p < 1/2$. Los agregados del surfactante tienden a ser bicapas para valores de $p > 1/2$ y en casos apropiados este valor también puede resultar en la formación de vesículas (Tabla 1).

Cabe mencionar que el área efectiva de la cabeza polar del anfífilo puede ser alterada por la adición de sales o por cambios en la temperatura de la solución micelar y esto producirá cambios en la forma micelar adoptada [47,48]. Por ejemplo, la adición de un electrolito a una solución micelar iónica, disminuye la repulsión electrostática entre las cabezas polares, modificando el valor de “ a ”. Este valor también se ve modificado en el caso de tensioactivos no-iónicos cuando se produce un aumento en la temperatura de la solución que genera la deshidratación de los grupos hidrofílicos.

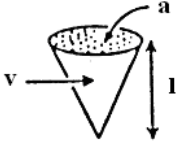



Parámetro crítico de empaquetamiento $p = v / a l$	Forma de empaquetamiento crítico	Estructuras formadas
$< 1/3$	<p>Cono</p> 	Micelas esféricas
$1/3 - 1/2$	<p>Cono truncado</p> 	Micelas cilíndricas
$1/2 - 1$	<p>Cono truncado</p> 	Bicapas flexibles, Vesículas
~ 1	<p>Cilindro</p> 	Bicapas planas

Tabla 1. Parámetro de empaquetamiento de surfactantes y varias de las estructuras que forman en soluciones acuosas.

La formación de micelas en agua es impulsada por la disminución de la energía libre del sistema debido a la remoción de fragmentos hidrofóbicos del ambiente acuoso y el re-establecimiento de la red de puentes hidrógeno en el agua. La ganancia adicional de energía resulta de la formación de uniones de Van der Waals entre los bloques hidrofóbicos en el núcleo de las micelas [49]. Así, los fragmentos hidrofóbicos del anfífilo forman el núcleo de una micela, mientras que los fragmentos hidrofílicos forman su superficie (Figura 6) [50].

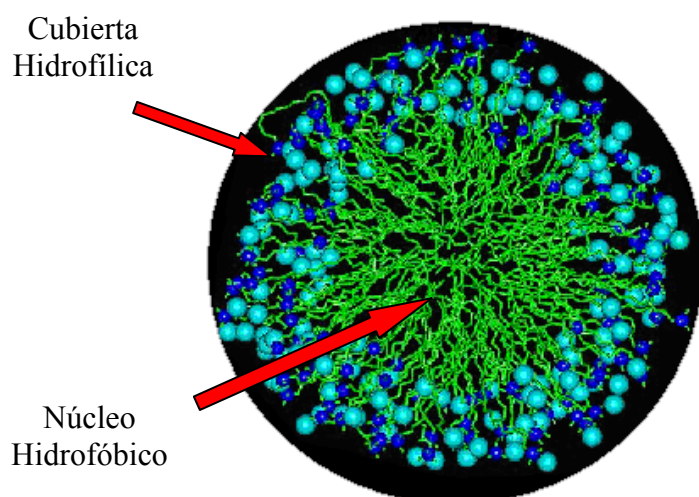


Figura 6. Representación esquemática de una micela en solución acuosa.

Las micelas pueden utilizarse como vehículos de fármacos en medios acuosos; éstas solubilizan moléculas no polares de baja solubilidad en el núcleo micelar, mientras que moléculas polares podrían ser adsorbidas en la superficie micelar y sustancias de polaridad intermedia podrían distribuirse a lo largo de las moléculas surfactantes en posiciones intermedias. En este contexto, el uso de las micelas proporciona un conjunto de claras ventajas [10,12]. La solubilización de fármacos utilizando surfactantes formadores de micelas resulta en un aumento de la solubilidad en agua de un fármaco escasamente soluble, mejorando así su biodisponibilidad; además produce una reducción de su toxicidad y otros efectos adversos, un aumento de su permeabilidad a través de las barreras fisiológicas y produce cambios sustanciales y favorables en la biodistribución de la droga. Por otro lado, la cubierta hidrofílica de las micelas protege al fármaco incorporado al mantenerlo aislado del ambiente acuoso externo, evitando así procesos de hidrólisis y degradación enzimática. Además, esta cubierta impide que se produzcan fenómenos indeseables como agregación inter-micelar, adhesión o fusión con glóbulos rojos y reconocimiento por los macrófagos del sistema retículo endotelial, permitiendo de esta manera prolongar el tiempo de circulación por el torrente sanguíneo.

En general las micelas poseen pesos moleculares mayores a 40 kDa y tamaños menores a los 100 nm, con lo que evitarían dos de los problemas más graves que tiene la administración endovenosa de fármacos: la rápida exclusión renal y la eliminación por el sistema retículo endotelial, respectivamente [51]. Además, debido a su pequeño tamaño y a su prolongado tiempo de circulación, las micelas demostraron tener una penetración espontánea en los intersticios de los compartimientos del cuerpo con el sistema vascular dañado (en tumores e infartos) por el efecto EPR [7,52].

Además, las estructuras micelares se pueden direccionar mediante la unión química de moléculas destino-específicas en su superficie. En este último caso, la liberación local de la droga libre desde las micelas en el órgano objetivo debería llevar a un aumento de la eficacia de la misma. Algunas de estas estructuras pueden ser diseñadas de tal manera que puedan ser activadas por cambios en el pH del medio ambiente, por estímulos químicos, mediante la aplicación de un campo magnético rápidamente oscilante, o por aplicación de una fuente de calor externa [53,54]. Tales modificaciones ofrecen control sobre la integridad de la partícula, las tasas de liberación de fármacos, y la ubicación de la liberación del fármaco, por ejemplo, dentro de organelas específicas.

De acuerdo con la literatura disponible, el tamaño habitual de un producto farmacéutico micelar es entre 10 y 80 nm, su valor de CMC se espera que esté en la región milimolar o incluso menor, y la eficacia de carga de un fármaco hidrofóbico debe ser entre 5 y 25 % en peso. Casi todas las vías posibles de administración de fármacos se han beneficiado con la utilización de formas micelares de las drogas en términos de la biodisponibilidad aumentada o de la reducción de los efectos adversos [55]. Se han sugerido composiciones micelares de diversos fármacos para aplicaciones de uso parenteral [56], oral [57], nasal y ocular [58].

El uso de micelas preparadas a partir de copolímeros anfifílicos para la solubilización de fármacos poco solubles ha atraído mucha atención recientemente [59,60]. Las micelas poliméricas están formadas por copolímeros de bloque que constan de unidades monoméricas hidrofílicas e hidrofóbicas con la longitud del bloque hidrofílico superior en cierta medida al hidrofóbico. Si la longitud de un bloque hidrofílico es demasiado alta, los copolímeros existen en el agua como monómeros (moléculas individuales), mientras que las moléculas con bloque hidrofóbico muy largo forman estructuras con morfología no micelar, tales como varillas y laminillas.

Similares a las micelas formadas por los detergentes convencionales, las micelas poliméricas comprenden un núcleo de bloques hidrofóbicos, estabilizados por la corona de cadenas hidrofílicas. Las micelas poliméricas a menudo son más estables en comparación con las micelas preparadas a partir de los detergentes convencionales (tienen menor valor CMC), algunos co-polímeros anfifílicos tienen valores de CMC tan bajo como 10^{-6} M [61], que es aproximadamente dos órdenes de magnitud menor que la de los agentes tensioactivos tales como Tween 80. Es por ello que el uso de micelas poliméricas a menudo permite lograr un tiempo de circulación prolongado, biodistribución favorable y menor toxicidad de un fármaco.

Se ha investigado en detalle el proceso de solubilización de fármacos insolubles en agua por copolímeros de bloque anfifílicos formadores de micelas. La simulación matemática del proceso de solubilización demostró que la solubilización inicial procede a través del desplazamiento de las moléculas del solvente (agua) del núcleo de la micela, y luego el fármaco solubilizado comienza a acumularse en el centro del núcleo de la micela empujando los bloques hidrofóbicos lejos de esta zona. Una solubilización extensa puede resultar en un cierto aumento de tamaño de las micelas, debido a la expansión de su núcleo por el fármaco solubilizado [62].

El factor principal que influye en la eficacia de incorporación de fármacos en la micela tiene que ver con el BHL de la misma, es decir con el tamaño de los bloques formadores de núcleo y de corona. En el primer caso, cuanto mayor sea el bloque hidrofóbico mayor será el tamaño del núcleo y su capacidad para atrapar fármacos hidrofóbicos. En el segundo caso, el aumento en la longitud de los bloques hidrofílicos resulta en el aumento del valor CMC, es decir, a una concentración dada de la solución del polímero anfifílico una fracción más pequeña de este polímero estará presente en la forma micelar y por ello la cantidad de la droga asociada a la micela disminuye. Además variando la composición de la micela así como el tamaño de los bloques hidrofílico e hidrofóbico del material formador de micelas, se pueden controlar fácilmente propiedades de éstas, tales como el tamaño, la capacidad de carga, el tiempo de circulación, etc.

Como puede verse, son múltiples las estrategias que en la actualidad se están empleando para la formulación de fármacos. En la tabla 2 se destacan las principales ventajas y desventajas del uso de los sistemas de administración mencionados.

SISTEMAS DE ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS	VENTAJAS	DESVENTAJAS
LIPOSOMAS	<ul style="list-style-type: none"> - Biocompatibles - Biodegradables - Baja toxicidad - Carga de moléculas de distinta polaridad - Funcionalización de su superficie 	<ul style="list-style-type: none"> - Elaboración compleja - Baja estabilidad en solución y en circulación - Fusión inespecífica con membranas - Liofilización necesaria
MICRO-EMULSIONES	<ul style="list-style-type: none"> - Estabilidad termodinámica - Carga de moléculas de distinta polaridad - Formación espontánea - Isotrópicas - Claridad óptica - Esterilización por filtración 	<ul style="list-style-type: none"> - Muy dinámicas, coalición de nanogotas - Costosos por la gran cantidad de tensioactivo
CICLODEXTRINAS	<ul style="list-style-type: none"> - Estabilidad física y química - Protección del fármaco 	<ul style="list-style-type: none"> - Carga de moléculas sólo hidrofóbicas y de tamaño compatible con la cavidad
DENDRÍMEROS	<ul style="list-style-type: none"> - Alta estabilidad - Baja polidispersión - Capacidad de interactuar con múltiples receptores al mismo tiempo (multivalencia) - Funcionalización de su superficie 	<ul style="list-style-type: none"> - Tóxicos, lisis de membranas celulares por la carga (+) - Rápida liberación del fármaco
NANOPARTÍCULAS	<ul style="list-style-type: none"> - Biocompatibles - Protección del fármaco - Liberación controlada - Carga de moléculas de distinta polaridad - Funcionalización de su superficie 	<ul style="list-style-type: none"> - Posible crecimiento de partículas con el almacenamiento - Liofilización necesaria - Tendencia a gelificar - Relativamente baja capacidad de carga
MICELAS	<ul style="list-style-type: none"> - Biocompatibles - Biodegradables - Carga de moléculas de distinta polaridad - Isotrópicas - Transparentes - Formación espontánea - Protección del fármaco - Funcionalización de sus superficie - No adhesión o agregación por su cubierta hidrofílica 	<ul style="list-style-type: none"> - Baja estabilidad en solución por fenómenos de dilución

Tabla 2. Ventajas y desventajas de distintos sistemas de administración de fármacos

4.2 Antecedentes

En los últimos años, nuestro grupo de investigación ha participado en proyectos de investigación relacionados a la aplicación de biopolímeros y biomateriales en el campo de las nano y microtecnologías, relacionadas a la industria farmacéutica, fármaco-veterinaria, tecnología médica y alimenticia [63-66].

En el caso particular de desarrollos de sistemas para vehiculizar drogas de interés farmacéutico en liposomas, se demostró que el estado de fase de la membrana lipídica y el del fármaco son aspectos de fundamental importancia al momento de definir el procedimiento de elaboración de estos productos. En este campo se desarrolló un procedimiento para encapsular el antineoplásico doxorubicina en liposomas utilizando una estrategia de carga activa de la droga que implica un cambio de su estado de fase al ingresar al interior acuoso del liposoma, con un diámetro medio de 100 nm (Doxopeg®-Raffo). Por otra parte, se realizaron estudios por difracción de rayos X con el objeto de evaluar la estabilidad física de formulaciones de anfotericina B (fungicida de primera línea de naturaleza anfipática aunque altamente tóxico) en liposomas de tamaño controlado (Anfogen®).

En el campo de la liberación controlada y vehiculización de fármacos de naturaleza hidrofóbica, nuestro grupo de investigación se encuentra trabajando activamente en la caracterización de sistemas nano o microestructurados a base de proteínas, polímeros y complejos supramoleculares de moléculas anfipáticas hidrotópicas. En este sentido, el desafío consiste en lograr sistemas nanoestructurados auto-ensamblados de forma tal de evitar el uso de equipamiento sofisticado (homogeneización a alta presión, equipos de filtración, evaporador rotatorio, equipos de ultrasonido, etc) y además, lograr productos con mayor estabilidad.

De estos estudios cabe destacar el desarrollo de una nueva estrategia de preparación de nanovehículos para fármacos hidrofóbicos basados en el uso de proteínas [67]. En este trabajo se utilizó la molécula de albúmina, y sus propiedades físico-químicas, para solubilizar taxanos, fármacos hidrofóbicos muy utilizados en tratamientos oncológicos. La solubilización, se produjo espontáneamente cuando los taxanos fueron incubados con la albúmina en un estado parcialmente desnaturalizado, en donde la proteína expone sus residuos hidrofóbicos al ambiente acuoso.

De las numerosas estrategias que existen actualmente para la vehiculización y administración de fármacos, tanto de naturaleza hidrofóbica como hidrofílica, en este trabajo de investigación se plantea la utilización de moléculas hidrotrópicas como una estrategia para la vehiculización de fármacos en medios acuosos.

Las moléculas hidrotrópicas, se definen como compuestos de naturaleza anfifílica con un alto contenido hidrofílico, especialmente iónico, y un menor contenido hidrofóbico, que forman estructuras micelares en medio acuoso

A pesar de la gran cantidad de ventajas que tiene el uso de estructuras micelares para la vehiculización de fármacos, un gran inconveniente que presentan es su baja estabilidad por desplazamiento del equilibrio micela-monómero hacia el estado monomérico por dilución de las micelas, por ejemplo como ocurre en el torrente sanguíneo cuando éstas son administradas por vía endovenosa. Como en este trabajo de investigación se propone el uso de moléculas hidrotrópicas, que formen estructuras micelares, para la vehiculización de fármacos de distinta naturaleza polar, esta problemática nos llevó a elegir trabajar con micelas lipídicas en vez de las clásicas micelas poliméricas. Esta decisión se fundamenta en el hecho de que las micelas poliméricas tienen valores de CMC del orden de 10^{-5} M; mientras que las lipídicas, específicamente las formadas por Gangliósidos, tienen valores de CMC mucho más bajos, de alrededor de 10^{-8} M. Esta diferencia en los valores de CMC se traduce en una mayor estabilidad para las micelas lipídicas aún frente a diluciones importantes de la solución micelar, lo cual tiene una gran importancia para un sistema cuya vía de administración es la parenteral y en el que interesa que el fármaco no se libere prematuramente.

De este modo, nos propusimos evaluar la capacidad que tienen los gangliósidos, elegidos como modelo de moléculas hidrotrópicas, para interaccionar y vehiculizar fármacos oncológicos; tomando a los taxanos (Paclitaxel y Docetaxel) y a la Doxorubicina como representantes de fármacos de naturaleza hidrofóbica y anfipática, respectivamente. Además, se plantea determinar el tipo de interacción que se produce entre el fármaco y el vehículo, así como caracterizar las propiedades físico-químicas y la estabilidad de los complejos micela-fármaco formados.

4.3 Gangliósidos

Los glicosfingolípidos, y especialmente los gangliósidos que contienen ácido siálico, se encuentran en grandes cantidades en la capa externa de las células eucariotas concentrándose particularmente en los tejidos del sistema nervioso [68-70]. Debido a su orientación, los gangliósidos han sido implicados en una variedad de eventos de la superficie celular, tales como fenómenos de reconocimiento y biotransducción de información a través de membranas [71-73].

Los gangliósidos influyen en la dinámica funcional de las membranas celulares de varias maneras: contribuyen a la rigidez de las membranas, están implicados en la transferencia de información entre las células vecinas o entre las superficies de células y el medio extracelular (neurotransmisores, hormonas) y modulan el crecimiento celular mediante la regulación de procesos de proliferación y maduración controlados por factores de crecimiento polipeptídicos, como el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento epidérmico, o factor tipo 2 de crecimiento de nervios [74].

Por otro lado, estos glicosfingolípidos se unen específicamente a virus y diversas toxinas bacterianas, tales como la botulínica, tetánica y colérica, y median las interacciones entre los microbios y las células huésped durante las infecciones. El ejemplo mejor conocido es la toxina del cólera, una enterotoxina producida por el *Vibrio cholerae*, cuyo receptor de superficie celular específico es gangliósido GM1 [75].

Además de estas manifestaciones endógenas de origen natural, se ha observado que los gangliósidos administrados exógenamente afectan también muchas funciones celulares. Varios reportes han sugerido que los gangliósidos podrían exhibir una actividad antioxidante, en particular sobre la peroxidación lipídica [76,77] y la viabilidad de las neuronas del cerebro en ratas. Las evidencias de la actividad antioxidante de los gangliósidos se han obtenido, con gangliósidos individuales y con una mezcla de gangliósidos cerebrales y el modo de acción de los éstos incluye diferentes mecanismos, tales como cambios en la fluidez de la membrana y la estabilización de la misma.

Desde el punto de vista estructural, estos lípidos altamente anfipáticos están formados por una molécula de ceramida, doble cola hidrofóbica común a todos los esfingolípidos formada por una esfingosina y un ácido graso, y una cabeza polar compuesta por carbohidratos, que incluye al menos entre uno y cuatro monosacáridos, lo que explica que estas moléculas se encuentren en la capa externa de las membranas

celulares. Además contienen entre una y tres moléculas de ácido siálico, clasificándose según este criterio en mono-, di- y trisialogangliósidos (Tabla 3). Así estos glicolípidos complejos son reconocidos por ser ácidos, solubles en agua y pobremente dializables [78].

NOMBRE CODIFICADO	ESTRUCTURA QUÍMICA
GM3	$\begin{array}{c} 4\text{Gal}\beta 1 - 4\text{Glc}\beta 1 - 1'\text{Cer} \\ \\ \text{Neu5Ac}\alpha 2 - 3 \end{array}$
GM2	$\begin{array}{c} \text{GalNac}\beta 1 - 4\text{Gal}\beta 1 - 4\text{Glc}\beta 1 - 1'\text{Cer} \\ \\ \text{Neu5Ac}\alpha 2 - 3 \end{array}$
GM1	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1 - 3\text{GalNac}\beta 1 - 4\text{Gal}\beta 1 - 4\text{Glc}\beta 1 - 1'\text{Cer} \\ \\ \text{Neu5Ac}\alpha 2 - 3 \end{array}$
GD1a	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1 - 3\text{GalNac}\beta 1 - 4\text{Gal}\beta 1 - 4\text{Glc}\beta 1 - 1'\text{Cer} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{Neu5Ac}\alpha 2 - 3 \qquad \text{Neu5Ac}\alpha 2 - 3 \end{array}$
GD1b	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1 - 3\text{GalNac}\beta 1 - 4\text{Gal}\beta 1 - 4\text{Glc}\beta 1 - 1'\text{Cer} \\ \\ \text{Neu5Ac}\alpha 2 - 3 \\ \\ 8 \\ \\ \text{Neu5Ac}\alpha 2 \end{array}$
GT1a	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1 - 3\text{GalNac}\beta 1 - 4\text{Gal}\beta 1 - 4\text{Glc}\beta 1 - 1'\text{Cer} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{Neu5Ac}\alpha 2 - 3 \qquad \text{Neu5Ac}\alpha 2 - 3 \\ \\ 8 \\ \\ \text{Neu5Ac}\alpha 2 \end{array}$
GT1b	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1 - 3\text{GalNac}\beta 1 - 4\text{Gal}\beta 1 - 4\text{Glc}\beta 1 - 1'\text{Cer} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{Neu5Ac}\alpha 2 - 3 \qquad \text{Neu5Ac}\alpha 2 - 3 \\ \\ 8 \\ \\ \text{Neu5Ac}\alpha 2 \end{array}$

Tabla 3. Estructura química de los principales gangliósidos. Neu5A α 2: Ácido neuramínico o Ácido siálico; Gal: Galactosa; GalNac: N-acetilgalactosamina; Glc: Glucosa; Cer: Ceramida.

La cadena de oligosacáridos de los gangliósidos es variable debido a la estructura, contenido, secuencia, y conexiones de los azúcares. Esto hace que los gangliósidos formen una familia muy grande de compuestos. Como todos los gangliósidos tienen una porción

hidrofóbica muy similar, las propiedades de empaquetamiento pueden ser cualitativamente atribuidas a la porción hidrofílica. De hecho, diferentes gangliósidos dentro de un agregado requieren un área interfacial lo suficientemente grande para proporcionar, en la capa hidrofílica, un lugar lo suficientemente amplio como para albergar la cadena de oligosacáridos y su agua de hidratación. Como regla general, cuanto mayor sea el área interfacial, más pequeños son los agregados y menor es el número de agregación [79].

Los gangliósidos se auto-ensamblan espontáneamente en soluciones acuosas, aquellos con cabeza polar pequeña, tales como GM3 y GM4, forman vesículas; mientras que desde el GM2 hasta los gangliósidos más complejos, la cabeza polar compuesta por azúcares es tan grande que dejan de formar vesículas y pasan a formar micelas con un bajo valor de CMC, entre 10^{-10} - 10^{-8} M. Es claro que el aumento de las unidades de azúcar del gangliósido conduce a un incremento general en el área interfacial de la molécula, que hace que los agregados sean más curvos y de menor tamaño [80].

Estas propiedades estructurales de los gangliósidos, así como su comportamiento tipo detergente nos llevaron a considerarlos como candidatos prometedores para la vehiculización de fármacos de naturaleza hidrofóbica o anfipática.

4.4 Fármacos oncológicos de interés

El cáncer es causado por el crecimiento incontrolado y la propagación de las células anormales. Los tratamientos efectivos incluyen cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal e inmunoterapia. Cada una de estas modalidades tiene sus ventajas y desventajas y generalmente es necesaria una combinación de ellas para producir resultados más eficaces. Debido a que la mayoría de los tipos de cáncer en humanos (> 85%) están relacionados con los tumores sólidos, la terapia actual contra el cáncer con frecuencia incluye procesos invasivos como la quimioterapia y la cirugía para eliminar el tumor si es posible.

Los esfuerzos de investigación para mejorar la quimioterapia en los últimos 25 años han dado lugar a una mejora en la supervivencia del paciente. Sin embargo, la eficacia de la terapia y los efectos secundarios posibles varían entre los diferentes agentes. Algunos medicamentos pueden tener una eficacia excelente, pero también graves efectos secundarios que afectan la calidad de vida. Además, pueden ser dados en cantidades limitadas por su toxicidad frente a las células normales y porque tienen un muy alto costo.

Varios fármacos oncológicos más eficaces y menos costosos están actualmente en fase de desarrollo. Sin embargo, normalmente se tarda al menos 10 años y miles de millones de dólares para descubrir un nuevo medicamento. Por ello es que los investigadores han puesto énfasis en el desarrollo de nuevos sistemas para la administración de fármacos anticancerígenos existentes o de nuevos programas de administración, ofreciendo tratamientos menos costosos, más eficaces y con insignificantes efectos secundarios.

Debido a que la acción de los quimioterápicos no es específica sobre células tumorales, sino que también producen un efecto tóxico sobre células normales, idealmente se requiere una alta concentración local del fármaco en el sitio de la enfermedad, mientras que la concentración en otros órganos y tejidos debe estar por debajo de un cierto nivel mínimo para evitar efectos secundarios negativos. Es por ello que actualmente están en pleno desarrollo las modificaciones de los vehículos para realizar un transporte dirigido de fármacos.

Generalmente, dos enfoques han sido utilizados para la administración de fármacos oncológicos, el direccionamiento por afinidad y el transporte pasivo. El primero intenta tomar ventaja de los antígenos o receptores sobre-expresados en tumores para dirigir selectivamente a la droga y al transportador utilizando un péptido, un anticuerpo, o fragmentos de anticuerpos. En el transporte pasivo, los vehículos, explotan el efecto EPR para dirigir la droga al tumor. Éste es una consecuencia de la permeabilidad vascular incrementada por la discontinuidad del endotelio, que facilita la extravasación del transportador y posteriormente, la liberación del fármaco [81] y de la disminución de la función linfática de los tumores que permite la permanencia de la droga en el sitio de acción [82]. De esta manera, partículas pequeñas, tales como micelas y liposomas, que van desde 10 a 500 nm de tamaño, pueden extravasarse y acumularse en el espacio intersticial debido a la permeabilidad vascular aumentada en esta zona. Si estas partículas están cargadas con un determinado fármaco, pueden llevar la droga a esta zona y liberarla como resultado de la degradación normal del transportador.

De los fármacos oncológicos más utilizados en la actualidad, que poseen dificultades en cuanto a su vehiculización y posterior administración, se eligieron a los taxanos (Paclitaxel y Docetaxel) y a la Doxorubicina como representantes de fármacos hidrofóbicos y anfipáticos, respectivamente.

4.4.1 Taxanos

El Paclitaxel (Ptx) es un producto natural aislado del tejo del Pacífico *Taxus brevifolia*, y es uno de los agentes oncológicos más activo utilizado [83]. Éste y su análogo sintético, Docetaxel (Dtx), están aprobados para uso clínico por la FDA en el tratamiento del cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón no microcítico y cáncer de próstata.

El mecanismo de acción de los taxanos como potentes inhibidores de la replicación de las células cancerosas está relacionado con su capacidad de bloquear el ciclo celular de estas células en la fase tardía G2-mitótica mediante la polimerización de la tubulina, para formar microtúbulos muy estables, inhibiendo la dinámica normal de la reorganización de la red microtubular [84]. Esto es lo opuesto a lo que ocurre con otros agentes antimicrotubulares como, por ejemplo, la colchicina, la vincristina o la vinblastina, los cuales producen el desensamblamiento de los microtúbulos.

Los taxanos también son potentes inhibidores de la angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos) y otros procesos involucrados en el desarrollo de la inflamación crónica. Esta actividad es debida en parte a la habilidad que tiene el fármaco para inhibir la transcripción del factor AP-1. Éste es un regulador de genes involucrados en la producción de (1) metaloproteinasas de matriz, (2) citoquinas asociadas con la inflamación crónica y (3) proteínas necesarias para la proliferación celular. Así, los taxanos inhiben a un regulador que juega un papel importante en la inflamación crónica y en condiciones que dependen de la angiogénesis, incluyendo el crecimiento tumoral.

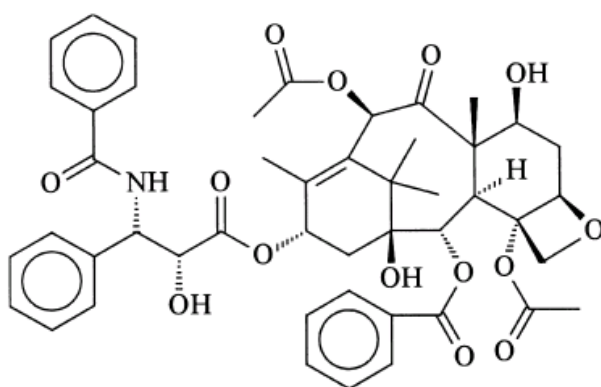


Figura 7. Estructura química del Ptx.

A pesar de ser potentes fármacos anticancerígenos, su estructura química (Figura 7) les confiere una pobre solubilidad acuosa (menos de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) que dificulta su formulación. Se han producido varios derivados del Ptx con la intención de mejorar la solubilidad del mismo, sin embargo la mayoría de estos derivados solubles reducen su

actividad antitumoral; probablemente, debido a que éstos poseen un mayor tamaño molecular que disminuye la habilidad del fármaco de difundir pasivamente a través de las membranas celular y nuclear de las células cancerígenas.

Luego de una extensa investigación de varios excipientes para permitir la administración parenteral, una opción viable se encontró en el **Taxol**® (Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ), una de las formulaciones actualmente comercializados de Ptx, en la que el fármaco se solubiliza en una mezcla de aceite de ricino polietoxilado (Cremophor®) al 50 % (v/v) y de etanol deshidratado al 50 % (v/v) con una concentración de Ptx de 6 mg.mL⁻¹. Sin embargo, esta formulación presenta varias desventajas toxicológicas, farmacológicas y farmacéuticas. El Cremophor puede provocar una serie de efectos no deseados tales como hipersensibilidad, neurotoxicidad y nefrotoxicidad [85]. Aunque la incidencia de hipersensibilidad grave se ha reducido mediante un régimen de premedicación con corticoesteroides y antihistamínicos, los efectos secundarios aún se producen en el 5-30 % de los pacientes tratados.

Por otra parte la alta toxicidad del Ptx en sí mismo constituye un problema adicional, y se ha informado que el mantenimiento de una concentración sistémica terapéuticamente significativa del fármaco es causante de reacciones graves. Además, se ha descrito que esta formulación precipita luego de la dilución con el líquido de infusión (solución de dextrosa o fisiológica), y que en algunas composiciones se forman precipitados fibrosos durante el almacenamiento por periodos prolongados de tiempo [86].

Se han propuesto otros disolventes orgánicos para la administración del Ptx, como el PEG, DMSO, polisorbato 80. Sin embargo, ninguno de ellos logró reducir la toxicidad asociada al Cremophor y algunos hasta disminuyeron la actividad antitumoral del fármaco en estudios de tumores murinos.

Con el fin de evitar las toxicidades asociadas con los co-solventes requeridos para la administración del Ptx, varias estrategias han sido evaluadas, tales como las nanopartículas, liposomas, emulsiones y varios sistemas micelares. Esta búsqueda de nuevas estrategias llevaron al desarrollo de diferentes formulaciones de Ptx asociadas con albúmina sérica humana (Alb) y otros polímeros. Una de ellas (**Abraxane**®; **ABI-007**; **nab paclitaxel**) ha sido aprobada en más de 40 países para el tratamiento del cáncer de mama metastásico y se encuentra bajo ensayos clínicos para varios tumores. La albúmina se une al paclitaxel de manera reversible (no covalente), lo que permite que el fármaco sea transportado en el cuerpo y liberado fácilmente en la superficie celular. Como se mencionó previamente, esta formulación explota la vía del receptor gp60 ubicado en las paredes de

las células endoteliales de los microvasos tumorales que permite el transporte de los complejos de albúmina a través de la pared del vaso sanguíneo hacia el tejido tumoral subyacente [41-43]. Además, a interacción con la proteína secretada SPARC permite mejorar las concentraciones intratumorales del fármaco [44].

Esta nueva formulación se prepara mediante la homogeneización a alta presión de paclitaxel en presencia de albúmina humana a una concentración de 3-4 %, similar a la concentración de albúmina en la sangre, lo que resulta en una suspensión coloidal de nanopartículas con un diámetro medio de 130-150 nm [42].

Además, nab-paclitaxel puede ser reconstituído en solución salina normal a concentraciones de 2-10 mg.mL⁻¹, comparado con 0.3-1.2 mg.mL⁻¹ para el Taxol [42]. Por lo tanto, la infusión de nab-paclitaxel requiere menos volumen y menor tiempo de administración en comparación con la formulación estándar de paclitaxel. Además, la ausencia del Cremophor elimina la necesidad de premedicación con esteroides y alivia el peligro de lixiviación de plastificantes de las bolsas o tubos de infusión. Sin embargo, esta formulación tiene una estabilidad muy limitada cuando se la reconstituye en solución salina (un máximo de 8 horas refrigerada de 2 a 8 °C) [42,43].

A pesar de que con esta formulación se ha mejorado el direccionamiento hacia los tumores, disminuyendo los efectos secundarios adversos sobre órganos y tejidos sanos, aún no se ha logrado eliminar completamente los efectos adversos asociados a los tratamientos quimioterapéuticos a base del Ptx. Es por ello que actualmente siguen siendo buscadas formulaciones alternativas para esta clase de fármacos.

Para el caso particular del Docetaxel, se han utilizado micelas de polisorbato 80 (Tween 80), un surfactante iónico, para mantener soluble al fármaco en medio acuoso, dando origen al **Taxotere®**, formulación actualmente comercializada de Dtx. Sin embargo, la gran cantidad de polisorbato 80 utilizada ha sido asociada con reacciones de hipersensibilidad severa como, retención de líquidos, neurotoxicidad, toxicidad musculoesquelética y neutropenia [87], por lo que recientemente existe un interés creciente en el desarrollo de formulaciones de Dtx libres de este surfactante [88].

Las micelas poliméricas también han sido estudiadas para formular taxanos. Por ejemplo, el **Genexol-PM** solubiliza al Ptx mediante el uso de un polímero biodegradable [89]. En estudios *in-vitro*, este complejo demostró tener una citotoxicidad comparable al Ptx disponible comercialmente contra varias líneas celulares de cáncer humanos, incluyendo ovario, mama, pulmón no microcítico y cáncer de colon. Además, la eficacia antitumoral *in-vivo* del Ptx en esta micela polimérica ha superado a la del Taxol en una

gran variedad de líneas celulares tumorales [90]. También se ha demostrado que esta formulación libre de Cremophor permite la administración de dosis más elevadas de droga que el paclitaxel convencional sin aumento asociado en toxicidades.

El **DHA-paclitaxel o Taxoprexin®** es un nuevo compuesto formado por unión covalente del ácido graso natural docosahexaenoico (DHA) y el paclitaxel. Este conjugado fue diseñado para funcionar como un profármaco y acumularse preferentemente en el tejido tumoral [91]. La preparación clínica de DHA-paclitaxel es formulado en un vehículo que contiene 80 % menos de Cremophor y etanol que la formulación estándar de Taxol. Este agente puede ser reconstituido en dextrosa al 5 % a una concentración máxima de 8 mg.mL⁻¹ y administrarse por vía intravenosa durante 2 horas cada 21 días. Sin embargo, debido a la presencia de Cremophor, esta formulación también requiere una premedicación con esteroides y antihistamínicos, así como tubos y sistemas de filtración libres de PVC para la administración del fármaco.

Polyglumex-paclitaxel (CT-2103; Xytotax™) es otro conjugado postulado para aumentar la solubilidad de los fármacos hidrofóbicos, aumentar la permeabilidad del tumor y la retención del paclitaxel, reducir al mínimo la exposición del tejido normal a la droga libre y evadir las bombas de eflujo de múltiples fármacos a través de la captación tumoral por pinocitocis [92]. Polyglumex-paclitaxel es una macromolécula que consiste en un polímero de ácido glutámico, un aminoácido de origen natural, biodegradable, soluble en agua unido al Ptx. A diferencia de la formulación estándar de paclitaxel, la preparación clínica de polyglumex-paclitaxel no contiene el vehículo tóxico Cremophor, debido a la capacidad del ácido poliglutámico para mantener en estado soluble a moléculas altamente hidrofóbicas como el Ptx. Esto se traduce en tiempos de infusión más cortos y la eliminación de la premedicación con esteroides y antihistamínicos. Este agente puede ser administrado de forma segura durante 10 min a través de una vena periférica, cada 21 días.

Otra de las estrategias que se ha usado activamente para solubilizar al Ptx son los **liposomas**. Estos, tienen muchas ventajas sobre otras formulaciones, tales como ser más biocompatibles y capaces de reducir la toxicidad del fármaco sin modificar la eficacia del mismo contra las células tumorales. Sin embargo, la limitada carga de fármaco y la insuficiente estabilidad en almacenamiento son dos obstáculos importantes para su aplicación [93,94].

4.4.2 Doxorrubicina (DOX)

Es un antibiótico antraciclina que actúa además como fármaco oncológico y que es considerado como la primera línea de elección en el tratamiento de cáncer de mama, tumores sólidos infantiles, sarcomas de tejidos blandos y linfomas agresivos (Figura 8) [95]. Ésta interactúa con el ADN por intercalación, produciendo la inhibición de la biosíntesis macromolecular. La intercalación de la DOX inhibe la progresión de la enzima topoisomerasa II, que desenrolla el ADN para la transcripción, deteniendo así el proceso de replicación.

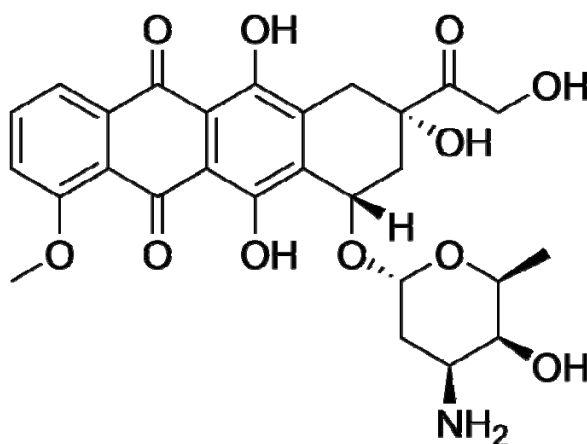


Figura 8. Estructura química de la DOX.

El uso de la DOX está limitado por producir una significativa cardiotoxicidad, nefrotoxicidad y hepatotoxicidad y también por su corto tiempo de circulación. Varios métodos se exploraron para mejorar el índice terapéutico de las antraciclina y para ampliar su utilidad mediante el uso de diversos sistemas de administración de fármacos, por ejemplo, los liposomas y los conjugados de polímeros basados en anticuerpos. En este contexto, se ha encontrado que la encapsulación de DOX dentro de los liposomas disminuye la cardiotoxicidad asociada con la forma libre del fármaco mientras se mantiene la potencia como agente anticancerígeno. Además, varios estudios han demostrado que las toxicidades agudas y crónicas asociadas con el uso del fármaco libre se reducen cuando el mismo está en la forma liposomal. Por otro lado, como la formulación liposomal es menos tóxica, se puede aumentar la dosis de administración del fármaco, dando como resultado una eficacia mejorada y un aumento en el índice terapéutico.

En este sentido, se han utilizado una gran variedad de formulaciones de DOX liposomal para evaluar el valor terapéutico de estos sistemas en modelos animales. Desafortunadamente, estas formulaciones son difíciles de comparar debido a la amplia variación en el grado de lamellaridad, tamaño, composición lipídica, relación molar droga-

lípidos y eficacia de atrapamiento del sistema. Estas variaciones están a menudo asociadas al procedimiento pasivo de atrapamiento o de carga. En esta técnica, el lípido y la droga están co-dispersos en un buffer acuoso, logrando así el atrapamiento mientras los liposomas se están formando. Cuando los liposomas de DOX se preparan de esta manera, se observa una pobre retención del fármaco, aunque cambios en la composición lipídica pueden mejorar tanto la captura como la retención del mismo. También se ha estudiado que la presencia de lípidos cargados negativamente en el liposoma, aumenta la asociación de DOX con las vesículas. Sin embargo, también está establecido que estos lípidos resultan en una rápida eliminación de los liposomas del torrente sanguíneo. Por lo tanto, los cambios resultantes en el comportamiento biológico no pueden ser correlacionados a una característica física específica del sistema liposomal.

La incapacidad para manipular por separado las propiedades de los preparados de DOX liposomal limita los intentos para seleccionar formulaciones optimizadas. La generación de un sistema optimizado requiere un proceso para generar formulaciones bien caracterizadas con propiedades físicas bien definidas, tales como el tamaño de vesícula, relación fármaco-lípido, composición lipídica y retención del fármaco; todas características que van a influir directamente en la vida media y eficacia del sistema liposomal.

Aprovechando que la molécula de DOX es una base anfipática débil (pK_a 8.3), ésta puede ser incorporada en el interior acuoso de vesículas preformadas mediante la aplicación de un gradiente iónico o de pH a través de la bicapa del liposoma o polimersoma. Así, la utilización de un gradiente de pH para la preparación de la DOX liposomal evita los problemas asociados al método del atrapamiento pasivo [96]. Este método ha sido extremadamente útil en la identificación de las variables que reducen la toxicidad y aumentan la eficacia de la DOX-liposomal. Por ejemplo, se ha incorporado la DOX en vesículas aplicando un gradiente de pH desde 7 por fuera de la vesícula hacia pH 4 adentro de la misma. La DOX permea a través de la membrana de la vesícula y co-precipita con los iones citratos previamente encapsulados usados para lograr un interior de condiciones ácidas. De esta manera los niveles de carga de DOX aumentan de 10 a 20 veces comparados con aquellos niveles obtenidos sin el uso del gradiente de pH [97]. Sin embargo, cabe mencionar que los gradientes son inestables y las moléculas de fármaco tienden a escaparse, con una vida media que ronda desde minutos a horas dependiendo de la composición de la bicapa.

En este aspecto, la estabilidad del fármaco encapsulado ha sido mejorada usando un gradiente de sulfato de amonio. La incorporación es entonces el resultado del intercambio

de DOX por los iones amonio ubicados en el interior de la vesícula [98], mientras que con el método de gradiente de pH se observan haces de fibras de iones citrato y DOX. Los iones manganeso también han sido usados para establecer un gradiente iónico para favorecer la entrada de DOX en el liposoma [99].

Existen varias formulaciones de DOX-liposomal actualmente en el mercado con el objetivo de reducir la cardiotoxicidad y mantener la eficacia antitumoral de la DOX.

Doxil®, también llamado **Caelyx**, es un sistema de encapsulación de DOX-HCl mediante el uso de un gradiente de sulfato de amonio en liposomas pegilados (con una cubierta de polietilenglicol) desarrollado para el tratamiento del sarcoma de Kaposi en pacientes con SIDA, que causa lesiones que crecen bajo la piel, en la comisura de la boca, nariz y garganta, en otros órganos. Además, Doxil ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de cáncer de ovario y mieloma múltiple [100, 101]. La cubierta con PEG resulta en una concentración de Doxil preferentemente en la piel; sin embargo esto produce un efecto secundario llamado eritrodisestesia palmar plantar (PPE), comúnmente conocido como síndrome mano-pie. Seguida a la administración de Doxil, pequeñas cantidades de la droga se escapan de los capilares en las palmas de las manos y en las plantas de los pies. El resultado consiste en enrojecimiento y descamación de la piel que se vuelve incómodo e incluso doloroso. En los ensayos clínicos usando una dosis de $50 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$ cada 4 semanas, el 50,6 % de los pacientes tratados con Doxil desarrollaron el síndrome mano-pie. La prevalencia de este efecto secundario limita la dosis de Doxil que se puede administrar comparado a la DOX libre en el mismo régimen de tratamiento, limitando la potencial substitución y reducción de la cardiotoxicidad producida por la DOX.

Myocet® es una formulación de DOX en liposomas no-pegilados, aprobada en Europa y Canadá para el tratamiento de cáncer metastático de mama usado en combinación con ciclofosfamida, sin embargo no ha sido todavía aprobado por la FDA para su uso en Estados Unidos. A diferencia del Doxil, el liposoma Myocet no posee la cubierta de polietilenglicol y por ello el síndrome mano-pie tiene una muy baja prevalencia. La minimización de este efecto secundario y de los efectos cardiotóxicos permite la substitución de la DOX libre por esta formulación en el mismo régimen de tratamiento sin pérdida de eficacia.

Sin embargo, la mayor desventaja de las formulaciones liposomales es que conllevan procedimientos de encapsulación largos y tediosos, aún cuando se los optimiza para ser usados en niveles industriales.

Por otro lado, también ha sido estudiada la encapsulación física de DOX, principalmente por efecto hidrofóbico, en sistemas autoensamblados basados en copolímeros de bloque [102,103] y la incorporación de la misma en el núcleo entrecruzado de micelas de poli (etilenoxido)-b-poli (ácido metacrílico) a través de interacciones electrostáticas [104].

En la actualidad, se siguen buscando activamente nuevas formulaciones, de preparación rápida y sencilla, que puedan vehicular este fármaco y reducir los efectos secundarios nocivos de su administración manteniendo su efecto biológico.

4.5 Bibliografía

- [1] Singla AK, Garg A, Aggarwal D (2002) Paclitaxel and its formulations. *Int J Pharm*, 235 (1-2) 179-92.
- [2] Benjamin RS (1974) Pharmacokinetics of adriamycin (NSC-123127) in patients with sarcomas. *Cancer Chemother Rep*, 58 (2) 271-273.
- [3] Gref R, Minamitake Y, Peracchia MT, et al. (1994) Biodegradable longcirculating polymeric nanospheres. *Science*, 263: 1600-1603.
- [4] Lasik DD, Martin FJ (1995) *Stealth Liposomes*, CRC Press, Boca Ratón, Florida, p320.
- [5] Torchilin VP, Trubetskoy VS (1995) Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating? *Adv Drug Deliv Rev*, 16: 141-155.
- [6] Palmer TN, Caride VJ, Caldecourt MA, Twickler J, Abdullah V (1984) The mechanism of liposome accumulation in infarction. *Biochim Biophys Acta* 797: 363-368.
- [7] Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K (2000) Tumor vascular permeability and the epr effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release*, 65: 271-284.
- [8] Torchilin VP (1998) Polymer-coated long-circulating microparticulate pharmaceuticals. *J Microencapsul*, 15: 1-19.
- [9] Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, 46: 3-26.

-
- [10] Fernandez AM, Van Derpoorten K, Dasnois L, et al. (2001) N-Succinyl-(beta-alanyl-L-leucyl-L-alanyl-L-leucyl)doxorubicin: an extracellularly tumor-activated prodrug devoid of intravenous acute toxicity. *J Med Chem*, 44: 3750-3753.
- [11] Yalkowsky SH, Roseman TJ (1981) Solubilization of drugs by cosolvents. In: Yalkowsky SH, editor. *Techniques of Solubilization of Drugs*. New York, NY: Marcel Dekker Inc: 91-134.
- [12] Shabner BA, Collings JM, eds. (1990) *Cancer Chemotherapy: Principles and Practice*. Philadelphia, PA: JB Lippincott.
- [13] Yokogawa K, Nakashima E, Ishizaki J, et al. (1990) Relationships in the structure-tissue distribution of basic drugs in the rabbit. *Pharm Res*, 7: 691-696.
- [14] Hagelucken A, Grunbaum L, Nurnberg B, et al. (1994) Lipophilic betaadrenoceptor antagonists and local anesthetics are effective direct activators of G-proteins. *Biochem Pharmacol*, 47: 1789-1795.
- [15] Lipinski CA (2000) Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 44: 235-249.
- [16] Ansel HC, Allen LV, Popovich NG, ed. (1999) *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Kluwer, Norwell, Massachusetts.
- [17] Rosen MJ (1989) *Surfactants and Interfacial Phenomena*, 2nd Ed. 240-255, Wiley, New York.
- [18] Crowe JH, Crowe LM (1998) Factors affecting the stability of dry liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 939: 327-334.
- [19] Payne NI, Timmins P, Ambrose CV, Ward MD, Ridgway F (1986) Proliposomes: a novel solution to an old problem. *J Pharm Sci*, 75: 325-333.
- [20] Kikuchi H, Yamauchi H, Hirota S (1991) A spray-dried method for mass production of liposomes. *Chem Pharm Bull*, 39: 1522-1527.
- [21] Moghini SM, Patel HM (1993) *Liposome Technology*. G. Gregoriadis, 2nd Ed. (3), CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- [22] Moreira JN, Almeida LM, Geraldés CF, Costa ML (1996) Evaluation of in vitro stability of large unilamellar liposomes coated with modified polysaccharide (O-palmitoylpullulan). *J Materials Sci Materials Medicine*, 7: 301-306.
- [23] Torchilin VP (1996) How do polymers prolong circulation time of liposomes? *J. Liposome Res*, 6: 99-110.
- [24] Blume G, Cevc G (1993) Molecular mechanism of the lipid vesicle longevity in vivo. *Biochim Biophys Acta*, 1146: 157-164.

-
- [25] Guo X, Szoka Jr FC (2001) Steric stabilization of fusogenic liposomes by a low-pH sensitive PEG-diortho ester-lipid conjugate. *Bioconj Chem*, 12 (2) 291-300.
- [26] Schulman JH, Stoeckenius W, Prince LM (1959) Mechanism of formation and structure of micro emulsions by electron microscopy. *J Phys Chem*, 63: 1677-1680.
- [27] Lawrence MJ, Rees GD (2000) Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*, 45: 89-121.
- [28] Kumar P, Mittal KL (1999) *Handbook of microemulsion Science and Technology*. Dekker, CRC Press, New York.
- [29] Eccleston J (1994) "Microemulsions" in *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Swarbrick J, Boylan J eds., Marcel Dekker, New York, (9) 375-421.
- [30] Trotta M, Gasco M, Pattarino F (1990) *Acta Pharm Technol*, 36: 226-331
- [31] Walter RH (2000) *Polysaccharide Association Structures and Methods in Supramolecular Chemistry*, John Wiley & Sons, New York.
- [32] Buschmann HJ, Schollmeyer EJ (2002) *Cosmet Sci*, 53: 185.
- [33] Frömring KH, Szejtli J (1993) *Cyclodextrins in Pharmacy*, Kluwer Acad Publ, Dordrecht.
- [34] Szejtli J (1988) *Cyclodextrin Technology*, Kluwer Acad Publ, Dordrecht.
- [35] Boas U, Heegaard P (2004) Dendrimers in drug research. *Chem Soc Rev*, 33: 43-63.
- [36] Bayele HK, et al. (2005) Versatile peptide dendrimers for nucleic acid delivery. *J Pharm Sci*, 94: 446-457.
- [37] Svenson S, Tomalia DA (2005) Dendrimers in biomedical applications - reflections on the field. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57: 2106-2129.
- [38] Malik N, Wiwattanapatapee R, Klopsch R, Lorenz K, Frey H, et al. (2000) Dendrimers: Relationship between structure and biocompatibility in vitro and preliminary studies on the distribution of I-125 labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *J Controlled Release*, 65: 133-148.
- [39] Jevprasesphant J, Penny J, Attwood D, McKeown NB, D'Emanuele NB (2003) The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers. *Int J Pharm*, 252: 263-266.
- [40] Desai N, Trieu V, Yao R et al. (2003) Evidence of greater antitumor activity of cremophor-free nanoparticle albumin-bound (nab) paclitaxel (abraxane) compared to taxol: role of a novel albumin transporter mechanism. *Breast Cancer Res Treat*, 92: 348-354.

-
- [41] Ibrahim NK, Desai N, Legha S et al. (2002) Phase I and pharmacokinetic study of ABI-007, a Cremophor-free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel. *Clin Cancer Res*, 8:1038-1044.
- [42] Gradishar WJ (2006) Albumin-bound paclitaxel: A next-generation taxane. *Expert Opin Pharmacother*, 7: 1041-1053.
- [43] Fukunaga-Kalabis M, Herlyn M (2007) Unraveling mysteries of the multifunctional protein SPARC. *J Invest Dermatol*, 127: 2497-2498.
- [44] Farokhzad OC, Langer R (2006) Nanomedicine: Developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Adv Drug Del Rev*, 58: 1456-1459.
- [45] Hawkins MJ, Soon-Shiong P, Desai N (2008) Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. *Adv Drug Del Rev*, 60: 876-885.
- [46] Israelachvili JN, Mitchell DJ, Ninham BW (1976) Theory of self-assembly of hydrocarbons amphiphiles into micelles and bilayers. *J Chem Soc Faraday Trans*, 72 (2) 1525-1568.
- [47] Berr SS (1987) Solvent Isotope Effects on Alkytrimethylammonium Bromide Micelles as a Function of Chain Length. *J Phys Chem*, 91: 4760.
- [48] Goyal PS, Dasannacharya BA, Kelkar VK, Manohar C, Rao KS, et al. (1991) Shapes and sizes of micelles in CTAB solutions. *Physica B*, 174: 196-199.
- [49] Jones M, Leroux J (1999) Polymeric micelles - a new generation of colloidal drug carriers. *Eur J Pharm Biopharm*, 48: 101-111.
- [50] Lasic DD (1992) Mixed micelles in drug delivery. *Nature*, 355: 279-280.
- [51] Kwon GS, Okano T (1996) Polymeric micelles as new drug carriers. *Adv Drug Delivery Rev*, 21: 107-116.
- [52] Gabizon AA (1995) Liposome circulation time and tumor targeting: implications for cancer chemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 16: 285-294.
- [53] Cammas S, Suzuki K, Sone C, et al. (1997) Thermo-responsive polymer nanoparticles with a core-shell micelle structure as site-specific drug carriers. *J Control Release*, 48: 157-164 .
- [54] Le Garrec D, Taillefer J, Van Lier JE, et al. (2002) Optimizing pHresponsive polymeric micelles for drug delivery in a cancer photodynamic therapy model. *J Drug Target*, 10: 429-437.
- [55] Trubetskoy VS, Torchilin VP (1995) Use of polyoxyethylene-lipid conjugates as long-circulating carriers for delivery of therapeutic and diagnostic agents. *Adv Drug Deliv Rev*, 16: 311-320.

- [56] Soga O, van Nostrum CF, Fens M, Rijcken CJ, Schiffelers RM, et al. (2005) Thermosensitive and biodegradable polymeric micelles for paclitaxel delivery. *J Control Release*, 103: 341-353.
- [57] Mathot F, van Beijsterveldt L, Preat V, Brewster M, Arien A (2006) Intestinal uptake and biodistribution of novel polymeric micelles after oral administration. *J Control Release*, 111: 47-55.
- [58] Pillion DJ, Amsden JA, Kensil CR, Recchia J (1996) Structure-function relationship among quillaja saponins serving as excipients for nasal and ocular delivery of insulin. *J Pharm Sci*, 85: 518-524.
- [59] Torchilin VP (2001) Structure and design of polymeric surfactant based drug delivery systems. *J Control Release*, 73:137-172.
- [60] Kwon GS, Kataoka K (1995) Block copolymer micelles as longcirculating drug vehicles. *Adv Drug Deliv Rev* 16: 295-309.
- [61] Kabanov AV, Batrakova EV, Alakhov VY (2002) Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J Control Release* 82: 189-212.
- [62] Xing L, Mattice WL (1998) Large internal structures of micelles of triblock copolymers with small insoluble molecules in their cores. *Langmuir*, 14: 4074-4080.
- [63] Heredia V, Bianco ID, Tríbulo H, Tríbulo R, Faudone S, et al. (2009) Polyisoprene matrix for progesterone release: in vitro and in vivo studies. *Int J Pharm*, 382: 98-103.
- [64] Paladini M, Pisano R, Scagliotti M, Sambuelli R, Lopez S, et al. (2008) Vantris® biocompatible, synthetic, non-biodegradable, easy to administer tissular bulking substance. Evaluation of local tissular reaction, localized migration and long-distance migration. *Archivos Españoles de Urología*, 61 (2) 263-268.
- [65] Heredia V, Bianco ID, Tríbulo H, Cuesta G, Chesta P, et al. (2008) Room temperature vulcanizing silicone sheets on a reusable support for progesterone delivery in estrous sunchronization treatments in cattle. *Animal Reproduction Science*, 108: 356-363.
- [66] Alasino RV, Bianco ID, Vitali MS, Zarzur JA, Beltramo DM (2007) Characterization of the inhibition of enveloped viruses infectivity by the cationic acrylate polymer Eudragit E100*. *Macromol Biosci*, 7:1132-1138. *Trabajo Seleccionado para la Tapa de la Revista.

- [67] Garro AG, Beltramo DM, Alasino RV, Leonhard V, Heredia V, et al. (2011) Reversible exposure of hydrophobic residues on albumin as a novel strategy for the formulation of nanodelivery vehicles of taxanes. *Int. J. Nanomedicine*, 6: 1193-1200.
- [68] Sonnino S, Mauri L, Chigorno V, Prinetti A (2006) Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology*, 17 (1) 1-13.
- [69] Fishman PH, Brady RO (1976) Biosynthesis and function of gangliosides. *Science*, 194: 906-915.
- [70] Wiegandt H (1982) The gangliosides. *Adv Neurochem*, 4: 149-223.
- [71] Spiegel S, Ravid A, Wilebek M (1979) Involvement of gangliosides in lymphocyte stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76: 5277-5281.
- [72] Markwell MAK, Svennerholm L, Paulson JC (1981) Specific gangliosides function as host cell receptors for Sendal virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78: 5406-5410.
- [73] Yamada KM, Critchley DR, Fishman PH, Moss J (1983) Exogenous gangliosides enhance the interaction of fibronectin with ganglioside-deficient cells. *Exp Cell Res*, 143: 295-302.
- [74] Hakomori S (1990) Bifunctional role of glycosphingolipids: modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions. *J Biol Chem*, 265: 18713-18716.
- [75] Fishman PH (1982) Role of membrane gangliosides in the binding and action of bacterial toxins. *J Membr Biol*, 69: 85-979.
- [76] Tyurin VA, Tyurina YY, Avrova N (1992) Ganglioside-dependent factor, inhibiting lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem Int*, 20: 401-407.
- [77] Avrova NF, Zakharov IO, Tyurin VA, Tyurina YY, Gamaley IA, et al. (2002) Different metabolic effects of ganglioside GM1 in brain synaptosomes and phagocytic cells. *Neurochem Res*, 27: 751-759.
- [78] Acquotti D, Sonnino S (2000) Use of nuclear magnetic resonance spectroscopy in evaluation of ganglioside structure, conformation and dynamics. *Methods Enzymol*, 312: 247-272.
- [79] Ulrich-Bott B, Wiegandt H (1984) Micellar properties of glycosphingolipids in aqueous media. *J Lipid Res*, 25: 1233-1245.
- [80] Formisano S, Johnson ML, Lee G, Aloj SM, Edelhofer H (1979) Critical Micelle Concentrations of Gangliosides. *Biochemistry*, 18 (6) 1119-1124.

-
- [81] Torchilin VP, Zhou F, Huang L (1993) pH-sensitive liposomes. *Liposome Res*, 3: 201-255.
- [82] Heuser LS, Miller FN (1986) Differential macromolecular leakage from the vasculature of tumors. *Cancer*, 57: 461-464.
- [83] Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT (1971) Plant antitumor agents VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc*, 93: 2325-2327.
- [84] Schiff PB, Fant J, Horwitz SB (1979) Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*, 277: 665-667.
- [85] Weiss RB, Donehower RC, Wiernik PH, Ohnuma T, Gralla RJ, et al. (1990) Hypersensitivity reactions from taxol. *J Clin Oncol*, 8: 1263-1268.
- [86] Greco FA, Hainsworth TM (1999) One-hour paclitaxel infusions: a review of safety and efficacy. *Cancer J Sci Am*, 5: 179-191.
- [87] Baker J, Ajani J, Scotte F, Winther D, Martin M, et al. (2009) Docetaxel-related side effects and their management. *Eur J Oncol Nurs*, 13: 49-59.
- [88] Engels FK, Mathot RA, Verweij J (2007) Alternative drug formulations of docetaxel: A review. *Anticancer Drugs*, 18: 95-103.
- [89] Kim SC, Kim DW, Shim YH, et al. (2001) In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy. *J Control Release*, 72: 191-202.
- [90] Zhang X, Burt HM, Von Hoff D, et al. (1997) An investigation of the antitumor activity and biodistribution of polymeric micellar paclitaxel. *Cancer Chemother Pharmacol*, 40: 81-86.
- [91] Wolff AC, Donehower RC, Carducci MK, et al. (2003) Phase I study of docosahexaenoic acid-paclitaxel: a taxane-fatty acid conjugate with a unique pharmacology and toxicity profile. *Clin Cancer*, 9: 3589-3597.
- [92] Terwogt JM, Nuijen B, Huinink WW, Beijnen JH (1997) Alternative formulations of paclitaxel. *Cancer Treatment Reviews*, 23 (2) 87-95.
- [93] Shieh MF, Chu IM, Lee CJ, Kan P, Hau DM, et al. (1997) Liposomal delivery system for taxol. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83 (1) 87-90.
- [94] Rivera E, Valero V, Arun B, Royce M, Adinin R, et al. (2003) Phase ii study of pegylated liposomal doxorubicin in combination with gemcitabine in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 21: 3249-3254.

- [95] Shah JJ, Orlowski RZ, Thomas SK (2009) Role of combination bortezomib and pegylated liposomal doxorubicin in the management of relapsed and/or refractory multiple myeloma. *Therapeut Clin Risk Manag*, 5: 151-159.
- [96] Harrigan PR, Wong KF, Redelmeier TE, Wheeler JJ, Cullis PR (1993) Accumulation of doxorubicin and other lipophilic amines into large unilamellar vesicles in response to transmembrane pH gradients. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1149 (2) 329-338.
- [97] Li X, Hirsh DJ, Cabral-Lilly D, Zirkel A, Gruner SM, et al. (1998) Doxorubicin physical state in solution and inside liposomes loaded via a pH gradient. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1415 (1) 23-40.
- [98] Haran G, Cohen R, Bar LK, Barenholz Y (1993) Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1151 (2) 201-215.
- [99] Cheung BCL, Sun THT, Leenhouts JM, Cullis PR (1998) Loading of doxorubicin into liposomes by forming Mn^{2+} -drug complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1414 (1-2) 205-216.
- [100] Pérez-López ME, Curiel T, Gómez JG, Jorge M (2007) Role of pegylated liposomal doxorubicin (Caelyx) in the treatment of relapsing ovarian cancer. *Anticancer Drugs*, 18 (5) 611-617.
- [101] Stebbing J, Gaya A (2002) Pegylated liposomal doxorubicin (Caelyx) in recurrent ovarian cancer. *Cancer Treat Rev*, 28(2) 121-125.
- [102] Chen W, Meng F, Cheng R, Zhong Z (2010) pH-sensitive degradable polymersomes for triggered release of anticancer drugs: a comparative study with micelles. *J of Control Release*, 142 (1) 40-46.
- [103] Upadhyay KK, Agrawal HG, Upadhyay C, Schatz C, Le Meins JF, et al. (2009) Role of block copolymer nanoconstructs in cancer therapy. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 26 (2) 157-205.
- [104] Kim JO, Kabanov AV, Bronich TK (2009) Polymer micelles with cross-linked polyanion core for delivery of a cationic drug doxorubicin. *J of Control Release* 138 (3) 197-204.

5. OBJETIVOS

La eficacia de muchos fármacos, especialmente aquellos de características hidrofóbicas, se encuentra limitada en gran medida por su incapacidad para alcanzar el sitio correcto de acción terapéutica. Por otra parte, aún para el caso de drogas solubles en agua, es conocido que sólo una pequeña fracción de la dosis administrada alcanza su sitio terapéutico, mientras que la mayor parte se distribuye a través de todo el cuerpo. Así, esta distribución en órganos y tejidos sanos conduce a resultados laterales no deseados y en algunos casos a una toxicidad severa que limita frecuentemente la dosis de administración del fármaco. Por lo tanto, una formulación farmacéutica ideal para principios activos, especialmente para los fuertemente hidrofóbicos, sería aquella que permita mantener la droga soluble y estable en medio acuoso y que al mismo tiempo sólo se concentre en el sitio de acción específico.

El desarrollo durante los últimos años de una gran cantidad de diseños tendientes a la administración de fármacos, hidrofílicos e hidrofóbicos, responde a la necesidad de mejoras en las propiedades terapéuticas, el incremento de la efectividad y la reducción de los efectos colaterales de los mismos. Algunas de las estrategias utilizadas incluyen el empleo de liposomas, nanopartículas, micropartículas, micelas poliméricas, entre otros [1-3].

En tal sentido, desde hace varios años, nuestro grupo de investigación ha estado trabajando en proyectos de investigación relacionados a la aplicación de biopolímeros y biomateriales en el área de la nano y microtecnología, vinculadas a la industria farmacéutica, fármaco-veterinaria, tecnología médica y alimenticia. Con respecto al campo de la vehiculización de fármacos, se ha trabajado activamente en la caracterización de sistemas nano y microestructurados a base de proteínas, polímeros y moléculas anfipáticas hidrotópicas.

En este trabajo se propone el uso de moléculas hidrotópicas como estrategia principal para la vehiculización de fármacos en medio acuoso.

Las moléculas hidrotópicas son definidas como compuestos de naturaleza anfipática, con un elevado contenido hidrofílico, especialmente iónico, y un menor contenido hidrofóbico. Debido a su composición química, presentan la particularidad de formar estructuras de tipo micelar, con una cubierta hidrofílica y un núcleo formado por dominios hidrofóbicos estabilizados, que se encuentra aislado del ambiente acuoso externo y que brinda un ambiente propicio para la captación y estabilización de fármacos con baja solubilidad en agua [4-8].

Como modelo de molécula hidrotópica, en el presente trabajo se utilizarán a los gangliósidos, glicosfingolípidos complejos que poseen entre una y tres moléculas de ácido siálico en su estructura que les confiere una carga superficial negativa a pH fisiológico.

Entre los principios activos oncológicos de interés, se utilizarán a los taxanos (Paclitaxel y Docetaxel) y a la Doxorubicina como representantes de fármacos de naturaleza hidrofóbica y anfipática, respectivamente.

5.1 Objetivo General

El objetivo principal del presente trabajo de investigación es el estudio y caracterización de la interacción de moléculas hidrotópicas con drogas oncológicas, como una estrategia de vehiculización de fármacos en medios acuosos.

5.2 Objetivos específicos

Como objetivos específicos del presente trabajo de investigación se plantean:

1. Evaluar la capacidad de los gangliósidos para vehiculizar fármacos oncológicos en medio acuoso y determinar el tipo de interacción existente entre las micelas formadas por éstos y el principio activo a vehiculizar.
2. Caracterizar las propiedades físico-químicas de los complejos micela-fármaco formados.
3. Caracterizar la estabilidad química y estructural en medio acuoso de los complejos transportador-fármaco formados.
4. Estudiar la potencial interacción de las formulaciones con componentes plasmáticos humanos:
 - a- actividad hemolítica
 - b- efecto sobre la agregación plaquetaria
 - c- viabilidad de linfocitos
 - d- interacción con proteínas plasmáticas
5. Evaluar el efecto citotóxico del fármaco puro y del encapsulado en las formulaciones micelares obtenidas, sobre líneas celulares en cultivo.
6. Caracterizar la eficacia *in vitro* de las formulaciones obtenidas.

5.3 Bibliografía

- [1] Moghimi MS, Hunter AC, Murray JC (2001) Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev*, 53: 283-318.
- [2] Adams ML, Lavasanifar A, Kwon GS (2003) Amphiphilic block copolymers for drug delivery. *J Pharm Sci*, 92: 1343-1355.
- [3] Mishra B, Patel BB, Tiwari S (2010) Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine*, 6: 9-24.
- [4] Torchilin VP (2007) Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. *Pharm Res*, 24: 1-16.
- [5] Ulrich-Bott B, Wiegandt H (1984) Micellar properties of glycosphingolipids in aqueous media. *J Lipid Res*, 25: 1233-1245.
- [6] Sonnino S, Cantú L, Corti M, Acquotti D, Venerando B (1994) Aggregative properties of gangliosides in solution. *Chem Phys Lipids*, 71: 21-45.
- [7] Sonnino S, Cantú L, Corti M, Acquotti D, Kirschner G, et al. (1990) Aggregation properties of semisynthetic GM1 ganglioside (II3Neu5AcGgOse4Cer) containing an acetyl group as acyl moiety. *Chemistry and Physics of Lipids*, 56 (1) 49-57.
- [8] Brocca P, Cantú L, Corti M, Del Favero E, Raudino A (2002) Collective phenomena in confined micellar systems of gangliosides. *Physica A*, 304: 117-190.

6. CAPÍTULO 1

Micelas auto-ensambladas de monosialogangliósidos como nanovehículos de taxanos

6.1 Resumen

En este capítulo se presentan resultados que demuestran que principios activos altamente hidrofóbicos, como los taxanos Paclitaxel (Ptx) y Docetaxel (Dtx), pueden ser incorporados espontáneamente en nanomicelas de gangliósidos dando lugar a la formación de estructuras estables en solución acuosa. La eficiencia con que los gangliósidos pueden solubilizar los taxanos depende en gran medida de la estructura auto-agregada que forman éstos en solución. De esta manera, GM3 que forma vesículas unilamelares resultó menos eficiente para solubilizar los taxanos que aquellos gangliósidos que forman estructuras micelares (como por ejemplo GM1 y GM2).

La solubilidad del Ptx en agua aumentó de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $6,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ luego de su asociación con las micelas de GM1. La incorporación del Ptx en las micelas de GM1 alcanza un óptimo en la relación molar GM1/Ptx 20/1 cuando la misma se realiza en frío ($4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$). Se observó un incremento en la capacidad de solubilización de las micelas de GM1 con la deshidratación del grupo polar de éstas por el pre-tratamiento de las micelas a $55 \text{ }^\circ\text{C}$. Sin embargo, las estructuras formadas fueron termodinámicamente más inestables ya que al cabo de 30 días de almacenamiento más de un 15 % del Ptx precipita; comparado con un 5 % de precipitación observado para las muestras preparadas en frío.

La ciclización del ácido siálico del GM1 por tratamiento en medio ácido, llevó a una reducción importante de su capacidad para solubilizar los taxanos; lo mismo ocurrió con el reemplazo del ácido graso de su grupo ceramida por un grupo dicloro acetilo. Estos resultados indican que el balance hidrofílico/hidrofóbico del GM1 es un aspecto crítico para determinar su capacidad de solubilización de taxanos.

La incorporación del Ptx en micelas de GM1 induce una reorganización estructural que se evidencia en una protección importante de la hidrólisis del grupo éster del Ptx a pH alcalino y en una reducción de la difusión de los monómeros de GM1 o del Ptx desde la micela hacia la solución, indicando que éstas son cinéticamente más estables que las micelas de gangliósido.

Los estudios de difracción de rayos X nos permitieron demostrar que la estructura cristalina presente en las micelas GM1 se pierde con la incorporación del Ptx.

Estudios en cultivos de células normales y tumorales permitieron demostrar que la incorporación del Ptx en micelas de GM1 no afecta el ingreso del taxano a las células ni su actividad antimitótica, la que fue cuantitativamente equivalente a la producida por la droga

en solución de Dimetilsulfóxido (DMSO). Asimismo la actividad biológica *in-vivo* del Ptx en las micelas de GM1 fue cualitativamente similar a la producida por el Ptx comercial (Taxol®).

6.2 Introducción

El Paclitaxel (Ptx) es uno de los agentes anticancerígenos más activo utilizado en la actualidad [1,2]. Como se mencionó previamente, debido a su baja solubilidad acuosa, se ha producido una extensa investigación acerca de los excipientes y vehículos que podrían permitir su administración parenteral.

Dos formulaciones comerciales han sido actualmente aprobadas por la FDA para la administración de Ptx: Taxol® y Abraxane®. En la primera se ha logrado solubilizar hasta 6 mg.mL⁻¹ de Ptx en medio acuoso, usando una mezcla de aceite de castor polietoxilado (Cremophor EL®) y etanol deshidratado (50 % v/v); sin embargo esta formulación presenta numerosas desventajas toxicológicas, farmacológicas y farmacéuticas [3-5]. En el Abraxane®, se solubilizan hasta 5 mg.mL⁻¹ de Ptx en medio acuoso, por medio de la asociación del fármaco con albúmina sérica humana o albúmina humana recombinante, sin la necesidad de utilizar co-solventes tóxicos como el Cremophor [6,7]. Sin embargo, esta formulación tiene una estabilidad muy limitada cuando se la reconstituye en solución salina (8 hs máximo cuando se la mantiene refrigerada entre 2 y 8 °C) y requiere del uso de un homogeneizador a alta presión para su preparación [6]. Por otra parte, aún cuando se ha mejorado el direccionamiento a los tejidos tumorales, ni siquiera con esta formulación se ha logrado eliminar completamente los efectos adversos asociados a los tratamientos quimioterapéuticos a base de Ptx.

Por otra parte, la formulación actualmente comercializada de Dtx (Taxotere®) también presenta ciertos inconvenientes. En ésta se utilizan micelas de polisorbato 80 para mantener soluble al fármaco en medio acuoso; sin embargo, la gran cantidad de surfactante utilizado ha sido asociada con reacciones de hipersensibilidad severa [8].

Como puede verse, la problemática respecto a la formulación de este tipo de principios activos requiere aún resolver problemas básicos de interacción de los taxanos con su o sus posibles vehículos hasta realizar estudios de nuevas estrategias de direccionamiento que permitan en conjunto mejorar la eficacia terapéutica. Por las razones expuestas es que elegimos a los taxanos como fármacos hidrofóbicos modelo para

caracterizar sus interacciones con moléculas hidrofóbicas con la idea de que los resultados pudieran aportar conocimiento que permita contribuir al desarrollo de nuevas estrategias para vehicular fármacos en medio acuoso (objetivo principal de este trabajo de tesis).

Existe una amplia variedad de estrategias disponibles para el transporte de fármacos anticancerígenos. Los nuevos tratamientos contra el cáncer no solo suplementan las quimio- y radio-terapias convencionales sino que también buscan prevenir el daño a los tejidos normales y superar la resistencia a las drogas.

Actualmente, no existe un método universal único que permita la encapsulación de la mayoría de los fármacos, principalmente debido a que cada droga requiere un enfoque diferente para manejar todas sus propiedades. Un enfoque muy prometedor para superar la toxicidad sistémica es el uso de transportadores nanométricos de fármacos, como liposomas, nanopartículas poliméricas, dendrímeros y micelas [9]. La incorporación de agentes quimioterapéuticos en transportadores nanométricos tiene múltiples ventajas comparado a la quimioterapia sistémica. Por ejemplo, los fármacos de bajo peso molecular son eliminados rápidamente por hígado y riñones disminuyendo sustancialmente su biodisponibilidad, este problema puede superarse por su incorporación en vehículos nanométricos [10]. Debido a su tamaño pequeño (≤ 100 nm), los transportadores nanométricos son dirigidos pasivamente a los tumores debido al efecto EPR, llevando a una mayor concentración del fármaco en el sitio del tumor y disminuyendo la toxicidad comparada a la administración sistémica [11].

Además, como se indicó anteriormente, la administración endovenosa de fármacos hidrofóbicos requiere el uso de solubilizantes como etanol o Cremophor, que a menudo se acompañan de efectos secundarios tóxicos que se suman a los que ya de por sí ocasiona el principio activo y que en algunos casos pueden ser hasta más severos. En este aspecto, el uso de liposomas “pegilados” ha sido útil para la liberación sostenida de Doxorubicina (DOX), otro quimioterápico muy utilizado en la actualidad [12]. Sin embargo, todavía no ha sido posible adaptar esta estrategia para la liberación de taxanos, principalmente debido a que bajo las condiciones en las que actualmente se preparan los liposomas, esta clase de fármacos son rápidamente expulsados de la bicapa lipídica originando formulaciones muy inestables [13,14].

En este contexto, una estrategia para superar la inestabilidad de los vehículos para transporte de taxanos en agua podría ser el uso de las micelas. Como se mencionó anteriormente, las principales ventajas de las micelas son: (1) son sistemas auto-ensamblados y (2) poseen tamaños más pequeños que los liposomas (usualmente entre un

rango de 5-100 nm). Por otro lado, la mayor desventaja observada hasta ahora para esta clase de sistemas surge principalmente debido al alto recambio de sus constituyentes, a causa del equilibrio dinámico micela-monómero, que las hace relativamente inestables frente a la dilución [15]. Como la dinámica de los sistemas micelares se haya relacionada a la concentración micelar crítica (CMC), con un alto recambio de los constituyentes frecuentemente asociado a altas CMC, la hipótesis de este trabajo fue que moléculas anfífilas que se auto-ensamblan de manera espontánea en micelas con bajos valores de CMC ($\leq 10^{-8}$ M), podrían ser usadas para solubilizar fármacos altamente hidrofóbicos como los taxanos en medios acuosos.

El objetivo principal de este estudio fue evaluar cuán efectivamente las moléculas hidrotrópicas de gangliósidos pueden solubilizar taxanos sin la ayuda de solventes orgánicos remanentes en la formulación.

Los resultados obtenidos muestran que los gangliósidos, con CMC en el orden de 10^{-10} - 10^{-8} M, interaccionan de manera espontánea con los taxanos formando estructuras solubles en agua que son relativamente insensibles a la dilución y permiten el transporte de estos fármacos en medio acuoso manteniendo su actividad antimitótica [16].

6.3 Materiales y métodos

6.3.1 Materiales

6.3.1.1 Reactivos

- El Paclitaxel (Ptx), taxano diterpenoide derivado de la corteza del árbol tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*), con un peso molecular de $853,9 \text{ g.mol}^{-1}$ y su análogo sintético, Docetaxel (Dtx) son de Yunnan Smandbet Co. Ltd. (Kumming, China). Las soluciones madres se prepararon disolviendo los taxanos en etanol y dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final de 20 mg.mL^{-1} y 50 mg.mL^{-1} respectivamente.
- El Taxol comercial usado fue DALYS 300, con una concentración de 6 mg.mL^{-1} de Ptx disuelto en una mezcla Cremophor/Etanol (50:50) de Laboratorio DOSA S.A.
- El Flutax-1 (7-O-[N-(4'-fluoresceincarbonyl)-l-alanyl]taxol), derivado fluorescente del paclitaxel con un peso molecular de $1283,3 \text{ g.mol}^{-1}$, fue provisto por Calbiochem (San Diego, CA). Las soluciones madres se prepararon en DMSO a una concentración final de $25 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$.

- Los gangliósidos totales (GT) y los monosialogangliósidos GM1, GM2 y GM3 purificados de cerebro bovino como sal de sodio, fueron un obsequio del Dr. P.E.A. Rodríguez. Las soluciones madres de los monosialogangliósidos se prepararon disolviendo los gangliósidos en agua bidestilada a una concentración final de 250 mg.mL⁻¹.
- El gangliósido LIGA-20 (LIGA), análogo sintético del gangliósido GM1 donde el ácido esteárico de la ceramida se reemplaza por un grupo dicloroacetilo, obtenido como sal de sodio fue un obsequio del Dr. P.E.A. Rodríguez. Las soluciones madres de LIGA se prepararon disolviendo los gangliósidos en agua bidestilada a una concentración final de 250 mg.mL⁻¹.
- El monosialogangliósido GM1 de origen porcino como sal de amonio fue obtenido de TRB pharma. Las soluciones madres se prepararon disolviendo los gangliósidos en agua bidestilada a una concentración final de 250 mg.mL⁻¹.
- El monosialogangliósido GM1 lactonizado fue un obsequio del Dr. P.E.A. Rodríguez. Las soluciones madres se prepararon disolviendo los gangliósidos en agua bidestilada a una concentración final de 250 mg.mL⁻¹.
- El diestearoil fosfatidil glicerol (dsPG) de Avanti Polar Lipids se utilizó sin purificación adicional.
- La fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC) de Avanti Polar Lipids se utilizó sin purificación adicional.
- El colesterol (Col) de Avanti Polar Lipids se utilizó sin purificación adicional.
- Todos los demás productos químicos utilizados fueron de grado analítico.

6.3.1.2 Líneas celulares

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron utilizando las siguientes líneas celulares continuas: células de mono verde africano (VERO), células epiteliales de riñón de mono (MA), células humanas de epiteloma laríngeo (Hep-2) y células humanas de epiteloma de cuello de útero (HeLa).

Para los cultivos celulares se utilizó medio de cultivo Dulbecco MEM (medio esencial mínimo) suplementado con suero fetal bovino irradiado (NATOCOR, Córdoba, Argentina) al 1 ó al 10 % (v/v) según condiciones de mantenimiento o de crecimiento respectivamente.

Los ensayos de captación celular se realizaron utilizando la siguiente línea celular continua: células fibroblásticas de embrión de ratón (NIH 3T3). Se utilizó medio de cultivo Dulbecco MEM suplementado con 2 mM de L-glutamina y suero fetal bovino irradiado (GIBCO) al 1 ó al 10 % (v/v) según condiciones de mantenimiento o de crecimiento respectivamente.

6.3.2 Métodos

6.3.2.1 Procedimiento estándar para la preparación de micelas mixtas de gangliósidos y taxanos

Las soluciones madres de gangliósidos totales (GT), y monosialogangliósidos GM1, GM2, GM3 y LIGA, con concentraciones de 250 mg.mL^{-1} , se prepararon en agua bidestilada 24 hs antes de su uso. Estas fueron mantenidas a $4 - 8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 hs. Luego se centrifugaron a $50.000 \times g$ por 15 minutos y el sobrenadante fue filtrado por $0,22 \text{ }\mu\text{m}$.

Las soluciones madres de Ptx y Dtx a una concentración final de 20 mg.mL^{-1} y 50 mg.mL^{-1} en etanol y DMSO, respectivamente, se agregaron lentamente y con agitación suave a las soluciones de micelas de gangliósidos previamente ajustadas a las diferentes condiciones a ser estudiadas.

Estas mezclas se incubaron a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 hs y luego se dializaron por 24 hs a la misma temperatura para eliminar el solvente en el que el fármaco estaba disuelto.

Para evaluar el efecto de la temperatura en la capacidad de las micelas de GM1 para cargar Ptx, la solución madre de GM1 fue incubada durante 30 minutos a $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Luego esta solución se mezcló con cantidades crecientes de Ptx en DMSO para alcanzar relaciones molares GM1/Ptx de 25/1 a 10/1. La incorporación de la droga fue realizada en dos condiciones de temperatura: $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min antes de incubar las muestras a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 hs. Luego del tiempo de incubación, las muestras se dializaron por 24 hs a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ para eliminar el DMSO.

Para evaluar el efecto del pH en la carga de Ptx en las micelas de GM1, la solución madre de GM1 fue llevada a pH 2, 5 y 7 usando buffers Glicina-HCl, Acetato de sodio y Fosfato de sodio respectivamente, a una concentración de 50 mM. Luego esta solución se mezcló con cantidades crecientes de Ptx en DMSO para alcanzar relaciones molares GM1/Ptx de 25/1 a 10/1. La incorporación del fármaco fue realizada en estas condiciones de pH por 24 hs a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Luego del tiempo de incubación, las muestras se dializaron por 24

hs a 4 °C frente a agua bidestilada para retirar el buffer usado y volver las muestras a pH ~ 6.

Para evaluar el efecto que producen los cambios en el contraión de la molécula de GM1, se utilizó GM1 como sal de sodio (GM1-Na⁺) y GM1 como sal de amonio (GM1-NH₄⁺). Las soluciones madres de cada tipo de GM1 se incubaron con cantidades crecientes de Ptx en DMSO para alcanzar relaciones molares GM1/Ptx de 25/1 a 10/1. La incorporación del fármaco fue realizada a 4 °C por 24 hs. Luego del tiempo de incubación, las muestras se dializaron por 24 hs a 4 °C frente a agua bidestilada para eliminar el DMSO.

6.3.2.2 Determinación de la concentración de Ptx o Dtx

La cuantificación de los taxanos se llevó a cabo por HPLC (High-performance liquid chromatography). Para ello, el Ptx o Dtx fueron extraídos de las micelas con 10 volúmenes de etil acetato. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 2.500 x g por 5 min, la fase orgánica se transfirió a un tubo limpio y se evaporó a sequedad a 40 °C. El residuo seco se disolvió en 1 volumen de etanol.

Las concentraciones de Ptx y de Dtx fueron medidas con una columna Curosil B C18 (250 x 3,20 mm I.D., con un tamaño de partícula de 5 µm) y una pre-columna Curosil B C18 (30 x 4,60 mm I.D., con un tamaño de partícula de 5 µm) adquiridas de Phenomenex. La fase móvil fue 60 % (v/v) acetonitrilo y 40 % (v/v) agua bidestilada. La velocidad de flujo fue de 0,7 mL.min⁻¹ y el eluyente fue monitoreado a 227 nm. La cromatografía fue realizada a temperatura ambiente (20 °C).

6.3.2.3 Determinación de la concentración de gangliósidos

La concentración de los gangliósidos fue medida por el método colorimétrico de resorcinol modificado donde se determina el contenido de ácido siálico [17]. Brevemente, a la muestra contenida en 1 mL se le añade 1 mL de reactivo de resorcinol y se calienta a 100 °C por 15 min. (Reactivo de resorcinol: 2 mg de resorcinol se disuelven en 0,1 ml de agua bidestilada + 0,8 mL de HCl 37,9% (w / v) + 2,5 µL de 0,1 M + cantidad de agua bidestilada suficiente para llegar a un volumen final de 1 mL). Luego, se deja que las muestras se enfríen y el cromóforo desarrollado se extrae con 2,5 mL de n-butyl acetato:n-butanol (85/15 vol/vol). Esta solución se centrifuga a 2500 x g por 5 min y los sobrenadantes se retiran y se miden por espectrofotometría a 580 nm.

6.3.2.4 Caracterización estructural de micelas GM1/Ptx

6.3.2.4.1 Difracción de rayos X

Micelas GM1/Ptx (20/1 mol/mol) se liofilizaron y analizaron en un difractor de rayos X Bruker D8-Advance con ánodo de Cobre. Se usaron GM1 y Ptx drogas sólidas como controles.

6.3.2.4.2 Análisis cromatográfico

Las muestras y los controles fueron corridas en un sistema Akta Explorer 100 (GE Healthcare) equipado con una columna Superdex 200, previamente equilibrada con buffer fosfato 50 mM (pH 7) con NaCl 150 mM, a un flujo de 0,4 mL.min⁻¹. El perfil de elución fue seguido con un detector de UV a 227 y 280 nm.

Los niveles de gangliósido fueron cuantificados como se mencionó previamente.

6.3.2.4.3 Microscopía electrónica

La morfología de las micelas fue detectada usando un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1200 EX II a 250.000 aumentos. Se cargaron 50 µL de cada muestra en una rejilla o grilla de carbono, se incubaron por 5 minutos y luego la rejilla se secó. El exceso de muestra se lavó con agua bidestilada. Luego las rejillas se incubaron con 50 µL de una solución de acetato de uranilo al 10 % por 1 minuto y posteriormente se secaron.

6.3.2.5 Estabilidad física de micelas GM1/Ptx

6.3.2.5.1 Ensayo de diálisis

Soluciones de micelas de GM1 y GM1/Ptx, con una concentración de GM1 de 250 mg.mL⁻¹, se dializaron por 72 horas usando membranas con un punto de corte de 14 kDa para asegurar la salida de los monómeros y la retención de las micelas durante el ensayo. Se tomaron alícuotas de ambos dializados a distintos tiempos: 0, 24, 48 y 72 hs en donde se determinó el contenido de GM1 y de Ptx como se mencionó previamente.

6.3.2.5.2 Ensayo de centrifugación

Micelas GM1/Ptx (20/1 mol/mol) fueron centrifugadas a 25.000, 50.000 y 100.000 x g por 1 hora a 20 °C en una ultracentrífuga XL-90 (Beckman Coulter Inc., USA).

Inmediatamente después de la centrifugación, se determinaron las concentraciones de GM1 y Ptx en los sobrenadantes como se describió previamente.

6.3.2.5.3 Efecto de la temperatura en la estabilidad de las micelas mixtas GM1/Ptx

Micelas GM1/Ptx (20/1 mol/mol) fueron guardadas por 4 meses en distintas condiciones de temperatura: 4, 25 y 37 °C. Se tomaron alícuotas de las muestras en distintos periodos de tiempo y se determinó la concentración de Ptx soluble por HPLC.

6.3.2.5.4 Efecto de ciclos de congelado-descongelado y de liofilización

Micelas GM1/Ptx (20/1 mol/mol) fueron congeladas a -80 °C por 24 hs. Posteriormente se permitió que las muestras alcancen temperatura ambiente y fueron centrifugadas a 15.000 x g por 10 min antes de medir las concentraciones de GM1 y Ptx que permanecieron solubles.

Por otro lado, micelas GM1/Ptx fueron liofilizadas y luego se disolvieron en su volumen inicial con agua bidestilada, se filtraron a través de un poro de 0,22 µm para luego medir la concentración de Ptx y GM1 solubles por los métodos descriptos.

6.3.2.6 Estabilidad química del Ptx en micelas de GM1

Para evaluar el efecto del pH alcalino en la estabilidad del Ptx incorporado en las micelas de GM1, se incubaron micelas GM1/Ptx (20/1 mol/mol) a pH 10 usando un buffer Carbonato de Sodio 0,2 M de pH 10. Se tomaron alícuotas de las muestras en distintos periodos de tiempo y se determinó la concentración de Ptx soluble por HPLC. Como control se utilizó una solución de Ptx en 50 % de etanol y 50 % agua bidestilada.

6.3.2.7 Capacidad de micelas de GM1 y de liposomas mixtos para la solubilización de Ptx

Se prepararon liposomas mixtos usando un procedimiento modificado de preparación de Anfotericina liposomada. Brevemente, se disolvieron 0,084 g de diestearoil fosfatidil glicerol (dsPG) en 3 mL de una mezcla de Cloroformo:Metanol (1:1). Se calentó a 65 °C hasta la disolución completa del lípido y se le agregaron 67,2 µL de HCl 2,5 N. Por otro lado se disolvieron 0,213 g de fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC) en 639 µL de una mezcla 1:1 Cloroformo:Metanol y cuando fue necesario se calentó a 65 °C para favorecer la disolución. Separadamente se disolvieron 0,052 g de Colesterol en 624 µL de

la mezcla Cloroformo:Metanol (1:1) y cuando resultó necesario se calentó a 65 °C para favorecer la disolución.

Una vez disueltos los lípidos, se procedió a mezclar estas soluciones para luego filtrar en caliente usando una membrana de policarbonato con poro de 0,45 µm resistente a cloroformo. Posteriormente, se secaron en evaporador rotatorio a 340 mBar a 40 ± 2 °C con agitación ≥ 150 rpm. Luego se secaron a 60 ± 2 °C durante aproximadamente 2 hs.

Una vez secos, los lípidos se resuspenden en 9 mL de una solución de Succinato de Sodio al 0,225 % suplementada con Sacarosa al 7,5 % y se redisuelven a 60 °C en evaporador rotatorio sin vacío. Ya disueltos, se preparan liposomas unilamelares por aplicación de ultrasonido usando un sonicador de punta GEX 600 Ultrasonic Processor a 40 % de potencia en cámara fría (5 ± 2 °C) en X ciclos de 10 minutos. Este procedimiento permitió obtener liposomas con una concentración de lípidos de 60,9 mg.mL⁻¹.

Por otro lado se prepara una solución de GM1 disuelto en una solución de Succinato de Sodio al 0,225 % suplementada con Sacarosa al 7,5 % con una concentración de 60,9 mg.mL⁻¹.

La solución madre de Ptx se agregó lentamente y con agitación suave a las soluciones de GM1 y liposomas previamente preparadas. Estas mezclas se incubaron a 4 °C por 24 hs y luego se dializaron por 24 hs a la misma temperatura para remover el DMSO en el que el fármaco estaba disuelto.

6.3.2.8 Caracterización de la captación celular de Ptx por microscopía de fluorescencia

Se cultivaron células NIH 3T3 a 37 °C y con un 5 % de CO₂ en medio MEM suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (GIBCO) y 2mM de L-glutamina.

Se diluyeron soluciones de Ptx y de micelas GM1/Ptx (20/1 mol/mol) con un 1 % de Flu-tax en MEM a una concentración final de Ptx de 10 µg.mL⁻¹.

Se incubaron monocapas de células NIH 3T3 crecidas hasta un 70 % de confluencia con cada muestra por 15, 30 y 60 minutos a 37 °C. Luego, las células se lavaron con buffer fosfato salino (PBS) y la droga incorporada en las células fue observada por microscopía de fluorescencia. Se utilizó el microscopio de fluorescencia confocal con sistema de detección por filtros invertidos, marca Olympus, del Departamento de Química Biológica de la Facultad de Cs. Químicas de la UNC.

6.3.2.9 Citotoxicidad in-vitro de micelas GM1/Ptx sobre líneas celulares tumorales y no-tumorales

Se cultivaron células HeLa, Hep-2, Vero y MA a 37 °C y con un 5 % de CO₂ hasta un 90 % de confluencia en medio MEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino (NATOCOR, Córdoba, Argentina). Estas monocapas celulares se incubaron por 24 horas con concentraciones crecientes de GM1, Ptx y micelas GM1/Ptx (20/1 mol/mol). Se evaluó la cantidad de células vivas luego de la incubación usando el ensayo de MTT (reducción del Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazoil)-2,5-difeniltetrazólico) [18].

Los valores de IC₅₀, concentración de las muestras en donde el crecimiento celular se inhibe en un 50 % comparado con las células control no tratadas, se estimaron gráficamente de las curvas de dosis-respuesta.

6.3.2.10 Efecto tóxico de micelas GM1/Ptx y de Taxol comercial “in-vivo”

Se utilizaron 4 ratones sanos provistos por el departamento de química biológica de la Facultad de Cs. Químicas de la UNC, de la misma edad y con pesos muy similares, a los que se les administraron 2 dosis distintas de Ptx (11 y 22 µg) por vía intraperitoneal cada 48 hs por 40 días. A dos de los ratones se les administró Ptx en forma de Taxol comercial y a los otros dos la formulación de micelas GM1/Ptx (20/1 mol/mol).

Luego de 40 días de tratamiento, los ratones fueron sacrificados y órganos como el riñón, hígado y cerebro fueron analizados por anatomía patológica.

6.3.2.11 Actividad biológica de micelas GM1/Ptx y de Taxol comercial “in-vivo”

Se utilizaron 4 ratones provistos por el departamento de química biológica de la Facultad de Cs. Químicas de la UNC, de la misma edad y con pesos muy similares que generan neuroblastomas periféricos espontáneos entre el 3° y 7° mes de vida. Antes de iniciar el tratamiento se mide el tamaño (ancho y largo) de los tumores desarrollados por cada ratón.

Se administraron dosis de Ptx de 11 µg por vía endovenosa cada 4 días y por 16 días que duró el tratamiento. A dos de los ratones se les administró Ptx en forma de Taxol comercial y a los otros dos la formulación de micelas GM1/Ptx (20/1 mol/mol).

Todos los días durante el tratamiento se midieron los parámetros del tumor desarrollado por cada ratón, así como también su peso y características generales como estado de ánimo, caída de pelo, etc.

6.3.2.12 Actividad biológica de micelas GM1/Ptx y de Taxol comercial “in-vivo” usando el modelo de angiogénesis en membrana corioalantoidea de embriones de pollo

El procedimiento realizado sobre los huevos de gallina consistió en:

1. Lavar la cáscara con EtOH al 70 %
2. Incubar por 72 hs el huevo a 37 °C y con 60-70 % de humedad. Rotar el huevo 3 veces al día
3. Post 72 hs de incubación, se realiza un corte en la parte superior de la cáscara y se retiran 3 mL de albúmen (clara). Se tapa y se sella con parafina. Se vuelve a incubar el huevo en las mismas condiciones de temperatura y humedad.
4. El día 8, se saca la tapa y se realiza la aplicación tópica de las muestras sobre una zona de la membrana con vasos sanguíneos desarrollados (dosis de 10 µL conteniendo 3 µg de Ptx y/o 135 µg de GM1 cuando corresponda).
5. En los días posteriores se evalúa el efecto que tiene el Ptx disuelto en las distintas formulaciones sobre la angiogénesis por microscopía óptica usando un aumento de 40 x.

6.4 Resultados

6.4.1 Solubilización de taxanos en micelas de gangliósidos

Los gangliósidos son glicoesfingolípidos aniónicos con una doble cola hidrocarbonada y una compleja cabeza o porción polar formada por varias unidades de azúcares. Cuando se disuelven en agua, la mayoría de ellos forman micelas con valores muy bajos de CMC (10^{-10} - 10^{-8} M) [19,20]. Debido a ello, en este trabajo se plantea la hipótesis de que esta clase de micelas podrían tener un comportamiento de tipo detergente y por ende solubilizar drogas de naturaleza hidrofóbica permaneciendo estables en soluciones acuosas, aún luego de ser diluídas.

Todos los gangliósidos comparten la misma porción hidrofóbica en su molécula mientras que se diferencian en el grupo polar, por ello las diferencias que se observan en sus propiedades de empaquetamiento se pueden atribuir cualitativamente a la composición de la porción hidrofílica de la molécula. De hecho, los requerimientos estéricos debidos a la hidratación de las cabezas polares determinan que los diferentes gangliósidos en un agregado requieran un área interfacial lo suficientemente grande para darle lugar a la

cadena oligosacárida y a su agua de hidratación en la capa hidrofílica. Como una regla general, mientras más grande es la cabeza polar, menor es número de agregación y el agregado autoensamblado es más pequeño.

Inicialmente se evaluó la capacidad de micelas formadas por una mezcla de gangliósidos totales (GT) para solubilizar Ptx. Para ello se agregaron, lentamente y con agitación, cantidades crecientes de Ptx disuelto en DMSO a una solución acuosa de micelas de GT. Luego de la incubación a 4 °C por 24 horas, estas soluciones se dializaron frente a agua bidestilada por 24 hs para eliminar el solvente en el que el fármaco estaba disuelto. Posteriormente, se llevó a cabo la extracción del Ptx incorporado en las micelas, para realizar su cuantificación por HPLC. En la figura 1 se observa que el porcentaje de Ptx incorporado en las micelas de GT (250 mg.mL⁻¹) es superior al 85 % hasta la relación molar GT/Ptx 20/1; mientras que a partir de allí, el porcentaje de fármaco incorporado disminuye notablemente. Estos resultados sugieren que la estructura micelar formada por gangliósidos totales es capaz de solubilizar grandes cantidades de Ptx, pero tiene un límite de saturación que se alcanza alrededor de la relación molar GT/Ptx 25/1, ya que el agregado de cantidades superiores de Ptx inestabilizan las micelas y el fármaco precipita.

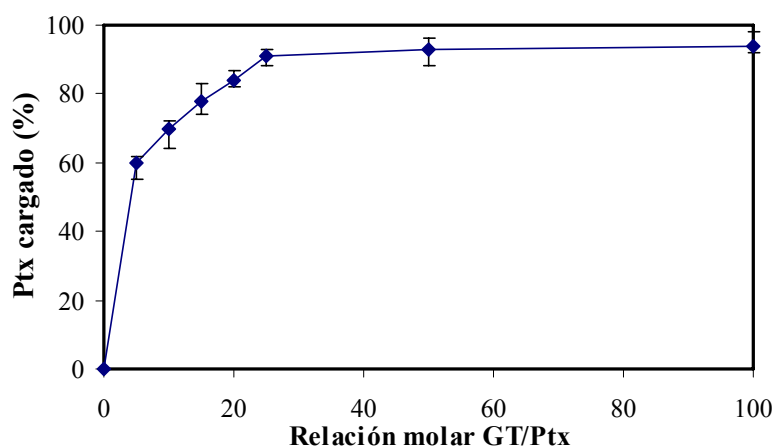


Figura 1. Incorporación del Ptx en micelas de GT a distintas relaciones molares GT/Ptx: 5/1, 10/1; 15/1; 20/1; 25/1; 50/1; 100/1. Las barras de error indican la desviación estándar (DS) de la media ($n=3$).

Los GT purificados de cerebro bovino se componen por una mezcla de mono-, di- y tri-sialogangliósidos (GD1a 40 %, GM1 20 %, GT1b 19 %, GD1b 16 % y otros como GM3 y GD3 que completan el 4 % restante). Estos tipos particulares de glicolípidos naturales son muy interesantes para estudiar la influencia de distintos factores fisico-químicos en la capacidad de incorporación y solubilización de fármacos ya que se pueden purificar con relativa facilidad por procedimientos estandarizados. Además, al obtenerlos de manera individual es posible contar con lípidos con un fragmento hidrofóbico común

(constituído por la ceramida) y un grupo polar que puede tener entre 2 y 4 unidades oligosacáridas sin carga y entre 1 y 3 moléculas de ácido siálico con carga negativa. Esto hace que sus propiedades de auto-agregación nos permitan obtener desde micelas esféricas hasta bicapas [20].

Por ello, en primer lugar se evaluó si la capacidad para solubilizar taxanos depende de la estructura auto-ensamblada del gangliósido, estudiando la capacidad de los distintos monosialogangliósidos (GM1, GM2 y GM3 ilustrados en la figura 2) para solubilizar el Ptx. Estos monosialogangliósidos poseen una sola molécula de ácido siálico formando parte de su porción polar, además de 4, 3 y 2 unidades oligosacáridas, respectivamente.

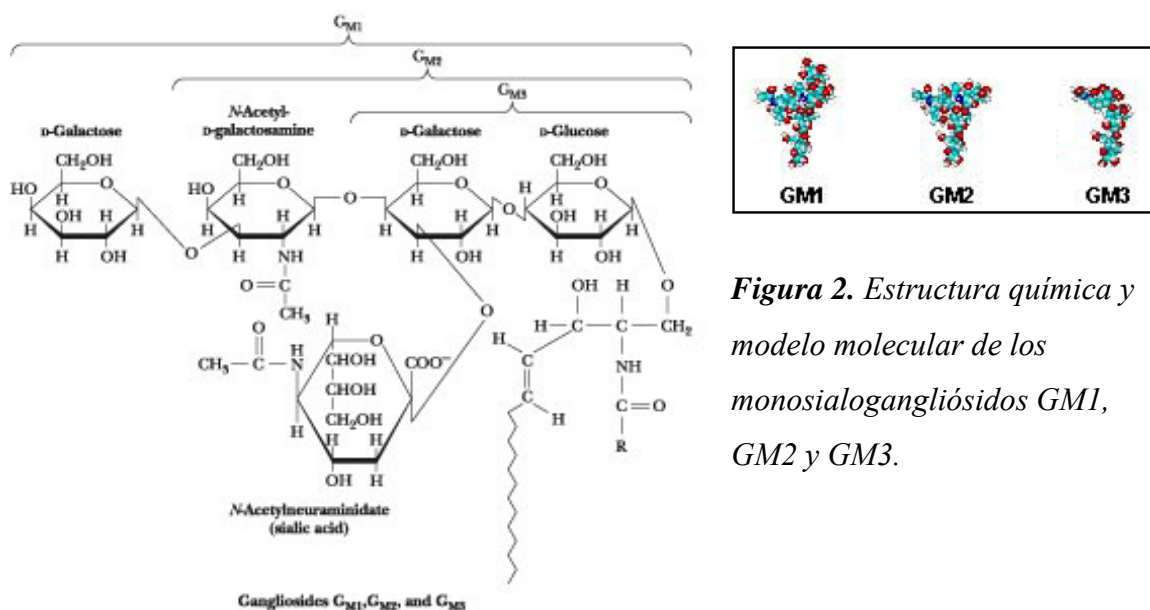


Figura 2. Estructura química y modelo molecular de los monosialogangliósidos GM1, GM2 y GM3.

La figura 3A muestra que la solubilidad del Ptx es máxima cuando se lo disuelve en gangliósidos formadores de micelas (GM1 y GM2) mientras que ésta es significativamente menor cuando el Ptx se mezcla con el gangliósido GM3 que forma espontáneamente vesículas unilamelares en medios acuosos.

Como se muestra en la figura 3B, las micelas de GM1 (250 mg.mL^{-1}) disuelven hasta $6,0$ y $6,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ de Dtx y Ptx respectivamente, lo que representa un incremento de 6.000 veces en la solubilidad de estos taxanos en agua. Bajo estas condiciones, la adición de taxanos a las micelas de GM1 lleva a la formación de soluciones ópticamente transparentes. Con el incremento en la concentración de taxanos, la cantidad de droga que permanece en solución disminuye progresivamente, sugiriendo que una vez que las micelas de GM1 están saturadas, el exceso de taxanos las desestabiliza. De acuerdo con este hallazgo, se observó que la máxima capacidad de incorporación de las micelas de GM1 se

alcanza en la relación molar GM1/Ptx 20/1 (Figura 3A), resultado similar al obtenido para las micelas formadas por una mezcla de GT.

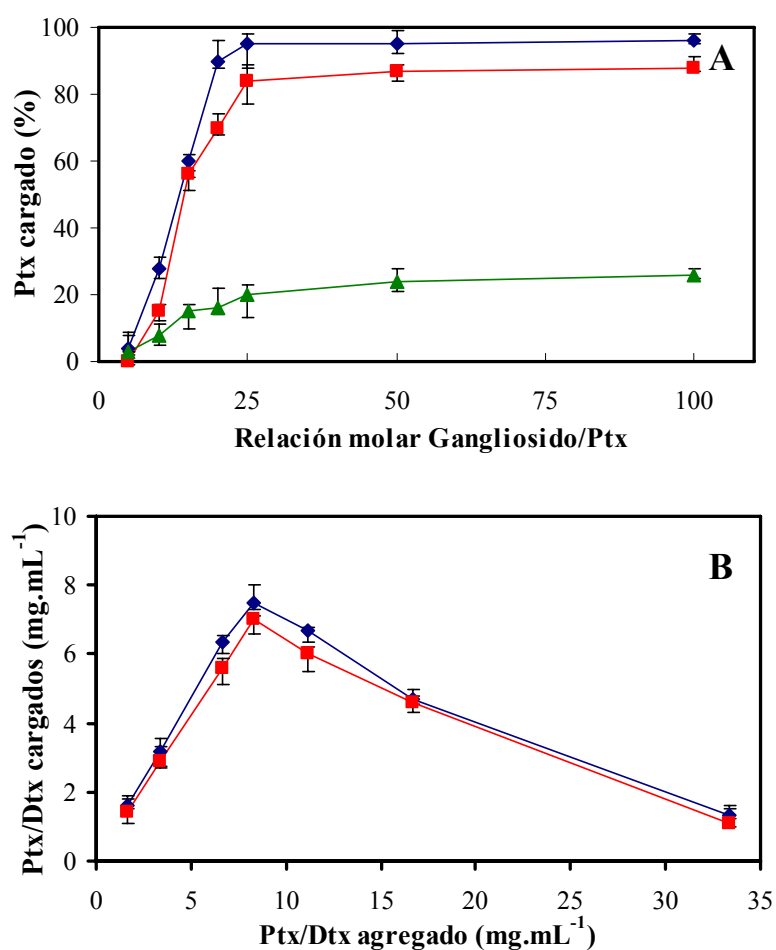


Figura 3. (A) Incorporación de Ptx en micelas de gangliósido a diferentes relaciones molares Gangliósido/Ptx: 5/1, 10/1; 15/1; 20/1; 25/1; 50/1; 100/1. GM1 (—◆—), GM2 (—■—) y GM3 (—▲—). **(B)** Capacidad de micelas de GM1 (250 mg.mL⁻¹) para solubilizar taxanos. La carga de Ptx (—◆—) y Dtx (—■—) se realizó a 4 °C durante 24 hs. Las barras de error indican la desviación estándar (DS) de la media (n = 3).

Estos resultados demostraron que de los monosialogangliósidos estudiados, el GM1 forma las estructuras micelares óptimas para la solubilización de taxanos, y es por ello que a continuación los estudios se centran en el uso de esta clase de micelas de gangliósido.

En el mismo contexto, evaluando cómo los cambios en el grupo polar del gangliósido alteran la capacidad para solubilizar taxanos, se observó que la modificación en la estructura de la cadena oligosacárida del GM1 por lactonización de su ácido siálico produjo ciertos cambios en su capacidad para interactuar y solubilizar Ptx (Figura 4AyB). En la relación molar GM1/Ptx 25/1, la proporción de Ptx incorporado no se modifica significativamente con la lactonización del GM1; sin embargo en las relaciones 20/1 y 15/1 ésta se redujo considerablemente (~ 40 %). A partir de la relación molar 10/1, la capacidad de ambas estructuras para solubilizar el Ptx es muy limitada.

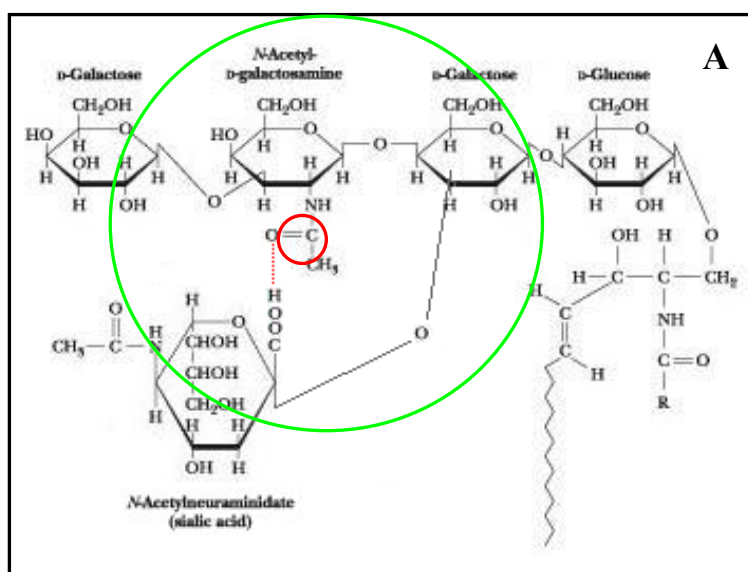
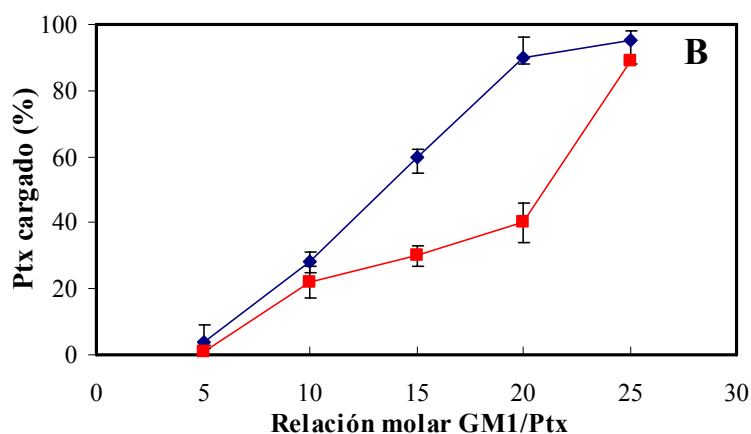


Figura 4.

(A) Estructura química del gangliósido GM1 y representación del proceso de lactonización.



(B) Incorporación de Ptx en micelas de GM1 a distintas relaciones molares GM1/Ptx. GM1 (◆) y GM1 lactona (■). Las barras de error indican la DS de la media ($n = 3$).

A continuación se llevaron a cabo estudios para evaluar la influencia, ahora, del dominio hidrofóbico de las micelas sobre la capacidad para solubilizar Ptx. Para esto, se redujo el largo de una de las cadenas hidrocarbonadas (ácido esteárico) unidas a la ceramida del GM1 reemplazándola por un grupo di-cloroacetilo (obteniendo lo que se conoce como LIGA, Figura 5A). Estas moléculas forman micelas esféricas con un peso molecular promedio de 102 kDa, que es aproximadamente la quinta parte del peso de las micelas de GM1 [21].

El perfil de solubilización del Ptx en función de la concentración de gangliósido muestra que la incorporación del Ptx en las micelas de LIGA resulta aproximadamente un 50 % menor que en las micelas de GM1 (Figura 5B).

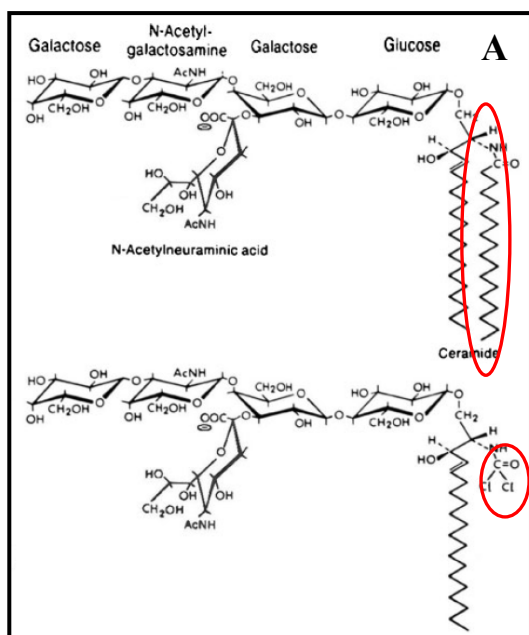
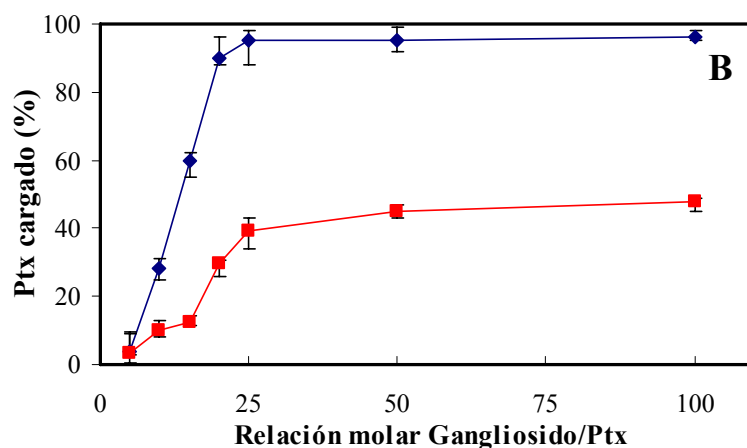


Figura 5.

(A) Estructura química de los gangliósidos GM1 y LIGA.



(B) Incorporación del Ptx en micelas de gangliósidos a distintas relaciones molares Gangliósido/Ptx: 5/1, 10/1; 15/1; 20/1; 25/1; 50/1; 100/1. GM1 (◆) y LIGA (■). Las barras de error indican la DS de la media (n = 3).

Por otro lado, se observó que la capacidad para solubilizar taxanos no es dependiente de la presencia de una carga neta en el ácido siálico ($pK_a = 2,6$) de la micela de GM1 ya que una reducción de pH de 7 a 2 ni cambios en los contra iones afectan su habilidad para incorporar taxanos (Figuras 6 y 7 respectivamente).

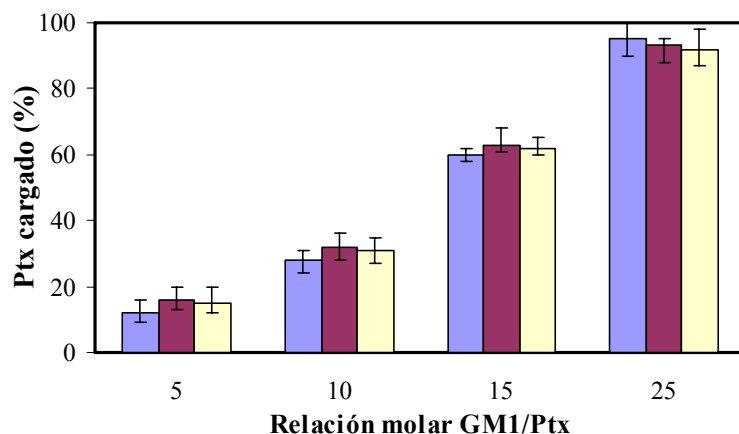


Figura 6. Efecto del pH en la incorporación de Ptx en micelas de GM1 a distintas relaciones molares GM1/Ptx. pH 2 (■), pH 5 (■) y pH 7 (□). Las barras de error indican la DS de la media (n = 3).

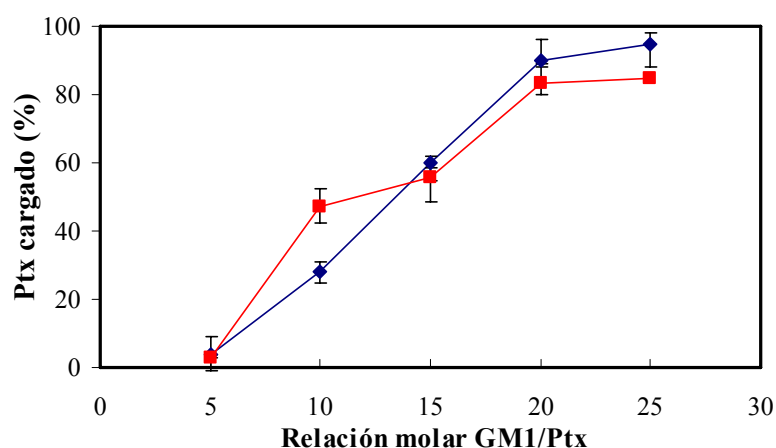


Figura 7. Efecto de cambios en el contraión de GM1 en la incorporación de Ptx en micelas de GM1 a distintas relaciones molares GM1/Ptx. Na⁺ (—◆—) y NH₄⁺ (—■—). Las barras de error indican la DS de la media ($n = 3$).

6.4.2 Efecto de la temperatura de incubación en la solubilización del Ptx por GM1

Es conocido que las micelas de gangliósidos tienen un comportamiento bi-estable que se debe a cambios conformacionales que involucran a las cadenas de oligosacáridos y que pueden ser producidos por algunos agentes externos como la temperatura [22]. Estos dos estados se caracterizan por tener diferentes propiedades de agregación y grados de hidratación [23,24]. Por ello, para profundizar en la caracterización acerca de la dependencia de la solubilización del Ptx con las propiedades estructurales de las micelas de gangliósido, se procedió a estudiar el efecto de la temperatura en la interacción entre Ptx y GM1.

Estudios previos demostraron que la incubación de micelas de GM1 a 55 °C induce una deshidratación de la cadena oligosacárida produciendo un encogimiento significativo de la región hidrofílica de la micela de que es acompañado por una ligera expansión de la región hidrofóbica. Como se muestra en la figura 8, la pre-incubación de las micelas de GM1 a 55 °C lleva a un importante aumento en su capacidad para solubilizar taxanos. Este fenómeno es de tipo reversible [25,26], por ello cuando las muestras pre-incubadas a 55 °C de GM1 se enfrían en baño de hielo antes de la adición del Ptx, la capacidad para solubilizar la droga vuelve a valores similares a aquellos obtenidos cuando la incorporación se realiza a 4 °C (figura 8).

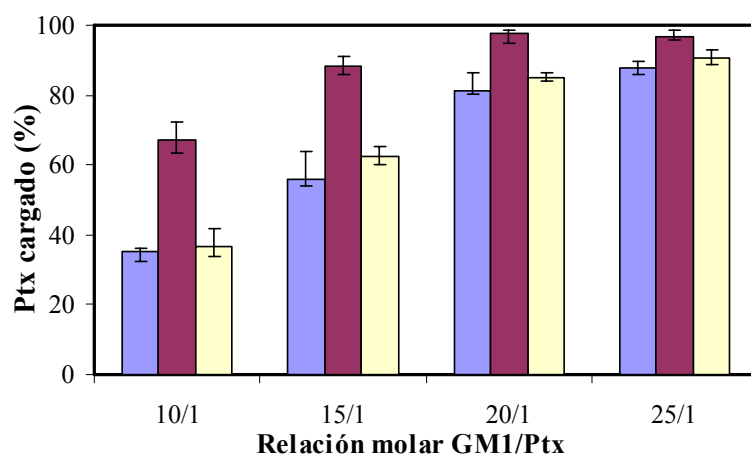


Figura 8. Efecto de la temperatura en la incorporación de Ptx en micelas GM1 a distintas relaciones molares GM1/Ptx. 4 °C (■), 55 °C (■) y 4 °C post incubación a 55 °C (■). Las barras de error indican la DS de la media ($n = 3$).

6.4.3 Caracterización estructural de micelas GM1/Ptx

Se sabe que el GM1 puede formar dos tipos de micelas de distinto tamaño, ambos estables, lo que indica que las moléculas de GM1 pueden auto-agregarse con diferentes geometrías de empaquetamiento [22]. Por consiguiente, fue de interés explorar si la incorporación de Ptx en las micelas de GM1 produce un cambio estructural de los agregados.

La difracción de rayos X de las micelas de GM1 liofilizadas mostró la existencia de dos picos mayoritarios que indican la presencia de dominios cristalinos ordenados (Figura 9A); mientras que la incorporación de Ptx anuló la estructura cristalina presente en las micelas (Figura 9D). Se utilizó una mezcla de GM1 y Ptx sólidos como control, con el fin de mostrar que el efecto observado no se debe a una dilución del gangliósido presente en la muestra (Figura 9C).

Como el componente principal del patrón de difracción del GM1 se debe a la estructura de la cola del ácido graso este resultado sugiere que, como se esperaba, tras su asociación con el GM1, el Ptx se localiza en el dominio o núcleo hidrofóbico de la micela alterando su estructura cristalina interna.

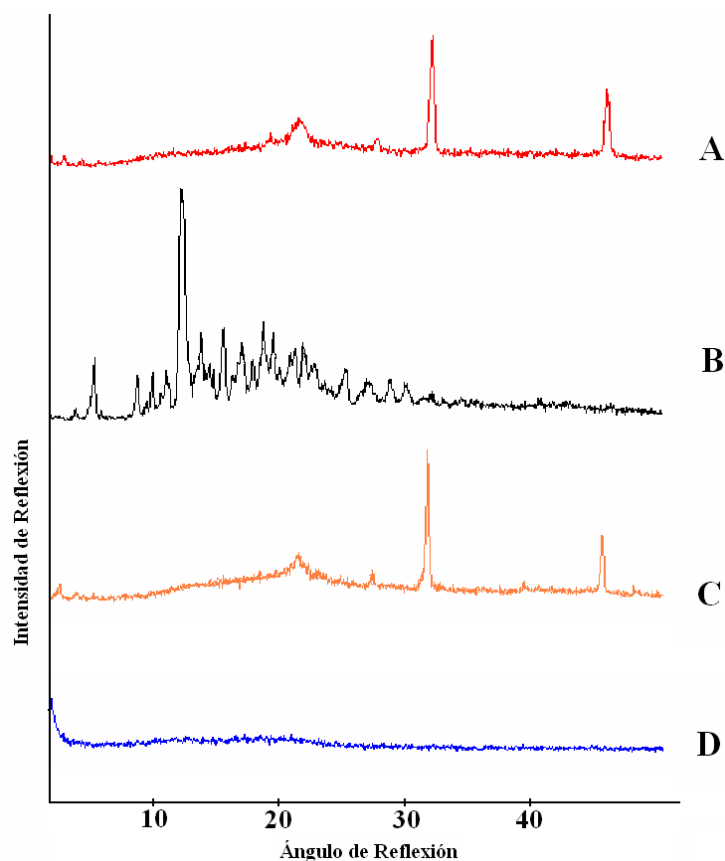


Figura 9. Patrones de difracción de rayos X de: (A) GM1 sólido, (B) Ptx sólido, (C) mezcla de Ptx y GM1 en estado sólido en relación molar 20/1, (D) solución de micelas GM1/Ptx 20/1 liofilizada.

Con el fin de obtener una mayor comprensión sobre las características estructurales de las micelas formadas entre el Ptx y GM1, se prepararon micelas GM1/Ptx usando distintas relaciones molares y se analizaron mediante cromatografía de exclusión molecular, donde las partículas se separan de acuerdo a su radio hidrodinámico.

Con el objeto de facilitar la comparación de los resultados, se les asignó a las distintas preparaciones un número equivalente al PM de la proteína globular que eluye al mismo volumen en las condiciones estudiadas.

Como se observa en la figura 10, a medida que la cantidad de Ptx incrementa, el perfil de elución se corre hacia mayores volúmenes indicando una reducción en el radio hidrodinámico promedio de las micelas mixtas. En estas condiciones, las micelas de GM1 puro eluyen a un volumen equivalente al de una proteína globular con un peso molecular (PM) promedio de 365 kDa y las micelas GM1/Ptx (20/1 mol/mol) con el de una proteína de 280 kDa (Figura 10). Además se observó que el pico que corresponde a los monómeros de GM1 (1,6 kDa) desaparece con la adición del Ptx.

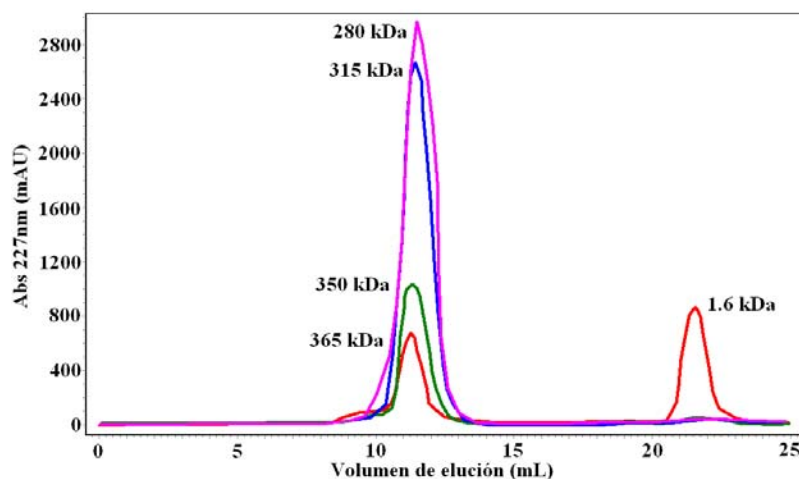
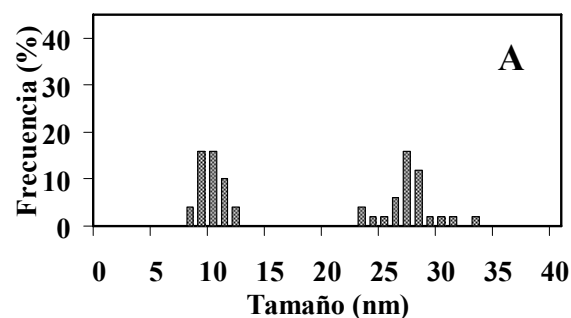
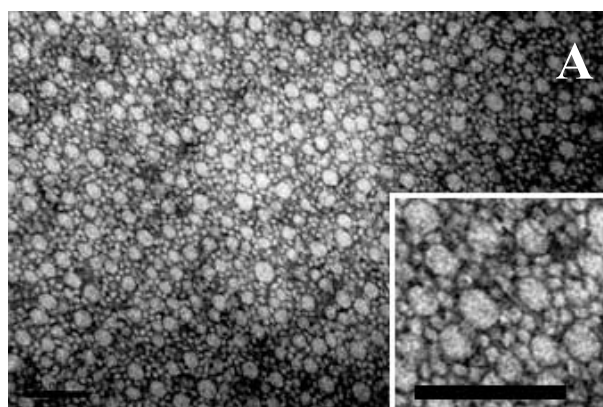


Figura 10. Patrones cromatográficos de micelas de GM1 (█) y de complejos GM1/Ptx: 100/1 (█); 50/1 (█) y 20/1 (█).

Se utilizó la microscopía electrónica de transmisión para evaluar la forma y tamaño de las micelas de GM1 cargadas con Ptx (Figura 11). La imagen obtenida para las micelas de GM1 puro muestra la existencia de dos poblaciones de distinto tamaño, una con un diámetro promedio de 9-10 nm y otra de 27-28 nm (Figura 11A). Con la incorporación del Ptx se observó la presencia de una sola población de micelas con un diámetro promedio de 9-12 nm (Figura 11B).

Como se mencionó previamente, es sabido que las micelas de GM1 experimentan cambios estructurales con el incremento de la temperatura hasta los 55 °C, donde las cadenas de oligosacáridos se deshidratan produciendo un encogimiento de la región hidrofílica de la micela de gangliósido que se acompaña de una ligera expansión de la porción hidrofóbica [25,26]. La figura 11 C muestra que este calentamiento desplaza el balance entre las dos poblaciones de micelas de GM1 hacia la población más pequeña de 9-10 nm.



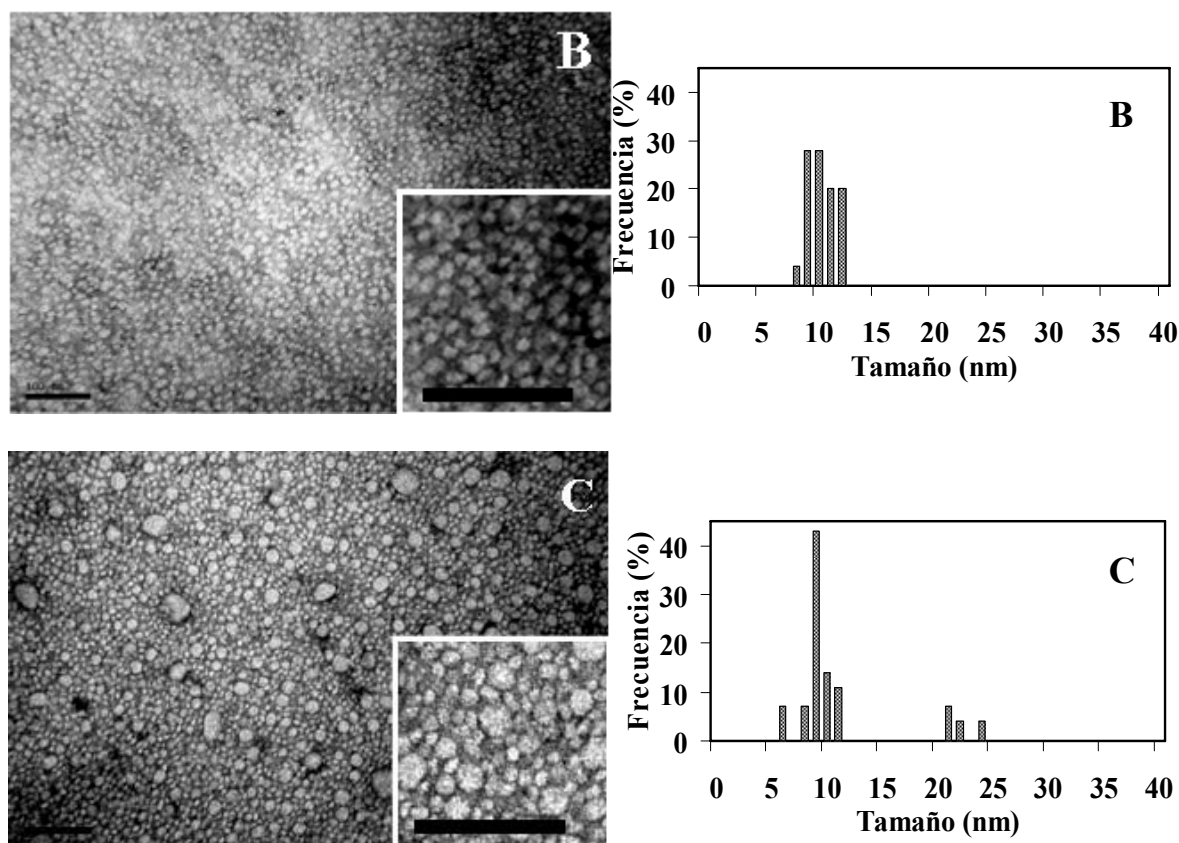


Figura 11. Microscopía electrónica e histogramas de frecuencia de: (A) micelas de GM1, (B) GM1/Ptx (20/1 mol/mol) y (C) GM1 calentado a 55 °C. El tamaño de barra es de 100 nm.

6.4.4 Estabilidad física de micelas GM1/Ptx

Previamente se mencionó que uno de los mayores problemas con el uso de sistemas micelares como vehículos transportadores de fármacos es su pobre estabilidad con la dilución, principalmente asociada con altos valores de CMC y un equilibrio rápido entre la forma monomérica y la micelar [27-29]. A pesar de que los gangliósidos tienen un valor de CMC mucho menor que la mayoría de los anfífilos formadores de micelas (del orden de 10^{-8} M), el alto recambio de los monómeros constituyentes de las micelas puede aún ser causante de problemas de estabilidad con la dilución [30].

De acuerdo con esta observación, se observó una reducción de alrededor de un 24 % del contenido total del GM1 luego de 72 hs de diálisis (tabla 1). Curiosamente, la incorporación del Ptx en las micelas de GM1 llevó a la formación de micelas cinéticamente más estables que aquellas formadas solo por GM1 ya que luego de la diálisis exhaustiva de

los complejos GM1/Ptx se observó una mínima reducción (menor a 5 %) del contenido de GM1 y Ptx (tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la diálisis en la estabilidad de micelas de GM1 y complejos GM1/Ptx.

Diálisis (hs)	GM1 Remanente (%)		Ptx Remanente(%)
	Micelas GM1	Micelas GM1/Ptx	Micelas GM1/Ptx
0	100	100	100
24	98	97	96
48	96	96	95
72	76	95	95

Otro de los problemas que ha sido frecuentemente observado en los sistemas de vehiculización de taxanos libres de solventes es su inestabilidad en solución (por ejemplo, el Abraxane es estable sólo por 8 horas luego de su reconstitución). Por lo tanto, a pesar de que los resultados del experimento de diálisis sugieran que las micelas formadas poseen una alta estabilidad en medio acuoso, el siguiente paso en esta investigación fue determinar la estabilidad en solución de las diferentes micelas que pueden formarse entre Ptx y GM1. Como se muestra en la tabla 2, más del 90 % del Ptx permanece en solución luego de una centrifugación a 100.000 x g de las micelas mixtas preparadas a 4 °C. De acuerdo con este resultado, se observó que la cantidad de Ptx que permanece soluble no se vio afectada cuando las micelas se almacenaron a 4 °C por hasta al menos 4 meses. Como era de esperar, el aumento de la temperatura a 25 y 37 °C fue un factor que afectó la estabilidad de la nanoestructura, probablemente haciendo más hidrofílico al sistema, y que llevó a una reducción progresiva de la cantidad de Ptx que permanece en solución (Tabla 3).

Tabla 2. Efecto de la centrifugación en la estabilidad de micelas GM1/Ptx.

Centrifugación	Micelas GM1/Ptx (relación molar)			
	100/1	50/1	25/1	20/1
	Ptx soluble (%)			
25.000 x g	100	100	97	97
50.000 x g	99	100	94	95
100.000 x g	99	99	93	93

Tabla 3. Efecto de la temperatura de almacenamiento en la estabilidad de micelas GM1/Ptx (20/1 mol/mol).

Tiempo (días)	Ptx soluble (%)		
	4 °C	25 °C	37 °C
0	100	100	100
8	96	100	94
17	95	90	94
42	95	91	87
113	95	90	86

Se evaluó también la estabilidad de las micelas GM1/Ptx 15/1, preparadas realizando la carga del Ptx a 55 °C en donde la incorporación incrementa un 30 % (Figura 8). Aquí se observó una disminución de un 15 % del Ptx soluble mientras la muestra se mantuvo por un mes a 4 y 25 °C y una disminución del 25% con la muestra mantenida a 37 °C. Este resultado demuestra que el incremento en la carga del Ptx por el proceso de calentamiento induce una posterior disminución en la estabilidad de la formulación. Este resultado sugiere que la solubilización de esa cantidad extra de Ptx es un proceso transitorio y que eventualmente la micela se re-estructura en la configuración más estable produciendo la precipitación de la droga excedente.

Por otro lado, al menos un 96 % de las micelas GM1/Ptx fueron re-solubilizadas luego de ciclos de congelado-descongelado y de la liofilización; resultado que evidencia que estos complejos micelares pueden ser almacenados en estado sólido por periodos prolongados de tiempo, sin perder sus propiedades físico-químicas.

6.4.5 Estabilidad química del Ptx en las micelas de GM1

Los estudios de caracterización estructural sugieren que tras la asociación con GM1, el Ptx se localiza en el núcleo hidrofóbico de las micelas e induce una reducción en su dinámica. Como el agua prácticamente no penetra al núcleo hidrofóbico de las micelas, se planteó la posibilidad de que la incorporación del Ptx en las micelas de GM1 podría protegerlo de su hidrólisis en condiciones alcalinas extremas de pH. De acuerdo con este postulado, se observó que más del 60 % del Ptx libre se hidrolizó en 5 horas a pH 10 mientras que cuando el Ptx se encuentra asociado a la micela prácticamente no se observa degradación alguna (Figura 12).

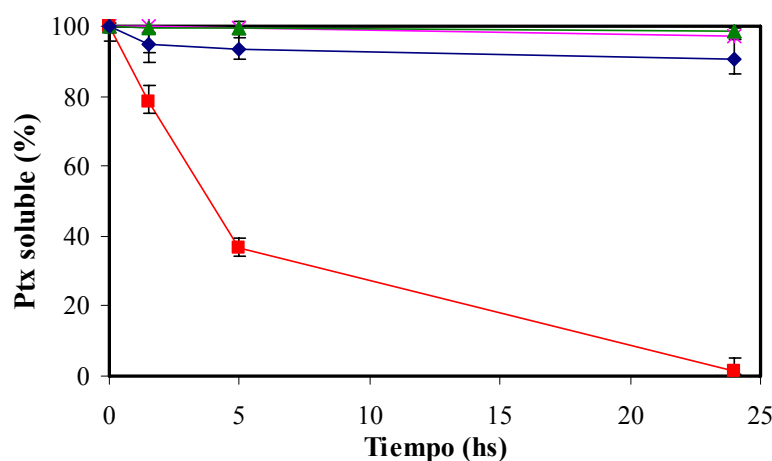


Figura 12. Efecto del pH en la estabilidad del Ptx en solución, pH 5 (—*) y pH 10 (—■), e incorporado en los complejos GM1/Ptx, pH 5 (—▲) y pH 10 (—◆). Las barras de error indican la DS de la media ($n = 3$).

6.4.6 Comparación de la capacidad de solubilización del Ptx entre micelas de GM1 y liposomas mixtos

Varios de los resultados obtenidos, sugieren fuertemente que el Ptx se encuentra localizado en el núcleo altamente hidrofóbico de la micela. Esto nos llevó a realizar una comparación acerca de la capacidad de dominios hidrofóbicos presentes en dos estructuras lipídicas diferentes, como son las cadenas hidrocarbonadas de las micelas y las cadenas hidrocarbonadas de una bicapa lipídica presente en los liposomas, para incorporar Ptx. Para analizar esta cuestión se utilizaron micelas de GM1 y liposomas mixtos de fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), diestearoil fosfatidil glicerol (dsPG) y Colesterol (Col). La figura 13 muestra que en relación molar Lípido/Ptx 100/1 la habilidad de incorporar Ptx de ambas estructuras resultó similar; sin embargo cuando se agrega mayor cantidad de Ptx, la eficiencia de los liposomas para la solubilización disminuye marcadamente.

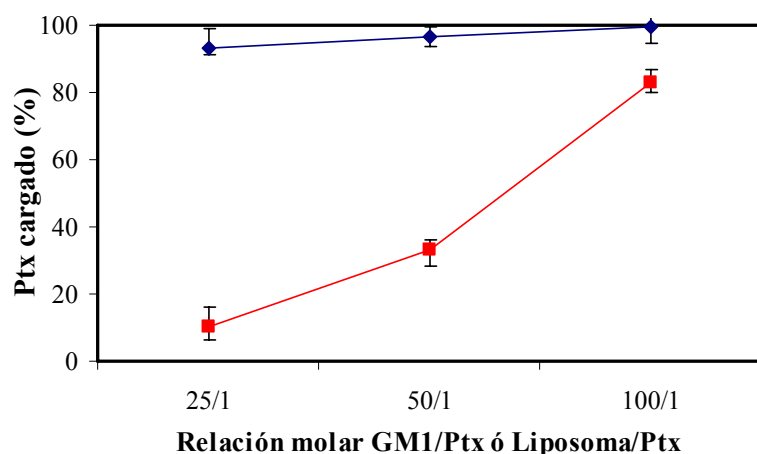


Figura 13. Comparación de la incorporación de Ptx en micelas de GM1 (—◆) y liposomas mixtos (—■). Las barras de error indican la DS de la media ($n = 3$).

6.4.7 Caracterización de la captación celular y actividad biológica del Ptx “in-vitro”

Con el fin de evaluar si la captación celular de Ptx se ve afectada por su incorporación en las micelas de GM1, se utilizó un derivado fluorescente del Ptx (Flu-tax). Como se muestra en la figura 14, el perfil cinético de liberación del Ptx desde las micelas de GM1 hacia una línea celular fibroblástica fue similar al de una solución control en DMSO.

De acuerdo con este resultado, se observó que la actividad citotóxica del Ptx incorporado en la micela de GM1 fue muy similar a la de la solución control en DMSO sobre líneas celulares de origen tumoral (Hep-2 y HeLa) y no-tumoral (Vero y MA). La figura 15 muestra el efecto citotóxico del Ptx sobre células Hep-2 (A) y Vero (B).

Los resultados obtenidos para células HeLa y MA fueron similares a aquellos obtenidos para Hep-2 y Vero respectivamente.

Se observa además, que las micelas de GM1 vacías prácticamente no tuvieron actividad citotóxica.

Estos resultados claramente indican que el Ptx puede ser liberado de las micelas de GM1 hacia las células, en donde se une a la molécula de tubulina para estabilizar los microtúbulos del citoesqueleto celular, bloqueando así la actividad mitótica.

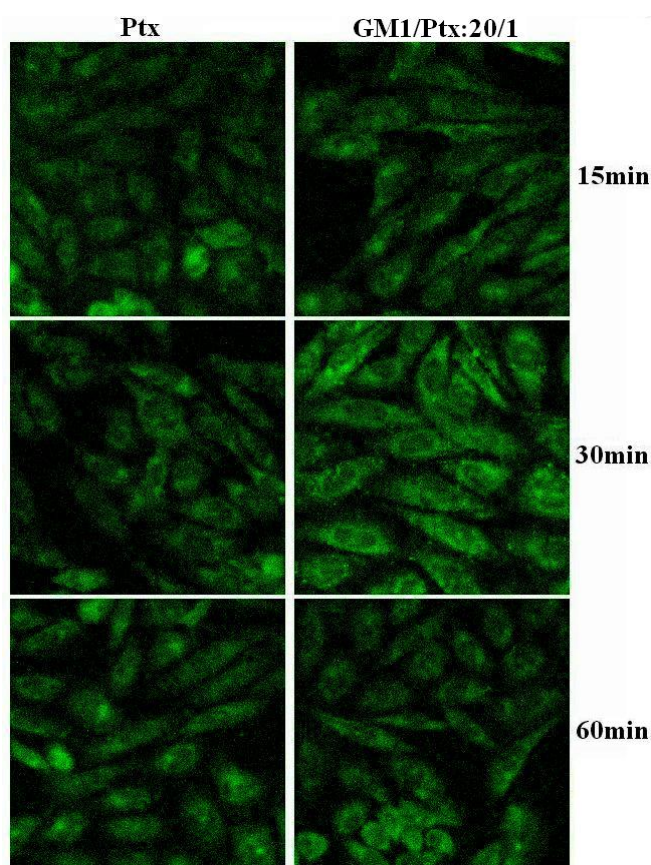


Figura 14. Captación celular de Ptx partir de una solución en DMSO, y desde micelas GM1/Ptx (20/1 mol/mol) a los 15, 30 y 60 min de incubación.

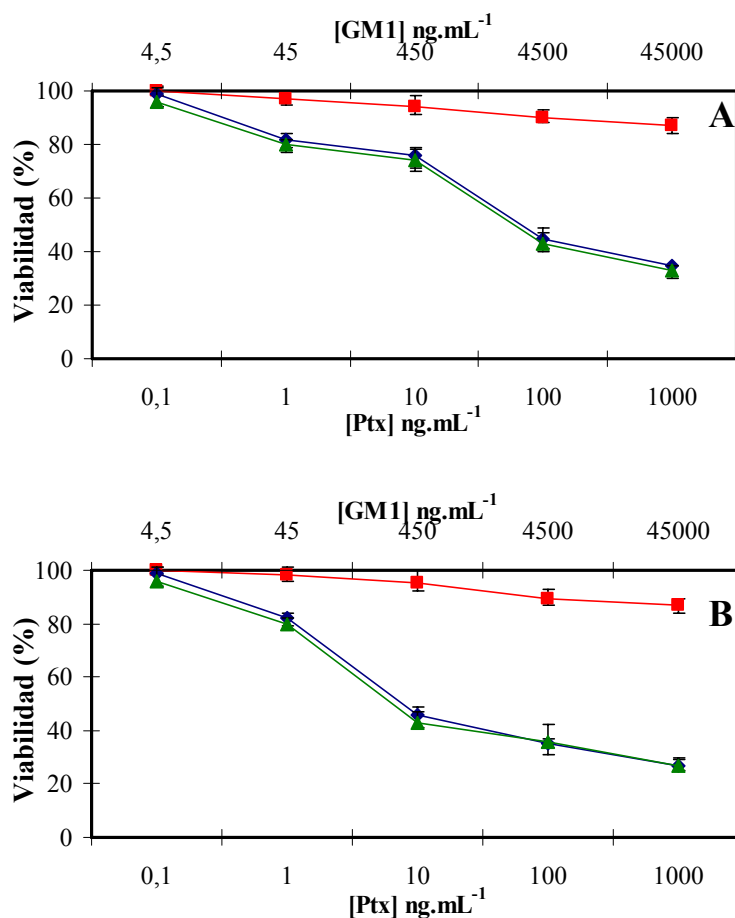


Figura 15. Efecto citotóxico *in vitro* de GM1 (—■—), Ptx (—◆—) y GM1/Ptx (—▲—) sobre células: (A) Vero y (B) Hep-2. Las barras de error indican la DS de la media ($n = 3$).

6.4.8 Caracterización de la actividad biológica del Ptx “*in-vivo*”

Se evaluó el efecto tóxico producido por la administración de micelas GM1/Ptx y de Taxol comercial en ratones, mediante el análisis anatómo-patológico de distintos órganos, algunos de ellos involucrados en el metabolismo y eliminación de esta clase de fármaco (hígado y riñón). Por otra parte se analizó el tejido cerebral, con el objeto de conocer si estas nanoestructuras son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica.

Para ello se utilizaron 4 ratones sanos, de la misma edad y con pesos muy similares, a los que se les administraron 2 dosis distintas de Ptx (11 y 22 μg) por vía intraperitoneal cada 48 hs por 40 días. A dos de los ratones se les administró Ptx en forma de Taxol comercial y a los otros dos la formulación de micelas GM1/Ptx (20/1 mol/mol). Luego del tratamiento, los ratones fueron sacrificados y analizados por anatomía patológica. Las fotos de los cortes histológicos se muestran en la figura 16.

A nivel hepático el Taxol produce una necrosis centroacinar con la menor dosis administrada (11 $\mu\text{g} = 150 \text{ mg.m}^{-3}$), acción tóxica que consiste en lesiones citoplasmáticas de los hepatocitos, pérdida de límites celulares, frecuentes células binucleadas o de

núcleos gigantes, presencia de infiltrados leucocitarios neutrófilos; sin embargo en general la arquitectura está conservada. Cuando la dosis se duplica (22 μ g), el Taxol produce una hepatitis tóxica, caracterizada por infiltrados de leucocitos neutrófilos que se extienden por los espacios porta, alteraciones nucleares más evidentes, con frecuentes células binucleadas, núcleos gigantes, actividad mitótica y tumefacción del citoplasma celular. La administración de la formulación micelar produce en cambio, una hepatopatía tóxica, con lesiones hepáticas mucho menos evidentes.

A nivel renal, el Taxol no produjo lesiones evidentes. La formulación micelar en cambio, causó una tubulopatía tóxica, en donde los glomérulos no presentan alteraciones y no hubo infiltrados inflamatorios aunque se vieron afectados los túbulos contorneados distales, con un epitelio tumefacto, desprendido y material amorfo que cierra la luz.

A nivel cerebral, ninguna de las dos formulaciones produjo lesiones evidentes. Este resultado sugiere que tanto el GM1 como el Ptx carecen de capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica.

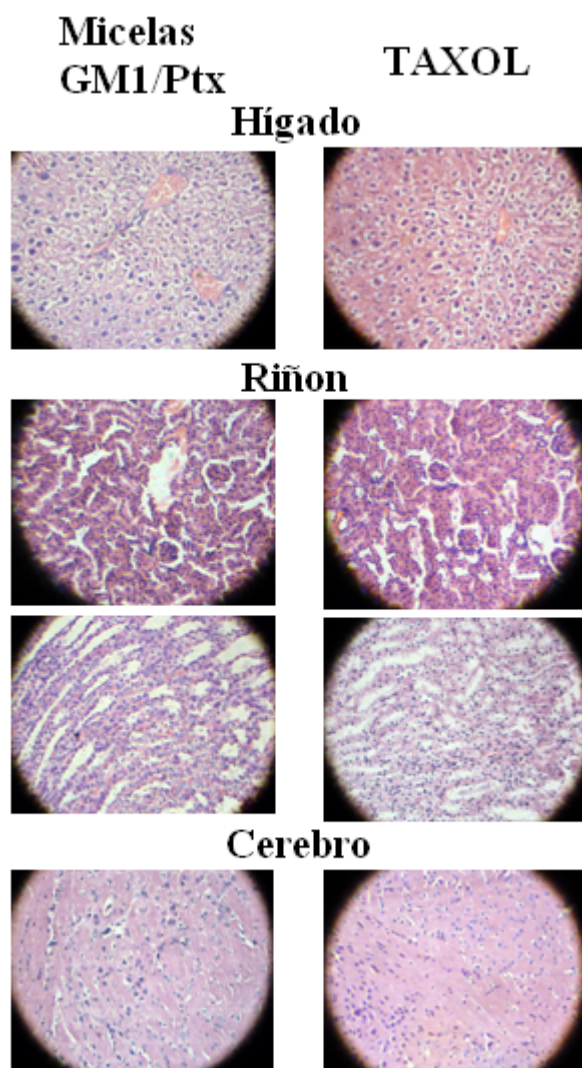


Figura 16. Fotos de cortes histológicos de los órganos de los ratones que se analizaron por anatomía patológica.

Se evaluó también la actividad biológica de estas dos formulaciones en ratones genéticamente alterados, que producen neuroblastomas periféricos espontáneos entre el tercer y séptimo mes de vida. En este estudio se administraron dosis de Ptx de 11 µg por vía endovenosa, cada 4 días y por 16 días que duró el tratamiento. A dos de los ratones se les administró Ptx en forma de Taxol comercial y a los otros dos la formulación de micelas GM1/Ptx (20/1 mol/mol). Se observó que en el lapso de 12 días de tratamiento (3 dosis) hubo una reducción muy significativa en el tamaño de los tumores de cada ratón de alrededor de un 85-90 %. Además en todos los ratones se produjo una gran pérdida de pelo desde la 2ª dosis. Estos resultados sugieren que el fármaco produce su efecto antimitótico de manera similar a partir de la administración de micelas GM1/Ptx y del Taxol comercial.

Con el fin de evaluar y comparar la actividad antiangiogénica del Ptx incorporado en micelas GM1/Ptx y el solubilizado en forma de Taxol comercial, se utilizó como modelo de angiogénesis a la membrana corioalantoidea (CAM) de embriones de pollo.

La angiogénesis es un proceso progresivo que implica múltiples pasos en el cual se generan nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos pre-existentes. La mayor parte del tiempo, el sistema vascular adulto se mantiene en un estado angiostático. Este estado debe ser desactivado para permitir la formación de nuevos vasos sanguíneos. Esta desactivación puede ser parte de una respuesta fisiológica normal (si se daña algún tejido) ó un paso crítico de una patología como el crecimiento de tumores.

Debido a la extensa vascularización y fácil accesibilidad, la CAM de embriones de pollo ha sido usada para estudiar aspectos morfo-funcionales del proceso de angiogénesis *in-vivo* y para estudiar la eficacia y el mecanismo de acción de moléculas pro- y antiangiogénicas.

La figura 17 muestra las imágenes microscópicas de los distintos huevos con sus respectivos tratamientos desde el tiempo 0 hs y hasta 72 hs, posteriores a la aplicación.

Con la aplicación de GM1, se observa un proceso angiogénico normal, con crecimiento y generación de nuevos vasos sanguíneos.

Por lo contrario, la formulación de micelas GM1/Ptx y de Taxol comercial produjeron un efecto antiangiogénico muy similar con deterioro, ruptura y desaparición de los vasos sanguíneos del embrión, que se aprecia visiblemente a las 48 hs post aplicación del fármaco.

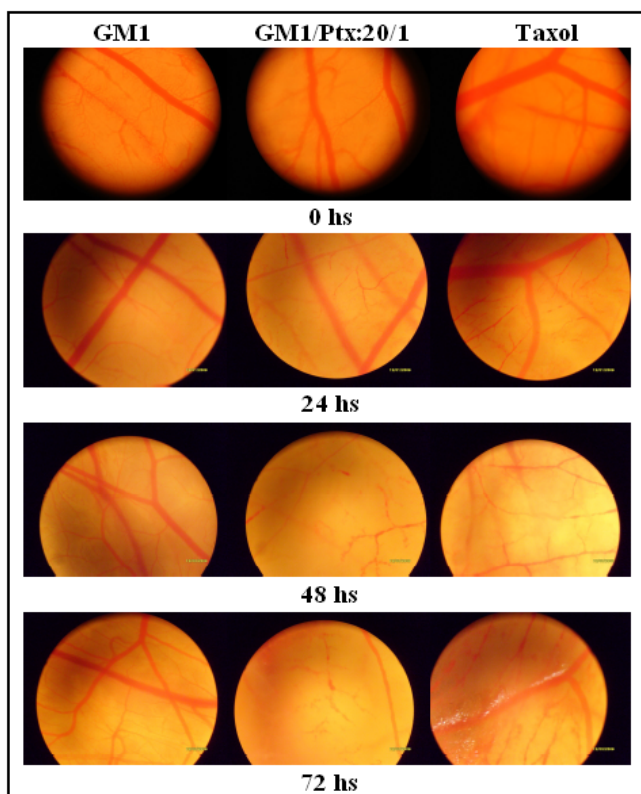


Figura 17. Actividad antiangiogénica en el tiempo del Ptx contenido en la formulación comercial (Taxol) y en los complejos micelares GM1/Ptx. Las micelas de GM1 se utilizan como control del proceso angiogénico normal.

6.5 Discusión

Los resultados presentados en este capítulo muestran que las micelas de gangliósido son nanoestructuras auto-ensambladas adecuadas para transportar grandes cantidades de drogas oncológicas hidrofóbicas como los taxanos en solución acuosa, en donde la droga se carga de forma espontánea sin necesidad de realizar ningún proceso complejo.

Inicialmente se trabajó con micelas mixtas formadas por una mezcla de gangliósidos totales purificados de cerebro bovino, las que demostraron ser capaces de solubilizar al Ptx. Las distintas clases de gangliósidos que se obtienen del cerebro pueden ser purificados con relativa facilidad, de manera que es posible estudiar la influencia de la estructura auto-agregada de cada gangliósido en la capacidad de incorporación y solubilización de fármacos. En este trabajo de investigación nos propusimos estudiar sólo a la familia de los monosialogangliósidos en cuanto a su capacidad para solubilizar taxanos. Los tres mayores representantes son GM1, GM2 y GM3. Estructuralmente, estos lípidos comparten la misma porción hidrofóbica y poseen solo una molécula de ácido siálico, pero difieren en la cantidad de azúcares que poseen en su región hidrofílica, teniendo 4, 3 y 2 azúcares neutros respectivamente. Desde el punto de vista estructural tanto el balance

hidrofóbico/hidrofilico de las micelas de gangliósido así como su composición química parecen jugar un importante rol en su capacidad para solubilizar taxanos. Así, cuando se los disuelve en agua, GM1 y GM2 forman micelas de entre 300 y 450 monómeros, mientras que GM3 forma vesículas unilamelares con alrededor de 14.000 monómeros [30]. Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que la máxima solubilización de los taxanos se logró con los gangliósidos que forman micelas.

En este contexto, el monosialogangliósido GM1 demostró ser el que forma las estructuras micelares con mayor capacidad para la incorporación de taxanos, ya que las micelas de GM2 (más grandes que las de GM1) o las micelas formadas por LIGA (más pequeñas) fueron menos eficientes para disolver estos fármacos.

La microscopía electrónica demostró que el GM1 se auto-agrega en medio acuoso dando origen a dos poblaciones micelares altamente dinámicas con diámetros promedios de 9 y 27 nm (Figura 11). También se evidenció el dinamismo que poseen estas estructuras, ya que tienen la capacidad de re-estructurarse en presencia del Ptx; así, la población de micelas de GM1 de 27 nm tiende a desaparecer, mientras que el fármaco se incorpora en las micelas de 9 nm y las estabiliza dinámicamente. Estos resultados y los obtenidos por difracción de rayos X sugieren que la incorporación de los taxanos induce una ruptura de la estructura interna de la micela que desplaza el equilibrio hacia el agregado más pequeño, lo que conduce a una reducción de la CMC y a una mayor estabilidad de las micelas mixtas comparadas con las micelas de GM1 puro.

Como podría esperarse, la deshidratación de la cabeza polar de las micelas de GM1 por el pre-calentamiento de las mismas a 55 °C, incrementa su capacidad de incorporación de taxanos. Sin embargo, una reducción de la polaridad del grupo hidrofílico del GM1 por titulación de la carga del ácido siálico no produjo ningún efecto, mientras que la lactonización de la micela redujo su capacidad de carga de taxanos.

Es importante destacar el hecho de que existe un límite de saturación para la incorporación de los taxanos en las micelas de GM1 (alrededor de la relación molar GM1/Ptx 20/1) y que una vez que las micelas se saturan con la droga, el exceso de la misma inestabiliza las micelas cargadas llevando a la precipitación de la mayoría del fármaco (ver figura 1 y 3A).

Como se mencionó previamente, la capacidad de las micelas de GM1 para cargar taxanos se puede aumentar por la deshidratación de la cabeza polar inducida por la temperatura. Sin embargo, como la deshidratación se revierte fácilmente con la reducción de la temperatura, este tratamiento resultó no ser una buena opción para la solubilización

efectiva de altas cantidades de taxanos. Además, este incremento en la capacidad para solubilizar taxanos demostró ser un proceso transitorio, ya que se observó que la estabilidad de estos complejos es bastante menor a la de aquellos preparados en frío.

A pesar de las buenas propiedades coloidales y de solubilización de fármacos, la baja eficiencia de carga y la necesidad de usar solventes orgánicos para la carga de las drogas son preocupaciones significativas en las formulaciones de micelas poliméricas desarrolladas hasta el momento como sistemas de liberación de fármacos poco solubles [31,32]. En este sentido, la incorporación de taxanos en micelas de GM1 ha demostrado ser una plataforma que permite el aumento de su solubilidad en agua hasta al menos 6 mg.mL^{-1} , concentración presente en las formulaciones comerciales aprobadas de Ptx (Taxol® y Abraxane®) y Dtx (Taxotere®).

Los estudios *in-vitro* mostraron que las micelas GM1/Ptx interactúan y liberan su contenido a células normales (Vero y MA) y tumorales (Hep-2 y HeLa) con valores de IC50 de alrededor de 100 ng.mL^{-1} y 10 ng.mL^{-1} respectivamente. Es importante remarcar que estos valores de IC50 son similares a aquellos obtenidos con otros sistemas de liberación de taxanos [33,34]. Adicionalmente, los estudios *in-vivo* demostraron que el Ptx incorporado en micelas de GM1 tiene una actividad biológica cualitativamente similar a la formulación de Taxol comercial.

6.6 Conclusiones

En este capítulo, se ha descrito un nuevo sistema nanomicelar auto-ensamblado para el transporte y liberación de taxanos en medio acuoso [16]. Nuestros resultados muestran que:

- Las micelas GM1/taxanos se pueden preparar fácilmente sin la necesidad de una homogeneización a alta presión.
- Soluciones acuosas de micelas de GM1 cargan espontáneamente taxanos incrementando su solubilidad acuosa hasta 6.000 veces, desde alrededor de $1 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ a 6 mg.mL^{-1} , permitiendo alcanzar las concentraciones terapéuticamente necesarias.
- Estas micelas mixtas son estables en solución acuosa sin disolvente orgánico durante al menos 4 meses cuando se las mantiene refrigeradas.

- La incorporación de los taxanos en las micelas de GM1 induce una reorganización estructural que conduce a una importante protección del Ptx reduciendo su hidrólisis a pH alcalino.
- La difusión tanto del GM1 como del fármaco se encuentra restringida cuando se forman las micelas mixtas, dando origen a estructuras estables tras la dilución, ciclos de congelado-descongelado y liofilización.
- La incorporación de los taxanos en las micelas de gangliósido no afecta su captación y efecto citotóxico sobre cultivos celulares, así como su actividad biológica *in-vivo*.

En conclusión, las propiedades físico-químicas y la buena bio-compatibilidad del sistema brindan la posibilidad de utilizar esta plataforma para el diseño de nuevos nanotransportadores para fármacos hidrofóbicos.

6.7 Bibliografía

- [1] Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT (1971) Plant antitumor agents VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc*, 93: 2325-2327.
- [2] Rowinsky EK, Donehower RC (1995) Paclitaxel (Taxol). *N Engl J Med*, 332: 1004 - 1014.
- [3] Liggins RT, Hunger WL, Burt HM (1997) Solid-state characterization of paclitaxel. *J Pharm Sci*, 86: 1458-1463.
- [4] Rowinsky EK (1997) The taxanes: dosing and scheduling considerations. *Oncology*, 11: 7-19.
- [5] Greco FA, Hainsworth TM (1999) One-hour paclitaxel infusions: a review of safety and efficacy. *Cancer J Sci Am*, 5: 179-191.
- [6] Ibrahim NK, Desai N, Legha S, Soon-Shiong P, Theriault RL, et al. (2002) Phase I and pharmacokinetic study of ABI-007, a Cremophor-free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel. *Clin Cancer Res*, 8: 1038-1044.
- [7] Gradishar WJ (2006) Albumin-bound paclitaxel: A next-generation taxane. *Expert Opin Pharmacother*, 7: 1041-1053.

-
- [8] Mishra B, Patel BB, Tiwari S (2010) Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine*, 6: 9-24.
- [9] Baker J, Ajani J, Scotte F, Winther D, Martin M, et al. (2009) Docetaxel-related side effects and their management. *Eur J Oncol Nurs*, 13: 49-59.
- [10] Matsumura Y (2008) Poly (amino acid) micelle nanocarriers in preclinical and clinical studies. *Adv Drug Deliv Rev*, 60: 899-914.
- [11] Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K (2000) Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release*, 65: 271-284.
- [12] O'Shaughnessy JA (2003) Pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer. *Clin Breast Cancer*, 4: 318-328.
- [13] Sharma A, Straubinger RM (1994) Novel taxol formulations: preparation and characterization of taxol-containing liposomes. *Pharm Res*, 11: 889-896.
- [14] Straubinger RM, Sharma A, Murray M, Mayhew E (1994) Novel taxol formulation: Taxol-containing liposomes. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 15: 69-78.
- [15] Torchilin VP (2007) Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. *Pharm Res*, 24: 1-16.
- [16] Leonhard V, Beltramo DM, Alasino RV, Bianco IB (2011) Water-soluble pharmaceutical composition comprising at least one therapeutically active substance having hydrophobic properties and at least one compound selected from among sialoglycosphingolipids, glycosphingolipids or a mixture of sialoglycosphingolipids and glycosphingolipids. WO 2011/113981 A1.
- [17] Miettinen T, Takki-Luukkainen IT (1959) Use of butyl acetate in determination of sialic acid. *Acta Chem Scand*, 13: 856-858.
- [18] Green LM, Reade JL, Ware CF (1984) Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth lymphokines. *J Immunol Methods*, 70: 257-268.
- [19] Ulrich-Bott B, Wiegandt H (1984) Micellar properties of glycosphingolipids in aqueous media. *J Lipid Res*, 25: 1233-1245.
- [20] Sonnino S, Cantú L, Corti M, Acquotti D, Venerando B (1994) Aggregative properties of gangliosides in solution. *Chem Phys Lipids*, 71: 21-45.

- [21] Sonnino S, Cantú L, Corti M, Acquotti D, Kirschner G, et al. (1990) Aggregation properties of semisynthetic GM1 ganglioside ($\text{II}^3\text{Neu5AcGgOse}_4\text{Cer}$) containing an acetyl group as acyl moiety. *Chemistry and Physics of Lipids*, 56 (1) 49-57.
- [22] Brocca P, Cantú L, Corti M, Del Favero E, Raudino A (2002) Collective phenomena in confined micellar systems of gangliosides. *Physica A*, 304: 117-190.
- [23] Cantú L, Corti M, Del Favero E, Muller E, Raudino A, et al. (1999) Thermal Hysteresis in Ganglioside Micelles Investigated by Differential Scanning Calorimetry and Light-Scattering. *Langmuir*, 15: 4975-4980.
- [24] Orthaber D, Glatter O (1998) Time and temperature dependent aggregation behaviour of the ganglioside GM1 in aqueous solution. *Chemistry and Physics of Lipids*, 92 (1) 53-62.
- [25] Hirai M, Takizawa T (1998) Intensive Extrusion and Occlusion of water in Ganglioside Micelles with Thermal Reversibility. *Biophys J*, 74: 3010-3014.
- [26] Hayakawa T, Hirai M (2002) Hydration and thermal reversibility of glycolipids depending on sugar chains. *Eur Biophys J*, 31 (1) 62-72.
- [27] Torchilin VP (2007) Micellar Nanocarriers: Pharmaceutical Perspectives. *Pharm Res*, 24 (1).
- [28] Gaucher G, Dufresne MH, Sant VP, Kang N, Maysinger D, et al. (2005) Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *J Control Release*, 109: 169-188.
- [29] Lukyanov AN, Torchilin VP (2004) Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs. *Adv Drug Deliv Rev*, 56: 1273-1289.
- [30] Sonnino S, Mauri L, Chigorno V, Prinetti A (2006) Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology*, 17 (1) 1R-13R.
- [31] Huh KM, Lee SC, Cho YW, Lee J, Jeong JH, et al. (2005) Hydrotropic polymer micelle system for delivery of paclitaxel. *J Control Release*, 101 (1) 59-68.
- [32] Lee J, Lee SC, Acharya G, Chang CJ, Park K (2003) Hydrotropic solubilization of paclitaxel: Analysis of chemical structures for hydrotropic property. *Pharm Res* 20 (7) 1022-1030.
- [33] Fukunaga-Kalabis M, Herlyn M (2007) Unraveling mysteries of the multifunctional protein SPARC. *J Invest Dermatol*, 127: 2497-2498.

- [34] Danhier F, Magotteaux N, Ucakar B, Lecouturier N, Brewster M, et al. (2009) Novel self-assembling PEG-p-(CL-co-TMC) polymeric micelles as safe and effective delivery system for Paclitaxel. *Eur J Pharm Biopharm*, 73: 230-238.

7. CAPÍTULO 2

Estudios sobre la interacción de Albúmina con micelas de GM1 que contienen Paclitaxel

7.1 Resumen

En el capítulo anterior se demostró que los taxanos, Paclitaxel (Ptx) y Docetaxel (Dtx), pueden ser incorporados de manera espontánea en micelas formadas por gangliósidos. Entre los monosialogangliósidos, el monosialogangliósido GM1, fue el más eficiente, aumentando la solubilidad en agua de los taxanos alrededor de 6.000 veces, dando origen a formulaciones estables que podrían ser usadas como una nueva estrategia para el transporte y liberación de fármacos en tratamientos contra el cáncer [1].

En este capítulo se describen los estudios para evaluar la potencial interacción de las formulaciones GM1/Ptx con los distintos componentes sanguíneos humanos. Los ensayos realizados con los componentes celulares demostraron que las micelas mixtas no producen una lisis significativa de los glóbulos rojos, ni afectan en la actividad plaquetaria; sin embargo producen una disminución de la población linfocitaria en alrededor de un 30 %, al igual que el fármaco libre en solución de DMSO.

Además, se presentan los estudios acerca de la interacción de las micelas mixtas con las proteínas plasmáticas. En este contexto, se demuestra que la albúmina sérica humana (Alb) es capaz de interactuar con las micelas GM1/Ptx en forma espontánea; resultado que aparece como una nueva estrategia que podría mejorar la acumulación de la droga en el sitio específico del tumor. A pesar de que la interacción entre Alb y las micelas mixtas GM1/Ptx es regulada por condiciones tales como pH y temperatura, aquí se demuestra que su principal fuerza impulsora es el efecto hidrofóbico. Así, esta interacción dio origen a un nuevo complejo ternario GM1/Ptx/Alb con tamaños entre 19 y 24 nm y radios hidrodinámicos de 140-180 kDa.

Estas micelas mixtas demostraron ser estables en solución acuosa por lo menos por hasta 40 días y también frente a ciclos de congelamiento-descongelamiento y de liofilización-solubilización.

Los resultados de los ensayos *in-vitro*, en donde se evaluó la capacidad de estos complejos para liberar el Ptx, mostraron que las nanoestructuras desarrolladas son capaces de liberar el fármaco, el cual puede ser captado por células en cultivo tanto de origen tumoral como no-tumoral, siendo la actividad antimitótica muy similar a la observada con la droga libre en solución de DMSO.

7.2 Introducción

Previamente se ha mencionado que muchos de los fármacos hidrofóbicos usados en la actualidad, especialmente aquellos empleados en tratamientos oncológicos como los taxanos, tienen una pobre o limitada solubilidad en agua, son rápidamente eliminados por vía fagocítica y renal, y producen una toxicidad sistémica elevada; características que limitan su uso terapéutico y que han llevado al desarrollo de diversos sistemas de administración con el objeto de mejorar sus propiedades terapéuticas.

La principal vía de administración de fármacos oncológicos es la endovenosa; por ello los vehículos utilizados para el transporte de esta clase de fármacos deben reunir ciertas características:

- ser biocompatibles
- ser biodegradables, es decir, el vehículo debe poder ser metabolizado o eliminado como tal, evitando su acumulación en el organismo
- tener un tamaño de partícula óptimo, para evitar su rápida eliminación por los macrófagos del sistema retículo endotelial y por filtración renal
- poseer una alta capacidad de carga, con el fin de reducir el volumen de inyección necesario para alcanzar la dosis terapéutica
- tener un tiempo de circulación prolongado, para permitir la llegada del fármaco al sitio de acción [2,3]
- ser específicos, de manera de reducir los efectos secundarios dañinos sobre órganos y tejidos sanos [4]

En este contexto, es importante también destacar que los vehículos para la administración endovenosa de fármacos pueden sufrir una agregación o adhesión a los distintos componentes de la sangre, incluyendo a las células sanguíneas y a las distintas proteínas séricas, que puede condicionar fuertemente su biodistribución, tiempo de circulación y eliminación. Por ejemplo, es conocido que ciertos transportadores con carga positiva, como los liposomas catiónicos, interactúan con proteínas plasmáticas de carga negativa, conduciendo a veces a la agregación de los vehículos y embolia en los vasos sanguíneos después de la administración intravascular.

Los resultados descriptos en el capítulo anterior de este trabajo de tesis mostraron que los monosialogangliósidos formadores de micelas (como GM1 y GM2), con una concentración micelar crítica en el orden de 10^{-8} M, interaccionan espontáneamente con el

Ptx y Docetaxel (Dtx) formando estructuras solubles en agua que son relativamente insensibles a la dilución y que permiten su transporte en medio acuoso y actividad antimitótica [1].

Considerando que la vía de administración de los taxanos es la endovenosa, en este capítulo se estudia la interacción de los complejos micelares GM1/Ptx formados con los distintos componentes sanguíneos humanos con el fin de evaluar el potencial uso de estos complejos como sistema de administración de taxanos.

7.3 Materiales y métodos

7.3.1 Materiales

7.3.1.1 Reactivos

- El Paclitaxel (Ptx), es de Yunnan Smandbet Co. Ltd. (Kumming, China). Las soluciones madres se prepararon disolviendo el Ptx en etanol y dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final de 20 mg.mL⁻¹ y 50 mg.mL⁻¹ respectivamente.
- El Flutax-1, derivado fluorescente del paclitaxel fue provisto por Calbiochem (San Diego, CA). Las soluciones madres se prepararon en DMSO a una concentración final de al 25 µg.mL⁻¹.
- El monosialogangliósido GM1 purificado de cerebro bovino como sal de sodio, fue un obsequio del Dr. P.E.A. Rodriguez. Las soluciones madres de GM1 se prepararon disolviendo los gangliósidos en agua bidestilada a una concentración final de 250 mg.mL⁻¹.
- La albúmina sérica humana purificada (Alb) al 20 % (p/v) con Caprilato de Sodio (0,04 M) y N-acetiltriptofano (0,04 M) usados como estabilizadores, fue un obsequio del Laboratorio de Hemoderivados, Universidad Nacional de Córdoba (Córdoba, Argentina). Para remover los excipientes la albúmina se dializó frente a agua destilada o solución salina y se diluyó con agua destilada no pirogénica hasta la concentración final usada en cada ensayo.
- Todos los demás productos químicos utilizados fueron de grado analítico.

7.3.1.2 Líneas celulares

Los ensayos de citotoxicidad y de captación celular se realizaron usando las mismas líneas celulares descriptas en el capítulo 1.

7.3.2 Métodos

7.3.2.1 Interacción de micelas GM1/Ptx con células sanguíneas

Se incubaron glóbulos rojos (GR) humanos purificados (4×10^6 células. mm^{-3}) con micelas GM1/Ptx (20/1 mol/mol) con una concentración de Ptx de $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ durante 6 horas a temperatura ambiente. Se tomaron alícuotas de las muestras a distintos periodos de tiempo y se cuantificó la cantidad de Ptx en el sobrenadante de los GR por HPLC y el porcentaje de hemólisis midiendo la hemoglobina libre por espectrofotometría UV-visible a 540 nm.

Por otro lado, se incubaron plaquetas humanas purificadas con un 10 % de volumen de micelas GM1/Ptx (20/1 mol/mol) con una concentración de GM1 de $1,13 \text{ mg.mL}^{-1}$ y de Ptx de $25 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ por 1 hora a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y bajo constante agitación para evitar la agregación plaquetaria espontánea. Como control positivo de agregación plaquetaria se usó una solución de colágeno tipo I de 1 mg.mL^{-1} . Además se utilizó una solución de Ptx en DMSO como control de efecto de la droga libre sobre las plaquetas.

Muestras de sangre humana entera se incubaron con Ptx en etanol (2 mg.mL^{-1}), micelas de GM1 (9 mg.mL^{-1}) y micelas GM1/Ptx (20/1 mol/mol) por 12 horas a temperatura ambiente. En tiempo 0 y 12 hs se marcaron a temperatura ambiente durante 20 min con anticuerpos monoclonales (triple etiquetado Opticlone CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PC5) en una cámara oscura. Después de la lisis de glóbulos rojos, (KHCO_3 1 g, NH_4Cl 8,26 g, EDTA (Na3) 0,003 g y 100 mL de H_2O), el sobrenadante de las muestras, conteniendo los linfocitos, se analizó en un citómetro de células Coulter Epics XL-MCL (Beckman-Coulter).

7.3.2.2 Interacción de micelas GM1/Ptx con plasma humano

Se incubaron micelas GM1/Ptx (20/1 mol/mol) con plasma humano a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por un periodo de tiempo comprendido entre 1 a 4 horas. Luego las muestras se analizaron mediante: 1- cromatografía de exclusión molecular realizada como se describió previamente [1], 2- electroforesis en SDS-PAGE y 3- cromatografía en capa delgada.

7.3.2.2.1 *Electroforesis en SDS-PAGE*

Se realizaron geles de poliacrilamida según el método de Laemmli utilizando el sistema Mini protean II (Bio-Rad). La electroforesis se realizó en condiciones desnaturalizantes. La concentración de acrilamida en el gel separador de las electroforesis con SDS (desnaturalizantes) fue del 12,5 % (p/v) y del 4 % (p/v) en el caso de los geles concentradores. Las muestras fueron diluidas en buffers de corrida convencionales (con 2 % (p/v) de 2-mercaptoetanol) y calentadas a 90 °C por 5 min. La migración electroforética se realizó en buffer de corrida Tris 0,1 M - Glicina 0,77 M pH 8,3 a 140 V durante 90 min. Se utilizaron marcadores de peso molecular (PM) de Bio-Rad y las proteínas fueron teñidas con Coomassie Brilliant Blue R-250. Se utilizó además un control de plasma.

7.3.2.2.2 *Cromatografía en capa delgada*

Para realizar la cromatografía en capa delgada se utilizó una placa cromatográfica de sílica gel inmersa verticalmente en un eluyente apolar, que consiste en una mezcla Cloroformo:Metanol:CaCl₂ (60:36:8). Se siembran las muestras y controles de plasma (dilución 1/10), y de GM1 y Ptx con 200 y 5 µg respectivamente. Luego, se revela la placa usando una mezcla de Ácido sulfúrico/Metanol.

7.3.2.3 *Procedimiento estándar para la preparación de micelas mixtas de GM1, Ptx y Alb*

Las soluciones madres de GM1 con una concentración de 250 mg.mL⁻¹, se prepararon en agua bidestilada 24 hs antes de su uso. Las soluciones fueron mantenidas a 4 - 8 °C por 24 hs. Luego se centrifugaron a 50.000 x g por 15 minutos y el sobrenadante fue filtrado por 0,22 µm. Las soluciones madres de Ptx a una concentración final de 50 mg.mL⁻¹ se agregaron lentamente y con agitación suave a las soluciones de micelas de GM1 generando complejos con una relación molar GM1/Ptx 20/1. Estas mezclas se incubaron a 4 °C por 24 hs y luego se dializaron por 24 hs a la misma temperatura para eliminar el solvente (DMSO) en el que estaba disuelto el fármaco. Luego, estas micelas (GM1/Ptx) se incubaron con Alb humana purificada por 24 horas en diferentes condiciones de pH (3, 5 y 7) y temperatura (4, 37 y 55 °C). La interacción fue estudiada por análisis cromatográficos como se menciona previamente [1] previa neutralización hasta pH 7.

7.3.2.4 *Determinación de la concentración de Ptx*

La determinación del Ptx se llevó a cabo como se mencionó anteriormente [1].

7.3.2.5 Determinación de la concentración de GM1

La concentración de GM1 fue medida por el método colorimétrico de resorcinol modificado [5] como se mencionó previamente [1].

7.3.2.6 Determinación de la concentración de Alb

El contenido de Albúmina unida a las micelas se determinó usando el ensayo de Bradford, basado en la unión del colorante azul brillante de Coomassie a la proteína en solución ácida o por absorbancia directa a 280 nm [6].

7.3.2.7 Estabilidad física de micelas GM1/Ptx/Alb

7.3.2.7.1 Ensayo de diálisis

Soluciones de micelas de GM1, GM1/Ptx y GM1/Ptx/Alb, con una concentración de GM1 de 250 mg.mL^{-1} , se dializaron por 72 hs usando membranas con un punto de corte de 14 kDa para asegurar la salida de los monómeros y la retención de las micelas durante el ensayo. Se tomaron alícuotas de ambos dializados a distintos tiempos: 0, 24, 48 y 72 hs en las que se determinó el contenido de GM1, Ptx y Alb como se mencionó previamente.

7.3.2.7.2 Estabilidad de las micelas mixtas en solución

Las micelas GM1/Ptx/Alb se almacenaron por 40 días a 4 °C. En distintos períodos de tiempo se tomaron alícuotas de las muestras en las que se determinó la cantidad de Ptx soluble por HPLC.

7.3.2.7.3 Efecto de ciclos de congelado-descongelado y de liofilización

Micelas GM1/Ptx/Alb fueron congeladas a -80 °C por 24 hs. Posteriormente se permitió que las muestras alcancen temperatura ambiente y fueron centrifugadas a $15.000 \times g$ por 10 min antes de medir las concentraciones de GM1, Ptx y Alb que permanecieron solubles.

Por otro lado, micelas GM1/Ptx/Alb fueron liofilizadas y luego se disolvieron en su volumen inicial con agua bidestilada, se filtraron a través de un poro de $0,22 \mu\text{m}$ para luego determinar la concentración de Alb, Ptx y GM1 solubles por los métodos descriptos previamente.

7.3.2.8 Caracterización estructural de micelas GM1/Ptx/Alb

7.3.2.8.1 Análisis cromatográfico

Las muestras problema y los controles fueron sometidos a una cromatografía de exclusión molecular en un sistema Akta Explorer 100 (GE Healthcare) equipado con una columna Superdex 200 como se mencionó en el capítulo 1.

Los niveles de gangliósido fueron cuantificados como se mencionó previamente.

7.3.2.8.2 Microscopía electrónica

La morfología de las micelas fue analizada usando un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1200 EX II a 250.000 aumentos como se mencionó previamente.

7.3.2.9 Estabilidad química del Ptx en micelas GM1/Ptx/Alb

Para evaluar el efecto del pH alcalino en la estabilidad del Ptx incorporado en las micelas de GM1/Ptx/Alb, se incubaron micelas GM1/Ptx/Alb a pH 10 usando un buffer Carbonato de Sodio 0,2 M de pH 10 a temperatura ambiente (25 ± 1 °C). Se tomaron alícuotas de las muestras en distintos periodos de tiempo y se determinó la cantidad de Ptx soluble por HPLC. Como control se utilizó una solución de Ptx en 50 % de etanol y 50 % agua bidestilada.

7.3.2.10 Detección de la captación celular de Ptx-fluorescente (Flu-tax) por microscopía de fluorescencia

Se cultivaron células NIH 3T3 a 37 °C y con un 5 % de CO₂ en medio MEM suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (GIBCO) y 2 mM de L-glutamina hasta un 70 % de confluencia. Luego se agregaron soluciones de Ptx y de micelas GM1/Ptx (20/1 mol/mol) y GM1/Ptx/Alb conteniendo un 1 % de paclitaxel fluorescente (Flu-tax) en MEM a una concentración final de Ptx de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y se incubaron con las mismas durante 15, 30 y 60 min a 37 °C.

Finalmente, las células se lavaron con PBS para remover el material soluble y el Flu-tax incorporado a las células fue analizado por microscopía de fluorescencia.

7.3.2.11 Efecto citotóxico de micelas GM1/Ptx/Alb sobre líneas celulares tumorales y no-tumorales in-vitro

Se cultivaron células HeLa, Hep2, Vero y MA a 37 °C y con un 5 % de CO₂ hasta un 90 % de confluencia en medio MEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino (NATOCOR, Córdoba, Argentina). Estas monocapas celulares se incubaron por 24 horas con concentraciones crecientes de GM1, Ptx y micelas GM1/Ptx (20/1 mol/mol) y GM1/Ptx/Alb. Finalmente se determinó la cantidad de células vivas mediante el ensayo MTT [7] y se estimaron los valores de IC₅₀ gráficamente de las curvas de dosis-respuesta.

7.4 Resultados

7.4.1 Interacción de micelas GM1/Ptx con componentes sanguíneos humanos

El propósito final de los sistemas de vehiculización de taxanos es su uso como vehículos para la administración parenteral, principalmente por vía endovenosa. Por ello, el paso siguiente de este trabajo de tesis consistió en estudiar las interacciones entre las micelas GM1/Ptx y los componentes de la sangre humana.

La incubación de las micelas GM1/Ptx con glóbulos rojos (GR) produjo una pequeña reducción del Ptx (10 %) en el sobrenadante de reacción que puede atribuirse a la asociación de las micelas con la membrana de los GR o a un atrapamiento de éstas en el sedimento de los GR. Por otro lado, no se detectó una hemólisis significativa (≤ 3 %) tras la incubación de los GR con 1,5 mg.mL⁻¹ de Ptx o con micelas GM1/Ptx.

En trabajos previos se ha demostrado que los gangliósidos no son capaces de inducir agregación plaquetaria, mientras que ejercen un rol inhibitorio en su activación por diferentes efectores [8]. Los resultados de nuestros ensayos concuerdan con estos estudios previos, ya que se observó que los complejos GM1/Ptx tampoco producen agregación plaquetaria.

Con el fin de evaluar en forma comparativa la interacción del Ptx, en solución de DMSO e incorporado en las micelas de GM1, con las células sanguíneas blancas, específicamente con los linfocitos; se incubaron ambas muestras con sangre entera durante 12 hs. Luego, se procedió a determinar la cantidad remanente de glicoproteínas de superficie CD3, CD4 y CD8 (estos dos últimos correspondientes a la diferenciación entre linfocitos T “helper” o auxiliares y citotóxicos respectivamente) mediante el uso de

citometría de flujo y de anticuerpos específicos. Como se muestra en la tabla 1, las micelas GM1/Ptx tuvieron un comportamiento muy similar al control de Ptx en DMSO, ya que ambas formulaciones indujeron una reducción de alrededor del 30 % en el número de linfocitos T CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺.

Tabla 1. Interacción de las micelas GM1/Ptx con linfocitos

	Linfocitos Remanentes (%)		
	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺
GM1	100	100	100
Ptx	73	80	70
GM1/Ptx	70	76	67

Cuando las micelas GM1/Ptx fueron incubadas con plasma humano a 37 °C y luego sometidas a una cromatografía de exclusión molecular, se observó una reducción marcada en el pico correspondiente a la albúmina sérica humana (Alb) mientras que el otro pico mayoritario del plasma, perteneciente a las inmunoglobulinas, permanece inalterado (Figura 1). Por otro lado, apareció un nuevo pico, que eluye con un radio hidrodinámico correspondiente con el de una proteína globular de 375 kDa (Figura 1). Este pico incrementó su tamaño en la medida en que aumentó el tiempo de incubación de las micelas GM1/Ptx con el plasma humano.

El análisis de las alícuotas de elución de la muestra de GM1/Ptx incubada con plasma por 4 hs a 37 °C por electroforesis SDS-PAGE muestra la presencia de la Alb en las alícuotas de elución 8, 9 y 10 correspondientes al nuevo pico de 375 kDa, así como en la alícuota de elución 13 que se corresponde con la Alb libre del plasma. Por otro lado, el análisis por cromatografía de capa fina reveló la presencia de Ptx y GM1 en el pico de 375 kDa (correspondiente a las alícuotas de elución 8, 9 y 10). Estos resultados demostraron que efectivamente existe una asociación física entre la Alb del plasma y las micelas GM1/Ptx (Figura 2).

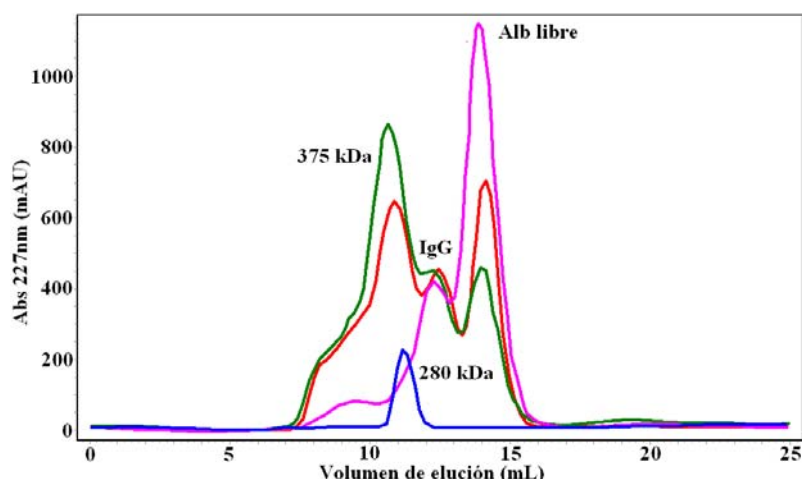


Figura 1. Patrones cromatográficos de micelas GMI/Ptx (■), plasma (■) y de complejos GMI/Ptx + plasma por 1 (■) y 4 horas (■) de incubación.

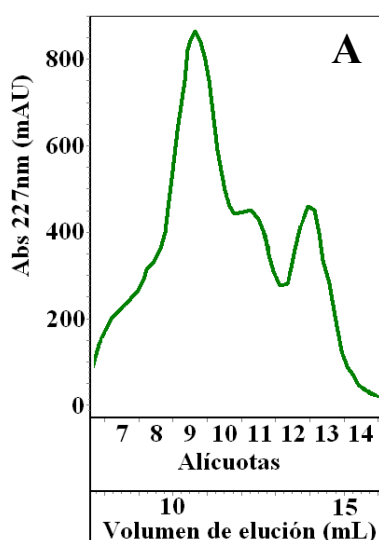
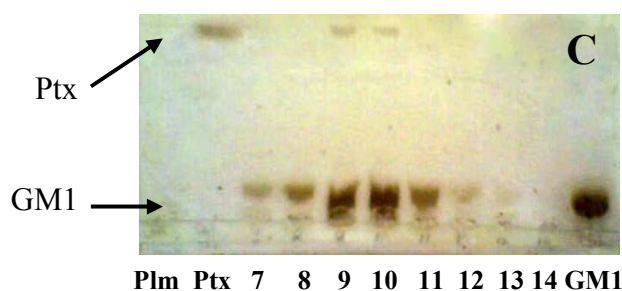
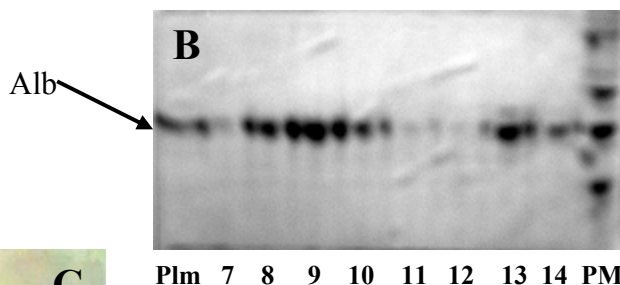


Figura 2. (A) Perfil cromatográfico, (B) Electroforesis en SDS-PAGE y (C) Cromatografía en capa fina, de las alícuotas de elución 7 a 14 de la muestra GMI/Ptx + plasma 4 hs a 37 °C. Se agregó un control de plasma (Plm), un marcador de peso molecular (PM), y controles de Paclitaxel (Ptx) y de GMI.



7.4.2 Caracterización de la interacción de micelas GMI/Ptx con Alb

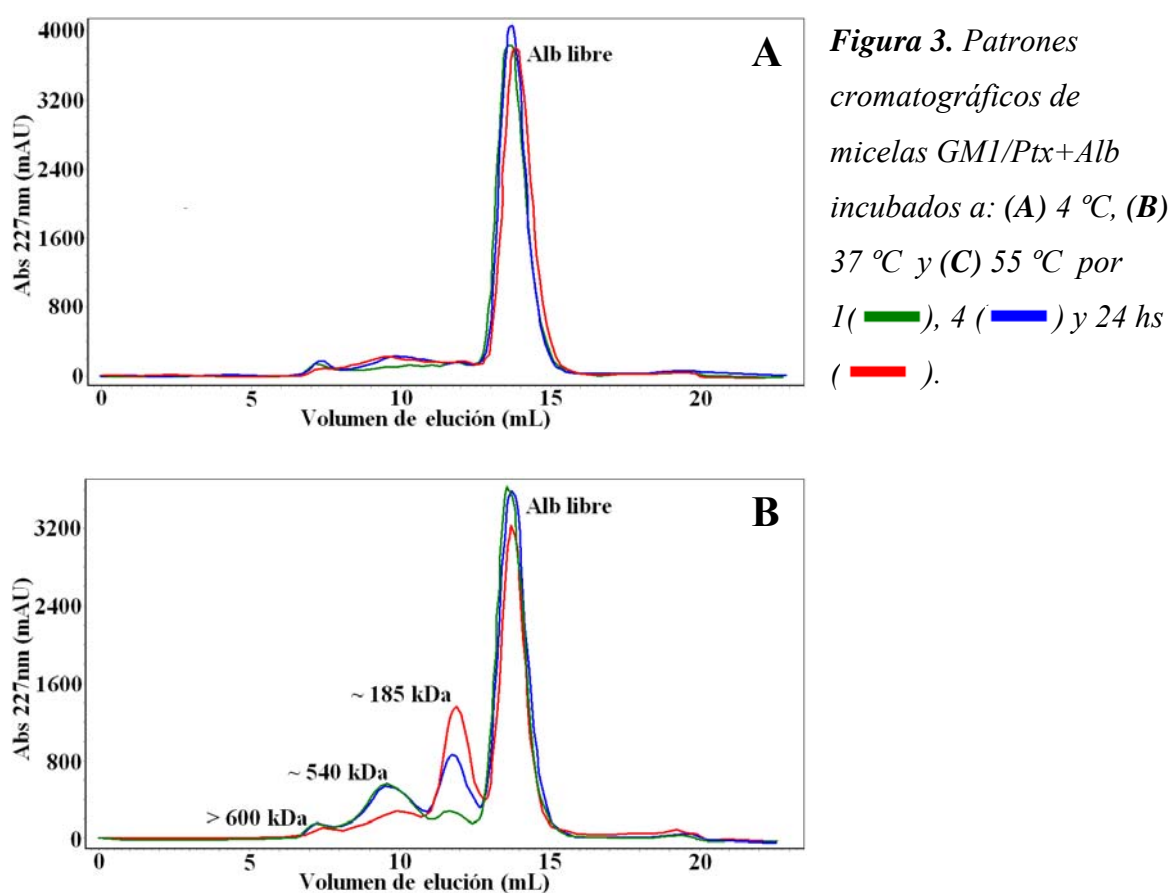
En los últimos años se han realizado varios intentos de formular los taxanos asociados a la albúmina (Alb) [9-11]. El fundamento de este enfoque se debe a que muchos tumores sobre-expresan receptores gp60 específicos para albúmina, que una vez activados,

podrían permitir el transporte de los complejos con albúmina a través de la pared de los vasos sanguíneos hacia el sitio del tumor [12]. De esta manera, se lograría disminuir la cantidad de fármaco que alcanza sitios inespecíficos del organismo, disminuyendo así los efectos secundarios no deseados y aumentando la eficacia de la dosis del fármaco administrado. En este aspecto, los resultados mencionados en el estudio previo claramente demuestran que las micelas de GM1 cargadas con Ptx interaccionan específicamente con la Alb luego de la incubación con plasma humano a 37 °C. A continuación, nuestros estudios se focalizaron en caracterizar la interacción que se produce entre las micelas GM1/Ptx con la Alb y que factores físico-químicos la condicionan.

Primero, se evaluó el efecto de la temperatura en la asociación de las micelas GM1/Ptx con Alb purificada usando la cromatografía de exclusión molecular. Cuando las micelas GM1/Ptx se incuban con Alb a 4 °C, se observa que sólo aparece el pico de elución correspondiente a la proteína en la corrida cromatográfica, lo que demuestra que en esta condición de temperatura no ocurre una interacción entre las micelas y la Alb, aún luego de 24 hs de incubación (Figura 3A). Por el contrario, la incubación a 37 °C mostró la presencia de tres picos de elución cuyo tamaño (≥ 600 , 540 y 185 kDa) depende del tiempo de incubación de las micelas con la proteína (Figura 3B). Se observó que el pico que se correlaciona con una proteína globular con un radio hidrodinámico de ~ 185 kDa incrementa a medida que aumenta el tiempo de incubación, mientras que proporcionalmente ocurre una reducción del pico de elución correspondiente a la Alb libre (Fig 3B). Este resultado demuestra que la interacción de las micelas GM1/Ptx con la Alb genera estructuras de carácter transitorio, inicialmente de tamaño grande y con menor cantidad de proteína unida; mientras que en la medida en que aumenta el tiempo de incubación las micelas se asocian con más cantidad proteína y generan estructuras más pequeñas y dinámicamente estabilizadas.

Cuando la interacción entre los complejos GM1/Ptx y Alb se llevó a cabo a 55 °C se puede observar que ocurre una rápida reducción del pico de elución correspondiente a la Alb libre con la concomitante aparición de un pico de elución nuevo con un radio hidrodinámico equivalente al de una proteína globular de ~ 140 kDa (Figura 3C). Estos resultados claramente ponen en evidencia que la temperatura es un factor que condiciona significativamente la interacción de los complejos GM1/Ptx con la Alb. (En el apéndice I se muestran los patrones cromatográficos de los controles de Alb purificada obtenidos en las tres condiciones de temperatura ensayadas)

Curiosamente, el patrón cromatográfico de las micelas GM1/Ptx preparadas a 55 °C muestra que el pico de elución de estas micelas a ~280 kDa que normalmente aparece a bajas temperaturas (4-8 °C), desaparece completamente con el aumento en la temperatura de preparación, observándose sólo el pico de elución correspondiente a los monómeros de GM1 (Fig 4). Este resultado sugiere que el calentamiento produce una desestabilización de las micelas muy marcada, aún en presencia del Ptx que previamente demostró ser un estabilizante de las micelas mixtas formadas a temperatura ambiente [1]. No obstante, cuando las micelas GM1/Ptx fueron calentadas a 55 °C y luego incubadas con la Alb, la asociación con esta proteína llevó a la formación de complejos ternarios GM1/Ptx/Alb estables que no se disocian con la cromatografía de exclusión molecular, indicando un desplazamiento del equilibrio micela-monómero hacia el estado micelar (Fig 4).



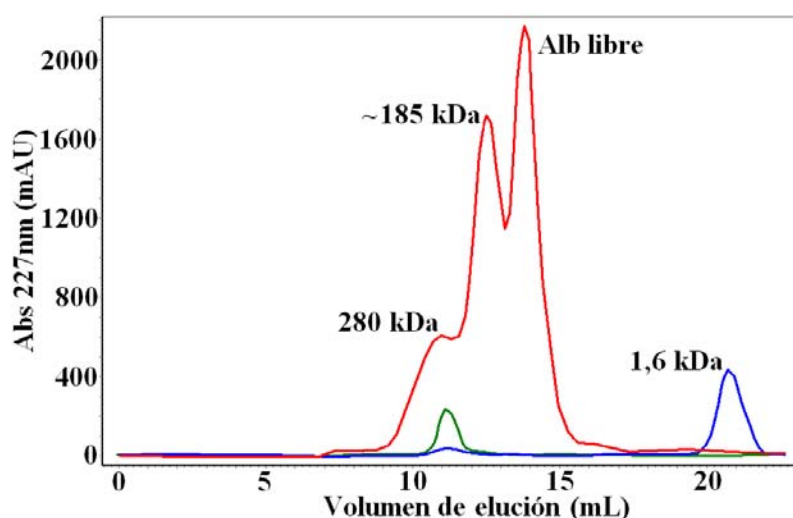
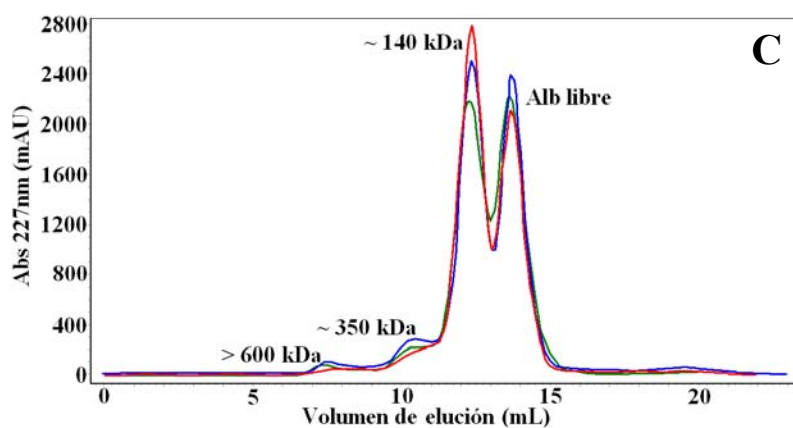


Figura 4. Patrones cromatográficos de micelas de GM1/Ptx a 4 °C (—), 55 °C (—), e incubadas con Alb a 55 °C por 1h (—).

Estudios adicionales mostraron que la presencia de una alta concentración salina (NaCl 0,5 M) no previno la interacción de las micelas GM1/Ptx con Alb, sugiriendo que la asociación no depende de interacciones de tipo electrostáticas sino que es dependiente de interacciones hidrofóbicas. Este resultado concuerda con estudios previos que demostraron que las micelas de GM1 unen albúmina a través de interacciones hidrofóbicas [13,14].

Es bien sabido que la albúmina sufre una desnaturalización reversible tras su incubación en medio ácido ($\text{pH} \leq 4,3$) o alcalino ($\text{pH} \geq 10$) que expone parte de sus residuos hidrofóbicos [15,16]. De acuerdo a esto, cuando se incubaron las micelas GM1/Ptx con Alb a pH 3 se observó que alrededor del 85 % de la Alb agregada (GM1/Alb 1/1 p/p) se asocia a las micelas (Fig 5); mientras que a pH 7 sólo un 35 % de la Alb agregada interactúa con éstas (Fig 3A). (En el apéndice II se muestran los patrones cromatográficos de los controles de Alb purificada obtenidos en las tres condiciones de pH ensayadas).

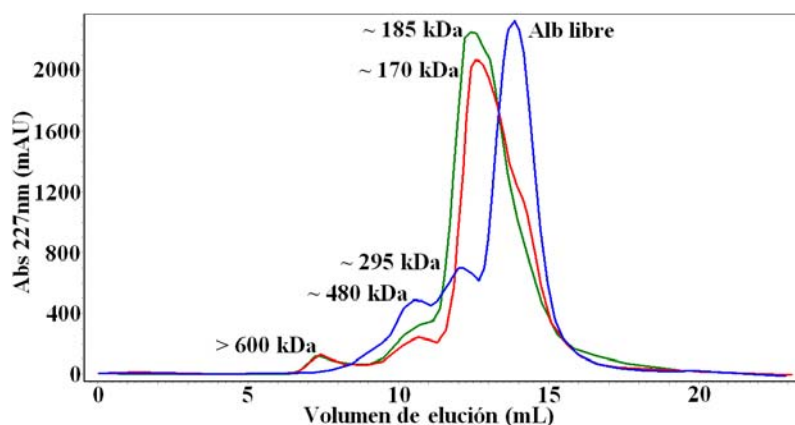


Figura 5. Patrones cromatográficos de micelas GM1/Ptx incubadas con Alb a pH 7 (■), 5 (■) y 3 (■) por 24 hs a 37 °C.

Cuando las micelas de GM1 se pre-incubaban con Alb a distintos pHs (3, 5 y 7) antes de la incorporación del Ptx, se observó que la cantidad de Ptx que puede ser cargada en la micela se reduce considerablemente, principalmente a pH ácido, sugiriendo que la unión de la proteína podría introducir un cambio conformacional en la micela o un impedimento estérico que afecta a la posterior entrada del fármaco (Tabla 2).

Tabla 2. Interacción de Ptx con micelas de GM1 y con micelas de GM1 previamente incubadas con Alb en distintas condiciones de pH (3, 5 y 7).

pH	Ptx Soluble (%)	
	GM1/Ptx	GM1/Alb/Ptx
3	96	54
5	94	20
7	94	76

Estos resultados demostraron que la mejor condición para la incorporación simultánea de Ptx y Alb en las micelas de GM1 ocurre cuando las micelas se cargan primero con Ptx y luego se incuban con Alb a pH 3 (Fig 5). Por consiguiente, para evidenciar cuando se alcanza el nivel de saturación de la micela, se incubaron los complejos GM1/Ptx (20/1 mol/mol) con cantidades crecientes de Alb (Fig 6). Estos estudios revelaron que la micela alcanza su saturación en una relación GM1/Alb 1/1 (p/p).

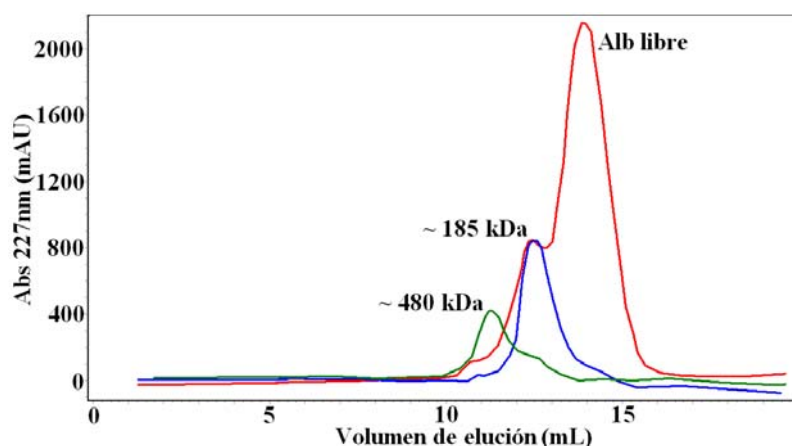


Figura 6. Patrones cromatográficos de micelas GM1/Ptx incubadas con cantidades crecientes de Alb a pH3 y 37 °C por 24 hs formando relaciones en masa GM1/Alb: 2/1 (—), 1/1 (—) y 1/4 (—).

7.4.3 Estabilidad física de las micelas mixtas GM1/Ptx/Alb

Mencionamos previamente que el uso de micelas como vehículos transportadores de fármacos es su baja estabilidad con la dilución, que ha sido principalmente asociada con altos valores de CMC y un rápido equilibrio entre la forma monomérica y la micelar [17-19].

En este aspecto, recientemente se demostró que la incorporación de Ptx en las micelas de GM1 produce una estabilización de su estructura. Considerando que la reducción de GM1 después de la diálisis de las micelas puras fue de 24 %, una diálisis extensiva de los complejos GM1/Ptx mostró sólo una reducción del 5 % de GM1 [1]. Cuando la Alb se une a los complejos GM1/Ptx, la reducción en la cantidad de GM1 fue sólo de un 6 % luego de una diálisis de 72 horas, indicando que estas nuevas micelas mixtas son también muy estables (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de la diálisis exhaustiva en la estabilidad de micelas de GM1 y complejos GM1/Ptx y GM1/Ptx/Alb.

Dialisis (hs)	GM1 Remanente (%)		
	Micelas GM1	Micelas GM1/Ptx	Micelas GM1/Ptx/Alb
0	100	100	100
24	98	97	96
48	96	96	95
72	76	95	94

Aunque los resultados de los experimentos de diálisis sugieren que las micelas tienen una alta estabilidad acuosa, también se realizaron estudios para determinar la estabilidad de estos complejos GM1/Ptx/Alb en solución acuosa por distintos periodos de tiempo. Se observó que la cantidad de Ptx que permanece soluble no se ve afectada cuando las micelas se almacenaron por al menos 40 días a 4 °C. Resultado que demuestra que la estabilidad de estas micelas asociadas a Alb es muy superior a la de la formulación análoga Ptx-Alb (Abraxane) cuya estabilidad en solución acuosa es de solo 8 horas.

Además, al menos el 95 % de las micelas GM1/Ptx/Alb se re-solubilizó luego de ciclos de congelado-descongelado y de liofilización-solubilización; demostrando que estos complejos micelares pueden ser almacenados en estado sólido sin perder sus propiedades físico-químicas.

7.4.4 Estabilidad química del Ptx en micelas GM1/Ptx/Alb

Estudios previos sugieren que el Ptx se localiza en el núcleo hidrofóbico de las micelas de GM1 [1]. Además se observó que el Ptx incorporado en la micela no tiene contacto con el medio circundante ya que resultó protegido contra la hidrólisis de su unión éster cuando las micelas se incubaron en pH alcalino.

Con el objeto de profundizar en la caracterización de las propiedades de estos complejos, se estudió si la unión de Alb a la micela podría afectar su habilidad para proteger al Ptx de su hidrólisis alcalina. La figura 7 muestra que cuando el Ptx se encuentra en estado libre, más del 90 % se hidroliza en 5 horas a pH 10; mientras que no se observa degradación del Ptx cuando éste se encuentra asociado a las micelas de GM1. Para el caso de las micelas GM1/Ptx/Alb se observa que aproximadamente el 50 % de la droga se hidroliza en el mismo período de tiempo. Este resultado sugiere que estas nuevas estructuras con albúmina unida se encuentran bastante menos compactadas dejando al Ptx más expuesto al ambiente acuoso externo.

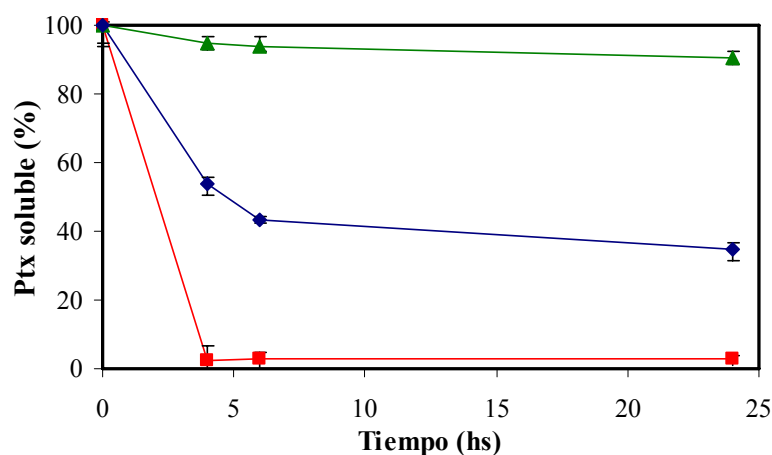


Figura 7. Efecto del pH 10 en la estabilidad del Ptx en solución (■) e incorporado en los complejos GM1/Ptx (▲) y GM1/Ptx/Alb (◆). Las barras de error indican la DS de la media ($n = 3$).

A continuación, para seguir con la caracterización estructural de estos complejos, se utilizó la microscopía electrónica de transmisión para evaluar la forma y tamaño de las micelas de GM1Ptx/Alb.

Nuestros estudios mostraron que las micelas de GM1 presentan dos poblaciones de diferente tamaño, una con un diámetro promedio de 9-10 nm y otra con 27-28 nm. Por otra parte, hemos demostrado que la incorporación del Ptx produce un desplazamiento hacia una única población micelar de 9-12 nm [1].

La figura 8 muestra que los complejos GM1/Ptx/Alb existen en una sola población micelar con un diámetro promedio de 19-24 nm.

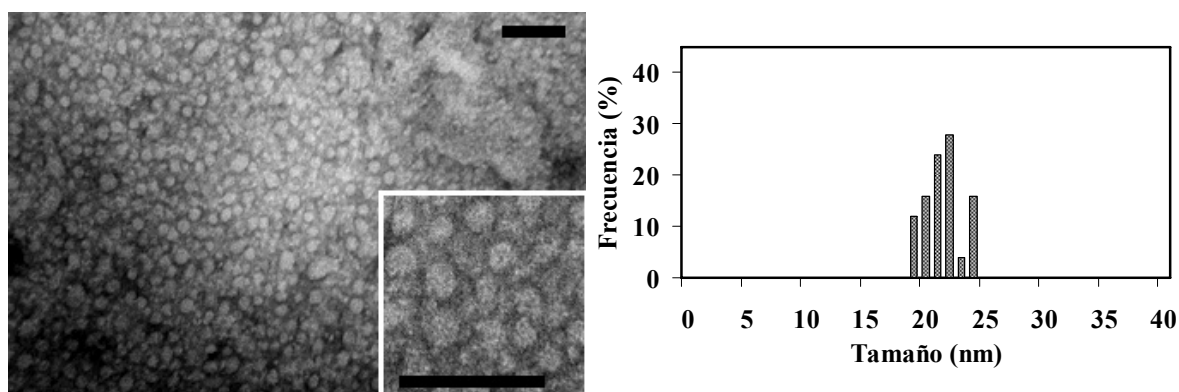


Figura 8. Microscopía electrónica e histograma de frecuencia de micelas de GM1/Ptx/Alb. El tamaño de barra es de 100 nm.

7.4.5 Análisis “in-vitro” de la captación celular y actividad biológica del Ptx incorporado en micelas de GM1

En el capítulo anterior, se demostró que el Ptx vehiculizado en micelas GM1/Ptx posee un efecto citotóxico muy similar al producido por el Ptx libre en solución de DMSO [1]. Este resultado implica que las micelas de GM1 son capaces de transportar y de liberar el Ptx de forma semejante a lo que ocurre con la droga libre

En este estudio, nuestro interés fue evaluar si la interacción de la Alb con las micelas GM1/Ptx produce una alteración en la liberación del fármaco desde la micela, su captación celular y su posterior efecto *in-vitro*.

Para evaluar la captación celular se usó un derivado fluorescente del Ptx (Flu-tax). Como se muestra en la figura 9, el perfil cinético de liberación del Ptx desde las micelas GM1/Ptx/Alb a una línea celular de fibroblastos fue muy similar al perfil obtenido para las micelas GM1/Ptx sin albúmina unida y para el control de Ptx en solución de DMSO.

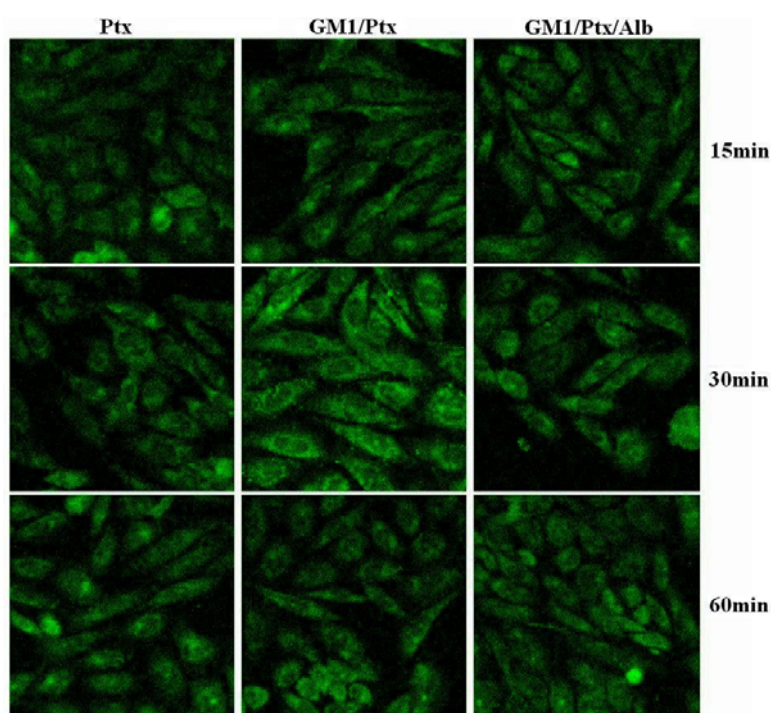


Figura 9. Captación celular de Ptx partir de una solución en DMSO, y desde micelas GM1/Ptx y GM1/Ptx/Alb a los 15, 30 y 60 min de incubación.

Además se estudió la actividad citotóxica del paclitaxel incorporado en micelas GM1/Ptx y GM1/Ptx/Alb sobre células de origen tumoral (Hep-2 y HeLa) y no-tumoral (Vero y MA) y se comparó con la producida por un control de Ptx libre en solución de DMSO.

La figura 10 muestra el efecto citotóxico del Ptx sobre células Vero (A) y Hep-2 (B). Estos resultados no mostraron diferencias significativas entre los valores de IC50 obtenidos por las micelas GM1/Ptx y GM1/Ptx/Alb en relación al control. Además los resultados obtenidos para células MA y HeLa fueron similares a aquellos obtenidos para Vero y Hep-2 respectivamente.

Por otro lado, las micelas de GM1 prácticamente no produjeron actividad citotóxica.

Estos resultados claramente indican que, a pesar de la asociación con albúmina, el Ptx puede ser liberado desde las micelas de gangliósido y entrar en las células en donde se une al citoesqueleto bloqueando la actividad mitótica.

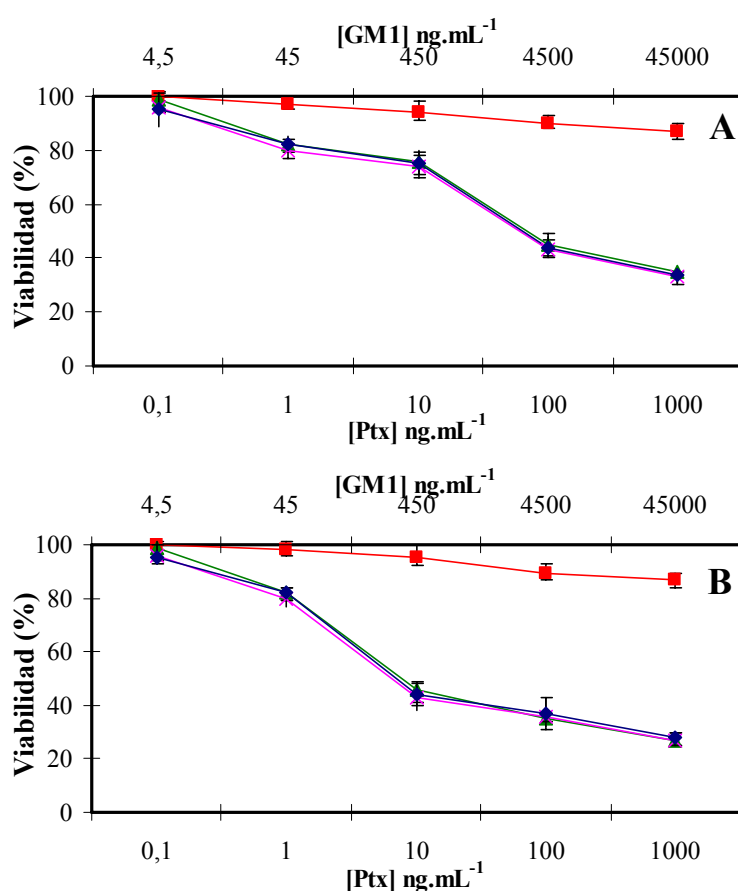


Figura 10. Efecto citotóxico *in vitro* de GM1 (—■—), Ptx (—▲—), GM1/Ptx (—×—) y GM1/Ptx/Alb (—◆—) sobre células: (A) Vero y (B) Hep-2. Las barras de error indican la DS de la media ($n = 3$).

7.5 Discusión

En los estudios previos, presentados en el primer capítulo de este trabajo de tesis, se muestra que las micelas de gangliósidos son capaces de incorporar espontáneamente fármacos oncológicos hidrofóbicos como los taxanos en medio acuoso sin ningún procedimiento complejo. Particularmente, las micelas de GM1 incrementaron la

solubilidad acuosa del Ptx, desde aproximadamente $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $6 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; logrando una concentración muy similar a la presente en las formulaciones aprobadas comercialmente de Ptx (Taxol® and Abraxane®).

Teniendo en cuenta que la vía principal de administración de los taxanos es la endovenosa, resultó de gran interés estudiar la potencial interacción de estos complejos micelares GM1/Ptx con los distintos componentes sanguíneos humanos.

Los resultados descritos en el presente capítulo muestran que tras la interacción con sangre humana, las micelas GM1/Ptx no interaccionan prácticamente con los glóbulos rojos humanos. Este comportamiento de las micelas de GM1, puede ser explicado por el hecho de que estas micelas poseen, a pH fisiológico, una marcada carga superficial negativa que es producto de la gran cantidad de moléculas de ácido siálico presentes en la estructura ($\text{pK}_a \sim 2,6$). Esta característica, relacionada con la carga superficial negativa de los GR, impediría que ambas estructuras se fusionen o adhieran. Por otra parte, los complejos GM1/Ptx tampoco presentaron interacción con las plaquetas, ya que no se observó ningún efecto sobre la agregación plaquetaria. Estos resultados en conjunto sugieren que la incorporación del Ptx en las micelas de GM1 podría favorecer a una prolongada circulación del fármaco, en forma de complejos GM1/Ptx, en el torrente sanguíneo mejorando así la posibilidad de acceder al tumor para ejercer su acción.

Respecto a la interacción de los complejos GM1/Ptx con los otros tipos celulares presentes en sangre, específicamente con los linfocitos, se observó que dicha interacción produce una reducción de alrededor de un 30 % de las distintas poblaciones linfocitarias (CD4^+ y CD8^+). Considerando que el Ptx en solución produce efectos similares, esta disminución en la población de linfocitos podría atribuirse sólo al efecto producido por el fármaco; sugiriendo que el vehículo (micela de GM1) tendría poca o ninguna relevancia en este mecanismo.

Además, en este capítulo se demostró que los complejos micelares GM1/Ptx son capaces de interactuar espontánea y selectivamente con la albúmina humana, originando complejos ternarios GM1/Ptx/Alb. Por lo tanto, se procedió a estudiar en detalle la interacción de estas micelas cargadas, con la albúmina sérica humana, una molécula transportadora que podría mejorar la acumulación del fármaco en el sitio del tumor.

Se observó que la asociación de la Alb con las micelas GM1/Ptx no se ve alterada por la presencia de altas concentraciones salinas, sugiriendo que la interacción es de naturaleza hidrofóbica. Sin embargo la misma resultó ser altamente dependiente de condiciones como la temperatura y el pH.

En este aspecto se evidenció que la interacción de la Alb con las micelas se vuelve más favorable a medida que aumenta la temperatura, siendo mayor cuando se alcanzan los 55 °C. Considerando que previamente se demostró que las micelas sufren ciertos cambios estructurales con el aumento de la temperatura, que producen una deshidratación de los grupos polares y en consecuencia un aumento de la hidrofobicidad del sistema [1], estos resultados refuerzan la existencia de una interacción fuertemente hidrofóbica entre las micelas y la proteína.

Por otra parte, la molécula de albúmina demostró tener una función estabilizadora de la estructura micelar, evitando el desplazamiento del equilibrio micela-monómero hacia el estado monomérico observado con el calentamiento de éstas a 55 °C (Figura 4).

Cuando se evaluó el efecto del pH en la interacción de los complejos GM1/Ptx con la Alb, se observó que a pH 3, condición en la cual la albúmina se encuentra en un estado de “desnaturalización reversible” exponiendo parte de sus residuos hidrofóbicos, se obtienen complejos micelares ternarios con un radio hidrodinámico equivalente al de una proteína globular de 185 kDa y con una cantidad de albúmina unida equivalente a un 85 % de la masa total del GM1, resultado a partir del cual se supone que, en estas condiciones, alrededor de 3 moléculas de albúmina podrían estar asociadas por cada micela GM1/Ptx. Estos resultados nuevamente refuerzan el carácter fuertemente hidrofóbico de la interacción entre las micelas y la albúmina.

Además de que la asociación con albúmina incrementa el tamaño de las micelas GM1/Ptx (Fig 8), resulta importante destacar que esta interacción produce una disminución, de alrededor de un 50 %, en la capacidad que tiene la micela de GM1 para proteger al Ptx de su hidrólisis alcalina. Esto significa que luego de la asociación con Alb ocurren ciertos cambios estructurales en la micela que dejan a la droga más expuesta al ambiente acuoso externo.

Finalmente, se observó que la unión de la Alb a la micela GM1/Ptx no produce una alteración en lo que respecta a la liberación y posterior captación celular del Ptx. En este aspecto, los estudios *in-vitro* mostraron que los complejos GM1/Ptx/Alb interactúan y liberan su contenido en células de origen no-tumoral (Vero y MA) y tumoral (Hep-2 y HeLa) de forma semejante a lo que ocurre con el control del fármaco puro. Los valores de IC50 obtenidos luego de 24 horas de incubación fueron de 90 y 95 ng.mL⁻¹ para células Vero y MA y de 8 y 9 ng.mL⁻¹ para células Hep-2 y HeLa. Resulta importante también resaltar que estos valores de IC50 son muy similares a aquellos obtenidos con otros sistemas de liberación de taxanos [20-22]. Paralelamente, los ensayos de fluorescencia

mostraron que no existen diferencias cinéticas en la incorporación del Ptx en las células desde las distintas formulaciones y que la misma comienza a tiempos muy cortos luego de la exposición (15 min).

7.6 Conclusiones

Los resultados obtenidos en este capítulo brindaron conocimientos fundamentales respecto al potencial uso de estos complejos nanomicelares auto-ensamblados como un sistema de administración endovenoso de taxanos. Además, se demostró la capacidad que tiene este nuevo sistema para asociarse a la albúmina humana; lo que podría resultar en una nueva estrategia para facilitar la acumulación del fármaco vehiculizado en el sitio del tumor [23]. En resumen, los resultados descriptos en este capítulo nos permiten concluir que:

- Los complejos GM1/Ptx no interaccionan con los GR y por lo tanto no produjeron hemólisis; tampoco interaccionan con las plaquetas, ya que no se produjo la agregación plaquetaria; sin embargo, si pueden interaccionar con los linfocitos, en los cuales indujeron una reducción de un 30 % en su población, al igual que el Ptx libre en solución de DMSO.
- Soluciones acuosas de micelas GM1/Ptx son capaces de interaccionar espontáneamente con albúmina sin la necesidad de usar una homogeneización a alta presión como lo requiere la formulación del Abraxane®.
- La interacción de la Alb y los complejos GM1/Ptx es principalmente de naturaleza hidrofóbica ya que se demostró que ésta se potencia cuando la albúmina se incuba a pH 3 o a 55 °C. Además, la presencia de NaCl hasta 0,5 M no previno la interacción.
- La mayor sensibilidad del Ptx a la hidrólisis alcalina sugiere que la presencia de albúmina en las micelas GM1/Ptx/Alb produce cambios en la estructura, haciendo que la misma resulte más permeable al medio acuoso respecto a aquellas micelas sin albúmina unida.
- Las micelas GM1/Ptx/Alb son estables en solución acuosa al menos durante 40 días cuando se las mantiene refrigeradas a 4-8 °C.
- Los complejos GM1/Ptx/Alb son estables tras la dilución y procesos de congelado-descongelado y de liofilización.

- La unión de la Alb a las micelas GM1/Ptx no afecta la liberación, captación y efecto biológico del Ptx en cultivos celulares.

7.7 Bibliografía

- [1] Leonhard V, Alasino RV, Bianco ID, Beltramo DM (2012) Self-assembled micelles of gangliosides as nanodelivery vehicles of taxanes. *J Control Release*, 162 (3) 619-627.
- [2] D. D. LasicDD, Martin FJ (1995) *Stealth Liposomes*, CRC, Boca Ratón, Florida.
- [3] Torchilin VP, Trubetskoy VS (1995). Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating? *Adv Drug Deliv Rev*, 16: 141-155.
- [4] Gref R, Minamitake Y, Peracchia MT, et al. (1994) Biodegradable longcirculating polymeric nanospheres. *Science*, 263: 1600 -1603.
- [5] Miettinen T, Takki-Luukkainen IT (1959) Use of butyl acetate in determination of sialic acid. *Acta Chem Scand*, 13: 856-858.
- [6] Garro AG, Beltramo DM, Alasino RV, Leonhard V, Heredia V, et al. (2011) Reversible exposure of hydrophobic residues on albumin as a novel strategy for the formulation of nanodelivery vehicles of taxanes. *Int. J. Nanomedicine*, 6: 1193-1200.
- [7] Green LM, Reade JL, Ware CF (1984) Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of citotoxic and growth lymphokines. *J Immunol Methods*, 70: 257-268).
- [8] Guglielmone HA, Daniele JJ, Bianco ID, Fernandez EJ, Fidelio GD (2000) Inhibition of Human Platelet Aggregation by Gangliosides. *Thrombosis Res*, 98 (1) 51-57.
- [9] Desai NP, Tao C, Yang A, Louie L, Yao Z, et al. Inventors (2004) American BioScience Inc., assignee, Protein stabilized pharmacologically active agents, methods for the preparation thereof and methods for the use thereof. United States Patent 6749868 June.
- [10] Paál K, Shkarupin A, Beckford L (2007) Paclitaxel binding to human serum albumin - Automated docking studies. *Bioorg Med Chem*, 15: 1323-1329.

-
- [11] Bertucci C, Cimitan S, Riva A, Morazzoni P (2006) Binding studies of taxanes to human serum albumin by bioaffinity chromatography and circular dichroism. *J Pharm Biomed Analysis*, 42: 81-87.
- [12] Fukunaga-Kalabis M, Herlyn M (2007) Unraveling mysteries of the multifunctional protein SPARC. *J Invest Dermatol*, 127: 2497-2498.
- [13] Tomasi M, Roda LG, Ausiello C, D'Agnolo G, Venerando B (1980) Interaction of GMI ganglioside with bovine serum albumin: formation and isolation of multiple complexes. *Eur J Biochem*, 111 (2) 315-24.
- [14] Venerando B, Roberti S, Sonnino S, Fiorilli A, Tettamanti G (1982) Interactions of ganglioside GM1 with human and fetal calf sera. Formation of ganglioside-serum albumin complexes. *Biochim Biophys Acta*, 692 (1) 18-26.
- [15] El Kadi N, Taulier N, Le Huérou JY, Gindre M, Urbach W, et al. (2006) Unfolding and refolding of bovine serum albumin at acid pH: ultrasound and structural studies. *Biophys J*, 91 (9) 3397-3404.
- [16] Dockal M, Carter DC, Rüker F (2000) Conformational transitions of the three recombinant domains of human serum albumin depending on pH. *J Biol Chem*, 275: 3042-3050.
- [17] Torchilin VP (2007) Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. *Pharm Res*, 24: 1-16.
- [18] Gaucher G, Dufresne MH, Sant VP, Kang N, Maysinger D, et al. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *J Control Release*, 109: 169-188.
- [19] Lukyanov AN, Torchilin VP (2004) Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs. *Adv Drug Deliv Rev*, 56: 1273-1289.
- [20] Wang J, Mongayt D, Torchilin VP (2005) Polymeric Micelles for Delivery of Poorly Soluble Drugs: Preparation and Anticancer Activity In Vitro of Paclitaxel Incorporated into Mixed Micelles Based on Poly(ethylene Glycol)-Lipid Conjugate and Positively Charged Lipids. *J Drug Target*, 13 (1) 73-80.
- [21] Danhier F, Magotteaux N, Ucakar B, Lecouturier N, Brewster M (2009) Novel self-assembling PEG-p-(CL-co-TMC) polymeric micelles as safe and effective delivery system for Paclitaxel. *Eur J Pharm Biopharm*, 73: 230-238.

- [22] Liebmann JE, Cook JA, Lipschultz C, Teague D, Fisher J, et al (1993) Cytotoxic studies of paclitaxel (Taxol®) in human tumour cell lines. *Br J Cancer*, 68: 1104-1109.
- [23] Leonhard V, Beltramo DM, Alasino RV, Bianco ID (2011) Water-soluble pharmaceutical composition comprising at least one therapeutically active substance having hydrophobic properties and at least one compound selected from among sialoglycosphingolipids, glycosphingolipids or a mixture of sialoglycosphingolipids and glycosphingolipids. WO 2011/113981 A1.

8. CAPÍTULO 3

Micelas auto-ensambladas de GM1 como nanovehículos de Doxorrubicina

8.1 Resumen

En los estudios previos de este trabajo de tesis se demostró que moléculas fuertemente hidrofóbicas como los taxanos (Paclitaxel y Docetaxel) pueden ser incorporados en micelas de monosialogangliósido GM1 de manera espontánea, originando formulaciones estables, solubles en agua, que podrían ser utilizadas como una nueva estrategia para administrar fármacos en tratamientos contra el cáncer [1]. También se describió la interacción hidrofóbica de estos complejos micelares GM1/Ptx con la albúmina sérica humana (Alb), como una estrategia que podría mejorar la acumulación del fármaco en el sitio del tumor [2].

En este capítulo se demuestra que la Doxorubicina (DOX), una antraciclina que actúa como un potente fármaco anticanceroso y que posee una polaridad mayor que el Ptx, también puede ser incorporada en micelas de GM1 generando complejos con tamaños de 27 a 33 nm y radios hidrodinámicos de alrededor de 400 kDa. A su vez, estos complejos GM1/DOX también son capaces de interactuar posteriormente con Alb. En la condición experimental ensayada, la cantidad de Alb que se une a la micela depende en gran medida de la cantidad de DOX incorporada en la misma, lo que sugiere que la proteína puede estar ocupando parcialmente los mismos dominios que el fármaco.

Los estudios demostraron que la molécula de DOX resulta ser más susceptible a la hidrólisis por incubación en pH alcalino, a diferencia de lo que ocurría con el Ptx, lo que sugiere que la DOX podría tener una localización más superficial en la micela.

También se demostró que estas micelas mixtas GM1/DOX resultan ser estables en solución durante al menos 60 días y frente a los tratamientos de congelación-descongelación o ciclos de liofilización-solubilización.

Los resultados de los ensayos *in-vitro* mostraron que la DOX incorporada en las nanoestructuras micelares puede ser captada por los cultivos de células y produce efectos citotóxicos similares a aquellos producidos por el fármaco libre.

8.2 Introducción

La doxorubicina (DOX) es un antibiótico antraciclina que actúa además como fármaco oncológico ya que afecta la actividad de la Topoisomerasa II y porque se intercala en la doble hebra del ADN afectando fuertemente la división celular. Actualmente se la

considera como la primera línea para el tratamiento de cáncer de mama, tumores sólidos infantiles, sarcomas de tejidos blandos y linfomas agresivos [3-6].

Como se ha mencionado previamente, la gran mayoría de los fármacos anticancerígenos presentan ciertos problemas particulares principalmente debido a la relativa falta de especificidad de su distribución sistémica y a los efectos secundarios posteriores producidos por el fármaco al atacar tanto a las células diana como a los tejidos sanos. Además, su farmacocinética implica la administración de altas dosis de droga y un esquema riguroso para alcanzar el efecto terapéutico deseado.

La DOX no está exenta de esta problemática ya que su uso se encuentra limitado por una significativa cardiotoxicidad, neurotoxicidad, hepatotoxicidad y también por su corto tiempo de vida media en circulación. Estas dificultades asociadas a la DOX libre han llevado a los investigadores a desarrollar múltiples estrategias para incorporar este fármaco en diferentes tipos de nanotransportadores [7-9].

La DOX es una base anfipática débil con un pKa de 8,3, propiedad que ha permitido su incorporación en el interior acuoso de vesículas preformadas mediante la aplicación de gradientes iónicos o de pH a través de la bicapa de los liposomas o polimersomas.

Previamente se ha mencionado que existen dos formulaciones liposomales de DOX actualmente en el mercado con el objetivo de reducir la cardiotoxicidad y mantener la eficacia antitumoral del fármaco: Doxil® y Myocet®. En la primera se emplea un gradiente de sulfato de amonio para encapsular al fármaco (como DOX-HCl) en liposomas “pegilados”; mientras que en la segunda los liposomas que se emplean para incorporar la DOX no poseen la cubierta de PEG. En ambos casos se logran encapsular hasta 2 mg.mL⁻¹ del fármaco.

A pesar que la encapsulación en liposomas ha reducido considerablemente la cardiotoxicidad asociada con el uso prolongado del fármaco manteniendo su eficacia antitumoral; estas formulaciones no han eliminado completamente los efectos adversos asociados al tratamiento quimioterapéutico, además requieren procesos de elaboración largos, complejos y costosos.

Como puede verse, sigue existiendo una gran problemática respecto a la formulación de DOX, por lo que se continúan buscando activamente formulaciones alternativas a las liposomales que logren disminuir los efectos nocivos del fármaco pero mantener su eficiencia antitumoral. Es por ello que elegimos a la Doxorubicina como fármaco anfipático modelo para caracterizar sus interacciones con las moléculas

hidrotrópicas de GM1, que utilizamos previamente para incorporar drogas hidrofóbicas como los taxanos, con la idea que los resultados obtenidos puedan contribuir al desarrollo de nuevas estrategias para vehicular fármacos, en este caso hidrofílicos, en medio acuoso.

El objetivo principal de este estudio fue entonces evaluar la capacidad de las micelas de GM1 para cargar un fármaco citotóxico antitumoral soluble en agua, como es la doxorubicina (DOX).

Los resultados obtenidos demuestran que: 1- las micelas formadas por GM1 son capaces de incorporar fármacos anticancerígenos anfipáticos como DOX, 2- la molécula de DOX parece localizarse en un nanodominio diferente y más externo que el del Ptx, 3- la presencia de DOX en las micelas de GM1 regula la posterior interacción con la albúmina y 4- la interacción con la albúmina para formar los complejos ternarios GM1/DOX/Alb aparece también, al igual que para el Ptx, como una estrategia que podría mejorar la acumulación del fármaco en el sitio del tumor disminuyendo así la toxicidad en tejidos sanos.

8.3 Materiales y métodos

8.3.1 Materiales

8.3.1.1 Reactivos

- El monosialogangliósido GM1 purificado de cerebro bovino como sal de sodio, fue un obsequio de TRB Pharma S.A. Las soluciones madres de GM1 se prepararon disolviendo los gangliósidos en agua bidestilada a una concentración final de $250 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.
- La Doxorubicina-HCl (DOX) fue un obsequio del laboratorio ELEA SA Argentina.
- La albúmina sérica humana purificada (Alb) al 20 % (p/v) con Caprilato de Sodio (0,04 M) y N-acetilriptofano (0,04 M) usados como estabilizadores, fue un obsequio del Laboratorio de Hemoderivados, Universidad Nacional de Córdoba (Córdoba, Argentina). Para remover los excipientes la albúmina se dializó frente a agua destilada o solución salina y se diluyó con agua destilada no pirogénica hasta la concentración final usada en cada ensayo.
- Todos los demás productos químicos utilizados fueron de grado analítico.

8.3.1.2 Líneas celulares

Los ensayos de citotoxicidad y de captación celular se realizaron utilizando las líneas celulares continuas mencionadas en el capítulo 1.

8.3.2 Métodos

8.3.2.1 Procedimiento estándar para la preparación de micelas mixtas de GM1 y Doxorubicina (DOX)

Las soluciones madres de GM1, con una concentración de 250 mg.mL^{-1} , se prepararon en agua bidestilada 24 hs antes de su uso. Estas fueron mantenidas a $4 - 8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 hs. Luego se centrifugaron a $50.000 \times g$ por 15 minutos y el sobrenadante fue filtrado por $0,22 \text{ }\mu\text{m}$.

Las soluciones madres de DOX, con una concentración de 24 mg.mL^{-1} se prepararon en NaCl 145 mM. Estas se agregaron lentamente a la solución de GM1 generando complejos GM1/DOX de distintas relaciones molares: 15/1; 10/1; 5/1; 2,5/1; 1/1. Estas mezclas se incubaron a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 hs y luego se dializaron frente a agua bidestilada por aproximadamente 24 hs a la misma temperatura, hasta que los niveles de DOX en el permeado fueran menores al límite de detección de la técnica de medición.

Cuando se evaluó el efecto del pH en la carga de DOX en las micelas de GM1, la solución madre de GM1 fue llevada a pH 2, 5 y 7 usando buffers Glicina-HCl, Acetato de Sodio y Fosfato de Sodio respectivamente, todos a una concentración de 50 mM. Luego esta solución se mezcló con cantidades crecientes de DOX para alcanzar relaciones molares GM1/DOX de 10/1 a 1/1. La incorporación del fármaco fue realizada en estas condiciones de pH por 24 hs a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Luego del tiempo de incubación, las muestras se dializaron por 24 hs a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ frente a agua bidestilada para separar la DOX soluble no incorporada en las micelas y retirar el buffer usado para volver las muestras a $\text{pH} \sim 6$.

Cuando se evaluó el efecto de la temperatura en la capacidad de las micelas de GM1 para cargar DOX, la solución madre de GM1 fue incubada durante 30 minutos a 4, 37 y $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Luego esta solución se mezcló con cantidades crecientes de DOX para alcanzar relaciones molares GM1/DOX de 10/1 a 1/1. La incorporación de la droga fue realizada a en esas con condiciones de temperatura durante 30 min antes de incubar las muestras a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 hs. Luego del tiempo de incubación, las muestras se dializaron por 24 hs a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ para separar la DOX soluble no incorporada en las micelas.

8.3.2.2 Determinación de la concentración de DOX

La DOX incorporada en las micelas de GM1 se cuantificó directamente por espectrofotometría UV-visible midiendo la absorbancia a 490 nm.

8.3.2.3 Determinación de la concentración de GM1

La concentración de GM1 fue medida por el método colorimétrico de resorcinol modificado [10] como se mencionó previamente en el capítulo 1.

8.3.2.4 Procedimiento estándar para la preparación de micelas mixtas de GM1, DOX y Alb

Las micelas GM1/DOX preparadas como se mencionó anteriormente, se incubaron con Alb purificada por 24 hs a pH 3 y 37 °C. La interacción fue estudiada por análisis cromatográficos como se menciona en el capítulo 1 previa neutralización de la proteína hasta pH 7.

8.3.2.5 Determinación de la concentración de Alb

El contenido de Albúmina unida a las micelas se determinó usando el ensayo de Bradford [11] o por absorbancia directa a 280 nm como se mencionó en el capítulo 2.

8.3.2.6 Caracterización estructural de micelas GM1/DOX

8.3.2.6.1 Análisis cromatográfico

Las muestras y los controles fueron corridas en un sistema Akta Explorer 100 (GE Healthcare) equipado con una columna Superdex 200, previamente equilibrada con un buffer fosfato 50 mM (pH 7) con NaCl 150 mM, a un flujo de 0,4 mL.min⁻¹. El perfil de elución fue seguido con un detector de UV a 227, 280 y 490 nm.

Los niveles de gangliósido fueron cuantificados como se mencionó previamente.

8.3.2.6.2 Microscopía electrónica

La morfología de las micelas fue detectada usando un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1200 EX II como se mencionó en el capítulo 1.

8.3.2.7 Estabilidad física de micelas GM1/DOX

8.3.2.7.1 Ensayo de centrifugación

Micelas GM1/DOX (5/1 mol/mol) fueron centrifugadas a 25.000, 50.000 y 100.000 x g por 1 h a 20 °C en una ultracentrífuga XL-90 (Beckman Coulter Inc., USA). Inmediatamente después de la centrifugación, los sobrenadantes se dializaron por 24 hs para eliminar la DOX soluble no incorporada en las micelas, antes de determinar las concentraciones de GM1 y DOX como se describió previamente.

8.3.2.7.2 Efecto de la temperatura en la estabilidad de las micelas mixtas GM1/DOX en solución acuosa

Micelas GM1/DOX (5/1 mol/mol) fueron almacenadas por 2 meses en distintas condiciones de temperatura: 4, 25 y 37 °C. Se tomaron alícuotas de las muestras en distintos periodos de tiempo y se las dializó por 24 hs antes de determinar la concentración de DOX que se mantiene incorporada en las micelas como se mencionó previamente.

8.3.2.7.3 Efecto de ciclos de congelado-descongelado y de liofilización

Micelas GM1/DOX (5/1 mol/mol) fueron congeladas a -80 °C por 24 hs. Posteriormente se permitió que las muestras alcancen temperatura ambiente y fueron centrifugadas a 15.000 x g por 10 min y dializadas por 24 hs antes de medir las concentraciones de GM1 y DOX como se describió previamente.

Por otro lado, micelas GM1/DOX fueron liofilizadas y luego se disolvieron en su volumen inicial con agua bidestilada, se filtraron a través de un poro de 0,22 µm y se dializaron por 24 hs, para luego medir la concentración de DOX y GM1 solubles por los métodos descritos.

8.3.2.8 Estabilidad química de la DOX en micelas de GM1

Para evaluar el efecto del pH alcalino en la estabilidad de la DOX incorporada en las micelas de GM1, se incubaron micelas GM1/DOX (5/1 mol/mol) a pH 10 usando un buffer Carbonato de Sodio 0,2 M de pH 10 a temperatura ambiente (25 ± 1 °C). Se tomaron alícuotas de las muestras en distintos periodos de tiempo y se determinó la concentración de DOX soluble por espectrofotometría. Como control se utilizó una solución de DOX en agua bidestilada..

8.3.2.9 Caracterización de la captación celular de DOX por microscopía de fluorescencia

Se cultivaron células NIH 3T3 a 37 °C y con un 5 % de CO₂ en medio MEM suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (GIBCO) y 2 mM de L-glutamina.

Se diluyeron soluciones de DOX y de micelas GM1/DOX (5/1 mol/mol) con y sin Alb asociada en MEM a una concentración final de DOX de 5 µg.mL⁻¹.

Se incubaron monocapas de células NIH 3T3 crecidas hasta un 70 % de confluencia con cada muestra por 15, 30 y 60 minutos a 37 °C. Luego, las células se lavaron con PBS y la droga incorporada a las células fue observada directamente por microscopía de fluorescencia ya que la DOX es una molécula que presenta fluorescencia propia, simplificando así el procedimiento.

8.3.2.10 Citotoxicidad in-vitro de micelas GM1/DOX y GM1/DOX/Alb sobre líneas celulares tumorales

Se cultivaron células HeLa y Hep-2 a 37 °C y con un 5 % de CO₂ hasta un 90 % de confluencia en medio MEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino. Estas monocapas celulares se incubaron por 24 hs con concentraciones crecientes de GM1, DOX y micelas GM1/DOX (5/1 mol/mol) con y sin Alb asociada. Se evaluó la cantidad de células vivas luego de la incubación usando el ensayo de MTT [12] y se estimaron los valores de IC₅₀ gráficamente de las curvas de dosis-respuesta.

8.4 Resultados

8.4.1 Incorporación de DOX en micelas de GM1

Previamente se demostró que las micelas formadas por GM1 son aptas para incorporar grandes cantidades de paclitaxel (Ptx), originando complejos GM1/Ptx solubles en agua [1]. En este capítulo, se evalúa si estas estructuras tienen la capacidad de incorporar fármacos oncológicos de naturaleza anfipática como es la Doxorubicina (DOX).

Inicialmente se analizó la incorporación de cantidades crecientes de DOX en micelas de GM1 (solución de 50 mg.mL⁻¹). Como se observa en la figura 1A hasta la relación molar GM1/DOX: 5/1 el 100 % de la DOX agregada al medio se incorpora en las micelas, mientras que a partir de esa relación las micelas ya se encuentran saturadas y el

agregado de cantidades superiores de DOX inestabilizan las micelas. En estas condiciones de saturación parte del fármaco en exceso se mantiene soluble fuera de la micela, mientras que una pequeña porción del mismo precipita junto con parte del GM1. La figura 1B muestra la curva de incorporación del fármaco, en donde 50 mg.mL⁻¹ de GM1 pueden incorporar hasta 10 mg.mL⁻¹ de DOX.

Como se puede observar, las micelas de GM1 pueden incorporar hasta 5 veces más DOX que los actuales productos comerciales basados en formulaciones liposomales, que mencionan concentraciones de hasta 2 mg.mL⁻¹; por lo que estas estructuras micelares pueden considerarse como una alternativa válida para la vehiculización de DOX [13].

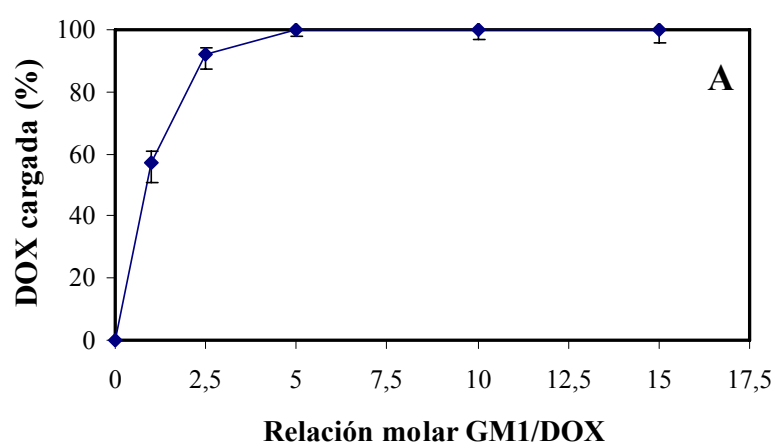
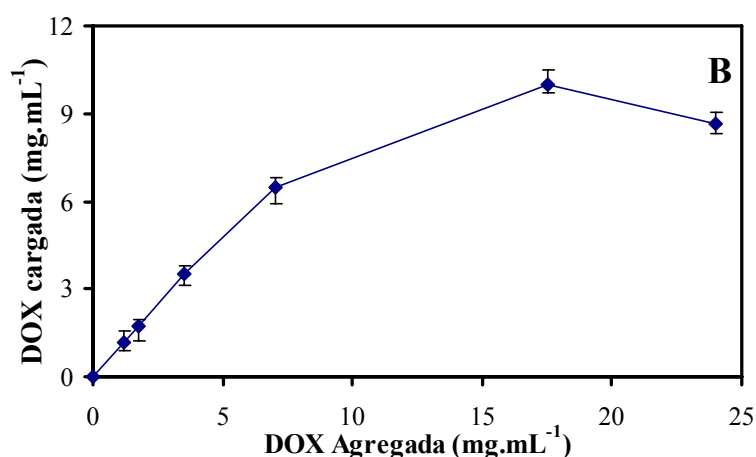


Figura 1. (A) Incorporación de DOX en micelas de GM1 a diferentes relaciones molares GM1/DOX: 1/1; 2.5/1; 5/1; 10/1; 15/1.



(B) Capacidad de micelas de GM1 (50 mg.mL⁻¹) para solubilizar DOX. La carga se realizó a 4 °C durante 24 h. Las barras de error indican la desviación estándar (DS) de la media (n = 3).

Para caracterizar la naturaleza de la interacción existente entre las micelas de GM1 y la DOX, se realizó la incubación de las micelas y el fármaco en la presencia de una alta concentración salina (NaCl 0,5 M). Esta condición no evitó la incorporación de DOX en las micelas, sugiriendo que la asociación no depende de interacciones de tipo electrostáticas sino que es dependiente de interacciones de tipo hidrofóbicas.

Para profundizar en la caracterización de la interacción GM1-DOX, se evaluaron distintos factores físico-químicos que podrían modular esta asociación.

Inicialmente se estudió el efecto del pH en la capacidad de las micelas para incorporar el fármaco. De igual manera que para el Ptx, se demostró que la interacción GM1-DOX no depende de la presencia de una carga neta en el ácido siálico ($pK_a \sim 2,6$) de la micela de GM1 ya que una reducción de pH de 7 a 2 no afecta su habilidad para incorporar el fármaco (Figura 2).

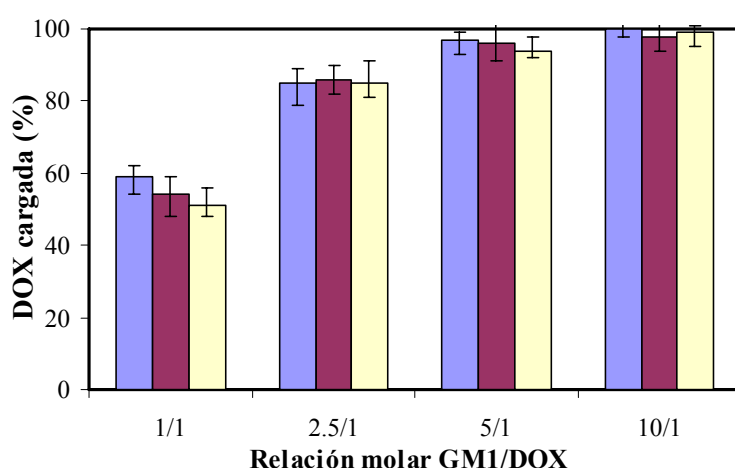


Figura 2. Efecto del pH en la incorporación de DOX en micelas de GM1 a distintas relaciones molares GM1/DOX. pH 2 (■), pH 5 (■) y pH 7 (□). Las barras de error indican la DS de la media ($n = 3$).

Estudios previos descritos en el capítulo 1 de este trabajo de tesis demostraron que la incorporación del Ptx, fármaco altamente hidrofóbico, se favorecía con el aumento de la temperatura a 55 °C. La incubación de las micelas de GM1 en esta condición de temperatura induce una deshidratación de la cadena oligosacárida produciendo un encogimiento significativo de la región hidrofílica de la micela que se acompaña de una ligera expansión de la región hidrofóbica [14,15]. También se demostró que el fenómeno es de tipo reversible, ya que las micelas que habían sido previamente calentadas y luego enfriadas antes de efectuar la carga de la droga lograban solubilizar la misma cantidad de fármaco que aquellas micelas que no se habían calentado.

Cuando se evaluó el efecto de la temperatura en la incorporación de DOX (Figura 3), se observó que los cambios de temperatura en el sistema no parecen afectar significativamente la interacción como ocurre con el Ptx. Sólo en la relación molar GM1/DOX 1/1 se observó un ligero aumento en la capacidad de carga del fármaco. Este resultado, probablemente se relacione con el hecho de que la DOX es una molécula anfipática y no hidrofóbica como el Ptx, por lo que el incremento en la hidrofobicidad de la micela producido por el aumento de la temperatura no modifica sustancialmente su

incorporación en la misma. Por otro lado este resultado sugiere que la DOX ocupa dominios más superficiales en la micela de GM1 que el Ptx, por lo que cambios a nivel del núcleo hidrofóbico de la misma no alteran prácticamente su incorporación.

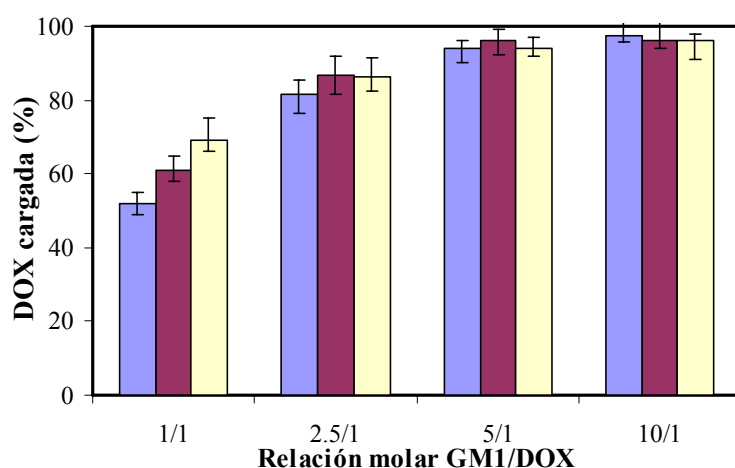


Figura 3. Efecto de la temperatura en la incorporación de DOX en micelas GM1 a distintas relaciones molares GM1/DOX. 4 °C (■), 37 °C (■) y 55 °C (■). Las barras de error indican la DS de la media ($n = 3$).

8.4.2 Caracterización estructural de micelas GM1/DOX

Con el fin de obtener una mayor comprensión acerca del carácter estructural de estas micelas, se estudiaron distintas relaciones molares de micelas GM1/DOX utilizando la cromatografía de exclusión molecular. Los patrones cromatográficos obtenidos previamente (Capítulo 1) mostraron que el GM1 presenta dos picos de elución, uno equivalente a una proteína globular de 365 kDa, que se correlaciona con el radio hidrodinámico de las micelas, y el otro correspondiente a la población de monómeros que se encuentran en constante equilibrio con las micelas [1]. Además, se encontró que las micelas GM1/Ptx tenían un perfil de elución corrido hacia mayores volúmenes respecto al GM1, indicando una reducción en el radio hidrodinámico cuando las estructuras se cargaban con este fármaco. También se observó que el pico correspondiente a los monómeros de GM1 desaparece completamente luego de la incorporación del Ptx, indicando que la carga del fármaco produce un desplazamiento del equilibrio micela-monómero hacia el estado micelar, estabilizando este tipo de estructura [1].

En este estudio se observó que la incorporación de DOX en las micelas de GM1 conduce a cambios en el radio hidrodinámico que dependen de la cantidad de fármaco cargado. A medida que la concentración de DOX aumenta hasta la relación molar GM1/DOX 5/1, la incorporación del fármaco produce un ligero incremento en el radio hidrodinámico de las micelas de GM1 hasta alrededor de 400 kDa. Sin embargo cuando se

sigue aumentando la cantidad de DOX incorporada en las micelas, hasta alcanzar la relación 2,5/1, los resultados muestran que se produce una reorganización de estas estructuras que da origen a dos poblaciones micelares, una de 370 kDa y otra de 209 kDa. Por otro lado, si se continúa con la adición de más fármaco hasta alcanzar la relación molar 1/1 se observa nuevamente una reorganización de las estructuras ya que sólo permanece la población más pequeña con un radio hidrodinámico de alrededor de 218 kDa (Figura 4). En este caso, al igual que lo que ocurre con la incorporación del Ptx, se observó la desaparición del pico de elución correspondiente con los monómeros de GM1, lo que sugiere que la DOX, al igual que el Ptx, estabiliza la estructura micelar.

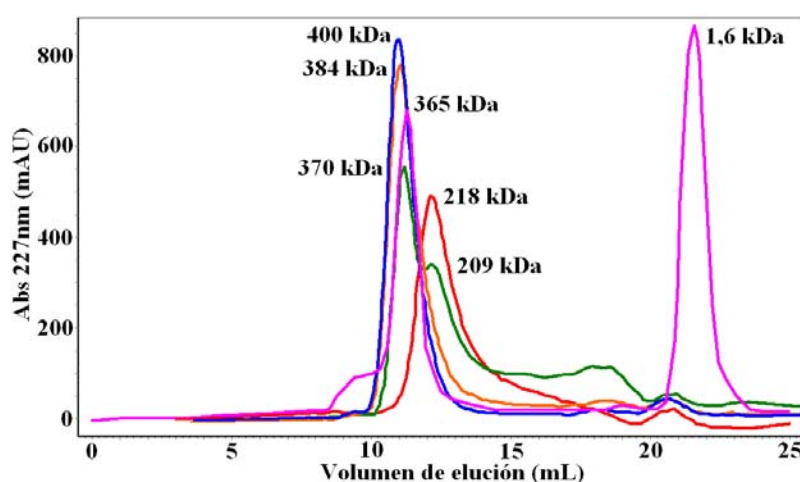


Figura 4. Patrones cromatográficos de micelas de GM1 () y de complejos GM1/DOX: 10/1 (); 5/1 (); 2,5/1 () y 1/1 ().

En base a todos estos resultados, a partir de este momento, se decidió continuar los estudios con las micelas GM1/DOX de relación molar 5/1 por ser estructuras que presentan una importante capacidad de carga de DOX (alrededor de $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y además porque presentan una sola población micelar homogénea.

Con el fin de evaluar la forma y tamaño de las micelas GM1/DOX se utilizó la microscopía electrónica de transmisión (TEM). Resultados previos mostraron que las micelas de GM1 existen en dos poblaciones de distinto tamaño, una de 9-10 nm y otra de 27-28 nm (Figura 5A) y que con la incorporación de Ptx en las micelas de GM1, se observa una unificación en una sola población de 9-12 nm (Figura 5B). La figura 5C muestra que la adición de DOX produce un cambio en la estructura de las micelas, pero en sentido opuesto a lo observado con el Ptx. En este caso se produce una desaparición de la población de micelas de tamaño pequeño (9-12 nm) para generar una población homogénea única con un tamaño de 27-33 nm.

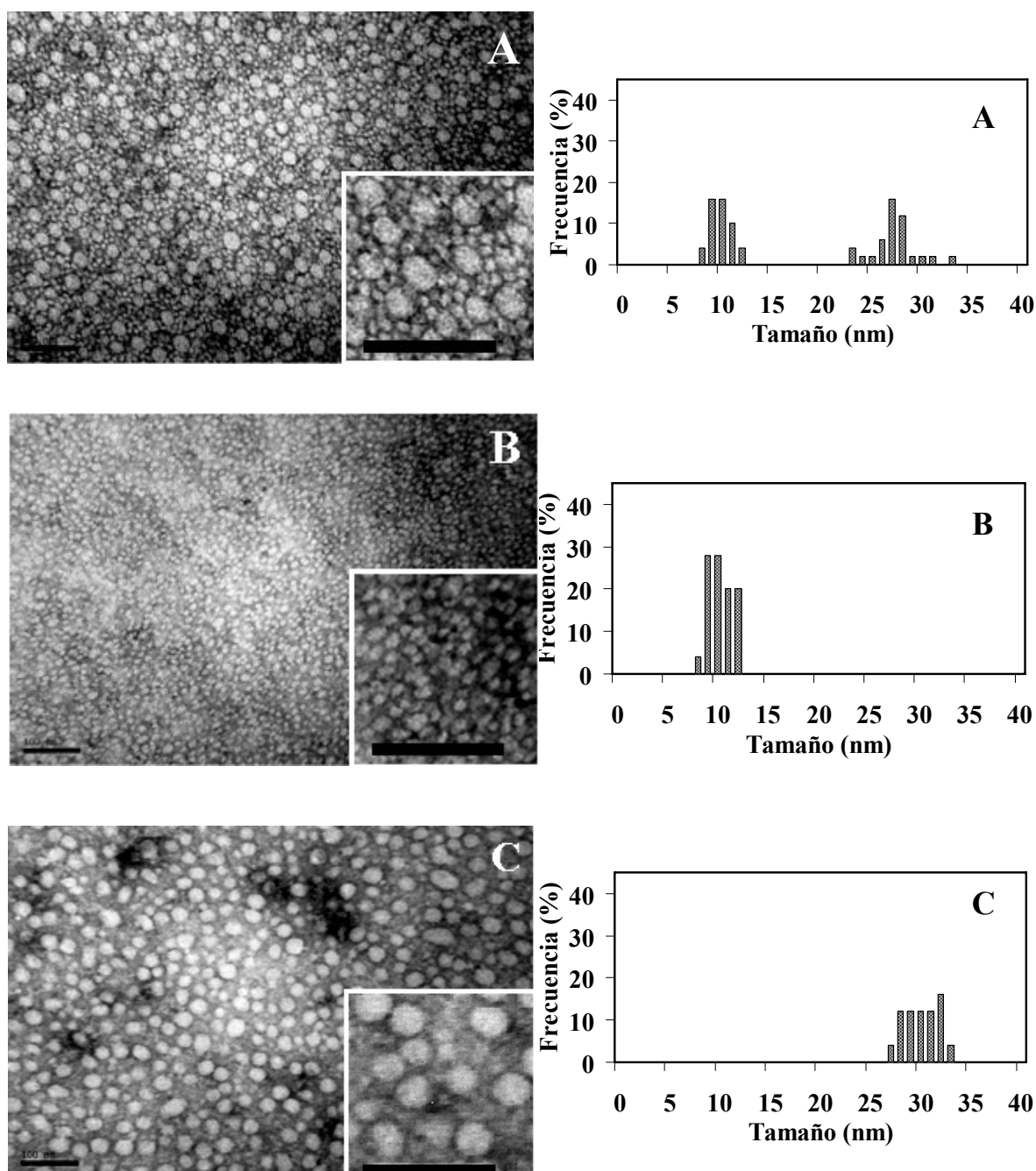


Figura 5. Microscopía electrónica (250.000 \times) e histogramas de frecuencia de: (A) micelas de GM1, (B) GM1/Ptx (20/1 mol/mol) y (C) GM1/DOX (5/1 mol/mol). El tamaño de barra es de 100 nm.

8.4.3 Estabilidad física de micelas GM1/DOX

Como se observa en la tabla 1 más del 90 % de la DOX permanece incorporada en las micelas GM1/DOX luego de una centrifugación hasta 100.000 \times g. Por otro lado, los estudios de estabilidad de los complejos GM1/DOX en solución demostraron que la

cantidad de DOX incorporada en las micelas de GM1 es estable por hasta 2 meses cuando éstas se almacenan a 4 y 25 °C. En los ensayos en los que se realizaron ciclos de congelamiento-descongelamiento o procesos de liofilización se pudo observar en todos los casos que la DOX permanece asociada a las micelas de GM1. Estos resultados muestran que las micelas GM1/DOX se comportan de manera semejante a los complejos GM1/Ptx; siendo el GM1 capaz de generar estructuras micelares estables que evitan la pérdida del fármaco y que además resultan aptas para ser almacenadas en estado sólido hasta el momento de su uso, manteniendo sus propiedades físico-químicas.

Tabla 1. Efecto de la centrifugación en la estabilidad de micelas GM1/DOX.

Centrifugación	Micelas GM1/DOX
	DOX cargada (%)
25,000 x g	98
50,000 x g	94
100,000 x g	90

8.4.4 Estabilidad química de DOX en micelas de GM1

Anteriormente, hemos descrito que las micelas de GM1 tienen la capacidad de proteger al Ptx incorporado de la hidrólisis alcalina [1], lo que sugiere una localización profunda de la droga en la micela en donde el agua libre difusible no tiene acceso. En el caso de la DOX se observó que mientras más del 90 % de la DOX libre es hidrolizada en 6 hs a pH 10, sólo un 17 % del fármaco incorporado en las micelas de GM1 se ve afectado por esta condición (Figura 6). Este resultado sugiere que la DOX podría estar localizada en un nanodominio más externo en la micela de GM1, el cual puede ser alcanzado por el medio acuoso externo.

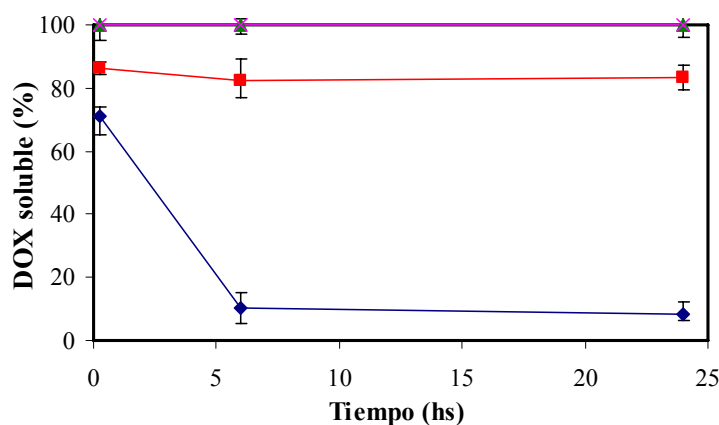


Figura 6. Efecto del pH en la estabilidad de DOX en solución, pH 5 (—*) y pH 10 (—♦) e incorporada en micelas GM1/DOX, pH 5 (—▲) y pH 10 (—■). Las barras de error indican la DS de la media (n = 3).

8.4.5 Interacción de micelas GM1/DOX con Alb

Estudios previos demostraron que las micelas de GM1 cargadas con Ptx, se asocian espontáneamente con la albúmina sérica humana (Alb). Además, se demostró que la interacción se debe principalmente a fuerzas hidrofóbicas más que electrostáticas. Estudios adicionales revelaron que la micela GM1/Ptx se satura de albúmina cuando se alcanza la relación GM1/Alb 1/1 en peso. Además, se observó que a 55 °C y a pH 3, condiciones donde la Alb se encuentra en un estado parcialmente desnaturizado y expone parte de sus residuos hidrofóbicos, la asociación de las micelas con la proteína se vuelve más favorable y se obtienen complejos micelares con menor radio hidrodinámico [2].

En virtud de los resultados anteriores y considerando las ventajas descriptas de la Alb en el tratamiento del cáncer [16,17], se estudió si los complejos GM1/DOX mantienen su capacidad de interactuar con esta proteína.

Se observó que estos complejos también interaccionan con la Alb de manera espontánea, sin embargo en este caso, la cantidad de Alb que se une a la micela depende en gran medida de la cantidad de fármaco incorporado en la misma. En la relación molar GM1/DOX 20/1, el 100 % de la Alb agregada (que representa una relación GM1/Alb 1/1 p/p) se asocia a la micela; mientras que en la medida en que ésta se encuentra más cargada con DOX, la cantidad de Alb que se une disminuye a un 70 y 40 % para las relaciones molares GM1/DOX: 5/1 y 1/1, respectivamente (Figura 7).

Estos resultados demuestran que la presencia de DOX afecta fuertemente la interacción con la Alb sugiriendo que estas dos moléculas podrían ocupar, al menos parcialmente, sitios de unión comunes en la micela de GM1.

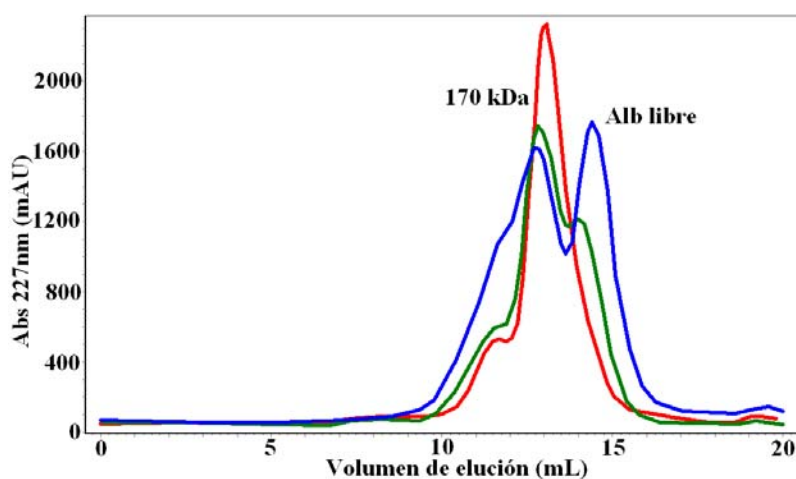


Figura 7. Patrones cromatográficos de micelas GM1/DOX: 20/1 (naranja); 5/1 (verde) y 1/1 (azul) incubadas con Alb (relación GM1/Alb: 1/1 en peso) a pH 3 y 37 °C por 24 hs.

La figura 8 muestra el estudio por microscopía electrónica de transmisión de los complejos mixtos GM1/DOX/Alb formados a partir de la incubación de la albúmina con micelas GM1/DOX de radio molar 5/1. En este caso se puede observar la presencia de una población micelar única con un tamaño de alrededor de 21-30 nm.

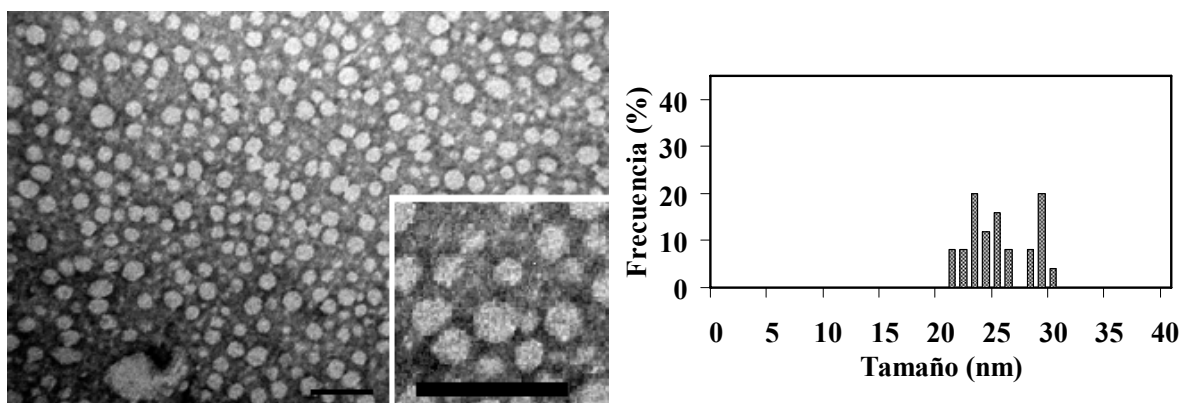


Figura 8. Microscopía electrónica (250.000 x) e histograma de frecuencia de micelas GM1/DOX/Alb. El tamaño de barra es de 100 nm.

8.4.6 Estudios “*in-vitro*” para evaluar los procesos de liberación, captación celular y actividad biológica de DOX

Anteriormente se demostró que las micelas de GM1 cargadas con Ptx producen efectos citotóxicos similares a los del Ptx libre en solución de DMSO [1]. También se evidenció que la captación celular del fármaco y su subsiguiente efecto biológico *in-vitro* es bastante similar en las micelas GM1/Ptx asociadas con albúmina [2].

En estos estudios se evaluó la liberación y la captación celular de la DOX contenida en las micelas de GM1 en relación con la DOX libre y por otra parte, si la interacción de la albúmina con la micela afecta este proceso así como su posterior efecto biológico *in-vitro*.

La figura 9 muestra el perfil cinético de liberación de la molécula de DOX, naturalmente fluorescente, desde complejos GM1/DOX (5/1 mol/mol) con y sin albúmina asociada y la captación por una línea celular de fibroblastos. La microscopía de fluorescencia muestra que la captación celular de DOX se encuentra ligeramente facilitada por la incorporación del fármaco en la micela de GM1. Además, la DOX incorporada en los complejos con Alb muestra una localización nuclear del fármaco, sitio donde ejerce su acción, y una disminución en la cantidad de DOX que permanece en la membrana o el citoplasma celular, como se observa con los complejos GM1/DOX.

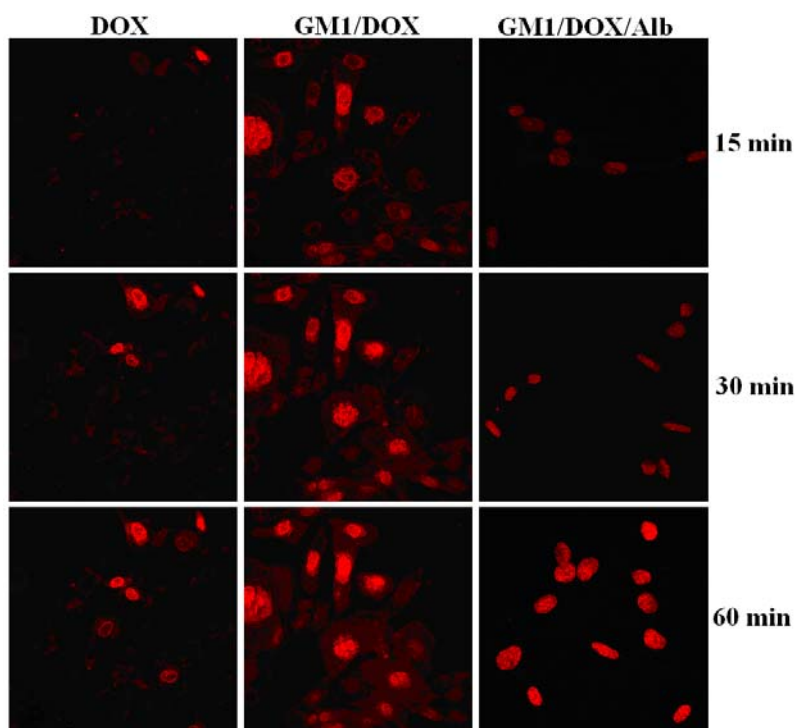


Figura 9. Captación celular de DOX desde una solución control y a partir de complejos GM1/DOX y GM1/DOX/Alb a los 15, 30 y 60 min de incubación.

A continuación se describe un estudio realizado para evaluar la actividad biológica de la DOX incorporada en los complejos micelares GM1/DOX y GM1/DOX/Alb respecto a la DOX libre en una solución control de NaCl 150 mM, en el que se utilizaron dos líneas de células tumorales (Hep-2 y HeLa). Los resultados de la figura 10 obtenidos en células Hep-2 muestran valores similares de IC₅₀ para la DOX independientemente si el fármaco está en estado libre o incorporado en las micelas (2,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Los resultados obtenidos para las células HeLa fueron muy similares a los obtenidos con la Hep-2. En ambos ensayos, las micelas de GM1 vacías no presentaron actividad citotóxica significativa.

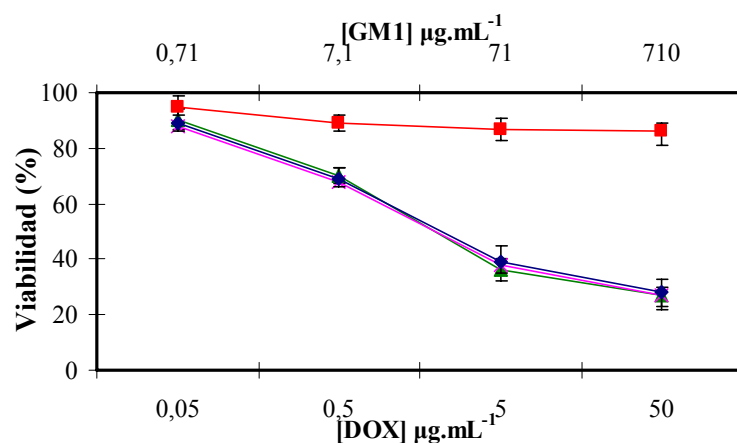


Figura 10. Efecto citotóxico in vitro de GM1 (—■—), DOX (—▲—), GM1/DOX (—×—) y GM1/DOX/Alb (—◆—) sobre células Hep-2. Las barras de error indican la DS de la media (n = 3).

8.5 Discusión

Los resultados obtenidos previamente demostraron que las micelas de gangliósido, específicamente aquellas formadas por GM1, son capaces de solubilizar espontáneamente fármacos hidrofóbicos oncológicos como los taxanos evitando los efectos indeseables de la utilización de co-disolventes [18]. También se ha demostrado que las micelas GM1/Ptx son capaces de interaccionar espontáneamente con la albúmina, un resultado que haría que estas nanoestructuras adquieran propiedades semejantes al Abraxane®, y que podría inducir la acumulación de los complejos con albúmina en el sitio específico del tumor [16,17].

Los resultados descritos en el presente capítulo, muestran que las micelas de GM1 también resultan estructuras capaces para incorporar drogas oncológicas polares como DOX sin ningún procedimiento complejo; proporcionando así una alternativa válida a los liposomas, formulación actualmente utilizada para el transporte de DOX. En este contexto, se pueden mencionar varias ventajas que presentan las micelas respecto a los liposomas para la vehiculización de DOX: 1- poseen una mayor capacidad de transporte en relación a la masa de lípidos usada, 2- no requieren procesos complejos para su formulación, y 3- poseen un tamaño más pequeño que le permite evadir su reconocimiento y eliminación por el sistema retículo-endotelial, entre otras.

Los estudios por cromatografía de exclusión molecular y por microscopía electrónica revelan una clara dependencia del radio hidrodinámico de las micelas GM1/DOX con la cantidad del fármaco incorporado (Figura 4 y 5C). Ya mencionamos previamente que las micelas de GM1 existen en dos poblaciones de 9 y 27 nm. El agregado de DOX induce una reorganización en las micelas distinta a la producida por el Ptx. Este último estabiliza la población de micelas hacia las estructuras más pequeñas que presenta el GM1, dando origen a complejos GM1/Ptx con un tamaño de ~9 nm; mientras que la DOX estabiliza la población más grande, formando una única población de complejos GM1/DOX con un diámetro medio de 27-33 nm.

Estos resultados nuevamente refuerzan el concepto de que las micelas de GM1 son estructuras altamente dinámicas, capaces de reorganizarse, ensamblar o retirar monómeros, en función de las propiedades físico-químicas de la molécula con la que interacciona.

Por otro lado, en este capítulo también se pone de manifiesto que las micelas GM1/DOX mantienen la capacidad de unirse a la albúmina. Sin embargo, en este caso

particular, la cantidad de albúmina unida depende en gran medida de la cantidad de fármaco incorporado en las micelas, sugiriendo que la proteína y la DOX pueden compartir algunos de los mismos sitios de unión en las micelas de GM1.

Con respecto a la actividad biológica de la DOX incorporada en las micelas de GM1, los resultados obtenidos fueron en todos los casos, similares a los del fármaco libre. También se observó que la unión previa de la albúmina no altera la captación celular y acción de la DOX. Estudios *in-vitro* mostraron que las micelas GM1/DOX y GM1/DOX/Alb interactúan y liberan su contenido a las células tumorales (Hep-2 y HeLa) con IC50 similares a los del fármaco control (2,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

8.6 Conclusiones

Los resultados obtenidos durante estos estudios, demuestran que las micelas de GM1 aparecen como un sistema nanomicelar auto-ensamblado que también presenta la capacidad para incorporar y vehiculizar un fármaco oncológico hidrofílico como es la Doxorubicina. En resumen, los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que:

- Las soluciones acuosas de GM1 pueden incorporar grandes cantidades de DOX (5 veces más que las formulaciones actuales), convirtiéndose en una alternativa al uso de liposomas para la vehiculización de este fármaco.
- Las micelas GM1/DOX son estables en solución acuosa sin disolvente orgánico durante por lo menos 2 meses bajo refrigeración. También permanecen estables luego de tratamientos como dilución, ciclos de congelación-descongelación y la liofilización.
- La mayor sensibilidad de DOX a la hidrólisis alcalina en relación con el Ptx sugiere que éste fármaco ocupa sitios más externos dentro de la micela y se encuentra más accesible al entorno acuoso externo.
- Estas micelas retienen la capacidad de interactuar con la albúmina, aunque la cantidad de proteína que se une depende en gran medida de la cantidad de DOX incorporada en la misma.
- La incorporación de DOX en las micelas de GM1 y la unión de Alb a éstas no afecta los mecanismos de liberación, captación y efecto biológico en cultivos celulares.

- La preparación de estos complejos micelares no requiere del uso de solventes ni de procesos costosos o complicados.

En conclusión, las características descritas y las propiedades fisico-químicas de este sistema micelar de monosialogangliósidos, hacen posible proponer su utilización como nanotransportadores de fármacos tanto hidrofóbicos como hidrofílicos.

8.7 Bibliografía

- [1] Leonhard V, Alasino RV, Bianco ID, Beltramo DM (2012) Self-assembled micelles of gangliosides as nanodelivery vehicles of taxanes. *J Control Release*, 162 (3) 619-627.
- [2] Leonhard V, Alasino RV, Bianco ID, Beltramo DM (2012) Selective binding of albumin to gm1 ganglioside micelles containing paclitaxel. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 4: 159.
- [3] Rivera E, Valero V, Arun B, Royce M, Adinin R, et al. (2003) Phase II study of pegylated liposomal doxorubicin in combination with gemcitabine in patients with metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol*, 21: 3249-3254.
- [4] Shah JJ, Orłowski RZ, Thomas SK (2009) Role of combination bortezomib and pegylated liposomal doxorubicin in the management of relapsed and/or refractory multiple myeloma. *Therapeut. Clin. Risk Manag*, 5: 151-159.
- [5] Swenson CE, Bolcsak LE, Batist G, Guthrie THJ, Tkaczuk KH, et al. (2003) Pharmacokinetics of doxorubicin administered i.v. as myocet (tlc d-99; liposome-encapsulated doxorubicin citrate) compared with conventional doxorubicin when given in combination with cyclophosphamide in patients with metastatic breast cancer. *Anti-Cancer Drugs*, 4: 239-246.
- [6] Cuong NV, Hsieh MF (2009) Recent advances in pharmacokinetics of polymeric excipients used in nanosized anti-cancer drugs. *Curr Drug Metab*, 10: 842-850.
- [7] Ceh B, Winterhalter M, Frederik PM, Vallner JJ, Lasic DD (1997) Stealth® liposomes: from theory to product. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 24 (2-3) 165-177.
- [8] Greco F, Vicent MJ (2009) Combination therapy: opportunities and challenges for polymer-drug conjugates as anticancer nanomedicines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61 (13) 1203-1213.

- [9] Patil RR, Guhagarkar SA, Devarajan PV (2008) Engineered nanocarriers of doxorubicin: a current update. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 25 (1) 1-61.
- [10] Miettinen T, Takki-Luukkainen IT (1959) Use of butyl acetate in determination of sialic acid. *Acta Chem Scand* 13: 856-858.
- [11] Garro AG, Beltramo DM, Alasino RV, Leonhard V, Heredia V, et al. (2011) Reversible exposure of hydrophobic residues on albumin as a novel strategy for the formulation of nanodelivery vehicles of taxanes. *Int. J. Nanomedicine*, 6: 1193-1200.
- [12] Green LM, Reade JL, Ware CF (1984) Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth lymphokines. *J Immunol Methods*, 70: 257-268.
- [13] Paul G. Tardi, Nancy I. Boman, and Pieter R. Cullis (1996) Review Liposomal Doxorubicin. *Journal of Drug Targeting*, 4 (3) 129-140.
- [14] Hirai M, Takizawa T (1998) Intensive Extrusion and Occlusion of water in Ganglioside Micelles with Thermal Reversibility. *Biophys J*, 74: 3010-3014.
- [15] Hayakawa T, Hirai M (2002) Hydration and thermal reversibility of glycolipids depending on sugar chains. *Eur Biophys J*, 31 (1) 62-72.
- [16] Gradishar WJ (2006) Albumin-bound paclitaxel: A next-generation taxane. *Expert Opin Pharmacother*, 7: 1041-1053.
- [17] Fukunaga-Kalabis M, Herlyn M (2007) Unraveling mysteries of the multifunctional protein SPARC. *J Invest Dermatol*, 127: 2497-2498.
- [18] Ibrahim NK, Desai N, Legha S, Soon-Shiong P, Theriault RL (2002) Phase I and pharmacokinetic study of ABI-007, a Cremophor-free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel. *Clin Cancer Res*, 8: 1038-1044.

9. CAPÍTULO 4

Incorporación de Paclitaxel, Doxorrubicina y Albúmina en micelas auto-ensambladas de GM1

9.1 Resumen

En los capítulos previos de este trabajo de tesis se demostró que los taxanos (Paclitaxel y Docetaxel), moléculas de carácter hidrofóbico, pueden ser incorporados en micelas de monosialogangliósido GM1 de manera espontánea, aumentando su solubilidad en agua aproximadamente 6.000 veces [1]. También se evidenció que estas estructuras micelares son capaces de incorporar otra clase de fármaco anticancerígeno, de naturaleza anfipática y soluble en agua, como es la Doxorrubicina [2].

Estas micelas mixtas demostraron ser formulaciones estables, solubles en agua, que podrían ser utilizadas como una nueva estrategia para administrar fármacos en tratamientos contra el cáncer. También se describió la interacción hidrofóbica de estos complejos micelares GM1/Ptx y GM1/DOX con la albúmina sérica humana (Alb), como una estrategia que podría mejorar la acumulación del fármaco en el sitio específico del tumor [2,3].

En este capítulo se demuestra que estas estructuras micelares poseen la capacidad de incorporar ambos fármacos (Ptx y DOX) de manera secuencial, ocupando éstos distintos dominios dentro de la micela, dando origen a formulaciones solubles en agua que podrían ser utilizadas como un novedoso sistema de transporte multi-fármaco en tratamientos oncológicos.

Además, se observó que estos complejos mixtos GM1/Ptx/DOX retienen la capacidad para interactuar con Alb, aunque la cantidad de proteína que se une a estas micelas es significativamente menor a la que se asocia con las micelas cargadas con Ptx o DOX únicamente.

Los complejos GM1/Ptx/DOX poseen tamaños de 20-32 nm y radios hidrodinámicos de 370 kDa. Estas estructuras resultaron ser estables en solución refrigerada por al menos 60 días y aún luego de ciclos de congelamiento-descongelamiento y liofilización-resuspensión.

Con respecto a los ensayos de actividad biológica *in-vitro*, se observó que ambos fármacos incorporados en las micelas de GM1 son captados por las células en cultivo de manera similar a los fármacos libres en solución. Sin embargo, los ensayos de citotoxicidad mostraron la existencia de una interacción antagónica entre ambos fármacos que impide poner en evidencia la actividad citotóxica producida por el Ptx.

9.2 Introducción

Casi todas las enfermedades, especialmente aquellas relativamente intratables como el cáncer, no pueden curarse mediante el tratamiento con un solo tipo de fármaco debido a la gran complejidad patológica. El uso combinatorio de múltiples fármacos que tienen diferente mecanismo de acción terapéutica a menudo logra un mejor resultado en comparación con las mono-terapias, ya que la combinación de fármacos adecuadamente seleccionados podría traer efectos sinérgicos o aditivos usando dosis más bajas. Además, la terapia de combinación de dosis bajas al mismo tiempo puede conducir a la disminución o supresión de graves efectos adversos.

Lamentablemente, esta área de administración de múltiples fármacos en un mismo vehículo permanece en gran parte sin explorar, mientras que la mayoría de los esfuerzos se centran en la investigación de sistemas para el transporte y entrega de un solo agente.

Los sistemas para el transporte de múltiples fármacos pueden ofrecer muchas ventajas sobre la administración de una mezcla física de varios fármacos: 1- prolongado tiempo de circulación y vida media, 2- reducción de la captación no-específica, 3- aumento de la acumulación en el sitio del tumor a través del transporte pasivo por la permeabilidad aumentada y efecto de retención y/o a través del transporte activo mediante la incorporación de ligandos específicos [4], 4- captación predominantemente por vía endocítica con el potencial de eludir los mecanismos de resistencia a fármacos y 5- dosificación ratiométrica, es decir, la capacidad para adaptar las proporciones relativas de cada agente basado en su disposición farmacológica. Además, un único sistema de transporte que lleva varios fármacos en la misma plataforma, puede lograr sincronizar y controlar la farmacocinética de cada droga, resultando en una mayor eficacia del fármaco, una mejor solubilidad y biodisponibilidad [5].

Así como la presencia de dos o más agentes terapéuticos en un único transportador ofrece nuevas posibilidades terapéuticas, al mismo tiempo plantea muchos nuevos desafíos: 1- Con el fin de identificar una combinación apropiada de fármacos, es necesario realizar una evaluación biológica exhaustiva que debe estar respaldada por un conocimiento profundo de los mecanismos moleculares implicados. 2- Otro aspecto crítico es la determinación de la relación de masa óptima de cada componente que forma parte del sistema de administración multi-fármaco. Esto requiere una investigación acerca del impacto de diferentes proporciones de fármaco sobre la actividad biológica del sistema

combinado. 3- También será necesario determinar la cinética de liberación de cada fármaco desde el sistema combinado, para determinar la relación óptima de fármacos ya que uno de los medicamentos puede afectar el perfil de liberación del otro y afectar a la actividad. 4- Finalmente, el desarrollo clínico de estos sistemas combinados es extremadamente difícil, debido a los costos para el desarrollo del diseño de tales sistemas complejos.

A pesar de que en la actualidad existen excelentes fármacos, éstos suelen tener ciertos inconvenientes como la baja solubilidad, biodistribución desfavorable y efectos secundarios graves, a cambio de su potencial efecto terapéutico; es por ello que hasta el momento se han desarrollado una gran cantidad de sistemas de transporte de fármacos, principalmente a nanoescala (10-200 nm), que incluyen los liposomas [6], micelas poliméricas [7,8], partículas de polímero [9], etc.

De estos, los liposomas han sido los más estudiados para el desarrollo de sistemas multi-fármaco. Zucker y col. han desarrollado un nanoliposoma pegilado (LipoViTo) para la entrega simultánea de dos agentes quimioterápicos, topotecan y vincristina [10]. Otro sistema liposomal consiste en un polímero “enjaulado”, desarrollado por Lee y col. [11], que ilustra las diferentes formas de incorporar múltiples fármacos en el liposoma tales como la encapsulación de uno y la conjugación covalente de otro. Este sistema comprende a la Doxorubicina (DOX), cargada en el núcleo liposomal, rodeada por una “jaula” de Cisplatino (Pt) conjugado a un polímero sensible al pH. Esta formulación combinada demostró mejorar la eficacia global de cada fármaco contra cáncer de mama y ovario usando dosis reducidas.

También los dendrímeros, nanopartículas poliméricas y conjugados poliméricos están siendo activamente investigados por su potencial aplicación como sistemas de administración multi-fármaco [12-17].

Considerando el hecho de que en estudios previos las micelas formadas por el gangliósido GM1 demostraron ser capaces de incorporar dos clases de fármacos oncológicos con diferentes características físico-químicas, uno hidrofóbico (Ptx) y otro anfipático y soluble en agua (DOX), en este capítulo se planteó evaluar si las micelas de GM1 poseen la capacidad para encapsular estos dos fármacos anticancerígenos de manera simultánea en la misma estructura micelar; estrategia que podría dar origen a un nuevo sistema de administración multi-fármaco para su uso en tratamientos oncológicos.

9.3 Materiales y métodos

9.3.1 Materiales

9.3.1.1 Reactivos

- El monosialogangliósido GM1 purificado de cerebro bovino como sal de sodio, fue un obsequio de TRB Pharma S.A. Las soluciones madres de GM1 se prepararon disolviendo los gangliósidos en agua bidestilada a una concentración final de 250 mg.mL⁻¹.
- El Paclitaxel (Ptx) es de Yunnan Smandbet Co. Ltd. (Kumming, China). Las soluciones madres se prepararon disolviendo el Ptx en etanol y dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final de 20 mg.mL⁻¹ y 50 mg.mL⁻¹ respectivamente.
- El Flutax-1, derivado fluorescente del paclitaxel, fue provisto por Calbiochem (San Diego, CA). Las soluciones madres se prepararon en DMSO a una concentración final de al 25 µg.mL⁻¹.
- La Doxorubicina-HCl (DOX) fue un obsequio del laboratorio ELEA S.A. Argentina.
- La albúmina sérica humana purificada (Alb) al 20 % (p/v) con Caprilato de Sodio (0,04 M) y N-acetilriptofano (0,04 M) usados como estabilizadores, fue un obsequio del Laboratorio de Hemoderivados, Universidad Nacional de Córdoba (Córdoba, Argentina). Para remover los excipientes la albúmina se dializó frente a agua destilada o solución salina y se diluyó con agua destilada no pirogénica hasta la concentración final usada en cada ensayo.
- Todos los demás productos químicos utilizados fueron de grado analítico.

9.3.1.2 Líneas celulares

Los ensayos de citotoxicidad y de captación celular se realizaron utilizando las líneas celulares continuas mencionadas en el capítulo 1.

9.3.2 Métodos

9.3.2.1 Procedimiento estándar para la preparación de micelas mixtas de GM1, Paclitaxel (Ptx) y Doxorubicina (DOX)

Las soluciones madres de GM1, con una concentración de 250 mg.mL⁻¹, se prepararon en agua bidestilada 24 hs antes de su uso. Estas fueron mantenidas a 4 - 8 °C

por 24 hs. Luego se centrifugaron a 50.000 x g por 15 min y el sobrenadante fue filtrado por 0,22 μm .

Las soluciones madres de Ptx, con una concentración final de 50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, se agregaron lentamente y con agitación suave a las soluciones de micelas de GM1 formando micelas GM1/Ptx de relación molar 20/1.

Las soluciones madres de DOX, con una concentración de 24 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ se prepararon en NaCl 145 mM. Estas se agregaron lentamente a la solución de micelas GM1/Ptx (20/1 mol/mol) generando complejos GM1/Ptx/DOX de distintas relaciones molares GM1/DOX: 15/1; 10/1; 5/1; 2,5/1; 1/1. Estas mezclas se incubaron a 4 °C por 24 hs y luego se dializaron por aproximadamente 24 hs a la misma temperatura hasta que los niveles de DOX en el permeado fueran menores al límite de detección de la técnica de medición.

Cuando se evaluó el efecto del pH en la carga de DOX en las micelas GM1/Ptx, la solución de micelas fue llevada a pH 2, 5 y 7 usando buffers Glicina-HCl, Acetato de Sodio y Fosfato de Sodio respectivamente, todos a una concentración de 50 mM. Luego esta solución se mezcló con cantidades crecientes de DOX para alcanzar relaciones molares GM1/DOX de 10/1 a 1/1. La incorporación del fármaco fue realizada en estas condiciones de pH por 24 hs a 4 °C. Luego del tiempo de incubación, las muestras se dializaron por 24 hs a 4 °C frente a agua bidestilada para eliminar la DOX soluble no incorporada en las micelas y retirar el buffer usado para volver las muestras a pH ~ 6.

En los estudios sobre el efecto de la temperatura en la capacidad de las micelas GM1/Ptx para cargar DOX, la solución micelas fue incubada durante 30 minutos a 4, 37 y 55 °C. Luego esta solución se mezcló con cantidades crecientes de DOX para alcanzar relaciones molares GM1/DOX de 10/1 a 1/1. La incorporación de la droga fue realizada a en esas con condiciones de temperatura durante 30 min antes de incubar las muestras a 4 °C por 24 hs. Luego del tiempo de incubación, las muestras se dializaron por 24 hs a 4 °C para eliminar la DOX soluble no incorporada en las micelas

9.3.2.2 Determinación de la concentración de DOX

La DOX incorporada en las micelas GM1/Ptx se cuantificó como se mencionó en el capítulo 3.

9.3.2.3 Determinación de la concentración de GM1

La concentración de GM1 fue medida por el método colorimétrico de resorcinol modificado [18] como se describió en el capítulo 1.

9.3.2.4 Determinación de la concentración de Ptx

La cuantificación del Ptx se llevó a cabo por HPLC como se describió en el capítulo 1.

9.3.2.5 Procedimiento estándar para la preparación de micelas mixtas de GM1, Ptx, DOX y Alb

Las micelas GM1/Ptx/DOX preparadas como se mencionó anteriormente, se incubaron con Alb purificada por 24 hs a pH 3 y 37 °C. La interacción fue analizada por métodos cromatográficos, como se mencionó en el capítulo 1, previa neutralización de la proteína hasta pH 7.

9.3.2.6 Determinación de la concentración de Alb

El contenido de Albúmina unida a las micelas se determinó usando el ensayo de Bradford [19], como se mencionó en el capítulo 2.

9.3.2.7 Caracterización estructural de micelas GM1/Ptx/DOX

9.3.2.7.1 Análisis cromatográfico

Las muestras y los controles fueron analizados en un sistema Akta Explorer 100 (GE Healthcare) equipado con una columna Superdex 200, como se describió en el capítulo 3. Los niveles de gangliósido fueron cuantificados como se mencionó previamente.

9.3.2.7.2 Microscopía electrónica

La morfología de las micelas fue detectada usando un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1200 EX II como se mencionó en el capítulo 1.

9.3.2.8 Estabilidad física de micelas GM1/Ptx/DOX

9.3.2.8.1 Ensayo de centrifugación

Micelas GM1/Ptx/DOX (con GM1/DOX 5/1 mol/mol) fueron centrifugadas a 25.000, 50.000 y 100.000 x g por 1 h a 20 °C en una ultracentrífuga XL-90 (Beckman Coulter Inc., USA). Inmediatamente después de la centrifugación, los sobrenadantes se dializaron por 24 hs para eliminar la DOX soluble no incorporada en las micelas, antes de determinar las concentraciones de GM1, Ptx y DOX como se describió previamente.

9.3.2.8.2 Efecto de la temperatura en la estabilidad de las micelas mixtas GM1/Ptx/DOX en solución acuosa

Micelas GM1/Ptx/DOX (con GM1/DOX 5/1 mol/mol) fueron almacenadas por 2 meses en distintas condiciones de temperatura: 4, 25 y 37 °C. Se tomaron alícuotas de las muestras en distintos periodos de tiempo y se las dializó por 24 hs antes de determinar las concentraciones de Ptx y DOX que se mantienen incorporadas en las micelas como se mencionó previamente.

9.3.2.8.3 Efecto de ciclos de congelado-descongelado y de liofilización

Micelas GM1/Ptx/DOX (con GM1/DOX 5/1 mol/mol) fueron congeladas a -80 °C por 24 hs. Posteriormente se permitió que las muestras alcancen temperatura ambiente y fueron centrifugadas a 15.000 x g por 10 min y dializadas por 24 hs antes de medir las concentraciones de GM1, Ptx y DOX como se describió previamente.

Por otro lado, micelas GM1/Ptx/DOX fueron liofilizadas y luego se disolvieron en su volumen inicial con agua bidestilada, se filtraron a través de un poro de 0,22 µm y se dializaron por 24 hs, para luego medir la concentración de Ptx, DOX y GM1 solubles por los métodos descriptos.

9.3.2.9 Estabilidad química de DOX y Ptx en micelas GM1/Ptx/DOX

Para evaluar el efecto del pH alcalino en la estabilidad de la DOX y el Ptx incorporados en las micelas GM1/Ptx/DOX (con GM1/DOX 5/1 mol/mol), se incubaron éstas a pH 10 usando un buffer Carbonato de Sodio 0,2 M de pH 10. Se tomaron alícuotas de las muestras en distintos periodos de tiempo y se cuantificó la cantidad de DOX y Ptx solubles por espectrofotometría y HPLC respectivamente. Como control se utilizaron una solución de DOX en agua bidestilada y una solución de Ptx en etanol/agua (50:50).

9.3.2.10 Caracterización de la captación celular de Ptx-fluorescente y DOX por microscopía de fluorescencia

Se cultivaron células NIH 3T3 a 37 °C y con un 5 % de CO₂ en medio MEM suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (GIBCO) y 2 mM de L-glutamina.

Se diluyeron soluciones de DOX, de Ptx-fluorescente (Flu-tax) y de micelas GM1/Ptx/DOX (con GM1/DOX 5/1 mol/mol) con y sin albúmina asociada, con un 1 % de Flu-tax, en MEM a una concentración final de 10 y 5 µg.mL⁻¹ de Ptx y DOX respectivamente.

Se incubaron células NIH 3T3 crecidas hasta un 70 % de confluencia con cada muestra por 15, 30 y 60 minutos a 37 °C. Luego, las células se lavaron con PBS y la presencia del fármaco incorporado fue observada mediante microscopía de fluorescencia.

9.3.2.11 Citotoxicidad in-vitro de micelas GM1/Ptx/DOX sobre líneas celulares tumorales

Se cultivaron células HeLa y Hep-2 a 37 °C y con un 5 % de CO₂ hasta un 90 % de confluencia en medio MEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino. Estas monocapas celulares se incubaron por 24 hs con concentraciones crecientes de GM1, Ptx, DOX y micelas GM1/Ptx/DOX (con GM1/DOX 5/1 mol/mol) con y sin albúmina asociada. Se evaluó la cantidad de células vivas luego de la incubación usando el ensayo de MTT [20] y se estimaron los valores de IC₅₀ gráficamente de las curvas de dosis-respuesta.

9.4 Resultados

9.4.1 Incorporación de DOX en micelas GM1/Ptx

Previamente se demostró que las micelas formadas por GM1 son aptas para incorporar grandes cantidades de paclitaxel (Ptx) y doxorubicina (DOX), fármacos oncológicos hidrofóbico y anfipático respectivamente, originando formulaciones estables y solubles en agua que podrían ser usadas como una nueva estrategia para el transporte y liberación de fármacos en tratamientos contra el cáncer [1,2].

La capacidad de las micelas de GM1 para incorporar estas dos clases de fármacos con características físico-químicas tan diferentes, condujo a plantear la posibilidad de

incorporar ambos fármacos de manera simultánea en la misma estructura micelar con el objetivo de desarrollar un sistema de administración multi-fármaco para utilizar en tratamientos oncológicos.

Inicialmente, y considerando que se ha demostrado previamente que el Ptx se ubica en el núcleo hidrofóbico de la micela y que la DOX se encuentra en sitios más externos y ligeramente accesible al ambiente acuoso externo [1,2], se evaluó la incorporación de DOX en micelas de GM1 previamente cargadas con Ptx. La figura 1 muestra la curva de incorporación de DOX, en donde se observa que 50 mg.mL⁻¹ de GM1, en forma de micelas de GM1 o GM1/Ptx (20/1 mol/mol) son capaces de incorporar más de 8 mg.mL⁻¹ de DOX. Este resultado demuestra que la presencia previa de Ptx en la micela de GM1 no parece afectar sustancialmente la incorporación de DOX.

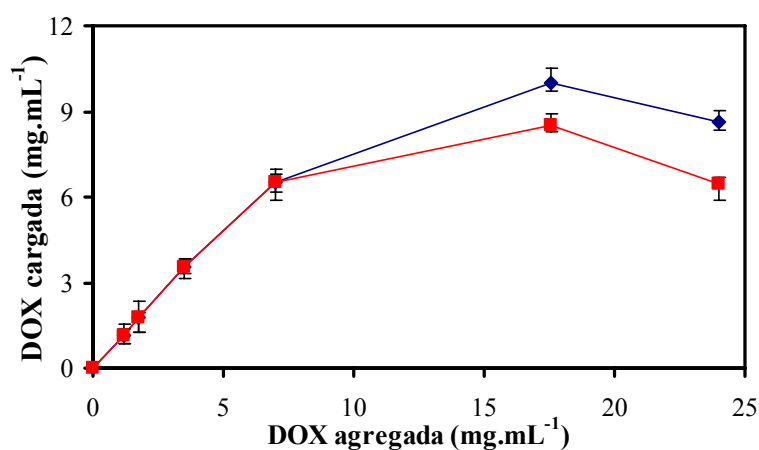


Figura 1. Capacidad de micelas de GM1 (50 mg.mL⁻¹) (—◆—) y GM1/Ptx (—■—) para incorporar DOX. La carga se realizó a 4 °C durante 24 h. Las barras de error indican la desviación estándar (DS) de la media (n = 3).

Cuando se realizó el estudio acerca de cómo resulta la incorporación de Ptx en micelas de GM1 previamente cargadas con DOX, se pudo observar que la cantidad de Ptx incorporada fue sustancialmente menor respecto a la cantidad que se puede cargar en las micelas de GM1. Como se muestra en la figura 2, la incorporación de Ptx en micelas GM1/DOX (5/1 mol/mol) se encuentra bastante impedida y depende en gran medida de la cantidad de Ptx agregado. Así, cuando la cantidad de Ptx agregado es baja (0,26 y 0,58 mg.mL⁻¹, que representan las relaciones molares GM1/Ptx 100/1 y 50/1) la incorporación de Ptx es aproximadamente un 40 % menor comparada con la solubilización del mismo en micelas de GM1; mientras que cuando se aumenta la cantidad de Ptx agregado (1,11 y 2,22 mg.mL⁻¹, que representan las relaciones 25/1 y 12,5/1) la carga del mismo cae bruscamente.

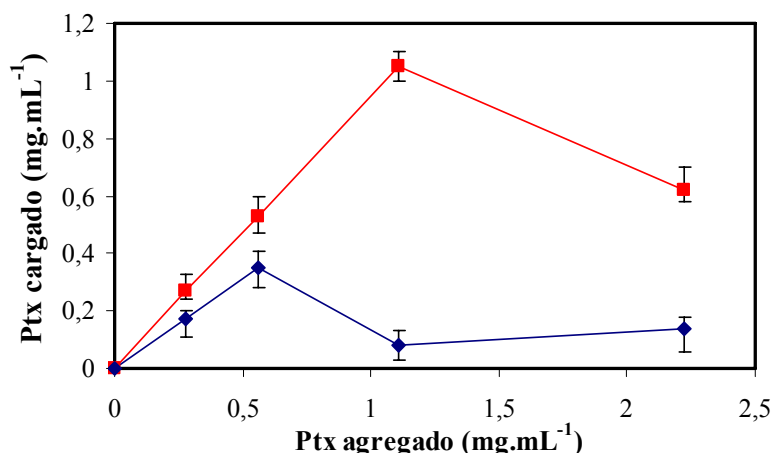


Figura 2. Incorporación de Ptx en micelas de GM1 (50 mg.mL⁻¹) (■) y GM1/DOX (◆). La carga se realizó a 4 °C durante 24 h. Las barras de error indican la desviación estándar (DS) de la media (n = 3).

Estos resultados sugieren que la DOX produce un impedimento estérico que impide la posterior entrada de Ptx en la micela o bien que estos fármacos podrían estar compartiendo dominios de unión dentro de la estructura micelar. Sin embargo, esta última hipótesis resulta poco probable ya que estudios previos sugieren que ambas moléculas ocupan dominios diferentes en la micela. Es por ello que para lograr la incorporación simultánea de ambos fármacos es necesario seguir una secuencia determinada que consiste en incorporar primero el Ptx y luego la DOX.

De igual manera que para la incorporación de DOX en micelas de GM1, factores como el pH y la temperatura no influyeron significativamente en la carga de DOX en micelas GM1/Ptx (20/1 mol/mol) [2].

9.4.2 Caracterización estructural de micelas GM1/Ptx/DOX

El estudio estructural de las micelas de GM1 llevado a cabo por cromatografía de exclusión molecular mostró que éstas poseen un radio hidrodinámico promedio equivalente al de una proteína globular de 365 kDa. Además se observa un pico de elución correspondiente a los monómeros de GM1 a 1,6 kDa que se encuentran en constante equilibrio con las micelas [1].

Por otro lado, la incorporación de Ptx produjo reducción en el radio hidrodinámico de las micelas [1]; mientras que la incorporación de DOX llevó a cambios estructurales en las micelas de GM1 que dependen fuertemente de la cantidad de fármaco incorporado [2].

En el caso de los complejos GM1/Ptx/DOX, hasta la relación molar GM1/DOX 5/1, la incorporación de DOX produce un ligero incremento en el radio hidrodinámico de

las micelas de GM1 hasta alrededor de 385 kDa. Sin embargo si se continúa aumentando la cantidad de fármaco incorporado, hasta las relaciones 2,5/1 y 1/1, las micelas se desestabilizan y generan un gradiente de poblaciones micelares de tamaños muy variables que van desde 350 a 50 kDa (Figura 3).

También se observó que el pico correspondiente a los monómeros de GM1 desaparece completamente luego de la incorporación de Ptx, DOX o ambas drogas en simultáneo, indicando que la carga de éstas produce un desplazamiento del equilibrio micela-monómero hacia el estado micelar, estabilizando este tipo de estructura.

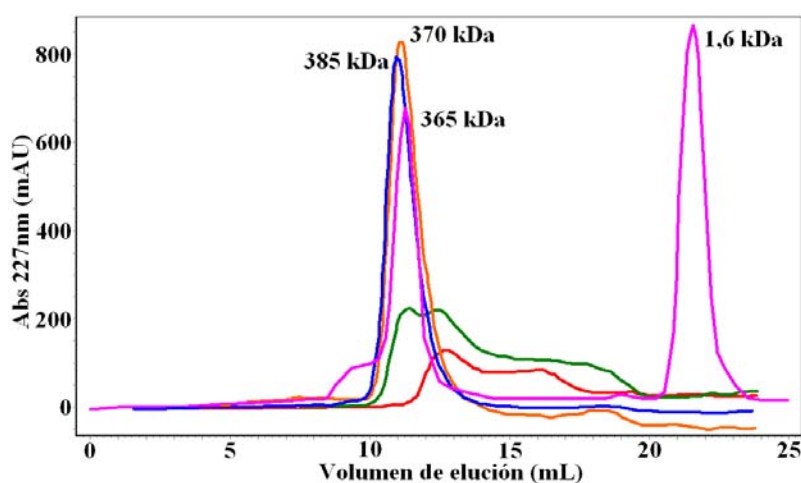


Figura 3. Patrones cromatográficos de micelas de GM1 () y de complejos GM1/Ptx/DOX con GM1/DOX: 10/1 (); 5/1 (); 2,5/1 () y 1/1 ().

En base a estos resultados se decidió que las micelas GM1/Ptx/DOX con una relación molar GM1/DOX de 5/1 son las estructuras que se utilizarán para continuar con los estudios ya que presentan una importante capacidad de carga de DOX ($\sim 10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y una población micelar homogénea.

Con el fin de evaluar la forma y tamaño de estos complejos GM1/Ptx/DOX se utilizó la microscopía electrónica de transmisión. Resultados previos demostraron que las micelas de GM1 existen en dos poblaciones de distinto tamaño, una de 9-10 nm y otra de 27-28 nm [1]. La incorporación de Ptx produjo una unificación de las micelas en una sola población de 9-12 nm [1]; mientras que la carga de DOX produjo un aumento en la estructura micelar hasta tamaños de 27-33 nm [2].

La figura 4, muestra que las micelas GM1/Ptx/DOX poseen un tamaño medio de 20-32 nm, resultado que sugiere que de ambos fármacos, la DOX posee una mayor influencia que el Ptx en cuanto a la re-estructuración de la estructura micelar.

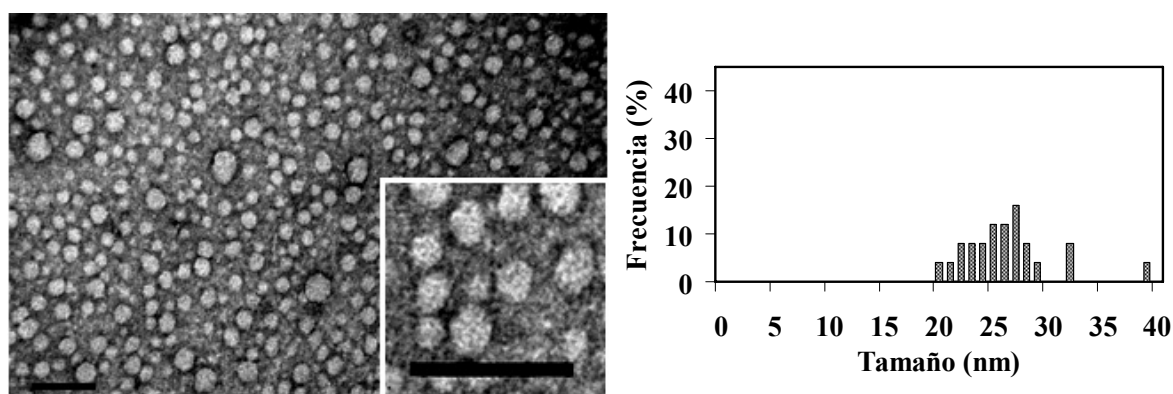


Figura 4. Microscopía electrónica (250.000 x) e histograma de frecuencia de micelas GM1/Ptx/DOX. El tamaño de barra es de 100 nm.

9.4.3 Estabilidad física de micelas GM1/Ptx/DOX

Como se observa en la tabla 1 más del 90 % y 93 % de DOX y Ptx, respectivamente, permanecen incorporados en las micelas luego de una centrifugación hasta 100.000 x g de las micelas mixtas GM1/Ptx/DOX preparadas a 4 °C. Los estudios de estabilidad de estos complejos en solución acuosa, demostraron que las cantidades de DOX y Ptx incorporadas en las micelas se mantienen estables por hasta 2 meses cuando éstas se almacenan a 4 y 25 °C. Por otra parte, en los ensayos en que se aplicaron ciclos de congelamiento-descongelamiento o procesos de liofilización se pudo observar que tanto el Ptx como la DOX permanecen asociados a las micelas de GM1. Estos resultados ponen en evidencia la marcada estabilidad de este sistema micelar, aún cuando se lo somete a condiciones físicas extremas.

Tabla 1. Efecto de la centrifugación en la estabilidad de micelas GM1/Ptx/DOX.

Micelas GM1/Ptx/DOX		
Centrifugación	DOX cargada (%)	Ptx cargado (%)
25.000 x g	98	97
50.000 x g	95	94
100.000 x g	91	93

9.4.4 Estabilidad química de DOX en micelas GM1/Ptx/DOX

Previamente se demostró que las micelas de GM1 poseen la capacidad de proteger al Ptx incorporado de la hidrólisis alcalina [1], lo que sugiere que el mismo se ubica en el núcleo hidrofóbico de la micela donde el agua libre difusible no tiene acceso. Cuando se evaluó que ocurría con la DOX incorporada en la micela de GM1 se observó que sólo un 17 % del fármaco se hidroliza luego de 6 hs de incubación a pH 10; mientras que más del 90 % de la DOX libre se degrada en esas mismas condiciones [2].

En el caso de las micelas GM1/Ptx/DOX (Figura 5), un 25 % de la DOX se hidroliza bajo esas mismas condiciones; mientras que sólo un 7 % del Ptx sufre tal degradación, resultado muy similar al obtenido para las micelas GM1/Ptx [1].

Estos resultados sugieren que, aunque ambos fármacos se encuentran ubicados en el núcleo hidrofóbico interno de la micela cuando se los incorpora de manera individual, en el caso de la carga simultánea se observa que la DOX parecería quedar más expuesta al medio acuoso, lo que explicaría el ligero aumento en la degradación del fármaco por el pH alcalino.

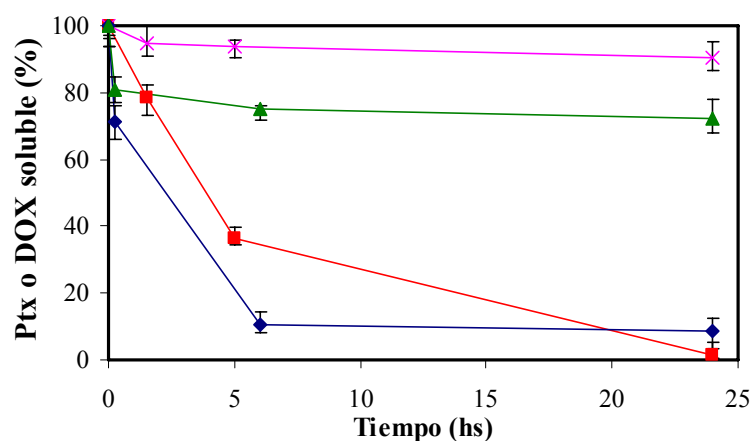


Figura 5. Efecto del pH 10 en la estabilidad de DOX en solución y de DOX (▲) y Ptx (◆) incorporados en micelas GM1/Ptx/DOX. Las barras de error indican la DS de la media ($n = 3$).

9.4.5 Interacción de micelas GM1/Ptx/DOX con Alb

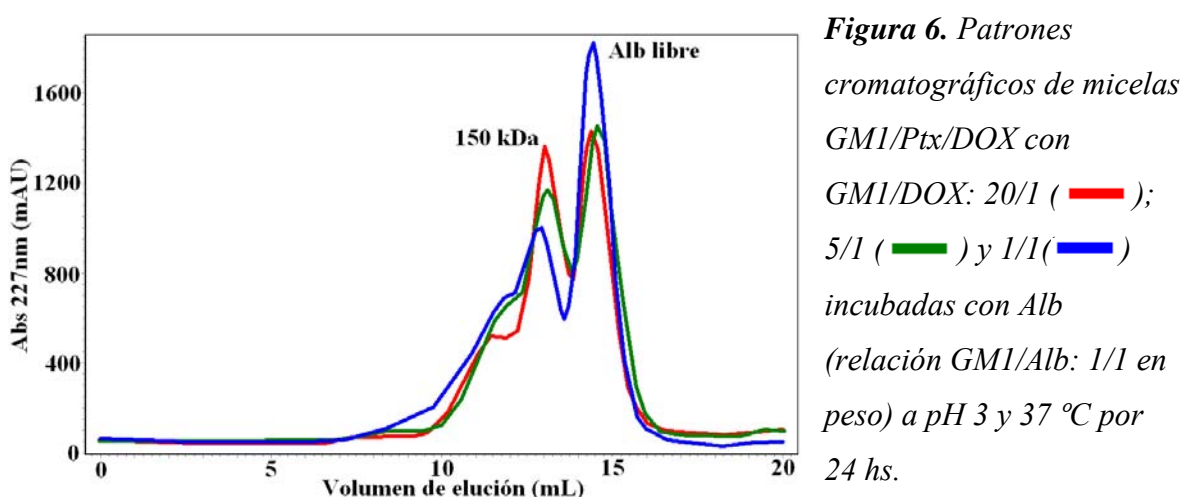
Previamente se demostró que las micelas GM1/Ptx y GM1/DOX son capaces de asociarse espontáneamente con la albúmina sérica humana (Alb) [2,3]. La condición óptima para lograr una mayor asociación, se obtuvo cuando la proteína se encuentra a pH 3, condición en la que adopta un estado “parcialmente desnaturalizado” y expone gran parte de sus residuos hidrofóbicos [3]. Este resultado y el hecho de que altas

concentraciones salinas (NaCl 0,5 M) no previenen la interacción, sugieren que en la misma se involucran fuerzas de tipo hidrofóbicas más que electrostáticas.

En el caso de las micelas GM1/Ptx, se observó que las mismas se saturan de Alb cuando se alcanza la relación GM1/Alb 1/1 en peso; mientras que en las micelas GM1/DOX la cantidad de Alb que se une a la micela depende en gran medida de la cantidad de fármaco incorporado (en la relación molar GM1/DOX: 5/1 la micela se satura con proteína cuando se alcanza una relación GM1/Alb 1/0,7 en peso). Esto sugiere que DOX y Alb podrían estar ocupando, al menos parcialmente, sitios de unión comunes en la micela de GM1.

Considerando los resultados previos y las ventajas que ofrece la Alb en el diseño de transportadores de fármacos para tratamiento del cáncer [21,22], se estudió si los complejos mixtos GM1/Ptx/DOX mantienen la capacidad de interactuar con esta proteína.

De la misma manera que para las micelas GM1/DOX, la cantidad de Alb que se asocia a los complejos GM1/Ptx/DOX también depende de la cantidad de DOX incorporada en la micela. En este caso el efecto es aún más marcado ya que en los complejos en donde la relación molar GM1/DOX es de 5/1 la micela se satura con Alb cuando se alcanza una relación GM1/Alb 1/0,4 en peso (Figura 6).



La figura 7 muestra el estudio por microscopía electrónica de transmisión de estos complejos mixtos GM1/Ptx/DOX/Alb formados a partir de la incubación de la proteína con micelas mixtas GM1/Ptx/DOX (con un radio molar GM1/DOX: 5/1). Se observa la presencia de una población micelar única con un tamaño de alrededor de 22-32 nm.

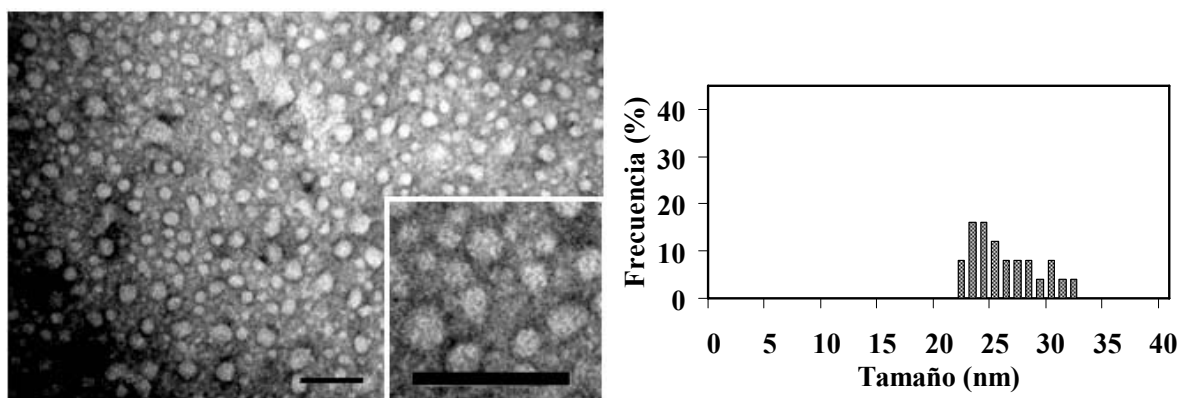


Figura 7. Microscopía electrónica (250.000 x) e histograma de frecuencia de micelas GM1/Ptx/DOX/Alb. El tamaño de barra es de 100 nm.

9.4.6 Estudios “in-vitro” para evaluar los procesos de liberación, captación celular y actividad biológica de DOX y Ptx incorporados en micelas de GM1

Los estudios previos presentados en los capítulos anteriores mostraron que tanto el Ptx como la DOX incorporados en micelas de GM1 producen efectos citotóxicos similares a los de los fármacos libres en solución [1,2]. Además, en ambos casos, la asociación con Alb no produjo cambios significativos en la actividad citotóxica de los fármacos [2,3].

Con respecto al Ptx, no se observaron diferencias en el perfil cinético de captación del fármaco desde las distintas formulaciones estudiadas y desde una solución en DMSO [3]; mientras que para la DOX se observó que su captación se encuentra ligeramente facilitada, con relación a la DOX libre, por la incorporación del fármaco en la micela de GM1 [2].

La figura 8 muestra el perfil cinético de entrega de DOX, molécula naturalmente fluorescente, y de Ptx, mediante el uso de su derivado fluorescente Flu-tax, desde complejos GM1/Ptx/DOX y GM1/Ptx/DOX/Alb y la captación de ambos fármacos por una línea celular de fibroblastos. Se observa que no existen diferencias significativas en cuanto a la captación de los fármacos desde las dos formulaciones estudiadas y desde las soluciones control. En la microscopía se evidencia la localización preferentemente nuclear de la DOX y citoplasmática del Ptx.

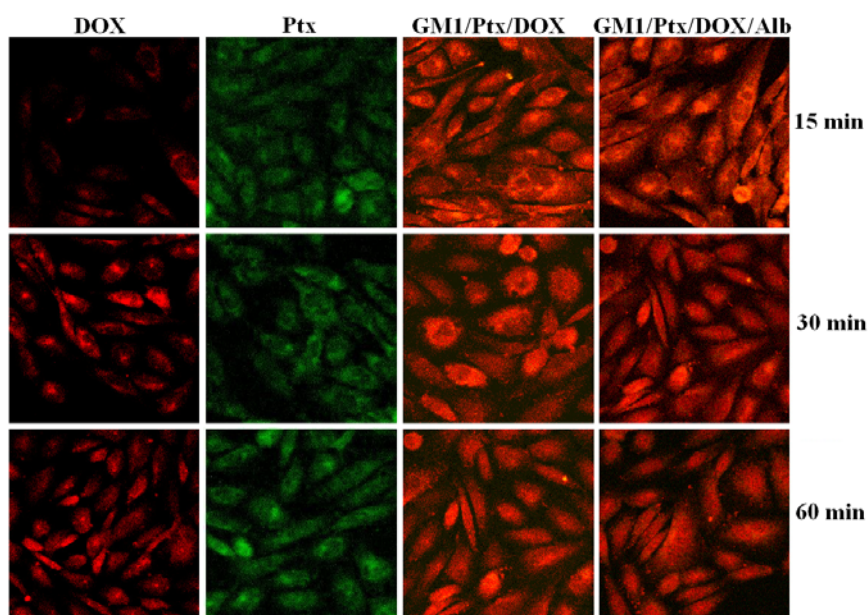


Figura 8. Captación celular de DOX y Ptx desde una solución control y a partir de complejos GM1/Ptx/DOX y GM1/Ptx/DOX/Alb a los 15, 30 y 60 min de incubación.

Por otra parte se utilizaron dos líneas de células tumorales (Hep-2 y HeLa) para evaluar el efecto biológico de la DOX y el Ptx incorporados en los complejos micelares GM1/Ptx/DOX y GM1/Ptx/DOX/Alb respecto a los fármacos libres en solución.

Los resultados de la figura 9 obtenidos sobre células Hep-2 muestran valores similares de IC₅₀ para la DOX independientemente si el fármaco está en estado libre o incorporado en las micelas (2,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Es interesante observar que el efecto biológico de los complejos GM1/Ptx/DOX y GM1/Ptx/DOX/Alb responde al patrón de efecto de la DOX, independientemente de la presencia de Ptx ya que cuando los complejos dejan de tener efecto, la concentración de Ptx presente en estos aún debería ser suficiente para producir un claro efecto citotóxico (0,0158 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Este resultado no se encuentra relacionado con la incorporación de los fármacos en las micelas de GM1, ya que la co-incubación de las dos drogas en forma libre mostró resultados muy similares. Por lo que este resultado sugiere la existencia de algún tipo de interacción entre Ptx y DOX.

Los resultados obtenidos con las células HeLa fueron muy similares a los obtenidos con la línea celular Hep-2.

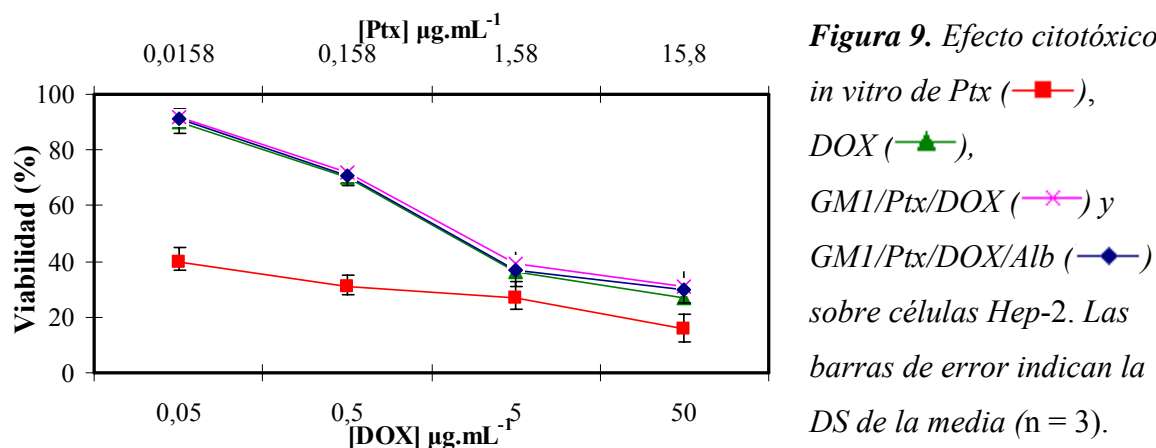


Figura 9. Efecto citotóxico *in vitro* de Ptx (—■—), DOX (—▲—), GM1/Ptx/DOX (—×—) y GM1/Ptx/DOX/Alb (—◆—) sobre células Hep-2. Las barras de error indican la DS de la media (n = 3).

9.5 Discusión

Los resultados obtenidos previamente han demostrado que las estructuras micelares formadas por el GM1 poseen la capacidad de solubilizar espontáneamente fármacos oncológicos de distinta polaridad, hidrofóbicos como el Ptx y anfipáticos como la DOX, sin la necesidad de utilizar co-solventes o algún procedimiento complejo [1,2]. Además, se evidenció que estos complejos tienen la capacidad de interactuar espontáneamente con la albúmina; una propiedad interesante que podría provocar la acumulación de los complejos en el sitio específico del tumor y reducir los efectos secundarios provocados por la llegada del fármaco a sitios sanos del organismo [21].

Los resultados descritos en este capítulo, muestran que las micelas de GM1 son estructuras capaces de incorporar Ptx y DOX en la misma estructura sin ningún procedimiento complejo. Sin embargo, se requiere seguir un orden específico para lograr incorporar en la micela la máxima cantidad de cada fármaco, primero debe ser incorporado el Ptx y luego la DOX, lo que sugiere que ambos ocupan dominios diferentes en la estructura micelar.

De igual manera que para los complejos GM1/DOX [2], los estudios por cromatografía de exclusión molecular de las micelas GM1/Ptx/DOX revelaron que existe una fuerte dependencia del radio hidrodinámico de las mismas con la cantidad de DOX incorporada. Hasta la relación molar GM1/DOX 5/1, el radio hidrodinámico de las micelas de GM1 se incrementa ligeramente, mientras que la adición de mayores cantidades de DOX, desestabilizan totalmente la estructura micelar (Figura 3). Por otro lado la microscopía electrónica demostró que la incorporación de DOX, en presencia o ausencia

de Ptx, produce una reorganización de las micelas de GM1 hacia un tamaño de 20-32 nm (Figura 4).

Aquí también se demuestra que los complejos GM1/Ptx/DOX mantienen la capacidad de unirse espontáneamente a la Alb preferentemente a pH 3; sin embargo, al igual que en las micelas GM1/DOX, la cantidad de Alb que se une depende fuertemente de la cantidad de DOX incorporada en la micela, sugiriendo que la proteína y la DOX pueden compartir algunos de los mismos sitios de unión en las micelas de GM1. En el caso de los complejos GM1/Ptx/DOX el efecto es aún más marcado ya que sólo un 40 % de la Alb agregada se une a la micela, cuando la relación molar GM1/DOX del complejo es 5/1, respecto a un 70 % de saturación alcanzado para las micelas GM1/DOX sin Ptx.

Los estudios acerca de la liberación de Ptx y DOX desde los complejos mixtos GM1/Ptx/DOX mostraron que ambos fármacos pueden ser liberados y captados por células en cultivo y que la asociación posterior con albúmina no afecta la liberación y captación de los mismos.

Los estudios de citotoxicidad *in-vitro* mostraron que los complejos GM1/Ptx/DOX y GM1/Ptx/DOX/Alb produjeron un efecto biológico similar a la DOX control; mientras que no se observó el efecto citotóxico esperado del Ptx incorporado en los mismos. Ensayos posteriores usando ambos fármacos en estado libre mostraron resultados similares, lo que sugiere la existencia de algún tipo de interacción entre Ptx y DOX y que este efecto no se relaciona con el hecho de estar incorporados en la misma estructura micelar. Respecto a estos resultados, ciertos autores han encontrado que la DOX y el etopósido actúan como antagonistas del Ptx sobre varias líneas celulares. Los fundamentos bioquímicos de esta interacción son desconocidos, pero el hecho de que los dos antagonistas del Ptx son inhibidores de la Topoisomerasa II, plantea la posibilidad de que el efecto citotóxico que produce el Ptx puede ser en parte dependiente de la actividad de esta topoisomerasa [22,23].

9.6 Conclusiones

En este capítulo se ha demostrado la capacidad de las micelas de GM1 para actuar como un sistema de vehiculización multi-fármaco, ya que estas micelas resultan ser capaces de incorporar dos fármacos con características físico-químicas muy diferentes,

tales como el Ptx y la DOX. En resumen, los resultados descritos en el presente trabajo muestran que:

- Las soluciones acuosas de GM1 pueden cargar grandes cantidades de Ptx y DOX sin requerir ningún proceso costoso o complicado para su preparación.
- Las micelas GM1/Ptx/DOX son estables en solución acuosa sin disolvente orgánico durante por lo menos 2 meses bajo refrigeración. También permanecen estables luego de tratamientos como la dilución, ciclos de congelación-descongelación y la liofilización.
- La mayor sensibilidad de DOX a la hidrólisis alcalina en relación con el Ptx sugiere que éste fármaco ocupa sitios más externos dentro de la micela y que se encuentra más accesible al entorno acuoso externo.
- Estas micelas retienen la capacidad de interactuar con la albúmina, aunque la cantidad de proteína que se une depende en gran medida de la cantidad de DOX incorporada en la misma.
- La liberación y captación celular de Ptx y DOX desde los complejos GM1/Ptx/DOX y GM1/Ptx/DOX/Alb fue similar a la de los controles. Sin embargo, el efecto biológico de estas formulaciones se limita a la citotoxicidad producida por la DOX ya que no se observó el efecto correspondiente al Ptx.

Por lo tanto, a pesar de que los dos fármacos ensayados interaccionan de manera antagonica en los estudios *in-vitro*, es factible postular a este modelo micelar como un nuevo sistema de vehiculización nanométrica multi-fármaco.

9.7 Bibliografía

- [1] Leonhard V, Alasino RV, Bianco ID, Beltramo DM (2012) Self-assembled micelles of gangliosides as nanodelivery vehicles of taxanes. *J Control Release*, 162 (3) 619-627.
- [2] Capítulo 3, “Micelas auto-ensambladas de GM1 como nanovehículos de Doxorubicina”.
- [3] Leonhard V, Alasino RV, Bianco ID, Beltramo DM (2012) Selective binding of albumin to gm1 ganglioside micelles containing paclitaxel. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 4: 159.

-
- [4] Emerich DF, Thanos CG (2007) Targeted nanoparticlebased drug delivery and diagnosis. *Journal of Drug Targeting*, 15 (3) 163-183.
- [5] Greco F, Vicent MJ, Gee S, et al. (2007) Investigating the mechanism of enhanced cytotoxicity of HPMA copolymer-Dox-AGM in breast cancer cells. *J Control Release*, 117 (1) 28-39.
- [6] Torchilin V (2005) Recent Advances with Liposomes as Pharmaceutical Carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4 (2) 145-160.
- [7] Kakizawa Y, Kataoka K (2002) Block Copolymer Micelles for Delivery of Gene and Related Compounds. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54 (2) 203-222.
- [8] Yokoyama M (2010) Polymeric Micelles as a New Drug Carrier System and Their Required Considerations for Clinical Trials. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 7 (2) 145-158.
- [9] Amin C, Mackman N, Key NS (2008) Microparticles and Cancer. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 36 (3-4) 177-183.
- [10] Zucker D, Andriyanov AV, Steiner A, Raviv U, Barenholz Y, Characterization of PEGylated nanoliposomes co-remotely loaded with topotecan and vincristine: relating structure and pharmacokinetics to therapeutic efficacy. *Journal of Controlled Release*. In press.
- [11] Lee SM, O'Halloran TV, Nguyen ST (2010) Polymercaged nanobins for synergistic cisplatin-doxorubicin combination chemotherapy. *Journal of the American Chemical Society*, 132 (48) 17130–17138.
- [12] Ren Y, Kang CS, Yuan XB, et al. (2010) Co-delivery of as-miR-21 and 5-FU by poly(amidoamine) dendrimer attenuates human glioma cell growth in vitro. *Journal of Biomaterials Science*, 21 (3) 303–314.
- [13] Kaneshiro TL, Lu ZR, (2009) Targeted intracellular codelivery of chemotherapeutics and nucleic acid with a welldefined dendrimer-based nanoglobular carrier. *Biomaterials*, 30 (29) 5660–5666.
- [14] Milane L, Duan ZF, Amiji M (2011) Pharmacokinetics and biodistribution of lonidamine/paclitaxel loaded, EGFRtargeted nanoparticles in an orthotopic animal model of multi-drug resistant breast cancer. *Nanomedicine*, 7 (4) 435–444.
- [15] Wang H, Zhao Y, Wu Y, et al., Enhanced anti-tumor efficacy by co-delivery of doxorubicin and paclitaxel with amphiphilic methoxy PEG-PLGA copolymer nanoparticles, *Biomaterials*, 32 (32) 8281–8290.

-
- [16] Shin HC, Alani AWG, Rao DA, Rockich NC, Kwon GS (2009) Multi-drug loaded polymeric micelles for simultaneous delivery of poorly soluble anticancer drugs. *J of Control Release*, 140 (3) 294-300.
- [17] Yang T, Wang Y, Li Z et al., (2012) Targeted delivery of a combination therapy consisting of combretastatin A4 and low-dose doxorubicin against tumor neovasculature. *Nanomedicine*, 8 (1) 81-92.
- [18] Miettinen T, Takki-Luukkainen IT (1959) Use of butyl acetate in determination of sialic acid. *Acta Chem Scand*, 13: 856-858.
- [19] Garro AG, Beltramo DM, Alasino RV, Leonhard V, Heredia V, et al. (2011) Reversible exposure of hydrophobic residues on albumin as a novel strategy for the formulation of nanodelivery vehicles of taxanes. *Int. J. Nanomedicine*, 6: 1193-1200.
- [20] Green LM, Reade JL, Ware CF. (1984) Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth lymphokines. *J Immunol Methods*, 70: 257-268.
- [21] Fukunaga-Kalabis M, Herlyn M (2007) Unraveling mysteries of the multifunctional protein SPARC. *J Invest Dermatol*, 127: 2497-2498.
- [22] Hahn SM, Liebmann JE, Cook J et al. (1993) Taxol in combination with doxorubicin or etoposide. Possible antagonism in vitro. *Cancer*, 72: 2705-2711.
- [23] Viallet J, Tsao MS, Gallant G (1996) Etoposide and doxorubicin antagonize the in vitro activity of paclitaxel in human non-small cell lung cancer cell lines. *Lung Cancer*, 15: 93-101.

10. CONCLUSIÓN

El presente trabajo de tesis demuestra que las micelas formadas por los gangliósidos, específicamente aquellas formadas por el monosialogangliósido GM1, tienen la capacidad de interactuar espontáneamente con fármacos oncológicos de distinta naturaleza polar; hidrofóbicos como los taxanos y anfipáticos como la doxorubicina. Se determinó que esta asociación está dominada principalmente por interacciones de tipo hidrofóbicas, entre el núcleo de la micela y los fármacos, y que no se ve afectada por cambios en el pH y concentración salina del medio. Sin embargo, la temperatura sí es un factor que puede modificar esta interacción, principalmente en el caso de la incorporación de Ptx en la micela de GM1. Este efecto de la temperatura se relaciona con el hecho de que las micelas de GM1 experimentan una deshidratación de los grupos polares de su cubierta hidrofílica cuando la temperatura llega a los 55 o 60 °C. Además, esta deformación de la región hidrofílica se acompaña de una ligera expansión del núcleo hidrofóbico de la micela, lo que explicaría un aumento en las interacciones hidrofóbicas entre el núcleo de la micela y los taxanos, que se evidencia como una mayor incorporación del fármaco. Por otro lado, se observó que el balance hidrofílico/lipofílico de la estructura auto-agregada es un factor crítico, ya que modificaciones en el mismo llevan a la formación de agregados de diferente forma y tamaño que influyen directamente en la interacción con el fármaco.

Por otra parte, se ha observado que las estructuras micelares formadas por el GM1, ofrecen microdominios de distinta polaridad que hacen factible la incorporación de paclitaxel (hidrofóbico) y doxorubicina (anfipática) de manera simultánea en la misma micela.

Los resultados presentados demuestran que las micelas de GM1 son estructuras muy dinámicas que tienen la capacidad de re-estructurarse, aumentar o disminuir la cantidad de monómeros que las forman y modificar su tamaño, en función de cambios en el medio ambiente y de la naturaleza y cantidad del fármaco con el que interactúan. Es así que el GM1, que existe normalmente en forma de dos poblaciones micelares de distinto tamaño (9 y 27 nm), se estructura de manera diferente en base a si incorpora paclitaxel (Ptx) o doxorubicina (DOX). Para el caso particular del Ptx, se observó que su incorporación en las micelas de GM1 produce una estabilización de las micelas de menor tamaño, de alrededor de 10 nm. Por el contrario, la incorporación de DOX en el GM1 produce una reestructuración dinámica de aquellas micelas de tamaño mayor. Además se ha observado que el radio hidrodinámico de las micelas de GM1 también se modifica como resultado de la interacción con los dos fármacos, disminuyendo en el caso del Ptx y aumentando en el caso de la DOX.

También se demostró que los complejos micelares formados son muy estables en solución acuosa, debido a que la incorporación de fármacos en estas estructuras produjo un desplazamiento del equilibrio micela-monómero hacia el estado micelar. Además los complejos GM1-fármaco soportaron ciertas condiciones físicas como procesos de centrifugación, diálisis, congelamiento-descongelamiento y de liofilización-solubilización. De esta manera los fármacos formulados en micelas de GM1 podrían ser aptos para ser mantenidos tanto en estado líquido como sólido sin que se alteren las propiedades fisico-químicas del sistema.

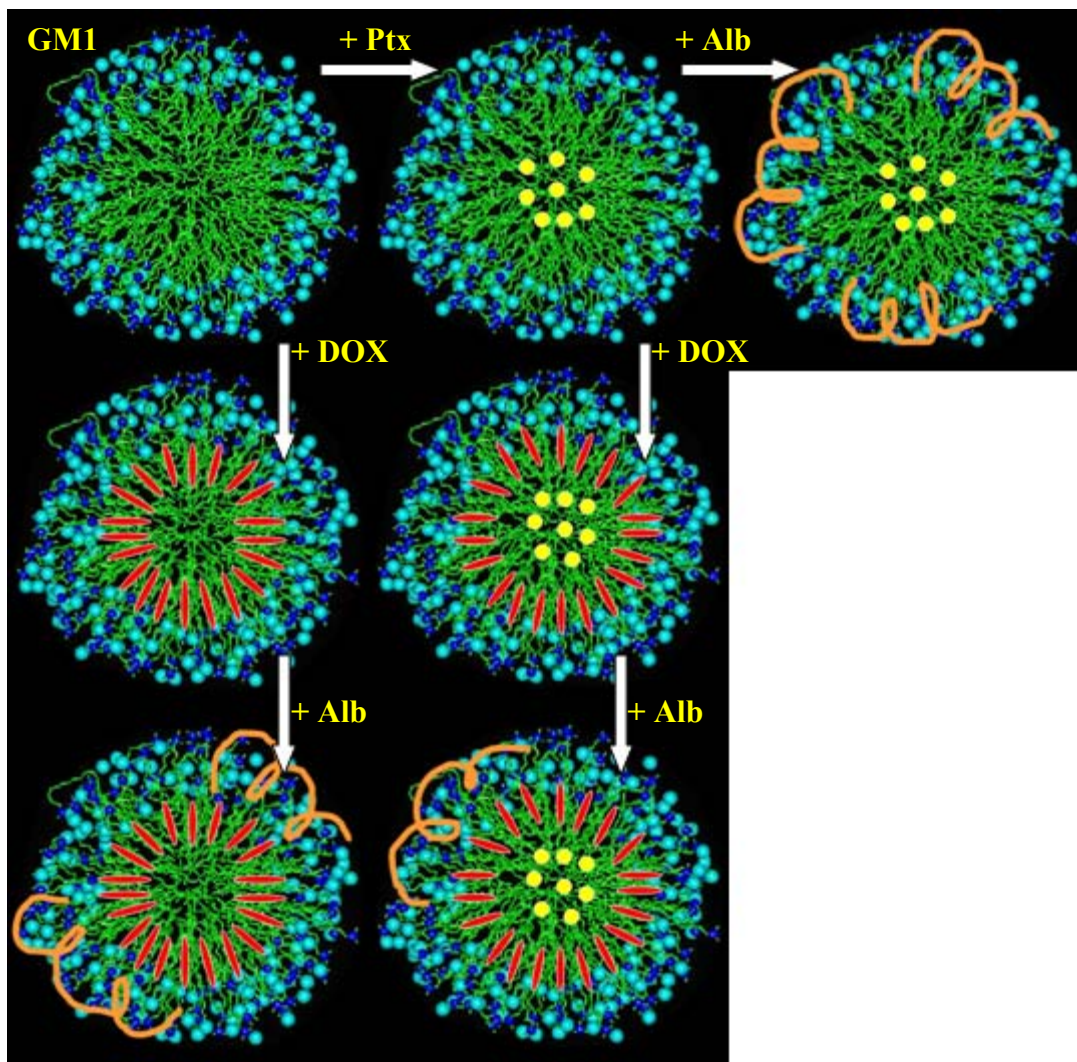
Considerando el hecho de que la mayoría de los fármacos oncológicos se administran por vía endovenosa, resultó importante evaluar la interacción de los complejos micelares formados con los distintos componentes sanguíneos. Así, se demostró que éstos no producen lisis de glóbulos rojos, ni influyen en la actividad plaquetaria; sin embargo producen una disminución de la población linfocitaria, efecto debido a la citotoxicidad del Ptx sobre esta clase celular. Por otro lado se demostró que los complejos presentan la capacidad de interactuar con la albúmina sérica humana. Se demostró que esta asociación es también dominada por fuerzas hidrofóbicas ya que el aumento de la hidrofobicidad de la micela producto del calentamiento hasta los 55 °C, como así también la incubación de la proteína a pH 3 en donde ésta expone sus residuos hidrofóbicos al ambiente acuoso, son condiciones que favorecen notablemente la interacción. Esta cualidad resulta muy beneficiosa en el caso de formulaciones para fármacos oncológicos ya que existen evidencias de que las células tumorales sobre-expresan receptores específicos para albúmina, lo que permitiría una mayor acumulación de los complejos con albúmina en el sitio específico del tumor. Además la molécula de albúmina podría cumplir un rol semejante al que cumple el PEG en los liposomas, protegiendo a la nanoestructura, disminuyendo su inmunogenicidad y el reconocimiento por el SRE, aumentando su biodisponibilidad y el tiempo de vida media en circulación.

Por último, se demostró que las estructuras micelares son capaces de liberar el o los fármacos encapsulados al entrar en contacto con células, aún cuando las micelas se encuentran asociadas con albúmina. Además, el efecto citotóxico *in-vitro* de los fármacos liberados por las micelas demostró ser similar al de las drogas libres en solución. Por otro lado, estudios *in-vivo* evidenciaron que el Ptx encapsulado en las micelas produce un efecto biológico similar a la formulación comercial del fármaco.

Todos estos resultados nos permiten sugerir que estas nanomicelas auto-ensambladas, formadas por el monosialogliósido GM1, podrían resultar en un modelo

factible para la vehiculización de uno o más fármacos de distinta naturaleza polar en medios acuosos.

A continuación se presenta un modelo que representa las asociaciones que ocurren entre las micelas de GM1, los fármacos (Ptx y DOX) y la albúmina (Alb), para dar origen a las distintas nanoestructuras descritas a lo largo de este trabajo de investigación.

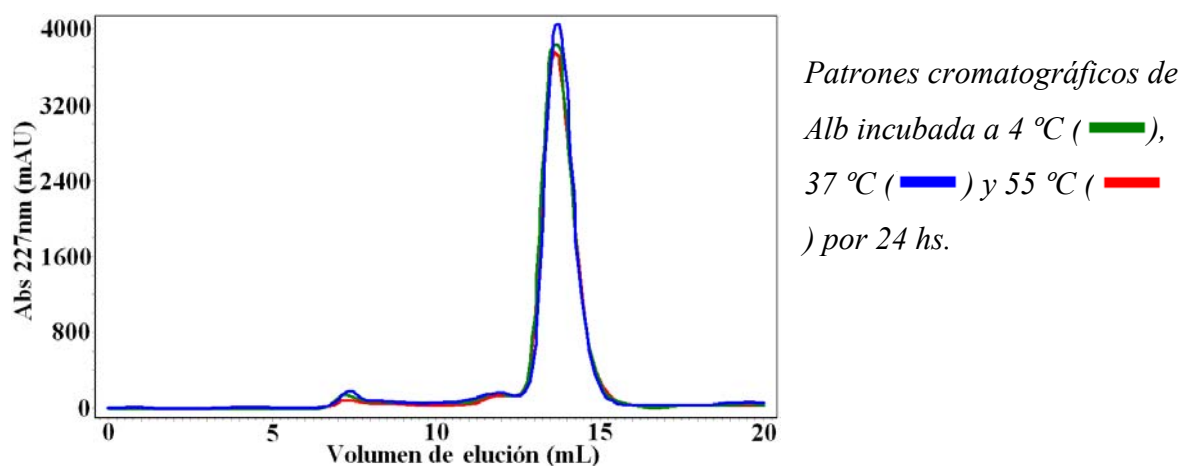


11. APÉNDICES

11.1 APÉNDICE I

La albúmina humana purificada fue sometida al mismo tratamiento de temperatura en el que se llevaron a cabo las incubaciones de los complejos GM1/Ptx con esta proteína, en este caso en ausencia de las micelas; con el fin de obtener el perfil cromatográfico control de la albúmina en las distintas condiciones de temperatura ensayadas.

Como se muestra en la siguiente figura, en todas las condiciones de temperatura ensayadas, desde 4 a 55 °C, no se observaron diferencias significativas en el perfil de elución de la proteína.



11.2 APÉNDICE II

Se incubó a la albúmina humana purificada en distintas condiciones de pH (3, 5 y 7) por 24 hs, en ausencia de los complejos micelares GM1/Ptx, con el objetivo de obtener el perfil cromatográfico control de la proteína bajo estas condiciones. Sin embargo hay que tener en cuenta que una vez concluido el tiempo de incubación, sea de la proteína sola en este caso o de los complejos GM1/Ptx con Alb, siempre se vuelve a neutralizar la solución hasta pH 7 antes de analizar la muestra por cromatografía de exclusión molecular.

Como se muestra en la figura, en todas las condiciones de pH ensayadas, no se observaron diferencias significativas en el perfil de elución de la albúmina. Este resultado probablemente se deba a que los cambios conformacionales que sufre la proteína con el pH sean de tipo reversible y una vez finalizado el tiempo de incubación, la posterior neutralización de la solución hasta pH 7 hace que la proteína vuelva a adoptar su estado conformacional nativo.

