



FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA
Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

NANOPARTÍCULAS DE PLGA: UNA APORTACIÓN INNOVADORA EN EL USO TERAPÉUTICO DE CANNABINOIDES

Memoria presentada por Inmaculada Muñoz Rubio para
optar al Grado de Doctor por la Universidad de Sevilla

Sevilla, 2013



FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA
Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

Memoria presentada por Inmaculada Muñoz Rubio para
optar al Grado de Doctor por la Universidad de Sevilla

Fdo. Inmaculada Muñoz Rubio

Vº Bº

Las Directoras de la Tesis Doctoral

Fdo. Dra. Mercedes Fernández Arévalo

Profesora Titular de Universidad
Departamento de Farmacia
y Tecnología Farmacéutica

Fdo. Dra. M^a de los Ángeles Holgado Villafuerte

Profesora Titular de Universidad
Departamento de Farmacia
y Tecnología Farmacéutica

Fdo. Dra. Lucía Martín Banderas

Contratada Postdoctoral Excelencia
Junta de Andalucía
Departamento de Farmacia
y Tecnología Farmacéutica



FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA
Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

D^a MERCEDES FERNÁNDEZ ARÉVALO, Profesora Titular de Universidad del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, D^a M^a ANGELES HOLGADO VILLAFUERTE, Profesora Titular de Universidad del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla y D^a LUCÍA MARTÍN BANDERAS, Contratada Postdoctoral de Excelencia de la Junta de Andalucía en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICAN: que la memoria que se presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla, realizada por la Licenciada en Farmacia D^a Inmaculada Muñoz Rubio, cuyo título es “NANOPARTÍCULAS DE PLGA: UNA APORTACIÓN INNOVADORA EN EL USO TERAPÉUTICO DE CANNABINOIDES” ha sido realizada bajo la dirección de las profesoras que suscriben y reúne todos los requisitos para su juicio y calificación.

Para que conste, y a petición de la interesada, firmamos el presente en Sevilla, a Febrero de dos mil trece.

D^a Mercedes Fernández Arévalo

D^a María de los Ángeles Holgado Villafuerte

D^a Lucía Martín Banderas



FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA
Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

D^a María Luisa González Rodríguez, Profesora Titular de Universidad y Directora del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA: que la Tesis Doctoral elaborada por la Licenciada en Farmacia D^a Inmaculada Muñoz Rubio, ha sido dirigida por la Dra. Mercedes Fernández Arévalo, la Dra. María de los Ángeles Holgado Villafuerte y la Dra. Lucía Martín Banderas, habiéndose realizado en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, cumpliendo todas las normas vigentes.

Para que conste, y a petición de la interesada, firmo el presente en Sevilla, a Febrero de dos mil trece.

D^a María Luisa González Rodríguez

Sevilla, Febrero 2013



FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA
Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

El Consejo de Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Sevilla,

INFORMA: que la memoria presentada para optar al grado de Doctor, realizada por la Licenciada en Farmacia D^a Inmaculada Muñoz Rubio, cuyo título es "NANOPARTÍCULAS DE PLGA: UNA APORTACIÓN INNOVADORA EN EL USO TERAPÉUTICO DE CANNABINOIDES", bajo la dirección de la Dra. Mercedes Fernández Arévalo, la Dra. María de los Ángeles Holgado Villafuerte y la Dra. Lucía Martín Banderas, reúne todos los requisitos necesarios para ello.

Para que conste, y a petición de la interesada, se firma el presente en Sevilla, a Febrero de dos mil trece.

A mi Familia

La realización de la presente Tesis Doctoral es resultado del esfuerzo conjunto de muchas personas que me han apoyado y ayudado durante este largo y, en ocasiones, arduo camino de dedicación y trabajo. Por ello, aprovecho estas líneas para expresarles mi más profundo y sincero agradecimiento.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mis directoras, Dra. Mercedes Fernández Arévalo, Dra. M^a Ángeles Holgado Villafuerte y Dra. Lucia Martín Banderas, por brindarme la oportunidad de trabajar con ellas, proporcionarme la formación científica y dirigir esta Tesis. Mercedes, gracias por tu confianza, cariño y apoyo. Gracias M^a Ángeles por tus consejos y ayuda incondicional. Y gracias Lucia por tu exigencia, tu infinita paciencia y tus conocimientos científicos.

Mención especial merece la Dra. Josefa Álvarez Fuentes, *cuasi* directora de la presente Tesis. Gracias también por tus conocimientos y dedicación.

Al resto de componentes del grupo de investigación CTS-480, por vuestra constante disposición y ayuda. Especialmente a Mati y Mario, por alegrarme día a día con su compañía en el departamento.

A todos los miembros de Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, especialmente a mis compañeros y compañeras de laboratorio, por compartir conmigo tantos buenos y malos momentos. A M^a Ángeles Serra, por su ayuda como alumna interna en esta última etapa.

Gracias al Consejo Andaluz de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, por otorgarme una beca para realización de un trabajo de investigación y otra para la realización de la Tesis Doctoral.

Al Dr. José Luis Arias Mediano, del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de Granada, gracias por tu ayuda, tu apoyo y tus consejos. También me gustaría mencionar tanto a los servicios de Biología y Microscopía del CITIUS, como al grupo de investigación *Cáncer* (CTS-657) del Departamento de Farmacología de la Universidad de Sevilla, por la ayuda y los servicios prestados.

Ya fuera del ámbito profesional, me gustaría dar las gracias a todas las personas que han pasado por mi vida en estos últimos años y han contribuido con su apoyo y su presencia a alcanzar esta meta.

A mis compañeros y amigos, Carlos y Dani, por apoyarnos y ayudarnos mutuamente durante este largo camino. Por esos momentos inolvidables, cerveza en mano, filosofando sobre la vida y nuestro “gran” futuro. Carlos, son muchos los años que llevamos aguantándonos, gracias por ser tan “tú”.

A mis amigos y amigas farmacéuticos/as, por acompañarme durante estos años y hacerme valorar la palabra amistad. Especialmente a María y mis Cristinas, ¡os adoro! A mis amigos y amigas no farmacéuticos, por esos jueves de Vizcaíno, en los que se para el tiempo para echar un buen rato con vuestra compañía. Gracias a Anita, Torres y Patri.

Especial mención se merecen mis amigos de “Onuba”, por estar a mi lado a pesar de la distancia, gracias por vuestro cariño y apoyo. Ro, Ra, Silvi, Javi, Luisa y Cristi, sois los mejores, gracias.

A toda mi familia. Gracias por vuestra dedicación, sacrificio, paciencia y amor. Gracias por enseñarme y apoyarme a afrontar las dificultades del día a día. Gracias por darme las fuerzas necesarias para continuar y siempre con la cabeza alta. Gracias a mis padres, Antonio y Plácida, y mi hermano Antonio, por todo lo que sois para mí. A mis tíos y primos, por su cariño. Especialmente a mi tía Joaqui, por enseñarme lo importante que es la vida y luchar por ella.

Y por último, quiero agradecerse a la persona que ha estado día a día a mi lado. Gracias por hacerme feliz. Gracias por tu ayuda y tu apoyo incondicional. Esta Tesis también es tuya. Muchas gracias, Carlos.

ÍNDICE

RESUMEN	3
CAPÍTULO I	9
1. CANNABINOIDES	9
1.1. Relación estructural de los cannabinoides principales	10
1.2. Sistema cannabinoide endógeno	12
1.2.1. Receptores endógenos	12
1.2.2. Cannabinoides endógenos	15
1.3. Ligandos que se unen a los receptores cannabinoides endógenos	16
1.4. Aplicaciones terapéuticas de los derivados cannabinoides	19
1.4.1. Dolor neuropático	23
1.4.1.1. Neurobiología del dolor neuropático	25
1.4.1.2. Evaluación del dolor neuropático	27
1.4.1.3. Farmacología y tratamiento del dolor neuropático	29
1.4.2. Cáncer	32
1.4.2.1. Factores de riesgo del cáncer	35
1.4.2.2. Diagnóstico y detección precoz del cáncer	39
1.4.2.3. Tratamiento del cáncer	40
1.5. Limitaciones en la aplicación terapéutica de los cannabinoides	43
2. NANOTECNOLOGÍA FARMACÉUTICA	46
2.1. Nanopartículas poliméricas	52
2.1.1. Métodos de elaboración de nanopartículas de PLGA	57
2.1.2. Propiedades físico-químicas de las nanopartículas de PLGA	58
2.1.3. Limitaciones de las nanopartículas de PLGA como sistemas de administración de fármacos	58
2.2. Funcionalización de nanopartículas de PLGA para administración oral	60
2.2.1. Quitosano (CS)	61
2.2.1.1. Adsorción de CS por interacción electrostática	63
2.2.1.2. Adsorción de CS por modificación química	65
2.2.2. Polietilenglicol (PEG)	67
2.2.3. Vitamina E	69
2.2.4. Metacrilatos (Eudragit®)	70

2.2.5. Lectinas	72
2.2.6. Lecitinas	75
2.2.7. Sales biliares	77
2.2.8. Péptido RGD	78
OBJETIVOS	85
CAPÍTULO II	91
1. INTRODUCCIÓN	91
2. MATERIALES Y MÉTODOS	93
2.1. Materiales	93
2.2. Método de cuantificación: cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)	94
2.2.1. Equipamiento y condiciones cromatográficas	95
2.2.2. Preparación de las soluciones estándar y de muestra	96
2.2.3. Validación del método analítico	96
2.2.3.1. Selectividad/especificidad	97
2.2.3.2. Precisión	98
2.2.3.3. Exactitud	99
2.2.3.4. Linealidad	100
2.2.3.5. Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)	101
2.2.3.6. Robustez	102
2.3. Elaboración de las nanopartículas	102
2.4. Modificación superficial de las nanopartículas de PLGA	105
2.5. Estudios de caracterización de las nanopartículas	106
2.5.1. Determinación del tamaño medio y distribución de tamaños	106
2.5.2. Determinación de la morfología y el aspecto	106
2.5.3. Determinación de la carga superficial	107
2.6. Determinación del contenido en CB13	107
2.7. Determinación del contenido residual de Pluronic® F68	108
2.8. Caracterización térmica mediante calorimetría diferencial de barrido	109
2.9. Estudio de estabilidad	110
2.10. Optimización del proceso de liofilización	111

2.11. Estudio de liberación <i>in vitro</i>	112
2.12. Propiedades mucoadhesivas <i>ex vivo</i>	113
2.13. Estudios en líneas celulares	115
2.13.1. Cultivo celular	115
2.13.2. Viabilidad celular <i>in vitro</i>	115
2.13.3. Estudios de captación celular <i>in vitro</i>	116
2.14. Análisis estadístico	117
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	118
3.1. Método de cuantificación por RP-HPLC	118
3.1.1. Condiciones cromatográficas	118
3.1.2. Validación del método analítico	118
3.1.2.1. Selectividad/especificidad	118
3.1.2.2. Precisión	120
3.1.2.3. Exactitud	123
3.1.2.4. Linealidad	125
3.1.2.5. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)	127
3.1.2.6. Robustez	128
3.2. Caracterización de las nanopartículas elaboradas	131
3.2.1. Determinación del tamaño medio y distribución de tamaños	131
3.2.2. Determinación de la morfología y el aspecto	135
3.2.3. Determinación de la carga superficial	136
3.3. Determinación del contenido en CB13	138
3.4. Determinación del contenido residual de Pluronic® F68	143
3.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	148
3.6. Estudio de estabilidad	149
3.7. Optimización del proceso de liofilización	151
3.8. Estudio de liberación <i>in vitro</i>	154
3.9. Propiedades mucoadhesivas <i>ex vivo</i>	159
3.10. Estudios en líneas celulares	161
3.10.1. Viabilidad celular <i>in vitro</i>	161
3.10.2. Estudios de captación celular <i>in vitro</i>	163

3.11. Prueba de concepto: Evaluación <i>in vivo</i> del dolor neuropático	167
CAPÍTULO III	
1. INTRODUCCIÓN	171
2. MATERIALES Y MÉTODOS	174
2.1. Materiales	174
2.2. Método RP-HPLC: Desarrollo y validación del método analítico	176
2.2.1. Equipamiento y condiciones cromatográficas	176
2.2.2. Preparación de las soluciones estándar y de muestra	177
2.2.3. Validación del método analítico	178
2.2.3.1. Selectividad/especificidad	179
2.2.3.2. Precisión	180
2.2.3.3. Exactitud	181
2.2.3.4. Linealidad	182
2.2.3.5. Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)	183
2.2.3.6. Robustez	184
2.3. Elaboración de las nanopartículas	185
2.4. Modificación superficial de las nanopartículas de PLGA	187
2.5. Estudios de caracterización de las nanopartículas	187
2.5.1. Determinación del tamaño medio y distribución de tamaños	187
2.5.2. Determinación de la morfología y el aspecto	188
2.5.3. Determinación de la carga superficial de las nanopartículas	188
2.6. Determinación del contenido en THC de las nanopartículas de PLGA	189
2.7. Análisis por espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR)	190
2.8. Estudios de adsorción superficial de proteínas	190
2.9. Estudio de hemocompatibilidad de las nanopartículas de PLGA	191
2.10. Estudio de liberación <i>in vitro</i>	195
2.11. Estudios <i>in vitro</i>	196
2.11.1. Cultivos celulares	196
2.11.2. Estudios de captación celular <i>in vitro</i>	197
2.11.3. Viabilidad celular <i>in vitro</i> : Estudio de la actividad antitumoral	199

2.12. Análisis estadístico	202
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	203
3.1. Método de cuantificación por RP-HPLC	203
3.1.1. Condiciones cromatográficas	203
3.1.2. Validación del método analítico	203
3.1.2.1. Selectividad/especificidad	203
3.1.2.2. Precisión	205
3.1.2.3. Exactitud	208
3.1.2.4. Linealidad	209
3.1.2.5. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)	210
3.1.2.6. Robustez	212
3.2. Caracterización de las nanopartículas elaboradas	214
3.2.1. Determinación del tamaño medio y distribución de tamaños	214
3.2.2. Determinación de la morfología y el aspecto	217
3.2.3. Determinación de la carga superficial	219
3.3. Determinación del contenido en THC	222
3.4. Análisis por espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR)	224
3.5. Estudios de adsorción superficial de proteínas	228
3.6. Estudio de hemocompatibilidad	230
3.7. Perfil de liberación <i>in vitro</i>	231
3.8. Estudios celulares <i>in vitro</i>	234
3.8.1. Estudios de captación celular <i>in vitro</i>	234
3.8.2. Viabilidad celular <i>in vitro</i> : Estudio de la actividad antitumoral	239
CONCLUSIONES	253
FUTURO Y PERSPECTIVAS	259
BIBLIOGRAFÍA	263

CAPÍTULO I		
Figura 1	Planta de Cannabis sativa.	9
Figura 2	Estructura química de: a) Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC ó THC); b) Δ^8 -tetrahidrocannabinol (Δ^8 -THC); c) cannabidiol (CBD) y d) cannabinol (CBN).	10
Figura 3	Representación esquemática de los receptores CB1 y CB2. Los receptores tienen siete segmentos transmembrana. ● Aminoácidos comunes a los dos receptores; ○ aminoácidos diferentes; ψ sitios de glicosilación. e1, e2, e3 son asas extracelulares; i1, i2, i3 son asas intracelulares.	13
Figura 4	Estructura química de la anandamina y del 2-araquidonil-glicerol.	16
Figura 5	Síndromes en los que se manifiesta dolor neuropático (DN).	27
Figura 6	A) estudios de imagen utilizados en la evaluación del dolor neuropático; b) ejemplo de teletermografía infrarroja en paciente afecto de síndrome doloroso regional complejo (SDRC o DSR) tipo I.	28
Figura 7	Incidencia y mortalidad de los cánceres más frecuentemente diagnosticados en todo el mundo, en 2008.	34
Figura 8	Principales áreas de aplicación de la Nanomedicina y Nanotecnología Farmacéutica.	47
Figura 9	Tipos de nanosistemas terapéuticos.	51
Figura 10	Dibujo esquemático de nanocápsulas y nanoesferas.	52
Figura 11	Representación esquemática de la internalización de nanopartículas en las células.	56
Figura 12	Adsorción de quitosano sobre la superficie de nanopartículas de PLGA cargadas negativamente.	63
Figura 13	Perfiles de calcio en sangre tras administración intragástrica de calcitonina a ratas en ayunas: □ solución de calcitonina; Δ nanopartículas de PLGA sin recubrimiento cargadas con calcitonina; ○ nanopartículas de PLGA recubiertas con quitosano cargadas con calcitonina.	65

Figura 14	Ilustración esquemática de una nanopartícula de PLGA modificada, compuesta de un núcleo híbrido de dextrano-PLGA, una monocapa lipídica de carácter anfifílico en la superficie del núcleo y decorada por cadenas hidrófilas de polietilenglicol.	76
CAPÍTULO II		
Figura 15	Elaboración de nanopartículas de PLGA por el método de nanoprecipitación.	103
Figura 16	Montaje llevado a cabo para los estudios de mucoadhesión de las nanopartículas elaboradas sobre mucosa de cerdo.	114
Figura 17	(a) Cromatogramas obtenidos para el placebo (verde), el disolvente (amarillo) y el estándar de CB13 (rojo); (b) Cromatograma representativo del CB13 (tiempo de retención=10.88 min).	119
Figura 18	(a) Linealidad del sistema correspondiente al intervalo de concentraciones de 250-750 µg/mL de CB13. (b) Linealidad del método correspondiente al intervalo de concentraciones de 250-750 µg/mL de CB13 agregado a una solución de placebo.	126
Figura 19	(a) LOD-LOQ obtenido tras la representación de la concentración frente a sus RSD. (b) Linealidad correspondiente al intervalo de concentración 2.5-750 µg/mL de CB13.	127
Figura 20	Histogramas de la distribución de tamaños de diferentes formulaciones elaboradas.	135
Figura 21	(A) Histograma de la distribución de tamaños de nanopartículas de PLGA cargadas con CB13 (polímero usado: R502) (10 % p/p); (B) Microfotografía SEM de la misma formulación.	136
Figura 22	Representación gráfica de la eficacia de encapsulación (% EE) y carga del fármaco (% p/p), en función del aditivo empleado para el recubrimiento superficial de las nanopartículas de PLGA cargadas con CB13 (13 % p/p) (polímero usado: R502) (n=3).	141
Figura 23	Espectros de ¹ H-RMN obtenidos para: a) CB13; b) PLGA Resomer [®] 502 y c) Pluronic [®] F68.	145

Figura 24	Espectros de ^1H -RMN obtenidos para a) nanopartículas de PLGA sin fármaco y b) nanopartículas de PLGA cargadas con CB13 (20 % p/p).	146
Figura 25	Termogramas correspondientes a Resomer [®] 502, CB13 libre, Pluronic [®] F68 y nanopartículas de PLGA sin carga y cargadas con CB13 (6 y 20 % p/p), obtenidos mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC).	148
Figura 26	Tamaño y distribución de tamaños obtenidos antes y después de la incubación en diferentes medios de incubación.	150
Figura 27	Microfotografía SEM de nanopartículas de PLGA tras su liofilización sin la adición de crioprotectores.	152
Figura 28	Efecto de la adición de crioprotectores en el tamaño y distribución de tamaños de nanopartículas de PLGA.	153
Figura 29	Perfiles de liberación <i>in vitro</i> de nanopartículas de PLGA, utilizando diferentes tipos de Resomer [®] y con 20 % (p/p) de contenido teórico del fármaco.	155
Figura 30	Perfiles de liberación <i>in vitro</i> de nanopartículas de PLGA (polímero utilizado: R502) modificadas superficialmente utilizando diferentes aditivos (Lec: lecitina; VitE: vitamina E; CS: quitosano; Eud: Eudragit [®] RS; PLGA: sin modificar) y con 13 % (p/p) de contenido teórico de fármaco.	157
Figura 31	A) Valores de % de mucoadhesión de nanopartículas de PLGA sin modificar y con superficie modificada; Fotografías tomadas con un microscopio de fluorescencia (Leica DFC425C; Leica Microsystems, Barcelona, España) para nanopartículas de PLGA recubiertas con quitosano en el íleon (B), yeyuno (C) y duodeno (D).	160
Figura 32	Viabilidad celular en células Caco-2 tras la incubación de nanopartículas de PLGA sin modificar y modificadas superficialmente, blancas y cargadas con CB13 a diferentes concentraciones. a) 24 horas y b) 48 horas	163

Figura 33	Histogramas de la fluorescencia obtenida en las células Caco-2 tras la incubación de: (A) nanopartículas fluorescentes de PLGA, t= 30 min y (B) t= 120 min; (C) nanopartículas fluorescentes de PLGA recubiertas con Eudragit® RS, t= 30 min y (D) t= 120 min; (E) nanopartículas fluorescentes de PLGA recubiertas con quitosano, t= 30 min y (F) t= 120 min.	165
Figura 34	Imágenes obtenidas por CLSM de células Caco-2 tras la incubación de nanopartículas de PLGA modificadas con quitosano y cargadas con Nile-Red (tiempo de incubación= 2 horas).	166
Figura 35	Efecto antinociceptivo de CB13 libre y encapsulado en nanopartículas de PLGA tras el test rat paw-pressure.	168
CAPÍTULO III		
Figura 36	Representación esquemática del método de nanoprecipitación: (a) por diálisis, a través de una membrana; (b) por la técnica del goteo.	186
Figura 37	a) Cromatogramas obtenidos para el placebo (verde), disolvente (amarillo) y el estándar de THC (rojo); (b) Cromatograma representativo del THC, con su tiempo de retención (t = 4.27 min).	204
Figura 38	(a) Linealidad del sistema correspondiente al intervalo de concentraciones de 250-750 µg/mL de THC. (b) Linealidad del método correspondiente al intervalo de concentraciones de 250-750 µg/mL de THC agregado a una solución de placebo.	210
Figura 39	(a) LOD-LOQ obtenido tras la representación de la concentración frente a sus D.E.R. (b) Linealidad correspondiente al intervalo de concentración 20-100 µg/mL de THC.	212
Figura 40	Tamaño de partícula, distribución de tamaños y valores de potencial zeta obtenidos para las nanopartículas de PLGA sin modificar y con superficie modificada, blancas y cargadas con THC (5 % p/p) (polímero usado: R502) (n=3).	216
Figura 41	Histogramas de la distribución de tamaños de una formulación de nanopartículas de PLGA recubierta con CS y PEG.	217

Figura 42	Morfología de (a) nanopartículas de PLGA recubiertas con CS, (b) nanopartículas de PLGA recubiertas con PEG y (c) nanopartículas de PLGA recubiertas con CS y PEG, estudiadas por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).	218
Figura 43	Valores de eficacia de encapsulación (EE %) (barras azules) y de carga de fármaco (% p/p) (puntos rojos) obtenidos para las nanopartículas de PLGA sin modificar y de superficie modificada, cargadas con THC (5 % p/p) (n=3).	223
Figura 44	(1) Espectros de FTIR de (A) PLGA; (B) PEG; (C) CS; (D) nanopartículas de PLGA; (E) nanopartículas de PLGA recubiertas con PEG; (F) nanopartículas de PLGA recubiertas con PEG-CS y (G) THC; (2) Estructura molecular de (A) PLGA; (B) PEG; (C) CS y (D) THC.	226
Figura 45	Valores de potencial zeta para las nanopartículas de PLGA, blancas o cargadas con THC, antes y después de la incubación en 1 mL de una solución de BSA a 400 µg/ml durante 2 horas a 37 ° C (Barra de error: D.E.; n = 3).	229
Figura 46	Perfiles de liberación <i>in vitro</i> de nanopartículas de PLGA modificadas y sin modificar superficialmente en función de la carga del fármaco: 1.5 y 5 % p/p.	232
Figura 47	Imágenes obtenidas por CLSM de células Caco-2 tras la incubación de: a) nanopartículas de PLGA sin modificar; b) nanopartículas de PLGA modificadas con polietilenglicol (PEG) y c) nanopartículas de PLGA modificadas con quitosano y polietilenglicol (PEG-CS); (fluorocromo: Nile-Red; tiempo de incubación= 30 minutos).	236
Figura 48	Efecto del tiempo de incubación y de las modificaciones superficiales sobre las nanopartículas de PLGA cargadas con THC (5 % p/p), sobre la captación de las nanopartículas por células Caco-2. (200 µg/mL, n = 6).	237
Figura 49	Viabilidad celular en células Caco-2 tras la incubación de las nanopartículas de PLGA sin modificar y modificadas superficialmente, blancas y cargadas con THC a diferentes concentraciones. a) 24 h, b) 48 h, c) 72 h, d) 96 h, e) 120 h, f) 168 h y g) 216 h.	240

Figura 50	<i>Viabilidad celular en células MRC-5 y A549 tras la incubación de las nanopartículas de PLGA sin modificar y modificadas superficialmente, blancas y cargadas con THC a diferentes concentraciones a 72 horas.</i>	246
------------------	--	-----

CAPÍTULO I		
Tabla 1	Principales acciones terapéuticas de los cannabinoides.	20
Tabla 2	Posibles aditivos empleados para la funcionalización de las nanopartículas de PLGA para la administración oral de fármacos.	80
CAPÍTULO II		
Tabla 3	Características de los distintos tipos de Resomer®.	93
Tabla 4	Condiciones de estrés sugeridas para los estudios de degradación de un fármaco.	98
Tabla 5	Áreas cromatográficas y porcentaje de degradación obtenidos al someter la muestra de CB13 a condiciones de estrés.	120
Tabla 6	Áreas cromatográficas y tiempos de retención (min) correspondientes al estudio de precisión instrumental.	121
Tabla 7	Precisión intermedia, desarrollada por dos analistas, en dos días diferentes, para dos muestras (M1 y M2).	123
Tabla 8	Valores obtenidos en el estudio de exactitud de las muestras de placebo cargadas con CB13 (y reproducibilidad, en niveles I, III y V).	124
Tabla 9	Valores obtenidos en el estudio de robustez.	129
Tabla 10	Tamaño de partícula y distribución de tamaños, coeficiente de variación intra- e interlote y valores de PZ obtenidos en función del polímero utilizado en la preparación de las nanopartículas (n=6).	132
Tabla 11	Tamaño de partícula y distribución de tamaños en función de la concentración de tensioactivo (Span® 60) ensayada (n=3).	133
Tabla 12	Tamaño y distribución de tamaños en función del contenido inicial de CB13 (polímero usado: R502) (n=3).	133
Tabla 13	Tamaño de partícula y distribución de tamaños, coeficiente de variación y valores de PZ obtenidos para las nanopartículas de PLGA sin modificar y de superficie modificada, blancas y cargadas con CB13 (13 % p/p) (polímero usado: R502) (n=3).	134

Tabla 14	Eficacia de encapsulación (% EE) y carga del fármaco (% p/p) obtenidos en función del polímero utilizado y de la carga inicial de CB13 (n=6).	138
Tabla 15	Eficacia de encapsulación (% EE) y carga del fármaco (% p/p) obtenidos para las nanopartículas de PLGA sin modificar y de superficie modificada, cargadas con CB13 (13 % p/p) (polímero usado: R502) (n=3).	141
Tabla 16	Contenido residual de Pluronic® F68 adsorbido en varias formulaciones, obtenidos tras el análisis de ¹ H-RMN.	147
Tabla 17	Carga del CB13 (% p/p) obtenida para las nanopartículas de PLGA, mediante análisis de ¹ H-NMR.	148
Tabla 18	Valores de tamaño ± D.E. (nm) de nanopartículas de PLGA antes de liofilizar, tras liofilizar sin crioprotector y tras la adición de crioprotectores: propilenglicol, manitol y trealosa en concentraciones de 5, 10 y 50 % p/p con respecto a las nanopartículas de PLGA (polímero usado: R502) (n=3).	153

CAPÍTULO III

Tabla 19	Áreas cromatográficas y porcentaje de degradación obtenidos al someter la muestra de THC a condiciones de estrés.	205
Tabla 20	Áreas cromatográficas y tiempos de retención (min) correspondientes al estudio de precisión instrumental.	206
Tabla 21	Precisión intermedia, desarrollada por dos analistas, en dos días diferentes, para dos muestras (M1 y M2).	207
Tabla 22	Valores medios obtenidos en el estudio de exactitud de las muestras de placebo cargadas con THC (y reproducibilidad del método, en niveles I, III y V).	208
Tabla 23	Estudio de la robustez del método para la validación del THC.	213

Tabla 24	Tamaño de partícula y distribución de tamaños de las nanopartículas de PLGA en función del polímero utilizado (R502 o R502H) y de la carga de THC (0, 1.5, 3 y 5 % p/p).	215
Tabla 25	Valores de potencial zeta de las nanopartículas de PLGA en función del polímero utilizado (R502 o R502H) y la carga del THC (0, 1.5, 3 y 5 % p/p).	220
Tabla 26	Eficacia de encapsulación (EE %) y carga de fármaco (THC % p/p) de las nanopartículas de PLGA en función del polímero utilizado (R502 o R502H) y la carga inicial del THC (CTHC: 1.5, 3 y 5 % p/p).	222
Tabla 27	Hemocompatibilidad de las nanopartículas de PLGA blancas y cargadas con THC (5 % p/p), sin modificar y modificadas superficialmente, en términos de hemólisis (%); activación plaquetaria (sP-selectina liberada, ng/mL), activación del complemento (liberación de C3a: C3a desArg, ng/mL) y tiempo de coagulación plasmática ($T_{1/2}$ máx, min).	231
Tabla 28	Valores de R^2 obtenidos tras el ajuste cinético del perfil de liberación <i>in vitro</i> de las nanopartículas de PLGA sin modificar y modificadas superficialmente, a baja dosis (1.5 % p/p) y alta dosis (5 % p/p) del THC.	234
Tabla 29	Valores de DL_{50} obtenidos para el THC libre y para las nanopartículas cargadas con THC, a diferentes tiempos de incubación.	244
Tabla 30	Valores de DL_{50} obtenidos para el THC libre y para las nanopartículas cargadas con THC, a 72 horas, en las dos líneas celulares estudiadas.	249

ABREVIATURAS

Δ^8-THC	Delta-8- tetrahidrocannabinol
Δ^9-THC o THC	Delta-9- tetrahidrocannabinol
$^1\text{H-RMN}$	Resonancia magnética nuclear
2-AG	2-araquidonil-glicerol
4T1	Línea celular de cáncer de mama murino
5-HT 3	Receptor de serotonina
A549	Células humanas de adenocarcinoma de pulmón
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEA	Anandamida
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Test estadístico de análisis de la varianza
APC	Células presentadoras de antígenos
ARN	Ácido ribonucleico
ATC	Antidepresivos tricíclicos
AUC	Área bajo la curva
BCS	Sistema de Clasificación Biofarmacéutica
BSA	Albúmina de suero bovino
C6	Línea celular de glioma de rata
CaCl₂	Cloruro cálcico
Caco-2	Línea celular humana de adenocarcinoma de colon
CB1	Receptor de cannabinoides tipo 1
CB13	1-naftalenil-[4-(pentiloxi)-1-naftalenil]-metanona
CB2	Receptor de cannabinoides tipo 2
CBD	Cannabidiol
CBN	Cannabinol
CCL-186	Línea celular de fibroblastos fetales humanos sanos (IMR-90)
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CLSM	Microscopio confocal de barrido láser
CO₂	Dióxido de carbono

Con A	Concanavalina A
CP 55,940	2-[(1R,2R,5R)-5-hidroxi-2-(3-hidroxipropil) ciclohexil]-5-(2-metiloctan-2-il)fenol
CS	Quitosano
CV	Coefficiente de variación
DCA	Ácido desoxicólico
DE	Desviación estándar
DER	Desviación estándar relativa
DL₅₀	Dosis Letal 50
DM	Diabetes Mellitus
DMEM	Medio de cultivo modificado Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DN	Dolor neuropático
DS	Dextrano
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
EA	Enfermedad del Alzheimer
EBSS	Solución salina equilibrada de Earle
ECACC	Colección Europea de Cultivos Celulares
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE	Eficacia de encapsulación
EH	Enfermedad de Huntington
ELA	Esclerosis Lateral Amiotrófica
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
EM	Esclerosis Múltiple
EMA	Agencia Europea de Medicina
EP	Enfermedad del Parkinson
Eu	Eudragit [®]
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Espectroscopia infrarroja transformada de Fourier

GABA	Ácido gamma amino butírico
H1299	Línea celular humana de cáncer de pulmón
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HBPM	Heparina de bajo peso molecular
HCl	Ácido clorhídrico
HeLa	Línea celular derivada de una muestra de cáncer cérvico-uterino obtenida el 8 de febrero de 1951 de una paciente llamada Henrietta Lacks
HHV8	Herpesvirus humano 8
HLB	Balance hidrofílico-lipofílico
HT-29	Línea celular humana derivada de adenocarcinoma de colon
HTLV-1	Virus de la leucemia de células T humanas tipo 1
IASP	Asociación Internacional del estudio del Dolor
ICH	International Conference on Harmonization
IR	Infrarrojo
ISRN	Inhibidores selectivos de la recaptación de noradrenalina-serotonina
LDV	Péptido correspondiente al triplete Leu-Asp-Val
Lec	Lecitina
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
LY320135	4-[6-metoxi-2-(4-metoxifenil)1-benzofuran-3-carbonil]benzonnitrilo
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MCF-7	Línea celular humana de cáncer de mama
MDA-MB-231	Línea celular epitelial de carcinoma de mama
MEM	Medio de cultivo Esencial Mínimo
MRC-5	Células humanas tipo fibroblastos de pulmón fetal
MTT	Bromuro de tetrazolio o Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NaCl	Cloruro sódico
NaOH	Hidróxido sódico
NF-κB	Factor nuclear kappa-B

NHS	N-hidroxisuccinimida
NO	Óxido nítrico
NP(s)	Nanopartículas
O-1057	3-(5'-ciano-1',1'-dimetilpentil)-1-(4-N-morfolinobutiliroxi)- Δ^8 -THC
PBS	Tampón fosfato salino
PC12	Línea celular derivada de un feocromocitoma de la médula suprarrenal de las ratas
PCL	Poli (ϵ -caprolactona)
PEG	Polietilenglicol
PFA	Paraformaldehído
P-gp	P-glicoproteína
PKA	Proteína quinasa A
PKB o AKT	Proteína quinasa B
PKC	Proteína quinasa C
PL	Fosfolipasas
PLA	Poli (ácido láctico)
PLGA	Ácido poli-(láctico-co-glicólico)
PPP	Plasma pobre en plaquetas
PRP	Plasma rico en plaquetas
PRT	Tiempo de recalcificación de plasma
PVA	Alcohol polivinílico
PZ	Potencial zeta
R²	Coefficiente de correlación
RCA	Ricinus communis-120
RES	Sistema reticulo-endotelial
RGD	Péptido RGD (arginina-glicina-aspártico)
RMF	Resonancia magnética funcional
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa
SDRC o DSR	Síndrome doloroso regional complejo
SDS	Dodecil sulfato de sodio o Lauril sulfato sódico
SEM	Microscopio electrónico de barrido

SIDA	Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
SNC	Sistema nervioso central
SNK	Análisis estadístico post hoc de Student-Newman-Keuls
SR141716A	Rimonabant o Acomplia o 5-(4-Clorofenil)-1-(2,4-dicloro-fenil)-4-metil-N-(piperidin-1-il)-1H-pirazol-3-carboxamida
TEM	Microscopio electrónico de transmisión
TEP	Tomografía de emisión de positrones
TF	Factor tisular
Tg	Temperatura de transición vítrea
TPGS o VitE	Vitamina E
USP	Farmacopea Americana
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta-visible
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VPH	Virus del papiloma humano
WGA	Aglutinina de germen de trigo
WIN 55,212-2	(R)-(+)-[2,3-Dihidro-5-metil-3-(4-morfolinilmetil)pirrol[1,2,3-di]-1,4-benzoxazin-6-il]-1-naftalenilmetanona
WIN 56,098	Antracen-9-il{2-metil-1-[2-(morfolin-4-il)etil]-1H-indol-3-il}metanona

RESUMEN

Actualmente existe una enorme focalización, desde los puntos de vista tecnológico e industrial, hacia el desarrollo de sistemas de administración de activos capaces de ejercer un control sobre su comportamiento fisicoquímico, en general, y biofarmacéutico, en particular. La posibilidad de desarrollar productos novedosos con relación a activos conocidos se ha convertido en una realidad de sumo interés para industrias de diferente índole, como farmacéutica, cosmética, agroalimentaria,... El hecho es que, con esta opción, se aporta un elemento diferencial con ventajas innegables que redundan en la puesta en el mercado de productos novedosos, de mayor calidad y mejor aceptación.

En este contexto, la aportación de la nanotecnología, específicamente en lo relativo al desarrollo de sistemas nanoparticulares para activos tales como fármacos, ingredientes cosméticos o productos de interés alimentario (por citar sólo algunos ejemplos), está resultando ser una herramienta tecnológica especialmente útil.

Desde hace algunos años, el grupo de investigación CTS-480 de la Universidad de Sevilla, trabaja, como línea prioritaria de investigación, en el desarrollo y en la evaluación de sistemas multiparticulares para la administración de activos, tanto en micro- y nano- cápsulas como micro- y nano- esferas. En relación con esta línea específica, en la actualidad se están desarrollando diversos proyectos de investigación que avalan la presente memoria.

En concreto, teniendo en cuenta los conceptos mencionados en el apartado anterior, el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral ha sido desarrollar sistemas multiparticulares nanométricos de naturaleza

polimérica que actúen como transportadores orales de agentes cannabinoides.

El trabajo se ha dividido en 3 capítulos diferentes. El primero se ha dedicado a una profunda revisión de los cannabinoides y de la nanotecnología farmacéutica. Los otros dos capítulos, estructurados típicamente en Introducción, Materiales y Métodos y Resultados y Discusión, se centran en el diseño y en diferentes estudios de caracterización, optimización y de comportamiento *in vitro* e *in vivo* de nanopartículas cargadas con derivados cannabinoides.

El primer capítulo trata sobre el estudio de los cannabinoides como agentes terapéuticos, concretamente sobre su uso para el tratamiento del dolor neuropático y el cáncer. Por otro lado, se describen las nanopartículas como sistemas de liberación controlada de estos activos cannabinoides, especialmente las poliméricas, teniendo en cuenta las limitaciones que presentan a la hora de una administración oral y las posibles modificaciones superficiales para solventar dichas limitaciones.

En el segundo capítulo, se lleva a cabo el desarrollo y la caracterización de diferentes sistemas nanoparticulares de PLGA para la administración oral de un derivado cannabinoide sintético, 1-naftalenil-[4-(pentiloxi)-1-naftalenil]-metanona (CB13), para el tratamiento del dolor neuropático. La caracterización se llevará a cabo en relación a sus diferentes características físico-químicas, liberación *in vitro*, bioadhesión, así como ensayos en cultivos en líneas celulares Caco-2 para evaluar su idoneidad como sistemas de administración oral. Además, se presentarán resultados preliminares de los ensayos *in vivo* en modelos animales de dolor neuropático.

El tercer capítulo trata de la preparación, caracterización y realización de una profunda evaluación *in vitro* de diferentes sistemas de nanopartículas de PLGA de superficie modificada cargadas con el derivado cannabinoide natural Delta-9- tetrahidrocannabinol (THC), con el fin de demostrar la actividad y selectividad antitumoral del THC vehiculizado en los sistemas desarrollados. Se han estudiado sus principales características fisicoquímicas, el perfil de liberación *in vitro*, la absorción celular en cultivos celulares, la adsorción de proteínas a la superficie de las nanopartículas y su hemocompatibilidad. Por último, se ha llevado a cabo un completo estudio de la viabilidad celular en varias líneas celulares, cancerosas y no cancerosas.

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

1. CANNABINOIDES

La planta *Cannabis sativa* ha sido utilizada por el hombre desde la antigüedad con varios propósitos: obtención de fibras textiles, fines curativos, recreativos, en la gastronomía o en lienzos para pintura al óleo, entre otros (Ben Amar, 2006).

Sus efectos biológicos se deben a un conjunto de compuestos presentes en la resina secretada por las hojas y brotes florecidos de la planta femenina (figura 1), la que produce cerca de cuatrocientos compuestos químicos, de los cuales unos sesenta se consideran dentro del grupo de los cannabinoides con actividad psicoactiva (Dewey, 1986). Los preparados obtenidos a partir de la planta, como el hachís o la marihuana, se encuentran entre las drogas de abuso más consumidas en el mundo.



Figura 1. Planta de *Cannabis sativa* (Fuente: <http://www.floresyplantas.net/plantas-aromaticasmedicinales/marihuana-cannabis-sativa-cannabis-indica-y-cannabis-rudelaris>).

No se conoce bien la función de los cannabinoides en la propia planta, aunque se ha propuesto que tienen un efecto defensor contra los insectos o para proteger las semillas del calor. En animales, las principales acciones de los cannabinoides son llevadas a cabo sobre

los sistemas cardiovascular, inmunológico y nervioso central. El principal responsable de las propiedades psicoactivas de la planta es el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) descubierto en 1964.

1.1. Relación estructural de los cannabinoides principales

Un cannabinoide, desde el punto de vista químico, es un compuesto perteneciente al grupo de los terpenofenoles y que activa los receptores cannabinoides en el organismo humano (Lambert y Fowler, 2005). Actualmente, se reconocen tres tipos generales de cannabinoides: los *cannabinoides herbarios* o *fitocannabinoides* sintetizados de forma natural por la planta de cannabis; los *cannabinoides endógenos*, producidos por animales y humanos y los *cannabinoides sintéticos*, compuestos similares generados en laboratorio. Los principales cannabinoides son el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), el Δ^8 -tetrahidrocannabinol (Δ^8 -THC), el cannabidiol (CBD) y el cannabinol (CBN) (figura 2). Otros cannabinoides presentes en la planta aparecen en cantidades diferentes según la variedad de *Cannabis*. El ácido cannabidiólico, que tiene actividad antibiótica, es un constituyente del cáñamo (Turner y cols., 1989).

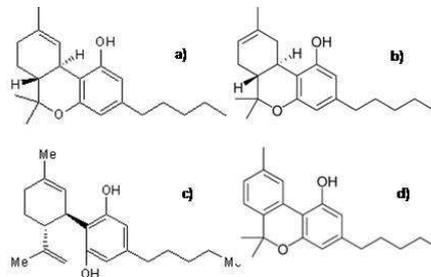


Figura 2. Estructura química de: a) Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC ó THC); b) Δ^8 -tetrahidrocannabinol (Δ^8 -THC); c) cannabidiol (CBD) y d) cannabinol (CBN) (Fuente: <http://en.wikipedia.org/wiki/>).

El Δ^9 -THC es el componente psicoactivo primario de la planta. Desde un punto de vista clínico, es útil para aliviar el dolor moderado pues posee un efecto analgésico además de ser neuroprotector. El tetrahidrocannabinol tiene aproximadamente la misma afinidad por los receptores cannabinoides CB1 y CB2 (Huffman, 2000). El Δ^8 -THC tiene un perfil farmacológico muy parecido al del Δ^9 -THC, aunque sus efectos son más débiles.

El cannabinol (CBN) es el producto primario de la degradación del THC y no suele aparecer en grandes concentraciones en la planta. El contenido en CBN va aumentando según la cantidad de THC que se degrada y por la exposición a la luz y al aire. Es un psicoactivo leve cuya afinidad es superior en el caso del receptor CB2 y baja en el CB1 (Mahadevan y cols., 2000).

El cannabidiol es un narcótico o estupefaciente, pero no se considera un psicoactivo. Recientemente se han hallado evidencias que demuestran que los fumadores de cannabis con una alta proporción de CBD/THC poseen menos tendencia a sufrir los síntomas de la esquizofrenia (Morgan y Curran, 2008). Este hecho está apoyado por tests psicológicos en los cuales los participantes experimentan una pérdida de intensidad de los efectos psicóticos cuando se les administra THC junto a CBD. Esto nos conduce a la hipótesis de que el CBD actúa como antagonista alostérico del CB1 y en consecuencia altera los efectos psicoactivos del THC. Desde un punto de vista terapéutico, el CBD parece responsable del alivio de las convulsiones, inflamaciones, ansiedad y náuseas (Zuardi y cols., 1982). El cannabidiol tiene una gran afinidad por el receptor CB2 y menos por el CB1.

El conocimiento de las relaciones existentes entre la estructura y la actividad de los cannabinoides ha permitido el diseño de compuestos análogos que han sido de gran utilidad en el estudio farmacológico y fisiológico de estas sustancias. En unos casos, se ha modificado el marcado carácter hidrófobo de los cannabinoides para aumentar su solubilidad en agua. Otras veces, se ha aumentado la afinidad por su receptor. Además, las sucesivas modificaciones de su estructura han permitido la preparación de derivados relacionados con alguna de las acciones atribuidas a estos compuestos, evitando las relativas a sus efectos psicotrópicos (Muñoz-Rubio y cols., 2010).

1.2. Sistema cannabinoide endógeno

1.2.1. Receptores endógenos

De manera análoga a lo sucedido con los opioides, donde su análisis llevó a proponer la existencia de receptores específicos para estas sustancias en el SNC (Vega, 2005), el estudio de los mecanismos de acción de los cannabinoides, en particular del Δ^9 -THC, llevó a pensar que en el cerebro realmente existían receptores para dichas sustancias. Finalmente se demostró que éstos ejercen su efecto a través de receptores específicos de membrana y, en 1990, se clonó e identificó el primer receptor de cannabinoides en tejido nervioso, el cual se denomina CB1 (Matsuda y cols., 1990). En 1993 se clonó, en células del sistema inmunológico, otro receptor de cannabinoides, el receptor CB2 (Munro y cols., 1993). Ambos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, caracterizados por tener siete dominios transmembrana (figura 3).

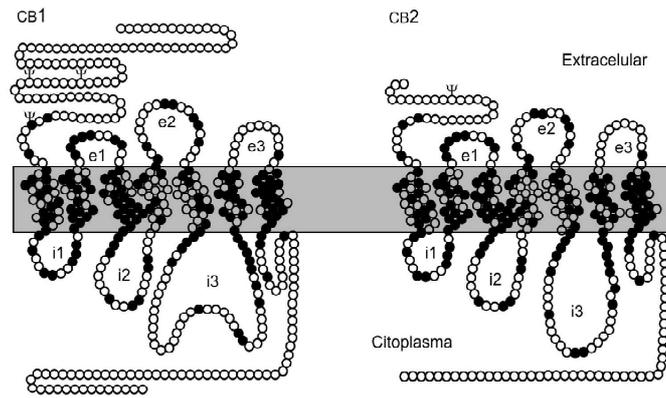


Figura 3. Representación esquemática de los receptores CB1 y CB2. Los receptores tienen siete segmentos transmembrana. ● Aminoácidos comunes a los dos receptores; ○ aminoácidos diferentes; ψ sitios de glicosilación. e1, e2, e3 son asas extracelulares; i1, i2, i3 son asas intracelulares. (Fuente: Rodríguez y cols., 2005).

El receptor CB1 se localiza fundamentalmente en el sistema nervioso central; el receptor CB2, en el bazo, amígdalas y células del sistema inmunológico. Entre ambos receptores hay una homología de alrededor del 48 % (Howlett y cols., 2002).

El receptor CB1 no está distribuido de manera homogénea en el sistema nervioso central ya que se expresa principalmente en la corteza cerebral, hipocampo, núcleo caudado-putamen, sustancia nigra pars reticulata, globo pálido y cerebelo. Además, se encuentra a bajos niveles en los centros respiratorios del tallo cerebral y también se expresa en las células gliales. Fuera del sistema nervioso central, el receptor CB1 se ha detectado en el bazo y, curiosamente, también en los testículos (Howlett y cols., 2002). Cabe destacar que los receptores CB1 son los más abundantes de todos los receptores acoplados a proteínas G en el cerebro, hecho que indica un papel funcional

altamente relevante en una gran diversidad de circuitos y sistemas neuronales (Di Marzo y Matias, 2005).

El receptor CB2 se encuentra fundamentalmente en células del sistema inmunológico y, en menor grado, en nódulos linfáticos y en el bazo (Howlett y cols., 2002). En el sistema nervioso central se expresa principalmente en las células gliales y su expresión en neuronas es mínima, por lo que el papel funcional de los receptores CB2 en el sistema nervioso central parece limitado a la modulación de las respuestas inmunológicas.

La unión de los cannabinoides a sus receptores desencadena una cascada de segundos mensajeros. Inicialmente activan una proteína G que, a través de la subunidad α , modula la actividad de la adenilato ciclasa, la cual, a su vez, regula los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) que modula la actividad de la proteína quinasa A (PKA) (Howlett y cols., 2002). Finalmente, la activación de quinasas lleva a la fosforilación de diversas proteínas, incluyendo canales iónicos, proteínas de vesículas sinápticas, proteínas que regulan la transcripción genética y enzimas. Se ha demostrado que los cannabinoides inhiben canales de calcio dependientes de voltaje tipo N, P, Q y L, y que pueden también activar o inhibir corrientes de potasio. El efecto combinado sobre estos dos tipos de canales parece la base de la inhibición que los cannabinoides ejercen en la liberación de otros neurotransmisores (Ameri, 1999).

Otros efectos que pueden producir los cannabinoides son el aumento de la producción de óxido nítrico (NO) y la activación de la proteína quinasa C (PKC); también hay estudios que indican la activación de la quinasa activada por mitógenos (MAPK), la proteína

quinasa B (PKB o AKT), fosfolipasas (PL) y el aumento de los niveles de calcio a expensas de los compartimentos intracelulares (Howlett y cols., 2002).

Por ejemplo, se ha demostrado que en el hipocampo la producción de endocannabinoides y su unión a receptores CB1 funciona como un mecanismo de neurotransmisión retrógrada que media la inhibición de la liberación de ácido gamma amino butírico (GABA, principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central). De hecho, se ha establecido la posibilidad de que dicha función como neurotransmisor retrógrado tenga un papel importante en el desarrollo de la potenciación de larga duración que, a nivel celular, constituye un elemento fundamental en los procesos de aprendizaje (Piomelli, 2003).

1.2.2. Cannabinoides endógenos

En consonancia con la idea de que existían receptores de cannabinoides, Devane y cols. descubrieron en 1992 un compuesto, la etanolamida del ácido araquidónico, como el primero de los endocannabinoides, los cuales son ligandos endógenos de los receptores de cannabinoides. Posteriormente se encontraron otros ligandos endógenos como el 2-araquidonil-glicerol, la palmitoiletanolamida y otros lípidos relacionados (Mechoulam y cols., 1995; Sugiura y cols., 1995). Los endocannabinoides se producen principalmente en el hipocampo, el tálamo, el cuerpo estriado, la corteza cerebral, el puente, el cerebelo y la médula espinal.

Cabe destacar que los lípidos del tipo de los cannabinoides endógenos no son exclusivos del cerebro de los vertebrados superiores ya que algunas plantas producen estas sustancias. De hecho, se discute si parte de los procesos que determinan el apetito peculiar que

algunas personas tienen por el chocolate es debido a que el cacao contiene pequeñas concentraciones de anandamida y 2-araquidonil-glicerol, también presentes en muy bajas concentraciones en la leche materna.

Los cannabinoides endógenos se sintetizan a partir de la N-araquidonil-fosfatidil-etanolamina en la membrana celular y son degradados aparentemente por hidrolasas de ácidos grasos. La síntesis de los cannabinoides es modulada por las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} aunque, a diferencia de otros neurotransmisores, los endocannabinoides no se almacenan en vesículas sinápticas, sino que se liberan directamente de la membrana celular.

La anandamida (figura 4) es capaz de unirse a los receptores CB1 y CB2, aunque muestra una mayor afinidad por los CB1 (Felder y cols., 1996).

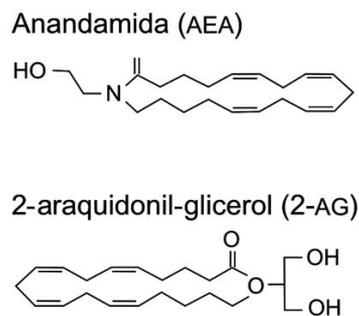


Figura 4. Estructura química de la anandamida y del 2-araquidonil-glicerol (Fuente: Rodríguez y cols., 2005)

1.3. Ligandos que se unen a los receptores cannabinoides endógenos

La relación estructura-actividad de los ligandos de los receptores de cannabinoides ha sido ampliamente estudiada desde que se

descubrieron los receptores cannabinoides (Pertwee, 1993; Razdan, 1986; Howlett, 1995; Huffman y Lainton, 1996;). Se encuentran dos tipos, agonistas o antagonistas, de acuerdo a sus interacciones con el receptor.

- Agonistas: Se pueden clasificar según su estructura química en cuatro grupos principales. El primero de ellos es el "grupo de cannabinoides clásicos". Está compuesto de derivados de dibenzopirano, como son los cannabinoides derivados de *Cannabis sativa* (Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, CBN y CBD) y los análogos sintéticos del Δ^9 -THC. El Δ^9 -THC sintético (dronabinol) y la nabilona han sido utilizados en algunos países con fines clínicos. Merece mencionarse el 3-(5'-ciano-1',1'-dimetilpentil)-1-(4-N-morfolinobutiliroxi)- Δ^8 -THC (O-1057), por su carácter hidrosoluble (Pertwee, 2001). El segundo es el "grupo de cannabinoides no clásicos" se compone de los análogos bicíclicos y tricíclicos de Δ^9 -THC que carecen de un anillo de pirano. Un importante miembro de este grupo de compuestos es CP 55,940 (Devane y cols., 1988). El tercer grupo de compuestos cannabimimético se compone de aminoalquilindoles, que son estructuralmente muy diferentes a los miembros de los dos primeros grupos. El prototipo de este "grupo aminoalquilindol" es un derivado de la pravadolina, WIN 55,212-2. Los tres tipos de compuestos son capaces de desplazarse mutuamente de su unión a receptores CB1 y CB2 (Pertwee, 2001). El cuarto grupo de moléculas con actividad cannabimimética es el "grupo de eicosanoides" que incluye una serie de compuestos estructuralmente derivados del ácido araquidónico (Devane y cols., 1992). El miembro prototipo de

este grupo es el cannabinoide endógeno araquidoniletanolamida (anandamida).

Aunque las características estructurales de los agentes cannabimiméticos que rigen sus afinidades por los receptores cannabinoides han sido objeto de amplia investigación, se ha prestado poca atención a las características estructurales que determinan su eficacia. Los datos existentes indican que la eficacia de los agonistas de los receptores cannabinoides diferentes no es siempre la misma, mostrando algunas de las propiedades mixtas agonistas-antagonistas que son típicos de los agonistas parciales.

- Antagonistas: En los últimos años se han desarrollado varias moléculas capaces de antagonizar de forma selectiva los efectos cannabimiméticos mediados por los receptores CB1 o CB2, que han supuesto una herramienta fundamental en la caracterización farmacológica de estos receptores. El primero que se estudió es el WIN 56,098 capaz de antagonizar al compuesto WIN 55,212-2, un agonista de los receptores cannabinoides (Pacheco y cols., 1991). Hoy en día, el antagonista de los receptores cannabinoides más potente, importante y bien caracterizado es el SR141716A. Se ha demostrado que previene y atenúa acciones cannabimiméticas, evitando que se produzcan varios de sus efectos típicos. SR141716A muestra una marcada selectividad por los receptores cannabinoides CB1 (Rinaldi-Carmona y cols., 1994; Compton y cols., 1996; Shire y cols., 1996).

Otro antagonista de los receptores cannabinoides, LY320135, tiene 16,5 veces mayor afinidad por los receptores CB1 que por los CB2, aunque la farmacología de este compuesto todavía no es completamente conocida (Di Marzo, 2008).

1.4. Aplicaciones terapéuticas de los derivados cannabinoides

El estímulo de los receptores cannabinoides puede dar lugar a un amplio abanico de respuestas (tabla 1). La mayoría de las acciones evocadas por los agonistas cannabinoides sobre el sistema nervioso central parecen depender principalmente de la activación de receptores CB1: efectos cognitivos y psicológicos, antieméticos y analgésicos, aunque en alguno de ellos no puede descartarse la participación de CB2. Por otro lado, el papel de los receptores CB2 es fundamental en otras acciones cannabimiméticas, como es el caso de los efectos inmunomoduladores y antiproliferativos (Muñoz-Rubio y cols., 2011).

Para el estímulo o agonismo cannabinoide se han propuesto diversas dianas terapéuticas, especialmente enfocadas al tratamiento del dolor (analgesia), de procesos que cursan con náuseas y vómitos (Campbell y cols., 2001), de patologías motoras espásticas, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Huntington o la esclerosis múltiple, del glaucoma, el asma bronquial y procesos cancerosos.

Por lo que se refiere a las posibilidades del antagonismo cannabinoide, las que se están explorando actualmente se refieren, sobre todo, a su potencialidad antiesquizofrénica y a su posible utilidad en los trastornos del apetito (obesidad).

Acción terapéutica	Antiemético	Estimulación del apetito	Enfermedades neurodegenerativas
			Enfermedad de Huntington (EH)
Mecanismo de acción	<ul style="list-style-type: none"> • Unión a los receptores CB1 del núcleo del tracto solitario • Agonistas cannabinoides pueden inhibir la activación del receptor de serotonina (5-HT₃) • Mediante activación acoplada de receptores CB1 y CB2, localizados en la zona de emplazamiento de la integración de los reflejos eméticos (núcleo del tracto solitario, área postrema y núcleo motor dorsal del vago). 	El sistema endocannabinoide es activado de forma transitoria en el cerebro tras un periodo breve de ayuno, liberando endocannabinoides de neuronas postsinápticas despolarizadas, los cuales activan retrógradamente los receptores CB1 presinápticos. La estimulación de receptores CB1 incrementa los niveles del neuropéptido Y, que es uno de los factores más potentes orexigénicos.	Diferentes teorías: <ul style="list-style-type: none"> • Agonistas CB1 favorecen el alivio de los síntomas motores • Agonistas CB2 producen neuroprotección por activación de los receptores CB2 (incrementados significativamente en las zonas lesionadas por la EH).
Ventajas	Pacientes que han recibido uso compasivo de THC y CBD añadido al antiemético habitual sugieren que se mejoran las náuseas y vómitos	El sistema endocannabinoide tiene efecto en la regulación del apetito, el peso y el balance energético, apoyando un efecto estimulante del apetito de los agonistas cannabinoides.	Pacientes tratados con agonistas cannabinoides experimentan una mejora de la sintomatología motora y un retraso en la progresión de la enfermedad
Inconvenientes	Efectos tóxicos: mareos, disforia, alucinaciones, sequedad de boca, somnolencia, alteración del gusto	El uso crónico de los cannabinoides en pacientes con SIDA o que reciben quimioterapia anticancerosa ocasiona efectos inmunosupresores, lo que supone un efecto adverso añadido en individuos que ya tienen el sistema inmune comprometido	La activación de los receptores CB1 producirá los efectos psicotrópicos típicos de los cannabinoides, incrementando a los ya observados en enfermos con EH.
Ref. bibliogr.	Van Sickle y cols., 2005; Durán y cols., 2010	Mattes y cols., 1994; Gamber y cols., 2005; Kirkham, 2008	Maccarrone y cols., 2007; Micale y cols., 2007; Sagredo y cols., 2009

Tabla 1. Principales acciones terapéuticas de los cannabinoides.

Tabla 1: Continuación

Acción terapéutica	Enfermedades neurodegenerativas			
	Enfermedad del Parkinson (EP)	Esclerosis lateral amiotrófica (ELA)	Esclerosis múltiple (EM)	Enfermedad de Alzheimer (EA)
Mecanismo de acción	<ul style="list-style-type: none"> Bloqueo de los receptores CB1, muy abundantes en las estructuras de los ganglios basales, produciendo reducción de la inhibición motora típica en EP. Estimulación del receptor CB1, dando lugar a una reducción en la liberación de glutamato, inhibición de los efectos de la dopamina y mejora del receptor GABA, todos los cuales son mecanismos con potencial antidiscinético. 	Acumulación de endocannabinoides en la médula lumbar espinal produciendo un mecanismo de defensa endógeno	Múltiples mecanismos de acción en diferentes dianas celulares, relacionadas con inflamación crónica, con espasticidad muscular y dolor, reparación y recuperación funcional y en los mecanismos de remielinización	Agonistas CB1 y CB2, actuando exclusivamente sobre células de microglía, son capaces de prevenir el daño neuronal y la secreción de citoquinas inflamatorias
Ventajas	Los antagonistas de los receptores CB1 son útiles en el tratamiento de los síntomas parkinsonianos y de la discinesia inducida por levodopa, mientras que los agonistas del receptor CB1 podrían tener valor en la reducción de la discinesia inducida por levodopa.	Efectos neuroprotectores y mejora de la sintomatología en pacientes con ELA	Mejora terapéutica relevante en términos de nocicepción y de la sintomatología de los pacientes en EM	Efectos beneficiosos sobre la agitación nocturna
Inconvenientes	Resultados contradictorios en los ensayos clínicos realizados en relación con la administración de agonistas o antagonistas de receptores CB1	Alta variabilidad interindividual, siendo necesaria la necesidad de establecer un tratamiento individualizado	La evaluación del efecto terapéutico puede ser confundida por efectos psicotrópicos o analgésicos, limitando la efectividad del tratamiento en EM	Efectos psicoactivos y que afectan a la memoria
Ref. bibliogr.	Brotchie, 2003	Carter y cols., 2010; Joerger y cols., 2012	Pryce y Baker, 2007; Novotna y cols., 2011; Sánchez y García-Merino, 2012	Micale y cols., 2007

Tabla 1. Principales acciones terapéuticas de los cannabinoides.

Tabla 1: Continuación

Acción terap.	Dolor	Glaucoma	Enfermedades inflamatorias	Cáncer
Mecanismo de acción	Activación de los receptores cannabinoides: • CB1: relacionados con la modulación de transmisión del dolor a través del sistema nervioso central. • CB2: modulando la liberación de factores pro- e inflamatorios de células no neuronales nociceptivas.	Agonistas de receptores CB1 en localizaciones implicadas en la producción y excreción del humor acuoso: el cuerpo ciliar, los vasos sanguíneos del cuerpo ciliar, el musculo ciliar y la malla trabecular, provocando un descenso en la presión intraocular, al disminuir la producción de humor acuoso.	Agonistas de receptores CB2 en células inmunes producen inhibición de la producción de citoquinas, disminución de la presencia de antígenos y modulación de la migración celular. También pueden reducir la inflamación por la promoción de la apoptosis en poblaciones de células inmunes.	Inducción de apoptosis de las células tumorales y disminución de la angiogénesis tumoral, así como la inhibición de la proliferación e invasividad y la estimulación de la diferenciación de las células tumorales.
Ventajas	Experimentalmente, la actividad analgésica de los agonistas del receptor cannabinoide es similar a la de los opiáceos, tanto en modelos de dolor por exceso de nocicepción como en modelos de dolor visceral y neuropático.	Claro efecto hipotensor ocular, así como un efecto neuroprotector sobre las células ganglionares de la retina	Acciones antiinflamatorias de agonistas cannabinoides, sobretudo de los receptores CB2 expresados en células inmunes.	Inhibición de náuseas y vómitos inducidos por la quimioterapia, estimulación del apetito y atenuación del dolor oncológico. Uso como antitumorales, en base a la capacidad para limitar la proliferación celular e inducir la muerte celular del tumor selectivo.
Inconvenientes	Efectos indeseables (leves y reversibles, pero frecuentes): • Centrales: mareo, cansancio y/o debilidad, somnolencia y alteraciones de la memoria. • Periféricos: boca seca, náuseas, hipotensión transitoria, mialgias o debilidad muscular.	• Vía tópica: midriasis, hiperemia conjuntival, opacificaciones corneales severas y neurotoxicidad. • Vía sistémica: descenso de la producción de lágrimas, diplopía, fotofobia, nistagmus y blefarospasmo.	Tolerancia y dependencia tanto física como psíquica	Efectos psicoactivos y tóxicos aumentados con la quimioterapia que inducen al paciente con cáncer a un estado de debilidad
Ref. biblio.	Malan y cols., 2001; Pertwee, 2001	Pinar-Sueiro y cols., 2011	Cabral y Griffin-Thomas, 2009; O'Sullivan y Kendall, 2010	Guzmán, 2003; Velasco y cols., 2007; Pisanti y cols., 2009

Tabla 1. Principales acciones terapéuticas de los cannabinoides.

Actualmente, la investigación se centra en conocer los mecanismos básicos y desarrollar una terapia específica efectiva en modelos de enfermedades degenerativas neurológicas (esclerosis múltiple, enfermedad del Parkinson, enfermedad de Huntington y enfermedad del Alzheimer), neuroprotección, dolor, tratamiento de la dependencia de opioides, glaucoma y cáncer.

La realización de ensayos clínicos, algunos publicados y otros en curso, están evaluando la eficacia de extractos de *Cannabis sativa* y otros cannabinoides sintéticos, tanto en el tratamiento del dolor neuropático, oncológico y sintomático de la esclerosis múltiple en pacientes que no responden a los tratamientos habituales, como en el tratamiento sintomático y antiproliferativo que se ha observado en determinados tipos de cáncer (Guzmán, 2003).

1.4.1. Dolor neuropático

La Asociación Internacional del estudio del Dolor (IASP) define el dolor neuropático como el dolor causado por una lesión o enfermedad del sistema somato-sensorial (Jensen y cols., 2011). Clínicamente, el dolor neuropático suele estar infradiagnosticado y se caracteriza por la asociación de síntomas sensitivos inespecíficos, no existiendo un consenso en los criterios diagnósticos de éste tipo de dolor (Dworkin y cols., 2003; Miralles-García y cols., 2010). Además, existen pocos estudios realizados donde se compare directamente las características del dolor con lesiones neurológicas u otras lesiones de tipo somático (Krause y Backonja, 2003).

El dolor neuropático es el resultado de una disfunción (lesión o destrucción) de los nervios periféricos o, menos comúnmente, del sistema nervioso central. Puede manifestarse en una variedad de

formas clínicas (Pedraza, 2007), incluyendo las parestesias (sensación anormal de los sentidos o de la sensibilidad general que se traduce por una sensación de hormigueo, adormecimiento, acorchamiento, etc.), de disestesias (trastornos en la sensibilidad, ardor, quemazón, hormigueo, pesadez), hiperpatía (reacción dolorosa desproporcionada a la intensidad y modalidad del estímulo, con una extensión que supera claramente la región estimulada), alodinia (sensación dolorosa provocada por un estímulo normalmente no doloroso) y de hiperalgesia (respuesta dolorosa aumentada a un estímulo normalmente doloroso, que sería un aumento de la respuesta a un dolor específico). Si está tratado de forma inadecuada, el dolor neuropático se acompaña frecuentemente por depresión, ansiedad y trastornos del sueño (Dworkin, 2002).

Este tipo de dolor, por su complejidad, es uno de los mayores desafíos en cuanto al manejo del dolor crónico se refiere y se configura como una de las áreas más prometedoras en la investigación del dolor. Gracias a esta complejidad requiere de un mayor conocimiento tanto de la neurobiología del mismo, como del manejo terapéutico de nuestros pacientes.

La encuesta "*Pain in Europe*" (<http://www.paineurope.com>) refleja el impacto sobre la calidad de vida que tiene el dolor crónico y neuropático y las repercusiones económicas de ello. Según dicha encuesta, (i) uno de cada 5 pacientes sufre depresión a causa del dolor; (ii) cerca del 40 % de las personas con dolor sufren alteraciones en su vida cotidiana (afectando al sueño, al ocio, etc.); (iii) a nivel laboral, uno de cada 5 pacientes afectados de dolor crónico ha perdido su trabajo; y (iv) el dolor crónico ocasiona alrededor de 15 días de baja laboral al año por término medio.

En nuestro país estas cifras pueden verse ligeramente alteradas. Así, España es el país con el índice más alto de depresión (29 %) debido al dolor crónico, el 22 % de los pacientes que sufren dolor crónico pierden su trabajo; un 8 % sufre cambios de responsabilidad en su trabajo y un 4 % cambian de trabajo (<http://www.paineurope.com>).

En el estudio DONEGA, realizado en España en pacientes con dolor neuropático, la prevalencia de pacientes con síntomas de ansiedad o depresión fue considerable, rondando o superando el 20 % (Rodríguez y García, 2007).

1.4.1.1. Neurobiología del dolor neuropático

El dolor neuropático se genera como resultado de cambios que ocurren en la transmisión normal del impulso doloroso. Estas alteraciones han sido detectadas en las terminaciones nerviosas periféricas, en el ganglio de la raíz dorsal, en el asta posterior de la espina dorsal y en la corteza somatosensorial. Además de cambios en las neuronas afectadas, se observan modificaciones en las propiedades eléctricas de las neuronas normales remanentes (Cruciani y Nieto, 2006).

Existen múltiples explicaciones en relación a los mecanismos del dolor neuropático, tanto centrales como periféricas, pero ninguna de ellas da cuenta de forma integral de la fisiopatología, ya que, probablemente, deba considerarse siempre multifactorial (Dworkin y cols., 2003). Dentro de los mecanismos periféricos se encuentran, la sensibilización de los nociceptores, la generación de impulsos espontáneos ectópicos en el axón, un aumento de la sensibilidad mecánica y/o química del axón periférico, la presencia de efapsis (punto de contacto lateral entre las fibras nerviosas a través del cual,

los impulsos pueden transmitirse directamente, a través de las membranas celulares en vez de a través de la sinapsis), la multiplicación de impulsos a través de descargas secundarias y la generación de impulsos espontáneos ectópicos en neuronas del ganglio dorsal (Woolf, 2004).

En el ámbito central, los mecanismos involucrados son el defecto de liberación central del nociceptor y la sensibilización de neuronas del asta posterior (Ro y Chang, 2005).

En cuanto a los mecanismos utilizados para las diferentes manifestaciones clínicas, el dolor continuo se ha relacionado con la sensibilización del nociceptor periférico, con impulsos ectópicos de fibras C y la pérdida de la inhibición central. Por su parte, el dolor paroxístico se relaciona con las descargas ectópicas de las fibras nociceptivas. También se ha determinado que las parestesias y disestesias se producen por descargas ectópicas en fibras A beta, agregándose en el caso de las disestesias, la sensibilización central y la reorganización de fibras A beta (Baños y cols., 2003).

El dolor neuropático puede manifestarse en una serie de síndromes (figura 5).

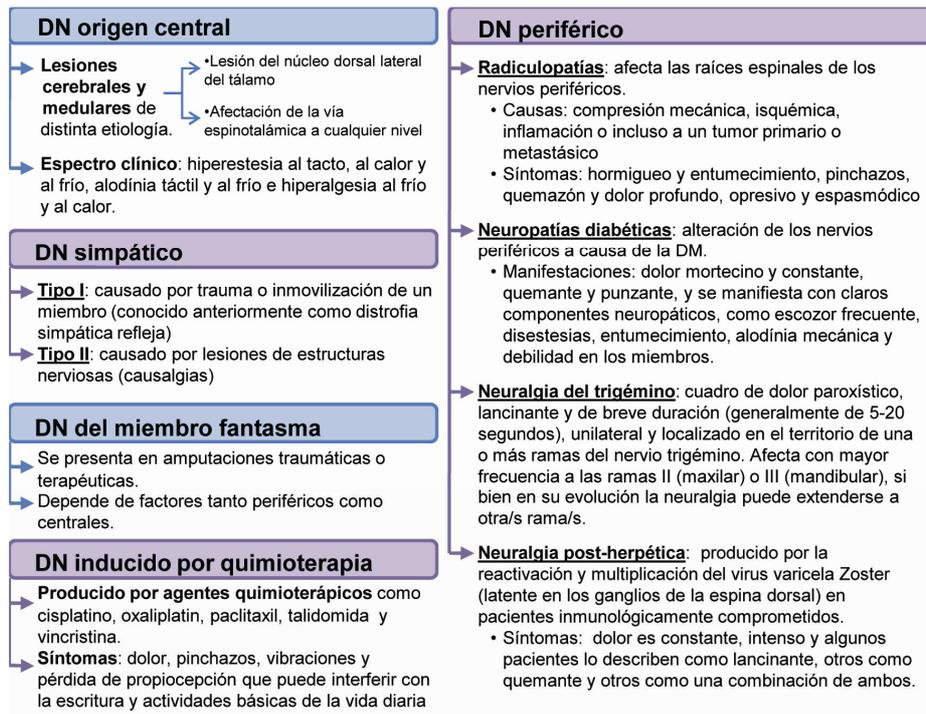


Figura 5. Síndromes en los que se manifiesta dolor neuropático (DN) (Abreviaturas: DM → Diabetes Mellitus)

1.4.1.2. Evaluación del dolor neuropático

La evaluación y valoración del dolor neuropático y de los síntomas asociados es necesaria para el diagnóstico y para guiar el tratamiento (Backonja y Rowbotham, 2007). El dolor neuropático es el resultado de una enfermedad o lesión del sistema nervioso y, consecuentemente, las manifestaciones clínicas incluyen tanto síntomas y signos sensoriales positivos como negativos. Una cuidadosa exploración física y neurológica puede ayudar a responder a la pregunta básica: ¿dónde está la lesión? Y valorar factores no neuropáticos (musculo-esquelético, inflamatorio, miofascial y psicológico) que contribuyen a la presentación del dolor de los pacientes. El descubrimiento de fenómenos sensitivos

negativos y positivos en el área del dolor es sugestivo, pero no diagnóstica este tipo de dolor. Herramientas para su valoración como el *Neuropathic Pain Questionnaire* (Krause y Backonja, 2003) y el *Neuropathic Pain Inventory* (Bouhassira y cols., 2004) fueron desarrolladas con el objetivo de ayudar al diagnóstico y valoración iniciales, así como a las valoraciones de seguimiento.

Además, estudios de imagen y de electromiografía de conducción nerviosa son, indudablemente, una parte integral del diagnóstico y valoración del dolor espinal (figura 6). Es importante mencionar que los estudios electromiográficos de conducción nerviosa son insensibles a las alteraciones de las fibras sensitivas de pequeño diámetro. Otros métodos, como las pruebas sensitivas térmicas cuantitativas confían en la capacidad psicofísica del paciente para discriminar cambios finos en los estímulos térmicos, pero no son utilizados ampliamente porque requieren equipo especializado y entrenamiento. La resonancia magnética funcional (RMF) puede valorar más ampliamente el dolor relacionado con estructuras cerebrales.

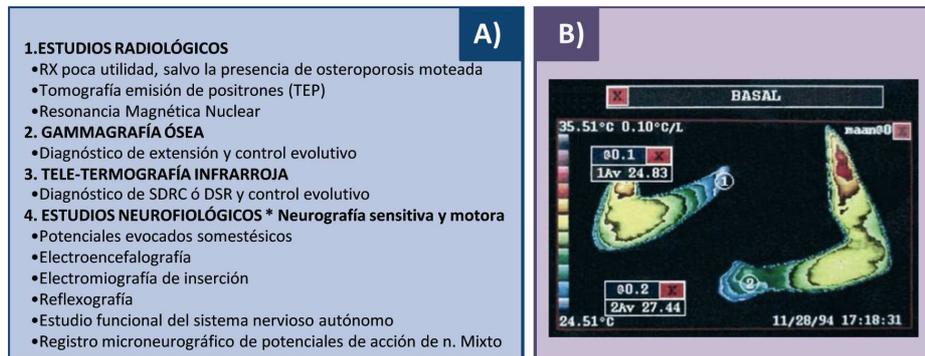


Figura 6. A) estudios de imagen utilizados en la evaluación del dolor neuropático; b) ejemplo de teletermografía infrarroja en paciente afecto de síndrome doloroso regional complejo (SDRC o DSR) tipo I. (Fuente: http://www.fundaciongrunenthal.es/cms/cda/_common/inc/display_file.jsp?fileID=58100207)

Por lo tanto y con los métodos mencionados anteriormente, la evaluación y el diagnóstico de dolor neuropático se establece por medio de un estudio completo basado en la historia clínica, la exploración física y neurológica y los estudios diagnósticos.

1.4.1.3. Farmacología y tratamiento del dolor neuropático

Según un artículo publicado por Vázquez (2003), más de la mitad de las personas que sufren dolor neuropático no está satisfecha con su medicación. Además, un gran porcentaje de pacientes, según la Sociedad Española del Dolor, suelen recurrir a la automedicación para tratar su dolor, con las connotaciones que pueda derivarse en cuanto a un mal control, efectos adversos (algunos de ellos importantes, al ser los AINEs los más utilizados) y el riesgo de interacciones.

Hasta ahora, los fármacos que cuentan con mayor experiencia en el tratamiento del dolor neuropático son los antidepresivos tricíclicos (ATC), con eficacia demostrada, por lo que se consideran generalmente de primera línea. Otros antidepresivos, los inhibidores selectivos de la recaptación de noradrenalina-serotonina (ISRN), también han demostrado su utilidad. Parecen ser menos eficaces, aunque mejor tolerados.

Ciertos antiepilépticos han mostrado su eficacia y son propuestos por algunos autores como fármacos de primera línea al mismo nivel que los ATC. En este grupo destacan la carbamazepina y gabapentina.

La utilización de opiodes en este tipo de tratamiento ha sido objeto de controversia, no obstante, en la actualidad parecen estar aceptados como fármacos de segunda o tercera línea.

A pesar de los fármacos mencionados, los tratamientos eficaces para el alivio del dolor neuropático son escasos y el número de pacientes que sufren este tipo de dolor crónico no aliviado sigue siendo elevado. Sin embargo, las opciones de tratamiento están expandiéndose continuamente y son probadas en estudios clínicos. Ninguna de las opciones disponibles actualmente proporciona un alivio bueno o moderado en más del 50-60 % de los pacientes en los estudios clínicos. Nuestro conocimiento sobre los mecanismos del dolor está creciendo en alcance y complejidad, y modelos animales y humanos de dolor están actualmente disponibles para probar fármacos antes de embarcarse en estudios clínicos a gran escala, difíciles y costosos.

Diferentes ensayos clínicos han demostrado que los derivados cannabinoides pueden ser considerados como tratamientos muy prometedores para el dolor que no responde a los tratamientos disponibles (Fox y cols., 2001; Manzanares y cols., 2006; Nurmikko y cols., 2007). De esta manera se abre una línea muy prometedora para tratar el dolor que no responde a las terapias farmacológicas disponibles en la actualidad (Walker y cols., 1999).

Básicamente, la antinocicepción de los derivados cannabinoides se debe a la activación de los receptores cannabinoides, sobre todo CB1 (Pertwee, 2001). Los receptores CB2, relacionados clásicamente con la modulación de la respuesta inmunológica, se encuentran también implicados en la antinocicepción modulando la liberación de factores pro e inflamatorios de células no neuronales nociceptivas (los receptores CB1 se relacionan más con la modulación de transmisión del dolor a través del sistema nervioso central) (Mackie, 2006).

La actividad antinociceptiva cannabinérgica central se debe a la presencia de receptores a nivel supraespinal y espinal. La administración de agonistas cannabinoides permite la disminución de la intensidad de entrada del impulso nociceptivo en el cerebro al alterar el sistema de control ascendente y descendente. Por lo tanto, se reduce la percepción central del dolor y el descenso de la actividad espontánea y evocada de los centros supraespinales por la actuación de un sistema descendente.

En la actividad cannabinérgica periférica, los receptores cannabinoides responsables, en cantidad considerablemente más pequeña que en el sistema nervioso central, están más relacionados con la modulación de la liberación de factores pro- e inflamatorios de las células no neuronales localizadas en la proximidad de neuronas nociceptivas que con la transmisión del dolor a través del sistema nervioso central (hecho que se debe a la presencia de receptores CB1) (Manzanares y cols., 1999; Mackie, 2006).

Desde el punto de vista experimental, la actividad analgésica de los agonistas del receptor cannabinoide es similar a la de los opiáceos, tanto en modelos de dolor por exceso de nocicepción, como en modelos de dolor visceral y neuropático (Pertwee, 2001), aunque los cannabinoides presentan mecanismos antinociceptivos diferentes. Esto supone abrir una nueva línea para tratar el dolor que no responde a los tratamientos farmacológicos actuales, especialmente para los dolores neuropáticos e inflamatorios (Skrabek y cols., 2008). Con esta situación, un tratamiento que permita que pacientes con dolor neuropático severo puedan llevar a cabo sus actividades diarias puede suponer un beneficio considerablemente superior a sus posibles efectos adversos.

El principio activo más importante del cannabis es el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC). El THC es el responsable de la mayoría de las acciones psicoactivas y efectos terapéuticos atribuidos a esta planta, como los efectos antiemético, analgésico, sedante y estimulante del apetito. El segundo principio activo en importancia es el cannabidiol (CBD). Es un cannabinoide no psicoactivo que actúa por un mecanismo diferente al del THC y comparte algunos de sus efectos terapéuticos. Ha mostrado efecto neuroprotector *in vitro*, así como efecto analgésico, antiinflamatorio, inmunosupresor, antiemético, hipnótico y ansiolítico en modelos de experimentación animal.

1.4.2. Cáncer

«Cáncer» es un término genérico que designa a un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de «tumores malignos» o «neoplasias malignas» (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>).

El cáncer empieza en las *células*, las cuales son las unidades básicas que forman los *tejidos*. Los tejidos forman los *órganos* del cuerpo. Normalmente, las células crecen y se dividen para formar nuevas células a medida que el cuerpo las necesita. Cuando las células envejecen y mueren, son reemplazadas por células nuevas. Algunas veces este proceso ordenado se descontrola. Las células nuevas se siguen formando cuando el cuerpo no las necesita y las viejas no mueren cuando deberían. Estas células que no son necesarias forman una masa de tejido, que es lo que se llama *tumor* (<http://cancer.gov/>). Los tumores pueden ser clasificados en *benignos* o *malignos*:

- Los tumores benignos no son cancerosos.
- Rara vez ponen la vida en peligro.

- Generalmente, se pueden operar y comúnmente no vuelven a crecer.
- Las células de tumores benignos no invaden tejidos de su alrededor.
- Las células de tumores benignos no se diseminan a otras partes del cuerpo.
- Los tumores malignos son cancerosos.
- Son más graves que los tumores benignos. Pueden poner la vida en peligro.
- Generalmente pueden extirparse, pero algunas veces vuelven a crecer.
- Las células de tumores malignos pueden invadir y dañar tejidos y órganos cercanos.
- Las células de tumores malignos pueden diseminarse (metástasis) a otras partes del cuerpo. Las células cancerosas se diseminan al desprenderse del tumor original (primario) y entrar en el torrente de la sangre o en el sistema linfático. Las células pueden invadir otros órganos y formar tumores nuevos que dañan estos órganos.

La transformación de una célula normal en tumoral es un proceso multifásico y suele consistir en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Estas alteraciones son el resultado de la interacción entre los factores genéticos del paciente y tres categorías de agentes externos: i) carcinógenos físicos, como las radiaciones ultravioleta e ionizantes; ii) carcinógenos químicos, como los asbestos, los componentes del humo de tabaco, las aflatoxinas

(contaminantes de los alimentos) o el arsénico (contaminante del agua de bebida); y iii) carcinógenos biológicos, como las infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos.

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo con unas 13 millones de personas diagnosticadas y 7.5 millones de muertes cada año. En la figura 7 se aprecia la incidencia y la mortalidad de los diferentes tipos de cáncer en todo el mundo, realizado por el proyecto GLOBOCAN en 2008 (últimos datos que se recogen). El proyecto GLOBOCAN tiene como objetivo proporcionar estimaciones contemporáneas de la incidencia, prevalencia y años de vida ajustados a discapacidad de los principales cánceres, a nivel nacional, de 184 países del mundo (<http://globocan.iarc.fr/>).

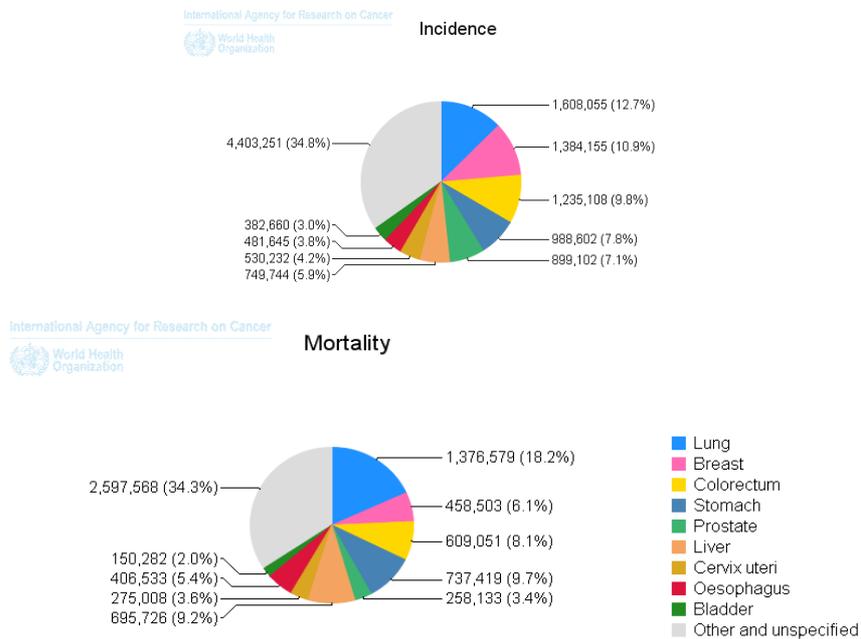


Figura 7. Incidencia y mortalidad de los cánceres más frecuentemente diagnosticados en todo el mundo, en 2008 (GLOBOCAN, <http://globocan.iarc.fr/>)

Más del 70 % de las defunciones por cáncer se registraron en países de ingresos bajos y medianos. Se prevé que el número de defunciones por cáncer siga aumentando en todo el mundo y supere los 13,1 millones en 2030 (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>).

1.4.2.1. Factores de riesgo del cáncer

Muchas causas o factores de riesgo pueden contribuir a la posibilidad de que una persona contraiga el cáncer. Es importante recalcar que una de cada tres personas padecerá cáncer durante su vida. Los factores de riesgo son elementos que aumentan la posibilidad de contraer cáncer. La mayoría de los cánceres probablemente se relacionan con más de un factor de riesgo. Pueden incluir elementos tales como edad, raza, sexo, factores genéticos, dieta y exposición a sustancias químicas, radiación y tabaco (http://www.atsdr.cdc.gov/es/general/cancer/riesgo_cancer.html). A continuación se enumeran los factores de riesgo más comunes en el desarrollo de la enfermedad:

- **Envejecimiento:** la mayoría de los cánceres ocurren en las personas después de los 65 años de edad. Aunque personas de todas las edades, incluyendo los niños, pueden padecer cáncer también (Irigaray y cols., 2007; Niccoli y Partridge, 2012).
- **Tabaco:** en España, cada año mueren más de 50000 personas de cáncer relacionado con el consumo de tabaco. El consumo de productos del tabaco o estar expuesto de manera regular al humo de tabaco (fumadores pasivos) aumenta el riesgo de padecer cáncer (Gómez-Raposo y cols., 2007; Seitz y Cho, 2009).

Los fumadores tienen mayor probabilidad de padecer cáncer de pulmón, laringe, boca, esófago, vejiga, riñón, garganta, estómago, páncreas, cuello uterino o cérvix. También tienen más probabilidad de padecer leucemia mieloide aguda (cáncer que comienza en las células de la sangre) (Khan y cols., 2010).

- Radiación ultravioleta (UV): proviene del sol y de las lámparas y camas solares; causa envejecimiento prematuro de la piel y daños en la piel que pueden resultar en cáncer. Se recomienda limitar la exposición al sol y evitar otras fuentes de radiación ultravioleta (Irigaray y cols., 2007).
- Radiación ionizante: puede causar daños celulares que resulten en cáncer. Este tipo de radiación proviene de rayos que penetran la atmósfera terrestre desde el espacio, de una lluvia radioactiva, del gas radón, de los rayos X y de otras fuentes (Irigaray y cols., 2007).

La lluvia radioactiva puede originarse de accidentes en plantas nucleares de energía o de la producción, prueba o uso de armas atómicas. La gente expuesta puede tener mayor riesgo de cáncer, especialmente de leucemia y cáncer de tiroides, mama, pulmón y estómago (Khan y cols., 2010).

Además, algunos procedimientos médicos son una fuente común de radiación (rayos X o radioterapia, aunque en ambos casos, el beneficio es casi siempre mayor que el pequeño riesgo que implica el tratamiento).

- Ciertos productos químicos y otras sustancias: algunas personas tienen un mayor riesgo de cáncer debido al trabajo que realizan (pintores, trabajadores de la construcción,

trabajadores de la industria química). Muchos estudios han demostrado que la exposición al asbesto, benceno, bencidina, cadmio, níquel y cloruro de vinilo en el trabajo puede causar cáncer.

- Algunos virus y bacterias: la infección causada por algunos virus o bacterias puede aumentar el riesgo de padecer cáncer (Irigaray y cols., 2007).
 - Virus del papiloma humano (VPH): La infección por VPH es la causa principal de cáncer cervical, es decir, cáncer de cuello uterino. También puede ser un factor de riesgo para otros tipos de cáncer.
 - Virus de hepatitis B (VHB) y hepatitis C (VHC): El cáncer de hígado puede aparecer después de varios años de infección con hepatitis B o hepatitis C.
 - Virus de la leucemia de células T humanas tipo 1 (HTLV-1): La infección con el virus de la leucemia de células T humanas tipo 1 aumenta el riesgo de padecer linfoma y leucemia.
 - Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH): El VIH es el virus que causa el SIDA. Las personas que tienen la infección de VIH tienen mayor riesgo de padecer cáncer, como linfomas o sarcoma de Kaposi.
 - Virus de Epstein-Barr: La infección del virus de Epstein-Barr ha sido asociada con un mayor riesgo de linfoma.
 - Herpesvirus humano 8 (HHV8): Este virus es un factor de riesgo para el sarcoma de Kaposi.

- *Helicobacter pylori*: esta bacteria puede causar úlceras en el estómago. También puede causar cáncer de estómago y linfoma en el recubrimiento del estómago.
- Hormonas: algunas hormonas (estrógeno solo o estrógeno junto con progesterona) recomendadas para aliviar algunos problemas (como los bochornos, sofocos y calores, la sequedad vaginal y el adelgazamiento de huesos) que suelen ocurrir durante la menopausia, pueden aumentar el riesgo de cáncer de mama (Donovan y cols., 2007).
- Antecedentes familiares de cáncer: algunos cambios en los genes (debido a mutaciones) que aumentan el riesgo de padecer cáncer pasan de padres a hijos. Estos cambios están presentes en todas las células del cuerpo desde el nacimiento (Calzone, 2012).

La genética desempeña una gran función para la mayoría de los cánceres, como es el caso del cáncer de mama (Clamp y cols., 2003) y el cáncer de colon. Esto significa que la historia de salud de una familia puede constituir un factor de riesgo para algunos tipos de cáncer.

- Alcohol: tomar más de dos bebidas alcohólicas por día durante varios años puede aumentar el riesgo de padecer cáncer de boca, garganta, esófago, laringe, hígado y mama. El riesgo aumenta con la cantidad de alcohol que se ingiere. Para la mayoría de estos cánceres, el riesgo es aún mayor si la persona también fuma (Irigaray y cols., 2007; Khan y cols., 2010; Seitz y Cho, 2009).

- Dieta deficiente, falta de actividad física o sobrepeso: las personas que tienen una dieta inadecuada, que no tienen suficiente actividad física o que tienen exceso de peso pueden tener un mayor riesgo de padecer varios tipos de cáncer. Por ejemplo, algunos estudios sugieren que las personas que comen una dieta rica en grasas tienen mayor riesgo de padecer cáncer de colon, de útero y de próstata. La falta de actividad física y el exceso de peso son factores de riesgo para padecer cáncer de mama, colon, esófago, riñón y útero (Irigaray y cols., 2007; Khan y cols., 2010).

1.4.2.2. Diagnóstico y detección precoz del cáncer

El diagnóstico y la detección precoz del cáncer aumentan enormemente las posibilidades de que el tratamiento resulte eficaz. Los componentes principales de la detección precoz del cáncer son dos: la educación para promover un diagnóstico precoz y el cribado (Ott y cols., 2009).

Si se reconocen las posibles señales de alerta del cáncer y se toman medidas con rapidez puede llegarse a un diagnóstico precoz. Un mayor conocimiento de las posibles señales de alerta del cáncer entre los médicos, el personal de enfermería y otros dispensadores de atención de salud, así como entre el público en general, puede tener un gran impacto en la enfermedad. Algunas de las señales iniciales del cáncer son la aparición de bultos, llagas que no cicatrizan, sangrado anormal, indigestión persistente y ronquera crónica. El diagnóstico precoz es especialmente importante en el cáncer de mama, cuello uterino, boca, laringe, colon y recto, y piel.

Por otro lado, se entiende por «cribado» la utilización de pruebas sencillas en una población sana con el fin de detectar sistemáticamente a las personas que aún no presentan ningún síntoma pese a sufrir una determinada enfermedad. Pueden citarse como ejemplos el cribado del cáncer de mama mediante mamografía y el del cáncer del cuello del útero con métodos de detección citológica (Perea y cols., 2012).

1.4.2.3. Tratamiento del cáncer

El plan de tratamiento depende principalmente del tipo de cáncer y del estadio de la enfermedad. Además, también se tiene en cuenta la edad del paciente y su salud general. Con frecuencia, el objetivo del tratamiento es curar el cáncer. En otros casos, el objetivo es controlar la enfermedad o reducir los síntomas el mayor tiempo posible (Balducci, 2007).

Aunque el plan de tratamiento puede ir variando con el tiempo, la mayoría de los planes de tratamiento incluyen cirugía, radioterapia y/o quimioterapia. Algunos comprenden terapia hormonal o terapia biológica. Además, se puede hacer un trasplante de células madre para que el paciente pueda recibir altas dosis de quimioterapia o radioterapia. Algunos cánceres responden mejor a un solo tipo de tratamiento, mientras que otros pueden responder mejor a una combinación de tratamientos.

Los tratamientos pueden actuar en un área específica (*terapia local*) o en todo el cuerpo (*terapia sistémica*). La terapia local extirpa o destruye el cáncer en una sola parte del cuerpo (cirugía y radioterapia). La terapia sistémica envía medicamentos o sustancias por el torrente sanguíneo para destruir células cancerosas en todo el cuerpo, destruyendo las células cancerosas que se hayan diseminado más allá

del tumor original. La quimioterapia, la terapia hormonal y la terapia biológica son generalmente terapias sistémicas.

Los efectos secundarios son frecuentes ya que los tratamientos para el cáncer generalmente dañan células y tejidos sanos. Los efectos secundarios dependen fundamentalmente del tipo y extensión del tratamiento. Es posible que los efectos secundarios no sean los mismos para todos los pacientes que reciben el tratamiento y los efectos pueden cambiar de una sesión de tratamiento a otra.

Sin embargo, la investigación actual se centra en el desarrollo de nuevos abordajes terapéuticos en el tratamiento del cáncer. Los estudios de las bases moleculares y de los mecanismos relacionados con el cáncer abren una nueva posibilidad al desarrollo de nuevos tratamientos para combatir la enfermedad.

Investigaciones recientes sugieren que los agonistas de los receptores cannabinoides, expresados por las células tumorales, pueden ofrecer una nueva estrategia para tratar el cáncer. Actualmente, su estudio se centra en el desarrollo de este tipo de cannabinoides para la terapia del cáncer, actuando como paliativos o como medicamentos contra el desarrollo del cáncer (Pisanti y cols., 2009).

Entre los efectos paliativos, se ha observado que los cannabinoides ejercen una actividad antiemética tras la activación de los receptores cannabinoides, probablemente localizados en el tronco cerebral. Esta acción antiemética mostrada por este tipo de sustancias es ligeramente mejor que la de los antieméticos convencionales (por ejemplo, metoclopramida, fenotiazinas, haloperidol) (Gralla y cols., 1984; Mannix, 2004).

Otro de los efectos psicológicos que se observan en los derivados cannabinoides es la estimulación del apetito, con la inducción de un fuerte deseo de comer y un efecto potenciado sobre el disfrute de las propiedades sensoriales de los alimentos. Los endocannabinoides parecen estar directamente implicados en los mecanismos centrales que dan lugar al ansia por la comida, el hambre y la anticipación y la evaluación hedónica de los alimentos. Entre los efectos del cáncer y de su tratamiento (generalmente quimioterapia) se encuentran la falta de apetito, inflamación de la boca, y la alteración del gusto de los alimentos, por lo que la administración de derivados de cannabinoides puede mejorar estos efectos (Mattes y cols., 1994; Kirkham, 2005).

Además, estos compuestos tienen propiedades analgésicas, ansiolíticas y antidepresivas, lo que permitiría combatir otros aspectos negativos asociados al cáncer (dolor oncológico, estados anímicos alterados).

Aparte de estas acciones paliativas, la investigación preclínica reciente sugiere que los pacientes con cáncer pueden beneficiarse de los cannabinoides de una forma adicional: desde finales de 1990, una importante cantidad de datos experimentales han demostrado que estos compuestos ejercen efectos antitumorales en diferentes modelos de cáncer, tanto en cultivos celulares como en modelos *in vivo* de ratones transgénicos (Caffarel y cols., 2012).

La acción antitumoral cannabinoide se basa en el bloqueo de varios mecanismos de la progresión tumoral. Por un lado, inhiben el crecimiento incontrolado de células del cáncer (por inhibición de la proliferación celular y mediante la inducción de muerte de células cancerosas por apoptosis), así como también afectan a la angiogénesis

tumoral y la metástasis. Curiosamente, estos efectos se han observado en células tumorales de origen muy diferente, incluyendo gliomas, melanomas, carcinomas de mama, piel, pulmones, hígado, páncreas, colon, próstata, y linfomas, entre otros, lo que indica que la acción antitumoral desarrollada por los cannabinoides tiene un carácter general y no es específico de un solo tipo de tumor (Velasco y cols., 2012).

1.5. Limitaciones en la aplicación terapéutica de los cannabinoides

El amplio abanico de aplicaciones terapéuticas ofertado por los cannabinoides ha dado lugar al desarrollo de diversas formulaciones de estos fármacos y sus derivados. Sin embargo, este grupo de sustancias presentan una serie de limitaciones que han frenado su progreso. Una de las principales limitaciones encontradas en la aplicación terapéutica de los cannabinoides está relacionada con su baja solubilidad acuosa. Desde el punto de vista de su disposición, los cannabinoides son sustancias que tienen una estructura carbocíclica con 21 carbonos y están formados generalmente por tres anillos, ciclohexano, tetrahidropirano y benceno, lo que les confiere propiedades altamente hidrófobas. Esta propiedad dificulta el desarrollo de una formulación de cannabinoides efectiva que permita administrarlos de forma óptima, ya que limita su absorción oral, aumenta su inestabilidad y favorece la acumulación en tejidos lipófilos del organismo.

A pesar de ello, actualmente, además del cannabis propiamente dicho, hay varios medicamentos derivados de cannabinoides que han sido investigados y comercializados como medicamentos en el mercado farmacéutico tanto nacional como internacional:

- Marinol[®] (Unimed Pharmaceuticals, Inc.). Contiene un derivado sintético del THC formulado en cápsulas (dronabinol). Registrado en Estados Unidos, Canadá, Sudáfrica, Australia y Nueva Zelanda para las náuseas y vómitos secundarios de la quimioterapia, así como para el síndrome de anorexia-caquexia de los pacientes con sida o cáncer terminal. Este compuesto presenta una absorción baja y errática que se traduce en una biodisponibilidad oral en torno al 6 % (Russo, 2008).
- Cesamet[®] (Eli Lilly & Co.). Es un cannabinoide sintético y análogo al dronabinol (nabilona) y se presenta en cápsulas para administración oral. Está indicado como auxiliar en el manejo del dolor crónico en pacientes con cáncer, esclerosis múltiple, fibromialgia y dolor neuropático. También está indicado en náuseas y vómitos inducidos por la quimioterapia del cáncer, especialmente útil en casos donde otros antieméticos no han sido efectivos. Sin embargo, aunque su biodisponibilidad oral ha sido mejorada con respecto al dronabinol, su absorción es lenta, irregular y variable entre los individuos. Su biodisponibilidad puede variar entre un 5 y un 10 %, debido a que es destruido parcialmente por el jugo gástrico y a que sufre efecto de primer paso hepático (Grotenhermen, 2003). Comercializado en Reino Unido, Canadá, Irlanda y Estados Unidos.
- Sativex[®] (Almirall), que contiene cannabidiol y Δ^9 -THC. Registrado en España (primer derivado del cannabis aprobado en 2010), para el tratamiento del dolor neuropático, tratamiento de la espasticidad en pacientes con esclerosis múltiple y adyuvante del tratamiento del dolor en oncología (Russo y cols.,

2007). Está formulado como solución para pulverización sublingual conteniendo etanol y propilenglicol como agentes solubilizantes, lo que puede provocar irritación en el lugar de administración (Naef y cols., 2004).

Recientemente, Hernán Pérez de la Ossa y cols. (2012) han desarrollado un sistema de administración basado en la microencapsulación de Δ^9 -THC. Las micropartículas fueron elaboradas a base del polímero poli- ϵ -caprolactona (PCL) y con tamaño de partícula entre 20 y 50 μm . Estos sistemas mostraron una actividad antitumoral prolongada en cultivo celular, sin embargo, su administración fue únicamente posible por vía parenteral, debido a su tamaño. No obstante, es la primera referencia en literatura que desarrolla un sistema basado en micropartículas como transportador de cannabinoides.

Por esta razón, el estudio de portadores nanotecnológicos como sistemas de administración oral de fármacos con baja solubilidad acuosa, como los cannabinoides, se presenta como una alternativa apropiada y novedosa. En base a todo ello, en el presente trabajo se propone el desarrollo de un sistema nanométrico que permita por un lado, la administración oral de este tipo de compuestos, obviando sus problemas de baja hidrosolubilidad y errática absorción, y, por otro, la liberación controlada en el tiempo de los activos vehiculizados, proporcionando una respuesta terapéutica óptima.

2. NANOTECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

El término “Nanotecnología” es usado extensivamente para definir las ciencias y las técnicas que se aplican a nivel de nanoescala, es decir, está relacionado con el estudio de entidades y cuerpos de tamaño nanométrico. Para tener una idea aproximada del tamaño de los sistemas que nos ocupa, basta decir que un eritrocito tiene un tamaño aproximado de 5000 nm, un virus mide unos 50 nm y el ADN unos 2 nm.

La peculiaridad de estos objetos de dimensiones nanométricas, tanto naturales como elaborados, reside en que presentan propiedades físicas, químicas y biológicas que difieren de forma importante de las propiedades que presentan a escala micro- o macroscópica. Estas características derivan principalmente de la gran superficie que ofrecen estos materiales al reducir considerablemente su tamaño (Roco, 2003).

En este sentido la Nanotecnología Farmacéutica podría definirse como el uso de la Nanotecnología para la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades, así como para mejorar la salud y funcionamiento del organismo humano. Las aplicaciones de la Nanotecnología Farmacéutica incluirían el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos con localización o direccionamiento específico, la creación de “laboratorios en un chip” que desempeñen múltiples funciones *in vitro* e *in vivo*, así como implantes y plataformas para tejidos (Yokoyama, 2005).

A grandes rasgos, las áreas de actuación de la Nanomedicina y Nanotecnología Farmacéutica se centran en diagnóstico, vectorización de fármacos y medicina regenerativa (figura 8).

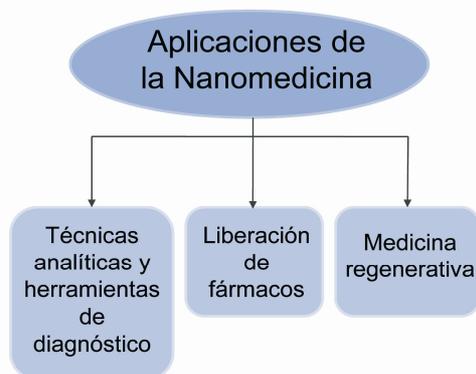


Figura 8. Principales áreas de aplicación de la Nanomedicina y Nanotecnología Farmacéutica (Fuente: González y cols., 2005).

En el campo de los sistemas de liberación de fármacos, la Nanotecnología permite la vectorización de principios activos a nivel de órganos, tejidos o células sobre los que ejercen su acción mediante la utilización de transportadores. Estos sistemas transportadores deben garantizar el direccionamiento del fármaco al lugar que lo necesite y en la cantidad adecuada (Singh y Lillard, 2009). Además, deben cumplir con ciertas características, como lo son una baja toxicidad, propiedades óptimas para el transporte y liberación del fármaco y una larga vida media en el organismo (Barratt, 2000). La Nanotecnología permitirá por medio de la obtención de dispositivos a escala nanométrica, liberar el fármaco de forma menos invasiva y tóxica en todos aquellos tejidos y células diana.

Una ventaja que ofrece este tipo de dispositivos es el evidente aumento de la efectividad del medicamento por medio del control preciso de la dosis requerida, del tamaño, la morfología y las propiedades superficiales. Al liberarse nanopartículas de forma específica sólo en órganos, tejidos o células que lo necesiten, se disminuye la toxicidad asociada al fármaco. Por otra parte, es necesario tener en cuenta que los sistemas de administración de fármacos

proporcionan la liberación sostenida del mismo de acuerdo con las necesidades del paciente, lo que permite la disminución de posibles efectos adversos que se puedan presentar como consecuencia de la administración masiva y prolongada de un fármaco determinado (Kawasaki y Player, 2005).

Cuando la Nanotecnología se aplica al diseño y desarrollo de sistemas de liberación de fármacos, surge un área de investigación cuyo fin último es la generación de *Nanosistemas Terapéuticos*. Estos nanosistemas están diseñados para ser administrados por distintas vías: la vía oral, con una importante presencia de conjugados de proteínas, péptido/molécula activa y distintas variedades de nanopartículas; la vía intravenosa, en donde destacan los sistemas tipo liposomas o nanosistemas modificados con anticuerpos, proteínas y péptidos para una vectorización activa; y la vía pulmonar, en donde se concentra la mayor variedad de sistemas y supone aproximadamente un 30 % del mercado de los sistemas de liberación de fármacos.

Los principales campos de investigación y aplicación de estos nanosistemas se orientan al desarrollo de vectores efectivos para enfermedades de difícil curación y de importante incidencia: cáncer (vectorización tumoral selectiva), enfermedades neurodegenerativas (paso a través de la barrera hematoencefálica) y enfermedades cardiovasculares. Estas áreas dedican actualmente importantes esfuerzos a la conjugación de anticuerpos en sistemas como nanopartículas y liposomas con el propósito de conseguir el transporte del fármaco de forma selectiva y eficaz.

Los aspectos en los que se debe focalizar el diseño y desarrollo futuro de los nanosistemas terapéuticos son (Vila-Jato, 2009):

- Nanosistemas que transporten y liberen el fármaco de forma selectiva en el órgano, tejido y célula diana.
- Diseño de nanosistemas seguros y eficaces.
- Promover la colaboración de los centros públicos y empresas, trabajando en Tecnología Farmacéutica y Biofarmacia, Ciencia y Tecnología de Materiales, Química Orgánica, Física Aplicada, Nanociencias, Biología celular, Fisiología, Inmunología, Farmacología Bioquímica, Biología Molecular e Investigación Clínica para encontrar sinergias y establecer proyectos con objetivos en el diseño y desarrollo de nanofármacos.
- Promover el diseño de nuevos materiales, polímeros sintéticos o semisintéticos, metales, lípidos y otros que sean biocompatibles, biodegradables y que permitan la formación de sistemas nanométricos fácilmente modificables, modulables y funcionalizables para conseguir sustratos para vectorización, materiales inteligentes con respuesta a distintos cambios o estímulos (pH, temperatura, campos magnéticos) y biosensores.
- Avanzar en técnicas de nanorecubrimiento, funcionalización y modificación de superficies.
- Avanzar en las tecnologías de fabricación de sistemas nanoparticulares (nanopartículas, micelas, liposomas, nanotubos, nanofibras) fácilmente escalables e industrializables.
- Desarrollo de técnicas analíticas que permitan la caracterización, evolución y seguimiento de los nuevos materiales.

- Desarrollo de las técnicas de conjugación de biomoléculas en condiciones efectivas de estabilidad y funcionalidad.
- Avances en modelos *in vitro* e *in vivo* para un mejor conocimiento de la función celular: identificación de receptores y marcadores de patologías para estrategias de vectorización.
- Mejores correlaciones farmacocinéticas y farmacodinámicas para predicciones del comportamiento de los sistemas de liberación *in vivo*.
- Avances en las técnicas de imagen para la visualización de la interacción de los sistemas nanométricos y las funciones celulares.

Actualmente, existen una gran variedad de diferentes tipos de sistemas de liberación de fármacos que se diferencian en su composición y estructura (figura 9).

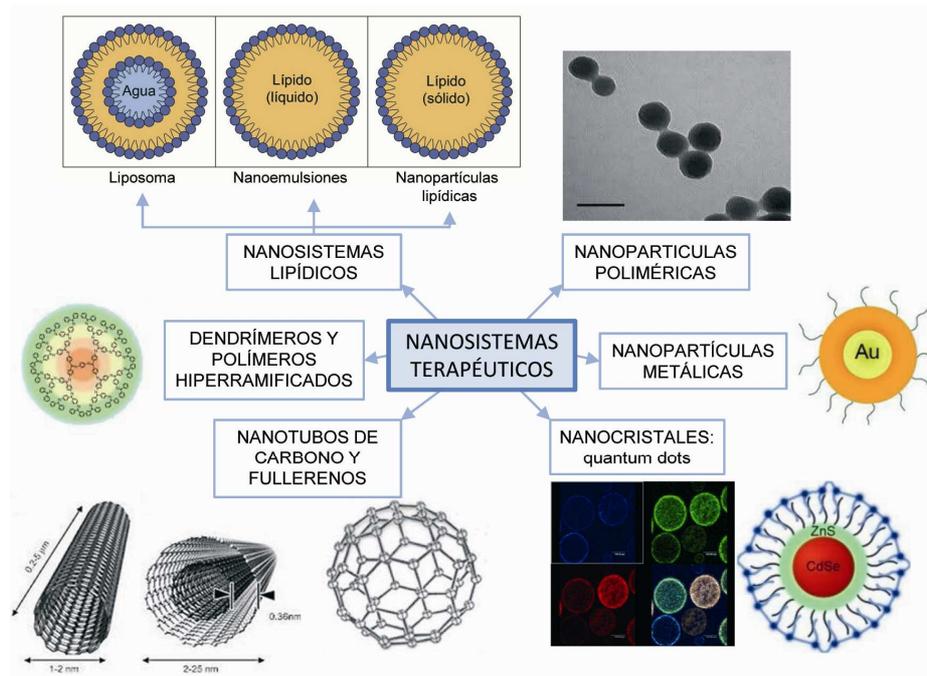


Figura 9. Tipos de nanosistemas terapéuticos.

Los principales sistemas de liberación de fármacos más ampliamente estudiados y conocidos son los liposomas, los dendrímeros y las nanopartículas (Svenson y Tomalia, 2005; Chun y cols., 2013). Sin embargo, en estos últimos años, la Nanotecnología ha ido evolucionando eficazmente estudiando nuevos nanosistemas como son las nanopartículas superparamagnéticas (Arias y cols., 2012; Eustaquio y Leary, 2012), las nanoenvolturas de oro (Chen y cols., 2008), los nanocristales (Junghanns y Muller, 2008) y las nanopartículas de silicio y sílice (Peng y cols, 2006).

En concreto, la utilización de nanopartículas es un área importante de la investigación en el campo de la liberación de fármacos, ya que estos sistemas permiten dirigir una amplia variedad de moléculas a los distintos tejidos liberándolos de manera sostenida en el tiempo.

Además, el uso de nanopartículas minimiza la degradación del principio activo, incrementa su semivida en el interior del órgano a tratar y disminuye su toxicidad.

A continuación se realizará una breve descripción de las nanopartículas por ser objeto de estudio de la presente tesis doctoral.

2.1. Nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas son sistemas coloidales de tamaño entre 10 y 1000 nm, generalmente de naturaleza polimérica. Se utilizan como portadores de fármacos en las que el principio activo está disuelto, atrapado, encapsulado, adsorbido o fijado a la partícula (Kreuter, 2007). Dependiendo de su estructura, las nanopartículas se clasifican en nanocápsulas y nanoesferas. Las nanocápsulas son sistemas reservorio constituidos por un núcleo rodeado de una membrana. En este caso el principio activo suele encontrarse en el núcleo, aunque también puede estar adsorbido en la superficie; en cambio, las nanoesferas son sistemas matriciales constituidos por el entrecruzamiento de los componentes de la matriz, en los que el principio activo se puede encontrar atrapado en la matriz, disuelto en ella o adsorbido en su superficie. A estas estructuras se les suele denominar indistintamente “nanopartículas” o “nanoesferas” (figura 10).

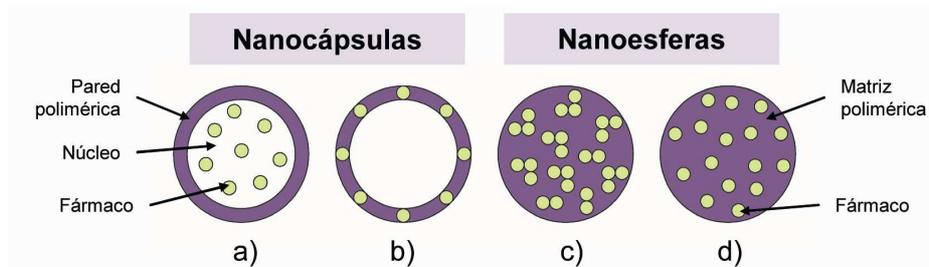


Figura 10. Dibujo esquemático de nanocápsulas y nanoesferas.

Las nanopartículas han sido propuestas para un gran número de aplicaciones, incluyendo marcadores biológicos, formación de imágenes, productos sanitarios, productos farmacéuticos, sistemas de liberación de fármacos, así como en la detección, diagnóstico y tratamiento de diversos tipos de enfermedades (Parveen y Sahoo, 2008). Representan sistemas de administración de fármacos adecuados para la mayoría de las vías de administración, incluyendo los inyectables (limitado por un rápido reconocimiento por el sistema inmune) (Igarashi, 2008). Además, se consigue una mejoría notable en la administración de fármacos lipófilos, proteínas, péptidos y genes por vía oral (Hillaireau y cols., 2006; Bhavsar y Amiji, 2007; Yoncheva y cols., 2007), así como también en el suministro de fármacos que se dirigen a determinados órganos/tejidos como portadores de ADN en terapia génica.

Desde un punto de vista tecnológico, las nanopartículas presentan una serie de ventajas:

- Alta estabilidad
- Pueden transportar una alta carga del fármaco.
- Capacidad de incorporación de sustancias tanto hidrófilas como hidrófobas.
- Propiedades de liberación controlada.

Estas cualidades permiten mejoras en la biodisponibilidad del fármaco, modificación de los perfiles farmacocinéticos y especificidad de acción y penetración intracelular de fármacos macromoleculares.

Desde el punto de vista de su fabricación, se han utilizado una amplia gama de materiales, tanto sintéticos como naturales, para

prepararlas. Idealmente, estos compuestos deben ser no tóxicos, biocompatibles, libre de impurezas y fácilmente procesables. Dentro de los polímeros sintéticos destacan los poliésteres, debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad. Los más utilizados son el ácido láctico (PLA) y los copolímeros formados por unidades monoméricas de ácido láctico y glicólico (PLGA), aprobados por la FDA para elaborar sistemas para la administración de sustancias activas por vía parenteral. Además, modificando el peso molecular, el grado de hidrofilia y la proporción de cada uno de los monómeros se puede controlar la velocidad de degradación de los mismos, el grado de encapsulación y la liberación del fármaco o principio activo (Makadia y Siegel, 2011). Otros polímeros empleados para la obtención de nanopartículas son la poli- ϵ -caprolactona (Dash y Konkimalla, 2012), el poli- β -hidroxibutirato (Grage y cols., 2009) y el ácido β -l-málico (Portilla-Arias y cols., 2008). Es importante señalar que el polímero empleado para formular las nanopartículas afecta de manera importante a las propiedades y estructura de las mismas y condiciona sus posibles aplicaciones, así como la vía de administración (Pinto Reis y cols., 2006).

El ácido poli-(láctico-co-glicólico) (PLGA) es uno de los polímeros sintéticos desarrollados con más éxito, debido a sus atractivas propiedades: (i) biodegradabilidad y biocompatibilidad, (ii) polímero aprobado por parte de la FDA y de la Agencia Europea de Medicina (EMA) para sistemas de administración de fármacos por vía parenteral, (iii) capacidad de dar lugar a formulaciones bien definidas y métodos de elaboración adaptados a diversos tipos de fármacos (pequeñas moléculas hidrófilas o hidrófobas o macromoléculas), (iv) capacidad de protección del fármaco frente a la degradación, (v) liberación sostenida

del principio activo, (vi) posibilidad de modificar las propiedades superficiales para proporcionar una mejor interacción con los materiales biológicos y (vii) posibilidad de direccionar las nanopartículas a los órganos o células específicas (Danhier y cols., 2012).

El PLGA está disponible comercialmente con diferentes pesos moleculares y composiciones, los cuales determinan el tiempo de degradación (desde varios meses a varios años) (Kumari y cols., 2010). Las distintas formas de PLGA se identifican generalmente por la relación de monómeros utilizados, por ejemplo, el PLGA 50:50 corresponde al co-polímero cuya composición es de 50 % de ácido láctico y 50 % de ácido glicólico.

Por todo ello, las nanopartículas de PLGA constituyen una gran oportunidad para la administración oral de fármacos que presentan condiciones desfavorables: propiedades fisicoquímicas inadecuadas para la absorción intestinal, problemas de estabilidad o solubilidad y clara disminución de la biodisponibilidad por efectos hepáticos de primer paso (Kagan y Hoffman, 2008). Su tamaño submicrométrico y una gran área superficial favorecen su absorción. De hecho, actualmente se encuentran comercializadas como sistemas de liberación sostenida de leuprolida (Lupron Depot[®], Abbott Lab.) y de triptorelina (Trelstar[®], Watson Pharm.). Además, se están llevando a cabo estudios para usarlas como vehículos para administración de proteínas (Giteau y cols., 2008), ARN (Campolongo y Luo, 2009) y antígenos para las células dendríticas (Gupta y cols., 2006).

Después de la administración oral, las nanopartículas de PLGA (por lo general en suspensión) son captadas y transportadas a través del epitelio de la mucosa. El mecanismo principal de absorción a través del

epitelio intestinal es difusión pasiva, impulsado por un gradiente de concentración. La difusión pasiva se puede producir entre las células (transporte paracelular) o a través del citoplasma (transporte transcelular) (Li, 2001). El transporte transcelular de las nanopartículas se lleva a cabo a través del proceso de transcitosis, por el cual las partículas son internalizadas (endocitosis) en la membrana apical, transportadas a través de la célula y finalmente, son liberadas (exocitosis) a través de la membrana basolateral.

Los procesos de endocitosis se pueden dividir en: endocitosis mediada por receptor, la cual requiere la unión de ligandos específicos a receptores de la membrana celular apical con el fin de iniciar el proceso de endocitosis; y la endocitosis adsorptiva, que no requiere ninguna interacción específica ligando-receptor y puede ser iniciada por la adsorción física de las nanopartículas a la superficie celular a través de fuerzas electrostáticas (enlaces de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas) (Gramma, 2011) (figura 11).

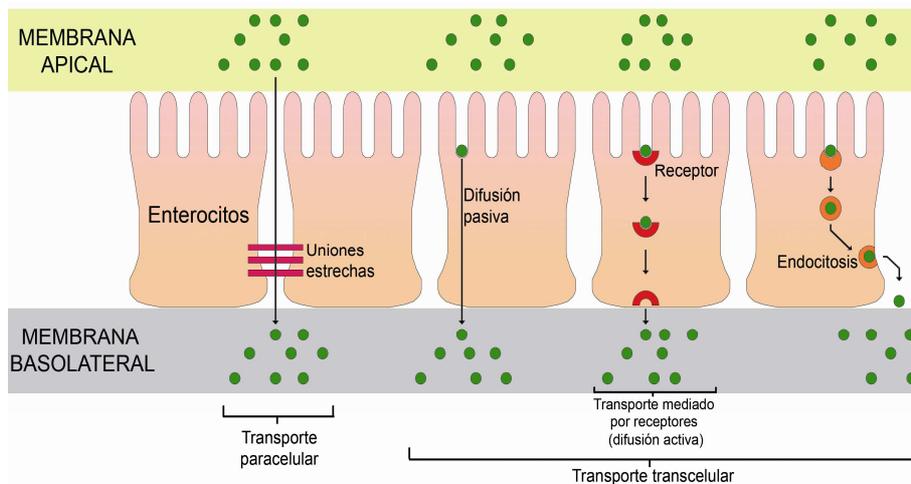


Figura 11. Representación esquemática de la internalización de nanopartículas en las células.

2.1.1. Métodos de elaboración de nanopartículas de PLGA

Dependiendo del método de preparación, su estructura puede diferir: fármaco atrapado en el interior del núcleo en las nanocápsulas; o bien, atrapado o adsorbido sobre la superficie de una matriz en las nanoesferas.

La técnica más común utilizada es el método de emulsión-extracción/evaporación del disolvente. Consiste en disolver polímero y fármaco en un disolvente orgánico (por ejemplo, diclorometano), formando la fase oleosa (O), la cual se emulsifica en una fase acuosa (A), consistente en agua y un tensioactivo (por ejemplo, polisorbato-80, poloxámero-188), formando una emulsión O/A. Las gotitas, de tamaño nanométrico, se inducen por sonicación u homogeneización. El disolvente se evapora o se extrae y las nanopartículas se recogen por centrifugación (Holgado y cols., 2008). Esta técnica permite la encapsulación de fármacos hidrófobos. Una modificación de la misma, es la técnica de la doble emulsión A/O/A, que se utiliza para encapsular fármacos hidrófilos, tales como péptidos, proteínas y ácidos nucleicos (Cózar-Bernal y cols., 2011).

Del mismo modo, las nanopartículas se pueden formar por el método de nanoprecipitación, también denominado método de deposición interfacial (Fessi y cols., 1989). En este método, polímero y fármaco se disuelven en un disolvente orgánico (tal como acetona) el cual se añade gota a gota a una solución acuosa (que contiene algún tensioactivo). El disolvente orgánico se evapora y las partículas se recogen después de la centrifugación.

Existen otras técnicas, tales como *spray-drying* (Beck y cols., 2012), *salting-out* (Allémann y cols., 1993) o por medio de fluidos supercríticos

(Byrappa y cols., 2008). En todos, el fármaco puede incorporarse de dos formas: (i) durante la producción propiamente dicha o (ii) por adsorción en las nanopartículas después de su producción.

2.1.2. Propiedades físico-químicas de las nanopartículas de PLGA

Las propiedades físico-químicas básicas a tener en cuenta en estos nanotransportadores son, generalmente, tamaño medio, distribución de tamaños (índice de polidispersión) y carga superficial.

El tamaño medio de partícula y el índice de polidispersión se pueden medir por espectroscopía de correlación de fotones (también llamado "dispersión de luz dinámica"). Esta técnica se basa en la dispersión de la luz causada por el movimiento browniano de las partículas (Gaumet y cols., 2008). Las técnicas de imagen, tales como microscopía electrónica de transmisión o microscopía de fuerza atómica proporcionan información sobre la morfología y el tamaño de las nanopartículas.

La carga superficial viene representada por el potencial zeta (PZ). La determinación de este parámetro se realiza estudiando la movilidad de las partículas cargadas a través de un potencial eléctrico. La carga superficial de las nanopartículas puede ser positiva o negativa. Generalmente las partículas de PLGA dan lugar a valores de PZ negativos (Soppimath y cols., 2001).

2.1.3. Limitaciones de las nanopartículas de PLGA como sistemas de administración de fármacos

Una vez administradas las nanopartículas y alcanzado el torrente circulatorio, el organismo las reconoce como extrañas, especialmente aquellas que sean hidrófobas. El sistema reticuloendotelial (RES) las

elimina de la corriente sanguínea y las lleva, fundamentalmente, a hígado y bazo. Este proceso es una de las barreras biológicas más importantes a la hora de administrar nanopartículas como sistemas transportadores de fármacos (Hans y Lowman, 2002). Además, las partículas se unen a unas proteínas presentes en la sangre, las opsoninas, para posteriormente ser detectadas por los macrófagos y eliminadas por fagocitosis (Owens y Peppas, 2006). Con objeto de superar estas limitaciones se han desarrollado técnicas para modificar la superficie de las nanopartículas y no ser así reconocidas por el RES. Para ello, los nanosistemas se recubren con moléculas que aumenten la hidrofilia superficial y dificulten así el reconocimiento por parte de los agentes que constituyen el RES.

Otra limitación es la carga superficial de las nanopartículas ya que dicho parámetro tiene una influencia importante en su interacción con las células y en su absorción. Las nanopartículas de PLGA tienen una ligera carga superficial negativa, la cual tiende a limitar su capacidad de interactuar con las células y, por lo tanto, la absorción intracelular, lo que conduce a una menor biodisponibilidad (Zhang y cols., 2012). Las partículas cargadas positivamente parecen permitir un mayor grado de internalización, como resultado de las interacciones iónicas que se establecen entre dichas partículas y la membrana celular que presenta carga negativa (Foged y cols., 2005; Vasir y Labhassetwar, 2008). Además, las cargadas positivamente parecen ser capaces de escapar de los lisosomas después de ser internalizadas, mientras que las cargadas negativamente son capaces de unirse a dichas estructuras (Yue y cols., 2011).

La modificación de las propiedades superficiales de las nanopartículas de PLGA se puede lograr, ya sea por recubrimiento de

la superficie con polímeros hidrófilos estabilizantes, bioadhesivos o tensioactivos, o mediante la incorporación de copolímeros biodegradables que le confieren una envoltura hidrófila a los nanotransportadores.

2.2. Funcionalización de nanopartículas de PLGA para administración oral

La existencia de múltiples vías de transporte a través del epitelio intestinal permite abordar diversas estrategias para mejorar la biodisponibilidad oral de las nanopartículas de PLGA. Algunas de estas vías se centran en las células M, mientras que otras apuntan, además de las células M, a todas las células intestinales, especialmente los enterocitos. La mayoría de estos enfoques se basan en la modificación de la superficie de las nanopartículas. La modificación de las propiedades de la superficie de dichas partículas se realiza, por ejemplo, por recubrimiento de la superficie con polímeros bioadhesivos hidrófilos o tensioactivos, o mediante la incorporación de copolímeros biodegradables que presentan propiedades hidrófilas. Estas modificaciones cambian, principalmente, el PZ de las partículas, así como su hidrofobicidad, produciendo inestabilidad coloidal de la formulación, cambios en las propiedades de mucoadhesión y en la adsorción de proteínas a su superficie y, finalmente, cambios en su absorción oral (des Rieux y cols., 2006).

Un claro ejemplo de la mejora de la biodisponibilidad oral de un fármaco utilizando estos sistemas se muestra en el reciente trabajo de Zhang y cols. (2012). En este trabajo, se administraron por vía oral nanopartículas de PLGA cargadas con insulina. Los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo* en ratas mostraron que las partículas

modificadas con quitosano modifican de forma notable los niveles de glucosa en plasma. Este comportamiento puede ser debido a la carga positiva del quitosano, en comparación con la insulina libre y las nanopartículas no modificadas, mejorando la absorción intestinal de la insulina. Además, tras una inyección subcutánea con una dosis de insulina de 15 UI/kg, la biodisponibilidad de los dos tipos de partículas ensayadas, no modificadas y modificadas, fue de 7.6 % y 10.5 %, respectivamente. Por otro lado, ensayos de transporte *in vivo* tras administración oral, han demostrado que estos sistemas pueden proteger eficazmente el fármaco encapsulado del jugo gástrico y de la degradación enzimática.

A continuación, se describen las principales estrategias utilizadas para modificar la superficie de las nanopartículas y el papel que desempeña cada aditivo. Todos los ejemplos y las referencias incluidas corresponden a nanopartículas sintetizadas con PLGA como polímero principal. Entre las sustancias empleadas para modificar la superficie se encuentran quitosano, polietilenglicol, metacrilatos, sales biliares, lecitinas, moléculas de RGD, etc.

2.2.1. Quitosano (CS)

El quitosano es un biopolímero hidrófilo que forma películas, hidrogeles, fibras, esponjas y micro- y nanopartículas bajo condiciones suaves. Químicamente, es un aminopolisacárido obtenido por N-desacetilación de la quitina, un hidrato de carbono procedente de varias especies de crustáceos. En productos farmacéuticos convencionales, el quitosano se utiliza como aglutinante, disgregante y material de recubrimiento. Sin embargo, en partículas para administración oral, ha sido ampliamente empleado para aumentar su absorción oral, debido a

sus propiedades mucoadhesivas y a su capacidad para abrir uniones estrechas entre células epiteliales, facilitando el transporte de fármacos macromoleculares a través de los epitelios organizados (Issa y cols., 2005). Recientemente, Zheng y cols., (2011) han estudiado el mecanismo de acción de este polímero en las uniones estrechas entre las células Caco-2. En este estudio han demostrado que el quitosano produce una alteración en estas uniones, por translocación de las proteínas ZO-1 y la liberación de proteínas actina F en la membrana plasmática.

Sin embargo, aunque las nanopartículas de quitosano pueden considerarse un sistema potencial de liberación de fármacos para administración oral, presentan una estabilidad física limitada en fluidos de la mucosa. Por lo tanto, el quitosano se puede emplear como material de recubrimiento para las nanopartículas de PLGA. En este caso, el objetivo principal es modificar la carga superficial de las partículas para mejorar las propiedades de mucoadhesión.

Además, estudios *in vitro* han demostrado que se produce una adsorción de proteínas en las nanopartículas de PLGA debido a los valores negativos de PZ (Semete y cols., 2012). Este problema se puede evitar mediante el recubrimiento de los sistemas con quitosano que, dada su hidrofilia, es adsorbido mejor que otros polímeros lipófilos (figura 12). Además, este proceso de recubrimiento no ejerce ninguna influencia sobre el comportamiento que las partículas pudieran tener posteriormente (Khvedelidze y cols., 2010).

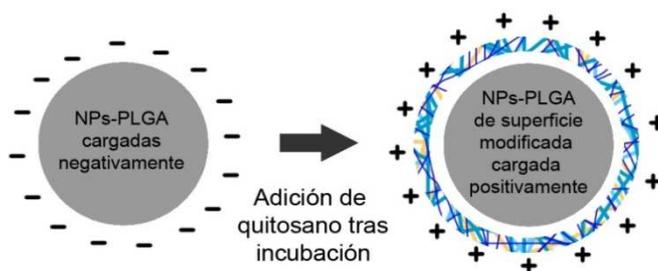


Figura 12. Adsorción de quitosano sobre la superficie de nanopartículas de PLGA cargadas negativamente.

Este tipo de recubrimiento puede realizarse por simple interacción electrostática entre el PLGA, cargado negativamente, y quitosano, cargado positivamente (Tahara y cols., 2011) o mediante modificación química de las cadenas de PLGA con quitosano, utilizando el mecanismo de la carbodiimida (Chakravarthi y cols., 2011).

2.2.1.1. Adsorción de CS por interacción electrostática

Este procedimiento se ha empleado con éxito para mejorar la biodisponibilidad oral de péptidos y proteínas, mejorando la capacidad para su penetración a través de las mucosas (Issa y cols., 2005; Kawashima y cols., 2000).

Tahara y cols., (2011) prepararon nanopartículas de PLGA por el método de la doble emulsión. El proceso de recubrimiento con quitosano se llevó a cabo durante la síntesis de las partículas mediante una interacción electrostática, empleando una solución que contenía una mezcla del polímero y un tensioactivo (PVA 1 %). Las nanopartículas catiónicas obtenidas fueron capaces de unirse al ADN de manera eficiente. Los mismos autores prepararon las mismas partículas por un método más simple, la nanoprecipitación. En este estudio se compararon nanopartículas de PLGA sin recubrir y

recubiertas con quitosano; ambas formulaciones cargadas con un factor nuclear kappa-B (NF- κ B) para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal.

En ambos casos, los autores encontraron que las partículas recubiertas aumentaban su tamaño en un 50-70 % debido al alto peso molecular del quitosano y modificaban su PZ desde valores negativos (-31.1 mV) a valores positivos (+11.2 mV). En los ensayos en cultivos celulares y en modelos animales tras una administración oral, las nanopartículas recubiertas presentaron una citotoxicidad razonablemente baja, una mejor estabilidad y una aceptable interacción con la mucosa inflamada.

Otro procedimiento posible para las nanopartículas de PLGA es recubrirlas con quitosano después del proceso de síntesis. Tras su liofilización, se suspenden en una solución que contiene dicho polímero y se incuban mediante agitación. En los trabajos de Lee y cols. (2011) se estudiaron ambas estrategias para nanopartículas de PLGA de administración oral cargadas con calcitonina de salmón. Se encontraron importantes diferencias en el tamaño de partícula entre los dos métodos, justificadas por un aumento de la viscosidad del medio cuando se añadió quitosano durante la síntesis de partículas, dificultando la formación de la gota. Sin embargo, cuando el polímero se añadió en la etapa final, la formación de una capa adicional no aumentó el tamaño de partícula. También se obtuvieron diferencias en la eficacia de encapsulación debido a que la calcitonina difunde en la solución de quitosano, con pH ácido, ya que, bajo estas condiciones, la calcitonina actúa como una base débil (punto isoelectrico 10.4).

Anteriormente, Kawashima y cols. (2000) compararon varias formulaciones de nanosferas de PLGA con dos polímeros mucoadhesivos: alginato sódico y quitosano. Los ensayos *in vitro* llevados a cabo en saco intestinal de rata mostraron un aumento en la mucoadhesión para las nanosferas recubiertas con quitosano. Además, se encontró una relación directa entre el peso molecular de este polímero y la magnitud de la mucoadhesión. Aunque no se localizaron sitios específicos de adhesión, se observó la siguiente tendencia: duodeno > yeyuno > íleon. Los ensayos *in vivo* demostraron que, después de la administración intragástrica de las nanopartículas, el nivel de calcio se redujo de manera satisfactoria durante 12 h (figura 13).

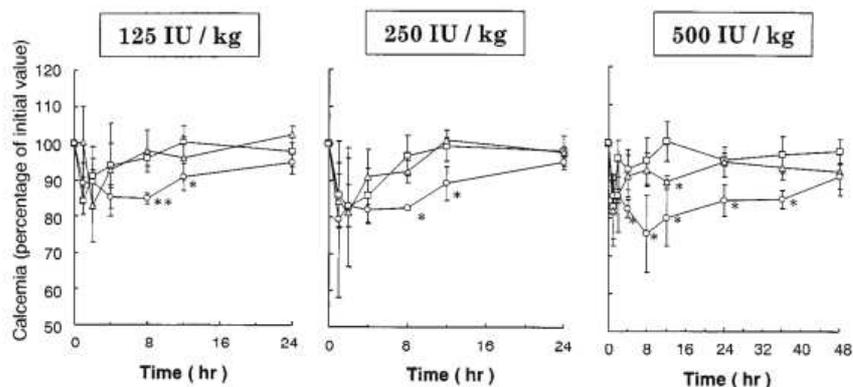


Figura 13. Perfiles de calcio en sangre tras administración intragástrica de calcitonina a ratas en ayunas (Kawashima y cols., 2000): □ solución de calcitonina; △ nanopartículas de PLGA sin recubrimiento cargadas con calcitonina; ○ nanopartículas de PLGA recubiertas con quitosano cargadas con calcitonina.

2.2.1.2. Adsorción de CS por modificación química

Chakravarthi y cols. (2011) compararon el efecto del quitosano adsorbido o conjugado químicamente en la superficie de nanopartículas

conteniendo paclitaxel en células 4T1. Después de ambos tipos de recubrimiento, no observaron ninguna diferencia en el tamaño de partícula, siendo los valores de PZ ligeramente negativos. En cuanto a la eficacia de ambos procesos, se cuantificó la cantidad de quitosano no incorporado a las nanopartículas por el método de la ninhidrina (Prochazkova y cols., 1999) y se evaluó la asociación del fármaco liberado en las células, observándose una correlación directa entre el grado de adsorción o conjugación con la cantidad inicial de quitosano, logrando un 99 % de eficiencia en el proceso de conjugación.

La reacción química entre PLGA y quitosano se produce a través del método de la carbodiimida, en el que se forma un grupo amida. La reacción se produce en la superficie de las nanopartículas liofilizadas y es catalizada por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS), utilizadas como aditivos para aumentar el rendimiento.

Grabovac y Bernkop-Schnürch (2007) utilizaron quitosano tiolado para prolongar el tiempo de residencia en la mucosa. La superficie de las partículas fue modificada químicamente con quitosano por el método de carbodiimida descrito anteriormente. Los grupos amino libres del polímero fueron entonces tiolados con 2-iminotiolano. Esta modificación dio lugar a una estructura de amidina catiónica que aumentó el carácter positivo de las nanopartículas, confirmado por los valores obtenidos de PZ. El tamaño medio de partícula aumentó considerablemente (hasta 3 veces) y la eficacia de encapsulación fue inferior (28 vs. 56 %). Sin embargo, los ensayos *in vitro* en intestino delgado de cerdo, demostraron una mejora significativa en las propiedades de mucoadhesión: 52 % para partículas sin quitosano y 80 % para partículas con quitosano.

2.2.2. Polietilenglicol (PEG)

Para mejorar la direccionalidad del fármaco hacia su lugar de acción, es necesario reducir al mínimo la opsonización de las nanopartículas y prolongar su circulación *in vivo*. Uno de los métodos utilizados para alcanzar este objetivo es el recubrimiento de partículas con polímeros hidrófilos tales como el polietilenglicol. Dicho polímero puede adicionarse de varias formas diferentes: unión covalente, mezclándolo durante la preparación de las partículas o mediante su adsorción superficial al polímero principal (Hans y Lowman, 2002). Todos estos procesos reciben el nombre de pegilación.

La modificación de la superficie con polietilenglicol también se utiliza para reducir la acumulación de partículas en órganos como el hígado y el bazo (Knop y cols., 2010). Esta modificación tiene propiedades fisicoquímicas favorables (por ejemplo, alta flexibilidad e hidrofilia y baja toxicidad e inmunogenicidad). Además, el polietilenglicol forma una corona hidrófila estabilizadora sobre la superficie de las nanopartículas, protegiéndolas de la degradación gastrointestinal.

La longitud, forma y densidad de las cadenas de polietilenglicol sobre la superficie de las nanopartículas afectan principalmente a la hidrofilia y, por tanto, a la fagocitosis de los nanosistemas (Gref y cols., 2000). Cuando la densidad superficial del polietilenglicol es baja, sus cadenas adoptan una configuración conocida como "hongo". Cuando la densidad aumenta, adoptan la configuración denominada de "cepillo" (Owens y Peppas, 2006). Varios estudios muestran que la presencia de este polímero en la superficie de las partículas impide la opsonización por el sistema complemento y otros factores del suero (Singh y Lillard, 2009). Estudios recientes han mostrado una mayor eficacia para

bloquear y repeler opsoninas en la configuración de "cepillo" que en la configuración de "hongo" (Vonarbourg y cols., 2006).

Gran parte de la investigación llevada a cabo con estos sistemas se centra en nanopartículas de administración intravenosa, conociéndose muy poco sobre el comportamiento de las mismas administradas por vía oral. Semete y cols., (2010) estudiaron la absorción *in vivo* y la respuesta inmunológica en 24 horas de nanopartículas de PLGA recubiertas con quitosano y polietilenglicol tras administración oral y peritoneal. Los resultados mostraron que las nanopartículas de PLGA recubiertas eran capturadas por los macrófagos, lográndose una administración intracelular.

Semete y cols., (2012) investigaron el efecto de la pegilación sobre la biodistribución de las nanopartículas después de su administración oral. Se detectó un 1 % más de partículas recubiertas que de partículas sin recubrir en plasma, indicando un aumento en el tiempo de circulación sistémica.

Vila y cols., (2002), observaron que la capa de polietilenglicol mejoró la estabilidad de las partículas en los fluidos gastrointestinales y facilitó el transporte del fármaco encapsulado (toxoides tetánico), a través de la mucosa intestinal y nasal, por lo que se cree que este polímero hidrófilo facilita el transporte a través de las placas de Peyer.

Garinot y cols., (2007) elaboraron partículas de PLGA con polietilenglicol y con péptido RGD (arginina-glicina-aspartato) en su superficie para dirigir las partículas a las células M. Se demostró que el 30 % del polietilenglicol en la formulación era suficiente para inducir una modificación de la carga superficial de las partículas con un PZ de -9 mV hasta -40 mV sin polietilenglicol.

2.2.3. Vitamina E

La vitamina E se empleó por primera vez como tensioactivo en una formulación de nanopartículas de PLGA en forma de D-alfa-tocoferil polietilenglicol 1000 succinato (vitamina E-TPGS o TPGS) (Mu y Feng, 2003). La vitamina E TPGS es un derivado de la vitamina E, que consta de un grupo de cabeza polar hidrófila (polietilenglicol) y una cola lipófila (succinato de tocoferol), dando lugar a un compuesto de propiedades anfifílicas. El objetivo de Mu y Feng (2003) era mejorar la biodisponibilidad oral de paclitaxel (Taxol[®]), incluyéndolo en nanopartículas, evitando al mismo tiempo el uso del adyuvante Cremophor[®] que causa graves efectos secundarios. La vitamina E-TPGS se incorporó en la fase acuosa de una emulsión elaborada por la técnica de extracción- evaporación del disolvente, en sustitución de los tensioactivos usados comúnmente, tales como alcohol polivinílico (PVA). Este nuevo tensioactivo mostró mejor eficacia emulsionante que el PVA y una mejora en la liberación del fármaco y adhesión a las células (Zhang y cols., 2008).

En un estudio llevado a cabo por Yin y Feng (2006) en células humanas de adenocarcinoma de colon (HT-29) y en ratas, se puso de manifiesto como las nanopartículas funcionalizadas con vitamina E-TPGS mostraron un aumento de la biodisponibilidad oral y valores terapéuticos más sostenibles en el tiempo. Otros estudios sobre la captación celular en células Caco-2 y HT-29 (Zhang y Feng, 2006) y células HeLa (Ma y cols., 2006) apoyaron estos resultados.

Los beneficios potenciales de la vitamina E en la curación de los síntomas neurológicos asociados con la deficiencia de dicha vitamina y las prometedoras características de las nanopartículas como sistemas

de administración de fármacos en el cerebro han dado lugar al desarrollo de nanopartículas de PLGA modificadas con vitamina E-TPGS como portadores potenciales para la administración de fármacos al cerebro. La citotoxicidad *in vitro* de estas partículas se estudió usando la línea celular PC12 como modelo de célula neural, no observándose toxicidad alguna (Jalali y cols., 2011).

Por otro lado, la vitamina E-TPGS funciona como inhibidor de la proteína de membrana P-glicoproteína, (P-gp), con expresión aumentada en tumores, la cual está asociada con el fracaso a la quimioterapia debido a la resistencia a los medicamentos. Al inhibir la P-gp, la TPGS mejora la citotoxicidad y aumenta la permeabilidad de varios fármacos antineoplásicos mediante solubilización micelar (Dintaman y Silverman, 1999; Lawrence y cols., 1999).

Un paso más hacia la direccionalidad selectiva de estos sistemas fue llevado a cabo usando nanopartículas de PLGA modificadas con vitamina E-TPGS adicionadas con ácido fólico para atacar a células cancerosas con sobreexpresión del receptor de folato (células MCF-7 de adenocarcinoma de mama y células de glioma C6). Los resultados demostraron una mayor captación celular de estas nanopartículas (Pan y Feng, 2008). Resultados similares fueron obtenidos por Zhao y Yung (2009) con micelas poliméricas de PLGA encapsulando doxorubicina y adicionadas con TPGS, polietilenglicol y ácido fólico.

2.2.4. Metacrilatos (Eudragit®)

Los polímeros Eudragit® son copolímeros derivados de ésteres del ácido acrílico y metacrílico. Forman una gran familia de polímeros que permiten modificar a medida los perfiles de liberación de fármacos, ofreciendo propiedades entéricas, protectoras o de liberación

sostenida. En consecuencia, han sido incluidos como material de recubrimiento para la administración oral de micro-y nanopartículas (Naha y cols., 2008). Los metacrilatos pueden ser incorporados como parte de la matriz polimérica, ya sea como una mezcla con PLGA, o por separado en la fase acuosa, en el método de emulsión-evaporación del disolvente.

Se han estudiado las propiedades mucoadhesivas del Eudragit[®] RS en la administración oral de heparina de bajo peso molecular (HBPM) que es absorbida pobremente en el tracto gastrointestinal (Hoffart y cols., 2002; Lamprecht y cols., 2006). Las nanopartículas cargadas con heparina se prepararon a partir de diferentes polímeros (Eudragit[®] RS, PLGA y sus respectivas mezclas). Las partículas recubiertas con Eudragit[®] RS presentaron una carga superficial positiva, mientras que el fármaco puro y las elaboradas con PLGA tenían carga negativa. Además, la adsorción de la heparina a la superficie de las partículas disminuyó la carga superficial positiva de las partículas con Eudragit[®] RS, produciendo una disminución de la adhesividad a la mucina. Este estudio demostró la influencia de la carga superficial sobre las propiedades de mucoadhesión de las nanopartículas; en concreto, las elaboradas con PLGA mostraron el menor coeficiente de mucoadhesión (PLGA<Eu-PLGA<Eu). Los estudios de absorción y transporte en células Caco-2 confirmaron estos resultados, siendo los mismos directamente proporcionales a los coeficientes de mucoadhesión.

Cetin y cols. (2010, 2011, 2012) elaboraron nanopartículas de PLGA con varios tipos de Eudragit[®] con el fin de controlar los perfiles de liberación de distintos fármacos entre los que se encontraban

diclofenaco sódico, clorhidrato de metformina o calcitonina de salmón. En este último caso, se obtuvo un alto porcentaje de encapsulación (69-83 %), consiguiéndose un efecto hipocalcémico marcado en todas las formulaciones.

2.2.5. Lectinas

Las lectinas son un grupo de proteínas de origen no inmune que están presentes en la mayoría de los seres vivos y que se unen a los azúcares con una elevada especificidad. Desempeñan un papel en los fenómenos de reconocimiento biológico de células y proteínas. Algunas lectinas como la aglutinina de germen de trigo (WGA), lectina de tomate, lectina de tojo y concanavalina A se emplean en formulaciones farmacéuticas. WGA es la más ampliamente utilizada debido a sus bajas propiedades inmunogénicas. Incluida en nanopartículas de PLGA se presenta como un posible potenciador de mucoadhesión de estas partículas. La WGA se conjuga a la superficie de estos sistemas por la estrategia de carbodiimida (conjugación de grupos amino de proteínas a los grupos carboxilo de PLGA).

Mo y Lim (2005) compararon nanopartículas de PLGA con WGA, concavalina A (Con A) y Ricinus communis-120 (RCA), estudiando su penetración en células A549 y H1299, como modelos humanos de cáncer de pulmón y CCL-186 como tejido pulmonar normal (fibroblastos de pulmón humano IMR-90).

La captación celular para A549, H1299 y CCL-186 aumentó respecto al tiempo de incubación, a la concentración de 20 µg/mL de lectina. La absorción de las nanopartículas, en función de la lectina, en las células A549 fue WGA>RCA>Con A, siendo mayor la absorción de WGA con respecto Con A y RCA (4 y 2 veces mayor, respectivamente), tras 2 h

de incubación. Las células H1299 mostraron mayor afinidad para WGA, 9 veces superior a la absorción de las partículas con Con A y 10 veces para RCA. Por otro lado, la absorción en las células CCL-186 fue 1,2 y 8 veces superior en nanopartículas con WGA respecto a RCA y Con A, respectivamente.

La asociación WGA-PLGA ha sido también investigada para la administración de péptidos tales como timopentina, un pentapéptido sintético (Arg-Lys-Asp-Val-Tyr) para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes (Yashu y cols., 2007 a). Esta molécula fue elegida como modelo de fármaco debido a su alta solubilidad en agua, baja permeabilidad de membrana, extenso metabolismo en el tracto gastrointestinal y una vida media extremadamente corta de 30 segundos. Después de la conjugación WGA-PLGA mediante la estrategia de carbodiimida, las nanopartículas se sintetizaron por el método de la doble emulsión, produciendo partículas con tamaño alrededor de 200 nm de diámetro y con un potencial zeta negativo, aunque se produjo una disminución significativa en la densidad de carga superficial cuando se incorporó WGA. En todos los casos se encontraron bajas eficacias de encapsulación (28-31 %) debido a la elevada solubilidad en agua del fármaco. En estudios *in vitro*, se investigaron las características de mucoadhesión con mucina de cerdo y los resultados mostraron que el grado de interacción dependía del tiempo de incubación y del contenido de WGA. Después de la administración oral a ratas, se midieron los niveles de CD4 + y CD8 + T, mostrando un aumento de las células CD4 + / CD8 + cuando las cantidades de WGA aumentaron de 1 µg/mg a 10 µg/mg. Los autores sugirieron que estos resultados demostraron una absorción oral

mejorada, relacionada con el aumento en el contenido de WGA y la existencia de un efecto protector contra la degradación del péptido.

Estos mismos autores investigaron la eficacia y los sitios de unión de estas nanopartículas en mucosa intestinal de rata y su biodistribución en tejidos de rata después de una administración oral (Yashu y cols., 2007 b). Los estudios de bioadhesión *ex vivo* utilizando muestras de mucosa intestinal sin placas de Peyer demostraron que la interacción fue de aproximadamente 1.5-4.8 veces mayor en nanopartículas conjugadas con WGA. Sin embargo, cuando se analizaron utilizando muestras de la mucosa intestinal con placas de Peyer, no hubo diferencia estadísticamente significativa. Por lo tanto, estos resultados mostraron que no existen sitios de unión específicos de WGA en la región de las placas de Peyer. Para aclarar cuáles eran los sitios de unión, las nanopartículas se pre-incubaron con un exceso de N-acetil-D-glucosamina, antes de su incubación con la mucosa intestinal. Las interacciones de las nanopartículas sin WGA no se vieron influenciadas por la presencia del azúcar. Sin embargo, para las nanopartículas que contenían WGA, la N-acetil-D-glucosamina inhibió eficazmente los sitios de unión de WGA, evidenciando que los lugares de unión específicos de las lectinas eran glicoconjugados intestinales.

Los resultados de biodistribución *in vivo* en tejidos de rata de las nanopartículas con o sin WGA mostraron una cantidad considerable de dichos sistemas en cada tejido, aunque la concentración más elevada se observó en el intestino delgado, lo que implica una mejora de la bioadhesión intestinal.

2.2.6. Lecitinas

Las lecitinas son componentes naturales de todas las células vivas con funciones esenciales para los seres humanos, animales y plantas. El término "lecitina" engloba a una mezcla compleja de fosfolípidos y otros componentes de origen natural, tales como triglicéridos, ácidos grasos, esteroides y glicolípidos. Los fosfolípidos son los componentes principales de las lecitinas y también son los principales componentes de la membrana celular y la estructura liposomal, formando parte de los lípidos estructurales. Su característica principal es su carácter anfifílico o anfipático: parte de la molécula tiene carácter hidrofílico y la otra parte es lipófila (Zhu y cols., 2007). Un fosfolípido está constituido por una molécula de glicerol, un grupo fosfato (junto con otro grupo, a veces con una carga eléctrica, como colina, serina y etanolamina, entre otros) y dos cadenas de ácidos grasos. Los fosfolípidos se clasifican de acuerdo a sus cabezas polares hidrófilas. Los más importantes son: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol (Nakaya, 1999).

En relación a las nanopartículas de PLGA, las lecitinas se utilizan como agentes tensioactivos que incrementan la eficacia de encapsulación de los fármacos. Las lecitinas se pueden añadir en la misma fase del polímero o se podrían incorporar en una fase separada, a la que se añade el polímero gota a gota. En este caso, las lecitinas se encuentran en la superficie de las partículas (Sandor y cols., 2002).

Las lecitinas también se pueden utilizar para el reconocimiento celular, ya que tienen la misma estructura que la bicapa de fosfolípidos de las membranas celulares. Por lo tanto, las lecitinas mejoran el reconocimiento celular y la absorción del fármaco (Shi y cols., 2009;

Park y cols., 2008). Además, las lecitinas se utilizan para disminuir la hidrofobicidad de algunos de los polímeros que se emplean en la formulación de nanopartículas, tales como PLGA, mejorando su afinidad a las membranas celulares, lo que garantiza un perfil de liberación mejorado (Zhu y cols., 2007).

Chan y cols. (2009) utilizaron el método de nanoprecipitación modificado para sintetizar nanopartículas de PLGA con polietilenglicol y lecitinas. Estos dos últimos se disolvieron en una solución acuosa de etanol a la que se añadió gota a gota, bajo agitación suave, una solución de PLGA en acetonitrilo.

Con el fin de mejorar la eficacia de encapsulación y la biodisponibilidad oral de vincristina, Ling y cols. (2010) elaboraron nanopartículas híbridas compuestas por un armazón de polietilenglicol, una monocapa de lecitina y un núcleo de dextrano y PLGA (figura 14).

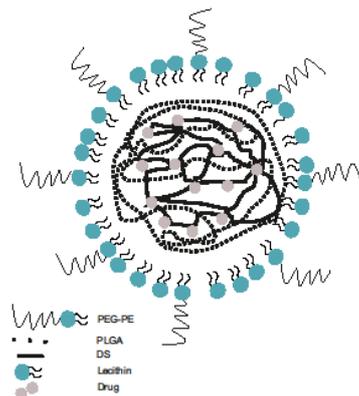


Figura 14. Ilustración esquemática de una nanopartícula de PLGA modificada, compuesta de un núcleo híbrido de dextrano-PLGA, una monocapa lipídica de carácter anfifílico en la superficie del núcleo y decorada por cadenas hidrófilas de polietilenglicol (Fuente: Ling y cols., 2010).

Los principales efectos de la utilización de lecitinas en los nanosistemas, en particular los elaborados con PLGA para administración oral, se observan tanto en estudios *in vitro* como en *in vivo*. Las lecitinas forman una monocapa lipídica que actúa como una valla molecular y contribuye a mantener las moléculas de fármaco en el interior del núcleo alejadas de las moléculas de agua. Este hecho es importante porque el agua es capaz de hidrolizar el PLGA y aumentar la erosión y liberación del fármaco (Chan y cols., 2009). Cuando la lecitina se conjuga con PLGA, se observa una alta absorción a nivel celular, en comparación con los sistemas que no la llevan (Ling y cols., 2010). Esta absorción es directamente proporcional al contenido de lecitina (Zhu y cols., 2007).

2.2.7. Sales biliares

La reabsorción selectiva de las sales biliares puede mejorar la biodisponibilidad de las nanopartículas. También se ha demostrado que alteran ciertas uniones de la mucosa epitelial lo que permite su absorción por las vías de transporte paracelular y transcelular (Sakai y cols., 1997; Lindmark y cols., 1998). En concreto, el ácido desoxicólico (DCA) ha sido utilizado para estos fines. Samstein y cols. (2008) describió un sistema oral en el que las nanopartículas de PLGA fueron administradas en una emulsión de DCA. Las nanopartículas cargadas con rodamina como modelo de fármaco, se administraron a ratones en una suspensión en PBS o en una emulsión de DCA. Los perfiles de liberación *in vitro* mostraron una liberación más sostenida a pH 2 para las partículas administradas en la emulsión de DCA así como valores de AUC más elevados. Sin embargo, la adición de DCA causaba agregación de las nanopartículas.

Los ácidos biliares también se pueden incorporar en las nanopartículas de PLGA durante el procedimiento de síntesis. Jung y cols. (2009) compararon los efectos de la cantidad de sales biliares en partículas orales de calcitonina administradas a ratas. Las nanopartículas, de 100-240 nm de tamaño, se elaboraron mediante el método de la doble emulsión. Se observó una relación inversamente proporcional entre la concentración de sales biliares y la eficacia de encapsulación. Las sales biliares son buenos tensioactivos pero no pudieron impedir la migración del fármaco a la fase acuosa externa.

La incorporación de las sales biliares no siempre mejora la biodisponibilidad oral. Gutierrez y cols. (2003) administraron por vía oral en ratones, partículas de PLGA de 1 μm cargadas con BSA para evaluar diversos tensioactivos y vehículos que aumentasen la concentración de IgG en sangre. Los resultados mostraron que las sales biliares provocaron una respuesta inmune similar a la obtenida cuando no fueron utilizadas.

Finalmente, es necesario tener en cuenta el hecho de que los ácidos biliares exhiben diferentes efectos biológicos y que, debido a su potencial toxicidad, los niveles de DCA deben mantenerse dentro de un intervalo estrecho de efectividad (Martínez y cols., 1998).

2.2.8. Péptido RGD

El péptido RGD (arginina-glicina-aspártico) se ha utilizado ampliamente como material para estimular la adhesión en la superficie celular a través de receptores de integrina (D'Souza y cols., 1991). Como las células M están presentes en baja densidad en el intestino, la orientación específica hacia las β 1-integrinas de las células M puede potenciar la absorción de nanopartículas. Esta estrategia ha sido

empleada principalmente para la administración oral de vacunas y de fármacos anticancerosos.

Fievez y cols. (2009) estudiaron el efecto de cuatro ligandos adheridos en la superficie de nanopartículas de PLGA cargadas con ovoalbúmina: RGD- β 1-integrina como péptido de referencia, RGD peptidomimético (RGDp), derivados de LDV (tripleto LDV, leu-asp-val, sirve para el reconocimiento celular por β 1-integrinas) (LDVd) y LDV peptidomimético (LDVp). Los autores estudiaron la influencia de estos ligandos en la transcitosis a través del epitelio intestinal o de las placas de Peyer y su capacidad para inducir una respuesta inmune después de la vacunación oral con partículas de 200 nm de tamaño. Los ensayos *in vivo* revelaron que todas las formulaciones fueron capaces de inducir una respuesta inmune celular. Sin embargo, se observaron algunas diferencias en función del ligando injertado en la superficie de las nanopartículas, lo que sugiere un procedimiento diferente en la inducción de la respuesta inmune, posiblemente debido a un proceso de reconocimiento diferente por las APC (células presentadoras de antígenos).

A continuación se muestra una tabla resumen (tabla 2) de los mecanismos de acción, principales ventajas e inconvenientes de cada aditivo descrito anteriormente en este apartado.

Aditivos	Mecanismo de acción	Ventajas	Inconvenientes	Referencias bibliográficas
Quitosano (CS)	Traslocación de las proteínas ZO-1 y liberación de proteínas actina F en la membrana plasmática	<ul style="list-style-type: none"> • Propiedades mucoadhesivas • Abre uniones estrechas entre células 	Incrementa el tamaño de partícula	Issa y cols, 2005; Zheng y cols. 2011; Kawashima y cols., 2000
Polietilenglicol (PEG)	El polímero forma una corona hidrófila estabilizadora sobre la superficie de las nanopartículas	<ul style="list-style-type: none"> • Previene la opsonización • Reduce la acumulación en órganos fuera de objetivo • Incrementa el tiempo de circulación sistémica 	Focalización no específica	Knop y cols., 2010; Singh y Lillard, 2009
Vitamina E	<ul style="list-style-type: none"> • Evita el citocromo P450, aumentando la vida media de las nanopartículas en plasma y la absorción celular • Inhibe P-glicoproteína de la membrana celular 	<ul style="list-style-type: none"> • Actúa como tensioactivo durante la síntesis • Mejora de la liberación controlada de fármacos • Aumenta la adhesión celular y las propiedades hemodinámicas • Vida media prolongada • Aumenta la permeabilidad celular de las nanopartículas 	Focalización no específica	Mu y Feng, 2003; Dintaman y Silverman, 1999; Yin y Feng, 2006; Zhao y Feng, 2010
Metacrilatos (Eudragit, Eu)	<ul style="list-style-type: none"> • Propiedades mucoadhesivas • Posibilidad de pH dependencia 	<ul style="list-style-type: none"> • Modifican a medida los perfiles de liberación de fármacos • Incrementa la eficacia de encapsulación de fármacos 	Focalización no específica	Hoffart y cols., 2002; Lamprecht y cols., 2006
Lectinas	Unión específica a restos de azúcar	Absorción celular de las nanopartículas por endocitosis mediada por receptor	Conjugación a las nanopartículas por la estrategia de la carbodiimida	Mo y Lim, 2005; YaShu y cols., 2007b

Tabla 2. Posibles aditivos empleados para la funcionalización de NPs-PLGA para administración oral de fármacos.

Tabla 2: Continuación

Lecitinas (Lec)	Reconocimiento superficial de las células	<ul style="list-style-type: none"> • Actúa como tensioactivo durante la síntesis de las nanopartículas • Incrementa la eficacia de encapsulación de fármacos • Mejora el perfil de liberación de fármacos 	Focalización no específica	Zhu y cols., 2007; Sandor y cols., 2002; Shi y cols., 2009; Park y cols., 2008
Sales biliares	Altera las uniones estrechas celulares, mejorando las vías de transporte paracelular y transcelular	Reabsorción selectiva	Alta toxicidad	Sakai y cols., 1997; Lindmark y cols., 1998
Péptido RGD	Estimula la adhesión en la superficie celular a través de receptores de integrina	Absorción celular de las nanopartículas por endocitosis mediada por receptor	Conjugación a las nanopartículas por la estrategia de la carbodiimida	D'Souza y cols., 1991; Fievez y cols., 2009

Tabla 2. Posibles aditivos empleados para la funcionalización de las nanopartículas de PLGA para la administración oral de fármacos.

Los avances en Tecnología Farmacéutica han posibilitado la aparición de un gran potencial para desarrollar una amplia variedad de nanosistemas que, administrados por vía oral, consigan optimizar la biodisponibilidad de los fármacos. En esta memoria, se han recopilado diversas metodologías centradas, principalmente, en la modificación de la superficie de las nanopartículas incluyendo: (i) recubrimiento con otro polímero que presente propiedades de mucoadhesión, (ii) unión a moléculas específicas que se unan selectivamente a receptores de membranas celulares; (iii) reducción de la hidrofobia de las nanopartículas y (iv) el uso de otros polímeros, además del formador de las partículas.

OBJETIVOS

El presente trabajo de investigación está encuadrado en una ciencia cada vez más innovadora y prometedora: la nanotecnología farmacéutica. De manera más específica, esta ciencia emergente se centra en aspectos relacionados con el control, desarrollo y evaluación de sistemas nanométricos inteligentes para la administración de moléculas activas.

Enmarcado en este contexto, en la presente Tesis Doctoral se establece el siguiente **OBJETIVO GENERAL: obtención de sistemas nanoparticulares biodegradables y biocompatibles, destinados a una posible administración oral, para la aplicación terapéutica de activos cannabinoides.**

Para cumplir con el objetivo general expuesto, se plantean los siguientes **OBJETIVOS PARCIALES:**

1. Poner a punto y validar un método analítico para los activos cannabinoides seleccionados: (1) el cannabinoide natural tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) y (2) el derivado sintético 1-naftalenil-[4-(pentiloxi)-1-naftalenil]-metanona (CB13).
2. Explorar distintas técnicas de elaboración de las nanopartículas según el activo y/o la aplicación final.
3. Optimizar el método seleccionado de elaboración de las nanopartículas a través de los estudios de caracterización tecnológica de los sistemas desarrollados. Para ello se pretende:
 - 3.1 Asegurar la homogeneidad de los sistemas con un control del tamaño adecuado y la obtención de poblaciones monodispersas y reproducibles.

- 3.2 Conseguir una elevada eficacia de encapsulación de los activos cannabinoides.
- 3.3 Modificar las características de superficie de las nanopartículas optimizadas, con el fin de estimar una mejora de la biodisponibilidad oral de los cannabinoides encapsulados.
- 3.4 Valorar la compatibilidad, estabilidad e integridad de los componentes en los nanosistemas, antes y después del proceso de liofilización.
4. Garantizar que el comportamiento biofarmacéutico de las nanopartículas permitan:
 - 4.1 Una liberación controlada de los cannabinoides, y
 - 4.2 Un control de las propiedades mucoadhesivas de las nanopartículas, simulando condiciones gastrointestinales *ex vivo*.
5. Estimar el comportamiento sanguíneo de las nanopartículas evaluando:
 - 5.1 Su hemocompatibilidad, mediante estudios de simulación de las condiciones sanguíneas, y
 - 5.2 La adsorción de proteínas séricas a su superficie, con el fin evitar la captación fagocítica y, por lo tanto, su eliminación del torrente sanguíneo.
6. Evaluar la interacción celular de las nanopartículas, controlando los siguientes parámetros:
 - 6.1 La internalización celular en la línea de adenocarcinoma de colon Caco-2.
 - 6.2 La citocompatibilidad de las nanopartículas “blancas” sobre esta línea celular y sobre las líneas celulares de

adenocarcinoma de pulmón A549 y de fibroblastos pulmonares sanos MCR-5.

6.3 La acción citotóxica de los activos cannabinoides encapsulados en las nanopartículas en sobre estas líneas celulares, cancerosas y no cancerosas.

7. Iniciar el comportamiento preclínico en modelos animales de dolor neuropático.

Esta Tesis Doctoral está encuadrada en un proyecto de investigación más amplio, en el que se ven implicados diversos grupos de investigación de otras áreas. En él se pretende evaluar la aplicación de estos nanosistemas en el tratamiento del dolor neuropático, cáncer y enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington, mediante (i) estudios preclínicos de los nanosistemas optimizados, y (ii) una evaluación clínica de los mismos.

CAPÍTULO II

NANOPARTÍCULAS DE PLGA DE SUPERFICIE MODIFICADA PARA LA ADMINISTRACIÓN ORAL DEL CANNABINOIDE SINTÉTICO CB13, CON ACTIVIDAD ANTIHIPERALGÉSICA. EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO*.

1. INTRODUCCIÓN

Entre los efectos farmacológicos producidos por los cannabinoides, la antinocicepción constituye una de las aplicaciones terapéuticas más trascendentes. La administración de estos compuestos daría respuesta a una importante necesidad médica no satisfecha, como son algunos síndromes de dolor crónico que no responden a la terapia actual (Dziadulewicz y cols., 2007).

Actualmente se conoce el papel que los cannabinoides ejercen en la antinocicepción. Los receptores de cannabinoides tipo 1 (CB1) se expresan en áreas clave, incluyendo la sustancia gris periacueductal, el cuerno dorsal de la médula espinal dorsal y las neuronas ganglionares de la raíz (Fox y cols., 2001). Por lo tanto, la activación selectiva de los receptores periféricos de cannabinoides CB1 tiene un elevado potencial para convertirse en una terapia valiosa en condiciones de dolor crónico, siempre y cuando los efectos del sistema nervioso central se atenúen.

Por todo ello, los estudios se han centrado en el diseño de una nueva clase de ligandos agonistas de receptores cannabinoides, conocidos como aminoalquilindoles, los cuales han mostrado una buena actividad en receptores CB1 y CB2 en humanos. Esto ha llevado al descubrimiento de un nuevo agonista dual de CB1/CB2, 1-naftalenil-[4-(pentiloxi)-1-naftalenil]-metanona (CB13), que muestra una potente actividad antihiperálgica en modelos animales y penetración limitada en cerebro (Dziadulewicz y cols., 2007).

En estudios de comportamiento de dolor crónico (neuropático y nociceptivo), el CB13 fue capaz de revertir la hiperálgia mecánica establecida después de la administración tanto oral como por inyección local en la pata posterior en modelos animales (cerdo y rata). En las

pruebas de comportamiento sobre la actividad del SNC en rata, el CB13 produce efectos significativos sólo a dosis 20 veces superior que la dosis oral requerida para revertir la hiperalgesia. Por lo tanto, estos datos indican que el CB13 produce actividad antihiperálgica predominantemente a través de una acción sobre los nervios sensoriales periféricos (Gardin y cols., 2009).

Sin embargo, el CB13 es un compuesto altamente lipófilo y pertenece a los componentes de clase II (baja solubilidad y alta permeabilidad) del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS), mostrando una solubilidad acuosa muy baja (~0.001-0.002 mg/mL). Como consecuencia de su pobre solubilidad y disolución en fluidos gastrointestinales, el CB13 es absorbido de forma incompleta tras administración oral (Gardin y cols., 2009).

Por todo ello, se ha seleccionado este fármaco en función de su interés terapéutico y sus inadecuadas propiedades fisicoquímicas para su inclusión en nanopartículas de PLGA que mejoren sus problemas de solubilidad acuosa y biodisponibilidad oral.

Por lo tanto, el objetivo de este capítulo es desarrollar y caracterizar diferentes sistemas nanoparticulares de PLGA para la administración oral del derivado cannabinoide CB13. La caracterización se llevará a cabo en relación a sus diferentes características físico-químicas, liberación *in vitro*, bioadhesión, así como ensayos en cultivos en líneas celulares Caco-2 para evaluar su idoneidad como sistemas de administración oral.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

En el presente estudio se han utilizado los siguientes compuestos y reactivos: el derivado cannabinoide sintético 1-naftalenil-[4-(pentiloxi)-1-naftalenil]-metanona (CB13), obtenido de Tocris Cookson Ltd. (Bristol, Reino Unido); ácido poli-(D,L-láctico-co-glicólico), copolímero del ácido láctico y el ácido glicólico, de diferente naturaleza (Resomer[®], PLGA 50:50 y PLGA 75:25), obtenidos de Boehringer Ingelheim GmbH (Ingelheim, Alemania). Los distintos tipos de Resomer[®] se diferencian en los grupos carboxilos libres finales, en la viscosidad inherente y en sus distintos pesos moleculares (tabla 3). Dentro de los PLGA 50:50, la presencia de grupos carboxilos finales hace que aumente la hidrofilia final del polímero (Elkhesen y Radwan, 2000; Rivera y cols., 2004).

Resomer [®]	Pm (Da)	Viscosidad inherente (dl/g)	Grupos carboxilos finales
502	12000	0.24	No
502 H	12000	0.19	Si
504	48000	0.50	No
504 H	48000	0.53	Si
752 S	15000	0.24	Si

Tabla 3. Características de los distintos tipos de Resomer[®].

Los tensioactivos empleados, Pluronic[®] F68, Tween[®] 80 y Span[®] 60, y los fluorocromos, cumarina-6 y Nile-Red (rojo de nilo) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St Louis, USA); el propilenglicol y el glicerol se adquirieron en Acofarma Distribución S.A. (Barcelona, España). Los disolventes utilizados, acetona PRS, acetonitrilo y DMSO

grado HPLC y ácido acético fueron adquiridos en Panreac Química (Barcelona, España).

Además se utilizó quitosano de bajo peso molecular, obtenido de Sigma-Aldrich (St Louis, USA); Eudragit[®] RSPO (Pm: 32000 g/mol), obtenido de Evonik Röhm GmbH (Darmstadt, Alemania); vitamina E y lecitina (Epikuron[®] 200), obtenidos de BASF ChemTrade GmbH (Burgbernheim, Alemania) y Cargill Texturizing Solutions (Barcelona, España), respectivamente. La trealosa fue obtenida de VWR International Eurolab S.L. (Barcelona, España).

El agua usada en los experimentos fue desionizada y filtrada (Milli-Q Academic, Millipore, Molsheim, Francia). Como medio de liberación se utilizaron 500 mL de buffer de fosfatos pH 7.4 obtenido de Biochemica AppliChem (Darmstadt, Alemania).

Para los experimentos celulares, las células humanas de adenocarcinoma de colon (Caco-2) se obtuvieron de ECACC, número 86010202 (Salisbury, Reino Unido). El medio de cultivo esencial Dubelcco modificado (DMEM alta concentración de glucosa, con L-glutamina, rojo de fenol y sin piruvato), suero fetal bovino y los antibióticos penicilina y estreptomina se obtuvieron de PAA Laboratories (Pasching, Austria). La Tripsina/EDTA, bromuro de tetrazolio, dodecil sulfato de sodio, paraformaldehído y Hoechst 33258 se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

2.2. Método de cuantificación: cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)

Para cuantificar de forma exacta y precisa la cantidad de fármaco en cada una de las formulaciones ensayadas, se puso a punto y se validó

un método analítico por HPLC. Teniendo en cuenta la bibliografía consultada sobre cuantificación por HPLC de derivados cannabinoides (Vollner y cols., 1986; De Backer y cols., 2009) y de fármacos hidrófobos (Holgado y cols., 2009), junto con los parámetros de validación descritos en las guías ICH (ICH-Q2B, 1996), se hicieron los ajustes necesarios en cuanto a fase móvil y velocidad de flujo, adecuándolos a las condiciones óptimas para nuestro laboratorio.

Se eligió este método para la cuantificación del CB13 en las nanopartículas elaboradas, para evitar las posibles interferencias que puedan producirse como consecuencia de la existencia de otras sustancias en la misma preparación y conseguir que la duración del análisis fuera lo más corta posible para evitar contaminación de las muestras por causas no controlables.

2.2.1. Equipamiento y condiciones cromatográficas

El análisis RP-HPLC fue llevado a cabo por un sistema Hitachi LaChrom[®] serie D-7000, equipado con una bomba cuaternaria L-7100, un espectrofotómetro de diodos UV-vis, serie L-7455, un inyector automático L-7200 y una interfaz D-7000. La toma de datos y los cálculos se llevaron a cabo mediante el uso del software HSM D-7000 LaChrom[®] de Merck-Hitachi (Darmstadt, Alemania).

Las condiciones cromatográficas (Vollner y cols., 1986; Holgado y cols., 2009) fueron una columna C18 Waters Spherisorb[®] ODS2 (5 µm, 4.6 mm x 250 mm, Milford, USA) y una fase móvil compuesta de dos solventes: (A) una mezcla de acetonitrilo:agua:ácido acético (75:23.7:1.3 v/v) y (B) acetonitrilo, en una proporción final 70:30 (A:B), a un flujo constante de 1000 mL/min. La longitud de onda de detección fue 230 nm y el volumen de inyección 10 µL. La temperatura de

operación se mantuvo a temperatura ambiente, aunque la columna se calentó a 40 ± 0.1 ° C en un horno (L-2350, LaChrom Elite[®]) para favorecer el flujo de la fase móvil en la columna.

2.2.2. Preparación de las soluciones estándar y de muestra

La solución estándar de CB13, con una concentración de 500 µg/mL se preparó pesando de forma exacta una cantidad en torno a 500 µg de CB13 y disolviéndolos en 1 mL de acetonitrilo. Se agitó vigorosamente en un vórtex hasta su completa solubilización. A continuación, se filtró (filtros de jeringa de 0.22 µm; Millex[®] GV, Millipore, Barcelona, España) y se inyectó en el equipo de HPLC.

Para la evaluación de las muestras, se pesaron con exactitud 5 mg de nanopartículas y se añadió 1 mL de acetonitrilo. Las muestras se agitaron vigorosamente en un vórtex (5 minutos) para promover la solubilización del CB13 contenido en las partículas. El resto de componentes no interfirieron en la cuantificación del CB13 a la longitud de onda utilizada (ver el proceso de validación completo). Las muestras se filtraron con filtros de jeringa de 0.22 µm (Millex[®] GV, Millipore, Barcelona, España) y se inyectaron directamente en el equipo de HPLC (Teixeira y cols., 2003).

2.2.3. Validación del método analítico

La validación de un método de análisis químico es un conjunto de pruebas que nos asegura la fiabilidad de los resultados obtenidos al utilizar dicho método. Las pruebas a realizar dependerán, en cada caso, del tipo de análisis (cuantitativo, cualitativo, ensayo límite) y del objetivo del análisis. Existen numerosas publicaciones proponiendo distintas pruebas y metodologías para validar un método de análisis

químico. Sin embargo, hoy día, la mayoría de analistas utilizan las metodologías propuestas por la Farmacopea Americana (USP) o por la *International Conference on Harmonization* (ICH).

En este caso, se llevó a cabo la validación del método por HPLC, de acuerdo con la ICH (ICH-Q2B, 1996), utilizando los siguientes parámetros analíticos: linealidad, precisión, exactitud, especificidad y selectividad, límites de detección y cuantificación y robustez. El intervalo de concentraciones de CB13 utilizado para la validación fue 250-750 µg/mL.

2.2.3.1. Selectividad/especificidad

La selectividad es la capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el analito en presencia de otros componentes en la muestra. El método analítico debe medir la concentración exacta de analito sin interferencias de impurezas, productos de degradación, excipientes o compuestos relacionados. En este trabajo, la selectividad del método se evaluó en tres muestras diferentes: (i) solución de placebo, que consistió en una solución que contenía todos los componentes de la formulación en las mismas cantidades y condiciones, a excepción del analito que se analiza; (ii) el disolvente utilizado en la fase móvil y (iii) una solución estándar de CB13 (500 µg/mL). Con este ensayo se pretende demostrar que no hay picos en los tiempos de retención correspondientes al analito, con lo que no existe componente alguno de la formulación que interfiera en el espectro de absorción del analito estudiado.

Por otra parte, se llevaron a cabo estudios de degradación, donde una serie de soluciones estándar del cannabinoide fueron sometidas a diferentes grados de estrés (tabla 4).

Condiciones sugeridas para la realización de estudios de degradación	
Estudios degradación	Condiciones sugeridas (*)
Degradación ácida	24 h solución de HCL 1N
Degradación básica	24h solución de NaOH 1N
Calor	24 h horno (105 °C)
Luz solar	1 h exposición lámpara UV 200-300 nm
(*) Estas condiciones pueden ser aumentadas o disminuidas dependiendo de las propiedades del producto y de las limitaciones del laboratorio donde se realiza el estudio.	

Tabla 4. Condiciones de estrés sugeridas para los estudios de degradación de un fármaco (Fuente: Lister, 2005).

En nuestro estudio, se llevaron a cabo algunos cambios en las condiciones recomendadas para la realización de estudios de degradación forzada, debido a las limitaciones de nuestro laboratorio o del fármaco en sí: el CB13 no se disuelve en soluciones acuosas ácidas o básicas, de modo que, en primer lugar se solubilizó en acetonitrilo y, a continuación, se acidificó o alcalinizó con una pequeña cantidad de ácido o base, incubándose esta mezcla durante 5 horas. Más tarde, las soluciones se neutralizaron con soluciones de base o ácido, completando hasta un volumen final con acetonitrilo, e incubándolas de nuevo hasta completar las 24 h. En cuanto al estudio de degradación por calor, una solución estándar de CB13 se incubó 24 h a 60 °C en un horno y para el estudio de degradación mediante la luz solar, la solución estándar de CB13 se expuso 24 horas a la luz del sol. Después de la prueba de estrés, las muestras se analizaron por HPLC tal como se indica en el apartado de condiciones cromatográficas.

2.2.3.2. Precisión

La precisión es el parámetro que expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas

mediante el análisis múltiple de la misma muestra homogénea en las condiciones prescritas. En nuestro estudio se evaluó la precisión de la siguiente manera (ICH-Q2B, 1996):

- Precisión instrumental: una solución estándar de CB13 se inyecta seis veces consecutivas, calculándose la desviación estándar (D.E.) y la desviación estándar relativa (D.E.R.). Este valor de D.E.R. debe ser menor o igual al 2 % para que sea válido.
- Reproducibilidad: este parámetro se determinó mediante el uso de los resultados obtenidos para la prueba de exactitud (nivel bajo 50 %, nivel medio 100 % y nivel alto 150 %). Se calculó la desviación estándar (D.E.) y la desviación estándar relativa (D.E.R.). La reproducibilidad del método puede ser aceptada cuando la D.E.R. es menor o igual que 2 %.
- Precisión intermedia: El objetivo de este estudio consiste en establecer los efectos de los analistas y/o equipos y/o tiempo y/o laboratorio que influyen sobre el método analítico. La precisión intermedia se evaluó mediante el análisis de una misma muestra por diferentes analistas en dos días diferentes.

2.2.3.3. Exactitud

La exactitud se define como la capacidad de un método de análisis de generar resultados lo más próximos al valor que es aceptado como verdadero. Se expresa como la diferencia entre el valor medido y el real o como un porcentaje del valor medido respecto al real (se suele denominar como porcentaje o factor de recuperación) (ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005).

En este se estudió, se tomaron los niveles de concentración del analito de 50, 75, 100, 125 y 150 %, para las cuales, se añadió una cantidad conocida de la sustancia activa a una determinada cantidad de solución placebo para obtener concentraciones de fármaco de 250, 375, 500, 625 y 750 µg/mL, respectivamente. Se calculó la cantidad de CB13 recuperada en relación con la cantidad agregada (porcentaje de recuperación) (ICH-Q2B, 1996).

2.2.3.4. Linealidad

La linealidad se define como la capacidad de un método de análisis de proporcionar un resultado directamente proporcional a la concentración de analito en un intervalo de concentraciones determinado.

Este estudio debe demostrar que los puntos de la representación gráfica señal-respuesta deben ajustarse a una recta, que la pendiente es significativamente distinta de cero y que la ordenada en el origen no es significativamente distinta de cero. En caso de que la ordenada en el origen tenga un valor significativo se debe demostrar que este sesgo no afecta a la exactitud del método. Si existe una relación lineal, los resultados deben ser evaluados por métodos estadísticos apropiados. Para el establecimiento de la linealidad, se recomienda un mínimo de cinco concentraciones (ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005).

La linealidad fue calculada mediante la evaluación de la linealidad del sistema y la linealidad del método. Para la linealidad del sistema, se estudiaron las soluciones estándar de CB13 a cinco niveles de concentración, de 50 a 150 %. Cada nivel de concentración se preparó por triplicado. Los resultados obtenidos se muestran mediante representación gráfica, obteniendo una curva de calibración, para,

posteriormente, llevar a cabo el estudio estadístico correspondiente. Para la linealidad del método, el procedimiento fue el mismo que para la linealidad del sistema, pero la muestra fue una solución que contiene las nanopartículas de PLGA (placebo) y la adición de una cantidad creciente de CB13, disuelto en el medio. Los resultados fueron tratados de la misma manera que para la linealidad del sistema.

2.2.3.5. Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)

El límite de detección (LOD) se define como el valor de la concentración en que la respuesta suministrada por el método de análisis es claramente superior a la incertidumbre asociada a dicha medida. Es la mínima concentración de analito que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada.

El término límite de cuantificación (LOQ) se define como la mínima concentración que produce respuesta que puede ser detectada y cuantificada con la precisión requerida.

Para el cálculo de estos parámetros, se prepararon una batería de soluciones estándares de CB13 en concentraciones decrecientes y se inyectaron en el sistema de HPLC. Posteriormente, se representaron las concentraciones en relación con la desviación estándar relativa (D.E.R.) obtenida a partir de cada una de las concentraciones. El primer punto que no cumple la mínima D.E.R. requerida en la reproducibilidad del método (2 %), se corresponde con el LOD, y el primer punto que la cumple corresponde al LOQ (Guidelines for Collaborative Study Procedure to Validate Characteristics of a Method of Analysis, 1989).

2.2.3.6. Robustez

La evaluación de la robustez debe tenerse en cuenta durante la fase de desarrollo y depende del tipo de procedimiento en estudio. Se debe demostrar la fiabilidad de un análisis con respecto a pequeñas variaciones en los parámetros del método.

Si las mediciones son susceptibles a las variaciones en las condiciones de análisis, las condiciones de análisis deben ser controladas adecuadamente o debe incluirse un consejo de prudencia en el procedimiento.

Los ejemplos de las variaciones típicas son la estabilidad de las soluciones de análisis y tiempo de extracción. En el caso de HPLC, los ejemplos de las variaciones típicas son: un cambio en el pH de la fase móvil (± 0.2 unidades), una variación en la composición de la fase móvil (± 8 % de cada solvente), diferentes columnas, temperatura del horno (± 2 ° C), velocidad de flujo (± 0.1 mL/min), etc.

El procedimiento de ajuste del pH se llevó a cabo de acuerdo con la ICH (ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005), utilizando soluciones de ácido clorhídrico e hidróxido de sodio.

2.3. Elaboración de las nanopartículas

La elaboración de las partículas se llevó a cabo mediante el método de nanoprecipitación o método de desplazamiento de disolvente que fue desarrollado por Fessi y cols., (1989) y se presenta como técnica de elección para la encapsulación de activos lipófilos (Chorny y cols., 2002; Niu y cols., 2009).

Esta técnica se basa en diferencias de tensión interfacial entre solventes. El proceso de nanoprecipitación ocurre en la interfase de

dos líquidos miscibles (disolvente y no-disolvente) tras la acumulación de una serie de fenómenos complejos tales como fenómenos de flujo, de difusión o gradientes de tensión superficial. Al adicionar una co-solución de polímero y fármaco sobre una solución acuosa conteniendo un tensioactivo ocurre un desplazamiento del disolvente (figura 15). Este fenómeno se traduce en una precipitación del polímero. La nanoprecipitación parece estar regulada por el efecto *Marangoni*, en el que el movimiento en la interfaz es causada por variaciones longitudinales de la tensión interfacial. En este caso, la precipitación es impulsada por: (i) la transferencia de soluto de la fase de mayor viscosidad, la cual está influenciada por elevados gradientes de concentración en la interfase, y (ii) por la tensión interfacial (Xie y Smith, 2010). Bajo condiciones optimizadas, en relación a la concentración de polímero, concentración de surfactante, velocidad de adición, etc., es posible obtener partículas nanométricas con una estrecha distribución de tamaño de partícula.

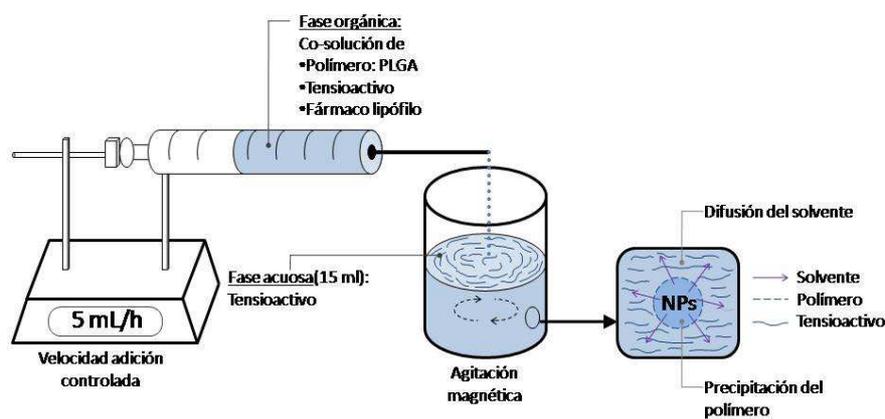


Figura 15. Elaboración de nanopartículas de PLGA por el método de nanoprecipitación.

Se trata de un método sencillo que ocurre a temperatura ambiente y bajo agitación suave, sin necesidad de aplicar cantidades de energía elevadas (sonicación, corte, turbulencias,...). Como ya se ha dicho, esta técnica es ideal para compuestos hidrófobos, con una solubilidad acuosa muy limitada, pero solubles en solventes tales como etanol o acetona (Niu y cols., 2009). En consecuencia, la pérdida del activo hacia la fase acuosa externa se ve minimizada pudiéndose alcanzar eficacias de encapsulación muy elevadas, en torno al 100%.

Esta técnica ha sido previamente empleada con éxito por nuestro grupo de investigación (Álvarez-Fuentes y cols., 2012). En este trabajo, se han llevado a cabo modificaciones durante y posteriores a la síntesis de las partículas, con el objeto de conseguir partículas con unas características fisicoquímicas (tamaños, propiedades superficiales, etc.) óptimas para una administración oral.

Para la elaboración de los sistemas, el PLGA se disolvió en acetona junto con Span[®] 60, alcanzando una concentración final de 1.5 % p/v. 5 mL de esta solución se añadieron, gota a gota, a diferentes velocidades (30, 15 y 5 mL/h) con una bomba de jeringa (Harvard Apparatus Ltd; Edenbridge, Reino Unido), a 15 mL de una solución acuosa de Pluronic[®] F68 (0.5 % p/v) en agitación (figura 15). Finalmente, la acetona se evaporó a temperatura ambiente durante 4 h.

A continuación, la suspensión de partículas se centrifugó (Centrifuga Eppendorf 504R; Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) sobre un lecho de glicerol (10 µL) a 10000 r.p.m. durante 15 min a 4 °C. Después de dos lavados, las nanopartículas se resuspendieron en una solución de trealosa al 5 % p/v, empleada como crioprotector. Posteriormente, se congelaron en nitrógeno líquido y se liofilizaron (- 80 ± 0.5 °C, y 0.057

mbar; Cryodos-50; Telstar Industrial S.L, Tarrasa, España). Todas las formulaciones se prepararon por triplicado ($n = 3$).

En el caso de la elaboración de las nanopartículas cargadas con CB13, el polímero y el fármaco fueron disueltos en acetona, a diferentes concentraciones del fármaco (6, 10, 13 y 20 % p/p) manteniendo la concentración de Span[®] 60.

2.4. Modificación superficial de las nanopartículas de PLGA

La modificación superficial de las partículas tiene como objetivo final el aumento en la biodisponibilidad oral del fármaco vehiculizado, ya sea tanto por la mejor interacción con los materiales biológicos, evitando así el reconocimiento por el sistema retículo endotelial, como por la posibilidad de direccionar las nanopartículas a los órganos o células específicas (Danhier y cols., 2012).

Para conseguir este objetivo, se ensayaron cuatro aditivos como posibles modificadores de la superficie: quitosano de bajo peso molecular (CS), Eudragit[®] RS (Eu), lecitina (Lec) y vitamina E (VitE) (Durán-Lobato y cols., 2013). Estos aditivos fueron disueltos a diferentes concentraciones en la solución del polímero. VitE y Lec se añadieron hasta alcanzar una concentración del 5 y 10 % p/v, cada uno de ellos; Eu se añadió a una concentración del 25, 50 y 75 % p/p en relación al PLGA. En el caso del CS, se añadió en una etapa adicional, tras la formación de las partículas, debido a su naturaleza hidrófila. Para ello, dichas partículas se incubaron durante una noche en una solución de CS al 0.25 % p/v en ácido acético (1 % v/v) y después se recogieron por centrifugación (Centrifuga Eppendorf 504R; Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania).

2.5. Estudios de caracterización de las nanopartículas

2.5.1. Determinación del tamaño medio y distribución de tamaños

El diámetro medio y la distribución de tamaños de los diferentes nanosistemas se midieron a 25 ± 0.5 °C por una técnica de dispersión de láser basado en la teoría de Mie (Partica LA-950V2; Horiba Ltd., Kyoto, Japón). Esta técnica opera prediciendo el comportamiento de las partículas sobre la dispersión de la luz. Como es bien conocido, las partículas dispersan la luz en todas las direcciones con un patrón de intensidad que es dependiente de su tamaño.

Como muestra se tomó una alícuota de 1 mL de la suspensión de partículas recién preparadas y se diluyó en una celda de 12 mL. Las mediciones se llevaron a cabo bajo agitación magnética continua. Se estudiaron las influencias de: i) velocidad de adición de la fase orgánica en la fase acuosa; ii) polímero utilizado; iii) concentración de surfactante empleado; iv) carga de fármaco; y v) aditivo utilizado para modificar la superficie de las partículas.

2.5.2. Determinación de la morfología y el aspecto

El microscopio electrónico de barrido es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, aportando información morfológica del material analizado.

El estudio de las características morfológicas de las distintas formulaciones se llevó a cabo utilizando un microscopio electrónico (XL-30; Royal Philips Electronics, Amsterdam, Países Bajos), que posee un detector de electrones secundarios mediante el cual fue posible observar la superficie de las muestras.

Las muestras liofilizadas se analizaron recubriéndolas con una fina capa de oro (*sputtering*) utilizando una cámara Edwards, con el fin de transformarlas en superficies conductoras.

Las condiciones de trabajo y procedimiento operativo seguido fue el utilizado para analizar muestras no conductoras, siendo el voltaje de aceleración de 15 kV.

2.5.3. Determinación de la carga superficial

La carga superficial eléctrica de las partículas se determinó mediante el cálculo del potencial zeta (PZ). El PZ es un parámetro fundamental que controla la interacción de las partículas en suspensión. Este potencial viene determinado, principalmente, por la naturaleza de la superficie de las partículas y el medio de dispersión.

Las medidas de PZ se llevaron a cabo mediante láser Doppler (Zetamaster 300; Malvern Instruments Ltd, Malvern, Reino Unido), por triplicado después de lavar las nanopartículas con agua destilada a temperatura ambiente. Se estudiaron los efectos del tipo de polímero, la carga del fármaco y el aditivo empleado en la modificación superficial.

2.6. Determinación del contenido en CB13

Con el fin de determinar el contenido de fármaco en las partículas, se empleó el método de RP-HPLC validado previamente (sección 2.2. del presente capítulo) (Álvarez-Fuentes y cols., 2012; Martín-Banderas y cols., 2012). Para ello se pesaron 5 mg de nanopartículas liofilizadas en una balanza de precisión ($d = 0.01$ mg; Modelo CP 225D; Sartorius AG, Goettingen, Alemania). A las muestras se les añadió 1 mL de acetonitrilo, agitándose vigorosamente en un vórtex (5 minutos) para

disolver las partículas en la fase orgánica. A continuación, se tomaron 10 µL de la solución previamente filtrada (filtros de jeringa de 0.22 µm; Millex® GV, Millipore, Barcelona, España) que se inyectaron en el sistema de HPLC. El contenido de fármaco se expresó como el porcentaje de la eficacia de encapsulación (% EE) y la carga de fármaco (% p/p), utilizando las siguientes fórmulas:

$$EE(\%) = \left(\frac{\text{Contenido CB13 en NP}}{\text{Contenido teórico de CB13 en NP}} \right) \times 100$$

$$\text{Carga de fármaco (\% p/p)} = \left(\frac{\text{masa de CB13 en NPs}}{\text{masa de NPs recogida}} \right) \times 100$$

2.7. Determinación del contenido residual de Pluronic® F68

Uno de los tensioactivos más utilizados en la producción de nanopartículas de PLGA es el alcohol polivinílico (PVA), aunque es difícil eliminarlo de la superficie de las partículas y, además, existen referencias bibliográficas sobre una posible toxicidad asociada a su empleo (Garay-Jiménez y cols., 2008; Nehilla y cols., 2008). En el presente trabajo, se empleó Pluronic® F68 para estabilizar las partículas, el cual puede ser considerado como una alternativa valiosa al PVA y un prometedor agente activo superficial. Es una sustancia aprobada por la FDA para uso clínico (Sanna y cols., 2011).

Con objeto de controlar las propiedades de superficie de las nanopartículas y su composición real se llevó a cabo un estudio mediante resonancia magnética nuclear (¹H-RMN) para determinar las cantidades residuales de Pluronic® F68 en las nanopartículas. El estudio de un espectro obtenido por esta técnica permite obtener

información sobre la estructura de un compuesto. Por ello, se realizaron espectros de ^1H -RMN (500 MHz) a 303 K en CDCl_3 a diferentes muestras de partículas liofilizadas en un espectrómetro Brüker Avance 500 (Brüker AXS Inc., Madison, USA). La cantidad residual de surfactante, siguiendo el método descrito por Trimaille y cols. (2003), viene dada por la siguiente expresión:

$$N(\text{mg} / \text{g}) = \frac{M_{PF68}}{M_{PLGA}} \frac{I_{PF68(\delta=1.17)} / 87}{I_{PLGA(\delta=5.35-5.15)}} \times 1000$$

donde:

I_{PLGA} es la integral del pico de los grupos $-\text{CH}$ de la unidad de ácido láctico del PLGA (Resomer[®] 502) ($\delta=5.35-5.15$ ppm) correspondientes a 1 protón,

I_{PF68} es la integral del pico de los grupos $-\text{CH}_3$ de la unidad de PEO del Pluronic[®] F68 ($\delta=1,17$ ppm) correspondiente a 87 protones,

M_{PLGA} es la suma de los pesos moleculares de las unidades de ácidos glicólico y láctico en el PLGA (130 g/mol), y

M_{PF68} es el peso molecular del Pluronic[®] F68 (8350 g/mol)

Los desplazamientos químicos se expresaron en ppm, usando la señal residual del disolvente protonado como referencia.

2.8. Caracterización térmica mediante calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una de las técnicas de análisis térmico más ampliamente utilizadas para la caracterización de sólidos. Eventos térmicos tales como fusión, recristalización, desolvatación, descomposición o transiciones vítreas, pueden

determinarse a través de esta técnica. (Clas y cols., 1999; Verdonck y cols., 1999).

Este estudio se realizó con el objeto de caracterizar los cambios inducidos que se producen cuando se someten los materiales utilizados a variaciones de temperatura. La finalidad fue determinar modificaciones de tipo fisicoquímico que puedan indicar la identidad y la pureza de las sustancias analizadas, así como averiguar la posible existencia de interacciones entre ellas. Para ello, se realizaron distintos termogramas mediante un sistema DSC (Setaram 131; Setaram Instrumentation, Caluire, Francia). Este equipo está compuesto por un horno, una unidad de control y el software correspondiente.

Las muestras en estudio, con un peso de aproximadamente 5 mg, se encapsularon en portamuestras de aluminio de 30 μ L de capacidad, los cuales fueron herméticamente cerrados. La velocidad de barrido fue de 10 $^{\circ}$ C/min en un intervalo de temperaturas comprendido entre 25 y 300 $^{\circ}$ C.

El empleo de esta técnica permitió caracterizar, desde el punto de vista térmico, el estado físico del CB13 contenido en las nanopartículas. Se procesaron muestras de CB13, Pluronic[®] F68, PLGA 50:50 y de las partículas cargadas con CB13 (6 y 20 % p/p fármaco/polímero).

2.9. Estudio de estabilidad

Una de las principales limitaciones de las nanopartículas elaboradas con polímeros biodegradables es que se degradan con el tiempo. Los efectos del pH y la temperatura tienen un efecto crucial en la estabilidad a largo plazo (Abdelwahed y cols., 2006). Con el fin de evaluar la estabilidad de los sistemas, se llevó a cabo un breve estudio

en el que muestras con y sin fármaco se incubaron en una serie de medios: agua Milli-Q, solución salina tamponada con fosfato (PBS) (pH 7.4) y medio de cultivo celular de Dulbecco modificado (DMEM), a 4 y 37 °C. Las muestras se recogieron después de varios períodos de incubación prefijados y se centrifugaron durante 5 min a 4000 r.p.m. con el fin de eliminar los agregados. Finalmente, se determinó el tamaño medio de partícula por dispersión láser (Prego y cols., 2006).

2.10. Optimización del proceso de liofilización

La liofilización es un proceso ampliamente utilizado para el secado y la mejora de la estabilidad de diversos agentes farmacéuticos. Se trata de un proceso relativamente lento y costoso, por lo que, en general sólo se utiliza para los productos con un alto valor añadido, como es el caso de la mayoría de las partículas que contienen ingredientes activos costosos, como es nuestro caso. Tras el proceso de liofilización, las nanopartículas deben presentar ciertas características: (i) preservar las características iniciales del producto, (ii) cuando son nuevamente re-suspendidas, el tiempo de reconstitución debe ser breve y la suspensión obtenida aceptable, (iii) la distribución de tamaños de partícula ha de ser estrecha o no modificada con respecto a las suspensiones iniciales y, (iv) conservar la actividad inalterada del fármaco encapsulado (Abdelwahed y cols., 2006).

Hay diferentes factores que pueden afectar a la calidad final del producto: el proceso de elaboración, el uso de un crioprotector y las condiciones de almacenamiento. La congelación es el primer paso de la liofilización y genera muchas tensiones. Durante este paso, la suspensión líquida se enfría, formándose cristales de hielo de agua

pura que pueden ejercer una tensión mecánica sobre las partículas, conduciendo a su desestabilización (Abdelwahed y cols., 2006).

En el presente trabajo, se evaluó el uso de diferentes crioprotectores empleados comúnmente: alcoholes de bajo peso molecular como el propilenglicol o azúcares como manitol y trealosa, todos ensayados a diferentes concentraciones entre 0-50 % p/p. El uso de crioprotectores resulta imprescindible en estos procesos ya que el PLGA, tras la congelación, forma un gel difícil de resuspender bajo ninguna condición (incluida sonicación) (Abdelwahed y cols., 2006).

Los crioprotectores ensayados se añadieron directamente a la suspensión de partículas antes de la congelación con nitrógeno líquido. Después del proceso completo de liofilización, las nanopartículas se resuspendieron en agua destilada y se determinó el tamaño medio de partícula para evaluar el efecto de cada crioprotector.

2.11. Estudio de liberación *in vitro*

El estudio de la liberación *in vitro* de un fármaco dentro de un nanosistema es de vital importancia para conocer el porcentaje de principio activo liberado en función del tiempo y caracterizar las formulaciones desde un punto de vista cinético.

Para iniciar este estudio, las nanopartículas recién preparadas conteniendo CB13 se suspendieron en PBS pH 7.4 (4 mg de nanopartículas en 15 mL). Este medio contenía 0.1 % p/v de Tween[®] 80, necesario para mantener las condiciones *sink* debido a la baja solubilidad en agua del CB13 (~0.001-0.002 mg/mL) (Hombreiro-Perez y cols., 2003). El ensayo se realizó a 37 °C y con agitación mecánica de 100 r.p.m. (Unitronic Vaivén; Selecta S.A., Barcelona, España). Se

tomaron alícuotas (500 μL) a intervalos de tiempo fijos tras centrifugarlas a 10000 r.p.m., 5 min (Centrifuga Eppendorf 504R; Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). La muestra filtrada (filtros de jeringa Acrodisc[®] 0.45 μm ; VWR International Eurolab S.L., Barcelona, España) se inyectó en el equipo de HPLC para la cuantificación del CB13. La cantidad de fármaco liberado se determinó utilizando una curva de calibración construida sobre el intervalo 2.5-750 mg/mL ($R^2 = 0,9900$) (Álvarez-Fuentes y cols., 2012). Durante este ensayo, se evaluaron los efectos del tipo de polímero usado y el aditivo empleado en la modificación superficial.

2.12. Propiedades mucoadhesivas ex vivo

Para realizar los estudios de mucoadhesión, se llevó a cabo la técnica descrita previamente por Belgamwar y cols., (2009) y Gradauer y cols., (2012). Para ello se empleó intestino de cerdo recién sacrificado, suministrado por el Matadero Municipal (Sevilla, España). Se tomaron muestras de intestino delgado correspondientes a porciones del duodeno, yeyuno e íleon. Los segmentos se colocaron sobre tubos de 9 cm de largo seccionados longitudinalmente, con el lado de la mucosa hacia arriba, dispuestos en un ángulo de inclinación de 45 °, aproximadamente (figura 16).

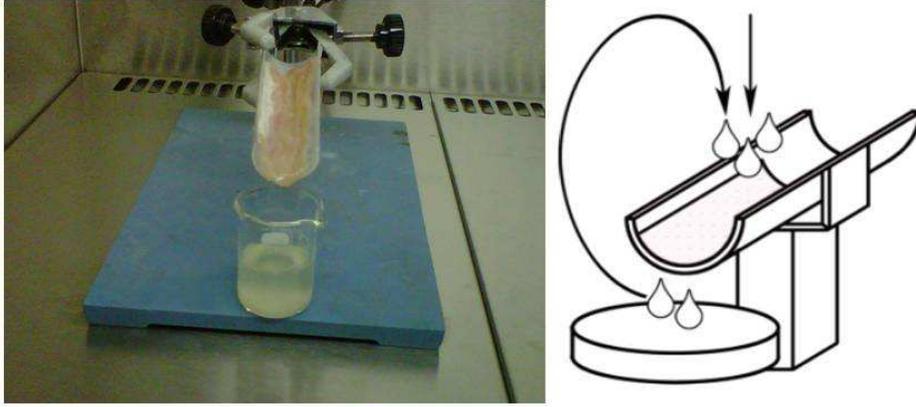


Figura 16. Montaje llevado a cabo para los estudios de mucoadhesión de las nanopartículas elaboradas sobre mucosa de cerdo (Fuente: Gradauer y cols., 2012).

El tejido intestinal se enjuagó con 5 mL de PBS pH 7.4 y posteriormente se dejó gotear 600 μ L de una suspensión de nanopartículas teñidas con cumarina-6 o Nile Red. El exceso se recogió en un vaso de precipitado y se volvió a aplicar, repitiendo este procedimiento diez veces. A la solución final residual se le midió la intensidad de fluorescencia (I_t) con un lector de placas (Synergy HT; BioTek Instruments Inc., Winooski, USA) a una longitud de onda de excitación de 380/40 nm y una longitud de onda de emisión de 460/40 nm. La mucoadhesión se cuantificó usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Mucoadhesión} = \frac{(I_0 \times V_0) - (I_t \times V_t)}{(I_0 \times V_0)} \times 100$$

donde,

I_0 es la fluorescencia de la solución inicial;

I_t es la fluorescencia de la solución final;

V_0 es el volumen que se aplica al tejido;

V_t es el volumen final de la solución no adsorbida a la mucosa y

% Mucoadhesión, que corresponde a la fracción de la suspensión de nanopartículas aplicada que es adsorbida en la mucosa intestinal.

2.13. Estudios en líneas celulares

2.13.1. Cultivo celular

Las células humanas de cáncer de colon (Caco-2) fueron cultivadas en medio esencial Dulbecco modificado suplementado con un 10 % de suero fetal bovino y un 1 % de penicilina-estreptomicina a 37 °C en ambiente humidificado del 5 % de CO₂ (Incubadora de CO₂ AutoFlow NU-4750 Water Jacket; Nuair, Plymouth, USA). El medio se repuso cada dos días y las células se subcultivaron después de alcanzar un 80 % de confluencia aproximadamente (Zhang y Feng, 2006).

2.13.2. Viabilidad celular *in vitro*

Se estudió la viabilidad de las células cancerosas expuestas a las nanopartículas realizando el ensayo MTT (Vihola y cols., 2005). Se trata de un método colorimétrico que mide cuantitativamente la actividad metabólica de las células viables y que se basa en la capacidad que tienen las deshidrogenasas mitocondriales de las células metabólicamente activas de reducir la sal de bromuro de tetrazolio (MTT), de color amarillo e hidrofílica, a un compuesto hidrofóbico (formazán), de color azul oscuro. Tras la captación del MTT, las células se rompen y se solubiliza el formazán con dodecil sulfato de sodio (SDS). La absorbancia de cada muestra es directamente proporcional al número de células viables.

Las células Caco-2 fueron sembradas en placas de 96 pocillos (Nunclon®; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) a una densidad de

7×10^5 células viables/pocillo y se incubaron 24 h para permitir la unión celular. Pasado ese tiempo, las células se incubaron con suspensiones de nanopartículas cargadas y no cargadas con CB13 en concentraciones de 0.025 a 25 mg/mL durante 24 y 48 h. A los intervalos de tiempo designados, se retiró el medio y se lavaron los pocillos con medio de cultivo. Entonces, se añadieron a cada pocillo 125 μ L de MTT a una concentración de 1 mg/mL en medio de cultivo. Después de la incubación con MTT durante 3-4 h, se añadieron 80 μ L de SDS al 20 % p/v en HCl (0.02 M) a cada pocillo, con el fin de solubilizar los cristales de formazán. Las placas se incubaron durante 24 h analizando, a continuación, su absorbancia con un lector de placas (Synergy HT; BioTek Instruments Inc., Winooski, USA) a 540 nm. La viabilidad celular se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$Viabilidad\ celular\ (\%) = \frac{Int_s}{Int_{control}} \times 100$$

Donde, Int_s es la intensidad de absorbancia de las células incubadas con la suspensión de nanopartículas e $Int_{control}$ es la intensidad de absorbancia de las células incubadas con el medio de cultivo sólo como control positivo.

2.13.3. Estudios de captación celular *in vitro*

Para la realización de estudios cuantitativos, las células Caco-2 se cultivaron en frascos de cultivo de 25 cm³ (Nunclon[®]; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) hasta alcanzar una confluencia del 80 %. Entonces, se cambió el medio de cultivo por una suspensión de nanopartículas cargadas con cumarina-6 (4 mg/mL). Las células se incubaron con la suspensión de nanopartículas durante 30 y 120 minutos. Pasados los tiempos de incubación, se retiró la suspensión de

partículas y las células se lavaron tres veces con DMEM. Seguidamente, las células se separaron de la superficie de los frascos por incubación con una solución que contenía tripsina (1x) durante 7 min y se les midió la cantidad de fluorescencia presente usando un citómetro de flujo (FC 500 Cytomics MPL; Beckman Coulter Inc., Brea, USA) (Danhier y cols., 2009).

Para la realización de estudios cualitativos, se sembraron células en una cámara de vidrio cubierta (μ -Dish 35 mm, alto; Ibidi GmbH, Munich, Alemania) hasta alcanzar el 80 % de confluencia. Entonces, se incubaron con una suspensión de partículas cargadas con Nile-Red durante 2 h. Pasado el tiempo de incubación, las células se lavaron con PBS y después se fijaron con paraformaldehído (4 % p/v en PBS) durante 25 min. Posteriormente, se tiñeron los núcleos con el reactivo Hoechst 33258. Las células se lavaron con PBS para eliminar el reactivo y se les añadió la mezcla PBS:glicerol (20:80) para ser observadas en el microscopio confocal de barrido láser (CLSM) (Zeiss LSM 410, LSM Tech, Etters, USA) con el software (Image Browser ZEN confocal Zeiss) para la formación de imágenes.

2.14. Análisis estadístico

Los datos se representan como media \pm desviación estándar (D.E.). Además se utilizaron F- y T-test y el análisis de la varianza para un solo factor y para múltiples factores, para determinar la significación entre dos grupos y entre más de dos grupos, respectivamente. Un valor de $p < 0.05$ se consideró significativo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Método de cuantificación por RP-HPLC

3.1.1. Condiciones cromatográficas

Las condiciones cromatográficas fueron optimizadas por la cuantificación de CB13 en un tiempo de análisis (20 minutos) y pico de absorción adecuados (aislado, simétrico, etc.).

Con respecto al desarrollo de este método y teniendo en cuenta la bibliografía consultada (Vollner y cols., 1986), se ensayaron diferentes fases móviles seleccionando finalmente la compuesta por dos solventes: (A) una mezcla de acetonitrilo/agua/ácido acético, (75:23.7:1.3 v/v) y (B) acetonitrilo, en proporción final 70:30 (A:B).

En primer lugar se ensayó una fase móvil consistente en metanol, agua y ácido acético (75:23.7:1.3). Sin embargo, el tiempo de retención era demasiado largo y la inclusión de una proporción de metanol podría disminuir el tiempo de retención del CB13. Por lo tanto, la siguiente fase móvil fue una mezcla 70:30 (v/v) de dos soluciones: la solución dada anteriormente y una solución de metanol. Finalmente, el metanol se cambió por acetonitrilo, debido a la alta producción de burbujas que aparecía en el sistema de HPLC y que se manifestaba en diferentes tiempos de retención para el pico de absorción del CB13.

3.1.2. Validación del método analítico

3.1.2.1. Selectividad/especificidad

La especificidad del método se comprobó mediante la comparación de los cromatogramas de CB13 estándar y los componentes de la formulación de las nanopartículas que pudieran crear posibles

interferencias en el proceso de validación. La figura 17 muestra los cromatogramas obtenidos para el placebo y el disolvente. En ella se observa que ni placebo ni disolvente muestran ningún pico con un tiempo de retención similar al del CB13 ($10.88 \text{ min} \pm 10 \%$), por lo que el método desarrollado es específico en relación a los excipientes de la preparación final.

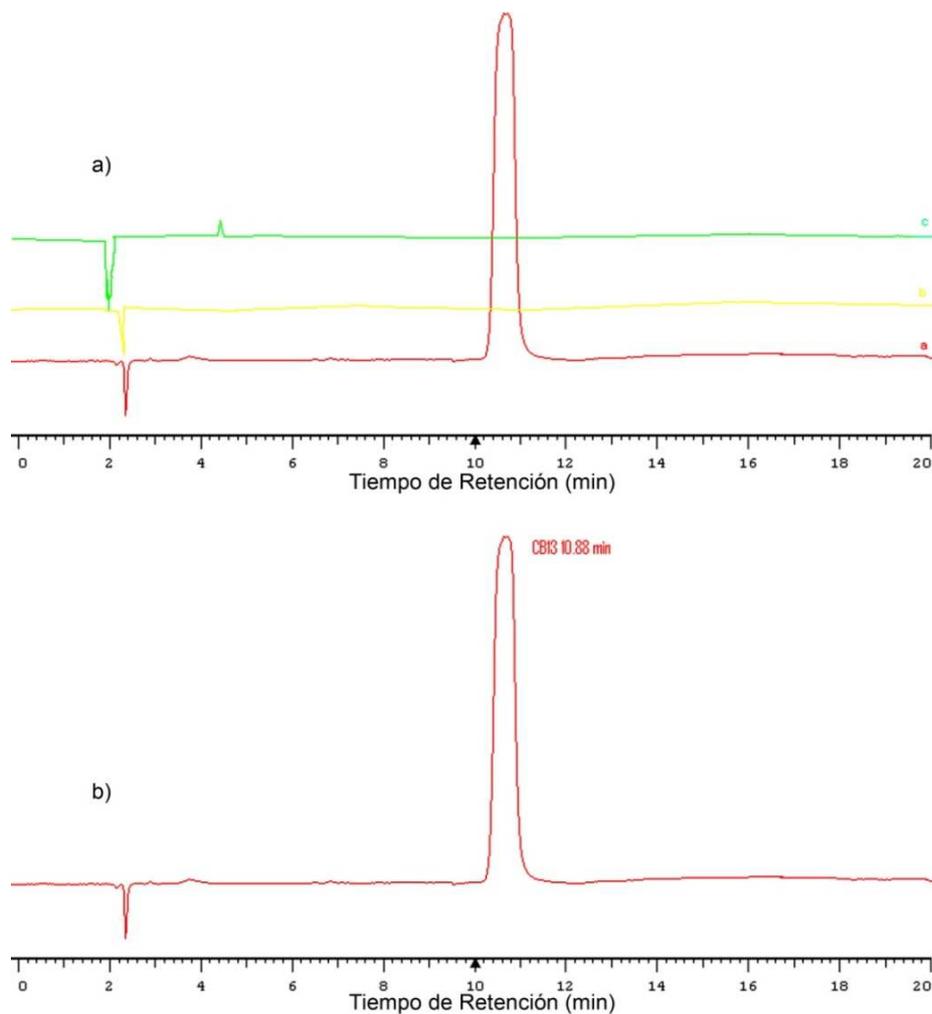


Figura 17. (a) Cromatogramas obtenidos para el placebo (verde), el disolvente (amarillo) y el estándar de CB13 (rojo); (b) Cromatograma representativo del CB13 (tiempo de retención=10.88 min).

Asimismo, las muestras de CB13 fueron sometidas a condiciones de estrés (temperatura, luz solar y pH), con el fin de detectar la presencia de posibles picos de interferencia resultantes de la degradación de CB13. Estas pruebas se consideran herramientas útiles en el establecimiento de las vías de degradación y la estabilidad inherente de la molécula (das Neves y cols., 2010). De acuerdo con las áreas obtenidas, el valor de la degradación media obtenida fue 7.50 %, por lo que se puede concluir que el CB13 es estable bajo estas condiciones de estrés, ya que el porcentaje de degradación de las muestras estresadas con respecto a la muestra estándar es muy pequeño. Por lo tanto, el método de HPLC desarrollado para la determinación y cuantificación de CB13 es específico y selectivo (Holgado y cols., 2009). En la tabla 5 se muestran los resultados de las áreas cromatográficas obtenidas tras su tratamiento.

Muestra	Área	D.E.	Degradación (%)
CB13 estándar	8153597.20	35005.81	-
Luz solar	7875096.40	26612.37	10.19
60 °C	7060010.75	41227.90	8.22
HCl	7439835.40	23639.07	5.91
NaOH	7488509.00	27971.56	5.66

Tabla 5. Áreas cromatográficas y porcentaje de degradación obtenidos al someter la muestra de CB13 a condiciones de estrés.

3.1.2.2. Precisión

El estudio de precisión expresa la importancia que tienen los errores aleatorios en el funcionamiento del método y se puede expresar en diferentes niveles. En el caso del método desarrollado, la precisión ha sido validada para diversos estudios de repetibilidad.

- **Precisión instrumental:** con este parámetro se evaluó la repetibilidad del sistema. En la tabla 6 se encuentran reflejados los resultados, del área y del tiempo de retención obtenidos, correspondientes a seis inyecciones de un único vial de CB13 estándar (500 µg/mL), realizadas el mismo día.

	Área	Tiempo retención (min)
	7878124	10.85
	7879007	10.91
	7929884	10.88
	7963324	10.80
	7782824	10.85
	7937328	10.85
Media	7895081.83	10.86
D.E.	64499.17	0.04
D.E.R.	0.82	0.34

Tabla 6. Áreas cromatográficas y tiempos de retención (min) correspondientes al estudio de precisión instrumental.

Se obtiene una desviación estándar relativa de 0.82 % para el área y 0.34 % para el tiempo de retención, lo que nos permite afirmar que el análisis de la repetibilidad instrumental del sistema se encuentra en condiciones óptimas ya que el criterio de aceptación en el análisis de las formulaciones de productos farmacéuticos establece el límite de D.E.R. en un 1.5 % (Guidelines for Collaborative Study procedure to validate characteristics of a method of analysis, 1989; ICH-Q2B, 1996; ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005).

- **Reproducibilidad del método:** se determinó mediante el uso de los resultados obtenidos en las pruebas de exactitud (a tres niveles de concentración: nivel bajo (50 %), nivel medio (100 %) y nivel alto (150 %), calculándose la D.E.R. para cada nivel. Los

valores se muestran en la tabla 8 (en la sección 3.1.2.3. del presente capítulo). En resumen, la D.E.R. del porcentaje de recuperación para las seis muestras analizadas, en los niveles I, III y V de la prueba de exactitud es inferior al 2.0 % (criterio de aceptación) por lo que este estudio se consideró válido (Guidelines for Collaborative Study procedure to validate characteristics of a method of analysis, 1989; Marcato y Durán, 2008; Cózar-Bernal y cols., 2011).

- Precisión intermedia o reproducibilidad del método analítico: los resultados obtenidos en los análisis realizados por dos analistas distintos en diferentes días se encuentran recogidos en la tabla 7.

En esta tabla puede observarse claramente que no existe variabilidad en las medidas obtenidas por los diferentes analistas en distintos días, obteniéndose valores de D.E.R. inferiores a los límites aceptados para ello (< 2.0 %), por lo que se puede concluir que el método es reproducible ya que las variaciones introducidas en el ensayo no influyen de forma significativa en el resultado del mismo (Guidelines for Collaborative Study procedure to validate characteristics of a method of analysis, 1989; Marcato y Durán, 2008; Cózar-Bernal y cols., 2011).

Analista/Día	Área	Conc. µg/mL	µg obtenidos	µg teóricos	Recuperación (%)	Media	D.E.	D.E.R.
1/1 M1	7989643.00	529.66	529.66	530.00	99.94	530.13	0.65	0.12
1/1 M2	7996592.00	530.59	530.59	530.00	100.11			
2/1 M1	8250925.00	564.35	564.35	560.00	100.78	561.49	4.05	0.72
2/1 M2	8207825.00	558.63	558.63	560.00	99.76			
1/2 M1	7933657.00	522.23	522.23	520.00	100.43	525.48	4.59	0.87
1/2 M2	7982560.00	528.72	528.72	520.00	101.68			
2/2 M1	8199425.00	557.51	557.51	550.00	101.37	558.93	2.01	0.36
2/2 M2	8220796.00	560.35	560.35	550.00	101.88			
Media	8097677.88	544.01	544.01	540.00	100.74	544.01	2.82	0.52
D.E.	132650.17	17.61	17.61	16.90	0.82			
D.E.R.	1.64	3.24	3.24	3.13	0.81			

Tabla 7. Precisión intermedia, desarrollada por dos analistas, en dos días diferentes, para dos muestras (M1 y M2).

3.1.2.3. Exactitud

Los resultados obtenidos para el análisis de este parámetro se expresan como el porcentaje de cada una de las muestras analizadas. La tabla 8 muestra que los porcentajes de recuperación para el intervalo de concentraciones estudiadas (250-750 µg/mL) se encuentran entre 98.04 % y 101.91 % con un valor de D.E.R. = 1.12 %.

Según los datos obtenidos, no sería necesario realizar ningún test estadístico adicional, ya que el criterio de aceptación de la ICH para las formulaciones farmacéuticas en este parámetro establece que el porcentaje de recuperación debe encontrarse entre el 98 y 102 %, lo que equivale a un ± 2.0 % de error relativo (Guidelines for Collaborative Study procedure to validate characteristics of a method of analysis, 1989; Marcato y Durán, 2008).

Nivel	μg teóricos	Área	μg obtenidos	Recuperación (%)
I	250.30	5893629	251.40	100.44
	250.60	5923674	255.39	101.91
	250.20	5894399	251.50	100.52
	250.40	5908769	253.41	101.20
	250.80	5906442	253.10	100.92
	250.50	5910865	253.69	101.27
	Media	5906296.33	253.08	101.04
D.E.	11233.87	1.49	0.54	
D.E.R.	0.19	0.59	0.54	
II	375.90	6877032	381.95	101.61
	375.60	6868845	380.87	101.40
	375.50	6846789	377.94	100.65
	375.40	6827659	375.40	100.00
	375.30	6844970	377.70	100.64
	375.20	6788651	370.22	98.67
	Media	6816810.50	373.96	100.50
D.E.	39823.55	5.29	1.07	
D.E.R.	0.58	1.41	1.06	
III	500.50	7826787	508.04	101.51
	500.30	7830087	508.48	101.64
	500.20	7819852	507.12	101.38
	500.10	7796745	504.06	100.79
	500.40	7830499	508.54	101.63
	500.90	7843563	510.27	101.87
	Media	7837031	509.40	101.47
D.E.	9237.64	1.23	0.37	
D.E.R.	0.12	0.24	0.36	
IV	625.70	8660128	618.68	98.88
	625.20	8616831	612.93	98.04
	625.50	8667643	619.68	99.07
	625.30	8626379	614.20	98.22
	625.80	8709376	625.22	99.91
	625.10	8662725	619.02	99.03
	Media	8656590.80	618.21	98.86
D.E.	36877	4.90	0.67	
D.E.R.	0.43	0.79	0.68	

Tabla 8. Valores obtenidos en el estudio de exactitud de las muestras de placebo cargadas con CB13 (y reproducibilidad, en niveles I, III y V).

Tabla 8: Continuación				
Nivel	µg teóricos	Área	µg obtenidos	Recuperación (%)
V	750.60	9721315	759.56	101.19
	750.30	9694826	756.04	100.77
	750.90	9759387	764.62	101.83
	750.70	9703864	757.24	100.87
	750.10	9739189	761.93	101.58
	750.20	9689777	755.37	100.69
	Media	9714483	758.65	101.15
D.E.	34939.56	4.64	0.46	
D.E.R.	0.36	0.61	0.46	
Media		7789689.90	503.12	100.60
D.E.		1358476.43	180.35	1.13
D.E.R.		17.44	35.85	1.12

Tabla 8. Valores obtenidos en el estudio de exactitud de las muestras de placebo cargadas con CB13 (y reproducibilidad, en niveles I, III y V).

3.1.2.4. Linealidad

La linealidad es la capacidad del método para responder proporcionalmente a los cambios en la concentración o la cantidad de analito en una muestra.

Respecto a la linealidad del sistema, se estudió en el intervalo de concentración de 250 a 750 µg/mL, mediante el cálculo de la ecuación de una recta y su coeficiente de correlación (R^2). La ecuación de la recta obtenida se corresponde con $y = 16898x + 317039$ (y: área del pico; x: concentración de CB13 (µg/mL) y un coeficiente de correlación $R^2 = 0.9983$ ($n = 6$)).

Para la linealidad del método, el intervalo de concentración fue el mismo que para la linealidad del sistema y la ecuación de la recta obtenida fue $y = 14303.52x + 316730.81$ con un coeficiente de correlación $R^2 = 0.9952$.

Para estos estudios se llevó a cabo un análisis estadístico (ANOVA) para asegurar una buena linealidad del método desarrollado. El test estadístico F y su correspondiente valor p (nivel de significación estadística de F-test) indican un buen ajuste global del modelo ($p = 2.45 \cdot 10^{-11}$ para la linealidad del sistema y $p = 1.89 \cdot 10^{-14}$ para la linealidad del método).

La figura 18 muestra los gráficos obtenidos en el estudio para la linealidad del sistema y la linealidad del método.

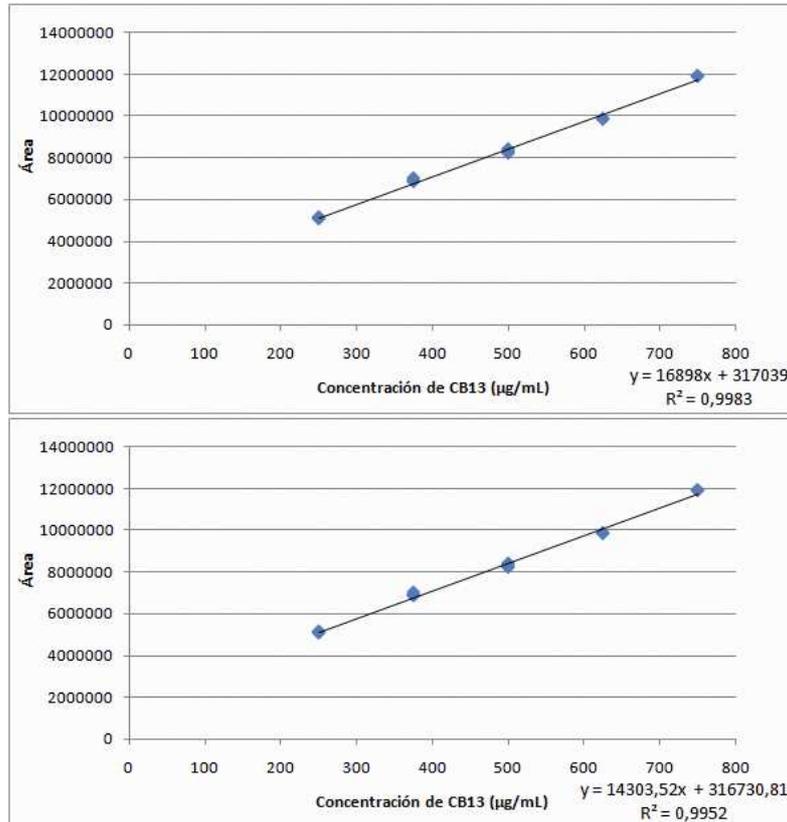


Figura 18. (a) Linealidad del sistema correspondiente al intervalo de concentraciones de 250-750 µg/mL de CB13. (b) Linealidad del método correspondiente al intervalo de concentraciones de 250-750 µg/mL de CB13 agregado a una solución de placebo.

3.1.2.5. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

La concentración más baja a la cual el analito es detectado (LOD) o cuantificado con precisión y exactitud aceptable (LOQ) fue determinado mediante el trazado de la zona de D.E.R. (%) frente a la concentración de analito (figura 19a) (Green, 1996).

Las concentraciones de CB13 utilizadas para este estudio fueron mucho menores que las concentraciones más bajas del método propuesto (0.5, 1.25, 2.5, 4, 5, 10, 20, y 35 $\mu\text{g/mL}$). De hecho, la concentración máxima en este estudio (35 $\mu\text{g/mL}$) corresponde a una señal de detección de alrededor del 5 % del área de absorción para la menor concentración incluida en la curva de calibración (250 $\mu\text{g/mL}$).

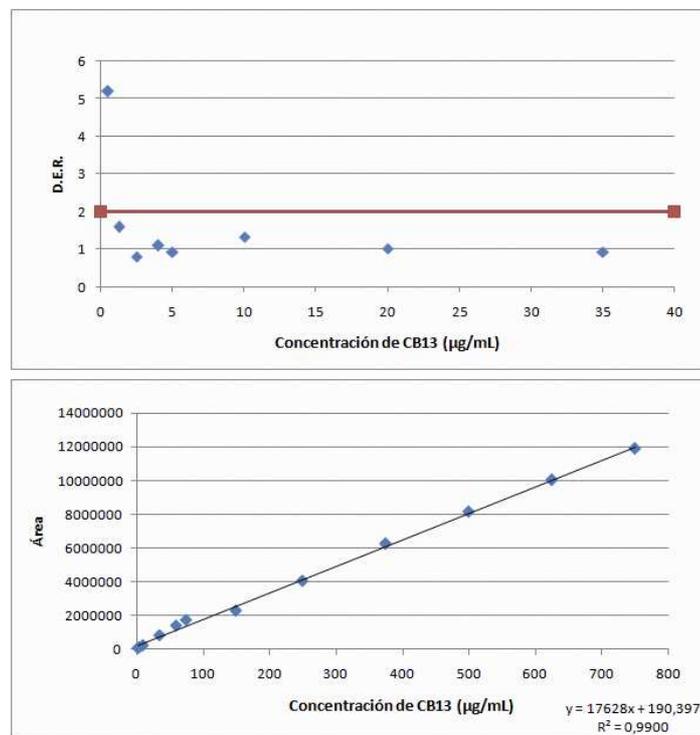


Figura 19. (a) LOD-LOQ obtenido tras la representación de la concentración frente a sus RSD. (b) Linealidad correspondiente al intervalo de concentración 2.5-750 $\mu\text{g/mL}$ de CB13.

El primer punto que no cumple la mínima D.E.R. que obedece a los requisitos preestablecidos para la reproducibilidad del estudio (2 %) corresponde al límite de detección. El valor de LOD se encontró que era 0.5 µg/mL. El primer punto que se sitúa dentro del valor especificado, corresponde al límite de cuantificación (LOQ), que se encuentra en 1.25 µg/mL (Épshtein, 2002).

Además, la representación de las concentraciones frente a las áreas obtenidas en las zonas inferiores de las concentraciones estudiadas (figura 19b) será útil para cuantificar cantidades menores de CB13 en algunas pruebas, tales como los estudios de liberación *in vitro*. Por esta razón, se desarrolló una nueva linealidad en el intervalo de concentraciones de CB13 de 2.5 a 750 µg/mL, obteniéndose una ecuación de la recta:

$$y = 17268x + 190.397 (R^2 = 0.9900) (F = 583.78; p = 3.25 \cdot 10^{-3}).$$

3.1.2.6. Robustez

La robustez de un método de análisis se utiliza para demostrar que las variaciones típicas de los parámetros del método no producen cambios significativos en los resultados del análisis.

La evaluación de la robustez se basa en el porcentaje de recuperación y los valores de D.E.R. obtenidos para diferentes cambios en el método de análisis. La tabla 9 muestra los porcentajes de recuperación y la D.E.R. para cada parámetro estudiado: la temperatura del horno (± 2 ° C), velocidad de flujo (± 0.100 mL/min), proporción de la fase móvil (A:B 75:25 y 65:35) y el pH de la fase móvil (± 0.2 unidades). Como se muestra en la tabla, los porcentajes de recuperación obtenidos en todos los parámetros estudiados, se

encuentran entre 99.33 % y 102.87 % y la D.E.R. de cada uno de ellos es inferior al 2 %. Por lo tanto, el método ha demostrado ser robusto sobre pequeñas variaciones del método de análisis (LoBrutto y Patel, 2007).

Cambios del método original	µg Teóricos	Área	µg Experimental	Recuperación (%)
Flujo Fase Móvil - 0.1 mL/min	500.6	7805558	505.23	100.92
	500.2	7866931	513.37	102.63
	500.3	7832567	508.81	101.70
	Media	7835018.67	509.14	101.75
	D.E.	30759.86	4.08	0.86
D.E.R.	0.39	0.80	0.84	
Flujo Fase Móvil + 0.1 mL/min	500.3	7847196	510.75	102.09
	500.2	7792737	503.52	100.66
	500.5	7788651	502.98	100.50
	Media	7809528	505.75	101.08
	D.E.	32685.36	4.34	0.88
D.E.R.	0.42	0.86	0.87	
Temperatura horno -2 °C	500.2	7871571	513.99	102.76
	500.7	7780730	501.93	100.25
	500.5	7791724	503.39	100.58
	Media	7814675	506.44	101.19
	D.E.	49579.06	6.58	1.36
D.E.R.	0.63	1.30	1.35	
Temperatura horno +2 °C	500.5	7824382	507.72	101.44
	500.3	7798848	504.33	100.81
	500.1	7874972	514.44	102.87
	Media	7832734	508.83	101.71
	D.E.	38743.16	5.14	1.06
D.E.R.	0.49	1.01	1.04	
Proporción Fase Móvil (A:B) 65:35	500.9	7803035	504.89	100.80
	500.2	7813163	506.23	101.21
	500.7	7746297	497.36	99.33
	Media	7787498.33	502.83	100.45
	D.E.	36038.96	4.78	0.99
D.E.R.	0.46	0.95	0.98	

Tabla 9. Valores obtenidos en el estudio de robustez.

Tabla 9: Continuación

Cambios del método original	µg Teóricos	Área	µg Experimental	Recuperación (%)
Proporción Fase Móvil (A:B) 75:25	500.5	7816384	506.66	101.23
	500.3	7787456	502.82	100.50
	500.8	7874516	514.38	102.71
	Media	7826118.67	507.95	101.48
	D.E.	44338.85	5.89	1.13
	D.E.R.	0.57	1.16	1.11
pH Fase Móvil= 2.70	500.1	7822905	507.53	101.49
	500.4	7850511	511.19	102.16
	500.8	7789915	503.15	100.47
	Media	7821110.33	507.29	101.37
	D.E.	30337.84	4.03	0.85
	D.E.R.	0.39	0.79	0.84
pH Fase Móvil= 3.10	500.7	7780508	501.90	100.24
	500.2	7829422	508.39	101.64
	500.6	7823697	507.63	101.40
	Media	7811209	505.98	101.09
	D.E.	26741.49	3.55	0.75
	D.E.R.	0.34	0.70	0.74

Tabla 9. Valores obtenidos en el estudio de robustez.

A modo resumen, en relación con el desarrollo y validación del método de HPLC en fase reversa propuesto, aplicado a la cuantificación del CB13 en las nanopartículas elaboradas, se ha demostrado que el método es selectivo, lineal entre el 50 y 150 % de la concentración tomada como estándar (500 µg/mL), con un coeficiente de correlación superior a 0.998, exacto y preciso. Los límites de detección y cuantificación para el fármaco fueron 0.5 y 1.25 µg/mL, respectivamente, encontrándose estos valores por debajo de las concentraciones más bajas esperadas en las muestras. Además, el método ha demostrado ser robusto a pequeñas variaciones típicas de los parámetros del método (Álvarez-Fuentes y cols., 2012).

3.2. Caracterización de las nanopartículas elaboradas

La síntesis de las nanopartículas de PLGA se llevó a cabo por el método de nanoprecitación, tal y como se ha descrito previamente (sección 2.3. de Materiales y Métodos).

3.2.1. Determinación del tamaño medio y distribución de tamaños

El tamaño y la distribución de tamaños de las nanopartículas se determinaron por dispersión láser. Los datos se expresan como el valor del diámetro medio y la desviación estándar (D.E.), obtenida a partir de experimentos independientes. Se estudió el efecto de la velocidad de adición de la fase orgánica en la fase acuosa, el tipo de polímero empleado, la concentración de surfactante, la cantidad inicial de fármaco y el aditivo empleado en la modificación superficial de las partículas.

En primer lugar, se estudió el tamaño y la distribución de tamaños en función de la velocidad de adición de la fase orgánica en la fase acuosa. Cuando se utilizaron velocidades altas de adición se formaron agregados de partículas, por lo que, finalmente se seleccionó como velocidad de referencia 5 mL/h para todas las nanopartículas elaboradas.

El análisis de las muestras mostró un tamaño de partícula de 90-300 nm de diámetro, independientemente de las condiciones iniciales de preparación, con un coeficiente de variación (CV) de aproximadamente 30 %. Se encontró influencia estadísticamente significativa ($F(5,19) = 3664.67$; $p = 2.38 \cdot 10^{-6}$; $n = 6$) del tipo de polímero empleado sobre el tamaño de partícula (tabla 10). Según los datos de la tabla, se puede observar que para los Resomer[®] 502, las partículas alcanzaron un

tamaño en torno a 300 nm, mientras que para el resto de polímeros el tamaño de partícula se situó alrededor de 100 nm.

Polímero (R: Resomer [®])	Tamaño \pm D.E. (nm)	CV (%) intra-lote	CV (%) inter-lote	PZ \pm D.E. (mV)
R502	311.02 \pm 12.94	34.28	4.16	-24.5 \pm 2.3
R502H	281.37 \pm 11.30	34.63	4.02	-42.6 \pm 0.6
R504	89.33 \pm 0.96	35.02	1.08	-28.4 \pm 1.1
R504H	91.97 \pm 10.38	34.87	2.29	-44.8 \pm 0.9
R752S	131.06 \pm 6.02	38.17	4.60	-33.2 \pm 0.7

Tabla 10. *Tamaño de partícula y distribución de tamaños, coeficiente de variación intra- e interlote y valores de PZ obtenidos en función del polímero utilizado en la preparación de las nanopartículas (n=6).*

Según los datos de la tabla, el tamaño de partícula disminuyó al aumentar el peso molecular del polímero desde 12.000 a 48.000 Da (502 vs. 504). Estos resultados pueden explicarse en función de la hidrofobicidad del polímero empleado. A mayor peso molecular, mayor hidrofobicidad y menor tamaño de partícula obtenido debido a la presencia de cadenas alifáticas más largas (Huh y cols., 2003; Palacio y cols., 2011). Sin embargo, no se encontraron diferencias en el tamaño por la presencia de grupos carboxilo terminales (502 vs. 502H y 504 vs. 504H) (Palacio y cols., 2011). Comparando los resultados entre R502 y R752S (con pesos moleculares similares), se obtuvieron diámetros más pequeños para R752S. En este caso, la fracción de ácido láctico en el polímero aumenta hasta un 75 %, incrementándose la hidrofobicidad del sistema, lo que provoca un menor tamaño de partícula para sistemas elaborados con R752S (Huh y cols., 2003; Palacio y cols., 2011).

En este estudio, se evaluó también la reproducibilidad del procedimiento. El coeficiente de variación (CV %) interlote fue en todos

los casos menor al 10 %, lo que apunta a que el procedimiento desarrollado para la síntesis de las nanopartículas mediante nanoprecipitación resulta fiable y reproducible.

El uso o no de un tensioactivo (Span[®] 60) en la fase orgánica, también afectó al tamaño de partícula de nanopartículas elaboradas con Resomer[®] 502 y 502H (tabla 11). Se puede observar que cuando no se empleó agente tensioactivo, el diámetro de partícula aumentó hasta 600 nm mostrando a su vez un alto grado de polidispersión por desestabilización del sistema.

Polímero (R: Resomer [®])	C _{surfactante} (% p/v)	Tamaño ± D.E. (nm)	CV (%)
R502	0	592.60 ± 296.10	49.97
	0.1	462.26 ± 533.70	115.45
	0.5	304.22 ± 111.50	35.65
R502H	0	600.56 ± 219.89	36.61
	0.1	269.40 ± 96.70	35.89
	0.5	287.35 ± 116.38	52.22

Tabla 11. Tamaño de partícula y distribución de tamaños en función de la concentración de tensioactivo (Span[®] 60) ensayada (n=3).

También se evaluó el tamaño de partícula en función de la cantidad inicial de CB13. No se encontró influencia significativa en el tamaño medio de partícula o distribución de tamaños en función de la variable estudiada ($F(6,38) = 1.452$; $p = 0.3633$; $n = 3$) (tabla 12).

CB13 (% p/p)	Tamaño ± D.E. (nm)	CV (%)
0	291.28 ± 99.80	34.28
6	309.84 ± 100.48	32.50
10	321.73 ± 108.90	33.86
13	322.34 ± 113.55	35.25
20	315.25 ± 108.30	34.36

Tabla 12. Tamaño y distribución de tamaños en función del contenido inicial de CB13 (polímero usado: R502) (n=3).

Por último, los resultados obtenidos en función del aditivo empleado para la modificación superficial de las partículas y las correspondientes concentraciones ensayadas se presentan en la tabla 13. Como se puede observar, las nanopartículas mostraron una distribución de tamaños en el intervalo 253-344 nm, lo que es adecuado para la captación celular tras su administración oral (Pappo y Eremark, 1989).

	Muestra	Tamaño \pm D.E. (nm)	CV (%)	PZ \pm D.E. (mV)
Blancas	PLGA	289.65 \pm 97.90	33.82	-32.70 \pm 0.50
	Eu(75 %)-PLGA	327.82 \pm 120.27	36.71	+47.00 \pm 0.30
	Eu(50 %)-PLGA	309.65 \pm 113.33	36.47	+36.10 \pm 1.40
	Eu(25 %)-PLGA	290.30 \pm 127.23	39.34	+26.50 \pm 0.90
	CS-PLGA	309.24 \pm 108.13	34.95	+57.70 \pm 2.90
	Lec(5 %)-PLGA	298.91 \pm 100.55	33.60	-23.10 \pm 1.30
	Lec(10 %)-PLGA	296.65 \pm 103.50	34.86	-21.00 \pm 1.70
	VitE(5 %)-PLGA	314.38 \pm 111.05	35.33	-14.80 \pm 1.10
	VitE(10 %)-PLGA	320.97 \pm 119.70	37.29	-18.80 \pm 0.40
Cargadas con CB13	PLGA	322.34 \pm 113.55	35.24	-35.60 \pm 1.10
	Eu(75 %)-PLGA	332.90 \pm 117.00	35.14	+43.40 \pm 1.20
	Eu(50 %)-PLGA	322.92 \pm 122.00	37.77	+33.80 \pm 0.60
	Eu(25 %)-PLGA	299.44 \pm 64.70	21.62	+25.50 \pm 0.30
	CS-PLGA	344.90 \pm 121.37	34.83	+59.00 \pm 1.10
	Lec(5 %)-PLGA	299.72 \pm 104.40	34.83	-21.50 \pm 0.70
	Lec(10 %)-PLGA	337.79 \pm 125.10	37.03	-26.10 \pm 0.40
	VitE(5 %)-PLGA	253.55 \pm 83.00	32.75	-15.70 \pm 0.60
	VitE(10 %)-PLGA	343.71 \pm 173.20	50.39	-17.10 \pm 0.50

Tabla 13. Tamaño de partícula y distribución de tamaños, coeficiente de variación y valores de PZ obtenidos para las nanopartículas de PLGA sin modificar y de superficie modificada, blancas y cargadas con CB13 (13 % p/p) (polímero usado: R502) (n=3).

Como conclusión general puede decirse que siguiendo el procedimiento indicado en Material y Métodos, se obtienen tamaños

adecuados con distribuciones de tamaños apropiados ya que rozan la homogeneidad, además de ser reproducibles lote a lote.

Por otro lado y para estudiar la influencia de los aditivos utilizados sobre el tamaño de partícula, se realizó un análisis de la varianza que indicó que no había influencias estadísticamente significativas sobre el parámetro estudiado ($F(8,25) = 1.909$; $p = 0.102$; $n = 34$).

A título de ejemplo, la figura 20 muestra los histogramas que ilustran la distribución de tamaños obtenidos para varias formulaciones.

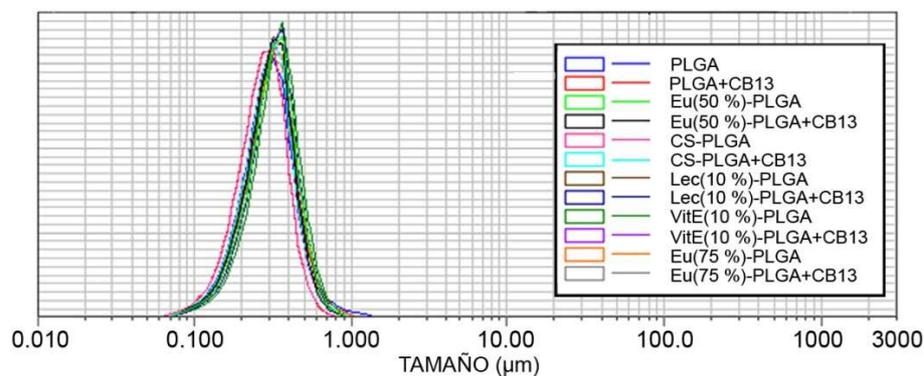


Figura 20. Histogramas de la distribución de tamaños de diferentes formulaciones elaboradas.

3.2.2. Determinación de la morfología y el aspecto

En relación con la morfología de las partículas, todas mostraron forma esférica. Además, el proceso de liofilización fue optimizado para que no afectara a la morfología de la superficie de las nanopartículas (Martín-Banderas y cols., 2012).

A título de ejemplo, la figura 21 muestra varios histogramas y una microfotografía SEM correspondientes a la formulación de nanopartículas de PLGA cargadas con CB13. La imagen reveló una morfología regular y simétrica de las partículas.

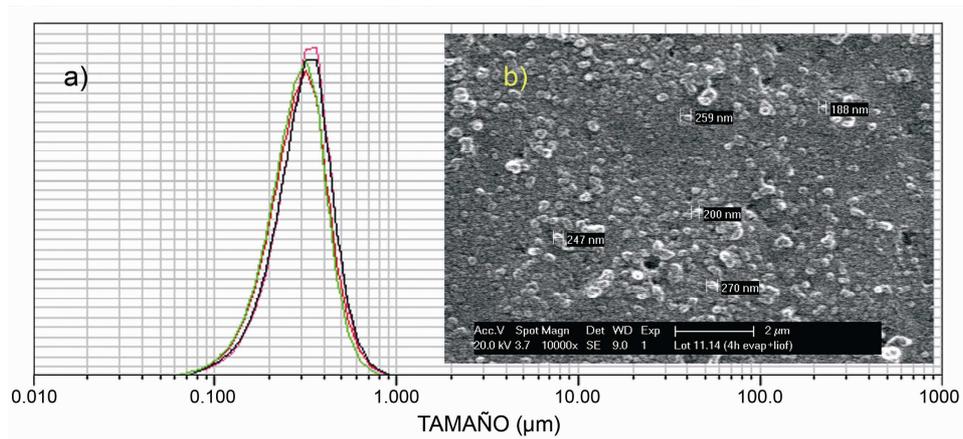


Figura 21. a) Histograma de la distribución de tamaños de nanopartículas de PLGA cargadas con CB13 (polímero usado: R502) (10 % p/p); b) Microfotografía SEM de la misma formulación.

3.2.3. Determinación de la carga superficial

El potencial zeta (PZ) de las partículas está relacionado con la carga eléctrica superficial de las mismas y su valor influye en una amplia gama de propiedades fisicoquímicas como la estabilidad en suspensión o la interacción con electrolitos, entre otras. Es por ello que, junto con otras propiedades, como el tamaño o la distribución de tamaños (estudiados anteriormente), las características de la superficie de las partículas tienen una gran repercusión, especialmente en aspectos relacionados con la captación y distribución de las mismas. Se estudiaron los efectos del tipo de polímero, la carga del fármaco y el aditivo empleado en la modificación superficial de las partículas elaboradas.

En relación al tipo de polímero, en la tabla 10 (sección 3.2.1. del presente capítulo) se muestran los valores de PZ obtenidos para cada formulación ensayada. Se obtuvieron valores negativos en todos los casos, por debajo de -24 mV, debido a las cargas negativas de los

grupos funcionales del PLGA. Cuando se evaluaron las nanopartículas cargadas con CB13, se obtuvieron valores de PZ ligeramente inferiores (-20 mV).

Sin embargo, para las formulaciones preparadas empleando diferentes aditivos para la modificación superficial de las partículas (tabla 13) (sección 3.2.1. del presente capítulo), los valores de PZ fueron negativos para formulaciones sin aditivos (similares a los obtenidos en función del polímero, tabla 10), moderadamente negativos para las partículas con lecitina, ligeramente negativos para las partículas con vitamina E y positivos para las partículas con quitosano y Eudragit[®]. Con respecto a estos últimos, los valores de PZ fueron los esperados debido a la naturaleza policationica del quitosano (grupos amino primarios) y del Eudragit[®] RS (grupos metil-amonio).

Comparando las partículas cargadas con CB13 y no cargadas, la presencia del fármaco no influyó en los valores de PZ de manera significativa. Esto es indicativo de una dispersión uniforme del CB13 en el interior de las nanopartículas, es decir, que el fármaco está principalmente encapsulado y no adsorbido sobre la superficie (Dillen y cols., 2006).

Es conocido que una carga superficial alta (ya sea negativa o positiva) es indicativa de una elevada estabilidad de un sistema coloidal en medio acuoso, debido a la repulsión entre las partículas cargadas del mismo signo. Además, las cargadas positivamente ofrecen unas propiedades de mucoadhesión más favorables, lo que sugeriría una posible mejora en la biodisponibilidad de un fármaco. Al mismo tiempo, estas mismas nanopartículas cargadas positivamente parecen permitir un mayor grado de internalización celular, como resultado de las

interacciones iónicas que se establecen entre las partículas con carga positiva y la carga negativa de las membranas de las células. Por otra parte, las nanopartículas cargadas positivamente parecen ser capaces de escapar de lisosomas después de ser internalizadas (Danhier y cols., 2012). Por lo tanto, y en función de los resultados obtenidos, las partículas modificadas superficialmente con quitosano y Eudragit® constituyen, *a priori*, las más adecuadas para considerar la administración oral del CB13.

3.3. Determinación del contenido en CB13

La capacidad de las nanopartículas para incorporar un fármaco es un parámetro importante debido a que un alto contenido en principio activo implica menor cantidad de partículas para alcanzar la dosis necesaria en el tratamiento. En la tabla 14 se muestran la carga de fármaco (% p/p) y la eficacia de encapsulación (EE %) para los sistemas elaborados en función del tipo de polímero empleado y la cantidad inicial de CB13.

Polímero (R: Resomer®)	C _{CB13} (% p/p)	EE ± D.E. (%)	Carga CB13 ± D.E. (% p/p)
R502	6	89.61 ± 0.25	5.37 ± 1.12
	10	82.26 ± 3.73	8.22 ± 6.69
	13	71.04 ± 2.33	9.39 ± 0.31
	20	70.75 ± 4.84	16.26 ± 0.97
R502H	6	80.74 ± 2.95	4.84 ± 1.12
	10	77.094 ± 3.01	6.71 ± 2.30
	13	72.03 ± 3.45	9.36 ± 3.65
	20	67.709 ± 1.98	15.64 ± 3.01
R504	6	75.44 ± 2.79	4.53 ± 1.10
R504H	6	71.53 ± 3.06	4.29 ± 2.24
R752S	6	83.21 ± 1.57	4.99 ± 3.05

Tabla 14. Eficacia de encapsulación (% EE) y carga del fármaco (% p/p) obtenidos en función del polímero utilizado y de la carga inicial de CB13 (n=6).

En términos de EE (%), se obtienen valores altos para todas las formulaciones preparadas debido a la baja solubilidad del CB13 en la fase externa acuosa (Homar y cols., 2007). Panyam y cols., 2004 demostraron que cuando se encapsulan principios activos hidrofóbicos, el contenido en fármaco de las partículas está estrechamente relacionado con las características de hidrofobia de la matriz polimérica formada durante el proceso de nanoprecipitación. Es decir, polímeros hidrófobos encapsularían fármacos hidrófobos más eficientemente. La hidrofobia del PLGA está directamente relacionada con el contenido en ácido láctico e inversamente relacionada con el peso molecular del mismo. Por otro lado, la presencia de grupos carboxilo terminales libres en el polímero (502H y 504H) confiere cierta hidrofilia a la matriz formada.

En base a estas premisas, las partículas elaboradas con Resomer[®] 502 mostraron los valores más altos de contenido en fármaco debido a su mayor hidrofobia (grupos terminales esterificados) y menor peso molecular. Inversamente, las partículas elaboradas con Resomer[®] 504H, mostraron los valores más bajos de contenido debido a un peso molecular más alto y la presencia de grupos carboxilo terminales libres (mayor hidrofilia). Finalmente, las nanopartículas elaboradas con Resomer[®] 752S, mostraron valores de EE (%) similares a los obtenidos con Resomer[®] 502, donde los efectos del peso molecular y contenido en ácido láctico (mayor peso molecular y mayor contenido en láctico que R502) fueron equilibrados.

En relación a la cantidad inicial de CB13 (6, 10, 13 ó 20 % p/p), la EE (%) disminuye cuando aumenta la concentración inicial de CB13, en las formulaciones elaboradas con Resomer[®] 502 y 502H. Esto significa que hay una cantidad máxima de fármaco que puede ser atrapado en la matriz de polímero en estado disperso, es decir, hay un límite de miscibilidad del fármaco en el polímero (Budhian y cols., 2007). El resto de fármaco que no se incorpora a la matriz puede migrar a la fase acuosa externa. Como ha indicado Panyam y cols., (2004) si el tensioactivo utilizado para estabilizar la emulsión está presente en una concentración mayor que su concentración micelar crítica, las micelas de tensioactivo pueden atrapar el fármaco, resultando en una disminución en la EE (%). En el presente estudio, la concentración de tensioactivo utilizado, Pluronic[®] F68 (0.06 mM), fue ligeramente superior a su concentración micelar crítica (0.04 mM), lo que puede explicar la disminución en la eficacia de encapsulación en relación a la cantidad inicial de CB13.

En relación con la carga de CB13 (% p/p), los resultados indican que parece aumentar con la cantidad inicial de fármaco empleado. Varios estudios han demostrado que la carga de fármaco puede ser mejorada por un aumento en la cantidad inicial de fármaco. Sin embargo, la EE (%) no aumenta necesariamente con una mayor cantidad inicial de fármaco. Una vez que se alcanza la capacidad de carga máxima de las nanopartículas, un aumento en la cantidad inicial del fármaco puede, incluso, disminuirla (Judefeind y de Villiers, 2009).

Por último, se estudiaron los parámetros de % p/p y EE (%) para las partículas modificadas superficialmente (tabla 15 y figura 22). De manera global y en función de los resultados obtenidos, puede

deducirse que el proceso de encapsulación fue reproducible y eficiente con rendimientos por encima del 70 %.

Muestra	EE \pm D.E. (%)	Carga CB13 \pm D.E. (% p/p)
PLGA	71.04 \pm 2.33	9.23 \pm 0.31
Lec(5 %)-PLGA	83.48 \pm 4.59	10.85 \pm 4.12
Lec(10 %)-PLGA	80.85 \pm 1.98	10.48 \pm 0.25
Eu(75 %)-PLGA	84.37 \pm 0.86	10.97 \pm 1.24
Eu(50 %)-PLGA	85.45 \pm 3.09	10.79 \pm 0.39
Eu(25 %)-PLGA	80.02 \pm 3.45	10.40 \pm 2.15
CS-PLGA	71.59 \pm 0.87	9.31 \pm 0.11
VitE(5 %)-PLGA	75.55 \pm 1.23	9.82 \pm 0.48
VitE(10 %)-PLGA	77.78 \pm 2.82	10.02 \pm 0.29

Tabla 15. Eficacia de encapsulación (% EE) y carga del fármaco (% p/p) obtenidos para las nanopartículas de PLGA sin modificar y de superficie modificada, cargadas con CB13 (13 % p/p) (polímero usado: R502) (n=3).

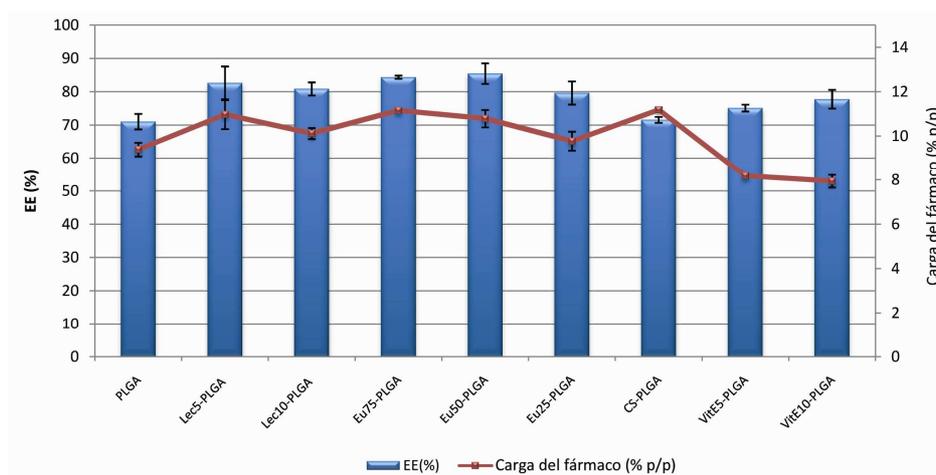


Figura 22. Representación gráfica de la eficacia de encapsulación (% EE) y carga del fármaco (% p/p), en función del aditivo empleado para el recubrimiento superficial de las nanopartículas de PLGA cargadas con CB13 (13 % p/p) (polímero usado: R502) (n=3).

Cuando se estudió la influencia de los aditivos y las concentraciones empleadas para cada uno de ellos, el análisis factorial de varianza realizado mostró un efecto significativo del tipo de aditivo utilizado ($F(4, 2) = 36.619, p < 0.001$) y la concentración usada ($F(2, 2) = 6.013, p < 0.001$). Las diferencias en los valores de la varianza en las formulaciones estudiadas se detectaron mediante la prueba de Levene de homogeneidad de varianzas. Además, el *post hoc* de Student-Newman-Keuls (SNK), llevada a cabo cuando la prueba de ANOVA factorial es significativa, se realizó para identificar grupos significativamente diferentes. Estos procedimientos de comparación por parejas, que cotejan más de un par de medios al mismo tiempo, mostró ligeras diferencias significativas ($p < 0.05$) en el parámetro EE (%), configurando los siguientes subgrupos: i) PLGA sin modificar y CS, ii) vitamina E y iii) lecitina y Eudragit[®].

En relación con las partículas no modificadas y con quitosano, los valores de EE (%) fueron similares. Este hecho podría ser debido a la metodología de producción: el quitosano se añadió en una etapa adicional, tras la formación de las partículas, y no en la solución de polímero inicial. Por lo tanto, la adición de quitosano mediante un método de incubación final parece no tener influencia sobre los valores de EE (%).

Por el contrario, y tomando como referencia las partículas no modificadas, la EE (%) aumentó cuando se utilizaron el resto de los aditivos. Estos incrementos pueden ser causados por diferentes mecanismos.

En relación a la lecitina y la vitamina E, el aumento en la EE (%) puede explicarse debido a sus naturalezas lipófilas y a sus

características tensioactivas. La lecitina (Epikuron[®] 200) y la vitamina E presentan valores de HLB de 7 y 6, respectivamente (datos obtenidos de sus fichas técnicas), por lo que la presencia de ambas sustancias, junto al Span[®] 60 en el medio orgánico, podría mejorar la solubilidad del fármaco en dicho medio, frenando así su salida al medio acuoso. Por otro lado, el Eudragit[®] RS presenta una permeabilidad acuosa muy baja, siendo capaz de reducir la migración del fármaco a la fase acuosa. El polímero acrílico reduce la permeabilidad de la superficie de las nanopartículas, aumentando el contenido en fármaco.

En relación a la concentración empleada para los diferentes aditivos, también se detectó una interacción significativa ($F(2, 72) = 9.185, p < 0.001$), lo que indica una influencia significativa en la eficacia de encapsulación dependiendo de la concentración del aditivo empleado. A título de ejemplo, en el caso del Eudragit[®], se observó un aumento en dicho parámetro (5.63 %) causado por el incremento de la concentración de aditivo.

En función de los resultados obtenidos hasta el momento, se seleccionaron las formulaciones elaboradas con la mayor concentración de aditivos con el fin de continuar los estudios posteriores.

3.4. Determinación del contenido residual de Pluronic[®] F68

Uno de los inconvenientes de la utilización de la nanoprecipitación como método de elaboración de nanopartículas es la posible detección de cantidades residuales del tensioactivo empleado sobre la superficie de las partículas.

Esta detección puede realizarse por varios métodos. Uno de los más usados es un método colorimétrico desarrollado por Childs (1975). Este método colorimétrico se basa en la formación de un complejo coloreado entre dos grupos hidroxilo de Pluronic[®] F68, Ba²⁺ y una molécula de yodo, el cual se puede cuantificar por espectrofotometría a 540 nm.

En el presente trabajo, la determinación de las cantidades residuales de Pluronic[®] F68 se llevó a cabo por espectroscopia ¹H-RMN (Trimaille y cols., 2003). En las figuras 23 y 24 se muestran los espectros de ¹H-RMN correspondientes a CB13, Pluronic[®] F68, Resomer[®] 502 y de las nanopartículas cargadas y no cargadas con CB13.

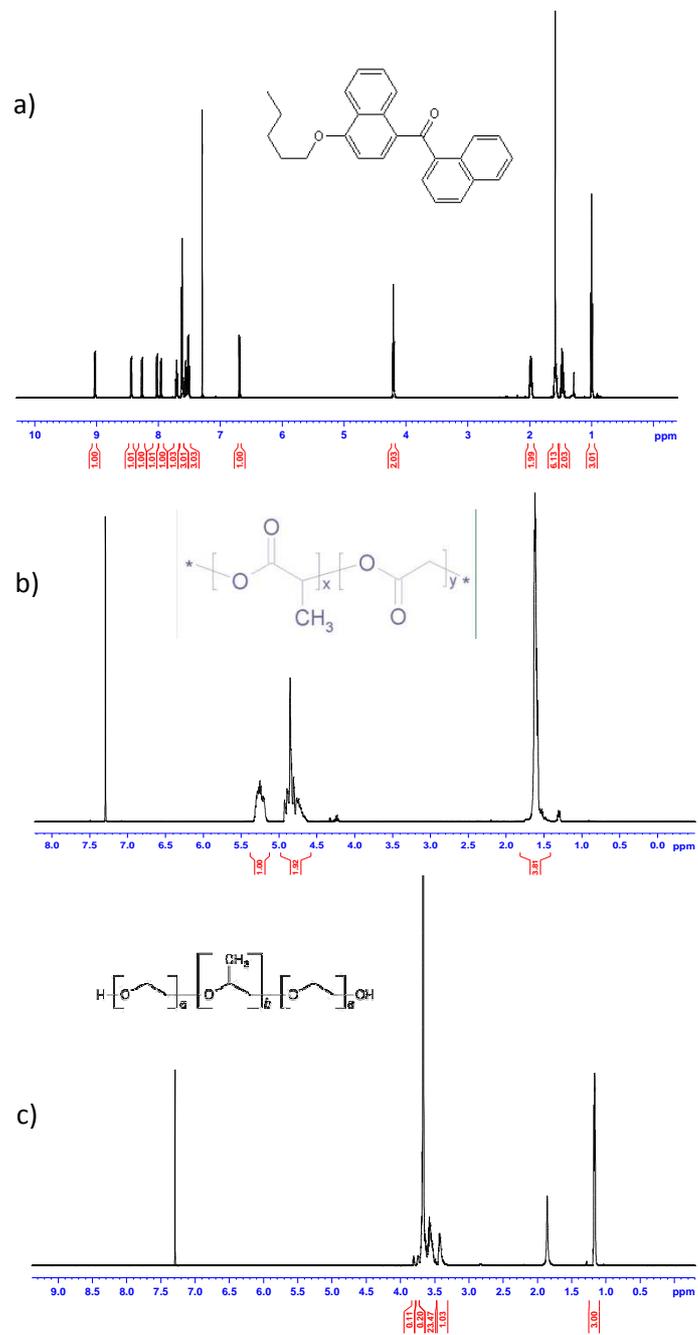


Figura 23. Espectros de ^1H -RMN obtenidos para: a) CB13; b) PLGA Resomer[®] 502 y c) Pluronic[®] F68.

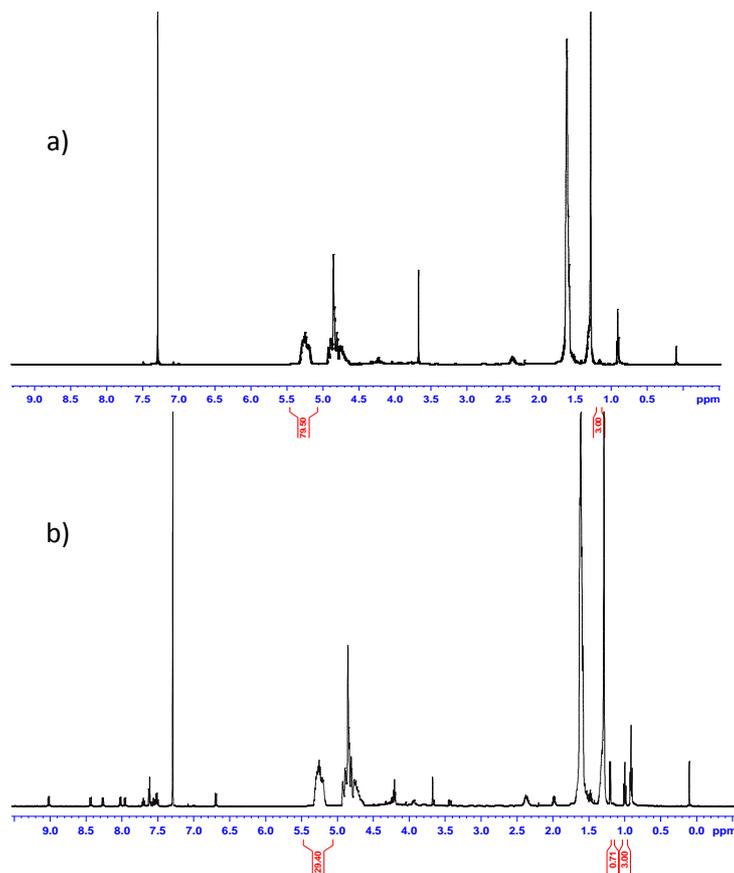


Figura 24. Espectros de ¹H-RMN obtenidos para a) nanopartículas de PLGA sin fármaco y b) nanopartículas de PLGA cargadas con CB13 (20 % p/p).

Para realizar los espectros de las partículas, éstas tras elaborarse, se centrifugaron (Centrifuga Eppendorf 504R; Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) y liofilizaron ($- 80 \pm 0.5$ °C, y 0.057 mbar; Cryodos-50; Telstar Industrial S.L, Terrassa, España). A continuación, el sólido obtenido se disolvió en CDCl_3 para el análisis de ¹H-RMN. La cantidad residual de Pluronic[®] F68 que se adsorbe en las partículas se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación (Trimaille y cols., 2003):

$$N (mg / g) = \left(\frac{M_{PF68} I_{PF68(\delta=1.17)} / 87}{M_{PLGA} I_{PLGA(\delta=5.35-5.15)}} \right) \times 1000$$

en la que I_{PLGA} es el pico integral de los grupos CH- del ácido láctico del Resomer[®] 502 ($\delta = 5.35-5.15$ ppm) correspondiente a 1 protón; I_{PF68} es el pico integral de los grupos -CH₃ del óxido de polietileno del Pluronic[®] F68 ($\delta = 1.17$ ppm) correspondiente a 87 protones; M_{PLGA} es el peso molecular del PLGA (130 g/mol) y M_{PF68} es el peso molecular del Pluronic[®] F68 (8350 g/mol). En la tabla 16 se muestran los resultados obtenidos para tres formulaciones diferentes:

Muestras	I_{PLGA}	N (mg/g)
PLGA	2637.2	12.175
Eu-PLGA	2305.4	13.930
CS-PLGA	3592.5	8.940

Tabla 16. Contenido residual de Pluronic[®] F68 adsorbido en varias formulaciones, obtenidos tras el análisis de ¹H-RMN.

Además, se realizaron espectros de ¹H-RMN para cuantificar el CB13 presente en las partículas siguiendo la siguiente ecuación. Los resultados se expresaron como Q (% p/p) y se muestran en la tabla 17:

$$Q (\%) = \left(\frac{M_{CB13} I_{CB13(\delta=1.2)} / 3}{M_{PLGA} I_{PLGA(\delta=5.2)}} \right) \times 100$$

Donde, M_{CB13} es el peso molecular de CB13 (368.47 g/mol); M_{PLGA} es el peso molecular del PLGA (130 g/mol); I_{CB13} es el pico integral de los grupos -CH₃ ($\delta = 1.2$ ppm) correspondientes a 3 protones e I_{PLGA} es el pico integral de los grupos CH- del ácido láctico del Resomer[®] 502 ($\delta = 5.35-5.15$ ppm) correspondiente a 1 protón. Los resultados obtenidos siguiendo esta metodología fueron similares a los obtenidos por HPLC

para la cuantificación del CB13 en las nanopartículas de PLGA (tabla 14).

Polímero (R: Resomer [®])	C inicial CB13 (% p/p)	I _{PLGA}	Q (% p/p)
R502	6	4936.62	6.9
	20	247.4	14.9

Tabla 17. Carga del CB13 (% p/p) obtenida para las nanopartículas de PLGA, mediante análisis de ¹H-NMR.

3.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En este apartado se estudió el estado físico de los sistemas desarrollados, así como de sus componentes por separado (Ma y cols., 2010). El estado físico del fármaco dentro de las nanopartículas puede ser un factor crítico en la liberación *in vitro* e *in vivo*. La figura 25 muestra los termogramas correspondientes al CB13, nanopartículas cargadas con CB13 y nanopartículas sin carga. También se realizaron los termogramas del PLGA y del Pluronic[®] F68.

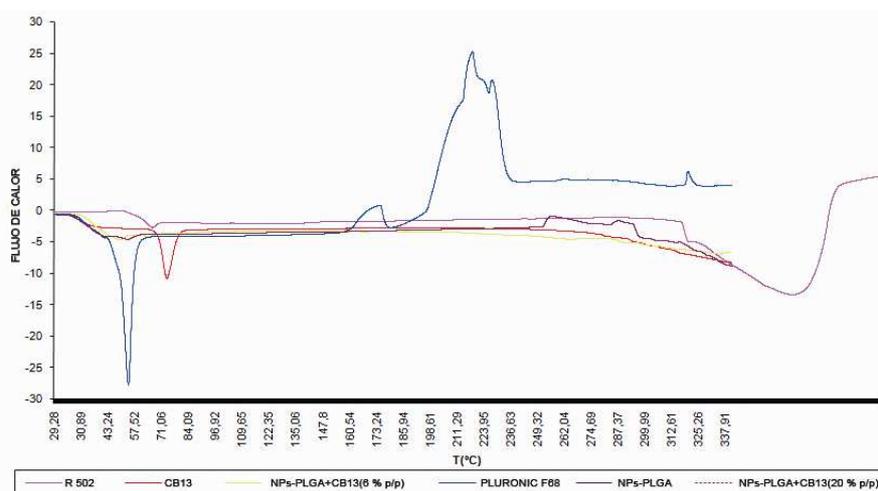


Figura 25. Termogramas correspondientes a Resomer[®] 502, CB13 libre, Pluronic[®] F68 y nanopartículas de PLGA sin carga y cargadas con CB13 (6 y 20 % p/p), obtenidos mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC).

La temperatura del pico correspondiente a la fusión del CB13 apareció a los 69.55 °C ($\Delta H=64.651$ J/g). Resomer[®] 502 y Pluronic[®] F68 presentaron picos endotérmicos (correspondientes a temperaturas de transición vítrea, Tg) a 45.90 °C y 53.07 °C, respectivamente.

Con respecto a las formulaciones estudiadas, no se detectó pico de fusión del fármaco ni de Pluronic[®] F68. Por lo tanto, se puede concluir que en el interior de las nanopartículas, el fármaco se encuentra en estado amorfo o como solución sólida (Musumeci y cols., 2006; Sanna y cols., 2011).

3.6. Estudio de estabilidad

Para una mejor comprensión de los perfiles de liberación *in vitro*, se estudió la estabilidad de las nanopartículas en diferentes medios de incubación a 37 °C. Igualmente, se llevaron a cabo estudios de estabilidad a 4 °C, para determinar las condiciones óptimas de almacenamiento. La figura 26 muestra la distribución de tamaño de las nanopartículas de PLGA, a diferentes tiempos ($t = 0$ y $t = 6$ h), en agua Milli-Q, PBS, y DMEM a 4 ó 37 °C.

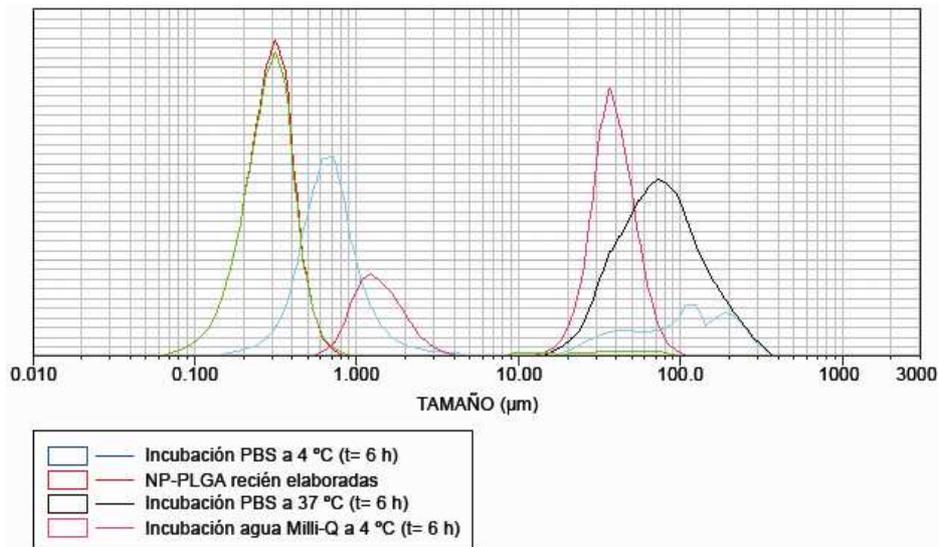


Figura 26. *Tamaño y distribución de tamaños obtenidos antes y después de la incubación en diferentes medios de incubación.*

Como referencia, la línea roja (y verde) indica el tamaño de partícula inicial de las nanopartículas ($300 \pm 102 \text{ nm}$; $t = 0$ horas). Después de la incubación en PBS a 37 °C durante 6 horas (línea negra), el tamaño medio de partícula aumentó hasta alcanzar 100 μm de diámetro. En PBS a 4 °C durante 6 horas (línea azul), se obtuvo una distribución de tamaños bimodal, con una pequeña fracción en torno a las 100 μm de diámetro y una fracción mayoritaria alrededor de los 700 nm de diámetro. Estos resultados señalan una degradación más lenta de las nanopartículas en PBS a 4 °C frente a 37 °C. Sin embargo, realizando un estudio comparativo con la estabilidad en agua Milli-Q a 4 °C, el resultado obtenido es exactamente el contrario. Se obtuvo una distribución de tamaños bimodal, con una pequeña fracción alrededor de 1 μm . Por último, los resultados obtenidos en la distribución de tamaños de las partículas incubadas en DMEM fueron similares a los obtenidos en PBS (resultados no mostrados).

3.7. Optimización del proceso de liofilización

Con el fin de determinar la concentración óptima del crioprotector, se realizó un estudio para evaluar la integridad de las nanopartículas después del proceso de congelación en nitrógeno líquido y de la liofilización ($- 80 \pm 0.5$ °C, y 0.057 mbar; Cryodos -50; Telstar Industrial S.L, Tarrasa, España), en diferentes condiciones experimentales.

Los crioprotectores son moléculas pequeñas, altamente hidroxiladas, tales como monosacáridos o alcoholes de bajo peso molecular, que se pueden añadir a la suspensión de las nanopartículas antes de la congelación-liofilización para preservar la integridad morfológica de un material durante la liofilización.

Por lo tanto, en este estudio se investigó la concentración óptima de tres crioprotectores, propilenglicol, trealosa y manitol. Las concentraciones de los agentes crioprotectores variaron de 0 a 50 % p/p, disolviendo el agente directamente en la suspensión de partículas, inmediatamente antes de la liofilización. Se evaluó el tamaño de las partículas después del proceso de congelación-liofilización midiendo el diámetro medio de partícula y la distribución de tamaños.

La suspensión de nanopartículas sin crioprotectores forma geles pegajosos durante la liofilización (figura 27). Estos geles liofilizados no se pudieron resuspender en agua Milli-Q, PBS o DMEM bajo ninguna condición (incluyendo agitación ultrasónica).

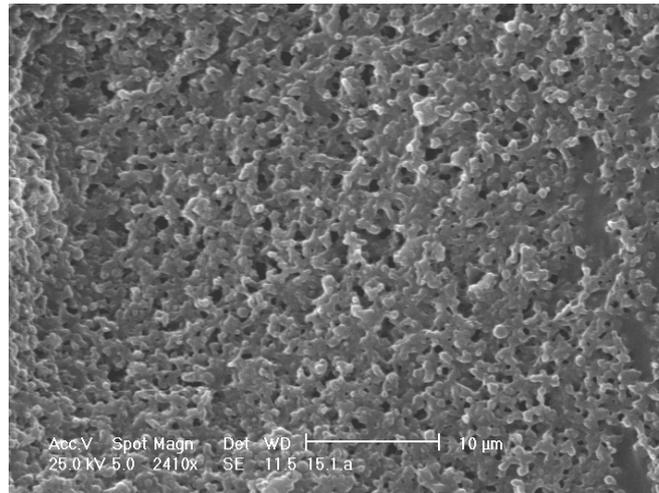


Figura 27. Microfotografía SEM de nanopartículas de PLGA tras su liofilización sin la adición de crioprotectores.

En la tabla 18 se muestra el efecto de la adición del crioprotector en el tamaño medio y distribución de tamaños de las partículas elaboradas. Con respecto al manitol, los resultados obtenidos sugieren que no se alcanzó la concentración óptima del crioprotector y el diámetro de las partículas fue disminuyendo al aumentar la concentración del mismo. En el caso del propilenglicol, se determinó que la concentración óptima a añadir en relación a las nanopartículas fue del 10 % p/p, ya que el tamaño medio y la distribución de tamaños obtenidos de las partículas tratadas con este crioprotector alcanzaron valores similares al diámetro de partícula inicial. Por último, en el caso de la trealosa, la concentración de 5 % p/p en relación a las nanopartículas fue suficiente para mantener el tamaño de partícula inicial.

Muestra	Tamaño \pm D.E (nm)
Antes liofilización	327,47 \pm 64.84
Liofilización sin crioprotector	56837.53 \pm 948.37
Propilenglicol 5 % p/p	758.85 \pm 347.38
Propilenglicol 10 % p/p	394.49 \pm 113.49
Propilenglicol 50 % p/p	319.38 \pm 103.98
Manitol 5 % p/p	48592.39 \pm 847.48
Manitol 10 % p/p	8593.57 \pm 209.48
Manitol 50 % p/p	3958.67 \pm 128.39
Trealosa 5 % p/p	328.84 \pm 127.48
Trealosa 10 % p/p	394.48 \pm 173.49
Trealosa 50 % p/p	399.38 \pm 138.11

Tabla 18. Valores de tamaño \pm D.E. (nm) de nanopartículas de PLGA antes de liofilizar, tras liofilizar sin crioprotector y tras la adición de crioprotectores: propilenglicol, manitol y trealosa en concentraciones de 5, 10 y 50 % p/p con respecto a las nanopartículas de PLGA (polímero usado: R502) (n=3).

A título de ejemplo, la figura 28 muestra varios histogramas de los tamaños y distribución de tamaños obtenidos en las nanopartículas de PLGA antes de liofilizar, tras liofilizar sin crioprotector y tras la adición de crioprotectores para su liofilización.

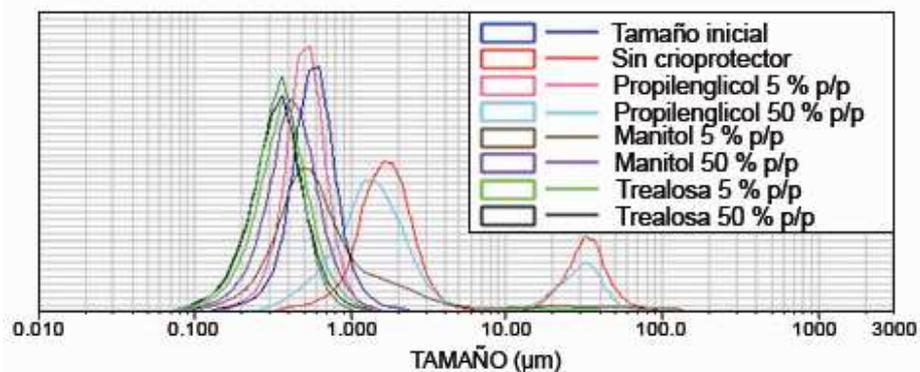


Figura 28. Efecto de la adición de crioprotectores en el tamaño y distribución de tamaños de nanopartículas de PLGA.

3.8. Estudio de liberación *in vitro*

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

En la figura 29 se representan los perfiles de liberación del CB13 en función del tipo de polímero utilizado en la elaboración de las partículas. Como es de esperar, existe una relación inversa entre la velocidad de liberación del fármaco y el tamaño de las partículas. Berkland y cols., (2003) verificaron que las microesferas más grandes se degradan más rápidamente que las pequeñas, debido, probablemente, a una mayor acumulación de productos ácidos por la hidrólisis del polímero. La hidrólisis que ocurre en los sistemas elaborados a base de PLGA (escisión de enlaces éster y posterior disminución del peso molecular) se inicia inmediatamente tras el contacto con el medio acuoso, formándose moléculas ácidas que catalizan la hidrólisis. Este proceso autocatalítico causa una degradación más rápida en el centro de la matriz del sistema que en la superficie y se hace más acentuado en sistemas de mayor tamaño (Fredenberg y cols., 2011).

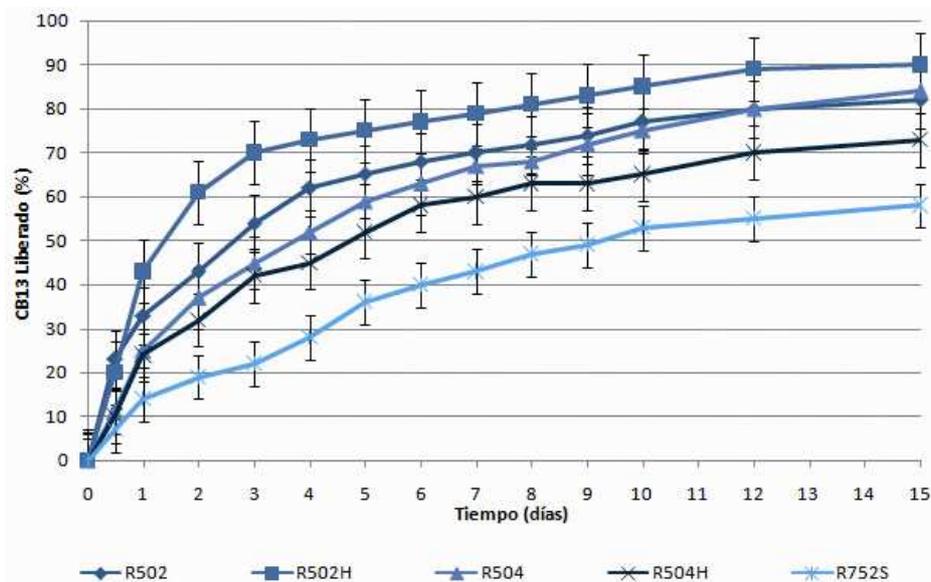


Figura 29. Perfiles de liberación *in vitro* de nanopartículas de PLGA, utilizando diferentes tipos de Resomer® y con 20 % (p/p) de contenido teórico del fármaco

Por otra parte, un menor peso molecular y un menor contenido en ácido láctico del polímero se traduce en un sistema menos hidrófobo y, por lo tanto, con una mayor capacidad de absorción de agua, aumentando así, su hidrólisis y erosión. El ácido láctico es más hidrófobo que el ácido glicólico y, por lo tanto, el copolímero de PLGA se hace más hidrófobo al aumentar su contenido en ácido láctico (Zilberman y Grinberg, 2008). De este modo, la liberación del CB13 fue más rápida en las partículas elaboradas con Resomer® 502 (láctico:glicólico 50:50) en comparación con aquellas elaboradas con Resomer® 752 (láctico:glicólico 75:25).

Además, la liberación del fármaco puede ser, obviamente, afectada por las interacciones hidrófobas entre el fármaco y el polímero. Dichas interacciones así como su impacto sobre los perfiles de liberación del

principio activo han sido objeto de estudios pormenorizados (Gaspar y cols., 1998; Budhian y cols., 2007; Holgado y cols., 2009).

Consecuentemente, la tasa de liberación más lenta del CB13 vehiculizado en nanopartículas de PLGA se obtuvo con Resomer[®] 752 y podría ser atribuida a una mayor interacción hidrofóbica entre el fármaco y este copolímero específico. Así, mediante el aumento de la hidrofobicidad del polímero, es posible reducir la liberación inicial y extender el periodo de liberación del fármaco.

Finalmente, la temperatura de transición vítrea de los polímeros Resomer[®] se reduce al disminuir el contenido en ácido láctico. Por esta razón, el Resomer[®] RG 502 interacciona débilmente con el fármaco y, por lo tanto, su liberación es más rápida (Yeo y Park, 2004; Arpagaus y Schafroth, 2011).

Por otro lado, se estudiaron los efectos de los aditivos empleados en la modificación superficial de las partículas sobre los perfiles de liberación *in vitro* (figura 30). En general, todas las formulaciones mostraron una liberación prolongada, no observándose la aparición del efecto "burst", a excepción de aquellas formulaciones que contenían lecitina.

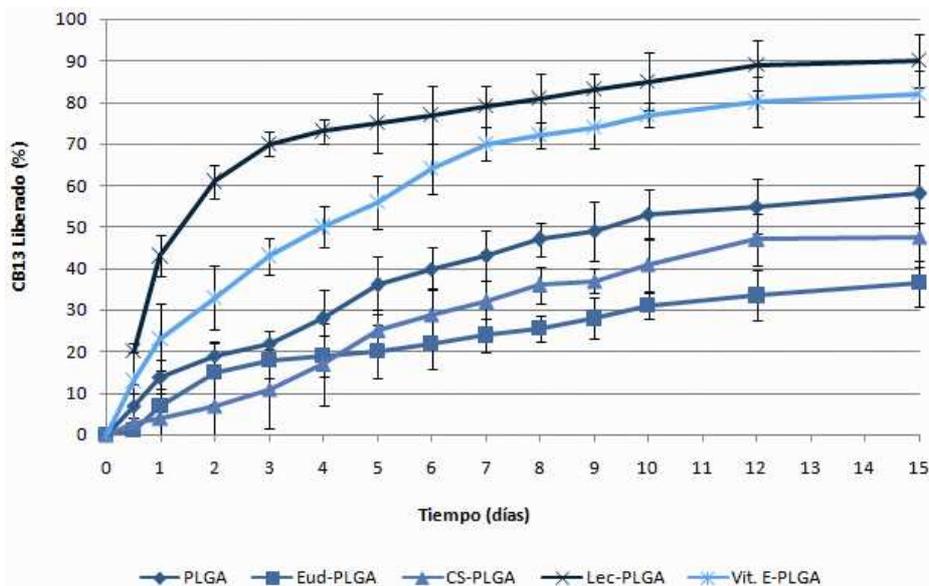


Figura 30. Perfiles de liberación in vitro de nanopartículas de PLGA (polímero utilizado: R502) modificadas superficialmente utilizando diferentes aditivos (Lec: lecitina; VitE: vitamina E; CS: quitosano; Eud: Eudragit® RS; PLGA: sin modificar) y con 13 % (p/p) de contenido teórico de fármaco

Tomando como referencia las nanopartículas no modificadas, aquéllas modificadas con lecitina y vitamina E mostraron perfiles de liberación más rápidos, mientras que las modificadas con quitosano y Eudragit® RS mostraron perfiles de liberación más lentos.

La tasa de liberación de fármaco más rápida obtenida con lecitina y vitamina E (~ 90 %) puede atribuirse a una mayor absorción de agua por parte de los sistemas, debido al mayor carácter hidrófilo de estas formulaciones en comparación con las no modificadas (Chen y cols., 2011). Por esta razón, el copolímero se hincha y se degrada más rápido, permitiendo una mayor difusión del medio acuoso en la matriz. El resultado final es una disolución del fármaco más rápida cuando se emplean estos aditivos. Shi y cols., (2009) obtuvieron resultados

similares tras el estudio de micropartículas de PLGA conteniendo gentamicina y recubiertas con lecitina.

Por otro lado, las nanopartículas modificadas con quitosano y Eudragit[®] RS mostraron una liberación de fármaco considerablemente más lenta y no completa (< 60 %) durante los 15 días que duró el ensayo de liberación. Por lo que respecta al quitosano, el perfil de liberación obtenido puede ser explicado en base a la metodología de producción (incubación) que originaría una capa de quitosano sobre la superficie de las nanopartículas que actuaría como una barrera adicional para la difusión del fármaco (Parveen y Sahoo, 2001). Las nanopartículas modificadas superficialmente con Eudragit[®] RS mostraron la tasa de liberación más lenta. En este caso, el proceso de elaboración dio lugar a la formación de una matriz escasamente permeable que impidió la entrada de agua, actuando como una barrera a la difusión del fármaco.

Finalmente, los perfiles de liberación *in vitro* se ajustaron a diversos modelos cinéticos. Los artículos publicados sobre la liberación de fármacos a partir de nanopartículas de PLGA modificadas superficialmente (Bozkir y Saka, 2005; Dillen y cols., 2006; Chakravarthi y Robinson, 2011) señalan que, en la mayoría de los casos, la cinética que mejor ajusta los perfiles de liberación fue el modelo de Higuchi. Sin embargo, la degradación lenta y gradual de las partículas también juega un papel importante en el comportamiento de liberación, tal como se ha explicado anteriormente. La mezcla de PLGA con diferentes sustancias permite obtener materiales con diferentes balances hidrófilo/hidrófobo que pueden modular la velocidad de erosión de la matriz.

En el presente estudio, y tras ajustar los perfiles a distintas cinéticas de liberación, se obtuvo una correlación lineal cuando se representó el porcentaje de fármaco liberado frente a la raíz cuadrada del tiempo (cinética de Higuchi), lo cual indicó que el principal mecanismo de liberación fue por difusión (Lec, $R^2=0.9916$; VitE, $R^2=0.9942$; sin modificar, $R^2=0.9851$; CS, $R^2=0.9707$; Eu, $R^2=0.9600$).

3.9. Propiedades mucoadhesivas *ex vivo*

Las propiedades mucoadhesivas de las nanopartículas elaboradas se investigaron usando la técnica descrita previamente por Belgamwar y cols., 2009 y Gradauer y cols., 2012 (véase la figura 16).

Los resultados correspondientes a las partículas sin modificar y modificadas con quitosano y Eudragit[®] RS se muestran en la figura 31. Para las partículas modificadas con lecitina y vitamina E se obtuvieron resultados similares a las no modificadas (no mostrados), debido a los valores negativos de PZ obtenidos para estas formulaciones.

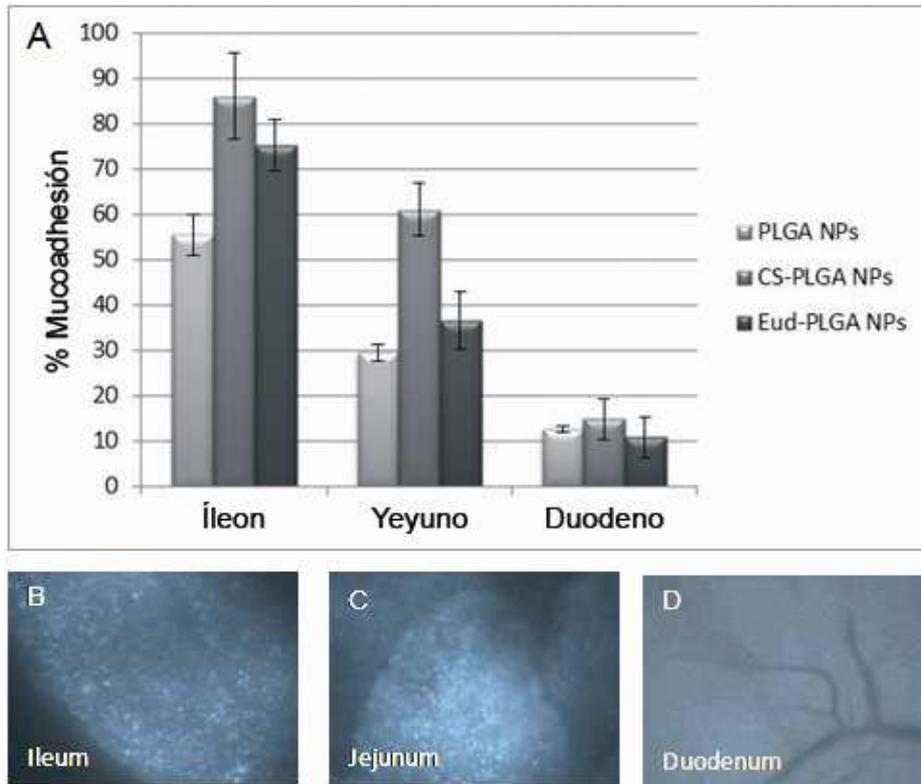


Figura 31. A) Valores de % de mucoadhesión de nanopartículas de PLGA sin modificar y con superficie modificada; Fotografías tomadas con un microscopio de fluorescencia (Leica DFC425C; Leica Microsystems, Barcelona, España) para nanopartículas de PLGA recubiertas con quitosano en el íleon (B), yeyuno (C) y duodeno (D).

En función de los resultados obtenidos, se observa una clara mejora en el porcentaje de mucoadhesión para partículas modificadas con quitosano y Eudragit® RS en comparación con las no modificadas. Los valores positivos de PZ que se observan en estas formulaciones podrían contribuir a una mejora en la mucoadhesión, debido a las interacciones iónicas entre las partículas cargadas positivamente y los componentes de la capa de mucosa cargados negativamente (grupos de ácido siálico) (Karn y cols., 2011; Gradauer y cols., 2012). Además,

se observó menor porcentaje de mucoadhesión en la parte superior del intestino delgado (duodeno) que en los segmentos posteriores del intestino (íleon). Esta diferencia puede atribuirse al hecho de que las células mucosas caliciformes (secretoras de moco) aumentan en número desde el duodeno hasta el íleon. Por lo tanto, el íleon es considerado, generalmente, como el sitio diana específico para la captación celular de estos nanosistemas (Zhang y cols., 2012).

Los resultados presentados en la figura 31 confirman la posibilidad de utilizar nanopartículas modificadas superficialmente con polímeros mucoadhesivos como una estrategia tecnológica prometedora en la administración oral de diferentes moléculas. Sin embargo, no hay que olvidar que las condiciones *in vivo* no se correlacionan directamente con los resultados obtenidos *in vitro*, debido a que en el entorno *in vivo* están presentes otros factores importantes como la motilidad gastrointestinal y los movimientos peristálticos.

En función de los resultados experimentales obtenidos hasta el momento con respecto a la eficacia de encapsulación y a las propiedades de mucoadhesión, se eligieron las nanopartículas modificadas con quitosano y Eudragit[®] RS para continuar con la realización de los siguientes ensayos.

3.10. Estudios en líneas celulares

3.10.1. Viabilidad celular *in vitro*

A pesar de que los cannabinoides presentan un perfil de seguridad favorable, es imprescindible realizar la evaluación toxicológica de las nanopartículas. Para este propósito, se llevó a cabo un ensayo MTT tal

y como se ha descrito en el correspondiente apartado de Materiales y Métodos.

En este ensayo, se emplearon células Caco-2, células humanas epiteliales de adenocarcinoma de colon (Alhamoruni y cols., 2010), como modelo de permeabilidad gastrointestinal. Es importante mencionar que los cannabinoides han demostrado inducir la inhibición del crecimiento celular y la inducción de apoptosis en células tumorales (Gustafsson y cols., 2009), aunque esta inhibición depende de las dosis de cannabinoides administradas (Ligresti y cols., 2003; Hart y cols., 2004; López-Rodríguez y cols., 2005; Sarne y cols., 2011).

En el presente trabajo, se evaluó la viabilidad celular *in vitro* de las formulaciones modificadas superficialmente con concentraciones de fármaco en el intervalo 0.03-30 μM y administrando un peso de nanopartículas entre 0.04 y 4 μg . Como control positivo se utilizó DMSO, que ha demostrado ser tóxico para la concentración ensayada y así, validar el ensayo. Los resultados obtenidos se resumen en la figura 32.

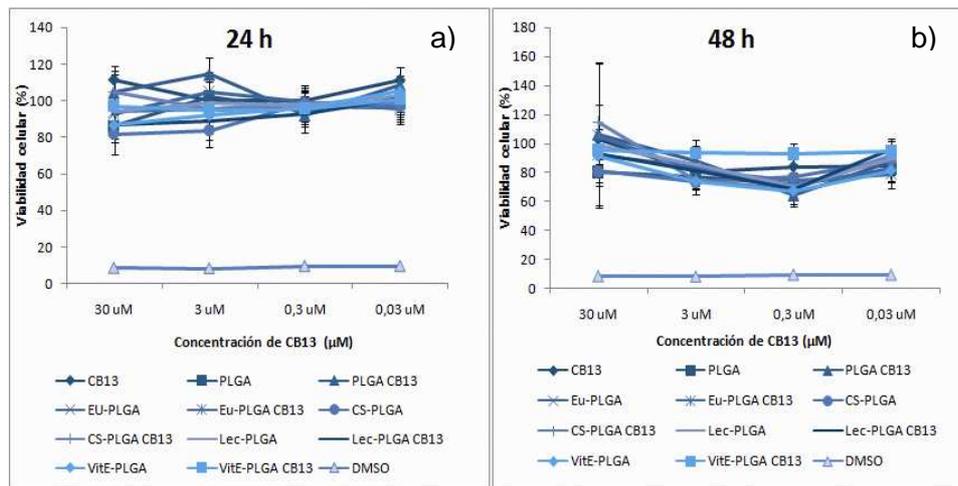


Figura 32. Viabilidad celular en células Caco-2 tras la incubación de nanopartículas de PLGA sin modificar y modificadas superficialmente, blancas y cargadas con CB13 a diferentes concentraciones. a) 24 horas y b) 48 horas.

Después de 24 h de incubación con las nanopartículas, la viabilidad de las células Caco-2 fue de alrededor de 100 % para todas las concentraciones ensayadas. Después de 48 h de incubación, se observó un comportamiento diferente: los resultados correspondientes a 3 y 0.3 μM en CB13 mostraron una disminución en la viabilidad de las células, debido probablemente, al efecto antitumoral demostrado de los compuestos cannabinoides (Ligresti y cols., 2003; Gustafsson y cols., 2009).

3.10.2. Estudios de captación celular *in vitro*

Los efectos terapéuticos de las nanopartículas como sistemas transportadores de fármacos dependen en gran medida de su internalización y retención en las células deseadas. Aunque los procesos biológicos *in vitro* e *in vivo* pueden ser diferentes, tal y como se ha mencionado anteriormente, los ensayos *in vitro* pueden proporcionar algunas evidencias preliminares que muestren las

ventajas de estas formulaciones. En el presente estudio, se utilizaron células Caco-2 para simular el tejido del tracto gastrointestinal y evaluar la captación de partículas por parte de dichas células.

Concretamente, se evaluó la captación celular de nanopartículas fluorescentes sin modificar y modificadas superficialmente con quitosano y Eudragit[®] RS, ya que las nanopartículas modificadas con estos dos agentes mostraron resultados óptimos en relación a la eficacia de encapsulación y a las propiedades de mucoadhesión (Danhier y cols., 2009; Rajapaksa y cols., 2010).

Las figuras 33 y 34 muestran los resultados obtenidos mediante citometría de flujo (estudio cuantitativo) y CLSM (estudio cualitativo).

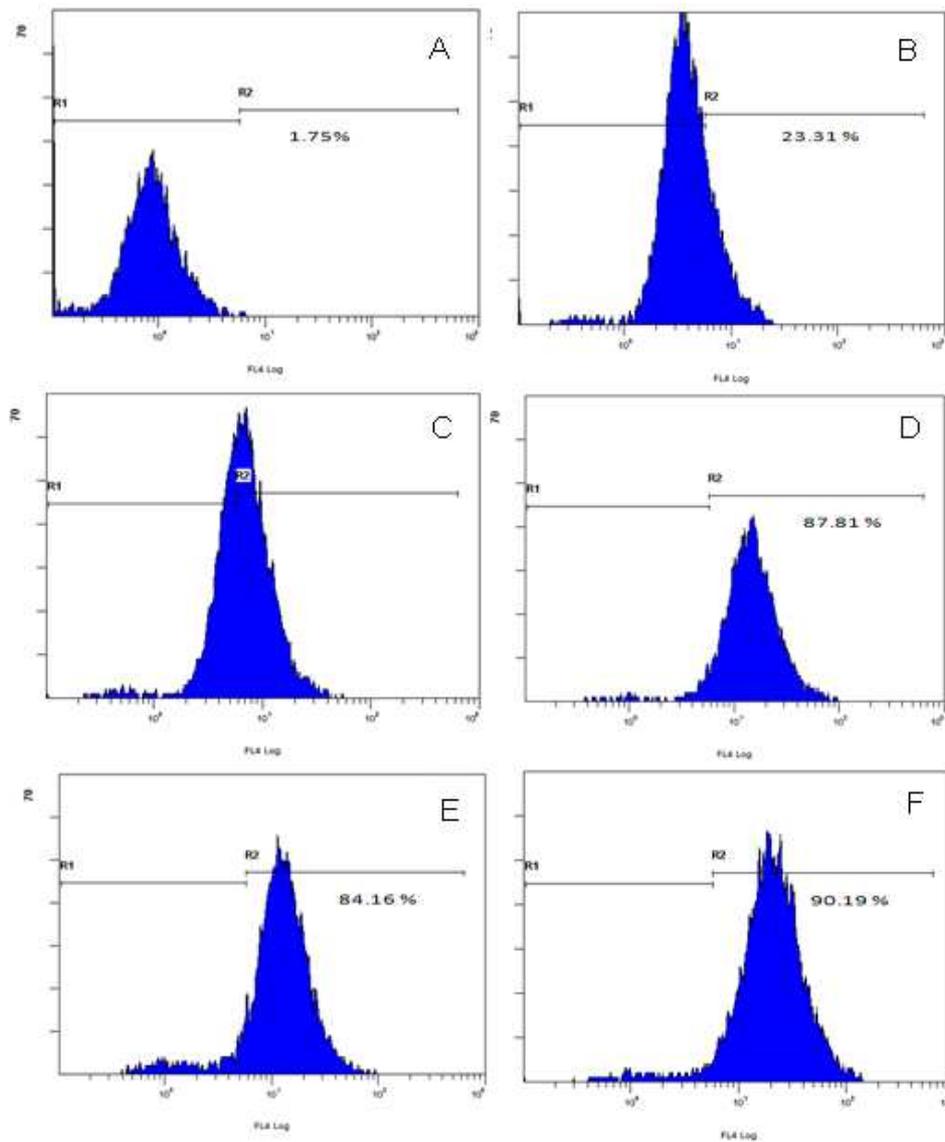


Figura 33. Histogramas de la fluorescencia obtenida en las células Caco-2 tras la incubación de: (A) nanopartículas fluorescentes de PLGA, $t = 30$ min y (B) $t = 120$ min; (C) nanopartículas fluorescentes de PLGA recubiertas con Eudragit® RS, $t = 30$ min y (D) $t = 120$ min; (E) nanopartículas fluorescentes de PLGA recubiertas con quitosano, $t = 30$ min y (F) $t = 120$ min.

Para el análisis por citometría de flujo, las células Caco-2 se incubaron durante 30 y 120 min con 200 μ L de una suspensión de nanopartículas fluorescentes y no fluorescentes empleadas como control (4 mg/mL). Como se puede observar en la figura 33, la intensidad de fluorescencia aumentaba con el tiempo de incubación en todos los casos, alcanzándose la intensidad más alta para la formulación modificada con quitosano. En este caso, no se observaron diferencias significativas después de 120 minutos de incubación, lo que indica que el proceso de captación celular se llevó a cabo en los primeros minutos. Este comportamiento ha sido descrito anteriormente y se basa en la hipótesis de que las propiedades mucoadhesivas del quitosano promueven la internalización de las nanopartículas en las células. Como se explicó anteriormente, estas propiedades bioadhesivas se deben a la atracción entre las cargas superficiales positivas de estas partículas y las cargas negativas de la mucosa que recubre el epitelio intestinal (Chakravarthi y Robinson, 2011; Tahara y cols., 2011).

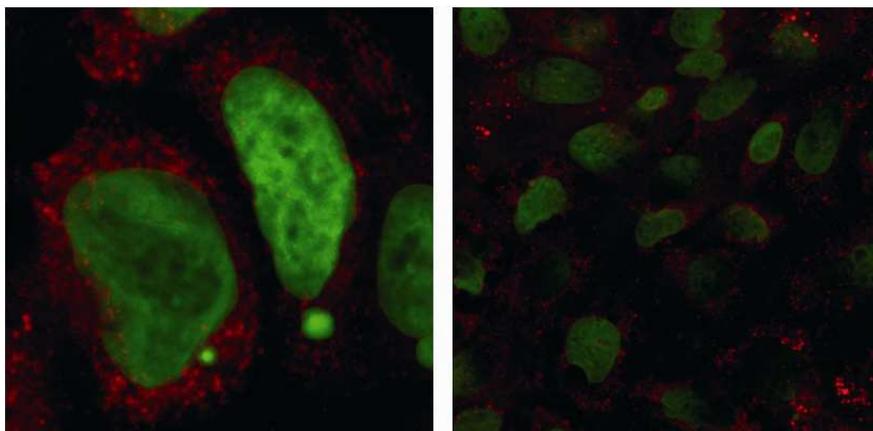


Figura 34. Imágenes obtenidas por CLSM de células Caco-2 tras la incubación de nanopartículas de PLGA modificadas con quitosano y cargadas con Nile-Red (tiempo de incubación= 2 horas).

Como ejemplo de estudio cualitativo, la figura 34 muestra las imágenes obtenidas por CLSM después de 2 h de incubación con partículas modificadas con quitosano y cargadas con Nile-Red como fluorocromo. Estos resultados confirmaron la adsorción de las partículas a la superficie celular de las Caco-2 e, incluso, su internalización celular y nuclear, tal y como ha sido descrito anteriormente por otros autores (des Rieux y cols., 2006).

A modo de resumen, se puede afirmar que el aumento en la captación celular de las partículas modificadas con quitosano por parte de las Caco-2 puede atribuirse a las fuertes interacciones electrostáticas entre la superficie de las nanopartículas cargadas positivamente y la membrana celular, cargada negativamente, lo que permite una mayor bioadhesión de estos sistemas y, por tanto, una significativa captación celular.

3.11. Prueba de concepto: Evaluación *in vivo* del dolor neuropático

Por último, se ha incluido en este capítulo, a modo de prueba de concepto, resultados preliminares obtenidos en ratas con constricción crónica del nervio ciático (modelo animal de dolor neuropático). Las nanopartículas, en forma de suspensión, fueron administradas vía oral a los animales una semana después de la cirugía para asegurar la creación del modelo.

Para evaluar la analgesia ante nocicepción del CB13 libre y encapsulado en las nanopartículas de PLGA, los animales se sometieron al test de presión de la pata o *paw pressure test* (modelo de dolor agudo), cuyo objetivo es determinar una latencia de respuesta del animal (tiempo que tarda el animal en retirar la pata) a un estímulo físico, fuerza de presión creciente aplicada en la pata posterior.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 35. Como se observa, el fármaco libre alcanzó su máximo a las 3 h, a partir de este tiempo la curva comienza a disminuir indicando una menor analgesia en los tiempos siguientes. En el caso de las nanopartículas cargadas con CB13, éstas mantuvieron la analgesia durante 48 h de forma controlada y sostenida. La gráfica indica además que el efecto analgésico pudiera ser aún más prolongado con estos nanosistemas.

Tanto el vehículo utilizado para disolver el CB13, DMSO, como las partículas blancas, no mostraron analgesia alguna.

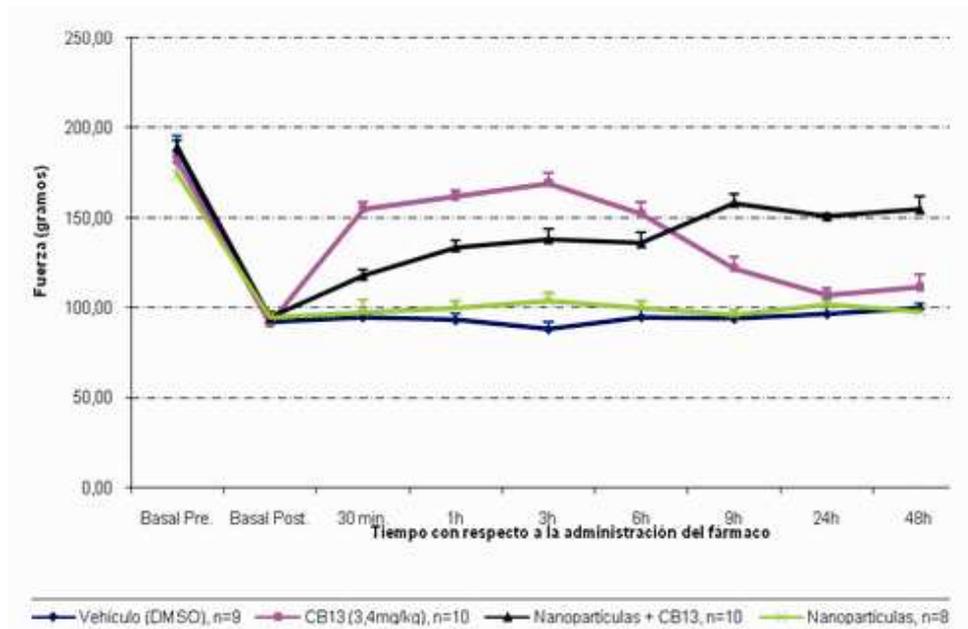


Figura 35. Efecto antinociceptivo de CB13 libre y encapsulado en nanopartículas de PLGA tras el test rat paw-pressure.

CAPÍTULO III

**ELABORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA PARA LA
ADMINISTRACIÓN ORAL DEL CANNABINOIDE NATURAL Δ 9-THC.
EVALUACIÓN *IN VITRO* DE SU ACTIVIDAD ANTITUMORAL.**

1. INTRODUCCIÓN

Los fármacos cannabinoides poseen propiedades que los hacen potencialmente útiles en el tratamiento del cáncer. Podrían usarse (y de hecho se utilizan en determinados países) como agentes paliativos, ya que son capaces de aliviar determinados efectos secundarios asociados a la quimioterapia (náuseas y pérdida de apetito, fundamentalmente). Además, estos compuestos tienen propiedades analgésicas, ansiolíticas y antidepresivas, lo que permiten combatir otros aspectos negativos asociados al cáncer (dolor oncológico, estados anímicos alterados). Por otro lado, los cannabinoides, además, pueden ofrecer como aplicación potencial, su uso como medicamentos antitumorales en base a la capacidad de algunos miembros de esta clase de compuestos para limitar la proliferación celular e inducir la muerte celular del tumor selectivo. Se han descrito estudios que muestran que los cannabinoides sintéticos pueden tener efectos favorables sobre el tumor *in vivo*, debido a sus propiedades inmunosupresoras, principalmente por sus efectos inhibitorios sobre el crecimiento tumoral y por efectos sobre la angiogénesis, metástasis y la inflamación (Guzman, 2003; Pisanti y cols., 2009 Velasco y cols., 2012).

El Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), principal componente activo de la marihuana, ha demostrado una actividad antitumoral (Galve-Roperh y cols., 2000; Piomelli, 2000) en estudios *in vitro* e *in vivo*. Galve-Roperh y cols. 2000, describieron que la administración intratumoral del THC inducía la apoptosis de células cancerígenas cultivadas *in vitro*, así como también una regresión considerable de los gliomas malignos en ratas Wistar y en ratones RAG-2 deficientes.

Sin embargo, a pesar del prometedor potencial clínico de los cannabinoides, el desarrollo de una formulación eficaz todavía es un reto. Aunque se han desarrollado varias formulaciones con THC que han sido aprobadas por la autoridades sanitarias, actualmente sólo tres se aplican en clínica (Marinol[®], Cesamet[®] y Sativex[®]) y, concretamente, Marinol[®] y Cesamet[®], se utilizan como agentes paliativos de los síntomas inducidos por la quimioterapia en pacientes con cáncer.

Las principales causas del lento progreso en el desarrollo de nuevos sistemas de administración de fármacos cannabinoides se debe a que éstos presentan: (i) alta inestabilidad, (ii) naturaleza altamente lipófila, (iii) baja solubilidad acuosa y (iv) baja biodisponibilidad (Brownjohn y Ashton, 2012).

Por esta razón, el desarrollo de un sistema nanométrico para la administración oral de cannabinoides se presenta como una alternativa novedosa frente a otros sistemas. Las partículas elaboradas con el polímero ácido poli-(D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA) han sido estudiadas ampliamente como sistemas de administración de fármacos. Sin embargo, debido a los inconvenientes mostrados para su administración oral (ligera carga negativa o incapacidad de evitar la opsonización), se han desarrollado una serie de estrategias para escapar de este mecanismo de aclaramiento y, por tanto, para mejorar la biodistribución *in vivo* de las nanopartículas de PLGA.

Por lo tanto, el objetivo de este capítulo es mostrar la capacidad de las nanopartículas de PLGA conteniendo un activo lipófilo, el Δ^9 -THC, de mejorar su internalización a través de la membrana apical de células de la mucosa intestinal y presentar esta estrategia como una alternativa efectiva para su administración oral.

Para ello, se ha llevado a cabo la elaboración, caracterización y una profunda evaluación *in vitro* de diferentes sistemas de nanopartículas de PLGA con superficie modificada y cargadas con THC. Entre otros ensayos, se han estudiado sus principales características fisicoquímicas, su perfil de liberación *in vitro*, la captación celular en cultivos celulares, la adsorción de proteínas en su superficie y su compatibilidad con la sangre. Por último, se ha llevado a cabo un estudio de la viabilidad celular en células cancerosas y no cancerosas de pulmón, tras la incubación del THC libre y de las nanopartículas cargadas con el fármaco, con el fin de demostrar la actividad y selectividad antitumoral del THC vehiculizado en nanopartículas de PLGA.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

Para la elaboración de este estudio se utilizaron los siguientes compuestos y reactivos: el cannabinoide Delta-9-tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC o THC) proporcionado por Tocris Cookson Ltd. (Bristol, Reino Unido); ácido poli-(D,L-láctico-co-glicólico), (PLGA 50:50), copolímero del ácido láctico y ácido glicólico, concretamente Resomer[®] 502 y 502H (peso molecular: 12000 Da; viscosidad inherente 0.24 y 0.19 dl/g, respectivamente), obtenidos de Boehringer-Ingelheim GmbH (Ingelheim, Alemania).

Para la modificación superficial de las partículas se utilizó quitosano (CS) de bajo peso molecular, obtenido de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) y polietilenglicol (PEG) (peso molecular 20 kDa) adquirido en Serva Feinbiochemica GmbH&Co. (Heidelberg, Alemania).

Los tensioactivos utilizados, Span[®] 60, Tween[®] 80 y Pluronic[®] F-68 y el fluorocromo Nile-Red (rojo de nilo) fueron obtenidos en Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). El glicerol se adquirió en Acofarma Distribución S.A. (Barcelona, España). La Vitamina E fue proporcionada por BASF ChemTrade GmbH (Burgbernheim, Alemania). Los disolventes utilizados, acetona PRS, acetonitrilo, metanol, DMSO grado HPLC y ácido acético fueron adquiridos en Panreac Química (Barcelona, España). La trealosa fue obtenida de VWR International Eurolab S.L. (Barcelona, España).

El agua usada en todos los experimentos fue desionizada y filtrada (Milli-Q Academic, Millipore, Molsheim, Francia). Como medio de

liberación se utilizaron 500 mL de buffer de fosfatos pH 7.4 obtenido de Biochemica AppliChem (Darmstadt, Alemania).

En los estudios de hemocompatibilidad se utilizaron, además, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), citrato de sodio, Triton[®] X-100, oxalato de amonio, el anticuerpo monoclonal específico para C3a desArg humano y el Anti C3a de conejo conjugado con peroxidasa, todos ellos obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

Para los experimentos en líneas celulares, se utilizaron células humanas de adenocarcinoma de colon (Caco-2), obtenidas de ECACC, número 86010202 (Salisbury, Reino Unido). El medio de cultivo Medio Esencial Mínimo (MEM con solución salina equilibrada de Earle (EBSS) sin L-glutamina), piruvato sódico, MEM con aminoácidos no esenciales, L-Glutamina y suero fetal bovino se obtuvieron de PAA Laboratories (Pasching, Austria). El antibiótico gentamicina se obtuvo de Gibco[®], Life Technologies Corporation (Nueva York, USA). La Tripsina / EDTA, MTT (bromuro de tetrazolio), SDS (dodecil sulfato de sodio), PFA (paraformaldehído) y Hoechst 33258 se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

Las células humanas tipo fibroblastos de pulmón fetal (MRC-5) y las células humanas de adenocarcinoma de pulmón (A549) también se obtuvieron de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC; Salisbury, Reino Unido). En este caso, se utilizó el medio de cultivo esencial Dubelcco modificado (DMEM alta concentración de glucosa, con L-glutamina, rojo de fenol y sin piruvato), y los antibióticos penicilina y estreptomina, que se obtuvieron de PAA Laboratories (Pasching, Austria).

2.2. Método RP-HPLC: Desarrollo y validación del método analítico

Para cuantificar de forma exacta y precisa el fármaco en cada una de las formulaciones realizadas, se puso a punto y se validó un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Esta técnica resulta especialmente útil para separar y cuantificar el principio activo inalterado presente en la formulación de sus productos de degradación y de los demás componentes de la misma (polímero, posibles restos de tensioactivos, aditivos utilizados en la modificación superficial, etc.).

Tras una extensa recopilación bibliográfica de cuantificación de cannabinoides por HPLC (Vollner y cols., 1986; De Backer y cols., 2009; Munjal y cols., 2006a; Munjal y cols., 2006b; Thumma y cols., 2008; Álvarez-Fuentes y cols., 2012) y de fármacos hidrófobos (Holgado y cols., 2009) y siguiendo los parámetros de validación descritos en las guías ICH (ICH-Q2B, 1996), se desarrolló un método analítico para la cuantificación del THC cargado en las nanopartículas de PLGA, adecuándolo a las condiciones óptimas de nuestro laboratorio. El método desarrollado fue útil para cuantificar el principio activo encapsulado y así, determinar la carga en fármaco de las nanopartículas de PLGA y la cantidad de fármaco liberado en los estudios de liberación *in vitro* a un tiempo determinado.

2.2.1. Equipamiento y condiciones cromatográficas

El análisis de RP-HPLC se llevó a cabo en un sistema de HPLC Hitachi LaChrom[®] serie D-7000, equipado con un inyector automático L-7200, una interfaz D-7000, una bomba cuaternaria (modelo L-7100) y un espectrofotómetro de diodos UV-vis serie L-7455. La recolección de

datos y los cálculos se llevaron a cabo mediante el uso del software HSM D-7000 LaChrom[®] de Merck-Hitachi (Darmstadt, Alemania).

Las condiciones cromatográficas fueron:

- Fase estacionaria: columna C18 Waters AtlantisT3[®] (3 μm , 4.6x100 mm, Milford, MA, USA).
- Temperatura: 25 ± 0.1 ° C en horno de columna serie L-2350, Elite LaChrom[®].
- Fase móvil: metanol/acetonitrilo/agua en proporción 52:30:18 v/v, respectivamente. El pH se ajustó a 4.5 con ácido acético. La fase móvil fue filtrada (filtros de membrana NYLAFLO[®], 0.45 μm 47 mm, VWR International Eurolab S.L., Barcelona, España) y desgasificada antes de su utilización.
- Flujo: 1.800 mL/min.
- Volumen de inyección: 20 μL
- Detector: 290 nm

2.2.2. Preparación de las soluciones estándar y de muestra

La solución estándar de THC, a una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$, se preparó disolviendo la cantidad de fármaco correspondiente en un vial comercializado de Tocris Cookson Ltd. (Bristol, Reino Unido) con el volumen de metanol necesario para obtener una concentración final de 0.05 % p/v. Se agitó vigorosamente en un vórtex hasta su completa solubilización. De esta solución así preparada se tomó 1 mL que se filtró (0.22 μm , Millex[®] GV, Millipore, Barcelona, España) y se inyectó en el equipo de HPLC.

Para la evaluación de las muestras, se pesaron con exactitud 5 mg de nanopartículas liofilizadas y se añadieron 5 mL de acetona. Las muestras se agitaron vigorosamente en un vórtex (5 min) para promover la disolución de las partículas en la fase orgánica. A continuación, se evaporó la acetona utilizando un rotavapor (Rotavapor[®] BüchiR/210, BüchiLabortechnik AG, Flawil, Suiza). Posteriormente, se añadió 1 mL de metanol a la película formada en el matraz tras la evaporación de la acetona para disolver el THC, alternando, seguidamente, sonicación y agitación en vórtex durante 5 min. A continuación, las muestras se filtraron (0.22 µm, Millex[®] GV, Millipore, Barcelona, España) y se inyectaron en el sistema de HPLC para la detección del THC.

2.2.3. Validación del método analítico

La validación de un método analítico es un procedimiento para establecer, por medio de la realización de un conjunto de pruebas analíticas, una base de datos que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. Además, nos asegura la fiabilidad de los resultados obtenidos al utilizar dicho método. Las pruebas a realizar dependerán, en cada caso, del tipo de análisis (cuantitativo, cualitativo, ensayo límite) y del objetivo del análisis.

A pesar de la existencia de numerosas publicaciones y guías, la mayoría de analistas utilizan las metodologías propuestas por la Farmacopea Americana (USP) o por la *International Conference on Harmonization* (ICH).

En este caso, se llevó a cabo la validación del método por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), de acuerdo con la International Conference on Harmonization (ICH) (ICH-Q2B, 1996), utilizando los siguientes parámetros analíticos: linealidad, precisión, exactitud, especificidad, límites de detección y cuantificación y robustez. El intervalo de concentraciones de THC para el cual se validó el método fue de 250-750 µg/mL.

2.2.3.1. Selectividad/especificidad

Este parámetro se relaciona con el grado en que otras sustancias interfieren en la identificación y en la capacidad del método analítico para identificar/cuantificar el analito en presencia de otras sustancias, endógenas o exógenas, en la muestra. El método analítico debe medir la concentración exacta de analito sin interferencias de impurezas, productos de degradación, excipientes o compuestos relacionados.

En este trabajo, la selectividad del método se evaluó en tres muestras diferentes (solución de placebo, que consiste en una solución que contiene todos los componentes de la formulación en las mismas cantidades y condiciones, a excepción del analito que se analiza; la solución de disolvente y una solución estándar de THC (500 µg/mL). Con este ensayo se pretende demostrar que no hay picos en los tiempos de retención correspondientes al analito, con lo que no existe ningún componente de la formulación que interfiera en el espectro de absorción del analito estudiado.

Por otra parte, se llevaron a cabo estudios de degradación, donde una serie de soluciones estándar del cannabinoide fueron sometidas a diferentes grados de estrés (Lister, 2005). Teniendo en cuenta las

limitaciones del propio laboratorio y/o del fármaco en sí, las muestras se sometieron a los siguientes estudios de estrés:

- Calor: una solución estándar de THC fue sometida a 60 °C durante 24 horas en un horno.
- Luz UV: la solución estándar se expuso a una lámpara UV (200-300 nm) durante 24 horas.
- Degradación ácida o básica: el THC no se disuelve en soluciones acuosas ácidas o básicas, de modo que, en primer lugar se solubilizó en su solvente habitual (metanol) y, a continuación, se acidificó o alcalinizó con una pequeña cantidad de ácido o base (HCl 1N o NaOH 1N, respectivamente), incubándose esta mezcla durante 5 horas. Más tarde, las soluciones se neutralizaron con soluciones de base o ácido, según procedieran, completando hasta un volumen final con metanol, e incubándolas de nuevo hasta completar las 24 horas.
- Oxidación: similar procedimiento al anterior, con la diferencia de la utilización de H₂O₂ para la incubación durante las 5 primeras horas.

Después de la prueba de estrés, las muestras se analizaron por HPLC tal como se muestra en el apartado de condiciones cromatográficas.

2.2.3.2. Precisión

La precisión es una medida del grado de concordancia entre las medidas realizadas empleando un método analítico y trabajando en condiciones normales de operación. Se expresa normalmente como porcentaje de desviación estándar relativa (D.E.R.). De acuerdo con las

guías de validación (ICH-Q2B, 1996; ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005), la precisión debe evaluarse a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

La repetibilidad es una medida del grado de concordancia de una serie de medidas realizadas en un espacio corto de tiempo (en un mismo día). La precisión intermedia es una medida de la dispersión de los resultados obtenidos por un método analítico en un espacio de tiempo más amplio que la repetibilidad, modificando ciertas condiciones de operación. Por último, la reproducibilidad expresa la precisión entre laboratorios, formando parte de los estudios interlaboratorio.

En nuestro estudio se evaluó la precisión de la siguiente manera (ICH-Q2B, 1996):

- Precisión instrumental: la solución estándar de THC se inyecta seis veces consecutivas, calculándose su desviación estándar y su desviación estándar relativa (D.E.R.).
- Reproducibilidad: este parámetro se determinó mediante el uso de los resultados obtenidos para la prueba de exactitud (nivel bajo 50 %, nivel medio 100 % y nivel alto 150 %). Se calculó la desviación estándar y la desviación estándar relativa (D.E.R.).
- Precisión intermedia: se evaluó mediante el análisis de una misma muestra por diferentes analistas en dos días diferentes.

2.2.3.3. Exactitud

La exactitud determina la proximidad entre los resultados obtenidos experimentales y los resultados reales (aceptados como verdaderos), y se evaluó mediante la determinación del porcentaje o factor de

recuperación de una cantidad conocida de THC (ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005).

Concretamente, se tomaron los niveles de concentración del analito de 50%, 75%, 100%, 125% y 150%, para las cuales, a una determinada cantidad de solución placebo se añadió una cantidad conocida de la sustancia activa para obtener concentraciones de fármaco de 250, 375, 500, 625 y 750 µg/mL, respectivamente. Se calculó la cantidad de THC recuperada en relación con la cantidad agregada (porcentaje de recuperación) (ICH-Q2B, 1996).

2.2.3.4. Linealidad

La linealidad de un procedimiento analítico se define como su capacidad (dentro del intervalo de concentraciones estudiadas) para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración de analito de la muestra, con un mínimo de 5 concentraciones (ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005).

Este estudio debe demostrar que los puntos de la representación gráfica señal-respuesta deben ajustarse a una recta, que la pendiente es significativamente distinta de cero y que la ordenada en el origen no es significativamente distinta de cero. En caso de que la ordenada en el origen tenga un valor significativo se debe demostrar que este sesgo no afecta a la exactitud del método.

La linealidad, se evaluó, en primera instancia, mediante la inspección visual de las rectas obtenidas y, posteriormente, se evaluaron los resultados mediante tratamientos estadísticos. Para evaluar estadísticamente la linealidad se siguieron dos criterios: coeficiente de correlación lineal, considerándose lineal si $R^2 > 0.999$; y desviación estándar relativa de la pendiente inferior al 5 %.

La linealidad fue calculada mediante la evaluación de la linealidad del sistema y la linealidad del método. Para la linealidad del sistema, se estudiaron las soluciones estándar de THC a cinco niveles de concentración, de 50% a 150%. Cada nivel de concentración se preparó por triplicado. Los resultados obtenidos se muestran mediante representación gráfica, obteniendo una curva de calibración, para, posteriormente, llevar a cabo el estudio estadístico correspondiente. Para la linealidad del método, el procedimiento fue el mismo que para la linealidad del sistema, pero la muestra fue una solución que contiene las nanopartículas de PLGA (placebo) y la adición de una cantidad creciente de THC, disuelto en el medio. Los resultados fueron tratados de la misma forma que para la linealidad del sistema.

2.2.3.5. Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)

En términos generales, el límite de detección (LOD) se define como la menor concentración o cantidad de analito que proporciona en el instrumento una señal significativamente diferente a la señal del “blanco” o “ruido de fondo”; esta concentración de analito puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada.

El límite de cuantificación (LOQ) es la menor concentración de analito que puede ser detectada y cuantificada con un nivel aceptable de precisión.

Para el cálculo de estos parámetros, se prepararon una serie de soluciones estándares de THC en concentraciones decrecientes y se inyectaron en el sistema de HPLC. Posteriormente, se representaron las concentraciones en relación con la desviación estándar relativa (D.E.R.) obtenida para cada una de las concentraciones con el fin de determinar LOD y LOQ. El primer punto que no cumple la mínima

D.E.R. requerida en la reproducibilidad del estudio (2 %), corresponde al límite de detección, y el primer punto que la cumple corresponde al LOQ (Guidelines for Collaborative Study Procedure to Validate Characteristics of a Method of Analysis, 1989).

2.2.3.6. Robustez

La robustez es la capacidad de un método para mantenerse inalterado por pequeñas variaciones deliberadas en los parámetros del método, constituyendo una medida de la fiabilidad de un método. En otras palabras, la robustez es el grado de reproducibilidad de un método analítico sometido deliberadamente a pequeñas variaciones en el *modus operandi*, con objeto de conocer su estabilidad frente a ellas y definir las de mayor influencia sobre la variabilidad de los resultados.

Para la determinación de la robustez de un método se varían deliberadamente parámetros del método tales como flujo, temperatura de columna, composición de la fase móvil, volumen de inyección, etc. y se determinan los efectos cuantitativos (si existen) de las variaciones efectuadas.

Si la influencia del parámetro está dentro de una tolerancia previamente especificada, entonces se considera que el método es robusto. Sin embargo, si las mediciones son susceptibles a las variaciones en las condiciones de análisis, las condiciones de análisis deben ser controladas adecuadamente o debe incluirse un consejo de prudencia en el procedimiento.

Los factores examinados fueron: cambio en el pH de la fase móvil (± 0.2 unidades); variación en la proporción de la fase móvil; temperatura del horno (± 2 ° C); y velocidad de flujo (± 0.1 mL/min).

El procedimiento de ajuste del pH se llevó a cabo de acuerdo con la ICH (ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005), utilizando soluciones de ácido clorhídrico e hidróxido de sodio.

2.3. Elaboración de las nanopartículas

Las nanopartículas se elaboraron por la técnica de nanoprecipitación, tal como se ha descrito en el Capítulo II.

La técnica de nanoprecipitación (o método de desplazamiento del disolvente) (Fessi y cols., 1989) es una técnica fácil y que consume poca energía, además de ser ampliamente utilizada para la fabricación de nanosistemas para la administración de fármacos hidrófobos. Se basa en la deposición interfacial, debido al desplazamiento de un disolvente de naturaleza orgánica por otro de naturaleza acuosa (no-disolvente) (Desgouilles y cols., 2003). Los requisitos esenciales para la elaboración de nanosistemas por esta técnica son la miscibilidad de los disolventes y la presencia de una solución diluida con el polímero.

La nanoprecipitación se puede elaborar por diálisis (desde una membrana) o por la técnica de goteo (figura 36). En este caso, las nanopartículas se elaboraron por la técnica del goteo, añadiendo gota a gota el solvente que contiene polímero y fármaco sobre el solvente acuoso, que se encuentra en agitación mecánica.

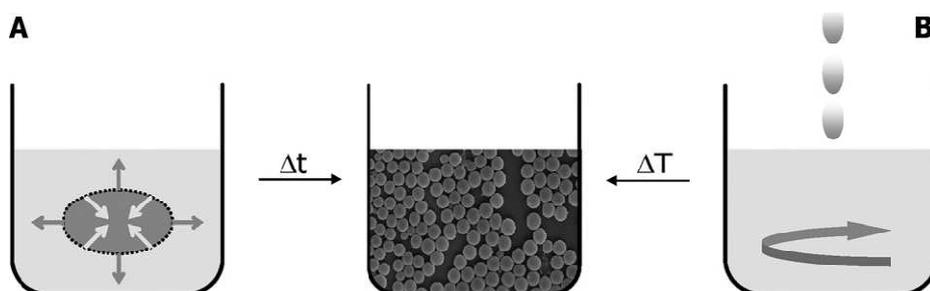


Figura 36. Representación esquemática del método de nanoprecipitación: (a) por diálisis, a través de una membrana; (b) por la técnica del goteo (Hornig y cols., 2009).

Concretamente en nuestro estudio, se co-disolvieron el polímero PLGA (a una concentración 1.5 % p/v) y Span[®] 60, como tensioactivo, en acetona. A esta solución se le añadió el activo THC a diferentes concentraciones (1.5, 3 y 5 % p/p con respecto al polímero) para formar las nanopartículas de PLGA y THC. De forma resumida, 5 mL de esta solución se añadieron gota a gota utilizando una bomba de jeringa (Harvard Apparatus Ltd; Edenbridge, Reino Unido) a una velocidad de 5 mL/h sobre 15 mL de una solución acuosa de Pluronic[®] F68 (0.5 % p/v) con agitación mecánica. A continuación, la acetona se evaporó a temperatura ambiente manteniendo la agitación durante 4 h.

Una vez evaporada la acetona, las partículas se recogieron por ultracentrifugación (10000 rpm, 15 min, 4 °C, Centrifuga Eppendorf 504R; Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania), sobre un lecho de glicerol (10 µL). Tras dos lavados con agua Mili-Q, las nanopartículas se re-suspendieron en una solución de trealosa al 5% p/v, empleada como crioprotector y se liofilizaron (congeladas en nitrógeno líquido y liofilizadas, -80.0 ± 0.5 °C, y 0.057 mbar; Cryodos -50; Telstar Industrial S.L, Tarrasa, España). Todas las formulaciones se prepararon por triplicado (n = 3).

2.4. Modificación superficial de las nanopartículas de PLGA

Al igual que en el Capítulo II, se llevó a cabo la modificación superficial de las nanopartículas de PLGA, con el objetivo de optimizar su absorción en el tracto gastrointestinal (Danhier y cols., 2012; Martín-Banderas y cols., 2013). Para ello, se ha empleado quitosano (CS) dado los buenos resultados obtenidos en el Capítulo II y, además, se ha utilizado también polietilenglicol (PEG) como modificador superficial.

Por lo tanto, la superficie de las nanopartículas de PLGA se modificó con polímeros hidrófilos (CS y PEG), con el fin de:

- (i) mejorar la captación celular de las nanopartículas, y
- (ii) minimizar el proceso de opsonización (Gref y cols., 2000; Parveen y Sahoo, 2011).

El CS se añadió en una etapa adicional, después de la formación de las nanopartículas. Para ello, dichos sistemas se incubaron durante una noche en una solución al 0.25 % p/v de CS en ácido acético al 1 % v/v y después se recogieron por centrifugación (10000 rpm, 15 min, 4 °C, Centrifuga Eppendorf 504R; Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). En el caso del PEG, las nanopartículas (modificadas previamente con CS y sin modificar) se incubaron en una solución acuosa de PEG, a una concentración de 4.5 % p/v, durante 3 horas. Posteriormente, se recogieron también por centrifugación.

2.5. Estudios de caracterización de las nanopartículas

2.5.1. Determinación del tamaño medio y distribución de tamaños

El tamaño medio y la distribución de tamaños de las diferentes formulaciones de nanopartículas se midieron a 25.0 ± 0.5 °C por

difracción láser basándose en la teoría de Mie (Partica LA-950V2; Horiba Ltd., Kyoto, Japón). Se tomó una alícuota de 1 mL de la suspensión de partículas recién preparadas y se diluyó con agua, en una celda de 12 mL. Las mediciones se llevaron a cabo bajo agitación magnética continua. Se estudiaron las influencias de: i) tipo de polímero utilizado para la elaboración de las nanopartículas; ii) carga de fármaco y iii) aditivos utilizados para la modificación superficial de las partículas.

2.5.2. Determinación de la morfología y el aspecto

Hoy en día la *Microscopia Electrónica* es una poderosa herramienta que permite la caracterización de materiales utilizando para ello un haz de electrones de alta energía que interactúa con la muestra.

La Microscopia Electrónica de Transmisión se basa en un haz de electrones que manejado a través de lentes electromagnéticas se proyecta sobre una muestra muy delgada situada en una columna de alto vacío.

El estudio de las características morfológicas de las distintas formulaciones se llevó a cabo utilizando un microscopio electrónico de transmisión (TEM) (CM-10; Philips Electronics, Amsterdam, Países Bajos).

Se tomó una muestra de partículas liofilizadas y se suspendió en agua destilada. Una gota de esta suspensión se colocó sobre una rejilla y se secó a temperatura ambiente para su posterior caracterización por TEM.

2.5.3. Determinación de la carga superficial de las nanopartículas

La carga superficial de las nanopartículas se determinó cuantificando el potencial zeta (PZ). Estas medidas de PZ se llevaron a

cabo mediante láser Doppler (Zetamaster 300; Malvern Instruments Ltd, Malvern, Reino Unido). El PZ se midió por triplicado después de lavar las nanopartículas con agua destilada a temperatura ambiente. Se estudiaron los efectos de: i) tipo de polímero utilizado para la elaboración de las nanopartículas, ii) carga de fármaco, y iii) aditivos empleados en la modificación superficial.

2.6. Determinación del contenido en THC de las nanopartículas de PLGA

Con el fin de determinar el contenido del fármaco en las nanopartículas, se empleó el método de HPLC validado previamente (véase la sección 2.2. del presente capítulo). Concretamente, se pesaron con exactitud 5 mg de nanopartículas liofilizadas y se añadieron 5 mL de acetona. Las muestras se agitaron vigorosamente en un vórtex (5 min) para promover su disolución en la fase orgánica. A continuación, se evaporó la acetona utilizando un rotavapor (BüchiR/210, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza). Posteriormente, se añadió 1 mL de metanol a la película formada en el matraz tras la evaporación de la acetona para disolver el THC. Posteriormente, se alternaron procesos de sonicación y agitación en vórtex durante 5 min. Las muestras se filtraron con filtros de jeringa de 0.22 µm de tamaño de poro (Millex[®] GV, Millipore, Barcelona, España) y se inyectaron en el sistema de HPLC. El contenido de fármaco se expresó como eficacia de encapsulación (EE %) y carga de fármaco (%), utilizando las siguientes fórmulas:

$$EE \% = \left(\frac{\text{Contenido de THC en nanopartículas}}{\text{Contenido teórico de THC en nanopartículas}} \right) \times 100$$

$$Carga\ de\ fármaco\ (\% p / p) = \left(\frac{\text{Contenido de THC en NPs}}{\text{Masa de NPs obtenida}} \right) \times 100$$

2.7. Análisis por espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia infrarroja consiste en hacer pasar una radiación IR a través de una muestra, la cual queremos analizar. Parte de la radiación infrarroja es absorbida por la muestra y parte pasa a través de ella (es transmitida por la muestra). Como consecuencia, se genera un espectro, resultante de la absorción molecular y de la transmisión emitida. Este espectro es característico de cada muestra analizada, en función de su estructura molecular. Por lo tanto, la espectroscopia infrarroja puede proporcionar una identificación (análisis cualitativo) de los materiales presentes en una muestra (Berthomieu y Hienerwadel, 2009).

En este estudio, se obtuvieron los espectros de transmisión de FTIR de diversas muestras (PLGA, PEG, CS, THC y de nanopartículas de PLGA, y modificadas con PEG y PEG-CS, todas ellas cargadas con THC) utilizando un espectrofotómetro de FTIR (JASCO FT/IR 4200; Jasco Analytical Instruments, Easton, MD, USA). Como peso de muestra se tomaron 2 mg de las partículas liofilizadas o de la materia prima en estudio.

2.8. Estudios de adsorción superficial de proteínas

La adsorción superficial de proteínas séricas a la superficie de los nanosistemas desarrollados para la administración de fármacos, ejerce una gran influencia en su captación por los fagocitos y, consecuentemente, en su eliminación del torrente sanguíneo (Thiele y cols., 2003).

En estudios previos, se ha demostrado la influencia de la carga superficial de las partículas en la adsorción de proteínas a su superficie

y, por lo tanto, en su captación y eliminación por fagocitosis (Luck y cols., 1998). Generalmente, la carga superficial se determina por el PZ de las nanopartículas. El estudio del PZ, por lo tanto, representa un método sensible y eficaz para determinar la adsorción de proteínas a la superficie de los sistemas.

Para determinar la adsorción superficial de proteínas en los sistemas desarrollados, las nanopartículas de PLGA sin modificar y modificadas, cargadas con fármaco y sin cargar, se incubaron en 1 mL de una solución de albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración de 400 µg/mL en agitación durante 2 horas a 37 °C (Thiele et al, 2003; Parveen y Sahoo, 2011). Posteriormente, las nanopartículas se centrifugaron (9500 rpm, 4 °C, 20 min, Centrifuga Eppendorf 504R; Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) para eliminar la proteína no adsorbida, y las nanopartículas se diluyeron en PBS (1:20) para analizar su carga superficial a través de los valores de PZ.

2.9. Estudio de hemocompatibilidad de las nanopartículas de PLGA

La compatibilidad de las nanopartículas con la sangre resulta decisiva si se pretende obtener un perfil terapéutico óptimo del fármaco cargado en ellas (Bender y cols., 2012; Dash y cols., 2010). Debido a su tamaño nanométrico, las nanopartículas pueden tener una baja hemocompatibilidad, causada por la alta relación superficie/volumen y el gran número de grupos reactivos en la superficie (Cenni y cols., 2008). La activación de las plaquetas, la hemólisis, los factores de coagulación, las moléculas de señalización para los leucocitos o la inducción de daño a las células endoteliales, pueden desencadenar la aparición de trombosis y de eventos hemorrágicos, hemolíticos e inflamatorios (Koziara y cols., 2005; Mayer y cols., 2009).

Consecuentemente, en este trabajo se ha llevado a cabo un estudio de la interacción de las formulaciones de nanopartículas de PLGA desarrolladas con los diferentes componentes de la sangre evaluando los posibles efectos de las nanopartículas sobre:

- lisis de eritrocitos,
- activación (y agregación) plaquetaria,
- activación del complemento y
- coagulación plasmática

Siguiendo la técnica descrita previamente por Dash y cols., 2010, las partículas se pusieron en contacto con alícuotas de muestras de sangre, para evaluar su efecto sobre los eritrocitos, en la coagulación plaquetaria y en el sistema del complemento. Como muestras de sangre se tomó la sangre de seis adultos sanos (mujeres de 30 - 42 años), con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, que se utiliza en la hemólisis y en experimentos de activación de plaquetas) o citrato de sodio (utilizado en la activación del sistema del complemento y en experimentos de tiempo de coagulación plasmática) para evitar la coagulación de la sangre durante la realización del estudio.

Se evaluó el efecto *in vitro* sobre la lisis de los eritrocitos utilizando tampón fosfato salino (PBS) como control negativo (0 % de lisis) y el tensioactivo no iónico Triton[®] X-100 (1 % p/v) como control positivo (100 % de lisis) de la hemólisis. A continuación, una muestra de sangre anticoagulada con EDTA se centrifugó (1500 rpm, 20 min, Centrifuga Eppendorf 504R; Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) para eliminar la fracción de suero. El volumen original del suero se reemplazó con 150 mM de NaCl y esta suspensión se diluyó (1:10) con 100 mM de PBS. Las nanopartículas (0.05 % p/v) se incubaron en la suspensión (100

glóbulos rojos/mL) a 37.0 ± 0.5 °C durante 2 h bajo agitación mecánica (200 rpm). Pasado este tiempo, la muestra se centrifugó (1500 rpm, 20 min, Centrifuga Eppendorf 504R; EppendorfAG, Hamburgo, Alemania) y se evaluó la liberación de la hemoglobina por espectrofotometría UV del sobrenadante (545 nm). El método utilizado por espectrofotometría UV fue previamente validado (exactitud, precisión y linealidad) (Espectrofotómetro UV-Visible Agilent 8453, Agilent Technologies Inc., Santa Clara CA, Estados Unidos). La hemólisis (%) se determinó según la fórmula:

$$\text{Hemólisis (\%)} = \left(\frac{(A_{\text{Muestra}} - A_{\text{Control}})}{A_{\text{control positivo}}} \right) \times 100$$

Donde, A_{control} es la absorbancia del PBS, $A_{\text{control positivo}}$ es la absorbancia del Triton[®] X-100 y A_{muestra} , la absorbancia obtenida en la muestra analizada.

Además, se analizó la activación (y agregación) plaquetaria tras la incubación de las nanopartículas en la sangre, ya que podría conducir a complicaciones trombóticas. Se cuantificó por el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Kit ELISA p-selectina; Sigma-Aldrich, St Louis, USA) en función de la liberación de la P-selectina soluble (SP-selectina) tras la incubación con las partículas en la sangre. Para ello, las muestras de sangre se centrifugaron (1000 rpm, 20 min, Centrifuga Eppendorf 504R; Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania), reservándose el sobrenadante (rico en plaquetas). A continuación, la sangre volvió a centrifugarse y el sobrenadante se combinó con el anterior, obteniendo plasma rico en plaquetas (PRP). El plasma pobre en plaquetas (PPP) se obtuvo por centrifugación de la sangre restante (3000 rpm, 10 min, Centrifuga Eppendorf 504R;

Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). Seguidamente, el PRP se diluyó 1:100 con oxalato de amonio al 1 % p/v, ajustándose a una concentración final de plaquetas (≈ 108 plaquetas/mL). Las nanopartículas (50 mg) se incubaron en 100 mL de PRP durante 1 h a 37.0 ± 0.5 °C. Una vez completado el tiempo de incubación, el sobrenadante se centrifugó (5000 rpm, 10 min, Centrifuga Eppendorf 504R; Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). Tanto PPP y PRP fueron utilizados como control positivo y PBS como control negativo.

Por otro lado, la activación del complemento puede producir anafilotoxinas y en consecuencia, la activación del sistema inmune. El sistema reticuloendotelial (RES) depura la sangre de antígenos que han sido opsonizados por el sistema del complemento (es decir, C3a y C5a). Por lo tanto, se determinó la activación del complemento mediante la cuantificación de C3a tras la incubación de las nanopartículas con agregados del plasma sanguíneo (obtenidos por centrifugación de la sangre). Para ello, se tomaron los mismos volúmenes de plasma y de una suspensión de las nanopartículas en solución salina y se incubaron durante 1 h a 37.0 ± 0.5 °C. Pasado el tiempo de incubación, las muestras se diluyeron apropiadamente y se incubaron en una placa de microtitulación (Grace Bio-Labs FlexPlate MP™, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) revestida con un anticuerpo monoclonal específico para C3a desArg humano (1 h, 25.0 ± 0.5 °C). Posteriormente, las placas se lavaron y se incubaron (20 min) con anti-C3a de conejo conjugado con peroxidasa para detectar el C3a unido (tras añadir un sustrato cromogénico). Se midió la absorbancia UV (450 nm) utilizando PBS como control negativo.

Por último, se evaluó la coagulación plasmática de la sangre tras la incubación de las nanopartículas. El proceso de coagulación plasmática

se basa en las vías intrínseca y extrínseca, que conducen a la formación de coágulos. La intrínseca se inicia cuando la sangre entra en contacto con una superficie "extraña", es decir, diferente al endotelio vascular, mientras que la extrínseca se inicia cuando la sangre se pone en contacto con tejidos lesionados, conduciendo a la exposición del factor tisular (TF).

Para imitar el sistema de coagulación intrínseca se evalúan los perfiles plasmáticos de recalcificación. Por ello, se utilizó el método de Howell para evaluar el tiempo de recalcificación de plasma (PRT) y el $T_{1/2 \text{ máx}}$ (tiempo en el que se alcanzó el máximo valor de absorbancia). Concretamente, la sangre se centrifugó a 3000 rpm (25 min, 8.0 ± 0.5 °C, Centrifuga Eppendorf 504R; Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) para obtener el PPP. Una suspensión de 50 mg de PPP y de las nanopartículas en PBS (0.1 mL) se incubaron durante 5 min a 37.0 ± 0.5 °C en una placa de 96 pocillos (Nunclo[®]; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A esta suspensión se le añadió 0.1 mL de 25 mM de una solución de CaCl_2 . La coagulación del plasma se controló de forma manual por inmersión de un gancho de acero inoxidable recubierto con silicona (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) en la solución para detectar la formación de hebras de fibrina. El tiempo de coagulación se estimó como el tiempo al que se formó la primera hebra de fibrina. Se utilizó PBS como control negativo.

2.10. Estudio de liberación *in vitro*

Los perfiles de liberación *in vitro* de las nanopartículas de THC se investigaron tras la incubación de las partículas (recién preparadas) en PBS pH 7.4 (4 mg de nanopartículas suspendidas en 15 mL), que contenía, a su vez, 0.1 % p/v de Tween[®] 80 para mantener las

condiciones *sink* (Hombreiro-Perez y cols., 2003) a 37 °C y agitación mecánica (100 rpm) (Unitronic Vaivén; Selecta S.A., Barcelona, España). A intervalos de tiempo prefijados se tomaron alícuotas (500 µL) que se centrifugaron (10000 rpm, 5 min, Centrifuga Eppendorf 504R; Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) para evitar precipitados. La muestra filtrada (filtros de jeringa de 0.22 µm; Millex[®] GV, Millipore, Barcelona, España) se inyectó en el sistema de HPLC para la evaluación del THC. La cantidad de THC liberado se determinó utilizando una curva de calibración construida sobre el intervalo 20-100 µg/mL ($R^2 = 0.9990$) (LOD = 30 µg/mL; LOQ = 40 µg/mL). En este apartado se estudiaron los efectos del aditivo empleado en la modificación superficial sobre los perfiles de liberación.

2.11. Estudios *in vitro*

2.11.1. Cultivos celulares

Para los estudios *in vitro* se utilizaron varias líneas celulares:

- Las células humanas de cáncer de colon (Caco-2) se utilizaron como modelo del tracto gastrointestinal. Se cultivaron en medio de cultivo Medio Esencial Mínimo (MEM con solución salina equilibrada de Earle (EBSS) sin L-glutamina), suplementado con un 10 % v/v de suero fetal bovino, un 1 % v/v de piruvato sódico, MEM con aminoácidos no esenciales y L-Glutamina y 0.1 % v/v del antibiótico gentamicina, a 37 °C en ambiente humidificado del 5 % de CO₂ (Incubadora de CO₂ AutoFlow NU-4750 Water Jacket; Nuaire, Plymouth, MN, USA). El medio se repuso cada dos días y las células se subcultivaron después

de alcanzar un 80 % de confluencia, aproximadamente (Zhang y Feng, 2006).

- Las células humanas tipo fibroblastos de pulmón fetal (MRC-5) y las células humanas de adenocarcinoma de pulmón (A549) se cultivaron en medio de cultivo esencial Dulbecco modificado (DMEM) suplementado con 2 mM de L-Glutamina, 50 µg/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomina y 10 % v/v de suero fetal bovino (FBS), en ambiente humidificado del 95 % de aire y 5 % de CO₂ a 37 °C (Incubadora de CO₂ AutoFlow NU-4750 Water Jacket; Nuaire, Plymouth, MN, USA).

2.11.2. Estudios de captación celular *in vitro*

La captación de las nanopartículas administradas por vía oral es altamente dependiente de las interacciones con las células intestinales. De estas interacciones nanopartículas-células, dependerá el efecto terapéutico de las mismas. Por ello, esta investigación *in vitro* puede proporcionar algunas evidencias preliminares para mostrar las ventajas de las formulaciones elaboradas. En el presente estudio, se utilizaron células Caco-2 para simular el tracto gastrointestinal como barrera para la captación de partículas tras administración oral.

Algunos aspectos de la captación celular en Caco-2 han sido estudiados en profundidad. El tamaño de partícula, la concentración administrada, el tiempo de incubación y la hidrofilia de la superficie de nanopartículas de PLGA son algunos de los factores más importantes que repercuten directamente en la captación celular de las nanopartículas (Danhier y cols., 2009; Gaumet y cols., 2010).

Por lo tanto, en este apartado se evaluó la captación celular de nanopartículas de PLGA fluorescentes, tanto de forma cualitativa como cuantitativa.

En el estudio cuantitativo, las células Caco-2 se cultivaron en frascos de cultivo de 25 cm² (Nunclon[®]; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) hasta alcanzar una confluencia del 80 %. Alcanzado este nivel, se cambió el medio de cultivo por una suspensión de nanopartículas de PLGA cargadas con Nile-Red. Las nanopartículas se dispersaron en el medio de cultivo a una concentración de 4 mg/mL y las células se incubaron junto a la suspensión de partículas a diferentes tiempos: 0.5, 1, 2, 4, 6 y 24 h. Pasados estos tiempos, se retiró la suspensión de nanopartículas y las células se lavaron tres veces con medio de cultivo (MEM) para eliminar posibles trazas. A continuación, las células se separaron de la superficie de los frascos por incubación con una solución que contenía tripsina (1x) durante 7 min y se cuantificó la cantidad de fluorescencia remanente usando un citómetro de flujo (FC 500 Cytomics MPL; Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) (Danhier y cols., 2009; Reix y cols., 2012).

En el estudio cualitativo, se sembraron células en una cámara de vidrio cubierta (μ -Dish35 mm, alto; Ibidi GmbH, Munich, Alemania) hasta alcanzar el 80 % de confluencia. Entonces, se incubaron con una suspensión de las diferentes formulaciones de nanopartículas de PLGA cargadas con Nile-Red durante 0.5 h. Pasado el tiempo de incubación, las células se lavaron con PBS y después se fijaron con paraformaldehído (4 % p/v en PBS) durante 25 min. Posteriormente, se tiñeron los núcleos con el reactivo Hoechst 33258. Las células se lavaron con PBS para eliminar el reactivo y se les añadió PBS:glicerol

(20:80) para ser observadas por el microscopio confocal de barrido láser (CLSM) (Zeiss LSM 410, LSM Tech, Etters, USA) con el software (Image Browser ZEN confocal Zeiss) para la formación de imágenes.

2.11.3. Viabilidad celular *in vitro*: Estudio de actividad antitumoral

Durante muchos años, los cannabinoides han sido utilizados para propósitos medicinales y recreativos. Actualmente, los estudios se centran en los efectos terapéuticos de los cannabinoides sobre diferentes tipos de cáncer. Son muchos los estudios que muestran la eficacia de los cannabinoides en el tratamiento del dolor en oncología y/o en la inhibición del crecimiento del tumor, en cánceres tales como los óseos, gliomas y carcinomas de piel (Saghafi y cols., 2011; Velasco y cols., 2012).

La actividad antitumoral de los cannabinoides, en nuestro caso del THC, fue investigada mediante estudios de viabilidad celular *in vitro*. Se evaluó mediante el ensayo MTT la viabilidad de las células cancerosas expuestas a nanopartículas de PLGA (Vihola y cols., 2005). Dicho procedimiento es un método colorimétrico que mide cuantitativamente la actividad metabólica de las células viables y que se basa en la capacidad que tienen las deshidrogenasas mitocondriales de las células metabólicamente activas de reducir la sal de tetrazolio (MTT), de color amarillo e hidrofílica, a un compuesto hidrofóbico (formazán), de color azul oscuro. Tras la captación del MTT, las células se rompen y se solubiliza el formazán con SDS. La absorbancia de cada muestra es directamente proporcional al número de células viables.

En este estudio se han utilizado varias líneas celulares, cancerosas y no cancerosas, con el fin de demostrar la actividad anticancerígena y la selectividad del THC con independencia de la línea celular estudiada:

- Línea celular Caco-2: fueron sembradas en placas de 96 pocillos (Nunclon[®]; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) a una densidad de 7×10^5 células viables/pocillo y se incubaron 24 h para permitir la unión celular. Pasado ese tiempo, las células se incubaron con suspensiones de las diferentes formulaciones de nanopartículas de PLGA, sin carga y cargadas con THC en concentraciones que van de 25 a 150 μM para 24, 48, 72, 96, 120, 168 y 216 h. Además las células se expusieron al THC libre en las mismas concentraciones teóricas que en las nanopartículas y a DMSO puro, como control positivo (produce muerte celular). A los intervalos de tiempo designados, se retiró el medio y se lavaron los pocillos con medio de cultivo. Entonces, se añadieron a cada pocillo 125 μL de MTT a una concentración de 1 mg/mL en medio de cultivo. Después de la incubación con MTT durante 3-4 h, se añadieron 80 μL de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 20 % p/v en HCl (0.02 M) a cada pocillo, con el fin de solubilizar los cristales de formazán de MTT. Las placas se incubaron durante 24 h y después se analizó su absorbancia con un lector de placas (Synergy HT; BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, Estados Unidos) a 540 nm.
- Por otro lado, las líneas celulares MCR-5 y A549 fueron también sembradas en placas de 96 pocillos (Nunclon[®]; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a diferente densidad, teniendo en

cuenta la velocidad de proliferación de la línea celular estudiada (4.5×10^3 células viables/pocillo para MCR-5 y 2.7×10^3 células viables/pocillo para A549) y se incubaron 24 h para permitir la unión celular. Pasado ese tiempo, las células se incubaron con suspensiones de las diferentes formulaciones de nanopartículas de PLGA, sin carga y cargadas con THC, en concentraciones que van de 0.10 a 50 μM para 72 h. Pasado el tiempo de incubación, se retiró el medio y se lavaron los pocillos con medio de cultivo. Entonces, se añadieron a cada pocillo 125 μL de MTT a una concentración de 1 mg/mL en medio de cultivo. Después de la incubación con MTT durante 4 h, se añadieron 80 μL de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 20 % p/v en HCl (0.02 M) a cada pocillo, con el fin de solubilizar los cristales de formazán de MTT. Las placas se incubaron durante 24 h y después se cuantificó su absorbancia con un lector de placas (Synergy HT; BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) a 450 nm.

La viabilidad celular se calculó, en todos los casos, mediante la siguiente ecuación:

$$Viabilidad_{celular}(\%) = \frac{Int_s}{Int_{control}} \times 100$$

Donde, Int_s es la intensidad de absorbancia de las células incubadas con la suspensión de nanopartículas (o el THC libre, DMSO o trealosa, en su caso) e $Int_{control}$ es la intensidad de absorbancia de las células incubadas con el medio de cultivo sólo, como control positivo.

2.12. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los distintos ensayos se representan como valor medio \pm desviación estándar. Además se utilizaron los F- y T-tests y el análisis de la varianza para un solo factor y para múltiples factores, para determinar la significación entre dos grupos y entre más de dos grupos, respectivamente. Un valor de $p < 0.05$ se consideró significativo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Método de cuantificación por RP-HPLC

3.1.1. Condiciones cromatográficas

El método analítico desarrollado por HPLC para la determinación de THC fue optimizado y adaptado a las condiciones de nuestro laboratorio, obteniéndose un pico de absorción adecuado (estrecho, aislado, simétrico, etc.) en un tiempo de análisis corto.

Se siguieron las condiciones cromatográficas consultadas en bibliografía (Munjal y cols., 2006a; Munjal y cols., 2006b; Thumma y cols., 2008), con excepción de la longitud de onda de absorción del THC, que en nuestro caso se fijó a 290 nm, ya que se obtenía un mayor pico de absorción que el especificado en bibliografía.

3.1.2. Validación del método analítico

3.1.2.1. Selectividad/especificidad

La especificidad del método analítico se evaluó en tres muestras diferentes: solución de placebo, solución de disolvente y solución estándar de THC (500 µg/mL). La finalidad es demostrar la no existencia de picos en los tiempos de retención correspondientes al analito, con lo que no existe ningún componente de la formulación que interfiera en el espectro de absorción del analito estudiado.

La figura 37 muestra los cromatogramas obtenidos para las tres muestras. En ella se observa que ni placebo ni disolvente muestran ningún pico con un tiempo de retención similar al del THC (4.27 min \pm 10 %), por lo que el método desarrollado es específico en relación a los excipientes de la preparación final.

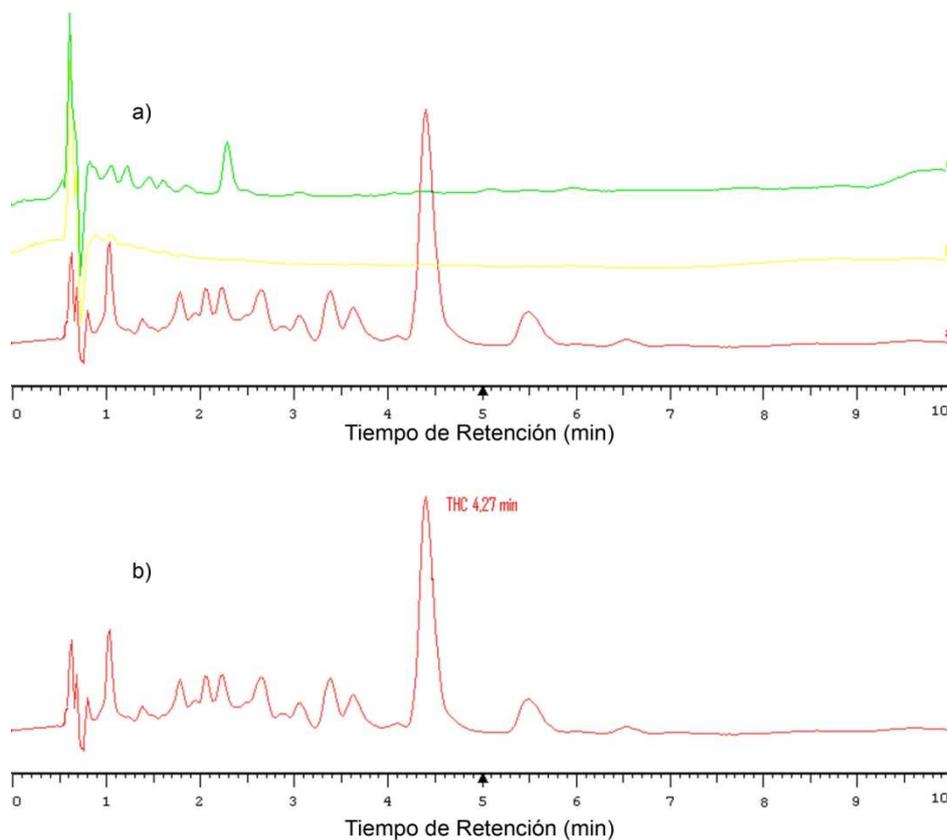


Figura 37. a) Cromatogramas obtenidos para el placebo (verde), disolvente (amarillo) y el estándar de THC (rojo); (b) Cromatograma representativo del THC, con su tiempo de retención ($t = 4.27$ min).

Además, en el estudio de selectividad, las muestras se sometieron a condiciones de estrés (temperatura, luz solar, pH y oxidación) con el fin de detectar la presencia de posibles picos de interferencia resultantes de la degradación de THC. De acuerdo con las áreas obtenidas, el valor de la degradación media obtenida fue 8.63 %, por lo que se puede concluir que el THC es estable bajo estas condiciones de estrés, ya que el porcentaje de degradación de las muestras estresadas con respecto a la muestra estándar es muy pequeño. Sin embargo, se

observa una mayor degradación del THC al someter las muestras a cambios bruscos de pH y, sobretodo, oxidación, con respecto a las demás condiciones.

A modo resumen, se puede concluir que el método de HPLC desarrollado para la determinación y cuantificación de THC es específico y selectivo (Álvarez-Fuentes y cols., 2012). En la tabla 19 se muestran las áreas cromatográficas obtenidas tras su tratamiento.

Muestra	Área	D.E.	Degradación (%)
THC estándar	151715.33	830.98	-
Luz solar	146349.67	2756.95	3.54
60°C	144883.00	268.53	4.50
HCl	138621.33	5174.64	8.63
NaOH	134440.67	3012.30	11.39
Oxidación	143988.33	1766.23	15.09

Tabla 19. Áreas cromatográficas y porcentaje de degradación obtenidos al someter la muestra de THC a condiciones de estrés.

3.1.2.2. Precisión

En el estudio de precisión se investigó la presencia de errores aleatorios y sus efectos en el correcto funcionamiento del método. En nuestro caso, la precisión se ha evaluado a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

- Precisión instrumental: con este parámetro se evaluó la repetibilidad del sistema. En la tabla 20 se encuentran reflejados los resultados del área y del tiempo de retención obtenidos, correspondientes a seis inyecciones de un único vial de THC estándar (500 µg/mL), realizadas el mismo día.

	Área	Tiempo retención (min)
	149662	4.29
	149548	4.27
	150804	4.27
	151059	4.32
	150746	4.24
	151155	4.27
Media	150495.67	4.27
D.E.	707.51	0.03
D.E.R.	0.47	0.62

Tabla 20. Áreas cromatográficas y tiempos de retención (min) correspondientes al estudio de precisión instrumental.

Se obtiene una desviación estándar relativa de 0.47 % para el área y 0.62 % para el tiempo de retención, lo que nos lleva a afirmar que el análisis de la precisión instrumental del sistema se encuentra en condiciones óptimas, ya que el criterio de aceptación en el análisis de las formulaciones de productos farmacéuticos establece el límite de D.E.R. en un 1.5 % (ICH-Q2B, 1996; ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005; Guidelines for Collaborative Study procedure to validate characteristics of a method of analysis, 1989).

- **Reproducibilidad del método:** se determinó mediante el uso de los resultados obtenidos en las pruebas de exactitud para tres niveles de concentración: nivel bajo (50 %), nivel medio (100 %) y nivel alto (150 %). En la tabla 22 (véase sección 3.1.2.3. del presente capítulo) se muestran los valores obtenidos para la D.E.R. a cada nivel estudiado. Para los tres niveles estudiados (I, III y V de la prueba de exactitud), la D.E.R. del porcentaje de recuperación medio, es inferior a 2.0 % (criterio de aceptación)

(Marcato y Durán, 2008; Cózar-Bernal y cols., 2011; Guidelines for Collaborative Study procedure to validate characteristics of a method of analysis, 1989). Por lo tanto, en función de los resultados obtenidos este estudio se consideró válido.

- Precisión intermedia: los resultados obtenidos en los análisis realizados por dos analistas distintos en diferentes días se encuentran recogidos en la tabla 21.

Analista/ Día	Área	Conc. ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	μg obtenidos	μg teóricos	Recuperación (%)	Media	D.E.	D.E.R.
1/1 M1	154305.67	515.12	515.12	500.00	103.02	510.41	6.66	1.31
1/1 M2	151348.67	505.70	505.70	500.00	101.14			
2/1 M1	150843.00	504.09	504.09	500.00	100.82	506.18	2.96	0.58
2/1 M2	152157.00	508.27	508.27	500.00	101.65			
1/2 M1	162233.00	540.38	540.38	500.00	108.08	544.11	5.27	0.97
1/2 M2	164570.67	547.83	547.83	500.00	109.57			
2/2 M1	161185.00	537.04	537.04	500.00	107.41	528.05	12.72	2.41
2/2 M2	155538.00	519.05	519.05	500.00	103.81			
Media	156522.63	522.19	522.19	500.00	104.44	522.19	6.90	1.32
D.E.	5386.33	17.16	17.16	0.00	3.43			
D.E.R.	3.44	3.29	3.29	0.00	3.29			

Tabla 21. Precisión intermedia, desarrollada por dos analistas, en dos días diferentes, para dos muestras (M1 y M2).

En esta tabla puede observarse claramente que no existe variabilidad en las medidas obtenidas por los diferentes analistas en distintos días, obteniéndose valores de D.E.R. inferiores a los límites aceptados para ello ($< 2.0\%$), por lo cual podemos concluir que el método es reproducible ya que las variaciones introducidas en el ensayo no influyen de forma significativa en el resultado del mismo (Marcato y Durán, 2008; Cózar-Bernal y cols., 2011; Guidelines for Collaborative Study

procedure to validate characteristics of a method of analysis, 1989).

3.1.2.3. Exactitud

Los resultados obtenidos para el análisis de este parámetro se expresan como el porcentaje de recuperación de cada una de las muestras analizadas. La tabla 22 nos muestra que los porcentajes de recuperación para el intervalo de concentraciones estudiadas (250-750 µg/mL) se encuentran entre 100.06 % y 101.83 % con un valor de D.E.R. = 0.84 %.

Nivel	µg teóricos	µg obtenidos	Recuperación (%)	D.E.R.
I	250.00	254.35	101.74	0.63
II	375.00	381.87	101.83	0.36
III	500.00	506.87	101.37	0.52
IV	625.00	625.37	100.06	0.51
V	750.00	759.44	101.26	0.94
	Media	505.58	101.25	
	D.E.	183.57	0.85	
	D.E.R.	36.31	0.84	

Tabla 22. Valores medios obtenidos en el estudio de exactitud de las muestras de placebo cargadas con THC (y reproducibilidad del método, en niveles I, III y V).

Según los datos obtenidos, no sería necesario realizar ningún test estadístico adicional, ya que el criterio de aceptación de la ICH para las formulaciones farmacéuticas en este parámetro establece que el porcentaje de recuperación debe encontrarse entre el 98 y 102 %, lo que equivale a un ± 2.0 % de error relativo (Marcato y Durán, 2008; Guidelines for Collaborative Study procedure to validate characteristics of a method of analysis, 1989).

3.1.2.4. Linealidad

La linealidad es la capacidad del método para responder proporcionalmente a los cambios en la concentración o la cantidad de analito en una muestra. En nuestro caso, la linealidad fue calculada mediante la evaluación de la linealidad del sistema (soluciones estándar de THC) y la linealidad del método (solución de placebo con cantidad creciente de THC disuelto en el medio).

Respecto a la linealidad del sistema, se estudió en el intervalo de concentración de 250 a 750 $\mu\text{g/mL}$, mediante el cálculo de la ecuación de una recta y su coeficiente de correlación (R^2). La ecuación de la recta obtenida se corresponde con $y = 313.8208x - 7349.6$ (y: área del pico; x: concentración de THC ($\mu\text{g/mL}$) y un coeficiente de correlación $R^2 = 0.9994$ ($n = 6$)).

Para la linealidad del método, el intervalo de concentración fue el mismo que para la linealidad del sistema y la ecuación de la recta obtenida fue $y = 314.7x - 6058.0$ con un coeficiente de correlación $R^2 = 0.9990$.

Para estos estudios se llevó a cabo un análisis estadístico (ANOVA) para asegurar una buena linealidad del método desarrollado. El test estadístico F y su correspondiente valor p (nivel de significación estadística de F-test) indican un buen ajuste global del modelo ($p = 8.60 \cdot 10^{-11}$ para la linealidad del sistema y $p = 7.09 \cdot 10^{-11}$ para la linealidad del método).

La figura 38 muestra los gráficos obtenidos en el estudio para la linealidad del sistema (38a) y la linealidad del método (38b).

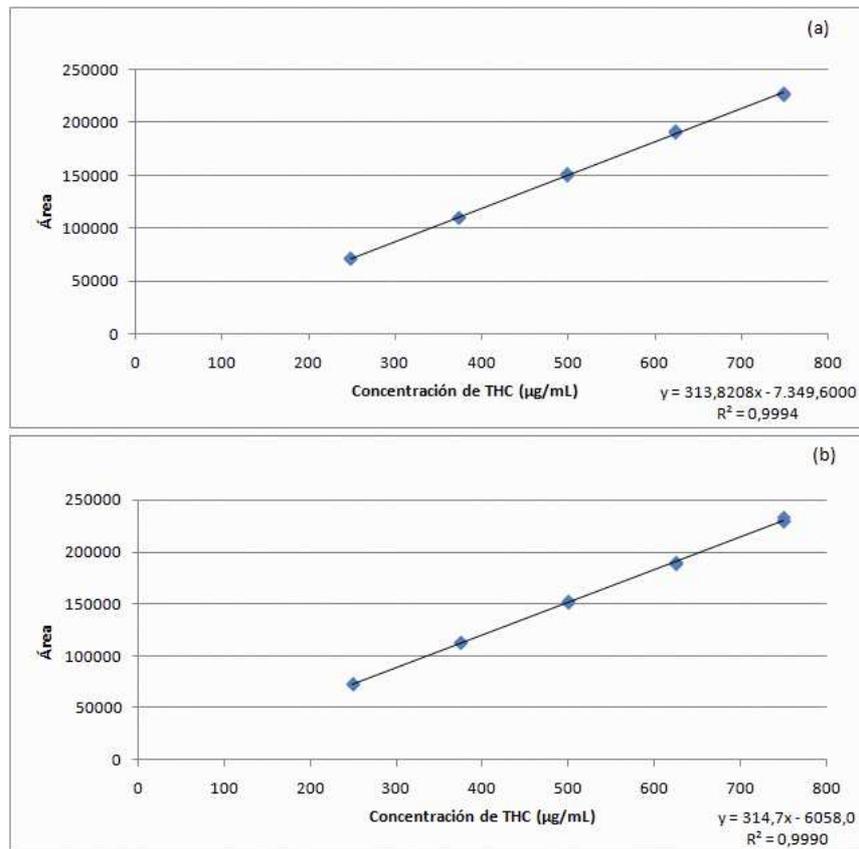


Figura 38. (a) Linealidad del sistema correspondiente al intervalo de concentraciones de 250-750 µg/mL de THC. (b) Linealidad del método correspondiente al intervalo de concentraciones de 250-750 µg/mL de THC agregado a una solución de placebo.

3.1.2.5. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

La concentración más baja a la cual el analito es detectado (LOD) o cuantificado con precisión y exactitud aceptable (LOQ), fue determinado mediante el estudio de la desviación estándar relativa D.E.R. (%) frente a la concentración de analito, a concentraciones mucho menores que el intervalo estudiado para la validación del método analítico (figura 39a) (Green, 1996).

Las concentraciones utilizadas para este estudio fueron más bajas que la menor concentración del método propuesto: 20, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 80 y 100 µg/mL.

El primer punto que no cumple la mínima D.E.R. que obedece a los requisitos preestablecidos para la reproducibilidad estudio (2%) corresponde al límite de detección. El valor de LOD se encontró que era el de 30 µg/mL. El primer punto que se sitúa dentro del valor especificado, corresponde al límite de cuantificación (LOQ), que se encuentra en 40 µg/mL (Épshtein, 2002).

Además, la representación de las concentraciones frente a las áreas obtenidas en las zonas inferiores de las concentraciones estudiadas (figura 39b) será útil para cuantificar cantidades menores de THC en algunas pruebas, tales como los estudios de liberación *in vitro*. Por esta razón, se desarrolló una nueva linealidad en el intervalo de concentraciones de THC de 20 a 100 µg/mL, obteniéndose una ecuación de la recta:

$$y = 332.2x - 65.52 (R^2 = 0.9990) (p = 2.49 \cdot 10^{-14}).$$

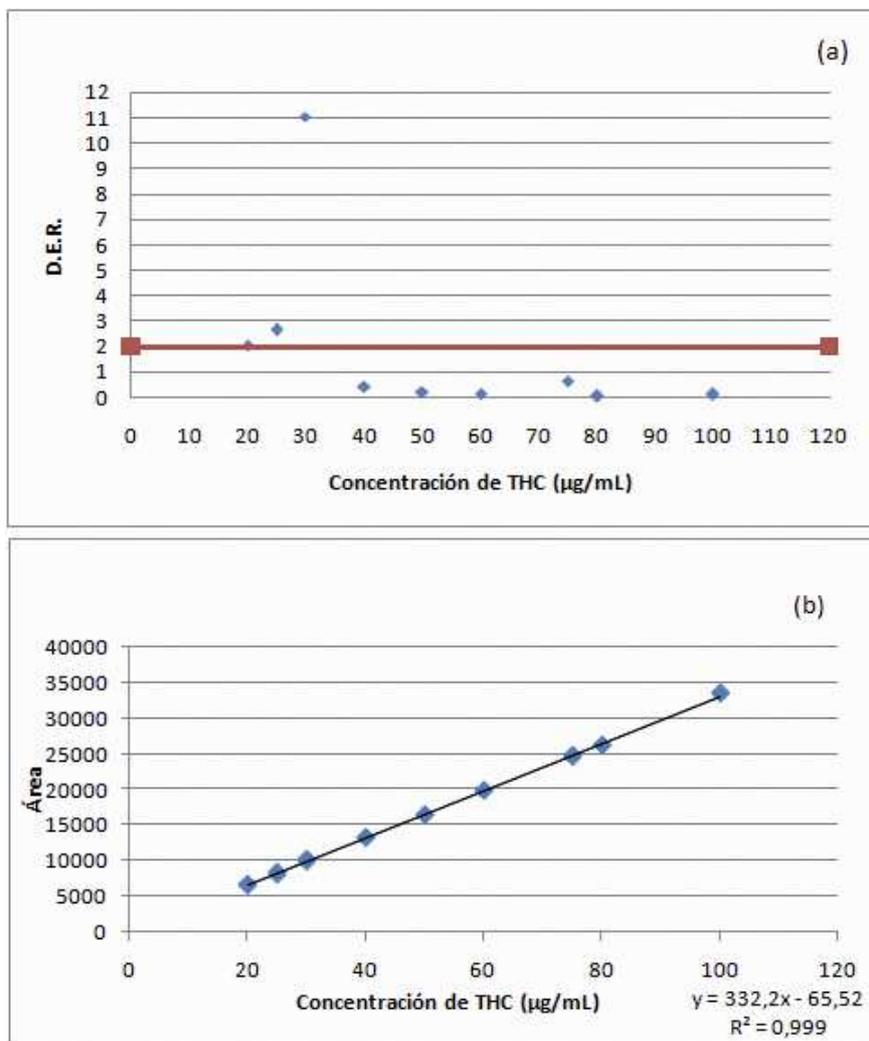


Figura 39. (a) LOD-LOQ obtenido tras la representación de la concentración frente a sus D.E.R. (b) Linealidad correspondiente al intervalo de concentración 20-100 µg/mL de THC.

3.1.2.6. Robustez

La robustez de un método de análisis se utiliza para demostrar que las variaciones típicas de los parámetros del método no producen cambios significativos en los resultados del análisis.

La evaluación de la robustez se basa en el porcentaje de recuperación y los valores de D.E.R. obtenidos para diferentes cambios en el método de análisis. La tabla 20 muestra los valores medios de los porcentajes de recuperación y la D.E.R. de cada parámetro estudiado: la temperatura del horno (± 2 °C), velocidad de flujo (± 0.100 mL/min), proporción de la fase móvil (proporción A:B, 90:10 y 80:20) y el pH de la fase móvil (± 0.2 unidades). Como se muestra en la tabla 23, los porcentajes de recuperación obtenidos en todos los parámetros estudiados, se encuentran entre 99.15 % y 101.30 % y la D.E.R. de cada uno de ellos es inferior al 2%. Por lo tanto, el método ha demostrado ser robusto sobre pequeñas variaciones del método de análisis (LoBrutto y Patel, 2007).

Cambios del método original	μg teóricos	μg experimentales	Recuperación (%)	D.E.R.
Proporción Fase Móvil (A:B) 80:20	500.00	506.52	101.30	0.31
Proporción Fase Móvil (A:B) 90:10	500.00	496.60	99.32	0.33
pH Fase Móvil= 4.30	500.00	502.58	100.52	0.29
pH Fase Móvil = 4.70	500.00	504.17	100.83	0.57
Temperatura del horno -2 °C	500.00	495.76	99.15	0.92
Temperatura del horno +2 °C	500.00	501.36	100.27	0.55
Flujo Fase Móvil -0.1 mL/min	500.00	505.31	101.06	0.82
Flujo Fase Móvil +0.1 mL/min	500.00	498.21	99.64	0.46
	Media	501.12	100.22	
	D.E.	4.94	0.99	
	D.E.R.	0.99	0.99	

Tabla 23. Estudio de la robustez del método para la validación del THC.

A modo resumen, en relación con el desarrollo y validación del método RP-HPLC propuesto, aplicado a la evaluación del THC en nanopartículas de PLGA, se ha demostrado que el método es selectivo, lineal entre el 50% y 150% de la concentración tomada como estándar (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), con un coeficiente de correlación superior a 0.999, exacto y preciso. Los límites de detección y cuantificación para el fármaco

fueron 30 y 40 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, y estos valores se encuentran por debajo de las concentraciones más bajas esperadas en las muestras. Además, el método ha demostrado ser robusto a pequeñas variaciones típicas de los parámetros del método.

3.2. Caracterización de las nanopartículas elaboradas

La síntesis de nanopartículas de PLGA cargadas con THC se llevó a cabo por el método de nanoprecitación, tal como se ha descrito previamente (sección 2.3. del presente capítulo). La caracterización de las formulaciones se estudió en función del tamaño medio de partícula, distribución de tamaños, estudio de la forma y aspecto de las nanopartículas y carga superficial por la medida del potencial zeta de las nanopartículas.

3.2.1. Determinación del tamaño medio y distribución de tamaños

El tamaño y la distribución de tamaño de las nanopartículas se midieron por dispersión láser. Los datos se expresan como el valor del tamaño medio y la desviación estándar (D.E.), obtenida a partir de experimentos independientes. Se estudiaron las influencias de los siguientes factores: i) polímero utilizado para la elaboración de las nanopartículas de PLGA; ii) carga de fármaco, y iii) aditivos utilizados para la modificación superficial de las nanopartículas.

En la tabla 24 se resumen los valores de tamaño medio y distribución de tamaños obtenidos para las formulaciones elaboradas en función del polímero utilizado (R502 o R502H) a las diferentes cargas del THC (1.5, 3 y 5 % p/p).

Polímero (R: Resomer [®])	C _{THC} (% p/p)	Tamaño ± D.E. (nm)	CV (%)
R502	0	311.02 ± 112.94	34.28
	1.5	330.74 ± 110.43	33.37
	3	388.34 ± 127.30	32.77
	5	433.85 ± 114.40	30.13
R502H	0	281.37 ± 110.30	34.63
	1.5	259.76 ± 63.80	24.54
	3	345.71 ± 115.80	33.49
	5	428.78 ± 147.50	34.41

Tabla 24. Tamaño de partícula y distribución de tamaños de las nanopartículas de PLGA en función del polímero utilizado (R502 o R502H) y de la carga de THC (0, 1.5, 3 y 5 % p/p).

El tamaño medio de partícula en función del polímero utilizado y con las diferentes cargas de THC, se encontró en el intervalo de 259-434 nm, con un coeficiente de variación (CV) situado, aproximadamente, entre el 25 y 35 %. Según los valores recogidos en la tabla 24, independientemente del Resomer[®] utilizado en la elaboración de las nanopartículas, el tamaño medio de partícula tiende a aumentar conforme se aumenta la carga en THC.

Sin embargo, tras realizar un análisis estadístico (ANOVA) de este parámetro, no se encontró diferencia significativa ($F = 0.034$; $p = 0.9998$; $n = 15$), independientemente del polímero utilizado y la carga de fármaco. Además, diferenciando los polímeros utilizados en cada caso y teniendo en cuenta exclusivamente la carga de fármaco, tampoco se encontraron diferencias significativas en el tamaño de partícula para R502 ($F = 0.023$; $p = 0.9945$; $n = 7$) ni para R502H ($F = 0.051$; $p = 0.9824$; $n = 7$).

Por otro lado, los resultados obtenidos para el tamaño de partícula en función del aditivo empleado en la modificación superficial de las

nanopartículas se muestran en la figura 40. Los datos se expresan como el valor medio \pm D.E., obtenidos a partir del análisis de muestras independientes.

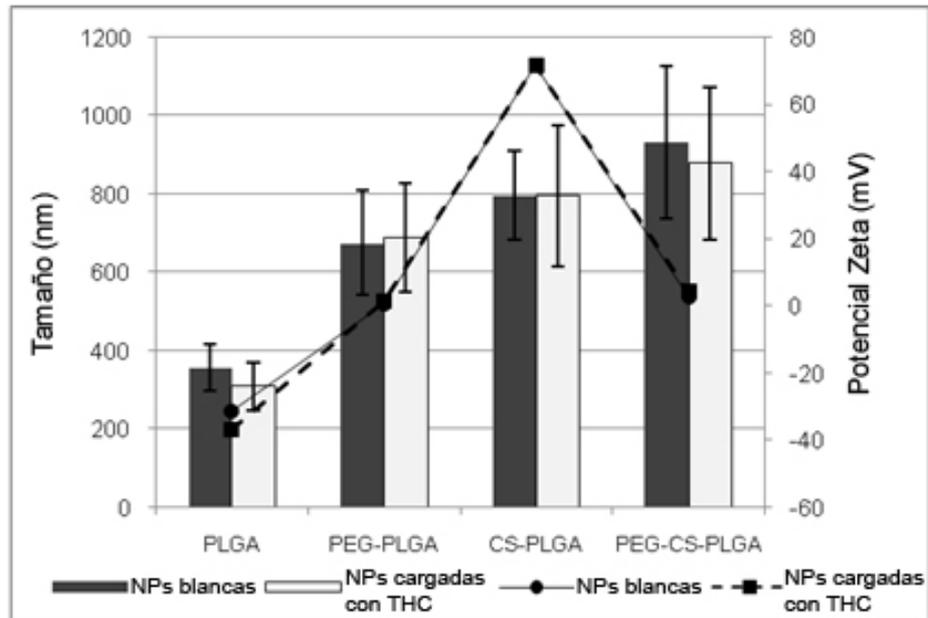


Figura 40. Tamaño de partícula, distribución de tamaños y valores de potencial zeta obtenidos para las nanopartículas de PLGA sin modificar y con superficie modificada, blancas y cargadas con THC (5 % p/p)(polímero usado: R502) ($n=3$).

Como se puede observar, las nanopartículas sin modificar mostraron una distribución de tamaño de partícula medio en el intervalo de 309-358 nm, que es adecuado para la captación celular en el suministro oral. Sin embargo, cuando CS y PEG se adsorben sobre la superficie de las partículas, el diámetro medio aumenta notablemente. Nafee y cols., 2009 y Parveen y Sahoo, 2011, obtuvieron resultados similares en sus estudios. Los autores atribuyen este comportamiento a la deposición de múltiples capas del componente de revestimiento superficial. La adición de CS y PEG se realiza en pasos posteriores a la

formación de las nanopartículas, por lo que se adsorben a la superficie formando una o varias capas superficiales, aumentando con ello el tamaño medio de partícula.

Sin embargo, aunque los tamaños aumentan con la modificación superficial de las nanopartículas, se espera que la adición de CS y de PEG mejore la captación y absorción celular de las nanopartículas, así como que evite el proceso de opsonización (Gref y cols., 2000; Parveen y Sahoo, 2011).

A título de ejemplo, se muestran a continuación, los histogramas que ilustran el aumento en la distribución de tamaños obtenidas para una formulación PEG-CS-PLGA, a medida que se añadían los aditivos para su recubrimiento superficial.

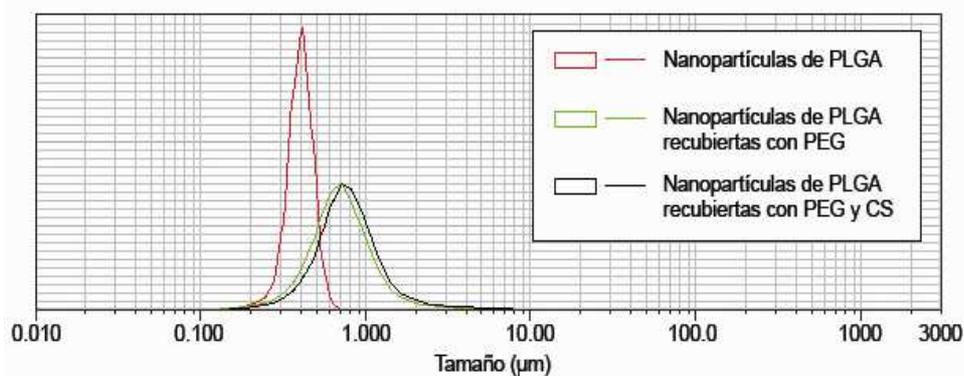


Figura 41. Histogramas de la distribución de tamaños de una formulación de nanopartículas de PLGA recubierta con CS y PEG.

3.2.2. Determinación de la morfología y el aspecto

La determinación de las características morfológicas de las distintas formulaciones se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Tal como se observa en la figura 42, las imágenes de TEM revelaron que las nanopartículas son entidades individuales con forma esférica, con una distribución homogénea y presentan, además, estructura de nanocápsulas, diferenciándose claramente núcleo y corteza para las nanopartículas recubiertas con CS y PEG. Autores como Parveen y Sahoo, (2011), Prego y cols., (2006) y Zahr y cols., (2006) han obtenido resultados similares.

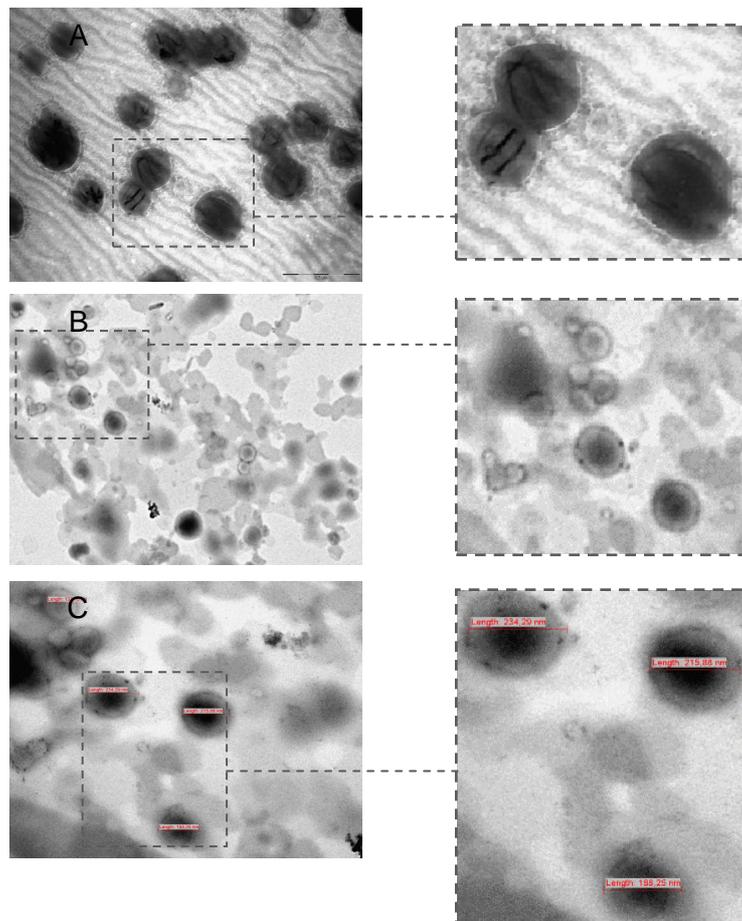


Figura 42. Morfología de (a) nanopartículas de PLGA recubiertas con CS, (b) nanopartículas de PLGA recubiertas con PEG y (c) nanopartículas de PLGA recubiertas con CS y PEG, estudiadas por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

3.2.3. Determinación de la carga superficial

La carga superficial de las partículas se estudió por la determinación del potencial zeta (PZ). Su valor influye en una amplia gama de propiedades fisicoquímicas como la estabilidad de las partículas en suspensión o la interacción con electrolitos, entre otras. Una carga superficial alta (ya sea negativa o positiva), es indicativa de la estabilidad de un sistema coloidal en el medio, debido a la repulsión entre las nanopartículas cargadas con el mismo signo. Se estudiaron los efectos de los siguientes factores: i) polímero utilizado para la elaboración de las nanopartículas de PLGA; ii) carga de fármaco y iii) aditivos utilizados para el recubrimiento superficial de las nanopartículas.

En relación al tipo de polímero y la carga de fármaco, en la tabla 25 se muestran los valores de PZ obtenidos. En este caso, se obtienen valores de PZ negativos para todas las formulaciones elaboradas, debido a las cargas negativas presentes en grupos funcionales del PLGA cuando las nanopartículas se encuentran en suspensión. Los valores de PZ en función del Resomer[®] (R502 o R502H) se encontraron por debajo de -24 mV, lo que demostró la alta estabilidad de las nanopartículas en suspensión en medio acuoso.

Polímero (R: Resomer®)	C _{THC} (% p/p)	Potencial Zeta ±D.E. (mV)
R502	0	-24.5 ± 2.3
	1.5	-28.9 ± 0.4
	3	-33.4 ± 0.3
	5	-28.6 ± 0.2
R502H	0	-42.6 ± 0.6
	1.5	-40.2 ± 1.0
	3	-32.9 ± 0.4
	5	-33.2 ± 0.5

Tabla 25. Valores de potencial zeta de las nanopartículas de PLGA en función del polímero utilizado (R502 o R502H) y la carga del THC (0, 1.5, 3 y 5 % p/p).

Se realizó un análisis estadístico (ANOVA) de los valores de PZ obtenidos, con el fin de determinar la existencia de diferencias en función del polímero y la carga de fármaco. Los resultados de este análisis indican que no existía diferencia significativa en los valores de PZ de las nanopartículas ($F = 0.030$; $p = 0.9999$; $n = 15$), independientemente del polímero utilizado y la carga de fármaco.

Sin embargo, en las formulaciones preparadas empleando diferentes aditivos para la modificación superficial de las nanopartículas (polímero: R502; carga inicial de THC: 5 % p/p), se observan diferentes valores de PZ. Tal como se observa en la figura 40 (véase sección 3.2.1. del presente capítulo), los valores de PZ oscilan entre los valores negativos de las nanopartículas sin recubrir (-31.4 mV para partículas blancas y -36.9 para las cargadas con THC), los valores neutros o relativamente cercanos a la neutralidad tras el recubrimiento con PEG (+0.45 y +1.34 mV blancas y cargadas con THC, respectivamente); valores ligeramente positivos para partículas doblemente recubiertas con PEG y CS (+2.90 y +4.44 mV blancas y cargadas con THC, respectivamente) y los valores altamente positivos para partículas

recubiertas de CS (+71.6 y +71.8 mV, blancas y cargadas con THC, respectivamente).

Los valores de PZ altamente positivos obtenidos para las nanopartículas recubiertas con CS se deben a la naturaleza policatiónica del CS (grupos amino primarios). Por otro lado, los valores de PZ de partículas recubiertas con PEG y PEG-CS fueron mucho menos negativos, en comparación con las partículas de PLGA, sugiriendo una casi completa neutralización de las cargas negativas del PLGA. Esto se debe a que la presencia en la superficie de las nanopartículas de cadenas de PEG reduce significativamente los valores de PZ por desplazamiento de la capa difusa (zona que se crea alrededor de las nanopartículas, encargada de la estabilización coloidal de las nanopartículas en suspensión) a una distancia mayor de las nanopartículas, lo que resulta en una disminución del valor absoluto del PZ (Patel y cols., 2012).

La presencia de estos componentes, CS y PEG, en la superficie de las partículas y, por lo tanto, la obtención de valores de PZ positivos o cercanos a la neutralidad, proporcionan a las nanopartículas una capa hidrófila en la superficie, ocultando la hidrofobicidad del PLGA y evitando así el reconocimiento por el sistema reticuloendotelial (RES). Ha sido ampliamente demostrado que la "pegilación" (recubrimiento superficial con PEG) aumenta la vida media de las nanopartículas en la circulación sanguínea (Owens y Peppas, 2006). Además, el PEG exhibe una excelente biocompatibilidad. Por otro lado, las nanopartículas cargadas positivamente aumentan las propiedades de mucoadhesión, lo que se traduce en un mayor grado de internalización celular, al parecer, como resultado de las interacciones iónicas que se establecen entre las partículas con carga positiva y la carga negativa

de las membranas de las células. Además, las nanopartículas cargadas positivamente parecen ser capaces de escapar de los lisosomas después de ser internalizadas (Danhier y cols., 2012). En este sentido, las formulaciones PEG-PLGA y PEG-CS-PLGA son, *a priori*, las más adecuadas para la administración oral del fármaco THC.

3.3. Determinación del contenido en THC

La determinación del contenido en fármaco de las nanopartículas se llevó a cabo mediante el método de HPLC validado previamente (véase la sección 3.1. del presente capítulo). La obtención de un alto contenido en fármaco en las nanopartículas es un factor importante, ya que implica una menor cantidad de nanopartículas para alcanzar la dosis necesaria en el tratamiento.

En la tabla 26 se muestran la eficacia de encapsulación (EE %) y la carga de fármaco (% p/p) para las nanopartículas de PLGA en función del tipo de polímero empleado y la cantidad inicial de THC.

Polímero (R: Resomer [®])	C _{THC} (% p/p)	EE ± D.E. (%)	Carga _{THC} ± D.E. (% p/p)
R502	1.5	77.76 ± 0.38	1.17 ± 0.01
	3	79.15 ± 0.27	2.64 ± 0.17
	5	84.88 ± 0.29	4.24 ± 0.01
R502H	1.5	88.88 ± 0.37	1.33 ± 0.01
	3	94.70 ± 0.60	3.16 ± 0.08
	5	91.34 ± 0.19	4.57 ± 0.01

Tabla 26. Eficacia de encapsulación (EE %) y carga de fármaco (THC % p/p) de las nanopartículas de PLGA en función del polímero utilizado (R502 o R502H) y la carga inicial del THC (C_{THC}: 1.5, 3 y 5 % p/p).

Para todas las formulaciones, el proceso de encapsulación fue reproducible y eficiente con rendimientos por encima del 75 %. La alta EE (%) del fármaco puede atribuirse a la naturaleza lipófila del THC.

Esto impide su reparto en la fase acuosa, favoreciendo su atrapamiento por parte de las nanopartículas durante la fase de deposición del polímero. Fármacos lipófilos, como el THC, no sufren pérdidas por migración al medio externo, lo que resulta en un aumento del contenido en fármaco en las nanopartículas (Barichello y cols., 1999).

Se realizó un análisis estadístico (ANOVA) de los valores de EE (%) obtenidos, con el fin de determinar la existencia de diferencias en función del polímero y la carga de fármaco. Los resultados de este análisis indican que no existía diferencia significativa en los valores de EE (%) obtenidos ($F = 0.006$; $p = 0.9999$; $n = 11$), independientemente del polímero utilizado y la carga de fármaco.

Por otro lado, para las nanopartículas modificadas superficialmente, se obtuvieron valores de contenido en fármaco similares. La EE (%) y la carga de fármaco (% p/p) de las nanopartículas fueron 73.4-79.4% y 3.7-3.9%, respectivamente, para una carga teórica de THC del 5% p/p. Los resultados se resumen en la figura 43.

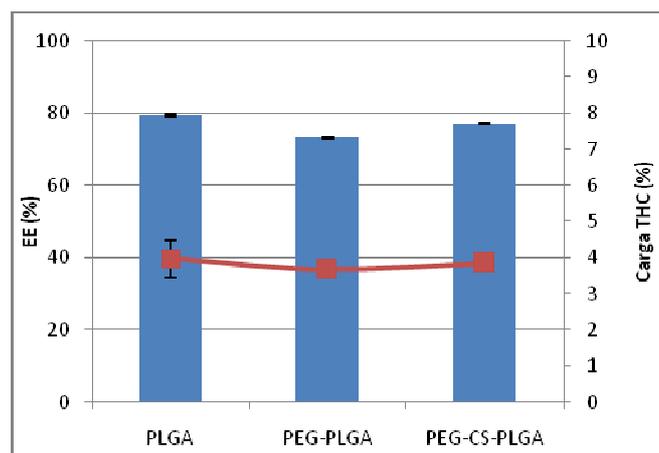


Figura 43. Valores de eficacia de encapsulación (EE %) (barras azules) y de carga de fármaco (% p/p) (puntos rojos) obtenidos para las nanopartículas de PLGA sin modificar y de superficie modificada, cargadas con THC (5 % p/p) ($n=3$).

El análisis factorial de varianza realizado indicó que no existía diferencia significativa en los valores de EE (%) obtenidos ($F = 0.001$; $p = 0.9983$; $n = 5$), independientemente de la presencia o no de uno o varios aditivos modificadores. Este hecho podría ser debido a la metodología de producción (como se explicó en el Capítulo II, en el caso del CS): los aditivos se añadieron en etapas adicionales, tras la formación de las nanopartículas y no en la solución de polímero inicial, durante el proceso de elaboración. Así, la adición de CS y/o PEG con un método de incubación parece no tener influencia sobre los valores de EE (%).

Autores como Chronopoulou y cols., 2013 y Chen y cols., 2012, han obtenido resultados similares tras la elaboración de este tipo de partículas modificadas superficialmente. La cantidad de fármaco encapsulado en las partículas modificadas superficialmente no cambió significativamente tras el proceso de recubrimiento, mostrando que el procedimiento no causa pérdidas de fármaco al medio externo.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la caracterización y en el contenido en fármaco de las nanopartículas y, debido a la no influencia del tipo de polímero utilizado en su elaboración y la carga inicial del fármaco en estos estudios, se eligieron las nanopartículas de PLGA elaboradas con el polímero R502 y a una carga inicial de THC máxima (5 % p/p), con el fin de continuar los estudios adicionales, centrándolos en evaluar la influencia del tipo de aditivo utilizado para la modificación superficial de las nanopartículas.

3.4. Análisis por espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR)

La FTIR se fundamenta en la absorción de radiación IR por las moléculas en vibración. Una molécula absorberá la energía de un haz

de luz infrarroja cuando dicha energía incidente sea igual a la necesaria para que se dé una transición vibracional de la molécula. Es decir, la molécula comienza a vibrar de una determinada manera gracias a la energía que se le suministra mediante luz infrarroja.

Pueden distinguirse dos categorías básicas de vibraciones: de tensión y de flexión. Las vibraciones de tensión son cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión están originadas por cambios en el ángulo que forman dos enlaces.

En la figura 44 se muestran los espectros obtenidos para los diferentes componentes analizados.

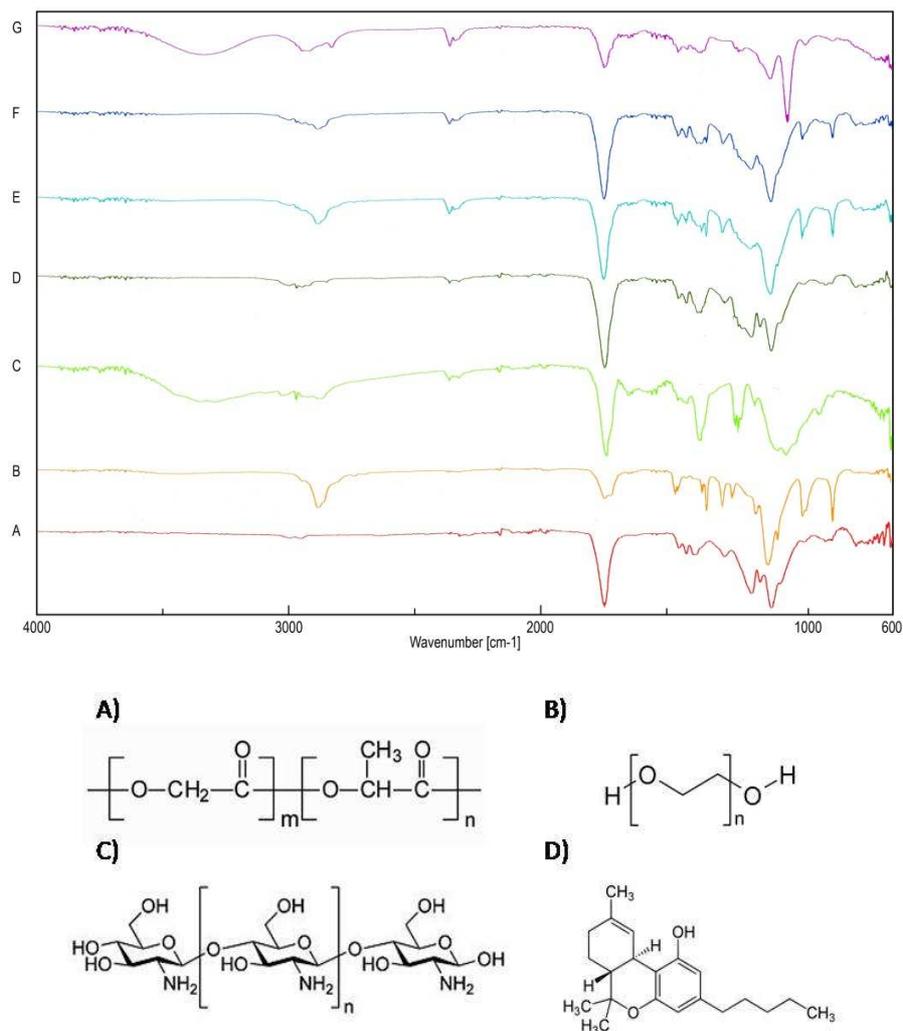


Figura 44.(1) Espectros de FTIR de (A) PLGA; (B) PEG; (C) CS; (D) nanopartículas de PLGA; (E) nanopartículas de PLGA recubiertas con PEG; (F) nanopartículas de PLGA recubiertas con PEG-CS y (G) THC; (2) Estructura molecular de (A) PLGA; (B) PEG; (C) CS y (D) THC.

Tal como se observa en la figura 44, para el espectro del PLGA (espectro A) se encontró una banda a 2986 y 2962 cm^{-1} , que correspondía a las vibraciones de tensión del grupo $-\text{CH}$. Además, a

1746 cm^{-1} apareció un gran pico de absorción, correspondiente a las vibraciones de tensión del grupo $-\text{COO}-$ (Shen y cols., 2011).

En el espectro de PEG (espectro B), la banda de absorción a 1092 cm^{-1} se atribuyó a la característica vibración de flexión de C-O-C de las unidades OCH_2CH_2- repetidas en su estructura básica molecular (Kassim y cols., 2006; Petrova y cols., 2008) y dos bandas de absorción a 1359 y 2883 cm^{-1} se atribuyeron a la vibración de flexión y la vibración de tensión de C-N, respectivamente (Wang y cols., 2007). El PEG puro también mostró distintos picos distintos a ~ 1278 y 845 cm^{-1} .

Por otro lado, en el espectro de CS (espectro C) se observó una gran banda característica (a 3360 cm^{-1}), la cual se atribuyó a las vibraciones de tensión de $-\text{NH}_2$ y los grupos $-\text{OH}$ en la molécula de CS. Además, a 1749 cm^{-1} se observó un gran pico de absorción correspondiente a la vibración de flexión del grupo amida (Parveen y Sahoo, 2011).

A continuación, para confirmar la presencia de los diferentes componentes en las nanopartículas, se llevaron a cabo análisis de FTIR de las formulaciones de nanopartículas desarrolladas. Para las nanopartículas de PLGA sin modificar (espectro D), se obtuvo el mismo espectro de IR que para el PLGA puro (espectro A). Sin embargo, se encontraron picos a ~ 1455 y ~ 2883 cm^{-1} , característicos de los grupos amino del CS en las nanopartículas recubiertas de CS-PLGA (espectro F), los cuales también se encontraron en el espectro de CS puro. La aparición de estos picos en las nanopartículas recubiertas con CS sugieren una modificación catiónica de las nanopartículas (RaviKumar

y cols., 2004), lo que explicaría la carga superficial positiva de estas formulaciones.

También se encontraron los picos característicos de PEG (picos de absorción a 841, 1077, 1278, 1360 y 2884 cm^{-1} para partículas recubiertas con PEG (espectro E); y 842, 1092, 1362 y 2883 cm^{-1} para la formulación de PEG-CS-PLGA (espectro F), lo que indica que el proceso de recubrimiento con PEG ha sido realizado con éxito (Parveen y Sahoo, 2011).

Por último, considerando el espectro de IR del THC se puede confirmar la presencia del mismo en las nanopartículas analizadas, por la aparición del pico característico a 2361 cm^{-1} tanto en el espectro del fármaco aislado (espectro G), como en los espectros de las nanopartículas elaboradas (espectros D, E y F). Este pico característico, junto con la gran banda de absorción a 3345, 2937 y 2829, se deben a las vibraciones de tensión del grupo $-\text{COOH}$ presente en la molécula de THC (Kupper, 2010).

3.5. Estudio de adsorción superficial de proteínas

Las proteínas séricas se adhieren, generalmente, a la superficie sólida e hidrófoba de las nanopartículas, con la finalidad de minimizar su energía de superficie, conduciendo a un aumento de la entropía conformacional y promoviendo el aumento en la absorción fagocítica de las nanopartículas (Mosqueira y cols., 1999).

La razón de la mayor permanencia de las nanopartículas en circulación sanguínea se debe, principalmente, a la influencia que ejerce la capa de PEG que inhibe estéricamente la interacción con proteínas del suero (Gref y cols., 2000).

Gref y cols., 2000, determinaron las características óptimas de la capa de PEG, en términos de espesor y densidad, para reducir simultáneamente la adsorción de proteínas de plasma, su carga superficial y la interacción con las células fagocíticas. Para estudiar dicha interacción, en el presente trabajo, se evaluó el PZ de las nanopartículas de PLGA sin modificar y modificadas superficialmente con PEG y/o CS, blancas y cargadas con THC, incubadas con albúmina de suero bovina (BSA), proteína cargada negativamente que se utilizó como modelo de proteína sérica, a una concentración de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Thiele y cols., 2003). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 45.

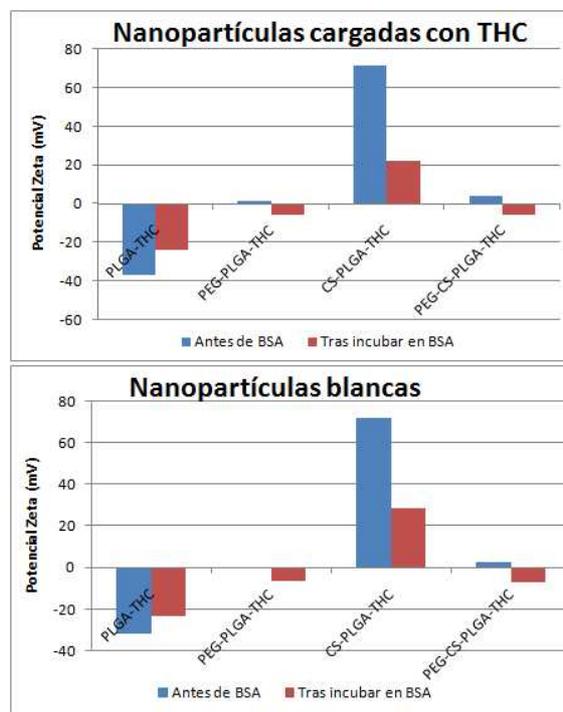


Figura 45. Valores de potencial zeta para las nanopartículas de PLGA, blancas o cargadas con THC, antes y después de la incubación en 1 mL de una solución de BSA a 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 2 horas a 37 ° C (Barra de error: D.E.; n = 3).

Las nanopartículas de PLGA sin modificar (negativas e hidrófobas) y las nanopartículas cargadas positivamente (formulación CS-PLGA) experimentaron un gran cambio en el potencial zeta, debido a la gran cantidad de proteína adsorbida, mientras que las nanopartículas recubiertas con PEG y PEG-CS, no modificaron prácticamente el valor del PZ tras la incubación en BSA, lo que se traduce en una menor cantidad de proteínas adsorbidas que en el caso anterior. Resultados similares han sido obtenidos por Parveen y Sahoo (2011).

Las partículas hidrófobas son opsonizadas más rápidamente que las hidrofílicas, lo cual está directamente relacionado con la cantidad de proteínas unidas a la superficie. Por lo tanto, la biodistribución de las nanopartículas puede ser modificada y hasta cierto punto monitorizada, recubriendo su superficie con materiales tales como el PEG (Sempf y cols., 2013).

3.6. Estudio de hemocompatibilidad

Los resultados obtenidos del ensayo de hemocompatibilidad (tabla 27) sugieren claramente un amplio margen de seguridad *in vivo* tras la administración de las partículas diseñadas en este trabajo.

Para todas las formulaciones ensayadas se obtuvieron porcentajes de hemólisis inferiores al 2.5 % por lo que pueden considerarse totalmente hemocompatibles. De hecho, es de esperar que no presenten ningún tipo de efecto hemolítico ya que no modificaron los niveles de sP-selectina, al sistema de activación del complemento ni los tiempos de coagulación plasmáticos.

Resultados similares se han obtenido para otro tipo de nanopartículas, presentando un margen de seguridad *in vivo* elevado

(Dash y cols., 2010; Arias y cols., 2011; Pérez-Artacho y cols., 2012; Martín-Banderas y cols., 2013).

Formulación	Hemólisis (%)	sP-selectina liberada (ng/mL)	C3a desArg (ng/mL)	T _{1/2 máx} (min)
PLGA blancas	2.1 ± 0.2	96 ± 9	293 ± 7	10.5 ± 0.7
PLGA cargadas	1.9 ± 0.4	103 ± 7	289 ± 8	11.1 ± 0.5
PEG-PLGA blancas	2.2 ± 0.6	104 ± 5	291 ± 5	12.1 ± 0.8
PEG-PLGA cargadas	1.8 ± 0.8	101 ± 8	296 ± 8	11.6 ± 1.2
PEG-CS-PLGA blancas	2.3 ± 0.6	106 ± 4	294 ± 7	12.4 ± 0.9
PEG-CS-PLGA cargadas	2.4 ± 0.3	98 ± 9	288 ± 9	11.7 ± 1.3
Control (solución de PBS)	0	97 ± 13	284 ± 12	12.3 ± 1.1

Tabla 27. Hemocompatibilidad de las nanopartículas de PLGA blancas y cargadas con THC (5 % p/p), sin modificar y modificadas superficialmente, en términos de hemólisis (%); activación plaquetaria (sP-selectina liberada, ng/mL), activación del complemento (liberación de C3a: C3a desArg, ng/mL) y tiempo de coagulación plasmática (T_{1/2 máx}, min).

3.7. Perfil de liberación *in vitro*

Se sabe que el perfil de liberación de un fármaco desde un sistema nanométrico es, en general, más prolongado y sostenido en el tiempo que el del mismo fármaco libre administrado vía oral. Por lo que estos sistemas se presentan como una alternativa real, útil, y de mayor eficacia al minimizar posibles efectos adversos que los sistemas de administración convencionales.

Los perfiles de liberación obtenidos para el THC desde las distintas formulaciones de nanopartículas ensayadas en el presente trabajo se recogen en la figura 46. Como puede observarse, todas las formulaciones presentaron perfiles de liberación controlados durante 6 días. En todos los casos, se observaron perfiles de liberación bifásicos con un periodo inicial de liberación más rápido.

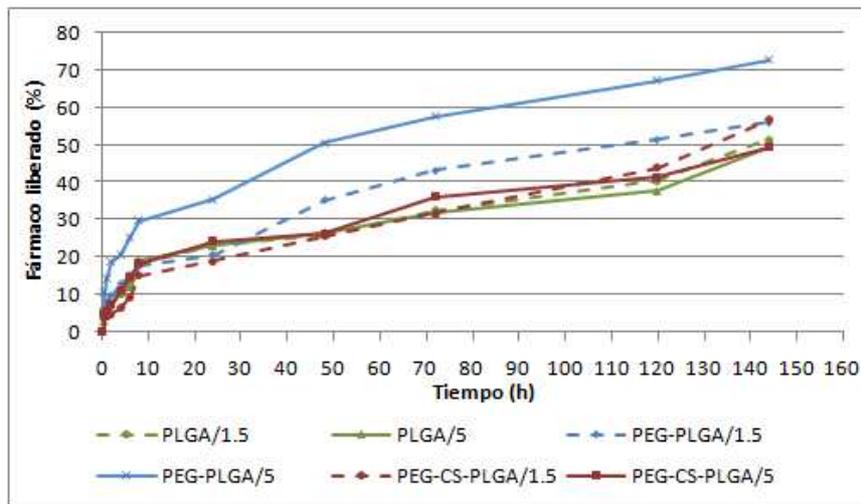


Figura 46. Perfiles de liberación *in vitro* de nanopartículas de PLGA modificadas y sin modificar superficialmente en función de la carga del fármaco: 1.5 y 5 % p/p.

En la primera etapa de la liberación, cierta cantidad de fármaco que ha podido quedar en la superficie de las partículas, es liberado más rápidamente. A continuación, el perfil de liberación se enlentece debido a que el THC, muy lipófilo, ha de salir desde el interior de la partícula.

Por otro lado, al comparar los perfiles obtenidos para las formulaciones modificadas superficialmente, se observa un aumento en la velocidad de liberación del THC, lo que sugiere que tanto PEG como CS aumentan la hidrofilia de las nanopartículas, favoreciendo la penetración de agua al sistema y, por lo tanto, la hidrólisis del PLGA y la liberación del THC (Patel y cols., 2012; Kumari y cols., 2010; Chan y cols., 2009). Sin embargo, se observa un menor grado de liberación para las nanopartículas de PEG-CS-PLGA, que podría estar causado por la adición de capas tanto de PEG como de CS sobre la superficie de las nanopartículas, actuando como una barrera adicional y obstaculizando la difusión del fármaco hacia el medio de liberación. En

el caso de partículas sin modificar se observó un perfil de liberación algo más lento para aquellas partículas que contenían menor carga de THC.

El ensayo de liberación sólo duró seis días ya que, tras analizar mediante HPLC las muestras a este tiempo, se observó un elevado grado de degradación del THC. El PLGA, polímero biodegradable aprobado por la FDA, es un poliéster alifático semicristalino que en medio acuoso se degrada lentamente generando un microambiente ácido (Fu y cols., 2000), lo que afecta seriamente a la estabilidad del THC (Hernán Pérez de la Ossa y cols., 2012).

Por esta razón, se añadió vitamina E como antioxidante a la formulación. Al observar de nuevo los resultados de los perfiles de liberación a tiempos mayores, se comprobó que la estabilidad del THC en este caso fue del 66.7 %, mayor que sin el empleo de la vitamina E pudiendo continuar el ensayo durante un total de diez días.

Por último, se llevó a cabo un ajuste cinético de los perfiles de liberación (tabla 28) encontrándose una relación lineal de los porcentajes de THC liberados, frente a la raíz cuadrada del tiempo (coeficientes de correlación adecuados, $R^2 > 0.95$), lo que indicaría que el mecanismo predominante de liberación del THC desde las nanopartículas de PLGA fue principalmente difusional.

Carga THC (% p/p)	Formulación	R ²
1.5 %	PLGA	0.9794
	PEG-PLGA	0.9853
	PEG-CS-PLGA	0.9708
5 %	PLGA	0.9747
	PEG-PLGA	0.9857
	PEG-CS-PLGA	0.957

Tabla 28. Valores de R² obtenidos tras el ajuste cinético del perfil de liberación *in vitro* de las nanopartículas de PLGA sin modificar y modificadas superficialmente, a baja dosis (1.5 % p/p) y alta dosis (5 % p/p) del THC.

Sobre esta cuestión no hay muchos trabajos publicados (Bozkir y Saka, 2005; Dillen y cols., 2006; Chakravarthi y Robinson, 2011). Sin embargo, en todos ellos los autores están de acuerdo que los perfiles de liberación se ajustan a un modelo cinético de Higuchi. La erosión lenta y gradual que sufren las partículas juega un papel importante. La mezcla del PLGA con diferentes sustancias permite obtener materiales con diferente balance hidrófilo/hidrófobo que modulan la erosión de la matriz polimérica.

3.8. Estudios celulares *in vitro*

3.8.1. Estudios de captación celular *in vitro*

El efecto terapéutico de las nanopartículas cargadas con THC dependerá de su internalización y retención por parte de las células. Aunque los procesos *in vivo* e *in vitro* pueden resultar diferentes, una investigación del comportamiento *in vitro* de estos sistemas puede aportar una información preliminar que evidencie sus ventajas. Puesto que la vía de administración de estas partículas será la vía oral, en este estudio se han utilizado células de cáncer de colon humano, Caco-2, aceptadas como el mejor modelo *in vitro* de mucosa intestinal.

En la bibliografía se puede encontrar algunos trabajos que evidencian una mayor captación celular de partículas de PLGA modificadas superficialmente frente a las que no han sido modificadas (Danhier y cols., 2009; Rajapaksa y cols., 2010).

En el presente estudio, se evaluó la captación celular de nanopartículas fluorescentes sin modificar y modificadas superficialmente, de forma cualitativa (microscopía láser confocal de barrido (CLSM)) y cuantitativa (citometría de flujo).

En el estudio por microscopía láser confocal de barrido, la figura 47 muestra las imágenes obtenidas por CLSM después de 30 minutos de incubación con nanopartículas fluorescentes (Nile-Red) sin modificar y modificadas superficialmente. Tal como se observan en las imágenes, las partículas se encuentran adsorbidas a la superficie celular de las células Caco-2 e, incluso, para las formulaciones en que las nanopartículas se modificaron superficialmente con PEG y CS, las partículas han sido internalizadas en las células. Autores como Reix y cols., 2012, des Rieux y cols., 2006 y Gaumet y cols., 2010, han descrito comportamientos similares para las nanopartículas de PLGA sin modificar y modificadas superficialmente con polímeros hidrófilos como el quitosano (CS).

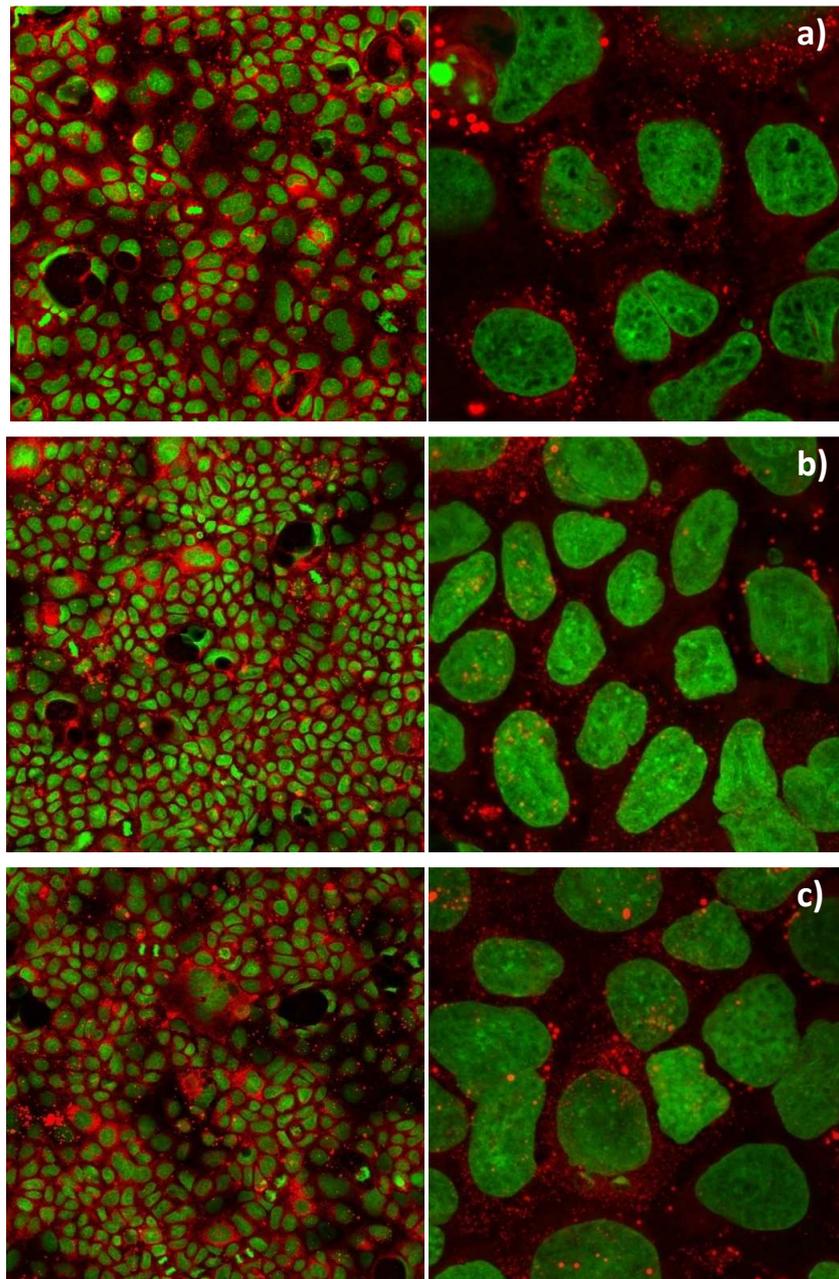


Figura 47. Imágenes obtenidas por CLSM de células Caco-2 tras la incubación de: a) nanopartículas de PLGA sin modificar; b) nanopartículas de PLGA modificadas con polietilenglicol (PEG) y c) nanopartículas de PLGA modificadas con quitosano y polietilenglicol (PEG-CS); (fluorocromo: Nile-Red; tiempo de incubación= 30 minutos).

Con idea de confirmar los resultados del análisis cualitativo y establecer una cinética de captación de las nanopartículas, en función del tiempo de incubación, se llevó a cabo un estudio cuantitativo mediante citometría de flujo.

Para dicho análisis, se añadieron 200 μL de una suspensión de nanopartículas (concentración de partículas: 4 mg/mL) a un cultivo de células Caco-2. Tras 0,5, 1, 2, 4, 6 y 24 h de incubación, las células fueron analizadas en el citómetro. El objetivo fue obtener un perfil de la cinética de captación celular, evaluando el efecto de las diferentes modificaciones superficiales llevadas a cabo (figura 48).

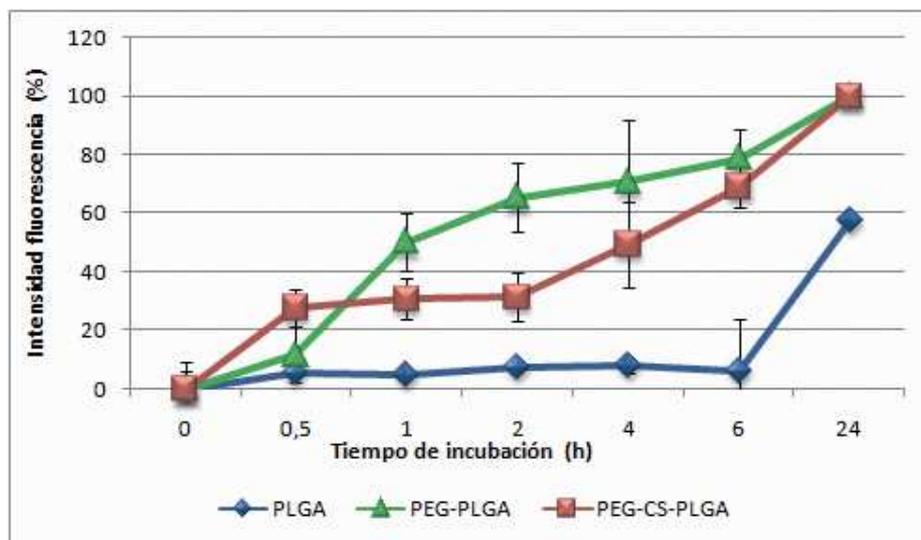


Figura 48. Efecto del tiempo de incubación y de las modificaciones superficiales sobre las nanopartículas de PLGA cargadas con THC (5 % p/p), sobre la captación de las nanopartículas por células Caco-2. (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $n = 6$).

Los resultados de la figura 48 muestran que el porcentaje de captación celular es un proceso dependiente del tiempo y muestra una clara influencia de cada uno de los aditivos empleados en los procesos

de modificación superficial. En el caso de las partículas sin modificar, se observa que la captación celular es constante durante las 6 primeras horas de ensayo siendo menor del 10 % y que tras 24 h de incubación, sólo un 60 % de las nanopartículas han sido captadas por las células.

Sin embargo, cuando se estudian las cinéticas de captación para las formulaciones PEG-PLGA y PEG-CS-PLGA, se observa una relación lineal en los dos casos con una mayor pendiente en el segundo caso. Las ecuaciones obtenidas para las dos formulaciones fueron: PEG-PLGA ($R^2= 0.9085$); $y = 14.326x - 13.28$; y para PEG-CS-PLGA ($R^2 = 0.9395$); $y = 16.236x - 11.089$, alcanzándose un 70 y 80 % de captación celular tras 6 horas de incubación y un 100 % tras 24 h.

Llama la atención las diferencias encontradas para estas dos formulaciones en los primeros tiempos de incubación. La cantidad de partículas captadas con PEG-CS ronda el 27 % en los 30 primeros minutos de incubación mientras que para las recubiertas solo con PEG ronda el 12 %, un 55 % menos. Sin embargo, tras 2 h la tendencia es la inversa, lo que parece indicar una saturación por parte de las células cuando son incubadas con partículas de PEG-CS-PLGA en los primeros tiempos, seguido de una meseta hasta las 4 h para luego continuar la internalización. Resultados similares han sido observados por otros autores (Harush-Frenkel y cols., 2008). El aumento de la asociación celular con partículas de PLGA recubiertas con CS ha sido previamente descrito y es atribuido a la potente propiedad mucoadhesiva del CS. Debido a esta potente actividad, la internalización de las partículas en las células es promovida en los primeros minutos de exposición, como así se ha demostrado en este estudio.

3.8.2. Viabilidad celular *in vitro*: Estudio de la actividad antitumoral

Los estudios de viabilidad celular se realizaron con la finalidad de determinar las concentraciones de THC, vehiculizado en las partículas, que presentan una actividad antitumoral en células cancerosas (Gustafsson y cols., 2009). Para este propósito, se llevó a cabo un ensayo MTT tal y como se ha descrito en el correspondiente apartado de Materiales y Métodos (Vihola y cols., 2005).

En este ensayo, se emplearon varias líneas celulares, cancerosas y no cancerosas, con el fin de demostrar la actividad anticancerígena y la selectividad del THC con independencia de la línea celular estudiada.

En primer lugar, se evaluó la viabilidad celular *in vitro* de las células Caco-2, células humanas epiteliales de adenocarcinoma de colon (Alhamoruni y cols., 2010), tras la incubación de las diferentes formulaciones desarrolladas, con concentraciones de fármaco en el intervalo 25-150 μM y administrando un peso de nanopartículas entre 0.16 y 0.96 mg/mL. Para validar el ensayo, como control negativo se utilizaron las células no tratadas y como control positivo se utilizó DMSO, que ha demostrado ser tóxico para la concentración ensayada. Además, se incubaron también en trealosa, para asegurar su inocuidad, ya que las nanopartículas iban suspendidas en una solución de trealosa al 5 % p/v utilizado como crioprotector durante la liofilización. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 49.

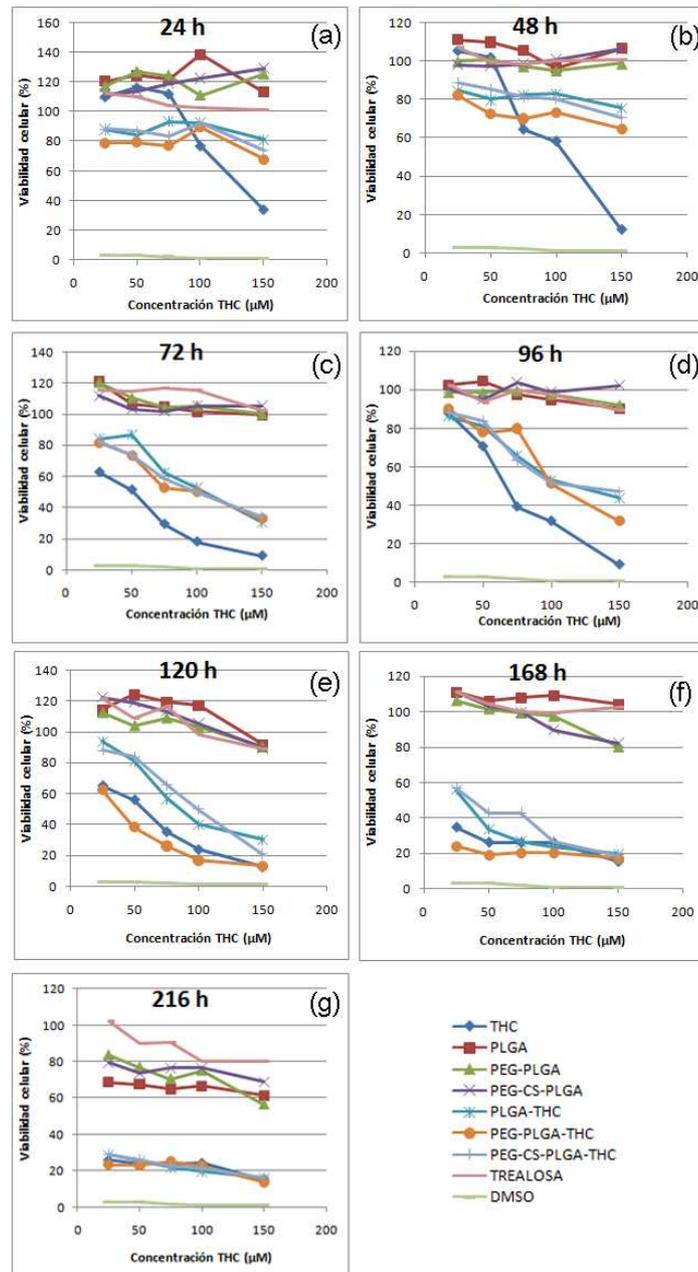


Figura 49. Viabilidad celular en células Caco-2 tras la incubación de las nanopartículas de PLGA sin modificar y modificadas superficialmente, blancas y cargadas con THC a diferentes concentraciones. a) 24 horas, b) 48 horas, c) 72 horas, d) 96 horas, e) 120 horas, f) 168 horas y g) 216 horas.

En relación con los resultados obtenidos para las formulaciones de nanopartículas sin THC (blancas), el análisis factorial de varianza realizado demostró una influencia estadísticamente significativa de las variables en estudio (formulación, cantidad de nanopartículas y tiempo de incubación) sobre la viabilidad celular de la línea celular caco-2 ($F = 5.543$; $p < 0.05$; $n=105$).

Tal como se observa en la figura 49, la viabilidad celular se mantuvo alrededor del 100 % para las formulaciones sin THC (y para la trealosa) a los primeros tiempos estudiados. Sin embargo, se encontró un pequeño porcentaje de citotoxicidad (viabilidad celular < 90 %) a los últimos tiempos de incubación (216 h, para todas las concentraciones estudiadas; 168 h para las concentraciones de 100 y 150 μM en las nanopartículas de PEG-CS-PLGA y para la concentración de 150 μM en las nanopartículas de PEG-PLGA; y 120 h, para las concentraciones de 100 y 150 μM en las nanopartículas de PEG-CS-PLGA). Estos resultados, se relacionan con una interacción estadísticamente significativa encontrada entre los efectos de la variable formulación y tiempo, que implica que la influencia de las diferentes formulaciones ensayadas sobre la viabilidad celular evaluada en células Caco-2 es diferente en función del tiempo ensayado

Estos resultados podrían explicarse por la posible acidificación que experimenta el medio de cultivo donde se encuentran las células, debido a la degradación que experimenta el PLGA a lo largo de los días. Es frecuente que, aunque se proporcionen las condiciones *sink* para la liberación *in vitro* de los fármacos, el difícil mantenimiento de estas condiciones, más los productos de degradación producidos por las propias células a lo largo de los días, produzcan la degradación del PLGA (Klose y cols., 2011; Tran y cols., 2012; Fu y cols., 2000).

Además, el *post hoc* de Student-Newman-Keuls (SNK), llevado a cabo cuando la prueba de ANOVA factorial es significativa, considera la configuración de las formulaciones ensayadas en dos grupos según el efecto que tiene sobre la viabilidad celular: i) PEG-CS-PLGA y PEG-PLGA y ii) PLGA sin modificar, ($p < 0.05$).

Por otro lado, para todas las formulaciones cargadas con THC, así como para el THC libre, la actividad antitumoral fue concentración-, formulación- y tiempo-dependiente ($F = 26.647$; $p < 0.05$; $n=140$). De hecho, el análisis factorial de varianza realizado mostró interacciones significativas de la concentración de THC con respecto a la formulación ($p < 0.05$) y del tiempo de incubación con respecto a la formulación ($p < 0.05$). En este caso, el *post hoc* de Student-Newman-Keuls (SNK) llevado a cabo, mostró que las diferencias significativas ($p < 0.05$) encontradas para el efecto del parámetro de la formulación sobre la viabilidad celular define los siguientes subconjuntos homogéneos: i) THC; ii) PEG-PLGA y iii) PEG-CS-PLGA y PLGA sin modificar.

En relación al THC libre, la disminución de la viabilidad celular fue más acusada que para las nanopartículas cargadas con THC en los primeros tiempos, lo cual podría ser debido a que: (i) el ajuste de la dosis de fármaco encapsulado se hace por una aproximación y (ii) el THC encapsulado no ha liberado la misma cantidad.

Cuando las células se incubaron con el THC libre, la concentración de THC se mantuvo constante en todo el periodo de incubación. Sin embargo, cuando se incubaron con las nanopartículas, el THC se liberó lentamente en el medio. De acuerdo con los resultados de los estudios de liberación *in vitro*, a partir de 120 horas, entre el 40-65 % (según formulación) del fármaco se ha liberado en el medio, lo que representa

una cantidad de THC entre 60-97.50 μM para la concentración de nanopartículas más alta y, por lo tanto, una actividad antitumoral potenciada en las nanopartículas, equiparable a la del THC libre, a la concentración real de 150 μM .

Los resultados obtenidos de los estudios de viabilidad celular llevado a cabo para estudiar la actividad antitumoral del THC concuerdan con los obtenidos por Gustaffson y cols., 2009; Hernán Pérez de la Ossa y cols., 2012; Van Dross y cols., 2012; y Ligresti y cols., 2003. En estos trabajos, varios derivados cannabinoides han demostrado un potencial efecto antitumoral a bajas concentraciones en determinados tipos de cáncer, como mama o colon.

En concreto, Hernán Pérez de la Ossa y cols., 2012, estudiaron el efecto sobre la viabilidad celular en la línea celular MDA-MB-231 de micropartículas de poli- ϵ -caprolactona cargadas con cannabidiol (CBD) durante 9 días. Los resultados mostraron una citotoxicidad de las micropartículas de CBD mayor que la obtenida con el fármaco libre en los días 4 y 7, pero inferior a 9 días. Los autores correlacionaron estos resultados a los obtenidos de los estudios de liberación *in vitro*.

Por último, se calculó la dosis letal 50 (DL_{50}) del THC libre y las nanopartículas cargadas con THC que experimentaron una actividad citotóxica para, al menos, la mitad del conjunto de células estudiadas. La DL_{50} se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$DL_{50} = 10 \left[\frac{(50 - V_{<50}) \times (\log_{10} C_{>50} - \log_{10} C_{<50})}{(V_{>50} - V_{<50})} \right] + \log_{10} C_{<50}$$

Donde $V_{<50}$ es la viabilidad inmediatamente inferior al 50 % del conjunto de la población, $V_{>50}$ la viabilidad inmediatamente superior al

50 %, $C_{<50}$ es la concentración a la cual se obtiene la $V_{<50}$ y $C_{>50}$ es la concentración a la cual se obtiene la $V_{>50}$.

En la tabla 29 se muestran los valores de DL_{50} obtenidos para el THC libre y para las nanopartículas cargadas con THC, a diferentes tiempos de incubación. Los resultados se presentan como los valores medios de $DL_{50} \pm$ desviación estándar (D.E.), calculados a partir de tres experimentos independientes.

Formulación	Tiempo incubación (h)	$DL_{50} \pm$ D.E. (μ M)
THC	24	125.70 \pm 30.59
THC	48	99.00 \pm 22.10
THC	72	48.45 \pm 12.02
THC	96	65.36 \pm 2.01
THC	120	56.01 \pm 2.75
PLGA-THC	72	105.00 \pm 7.12
PLGA-THC	96	115.02 \pm 6.62
PLGA-THC	120	87.10 \pm 7.83
PLGA-THC	168	30.15 \pm 4.74
PEG-PLGA-THC	72	92.68 \pm 18.98
PEG-PLGA-THC	96	102.11 \pm 6.19
PEG-PLGA-THC	120	36.93 \pm 9.24
CS-PEG-PLGA-THC	72	95.36 \pm 17.84
CS-PEG-PLGA-THC	96	126.65 \pm 24.14
CS-PEG-PLGA-THC	120	99.62 \pm 0.76
CS-PEG-PLGA-THC	168	34.92 \pm 1.72

Tabla 29. Valores de DL_{50} obtenidos para el THC libre y para las nanopartículas cargadas con THC, a diferentes tiempos de incubación.

Por lo tanto, como resumen de los estudios de viabilidad celular *in vitro* de las células Caco-2 de las nanopartículas de PLGA, blancas y cargadas con THC, se puede concluir que las nanopartículas cargadas con THC elaboradas en esta memoria, presentan una actividad antitumoral concentración-, formulación y tiempo- dependiente, directamente proporcionales a los estudios de liberación *in vitro*.

A continuación, se llevó a cabo un estudio sobre la citotoxicidad y la selectividad de las nanopartículas de PLGA de superficie modificada y sin modificar, sin carga y cargadas con THC, en células normales (MRC-5) y células cancerosas de pulmón (A549).

En este estudio, lo primero que se estableció fue la duración del tratamiento, debido a la diferencia de crecimiento de las células normales frente a las células cancerosas y a los problemas de proliferación de las células normales. Por un lado, para realizar el ensayo en las mismas condiciones, en el momento del tratamiento, se necesitan el mismo número aproximado de células normales que de células cancerosas. Después de sembrar las células en las placas, las células normales necesitan unas 24 horas para poderse adaptar al nuevo medio. Si se tratan antes de ese tiempo, existe la posibilidad de que el ensayo no salga bien. Sin embargo, en 24 horas las células cancerosas se han habituado a la placa y, posiblemente, a dividirse. Por ello, se puso a punto una técnica, de forma que si se siembran dos quintas partes menos de células cancerosas respecto a las células normales, a un tiempo de 72 horas, ambas líneas se encuentran en el mismo número aproximadamente. Además, se limitó el número de células a sembrar debido a una posible saturación del pocillo. El día del experimento, las células no deben llegar a saturación, ya que pueden parar su proliferación o su metabolismo, influyendo en los resultados. Esto limita el número de células y el tiempo de tratamiento. Para un tiempo de incubación de más de 72 horas, el número de células cancerosas a sembrar debería ser muy pequeño para evitar la saturación de los pocillos, y el número de células normales también pequeño, para que el número de células sea lo más aproximado el día del tratamiento. Sin embargo, la siembra de un número muy pequeño

de células normales no es posible, debido a que necesitan una densidad elevada para poder crecer.

Así, establecido el tiempo de tratamiento a 72 horas, se incubaron las diferentes formulaciones desarrolladas, con concentraciones de fármaco en el intervalo 0.1-50 μM y administrando un peso de nanopartículas entre 0.06 y 0.32 mg/mL. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 50.

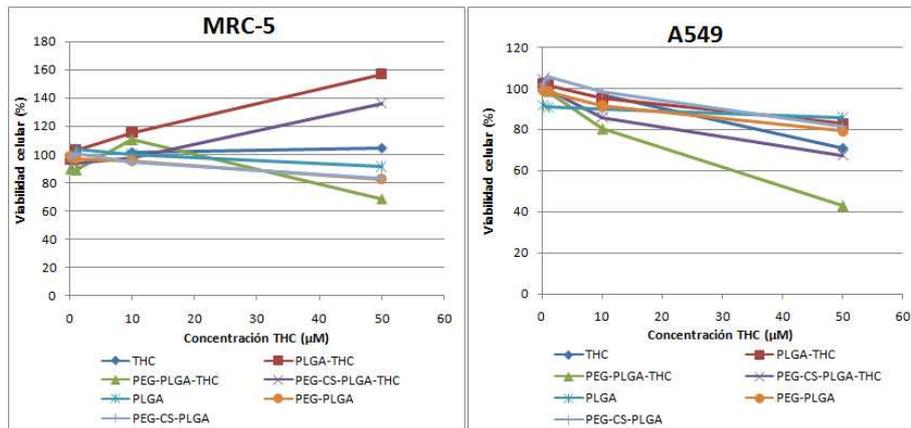


Figura 50. Viabilidad celular en células MRC-5 y A549 tras la incubación de las nanopartículas de PLGA sin modificar y modificadas superficialmente, blancas y cargadas con THC a diferentes concentraciones a 72 horas.

Para las nanopartículas sin carga de THC, se produjo un descenso de la viabilidad celular en ambas líneas celulares de aproximadamente 10-15 % a las concentraciones máximas de nanopartículas. Estadísticamente, el análisis factorial de varianza realizado mostró una influencia estadísticamente significativa sobre la viabilidad celular de la línea celular MCR-5 de fibroblastos pulmonares sanos ($F = 20.454$; $p < 0.05$; $n=12$), debido a la variable formulación. La cantidad de nanopartículas incubadas no presentó influencias significativas sobre la

viabilidad celular en las condiciones estudiadas ($p = 0.195$). No obstante, el estudio estadístico sí muestra una interacción significativa entre los factores formulación y cantidad de nanopartículas ($p < 0.05$), es decir, el efecto de la formulación sobre la viabilidad celular en el estudio planteado depende de la cantidad de nanopartículas que se use en el estudio.

El análisis de *post hoc* llevado a cabo (SNK) mostró que las diferencias significativas encontradas en los valores de viabilidad celular se debían a las nanopartículas elaboradas con PEG-CS-PLGA, que son la que provocan menor viabilidad.

Para la línea celular A549, la estadística también mostró influencias estadísticamente significativas sobre la viabilidad celular ($F = 13.368$; $p < 0.05$; $n=12$), en este caso, debido a las dos variables estudiadas, la formulación y a la cantidad de nanopartículas incubadas. Sin embargo, no se encontró interacción para el efecto de ambas variables sobre la viabilidad celular ($p = 0.093$). En este caso, el *post hoc* de Student-Newman-Keuls (SNK) diferenció el efecto de las formulaciones en tres subgrupos diferentes: PEG-CS-PLGA > PLGA > PEG-PLGA.

Como sucedió en el estudio de la viabilidad celular en las células Caco-2, estos resultados podrían explicarse por la posible acidificación que experimenta el medio de cultivo donde se encuentran las células, debido a la degradación que experimenta el PLGA (Klose y cols., 2011; Tran y cols., 2012).

Para las nanopartículas cargadas con THC en la línea celular MRC-5, el análisis factorial de varianza realizado mostró un efecto significativo ($F = 25.270$, $p < 0.05$, $n=16$) en relación a las dos variables en estudio, la formulación, y la concentración de THC, así como una

interacción significativa entre el efecto de ambos parámetros. Así, puede observarse en la figura 50, que el efecto de las distintas formulaciones es diferente según la concentración de partículas usada.

En este caso, se produjo un doble comportamiento: por un lado, las PEG-PLGA-THC disminuyeron la viabilidad celular, mientras que las PLGA-THC y PEG-CS-PLGA-THC estimularon el ritmo de proliferación de las células sanas. Este hecho podría ser debido a la velocidad de liberación *in vitro* del THC en las diferentes formulaciones. Las partículas PEG-CS-PLGA y PLGA muestran unos perfiles de liberación más lento por lo que la cantidad real de fármaco disponible para inhibir la proliferación celular de las células sanas es menor en estas formulaciones (Hernán Pérez de la Ossa y cols., 2012; Hernán Pérez de la Ossa y cols., 2013).

Para la línea celular cancerosa A549, en todos los casos disminuyó la viabilidad celular conforme aumentaba la concentración de THC, aunque fue más acusada para las nanopartículas PEG-PLGA, llegando a superar al THC libre a las concentraciones más altas. Al igual que para MRC-5, los estudios estadísticos mostraron influencias significativas ($F = 35.676$, $p < 0.05$, $n=16$) en relación a la formulación y la concentración de THC, mostrándose también interacción de los efectos de ambos parámetros ($p < 0.05$). Así, el efecto de las distintas formulaciones es diferente según la concentración de partículas usada.

A las concentraciones más bajas de THC, no hay diferencias entre el fármaco libre y encapsulado para ninguna formulación. Este hecho es debido a que se necesita una concentración mayor de THC para ser citotóxico. Sin embargo, para una concentración de THC en las nanopartículas de 50 μM , las PEG-CS-PLGA y PLGA se comportan

igual y son más citotóxicas, sin duda, las PEG-PLGA. Estos resultados son extrapolables a los obtenidos para la línea celular Caco2, en la que PLGA y PEG-CS-PLGA presentan una viabilidad celular similar y las PEG-PLGA presentan una mayor actividad antitumoral.

Finalmente, se calculó la dosis letal 50 (DL_{50}) del THC libre y las nanopartículas cargadas con THC que experimentaron una actividad citotóxica para, al menos, la mitad del conjunto de células estudiadas, a partir de la ecuación anterior desarrollada para las células Caco-2.

Formulación	Línea celular	$DL_{50} \pm D.E. (\mu M)$
THC	MCR-5	99.17 ± 41.43
	A549	60.81 ± 23.57
PEG-PLGA-THC	MCR-5	76.22 ± 20.61
	A549	42.29 ± 29.28

Tabla 30. Valores de DL_{50} obtenidos para el THC libre y para las nanopartículas cargadas con THC, a 72 horas, en las dos líneas celulares estudiadas.

En este caso, sólo el THC libre y las nanopartículas de PEG-PLGA experimentaron una viabilidad celular menor al 50 % para ambas líneas celulares, aunque este valor fue más acusado en las nanopartículas de PEG-PLGA que para el THC libre, demostrando una mayor efectividad para estas nanopartículas.

Así pues, a modo resumen de los estudios de viabilidad celular *in vitro* de las células pulmonares sanas MCR-5 y cancerosas A549, de las nanopartículas de PLGA, blancas y cargadas con THC, se puede concluir, al igual que para los estudios con Caco-2, las nanopartículas cargadas con THC, principalmente las PEG-PLGA, presentaron una actividad antitumoral en la línea cancerosa A549 concentración- y tiempo- dependiente, directamente proporcionales a los estudios de liberación *in vitro* y efectos no tan acusados o en su caso, proliferativos,

en la línea celular sana MCR-5, demostrando así, una actividad antitumoral selectiva por parte de las nanopartículas cargadas con THC.

A expensas de futuros estudios *in vivo*, y teniendo en cuenta que las condiciones *in vivo* no se correlacionan directamente con los resultados obtenidos *in vitro*, debido a que en el entorno *in vivo* están presentes otros factores importantes, los resultados obtenidos en ese trabajo han demostrado que los sistemas elaborados presentan propiedades adecuadas para una posible administración oral del THC y su aplicación clínica como agente antitumoral, siendo las formulaciones modificadas con PEG las más prometedoras.

CONCLUSIONES

Como se indicó previamente, el objetivo general del presente trabajo de investigación ha sido obtener sistemas nanoparticulares de naturaleza polimérica (PLGA) conteniendo activos cannabinoides (Δ^9 -THC y CB13), destinados a una potencial administración oral para su aplicación terapéutica. Para conseguirlo, se plantearon una serie de objetivos parciales. Las conclusiones se exponen siguiendo la misma estructuración:

1. Según la literatura científica consultada, por primera vez se ha desarrollado un método analítico para los activos cannabinoides Δ^9 -THC y CB13, mediante una técnica precisa y fiable como es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para ambas moléculas, los métodos desarrollados han demostrado ser precisos, exactos, lineales, robustos y con un LOQ y LOD muy por debajo del intervalo estudiado.
2. Tras elaborar las nanopartículas por diferentes técnicas, se optó por el método de nanoprecipitación para la producción.
3. Respecto a la caracterización tecnológica de los sistemas desarrollados por nanoprecipitación:
 - 3.1. Se han obtenido poblaciones monodispersas (~ 35 % de coeficiente de variación) de tamaño nanométrico (desde ~ 100 a 850 nm, en función de la formulación), con morfología esférica y superficie lisa.
 - 3.2. Se han conseguido eficacias de encapsulación muy elevadas (> 75 % para todas las formulaciones).
 - 3.3. Se han modificado las propiedades de superficie de las nanopartículas de PLGA reduciendo tanto la hidrofobicidad como la carga superficial negativa de los sistemas originales (-32.70 mV para las nanopartículas de PLGA frente a +57.70

mV para las nanopartículas de PLGA modificadas con CS, -21.00 mV con lecitina, o +4.10 mV con PEG).

3.4. Se garantiza que:

3.4.1. Existe compatibilidad fisicoquímica entre los activos cannabinoides y el resto de los componentes de las formulaciones, según los análisis térmicos efectuados.

3.4.2. Los estudios de tamaño permiten concluir la estabilidad física de las nanopartículas tras su incubación en diferentes medios.

3.4.3. Los componentes de los sistemas, tanto polímeros como activos cannabinoides, mantienen su integridad tras el proceso de nanoencapsulación, según los análisis por espectroscopía infrarroja transformada de Fourier.

3.4.4. Se mantiene el control en el tamaño y la homogeneidad de las nanopartículas tras el proceso de liofilización, gracias a la adición de crioprotectores.

4. En relación con la caracterización biofarmacéutica:

4.1. Los estudios de liberación *in vitro* mostraron:

4.1.1. Un perfil bifásico para todos los sistemas desarrollados: (i) una primera etapa de liberación inmediata (difusión de los activos localizados a nivel más superficial de la matriz polimérica), y (ii) una segunda etapa, de velocidad de liberación muy controlada (debido a la degradación de la matriz polimérica).

4.1.2. Una liberación mantenida durante 10 días para el THC y 15 días para el CB13.

- 4.1.3. La integridad de los activos cannabinoides durante todo el estudio de liberación, tras no detectarse productos de hidrólisis o de degradación para ninguno de los activos.
- 4.2. La mucoadhesión de las nanopartículas fue superior cuando los sistemas se modificaron superficialmente con polímeros hidrófilos como quitosano y Eudragit® (55.86 % de mucoadhesividad para las nanopartículas de PLGA en íleon, 85.72 % para las nanopartículas recubiertas con CS y 73.23 % para las recubiertas con Eudragit®).
5. Relativo al comportamiento sanguíneo de las nanopartículas:
 - 5.1. Los estudios de hemocompatibilidad determinaron la total compatibilidad de las formulaciones examinadas con la sangre (< 2.5 % de hemólisis para todas las formulaciones).
 - 5.2. Los estudios de adsorción de proteínas séricas a la superficie de las nanopartículas demostraron una gran eficacia del PEG, muy superior a la del CS y al PLGA sin recubrir, lo que reduciría el proceso de opsonización de las partículas.
6. Derivado de los estudios de interacción celular, se concluye que:
 - 6.1. La internalización de las nanopartículas en las células Caco-2 es concentración y tiempo-dependiente. La eficacia fue mayor en nanopartículas modificadas superficialmente con CS o PEG.
 - 6.2. Las nanopartículas “blancas” son citocompatibles con las líneas celulares estudiadas.
 - 6.3. Respecto a los estudios de citotoxicidad:
 - 6.3.1. Las nanopartículas con CB13 mostraron una viabilidad celular adecuada con la línea celular Caco-

2. No obstante, a concentraciones submicromolares se observó una disminución significativa de la viabilidad celular concentración-dependiente y tiempo-dependiente.

6.3.2. Las nanopartículas con THC mostraron una disminución acusada de la viabilidad celular en las líneas celulares cancerosas Caco-2 y A549, pero no para MCR-5. Al igual que para el CB13, esta disminución fue concentración y tiempo-dependiente, aunque en este caso se observó para todas las concentraciones de THC estudiadas, demostrando así una potencial actividad antitumoral.

7. Como resultado preliminar *in vivo*, se obtuvo la siguiente prueba de concepto: las nanopartículas de PLGA-CB13 proporcionaron un efecto analgésico controlado y sostenido durante seis días en ratas con constricción del nervio ciático, utilizadas como modelo animal del dolor neuropático.

A modo de resumen, se puede concluir que las nanopartículas diseñadas y elaboradas en esta memoria pueden constituir una estrategia que posibilite ampliar la utilidad terapéutica de los cannabinoides, al presentar propiedades adecuadas para una eficaz administración oral de estos activos y suponer una alternativa real a sus actuales formas de administración.

FUTURO Y PERSPECTIVAS

Actualmente existen distintos proyectos y acuerdos entre nuestro grupo de investigación y otros grupos de investigación de ámbito nacional e internacional. Entre los objetivos de estas colaboraciones, podemos destacar la funcionalización de los sistemas nanoparticulares diseñados y optimizados durante el desarrollo de este trabajo de investigación; aplicar estos sistemas al tratamiento de otras enfermedades, diseñar nuevos sistemas por ejemplo, como puedan ser nanopartículas lipídicas.

En cuanto a las aplicaciones terapéuticas de las nanopartículas de cannabinoides desarrolladas en esta Tesis Doctoral, se están llevando a cabo estudios *in vivo* en animales para su posible aplicación en el tratamiento del dolor, aunque actualmente sólo se tienen datos preliminares.

Además, se está llevando a cabo otra posible aplicación terapéutica de los sistemas como agentes antitumorales, tras el estudio *in vitro* de las nanopartículas en líneas celulares cancerosas y no cancerosas.

Por otro lado, se pretende realizar estudios *in vivo* de las nanopartículas de cannabinoides desarrolladas en la presente memoria, para su utilización en enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Huntington.

Finalmente, el desarrollo de nuevas formulaciones para la administración de los cannabinoides, como las nanopartículas lipídicas, permitirá abrir un nuevo campo para la aplicación terapéutica de estos agentes.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., Fessi, H. *Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations*. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 58, 1688-1713 (2006)
- Alhamoruni, A.C., Lee, K.L., Larvin, W.M., O'Sullivan, S.E. *Pharmacological Effects of Cannabinoids on the Caco-2 Cell Culture Model of Intestinal Permeability*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 335, 92-102 (2010)
- Allémann, E., Leroux, J.C., Gurny, R., Doelker, E. *In vitro extended-release properties of drug-loaded poly(DL-lactic acid) nanoparticles produced by a salting-out procedure*. *Pharm. Res.*, 10, 1732-1737 (1993)
- Álvarez-Fuentes, J., Martín-Banderas, L., Muñoz-Rubio, I., Holgado, M.A., Fernández-Arévalo, M. *Development and Validation of an RP-HPLC Method for CB13 Evaluation in Several PLGA Nanoparticle Systems*. *The Scientific World Journal*, Article ID 737526, 9 pages (2012)
- Ameri, A. *The effects of cannabinoids on the brain*. *Prog. Neurobiol.* 58, 315-348 (1999)
- Arias, J.L., López-Viota, M., Sáez-Fernández, E., Ruiz, M.A., Delgado, A.V. *Engineering of an antitumor (core/shell) magnetic nanoformulation based on the chemotherapy agent ftorafur*. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects*, 384, 157-163 (2011)
- Arias, J.L., Sáez-Fernández, E., López-Viota, M., Biedma-Ortiz, R.A., Ruiz, M.A. *Synthesis of a biodegradable magnetic nanomedicine based on the antitumor molecule tegafur*. *Med. Chem.* 8, 516-523 (2012)

Arpagaus, C., Schafroth, N. *Spray dried biodegradable polymers for controlled drug delivery systems*. European Industrial Pharmacy, 11, 10-13 (2011)

Backonja, M. y Rowbotham, M.C. *Tratamiento Farmacológico del Dolor Neuropático*. En: Wall y Melzack, *Tratado del Dolor*, McMahon, S.B. y Koltzenburg, M. (Editores), 5ª ed., Elsevier España S.A., Madrid, 2007, pg. 1103–1111

Balducci, L. *Molecular insight in cancer treatment and prevention*. Int. J. Biochem. Cell B, 39, 1329-1336 (2007)

Baños, J.E., Sánchez, G., Berrendero, F., Maldonado, R. *Neuropathic pain: some clues for future drug treatments*. Mini Rev. Med. Chem., 3, 719-727 (2003)

Barichello, J.M., Morishita, M., Takayama, K., Nagai, T. *Encapsulation of Hydrophilic and Lipophilic Drugs in PLGA Nanoparticles by the Nanoprecipitation Method*. Drug Dev. Ind. Pharm., 25, 471-476 (1999)

Barratt, G.M. *Therapeutic applications of colloidal drug carriers*. Pharm. Sci. Technol. To., 3, 163-171 (2000)

Beck, R.C., Ourique, A.F., Guterres, S.S., Pohlmann, A.R. *Spray-dried polymeric nanoparticles for pharmaceuticals: a review of patents*. Recent Pat. Drug Deliv. Formul., 6, 195-208 (2012)

Belgamwar, V., Shah, V., Surana, S.J. *Formulation and evaluation of oral mucoadhesive multiparticulate system containing metoprolol tartarate: an in vitro-ex vivo characterization*. Curr. Drug Deliv., 6, 113-121 (2009)

Ben Amar, M. *Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential*. J. Ethnopharmacol, 105, 1-25 (2006)

- Bender, E.A., Adorne, M.D., Colomé, L.M., Abdalla, D.S., Guterres, S.S., Pohlmann, A.R. *Hemocompatibility of poly(ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan*. *Int. J. Pharm.*, 426, 271-279 (2012)
- Berkland, C., Kim, K., Pack, D.W. *PLGA microsphere size controls drug release rate through several competing factors*. *Pharm. Res.*, 20, 1055-1062 (2003)
- Berthomieu, C., Hienerwadel, R. *Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy*. *Photosynth Res*, 101, 157–170 (2009)
- Bhavsar, M.D. y Amiji, M.M. *Polymeric nano- and microparticle technologies for oral gene delivery*. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 4, 197-213 (2007)
- Bouhassira, D., Attal, N., Fermanian, J., Alchaar, H., Gautron, M., Masquelier, E., Rostaing, S., Lanteri-Minet, M., Collin, E., Grisart, J., Boureau, F. *Development and validation of the Neuropathic Pain Symptom Inventory*. *Pain*, 108, 248-257 (2004)
- Bozkir, A., Saka, O.M. *Formulation and investigation of 5-FU nanoparticles with factorial design-based studies*. *Farmaco*, 60, 840-846 (2005)
- Brotchie, J.M. *CB1 cannabinoid receptor signalling in Parkinson's disease*. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 3, 54-61 (2003)
- Brownjohn, P.W., Ashton, J.C. *Cannabinoids and Neuropathic Pain*. *Neuropathic Pain*, Cyprian ChukwunonyeUdeagha (Ed.) (2012), ISBN: 978-953-51-0452-0, InTech, DOI: 10.5772/36889. Available from: <http://www.intechopen.com/books/neuropathic-pain/cannabinoids-and-neuropathic-pain>. (Fecha consulta: Enero 2013)

- Budhian, A., Siegel, S.J., Winey, K.I. *Controlling the in vitro release profiles for a system of haloperidol-loaded PLGA nanoparticles*. Int. J. Pharm., 346, 151-159 (2007)
- Byrappa, K., Ohara, S., Adschiri, T. *Nanoparticles synthesis using supercritical fluid technology-towards biomedical applications*. Adv. Drug Deliv. Rev., 60, 299-327 (2008)
- Cabral, G.A., Griffin-Thomas, L. *Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation*. Expert. Rev. Mol. Med. 20, e3 (2009)
- Caffarel, M.M., Andradas, C., Pérez-Gómez, E., Guzmán, M., Sánchez, C. *Cannabinoids: A new hope for breast cancer therapy?*. Cancer Treatment Reviews, 38, 911–918 (2012)
- Calzone, K.A. *Genetic Biomarkers of Cancer Risk*. Semin. Oncol. Nursing, 28, 122-128 (2012)
- Campbell, F.A., Trámer, M.R., Carrol, D., Reynolds, D.J.M., Moore, R.A. *Are cannabinoids an effective and safe treatment option in the management of pain? A qualitative systematic review*. BJM, 323, 13-16 (2001)
- Campolongo, M.J. y Luo, D. *Drug delivery: Old polymer learns new tracts*. Nat. Mater., 8, 447-448 (2009)
- Carter, G.T., Abood, M.E., Aggarwal, S.K., Weiss, M.D. *Cannabis and Amyotrophic Lateral Sclerosis: Hypothetical and Practical Applications, and a Call for Clinical Trials*. Am. J. Hosp. Palliat. Care, 27, 347-356 (2010)

- Cenni, E., Granchi, D., Avnet, S., Fotia, C., Salerno, M., Micieli, D., Sarpietro, M.G., Pignatello, R., Castelli, F., Baldini, N. *Biocompatibility of poly(d , l -lactide-co-glycolide) nanoparticles conjugated with alendronate*. *Biomaterials*, 29, 1400–1411 (2008)
- Cetin, M., Aktas, M.S., Vural, I., Ozturk, M. *Salmon calcitonin-loaded Eudragit(R) and Eudragit(R)-PLGA nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation*. *J. Microencap.*, 29,156-166 (2012)
- Cetin, M., Atila, A., Kadioglu, Y. *Formulation and In vitro Characterization of Eudragit (R) L100 and Eudragit(R) L100-PLGA nanoparticles containing diclofenac sodium*. *AAPS PharmSciTech.*, 11,1250-1256 (2010)
- Cetin, M., Atila, A., Selma, S., Vural, I. *Preparation and characterization of metformin hydrochloride loaded-Eudragit® RSPO and Eudragit® RSPO/PLGA nanoparticles*. *Pharm. Dev. Tech.*, 14, 1-7 (2011)
- Chakravarthi, S.S., Robinson, D.H. *Enhanced cellular association of paclitaxel delivered in chitosan-PLGA particles*. *Int. J. Pharm.*, 409, 111-120 (2011)
- Chan, J.M., Zhang, L., Yuet, K.P., Liao, G., Rhee, J.W., Langer, R., Farokhzad, O.C. *PLGA-lecithin-PEG core-shell nanoparticles for controlled drug delivery*. *Biomaterials*, 30, 1627-1634 (2009)
- Chen, H., Khemtong, C., Yang, X., Chang, X., Gao, J. *Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs*. *Drug Discov. Today*, 16, 354-360 (2011)
- Chen, J., Li, S., Shen, Q. *Folic acid and cell-penetrating peptide conjugated PLGA–PEG bifunctional nanoparticles for vincristine sulfate delivery*. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 47, 430-443 (2012)

Chen, P.C., Mwakwari, S.C., Oyelere, A.K. *Gold nanoparticles: From nanomedicine to nanosensing*. Nanotech., Sci. App., 1, 45-66 (2008)

Childs, C.E. *The determination of polyethylene glycol in gamma globulin solutions*. Microchem J., 20, 190-192 (1975)

Chorny, M., Fishbein, I., Danenberg, H.D., Golomb, G. *Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics*. J. Control. Release, 83, 389-400 (2002)

Chronopoulou, L., Massimi, M., Giardi, M.F., Cametti, C., Devirgiliis, L.C., Dentini, M., Palocci, C. *Chitosan-coated PLGA nanoparticles: A sustained drug release strategy for cell cultures*. Colloid Surface B, 103, 310-317 (2013)

Chun, J.Y., Choi, M.J., Min, S.J., Weiss, J. *Formation and stability of multiple-layered liposomes by layer-by-layer electrostatic deposition of biopolymers*. Food Hydrocolloid., 30, 249-257 (2013)

Clamp, A., Danson, S., Clemons, M. *Hormonal and genetic risk factors for breast cancer*. Surg., 1, 23-31 (2003)

Clas, S.D., Dalton, C.R., Hancock, B.C. *Differential scanning calorimetry: applications in drug development*. Pharm. Sci. Technol. To., 2, 311-320 (1999)

Compton, D., Aceto, M.D., Lowe, J., Martin, B.R. *In vivo characterization of a specific cannabinoid receptor antagonist (SR141716A): inhibition of delta 9-tetrahydrocannabinol-induced responses and apparent agonist activity*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 277, 586-594 (1996)

- Cózar-Bernal, M.J., Holgado, M.A., Arias, J.L., Muñoz-Rubio, I., Martín-Banderas, L., Alvarez-Fuentes, J., Fernández-Arévalo, M. *Insulin-loaded PLGA microparticles: flow focusing versus double emulsion/solvent evaporation*. J. Microencap. 28, 430-441 (2011)
- Cruciani, R.A. y Nieto, M.J. *Fisiopatología y tratamiento del dolor neuropático: avances más recientes*. Rev. Soc. Esp. Dolor, 5, 312-327 (2006)
- Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J.M., Coco, R., Le Breton, A., Prétat, V. *PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications*. J. Control. Release, 161, 505-522 (2012)
- Danhier, F., Lecouturier, N., Vroman, B., Jérôme, C., Marchand-Brynaert, J., Feron, O., Prétat, V. *Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation*. J. Control. Release, 133, 11-17 (2009)
- das Neves, J., Sarmiento, B., Amiji, M.M., Bahia, M.F. *Development and validation of a rapid reversed-phase HPLC method for the determination of the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor dapivirine from polymeric nanoparticles*. J. Pharmaceut. Biomed., 52, 167-172 (2010)
- Dash, B.C., Réthoré, G., Monaghan, M., Fitzgerald, K., Gallagher, W., Pandit, A. *The influence of size and charge of chitosan/polyglutamic acid hollow spheres on cellular internalization, viability and blood compatibility*. Biomaterials, 31, 8818–8197 (2010)
- Dash, T.K., Konkimalla, V.B. *Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review*. J. Control. Release, 158, 15-33 (2012)

De Backer, B., Debrus, B., Lebrun, P., Theunis, L., Dubois, N., Decock, L., Verstraete, A., Hubert, P., Charlier, C. *Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material*. J. Chromatogr. B, 877, 4115-4124 (2009)

des Rieux, A., Fievez, V., Garinot, M., Schneider, Y.J., Pr at, V. *Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach*. J. Control. Release, 116, 1-27 (2006)

Desgouilles, S., Vauthier, C., Bazile, D., Vacus, J., Grossiord, J.L., Veillard, M., Couvreur, P. *The design of nanoparticles obtained by solvent evaporation: A comparative study*. Langmuir, 19, 9504-9510 (2003)

Devane, E., Dysarz, F., Johnson, R., Melvin, L., Howlett, A.C. *Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain*. Mol. Pharmacol., 34, 605-613 (1988)

Devane, W.A., Hanus, L., Brever, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Madelbound, A., Etinger, A., Mechoulam, R. *Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor*. Science 258, 1946-1949 (1992)

Dewey, W.L. *Cannabinoid Pharmacology*. Pharmacol. Rev., 38, 151-178 (1986)

Di Marzo, V. *CB1 receptor antagonism: biological basis for metabolic effects*. Drug Discov. Today, 13, 1026-1041 (2008)

Di Marzo, V., Matias, I. *Endocannabinoid control of food intake and energy balance*. Nature Nsci. 8, 585-589 (2005)

- Dillen, K., Vandervoort, J., Van den Mooter, G., Ludwig, A. *Evaluation of ciprofloxacin-loaded Eudragit® RS100 or RL100/PLGA nanoparticles*. Int. J. Pharm., 314, 72-82 (2006)
- Dintaman, J.M., Silverman, J.A. *Inhibition of P-Glycoprotein by D-alfa-Tocopheryl Polyethylene Glycol 1000 Succinate (TPGS)*. Pharm. Res., 16, 1550-1555 (1999)
- Donovan, M., Tiwary, C.M., Axelrod, D., Sasco, A.J., Jones, L., Hajek, R., Sauber, E., Kuo, J., Davis, D.L. *Personal care products that contain estrogens or xenoestrogens may increase breast cancer risk*. Med. Hypotheses, 68, 756-766 (2007)
- D'Souza, S.E., Ginsberg, M.H., Plow, E.F. *Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif*. Trends Biochem. Sci. 16, 246-250 (1991)
- Durán, M., Laporte, J.R., Capellà, D. *Novedades sobre potencialidades terapéuticas del Cannabis y el sistema cannabinoide*. Med. Clín., 122, 390-398 (2004)
- Durán, M., Pérez, E., Abanades, S., Vidal, X., Saura, C., Majem, M., Arriola, E., Rabanal, M., Pastor, A., Farré, M., Rams, N., Laporte, J.R., Capellà, D. *Preliminary efficacy and safety of an oromucosal standardized cannabis extract in chemotherapy-induced nausea and vomiting*. Br. J. Clin. Pharmacol., 70, 656-663 (2010)
- Durán-Lobato, M., Muñoz-Rubio, I., Holgado, M.A., Alvarez-Fuentes, J., Fernández-Arévalo, M., Martín-Banderas, L. *Enhanced cellular uptake and biodistribution of a synthetic cannabinoid loaded in surface-modified poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles*. J. Biomed. Nanotechnol., 2013 (en revisión)

Dworkin, R.H. *An overview of neuropathic pain: syndromes, symptoms, signs, and several mechanisms.* Clin. J. Pain, 18, 343-349 (2002)

Dworkin, R.H., Backonja, M., Rowbotham, M.C., Allen, R.R., Argoff, C.R., Bennett, G.J., Bushnell, M.C., Farrar, J.T., Galer, B.S., Haythornthwaite, J.A., Hewitt, D.J., Loeser, J.D., Max, M.B., Saltarelli, M., Schmader, K.E., Stein, C., Thompson, D., Turk, D.C., Wallace, M.S., Watkins, L.R., Weinstein, S.M. *Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations.* Arch. Neurol., 60, 1524-1534 (2003)

Dziadulewicz, E.K., Bevan, S.J., Brain, C.T., Coote, P.R., Culshaw, A.J., Davis, A.J., Edwards, L.J., Fisher, A.J., Fox, A.J., Gentry, C., Groarke, A., Hart, T.W., Huber, W., James, I.F., Kesingland, A., La Vecchia, L., Loong, Y., Lyothier, I., McNair, K., O'Farrell, C., Peacock, M., Portmann, R., Schopfer, U., Yaqoob, M., Zadrobilek, J. *Naphthalen-1-yl-(4-pentyloxynaphthalen-1-yl)methanone: A Potent, Orally Bioavailable Human CB1/CB2 Dual Agonist with Antihyperalgesic Properties and Restricted Central Nervous System Penetration.* J. Med. Chem., 50, 3851-3856 (2007)

Elkheshen, S.A., Radwan, M.A. *Sustained release microspheres of metoclopramide using poly(D,L-lactide-co-glycolide) copolymers.* J. Microencap., 17, 425-435 (2000)

Épshtein, N.A. *Limit of quantitation estimated with allowance for reproducibility requirements.* Pharm. Chem. J., 36, 631-633 (2002)

Eustaquio, T. y Leary, J.F. *Nanobarcoding: detecting nanoparticles in biological samples using in situ polymerase chain reaction.* Int. J. Nanomedicine, 7, 5625-5639 (2012)

- Felder, C.C., Nielsen, A., Briley, E.M., Palkovits, M., Priller, J., Axelrod, J., Nguyen, D.N., Richardson, J.M., Riggin, R.M., Koppel, G.A., Paul, S.M., Becker, G.W., *Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat*. FEBS Lett., 393, 231-235 (1996)
- Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.P., Ammoury, N., Benita, S. *Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement*. Int. J. Pharm., 55, R1-R4 (1989)
- Fievez, V., Plapied, L., des Rieux, A., Pourcelle, V., Freichels, H., Wascotte, V., Vanderhaeghen, M.L., Jérôme, C., Vanderplasschen, A., Marchand-Brynaert, J., Schneider, Y.J., Préat, V. *Targeting nanoparticles to M cells with non-peptidic ligands for oral vaccination*. Eur. J. Pharm. Biopharm., 73, 16-24 (2009)
- Foged, C., Brodin, B., Frokjaer, S., Sundblad, A. *Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model*. Int. J. Pharm., 298, 315-322 (2005)
- Fox, A., Kesingland, A., Gentry, C., McNair, K., Patel, S., Urban, L., James, I. *The role of central and peripheral cannabinoid 1 receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain*. Pain, 92, 91-100 (2001)
- Fredenberg, S., Wahlgren, M., Reslow, M., Axelsson, A. *The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems – a review*. Int. J. Pharm., 415, 34-52 (2011)
- Fu, K., Pack, D.W., Klibanov, A.M., Langer, R. *Visual evidence of acidic environment within degrading poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres*. Pharm Res, 17, 100-106 (2000)

Galindo-Rodriguez, S., Allémann, E., Fessi, H., Doelker, E. *Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods.* Pharm. Res., 21, 1428-1439 (2004)

Galve-Roperh, I., Sánchez, C., Cortés, M.L., Gómez del Pulgar, T., Izquierdo, M., Guzmán, M. *Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation.* Nat. Med., 3, 313-319 (2000)

Gamber, K.M., Macarthur, H., Westfall, T.C. *Cannabinoids augment the release of neuropeptide Y in the rat hypothalamus.* Neuropharmacology, 49, 646-652 (2005)

Garay-Jiménez, J.C., Young, A., Gergeres, D., Greenhalgh, K., Turos, E. *Methods for purifying and detoxifying sodium dodecyl sulfate-stabilized polyacrylate nanoparticles.* Nanomedicine, 4, 98-105 (2008)

Gardin, A., Kucher, K., Kiese, B., Appel-Dingemanse, S. *Cannabinoid Receptor Agonist 13, a Novel Cannabinoid Agonist: First in Human Pharmacokinetics and Safety.* Drug Metab. Dispos., 37, 827-833 (2009)

Garinot, M., Fiévez, V., Pourcelle, V., Stoffelbach, F., des Rieux, A., Plapied, L., Theate, I., Freichels, H., Jérôme, C., Marchand-Brynaert, J., Schneider, Y.J., Préat, V. *PEGylated PLGA-based nanoparticles targeting M cells for oral vaccination.* J. Control. Release, 120, 195-204 (2007)

Gaspar, M.M., Blanco, D., Cruz, M.E., Alonso, M.J. *Formulation of L-asparaginase-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of polymer properties on enzyme loading, activity and in vitro release.* J. Control. Release, 52, 53-62 (1998)

- Gaumet, M., Gurny, R., Delie, F. *Interaction of biodegradable NPs with intestinal cells: the effect of surface hydrophilicity*. Int. J. Pharm., 390, 45–52 (2010)
- Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R., Delie, F. *Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters*. Eur. J. Pharm. Biopharm., 69, 1-9 (2008)
- Giteau, A., Venier-Julienne, M.C., Aubert-Pouessel, A., Benoit, J.P. *How to achieve sustained and complete protein release from PLGA-based microparticles?* Int. J. Pharm., 350, 14-26 (2008)
- Gómez, C., de Castro, J., González, M., *Factores etiológicos del cáncer de pulmón: fumador activo, fumador pasivo, carcinógenos medioambientales y factores genéticos*. Med. Clín., 128, 390-396 (2007)
- González, J.M., López, M., Ruiz, G. *Nanomedicina*. Vigilancia Tecnológica, 5, 22-26 (2005)
- Grabovac, V., Bernkop-Schnürch, A. *Development and in vitro evaluation of surface modified poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles with chitosan-4-thiobutylamidine*. Drug Dev. Ind. Pharm., 33, 767-774 (2007)
- Gradauer, K., Vonach, C., Leitinger, G., Kolb, D., Fröhlich, E., Roblegg, E., Bernkop-Schnürch, A., Prassl, R. *Chemical coupling of thiolated chitosan to preformed liposomes improves mucoadhesive properties*. Int. J. Nanomed., 7, 2523-2534 (2012)

Grage, K., Jahns, A.C., Parlane, N., Palanisamy, R., Rasiah, I.A., Atwood, J.A., Rehm, B.H. *Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: biogenesis, structure, and potential use as nano-/micro-beads in biotechnological and biomedical applications*. *Biomacromolecules*, 10, 660-669 (2009)

Gralla, R.J., Tyson L.B., Bordin L.A. *Antiemetic therapy: a review of recent studies and a report of a random assignment trial comparing metoclopramide with delta-9-tetrahydrocannabinol*. *Cancer Treat Rep*, 68, 163–172 (1984)

Grama, C.N., Ankola, D.D., Ravi-Kumar, M.N.V., *Poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for peroral delivery of bioactives*. *Curr. Opin. Colloid. In.*, 16, 238-245 (2011)

Green, J.M., *Doing a thorough method validation can be tedious, but the consequences of not doing it right are wasted time, money, and resources*. *Anal. Chem.*, 68, 305A-309A (1996)

Gref, R., Lück, M., Quellec, P., Marchand, M., Dellacherie, E., Harnisch, S., Blunk, T., Müller, R.H. *'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption*. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 18, 301-313 (2000)

Grotenhermen, F. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids*. *Clin. Pharmacokinet.*, 42, 327-360 (2003)

Guidelines for Collaborative Study Procedure to Validate Characteristics of a Method of Analysis. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 72, 694-704 (1989)

- Gupta, P.N., Mahor, S., Rawat, A., Khatri, K., Goyal, A., Vyas, S.P. *Lectin anchored stabilized biodegradable nanoparticles for oral immunization 1. Development and in vitro evaluation*. Int. J. Pharm., 318, 163-173 (2006)
- Gustafsson, S.B., Lindgren, T., Jonsson, M., Jacobsson, S. *Cannabinoid receptor-independent cytotoxic effects of cannabinoids in human colorectal carcinoma cells: synergism with 5-fluorouracil*. Cancer Chemother. Pharmacol., 63, 691-701 (2009)
- Gutierrez, I., Hernandez, R.M., Igartua, M., Gascón, A.R., Pedraz, J.L. *Immune responses to orally administered PLGA microparticles: influence of oil vehicles and surfactive agents*. J. Microencap. 20, 525-536 (2003)
- Guzmán M. *Cannabinoids: potential anticancer agents*. Nat. Rev. Cancer, 3, 745-755 (2003)
- Hans, M.L. y Lowman, A.M. *Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting*. Curr. Opin. Solid St. M., 6, 319-327 (2002)
- Hart, S., Fischer, O.M., Ullrich, A. *Cannabinoids induce cancer cell proliferation via tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17)-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor*. Cancer Res., 64, 1943-1950 (2004)
- Harush-Frenkel, O., Altschuler, Y., Benita, S. *Nanoparticle-Cell Interactions: Drug Delivery Implications*. Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst., 25, 485-544 (2008)
- Haznedar, S., Dortunç, B. *Preparation and in vitro evaluation of Eudragit microspheres containing acetazolamide*. Int. J. Pharm., 269, 131-140 (2004)

Hernán Pérez de la Ossa, D., Ligresti, A., Gil-Alegre, M.E., Aberturas, M.R., Molpeceres, J., Di Marzo, V., Torres Suárez, A.I. *Poly- ϵ -caprolactone microspheres as a drug delivery system for cannabinoid administration: Development, characterization and in vitro evaluation of their antitumoral efficacy*. J. Control. Release 161, 927-932 (2012)

Hernán Pérez de la Ossa, D., Lorente, M., Gil-Alegre, M.E., Torres, S., García-Taboada, E., Aberturas, M.R., Molpeceres, J., Velasco, G., Torres-Suárez, A.I. *Local delivery of cannabinoid-loaded microparticles inhibits tumor growth in a murine xenograft model of glioblastoma multiforme*. PLOS One, (2013), doi: 10.1371/journal.pone.0054795

Hillaireau, H., Le Doan, T., Couvreur, P. *Polymer-based nanoparticles for the delivery of nucleoside analogues*. J. Nanosci. Nanotechnol. 6, 2608-2617 (2006)

Hoffart, V., Ubrich, N., Simonin, C., Babak, V., Vigneron, C., Hoffman, M., Lecompte, T., Maincent, P. *Low molecular weight heparin-loaded polymeric nanoparticles: Formulation, characterization, and release characteristics*. Drug Dev. Ind. Pharm. 28, 1091-1099 (2002)

Holgado, M.A., Arias, J.L., Cózar-Bernal, M.J., Alvarez-Fuentes, J., Gañán-Calvo, A.M., Fernández-Arévalo, M. *Synthesis of lidocaine-loaded PLGA microparticles by flow focusing. Effects on drug loading and release properties*. Int. J. Pharm., 358, 27-35 (2008)

Holgado, M.A., Cózar-Bernal, M.J., Salas, S., Arias, J.L., Álvarez-Fuentes, J., Fernández-Arévalo, M., *Protein-loaded PLGA microparticles engineered by flow focusing: physicochemical characterization and protein detection by reversed-phase HPLC*. Int. J. Pharm., 380, 147-154 (2009)

- Homar, M., Suligoj, D., Gasperlin, M. *Preparation of microcapsules with self-microemulsifying core by a vibrating nozzle method.* J Microencapsul., 24, 72-81 (2007)
- Hombreiro-Perez, M., Siepmann, J., Zinutti, C., Lamprecht, A., Ubrich, N., Hoffman, M., Bodmeier, R., Maincent, P. *Non-degradable microparticles containing a hydrophilic and/or a lipophilic drug: preparation, characterization and drug release modelling.* J. Control. Release, 88, 413-428 (2003)
- Hornig, S., Heinze, T., Becer, R., Schubert, U.S. *Synthetic polymeric nanoparticles by nanoprecipitation.* J. Mater. Chem., 19, 3838–3840 (2009)
- Howlett, A.C. *Pharmacology of cannabinoid receptors.* Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 35, 607-634 (1995)
- Howlett, A.C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W.A., Felser, C.C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B.R., Mechoulam, R., Pertwee, R.G. *International Union of Pharmacology XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors.* Pharmacol. Rev. 54, 161-202 (2002)
- <http://cancer.gov/> (Fecha consulta: enero 2013)
- <http://en.wikipedia.org/wiki/> (Fecha consulta: enero 2013)
- <http://globocan.iarc.fr/> (Fecha consulta: enero 2013)
- http://www.atsdr.cdc.gov/es/general/cancer/riesgo_cancer.html (Fecha consulta: enero 2013)

<http://www.floresyplantas.net/plantas-aromaticasmedicinales/marihuana-cannabis-sativa-cannabis-indica-y-cannabis-rudelaris>
(Fecha consulta: enero 2013)

http://www.fundaciongrunenthal.es/cms/cda/_common/inc/display_file.jsp?fileID=58100207 (Fecha consulta: enero 2013)

<http://www.paineurope.com/patient/pain-surveys/pain-in-europe-survey.html> (Fecha consulta: noviembre de 2012).

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/> (Fecha consulta: enero 2013)

Huffman, J.W. *The search for selective ligands for the CB2 receptor.* Curr. Pharm. Des., 6, 1323-1337 (2000)

Huffman, J.W., Lainton, J.A.H. *Recent developments in the medicinal chemistry of cannabinoids.* Curr. Med. Chem., 3, 101-116 (1996)

Huh, K.M., Cho, Y.W., Park, K. *PLGA-PEG Block Copolymers for Drug Formulations.* Drug Dev. Deliv. [serial on the internet] 2003, 3 (5). Available from: <http://www.drugdeliverytech.com/ME2/dirmod.asp?sid=&nm=&type=Publishing&mod=Publications%3A%3AArticle&mid=8F3A7027421841978F18BE895F87F791&tier=4&id=BB85E8579021481EACBC7C3F0674348F>.

ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: Text and methodology-Q2(R1), 2005

ICH-Q2B validation of analytical procedures, in *Proceedings of the Methodology International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, Geneva, Switzerland, 1996.

- Igarashi, E. *Factors affecting toxicity and efficacy of polymeric nanomedicines*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 229, 121-134 (2008)
- Irigaray, P., Newby, J.A., Clapp, R., Hardell, L., Howard, V., Montagnier, L., Epstein, S., Belpomme, D. *Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: An overview*. *Biomed. Pharmacother.*, 61, 640-658 (2007)
- Issa, M.M., Koping-Hoggard, M., Artursson, P. *Chitosan and the mucosal delivery of biotechnology drugs*. *Drug Discovery Today: Technol.*, 2, 1-6 (2005)
- Jalali, N., Moztafzadeh, F., Mozafari, M., Asgari, S., Motevalian, M. *Physicochemical and Engineering Aspects Surface modification of poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles by d-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate as potential carrier for the delivery of drugs to the brain*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 392, 335-342 (2011)
- Jensen, T.S., Baron, R., Haanpää, M., Kalso, E., Loeser, J.D., Rice, A.S., Treede, R.D. *A new definition of neuropathic pain*. *Pain*, 152, 2204-2205 (2011)
- Joerger, M., Wilkins, J., Fagagnini, S., Baldinger, R., Brenneisen, R., Schneider, U., Goldman, B., Weber, M. *Single-dose Pharmacokinetics and Tolerability of Oral Delta-9-Tetrahydrocannabinol in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis*. *Drug Metab. Lett.*, 6, 102-108 (2012)
- Judefeind, A., de Villiers, M.M. *Drug loading into and in vitro release from nanosized drug delivery systems*. En: de Villiers, M.M., Aramwit, P., Kwon, G.S. (editores), *Nanotechnology in Drug Delivery*. Ed. Springer, New York, 2009, pp.129-162

Jung, T.S., Kwon, B.S., Lee, H.E., Kim, A.Y., Lee, M.J., Park, C.R., Kang, H.K., Kim, Y.D., Lee, S.K., Kang, J.S., Choi, G.J. *Enhanced oral absorption of salmon calcitonin-encapsulated PLGA nanoparticles by adding organic substances*. Korean J. Chem. Eng., 26, 131-135 (2009)

Junghanns, J.U. y Muller, R.H. *Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications*. Int. J. Nanomed., 3, 295-309 (2008)

Kagan, L. y Hoffman, A. *Systems for region selective drug delivery in the gastrointestinal tract: biopharmaceutical considerations*. Expert Opin. Drug Del., 5, 681-692 (2008)

Kalant, H. *Adverse effects of cannabis on health: an update of the literature since 1996*. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry, 28, 849-863 (2004)

Karn, P.R., Vanic, Z., Pepic, I., Škalko-Basnet, N. *Mucoadhesive liposomal delivery systems: the choice of coating material*. Drug Dev. Ind. Pharm. 37, 482-488 (2011)

Kassim, A., Ekarmul Mahmud H.N.M., Yee, L.M., Hanipah, N. *Electrochemical preparation and characterization of polypyrrole-polyethylene glycol conducting polymer composite films*. Pac. J. Sci. Technol., 7, 103–107 (2006)

Kawasaki, E.S. y Player, A. *Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer*. Nanomed-Nanotechnol., 1, 101-109 (2005)

Kawashima, Y., Yamamoto, H., Takeuchi, H., Kuno, Y. *Mucoadhesive DL-Lactide/Glycolide Copolymer nanospheres Coated with Chitosan to Improve Oral Delivery of Elcatonin*. Pharm. Dev. Tech., 5, 77-85 (2000)

- Khan, N., Afaq, F., Mukhtar, H. *Lifestyle as risk factor for cancer: Evidence from human studies*. *Cancer Lett.*, 293, 133-143 (2010)
- Khvedelidze, M., Mdzinarashvili, T., Partskhaladze, T., Nafee, N., Schaefer, U.F., Lehr, C.M., Schneider, M. *Calorimetric and spectrophotometric investigation of PLGA nanoparticles and their complex with DNA*. *J. Therm. Anal. Calorim.*, 99, 337-348 (2010)
- Kirkham, T.C. *Endocannabinoids in the regulation of appetite and body weight*. *Behav. Pharmacol.*, 16, 297–313 (2005)
- Kirkham, T.C. *Taranabant Cuts the Fat: New Hope for Cannabinoid-Based Obesity Therapies?* *Cell Metabolism.*, 7, 1-2 (2008)
- Klose, D., Delplace, C., Siepmann, J. *Unintended potential impact of perfect sink conditions on PLGA degradation in microparticles*. *Int J Pharm*, 404, 75-82 (2011)
- Knop, K., Hoogenboom, R., Fischer, D., Schubert, U.S. *Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49, 6288-6308 (2010)
- Koziara, J.M., Oh, J.J., Akers, W.S., Ferraris, S.P., Mumper, R.J. *Blood compatibility of cetyl alcohol/polysorbate-based nanoparticles*. *Pharm. Res.*, 22, 1821–1828 (2005)
- Krause, S.J. y Backonja, M. *Development of a neuropathic pain questionnaire*. *Clin. J. Pain*, 19, 306-314 (2003)
- Kreuter, J. *Nanoparticles, a historical perspective*. *Int. J. Pharm.*, 331, 1-10 (2007)

Kumari, A., Yadav, S.K., Yadav, S.C. *Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems*. Colloid. Surface B, 75, 1-18 (2010)

Kupper, R.J. *Compositions comprising crystalline trans-(+/-)-delta-9-tetrahydrocannabinol*. EP 2263667 A2, 2010.

Lambert, D.M., Fowler, C.J. *The endocannabinoid system: Drug targets, lead compounds and potential therapeutic applications*. J. Med. Chem., 48, 5059- 5087 (2005)

Lamprecht, A., Koenig, P., Ubrich, N. *Low molecular weight heparin nanoparticles: mucoadhesion and behaviour in Caco-2 cells*. Nanotech., 17, 3673-3680 (2006)

Lawrence, Y., Bridgers, A., Polli, J., Vickers, A., Long, S., Roy, A., Winnike, R., Coffin, M. *Vitamin E-TPGS Increases Absorption Flux of an HIV Protease Inhibitor by Enhancing Its Solubility and Permeability*. Pharm. Res., 16, 1812-1817 (1999)

Lee, M.J., Seo, D.Y., Lee, H.E., Choi, G.J. *Therapeutic effect of chitosan modification on salmon-calcitonin-loaded PLGA nanoparticles*. Korean J. Chem. Eng., 28, 1406-1411 (2011)

Li, A.P. *Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery*. Drug Discov. Today, 6, 357-366 (2001)

Ligresti, A., Bisogno, T., Matias, I., De Petrocellis, L., Cascio, M.G., Cosenza, V., D'Argenio, G., Scaglione, G., Bifulco, M., Sorrentini, I., Di Marzo, V. *Possible Endocannabinoid Control of Colorectal Cancer Growth*. Gastroenterology, 125, 677-687 (2003)

- Lindmark, T., Kimura, Y., Artursson, P. *Absorption enhancement through intracellular regulation of tight junction permeability by medium chain fatty acids in Caco-2 cells*. J. Pharm. Exp. Ther., 284, 362-369 (1998)
- Ling, G., Zhang, P., Zhang, W., Sun, J., Meng, X., Qin, Y., Deng, Y., He, Z. *Development of novel self-assembled DS-PLGA hybrid nanoparticles for improving oral bioavailability of vincristine sulfate by P-gp inhibition*. J. Control. Release, 148, 241-248 (2010)
- Lister, A.S. *Validation of HPLC methods in pharmaceutical analysis*. Sep. Sci. Technol., 6, 191-217 (2005)
- LoBrutto, R., Patel, T., *Method validation in HPLC for Pharmaceutical Scientists*, Y.V. Kazakevich y R. LoBrutto (editores), Ed. John Wiley & Sons, Hoboken, USA, 2007
- López-Rodríguez, M.L., Viso, A., Ortega-Gutiérrez, S., Díaz-Laviada, I. *Involvement of Cannabinoids in Cellular Proliferation*. Mini Rev. Med. Chem. 5, 97-106 (2005)
- Lück, M., Paulke, B.R., Schröder, W., Blunk, T., Müller, R.H. *Analysis of plasma protein adsorption on polymeric nanoparticles with different surface characteristics*. J. Biomed. Mater. Res., 39, 478-485 (1998)
- Ma, Y., Zheng, Y., Liu, K., Tian, G., Tian, Y., Xu, L., Yan, F., Huang, L., Mei, L. *Nanoparticles of Poly(Lactide-Co-Glycolide)-d- α -Tocopheryl Polyethylene Glycol 1000 Succinate Random Copolymer for Cancer Treatment*. Nanoscale Research Lett., 5, 1161-1169 (2010)
- Maccarrone, M., Battista, N., Centonze, D. *The endocannabinoid pathway in Huntington's disease: a comparison with other neurodegenerative diseases*. Prog. Neurobiol., 81, 349-379 (2007)

- Mackie, K., *Cannabinoid receptors as therapeutic targets*. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 46, 101-122 (2006)
- Mahadevan, A., Siegel, C., Martin, B.R., Abood, M.E., Beletskaya, I., Razdan, R.K. *Novel cannabinol probes for CB1 and CB2 cannabinoid receptors*. *J. Med. Chem.*, 43, 3778-3785 (2000)
- Makadia, H.K. y Siegel, S.J. *Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier*. *Polymers*, 3, 1377-1397 (2011)
- Malan, T.P., Ibrahim, M.M., Deng, H., Liu, Q., Mata, H.P., Vanderah, T., Porreca, F., Makriyannis, A., *CB2 cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception*. *Pain*, 93, 239-245 (2001)
- Mannix, K.A. In: *Oxford textbook of palliative medicine*. Doyle, D., Hanks, G., Cherny, N., Calmann, K. (Eds.), Oxford University Press, Oxford, UK (2004), 459–467.
- Manzanares, J., Corchero, J., Romero, J., Fernández-Ruiz, J.J., Ramos, J.A., Fuentes, J.A. *Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids*. *Trends Pharmacol. Sci.*, 20, 287-294 (1999)
- Manzanares, J., Julian, M.D., Carrascosa, A. *Role of the cannabinoid system in pain control and therapeutic implications for the management of acute and chronic pain episodes*. *Curr. Neuropharmacol.*, 4, 239-257 (2006)
- Marcato, P.D., Durán, N. *New aspects of nanopharmaceutical delivery systems*. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 8, 2216-2229 (2008)

- Martín-Banderas, L., Álvarez-Fuentes, J., Durán-Lobato, M., Prados, J., Melguizo, C., Fernández-Arévalo, M., Holgado, M.A. *Cannabinoid derivate-loaded PLGA nanocarriers for oral administration: formulation, characterization and cytotoxicity studies*. *Int. J. Nanomed.* 7, 5793-5806 (2012)
- Martin-Banderas, L., Duran-Lobato, M., Munoz-Rubio, I., Alvarez-Fuentes, J., Fernandez-Arevalo, M., Holgado, M.A. *Functional PLGA NPs for Oral Drug Delivery: Recent Strategies and Developments*. *Mini Rev. Med. Chem.*, 13, 58-59 (2013)
- Martinez, J.D., Stratagoules, E.D., LaRue, J.M., Powell, A.A., Gause, P.R., Craven, M.T., Payne, C.M., Powell, M.B., Gerner, E.W., Earnest, D.L. *Different bile acids exhibit distinct biological effects: The tumor promoter deoxycholic acid induces apoptosis and the chemopreventive agent ursodeoxycholic acid inhibits cell proliferation*. *Nutr. Cancer*, 31, 111-118 (1998)
- Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., Bonner, T.I. *Structure of cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA*. *Nature* 346, 561-564 (1990)
- Mattes, R.D., Engelman, K., Shaw, L.M., Elsohly, M.A. *Cannabinoids and appetite stimulation*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49, 187-195 (1994)
- Mayer, A., Vadon, M., Rinner, B., Novak, A., Wintersteiger, R., Frohlich, E. *The role of nanoparticle size in hemocompatibility*. *Toxicology*, 258, 139–147 (2009)

Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almong, S., Martin, B.R., Compton, D.R., Pertwee, R.G., Griffin, G., Bayewitch, M., Barg, J., Vogel, Z. *Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors.* *Biochem. Pharmacol.* 50, 83-90 (1995)

Micale, V., Mazzola, C., Drago, F. *Endocannabinoids and neurodegenerative diseases.* *Pharmacol. Res.*, 56, 382–392 (2007)

Miralles-García, J.M., de Pablos-Velasco, P., Cabrerizo, L., Pérez, M., López-Gómez, V. *Prevalence of distal diabetic polyneuropathy using quantitative sensory methods in a population with diabetes of more than 10 years' disease duration.* *Endocrinol. Nutr.*, 57, 414-420 (2010)

Mo, Y., Lim, L.Y. *Preparation and in vitro anticancer activity of wheat germ agglutinin (WGA)-conjugated PLGA nanoparticles loaded with paclitaxel and isopropyl myristate.* *J. Control. Release*, 107, 30-42 (2005)

Morgan, C.J., Curran, H.V. *Effects of cannabidiol on schizophrenia-like symptoms in people who use cannabis.* *Br. J. Psychiatry*, 192, 306-307 (2008).

Mosqueira, V.C., Legrand, P., Gref, R., Heurtault, B., Appel, M., Barratt, G. *Interactions between a macrophage cell line (J774A1) and surface-modified poly (D,L-lactide) nanocapsules bearing poly(ethylene glycol).* *J. Drug Target*, 7, 65–78 (1999)

Mu, L., Feng, S.S. *A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS.* *J. Control. Release*, 86, 33-48 (2003)

- Munjal, M., ElSohly, M.A., Repka, M.A. *Polymeric systems for amorphous Delta-9-tetrahydrocannabinol produced by a holt-melt method. Part II: Effect of oxidation mechanisms and chemical interactions on stability.* J Pharm Sci, 95, 2473-2485 (2006 b)
- Munjal, M., Stodghill, S.P., ElSohly, M.A., Repka, M.A. *Polymeric systems for amorphous Delta-9-tetrahydrocannabinol produced by a holt-melt method. Part I: Chemical and thermal stability during processing.* J Pharm Sci, 95,1841-1853 (2006 a)
- Muñoz-Rubio, I., Cózar-Bernal, M.J., Álvarez-Fuentes, J., Martín-Banderas, L., Fernández-Arévalo, M., Holgado, M.A. *Cannabinoides: nuevas perspectivas terapéuticas en el tratamiento del dolor.* Ind. Farm., 25, 78-84 (2010)
- Muñoz-Rubio, I., Cózar-Bernal, M.J., Álvarez-Fuentes, J., Martín-Banderas, L., Fernández-Arévalo, M., Holgado, M.A., *Aplicaciones de los cannabinoides como agentes terapéuticos.* Ind. Farm., 26, 68-77 (2011)
- Munro, S., Thomas, K.L., Abu-Shaar, M. *Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids.* Nature 365, 614-618 (1993)
- Musumeci, T., Ventura, C.A., Giannone, I., Ruozi, B., Montenegro, L., Pignatello, R., Puglisi, G. *PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel.* Int. J. Pharm., 325, 172-179 (2006)
- Naef, M., Russmann, S., Petersen-Felix, S., Brenneisen, R. *Development and pharmacokinetic characterization of pulmonar and intravenous delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) in humans.* J. Pharm. Sci., 93, 1176-1184 (2004)

Nafee, N., Taetz, S., Schneider, M., Schaefer, U.F., Lehr, C.M. *Chitosan-coated PLGA nanoparticles for DNA/RNA delivery: effect of the formulation parameters on complexation and transfection of antisense oligonucleotides*. *Nanomed-Nanotechnol.*, 3, 173-183 (2007)

Nafee, N., Schneider, M., Schaefer, U.F., Lehr, C.M. *Relevance of the colloidal stability of chitosan/PLGA nanoparticles on their cytotoxicity profile*. *Int. J. Pharm.*, 381, 130-139 (2009)

Naha, P.C., Kanchan, V., Manna, P.K., Panda, A.K. *Improved bioavailability of orally delivered insulin using Eudragit-L30D coated PLGA microparticles*. *J. Microencap.*, 25, 248-256 (2008)

Nakaya, T., Li, Y.J. *Phospholipid polymers*. *Prog. Polym. Sci.*, 24, 143-181 (1999)

Nehilla, B.J., Bergkvist, M., Popat, K.C., Desai, T.A. *Purified and surfactant-free coenzyme Q10-loaded biodegradable nanoparticles*. *Int. J. Pharm.*, 348, 107-114 (2008)

Niccoli, T., Partridge, L. *Ageing as a Risk Factor for Disease*. *Curr. Biol.*, 22, 741-752 (2012)

Niu, X., Zou, W., Liu, C., Zhang, N., Fu, C. *Modified nanoprecipitation method to fabricate DNA-loaded PLGA nanoparticles*. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 35, 1375-1383 (2009)

- Novotna, A., Mares, J., Ratcliffe, S., Novakova, I., Vachova, M., Zapletalova, O., Gasperini, C., Pozzilli, C., Cefaro, L., Comi, G., Rossi, P., Ambler, Z., Stelmasiak, Z., Erdmann, A., Montalban, X., Klimek, A., Davies, P. *A randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, enriched-design study of nabiximols (Sativex®), as add-on therapy, in subjects with refractory spasticity caused by multiple sclerosis.* Eur. J. Neurol., 18, 1122-1131 (2011)
- Nurmikko, T.J., Serpell, M.G., Hoggart, B., Toomey, P.J., Morlion, B.J., Haines, D. *Sativex® successfully treats neuropathic pain characterised by allodynia: a randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial.* Pain, 133, 210-220 (2007)
- O'Sullivan, S.E. y Kendall, D.A. *Cannabinoid activation of peroxisome proliferator-activated receptors: Potential for modulation of inflammatory disease.* Immunobiology, 215, 611–616 (2010)
- Ott, J.J., Ulrich, A., Miller A.B. *The importance of early symptom recognition in the context of early detection and cancer survival.* Eur. J. Cancer, 45, 2743-2748 (2009)
- Owens, D.E., Peppas, N.A. *Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles.* Int. J. Pharm., 307, 93-102 (2006)
- Pacheco, M., Childers, S.R., Arnold, R., Casiano, F., Ward, S.J. *Aminoalkylindoles: actions on specific G-protein-linked receptors* J. Pharmacol. Exp. Ther., 257, 170-183 (1991)

- Palacio, J., Orozco, V.H., López, B.L. *Effect of the molecular weight on the physicochemical properties of poly(lactic acid) nanoparticles and on the amount of ovalbumin adsorption.* J. Braz. Chem. Soc. 22, 2304-2311 (2011)
- Pan, J., Feng, S.S. *Targeted delivery of paclitaxel using folate-decorated poly(lactide)-vitamin E TPGS nanoparticles.* Biomaterials, 29, 2663-2672 (2008)
- Panyam, J., Williams, D., Dash, A., Leslie-Pelecky, D., Labhasetwar, V. *Solid-state solubility influences encapsulation and release of hydrophobic drugs from PLGA/PLA nanoparticles.* J. Pharm. Sci., 93, 1804-1814 (2004)
- Pappo, J., Ermak, T.H. *Uptake and translocation of fluorescent latex particle by rabbit Peyer's patch follicle epithelium: a quantitative model for M cell uptake.* Clin. Exp. Immunol. 76, 144-148 (1989)
- Park, S.I., Kim, J.H., Lim, J.H., Kim, C.O. *Surface-modified magnetic nanoparticles with lecithin for applications in biomedicine.* Curr. Applied Phys., 8, 706-709 (2008)
- Parveen, S., Sahoo, S.K. *Long circulating chitosan/PEG blended PLGA nanoparticles for tumor drug delivery.* Eur. J. Pharm., 670, 372-383 (2011)
- Parveen, S., Sahoo, S.K. *Polymeric nanoparticles for cancer therapy.* J. Drug Target., 16, 108-123 (2008)
- Patel, B., Gupta, V., Ahsan, F. *PEG-PLGA based large porous particles for pulmonary delivery of a highly soluble drug, low molecular weight heparin.* J. Control. Release, 162, 310-320 (2012)

- Pedraza, L. *Dolor neuropático, diagnóstico y tratamiento*. Rev. Med. Clin. Condes, 18, 233-238 (2007)
- Peng, J., He, X., Wang, K., Tan, W., Li, H., Xing, X., Wang, Y. *An antisense oligonucleotide carrier based on amino silica nanoparticles for antisense inhibition of cancer cells*. Nanomedicine-UK, 2, 113-120 (2006)
- Perea, M.D., Castaño-Vinyals, G., Altzibar, J.M., Ascunce, N., Moreno, V., Tardon, A., Pollán, M., Sala, M. *Prácticas de cribado de cáncer y estilos de vida asociados en la población de controles del estudio español multi-caso control*. Gac Sanit., 26, 301–310 (2012)
- Pérez-Artacho, B., Gallardo, V., Ruiz, M.A., Arias, J.L. *Maghemite/poly(D,L-lactide-co-glycolide) composite nanoplatform for therapeutic applications*. J. Nanopart. Res., 14, 768-778 (2012)
- Pertwee R. *The evidence for the existence of cannabinoid receptors*. Gen Pharmacol., 4, 811-824 (1993)
- Pertwee, R.G. *Cannabinoid receptor and pain*. Prog. Neurobiol., 63, 569-611 (2001)
- Petrova, S., Miloshev, S., Mateva, R., Iliev, I. *Synthesis of amphiphilic PEG–PCL–PEG triblock copolymers*. J. Univ. Chem. Technol. Metall., 43, 199–204 (2008)
- Pinar-Sueiro, S., Rodríguez-Puertas, R., Vecino, E. *Aplicaciones de los cannabinoides en glaucoma*. Arch. Soc. Esp. Oftalmol., 86, 16-23 (2011)
- Pinto-Reis, C., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J., Veiga, F. *Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles*. Nanomedicine-UK, 2, 8-21 (2006)

Piomelli, D. *The molecular logic of endocannabinoid signalling*. Nature Nsci Revs 4, 873-884 (2003)

Piomelli, D., Giuffrida, A., Calignano, A., Rodríguez de Fonseca, F. *The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs*. Trends Pharmacol. Sci., 6, 218-224 (2000)

Pisanti, S., Malfitano, A.M., Grimaldi, C., Santoro, A., Gazerro, P., Laezza, C., Bifulco, M. *Use of cannabinoid receptor agonists in cancer therapy as palliative and curative agents*. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab., 23, 117-131 (2009)

Portilla-Arias, J.A., Garcia-Alvarez, M., Galbis, J.A., Muñoz-Guerra, S. *Biodegradable nanoparticles of partially methylated fungal poly(beta-L-malic acid) as a novel protein delivery carrier*. Macromol. Biosci., 8, 551-559 (2008)

Prego, C., Torres, D., Fernandez-Megia, E., Novoa-Carballal, R., Quiñoá, E., Alonso, M.J. *Chitosan-PEG nanocapsules as new carriers for oral peptide delivery: effect of chitosan pegylation degree*. J Control. Release, 111, 299-308 (2006)

Prochazkova, S., Varum, K.M., Ostgaard K. *Quantitative determination of chitosans by ninhydrin*. Carbohydrate Polymers, 38, 115-122 (1999)

Pryce, G. y Baker, D. *Control of Spasticity in a Multiple Sclerosis Model is mediated by CB1, not CB2, Cannabinoid Receptors*. Brit. J. Pharmacol., 150, 519-525 (2007)

Rajapaksa, T.E., Stover-Hamer, M., Fernandez, X., Eckelhoefer, H.A., Lo, D.D. *Claudin 4-targeted protein incorporated into PLGA nanoparticles can mediate M cell targeted delivery*. J. Control. Release, 142, 196-205 (2010)

- Ravi Kumar, M.N.V., Bakowsky, U., Lehr, C.M. *Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers*. *Biomaterials*, 25, 1771-1777, (2004)
- Razdan, R.K. *Structure-activity relationships in cannabinoids*. *Pharmacol. Rev.*, 38, 75-149 (1986)
- Reix, N., Parat, A., Seyfritz, E., Van der Werf, R., Epure, V., Ebel, N., Danicher, L., Marchioni, E., Jeandidier, N., Pinget, M., Frère, Y., Sigrist, S. *In vitro uptake evaluation in Caco-2 cells and in vivo results in diabetic rats of insulin-loaded PLGA nanoparticles*. *Int J Pharm.*, 437, 213-220 (2012)
- Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Héaulme, M., Shire, D., Calandra, B., Congy, C., Martínez, S., Maruani, J., Néliat, G., Caput, D., Ferrara, P., Soubrié, P., Belière, J.C., Le Fur, G. *SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor*. *FEBS Lett.*, 350, 240-244 (1994)
- Rivera, P.A., Martínez-Oharriz, M.C., Rubio, M., Irache, J.M., Espuelas, S. *Fluconazole encapsulation in PLGA microspheres by spray-drying*. *J. Microencap.*, 21, 203-211 (2004)
- Ro, L.S. y Chang, K.H. *Neuropathic pain: mechanisms and treatments*. *Chang Gung Med. J.* 28, 597-605 (2005)
- Robert-Segarra, A., Torres-Giménez, A., Tejero-Pociello, A., Campo-López, C., Pérez de los Cobos, J., *Efectos esperados y adversos del consumo de cannabis en sujetos dependientes de los tetrahidrocannabinoides*. *Trastornos Adictivos*, 8, 148-154 (2006)
- Roco, M. *Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine*. *Curr. Opin. Biotech.*, 14, 337-346 (2003)

Rodríguez, M.J. y García, A.J. *Costes del dolor neuropático según etiología en las Unidades del Dolor en España*. Rev. Soc. Esp. Dolor, 6, 404-415 (2007)

Rodríguez, U., Carrillo, E., Soto, E. *Cannabinoides: neurobiología y usos médicos*. Elementos: ciencia y cultura, 60, 3-9 (2005)

Russo, E. *Cannabinoids in the management of difficult to treat pain*. Therapeut. Clin. Risk Manag., 4, 245-259 (2008)

Russo, E.B., Guy, G.W., Robson, P.J. *Cannabis, pain, and sleep: lessons from therapeutic clinical trials of Sativex®, a cannabis-based medicine*. Chem. Biodivers., 4, 1729-1743 (2007)

Saghafi, N., Lam, D.K., Schmidt, B.L. *Cannabinoids attenuate cancer pain and proliferation in a mouse model*. Neurosci. Lett., 488, 247-251 (2001)

Sagredo, O., González, S., Aroyo, I., Pazos, M.R., Benito, C., Lastres-Becker, I., Romero, J.P., Tolón, R.M., Mechoulam, R., Brouillet, E., Romero, J., Fernández-Ruiz, J. *Cannabinoid CB2 receptor agonists protect the striatum against malonate toxicity: relevance for Huntington's disease*. Glia, 57, 1154-1167 (2009)

Sakai, M., Imai, T., Ohtake, H., Azuma, H., Otagiri, M. *Effects of absorption enhancers on the transport of model compounds in Caco-2 cell monolayers: assessment by confocal laser scanning microscopy*. J. Pharm. Sci., 86, 779-785 (1997)

Samstein, R.M., Perica, K., Balderrama, F., Look, M., Fahmy, T.M. *The use of deoxycholic acid to enhance the oral bioavailability of biodegradable nanoparticles*. Biomaterials, 29, 703-708 (2008)

- Sánchez, A.J. y García-Merino, A. *Neuroprotective agents: cannabinoids*. Clin. Immunol., 142, 57-67 (2012)
- Sandor, M., Riechel, A., Kaplan, I., Mathiowitz, E. *Effect of lecithin and MgCO₃ as additives on the enzymatic activity of carbonic anhydrase encapsulated in poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) microspheres*. Biochim. Biophys. Acta, 1570, 63-74 (2002)
- Sanna, V., Roggio, A.M., Posadino, A.M. *Novel docetaxel-loaded nanoparticles based on poly(lactide-co-caprolactone) and poly(lactide-co-glycolide-co-caprolactone) for prostate cancer treatment: formulation, characterization, and cytotoxicity studies*. Nanoscale Res. Lett., 6, 260-267 (2011)
- Sarne, Y., Asaf, F., Fishbein, M., Gafni, M., Keren, O. *The dual neuroprotective–neurotoxic profile of cannabinoid drugs*. Brit. J. Pharmacol. 163, 1391-1401 (2011)
- Seitz, H.K., Cho, C.H. *Contribution of Alcohol and Tobacco Use in Gastrointestinal Cancer Development*. In: *Cancer Epidemiology, Vol. 2, Modifiable Factors*. Verma, M., Humana Press, New York, USA (2009) 217-241
- Semete, B., Booyesen, L.I.J., Kalombo, L., Venter, J.D., Katata, L., Ramalapa, B., Verschoor, J.A., Swai, H. *In vivo uptake and acute immune response to orally administered chitosan and PEG coated PLGA nanoparticles*. Toxicol. Applied Pharm., 249, 158-165 (2010)
- Semete, B., Booyesena, L., Kalombo, L., Ramalapa, B., Hayeshia, R., Swai, H.S. *Effects of protein binding on the biodistribution of PEGylated PLGA nanoparticles post oral administration*. Int. J. Pharm., 424, 115-120 (2012)

Sempf, K., Array, T., Gelperina, S., Schorge, T., Meyer, B., Karas, M., Kreuter, J. *Adsorption of plasma proteins on uncoated PLGA nanoparticles*. Eur. J. Pharm. Biopharm. (2013), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.11.030>.

Shen, H., Hu, X., Yang, F., Bei, J., Wang, S. *Cell affinity for bFGF immobilized heparin-containing poly(lactide-co-glycolide) scaffolds*. Biomaterials, 32, 3404-3412 (2011)

Shi, X., Wang, Y., Ren, L., Huang, W., Wang, D.A. *A protein/antibiotic releasing poly(lactic-co-glycolic acid)/lecithin scaffold for bone repair applications*. Int. J. Pharm., 373, 85-92 (2009)

Shire, D., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Oustric, D., Pessègue, B., Bonnin-Cabanne, O., Le Fur, G., Caput, D., Ferrara, P. *Molecular cloning, expression and function of the murine CB2 peripheral cannabinoid receptor*. Biochim. Biophys. Acta, 1307, 132-136 (1996)

Singh, R., Lillard, J.W. *Nanoparticle-based targeted drug delivery*. Exp. Mol. Pathol., 86, 215-223 (2009)

Skrabek, R.Q., Galimova, L., Ethans, K., Perry, D. *Nabilone for the treatment of pain in fibromialgia*. J. Pain, 9, 164-173 (2008)

Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R., Rudzinski, W.E. *Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices*. J. Control. Release, 70, 1-20 (2001)

Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., Waku, K. *2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 215, 89-97 (1995)

- Svenson, S. y Tomalia, D.A. *Dendrimers in biomedical applications- reflections on the field*. Adv. Drug Deliv. Rev., 57, 2106-2129 (2005)
- Tahara, K., Samura, S., Tsuji, K., Yamamoto, H., Tsukada, Y., Bando, Y., Tsujimoto, H., Morishita, R.; Kawashima, Y. *Oral nuclear factor- κ B decoy oligonucleotides delivery system with chitosan modified poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres for inflammatory bowel disease*. Biomaterials, 32, 870-878 (2011)
- Teixeira, M., Alfonso, C., Pinto, M., Barbosa, C.M. *A validated HPLC method for the assay of xanthone and 3-methoxyxanthone in PLGA nanocapsules*. J. Chromatogr. Sci., 41, 371-376 (2003)
- Thiele, L., Diederichs, J.E., Reszka, R., Merkle, H.P., Walter, E. *Competitive adsorption of serum proteins at microparticles affects phagocytosis by dendritic cells*. Biomaterials, 24, 1409–1418 (2003)
- Thumma, S., Majumdar, S., ElSohly, M.A., Gul, W., Repka, M.A. *Chemical stability and bioadhesive properties of an ester prodrug of Δ -9-tetrahydrocannabinol in poly(ethylene oxide) matrices: effect of formulation additives*. Int J Pharm, 362, 126-132 (2008)
- Tran, V.T., Karam, J.P., Garric, X., Coudane, J., Benoît, J.P., Montero-Menei, C.N., Venier-Julienne, M.C. *Protein-loaded PLGA-PEG-PLGA microspheres: A tool for cell therapy*. Eur J Pharm Sci, 45, 128-137 (2012).
- Trimaille, T., Pichot, C., Elaïssari, A., Fessi, H., Briançon, S., Delair, T. *Poly(d,l-lactic acid) nanoparticle preparation and colloidal characterization*. Colloid. Polym. Sci., 281, 1184-1190 (2003)

Turner, C.E., Elsohly, M.A., Boeren, E.G. *Constituent of Cannabis sativa L. A review of the natural constituent*. J. Nat. Prod., 43, 169-234 (1989)

Van Dross, R., Soliman, E., Jha, S., Johnson, T., Mukhopadhyay, S. *Receptor-dependent and receptor-independent endocannabinoid signaling: A therapeutic target for regulation of cancer growth*. Life Sci. (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2012.09.025>.

Van Sickle, M.D., Duncan, M., Kingsley, P.J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K. Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J.S., Marnett, L.J., Di Marzo, V., Pittman, Q.J., Patel, K.D., Sharkey, K.A. *Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors*. Science 310, 329-332 (2005)

Vasir, J.K. y Labhasetwar, V. *Quantification of the force of nanoparticle–cell membrane interactions and its influence on intracellular trafficking of nanoparticles*. Biomaterials, 29, 4244-4252 (2008)

Vázquez, K. *El dolor: un asunto tan serio para el médico como para el paciente*. Rev. Esp. Econ. Salud, 2, 242-244 (2003)

Vega, R., *Opioides: neurobiología, usos médicos y adicción*. Elementos: ciencia y cultura, 60, 11-23 (2005).

Velasco, G., Carracedo, A., Blázquez, C., Lorente, M., Aguado, T., Haro, A., Sánchez, C., Galve-Roperh, I., Guzmán, M. *Cannabinoids and gliomas*. Mol. Neurobiol. 36, 60-67 (2007)

Velasco, G., Sánchez, C., Guzmán, M. *Towards the use of cannabinoids as antitumour agents*. Nat. Rev. Cancer, 12, 436-444 (2012)

- Verdonck, E., Schaap, K., Thomas, L.C. *Discussion of the principles and applications of modulated temperature DSC (MTDSC)*. Int. J. Pharm., 192, 3-20 (1999)
- Vihola, H., Laukkanen, A., Valtola, L., Tenhu, H., Hirvonen, J. *Cytotoxicity of thermosensitive polymers poly(N-isopropylacrylamide), poly(N-vinylcaprolactam) and amphiphilically modified poly(N-vinylcaprolactam)*. Biomaterials, 26, 3055-3064 (2005)
- Vila, A., Sánchez, A., Tobío, M., Calvo, P., Alonso, M.J. *Design of biodegradable particles for protein delivery*. J. Control. Release, 78, 15-24 (2002)
- Vila-Jato, J.L. En: *Monografía XXVIII: Nanotecnología farmacéutica. Realidades y posibilidades farmacoterapéuticas*. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid, 2009
- Vollner, L., Bieniek, D., Korte, F. *Review of analytical methods for identification and quantification of cannabis products*. Regul. Toxicol. Pharmacol., 6, 348-358 (1986)
- Vonarbourg, A., Passirani, C., Saulnier, P., Benoit, J.P. *Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems*. Biomaterials, 27, 4356-4373 (2006)
- Walker, J.M., Hohmann, A.G., Martin, W.J., Strangman, N.M., Huan, S.M., Tsou, K. *The neurobiology of cannabinoid analgesia*. Life Sci., 65, 665-673 (1999).
- Wang, Q., Dong, Z., Du, Y., Kennedy, J.F. *Controlled release of ciprofloxacin hydrochloride from chitosan/polyethylene glycol blend films*. Carbohydr. Polym., 69, 336-343 (2007)

Woolf, C.J. *Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy*. Life Sci., 74, 2605-2610 (2004)

Xie, H., Smith, J. W. *Fabrication of PLGA nanoparticles with a fluidic nanoprecipitation system*. Journal of Nanobiotechnology, 8, article 18 (2010)

Yashu, Y., Dawei, C., Mingxi, Q., Xiuyan, W., Haiyang, H. *Lectin-conjugated PLGA nanoparticles loaded with thymopentin: Ex vivo bioadhesion and in vivo biodistribution*. J. Control. Release, 123, 27-38 (2007 b)

Yashu, Y., Dawei, C., Mingxi, Q., Zhe, L., Haiyang, H. *Preparation and evaluation of lectin-conjugated PLGA nanoparticles for oral delivery of thymopentin*. J. Control. Release, 116, 337-345 (2007 a)

Yeo, Y., Park, K. *Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems*. Arch. Pharm. Res., 27, 1-12 (2004)

Yin, K., Feng, S. *In vitro and in vivo studies on vitamin E TPGS-emulsified poly (D, L -lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for paclitaxel formulation*. J. Control. Release, 27, 2285-2291 (2006)

Yokoyama, M. *Drug targeting with nano-sized carrier systems*. J. Artif. Organs, 8, 77-84 (2005)

Yoncheva, K., Guembe, L., Campanero, M.A., Irache, J.M. *Evaluation of bioadhesive potential and intestinal transport of pegylated poly(anhydride) nanoparticles*. Int. J. Pharm., 334, 156-165 (2007)

Yue, Z.G., Wei, W., Lv, P.P., Yue, H., Wang, L.Y., Su, Z.G., Ma, G.H. *Surface charge affects cellular uptake and intracellular trafficking of*

- chitosan-based nanoparticles*. *Biomacromolecules*, 12, 2440–2444 (2011)
- Zahr, A.S., Davis, C.A., Pishko, M.V. *Macrophage uptake of core-shell nanoparticles surface modified with poly(ethylene glycol)*. *Langmuir*, 22, 8178–8185 (2006)
- Zhang, X., Sun, M., Zheng, A., Cao, D., Bi, Y., Sun, Y. *Preparation and characterization of insulin-loaded bioadhesive PLGA nanoparticles for oral administration*. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 45, 632-638 (2012)
- Zhang, Z., Feng, S.S. *Self-assembled nanoparticles of poly(lactide)-Vitamin E TPGS copolymers for oral chemotherapy*. *Int. J. Pharm.*, 324, 191-198 (2006)
- Zhang, Z., Lee, S.H., Gan, C.W., Feng, S.S. *In vitro and in vivo investigation on PLA-TPGS nanoparticles for controlled and sustained small molecule chemotherapy*. *Pharm. Res.*, 25, 1925-1935 (2008)
- Zhao, H., Yung, L.Y.L. *Addition of TPGS to folate-conjugated polymer micelles for selective tumor targeting*. *J. Biomed. Mat. Res. Part A*, 91, 505-518 (2009)
- Zheng, A.P., Liu, H.X., Yuan, L., Meng, M., Wang, J.C., Zhang, X., Zhang, Q. *Comprehensive studies on the interactions between chitosan nanoparticles and some live cells*. *J. Nanopart. Res.*, 13, 4765-4776 (2011)
- Zhu, N., Cui, F.Z., Hu, K., Zhu, L. *Biomedical modification of poly(L-lactide) by blending with lecithin*. *J. Biomed. Mater. Res. A*, , 82, 455-461 (2007)

Zilberman, M., Grinberg, O. *HRP-loaded bioresorbable microspheres: effect of copolymer composition and molecular weight on microstructure and release profile.* J Biomater. Appl., 22, 391-407 (2008)

Zuardi, A.W., Shirakawa, I., Finkelfarb, E. Karniol, I.G. *Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta-9-THC in normal subjects.* Psychopharmacology, 76, 245-250 (1982).

