



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Obtención de nanopartículas de poli ϵ -caprolactona (PCL) e Ivermectina modificadas con polietilenglicol (PEG) 6000 y su evaluación en el proceso de fagocitosis

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICA
FARMACÉUTICA-BIÓLOGA**

P R E S E N T A

CLAUDIA IVONNE GARCÍA SALAS

México, D.F., 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Saturnino de León Chapa

Vocal: Ma. del Socorro Alpizar Ramos

Secretario: Ma. Josefa Bernad Bernad

1er. Suplente: Norma Trinidad Gonzáles Monzón

2do. Suplente: Francisco García Olivares

Una parte de este trabajo se desarrolló en el anexo del laboratorio 1-E/F del edificio A de la Facultad de Química de la UNAM, en el laboratorio 1 y 2 de Tecnología Farmacéutica del edificio F de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la tutoría de la Dra. María Josefa Bernad Bernad y la asesoría de la Q.F.B. Guadalupe Díaz Nanclares, así como con el apoyo del Macroproyecto de Veterinaria de CONACYT-SAGARPA 568.

La otra parte se realizó en el laboratorio de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo la supervisión técnica del Dr. Enrique Ortega Soto y el apoyo técnico de la M en IBB. Claudia Angélica Garay. También se contó con el apoyo del proyecto de CONACYT 45092 y DGAPA IN220705.



Asesora

Dra. María Josefa Bernad Bernad
(Facultad de Química, UNAM)



Supervisor técnico

Dr. Enrique Ortega Soto
(Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM)

Sustentante

Claudia Ivonne García Salas

Los ángeles colegiales

Rafael Alberti

*Ninguno comprendíamos el secreto nocturno de las pizarras
ni por qué la esfera armilar se exaltaba tan sola cuando la mirábamos.
Sólo sabíamos que una circunferencia puede no ser redonda
y que un eclipse de luna equivoca a las flores y adelanta el reloj de los pajaros.
Ninguno comprendíamos nada:
ni por qué nuestros dedos eran de tinta china
y la tarde cerraba compases para al alba abrir los libros.
Sólo sabíamos que una recta, si quiere, puede ser curva o quebrada
y que las estrellas errantes son niños que ignoran la aritmética.*

Todos duermen

Ester Mondlak

*Todos duermen.
Frente al papel en blanco me quedo quieta
con el lápiz en la mano.
Dejo correr el río que tengo en el pecho.
Silencio,
no escribas,
calla,
escucha.
Como un pescador echo la red
y espero...
Esta noche regreso a casa con las manos vacías.
Tengo sueño.*

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero transmitir mi gratitud a la Dra. María Josefa Bernad Bernad por haber depositado en mí una inmensa confianza, por haberme brindado la oportunidad de conocer el sorprendente mundo de la Tecnología Farmacéutica. Gracias por su gran ayuda, por sus consejos y enseñanzas y su calidad como investigadora.

También quiero agradecer a Guadalupe Díaz Nanclares, por su valiosa asesoría a lo largo de mi estancia en el laboratorio, por sus grandes lecciones y consejos, por su paciencia conmigo, por su amistad. Hubiera sido imposible terminar sin su ayuda.

Al Dr. Enrique Ortega Soto, Jefe del laboratorio de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por su valiosa colaboración para la parte biológica de este trabajo, y su atención conmigo. Lo mismo a Claudia Garay, Técnico del laboratorio del Dr. Ortega Soto, por sus valiosas lecciones, por su gran ayuda en el laboratorio y por su calidad y calidez humana.

No quisiera olvidarme de dar las gracias a todos mis compañeros del laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Toni, Jorge, Mirna, Cesar, Lorena, Juan Carlos, Julio, Diana y Abraham, sobre todo a Abraham, que me ofreció a parte de su ayuda en el laboratorio su valiosa amistad; nunca olvidaré el 15 de septiembre del 2006.

A mis amigos de la Facultad, Edgar, Alejandro, Didier, Alberto el brujo, Gabriel, Lulú, Rodrigo Gutiérrez, y a los que me faltan. A los incondicionales...un millón de besos. A Rodrigo Barquera, gracias por su sincera amistad, por sus sabios consejos; por su gran apoyo.

A mis hermanos; Omar y Alan, gracias por su alegría y compañía.

Desearía dar un millón de gracias a mis padres, por convertirme en quien soy. Por los grandes esfuerzos para ofrecerme una gran educación. Por inculcarme su gran responsabilidad, constancia y valores; por enseñarme que los esfuerzos siempre traen su recompensa, por hacer que mi vida sea muy buena. A todos ellos, por soportar mis ausencias.

Finalmente quiero dar las gracias a Christian, por su incondicional amistad, por convertirse en mi paño de lágrimas, por estar conmigo en las buenas y en las malas, por su extraordinario optimismo ante las cosas difíciles, por su gran paciencia y comprensión, por sus buenos consejos. Por su infinito amor... al que de igual forma correspondo, mil gracias.

I N D I C E

I.	I N T R O D U C C I Ó N	1
II.	A N T E C E D E N T E S	4
	1. SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA	5
	1.1. Sistemas moleculares (<i>Ciclodextrinas, dendrímeros y anticuerpos</i>).....	11
	1.2. Sistemas celulares (<i>eritrocitos</i>).....	16
	1.3. Sistemas coloidales (<i>microemulsiones, liposomas, nanopartículas</i>).....	18
	2. NANOPARTÍCULAS	26
	2.1 Métodos de preparación	27
	2.2 Caracterización de nanopartículas	29
	2.3 Modificación de la superficie de nanopartículas con polímeros	31
	3. IVERMECTINA	36
	3.1. Ficha técnica	36
	3.2. Farmacodinamia	38
	3.3. Farmacocinética	39
	3.4. Uso, dosis recomendadas y vías de administración	40
	3.5. Sistemas de Liberación controlada para animales	41
	4. RECONOCIMIENTO DE SISTEMAS COLOIDALES POR EL MPS	46
	4.1. Proceso fagocítico	48
	4.2. Fagocitosis de sistemas coloidales	56
	4.3. Factores que influyen en la eliminación de los sistemas coloidales	62
	4.4. Detección/ cuantificación del Proceso Fagocítico	66
III.	O B J E T I V O S	70
	1. OBJETIVO GENERAL	71
	2. OBJETIVOS PARTICULARES	71

IV. P A R T E E X P E R I M E N T A L	72
1. REACTIVOS, MATERIAL Y EQUIPO.....	73
2. METODOLOGÍA.....	75
2.1. Elaboración de nanopartículas sin PEG 6000.....	75
2.2. Elaboración de nanopartículas con PEG 6000.....	77
2.3. Elaboración de nanopartículas fluorescentes.....	79
2.4. Caracterización de nanopartículas.....	80
2.5. Proliferación de macrófagos murinos J774.....	80
2.6. Activación de complemento y proceso fagocítico.....	81
V. R E S U L T A D O S Y D I S C U S I Ó N	85
1. ELABORACIÓN DE PARTÍCULAS SIN PEG 6000.....	86
2. ELABORACIÓN DE PARTÍCULAS CON PEG 6000.....	98
3. TOXICIDAD DEL BRIJ®56.....	105
4. ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO Y PROCESO FAGOCÍTICO.....	114
VI. C O N C L U S I O N E S	122
VII. A P É N D I C E I (Información complementaria)	125
VIII. A P É N D I C E I I (Composición de soluciones)	133
IX. B I B L I O G R A F Í A	136

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, los pesticidas y antiparasitarios han sido ampliamente utilizados en la ganadería, así como en la agricultura, a pesar de que su uso puede provocar riesgos tanto al humano como al medio ambiente. En algunos países poco desarrollados, los ganaderos y agricultores aplican antiparasitarios y pesticidas en dosis más grandes que las recomendadas, y esto tiene un gran impacto a nivel ambiental y alimenticio.

Dependiendo de la vía de administración y de las condiciones climáticas, cerca del 90% de los antiparasitarios y pesticidas utilizados convencionalmente se pierden o se descomponen. Normalmente, la administración de estos fármacos es muy constante, en algunas ocasiones a base de baños, lo cual provoca grandes problemas de estrés en los animales y por ende, problemas económicos severos, así como un daño al medio ambiente.

Los sistemas acarreadores de liberación controlada utilizados para antiparasitarios y pesticidas pueden reducir notoriamente la cantidad de sustancia activa requerida para un tratamiento eficaz contra la parasitosis gastrointestinal y las infestaciones, ya que pueden mantener una concentración efectiva de la sustancia activa por un periodo de tiempo mas largo y en el sitio deseado.

Recientemente se han logrado avances en el desarrollo de sistemas acarreadores poliméricos de liberación controlada, tanto para el campo agroquímico como para la medicina veterinaria, particularmente de las nanopartículas. Muchos de estos acarreadores están basados en polímeros sintéticos biodegradables, dentro de los cuales se encuentran los poliésteres alifáticos, ácido poliláctico (PLA), ácido glicólico (PGA), ácido poliláctico – glicólico (PLGA), poli (ϵ -caprolactona) (PCL), polióxido de etileno, entre otros. Con estos materiales se logran obtener sistemas acarreadores que permiten encapsular la cantidad necesaria de sustancia activa, así como protegerla y conferirle estabilidad, además de lograr una liberación adecuada en el tiempo e incluso en el espacio.

Sin embargo, las aplicaciones de estos sistemas acarreadores poliméricos están limitadas por la complejidad del proceso para su obtención y la rápida eliminación de éstas partículas por las células del Sistema Fagocítico Mononuclear (MPS). En algunas ocasiones el proceso

INTRODUCCIÓN

puede ser optimizado, solucionando el primer inconveniente. Por otro lado, algunos polímeros hidrofílicos, como el Polietilenglicol (PEG), puede modificar la superficie de estos acarreadores, y reducir en gran número su reconocimiento por el MPS.

Dentro de los antiparasitarios de interés para la medicina veterinaria se encuentra la Ivermectina, la cual se utiliza ampliamente en el control y tratamiento de diversas infecciones causadas por nemátodos y artrópodos que atacan diversas variedades de ganado y animales domésticos.

Como colaboración para el desarrollo de mejores sistemas acarreadores de antiparasitarios, en este trabajo se han realizado nanopartículas de PCL e Ivermectina por el método de microemulsión por fusión, haciendo una modificación en su superficie con PEG 6000 para disminuir su reconocimiento por el MPS.

II. ANTECEDENTES

1. SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA (SLC)

Generalidades

El desarrollo de los sistemas de liberación controlada (SLC) surge como una alternativa de las formas de dosificación convencionales, que presentan limitaciones para determinados fármacos que tienen una semivida biológica reducida y que requieren de una administración repetida a pequeños intervalos de tiempo, lo cual puede ser un gran inconveniente para el paciente, así como la causa de grandes fluctuaciones en los niveles de fármaco a nivel plasmático. Algunas formas de dosificación convencionales, tales como las tabletas o las inyecciones para vía intravenosa suministran una dosis de fármaco tan alta que en algunas ocasiones pueden causar reacciones adversas, y así mismo ser imprevisibles e ineficaces, ya que a menudo es necesaria la administración de una alta dosis de fármaco para asegurar que la cantidad requerida del fármaco llega al sitio de acción. Debido a que el efecto terapéutico no sólo se logra por la cantidad de fármaco que llega al sitio de acción, sino también por el tiempo que logra mantenerse dicho fármaco en el cuerpo en las concentraciones necesarias, estos SLC incrementan la duración del proceso de liberación del fármaco, logrando no sólo una liberación controlada, sino prolongada[1,2].

En una forma farmacéutica convencional la concentración de fármaco en sangre incrementa cuando éste es administrado, pero una vez alcanzada la concentración máxima vienen los declives. Cada fármaco alcanza niveles plasmáticos específicos, los cuales pueden ser muy altos o tan inferiores que resultan ser ineficientes, además de que la concentración de fármaco en sangre también depende de cada paciente y de la frecuencia de la administración[3].

La propuesta de liberación controlada como una disciplina distinta en el área farmacéutica data de finales de la década de los 60`s cuando nuevas tecnologías fueron exploradas. Los pioneros en SLC fueron los comprimidos orales, cápsulas y en algunos casos los transdérmicos. En la década de los 70`s se introduce un nuevo concepto, los denominados sistemas terapéuticos que definen aquellos dispositivos que optimizan la terapia incorporando un sistema de ingeniería avanzada. Durante la década de los 80`s los avances logrados en la producción de insulina por la tecnología del DNA recombinante provocan una

nueva era en el desarrollo biotecnológico que da un nuevo ímpetu a la liberación controlada. A partir de los 90`s y hasta la fecha se ha vivido un gran auge en la investigación de todos estos sistemas, obteniendo sistemas inteligentes que han revolucionado el área farmacéutica[4].

Ventajas y desventajas

Los SLC, también conocidos como sistemas inteligentes, dirigidos, novedosos, programados, etc., son sistemas capaces de liberar al fármaco de manera controlada y de manera dirigida a un sitio específico del organismo, logrando mantener niveles plasmáticos semejantes a los logrados con una infusión intravenosa continua y durante un periodo de tiempo más largo. Algunos SLC son capaces de liberar al fármaco sólo cuando éste es necesario, lo cual logra reducir los efectos adversos causados al paciente[5].

Estos sistemas ofrecen otras ventajas, ya que muchas formulaciones basadas en estos pueden incrementar la eficiencia de los fármacos lábiles, así como permitir que el fármaco pase a través de las barreras fisiológicas para llegar al sitio de acción, resistiendo al metabolismo y ataque químico. Los fármacos lábiles, tales como los péptidos, proteínas, y enzimas, que pueden perder su actividad por efecto del medio en el que se encuentren, se ven protegidos, incrementando su actividad y al mismo tiempo minimizando los efectos secundarios que pudiesen causar después de su administración[1].

Los SLC presentan otras ventajas en relación a las formas farmacéuticas convencionales:

- Mezclar sustancias incompatibles
- Retener sustancias volátiles
- Enmascarar sabor y olor
- Convertir un líquido en un sólido
- Mejorar las propiedades de compactación
- Disminuir la respuesta inmune frente al fármaco

Por otro lado, las desventajas van ligadas a los efectos de toxicidad provocados por el mal funcionamiento de los SLC que pueden causar pronta liberación de toda la carga del activo,

cantidades pensadas para periodos largos y por ende, tóxicas si son liberadas prematuramente. Otra desventaja es la imposibilidad de retirar el sistema en caso de efectos adversos, aunque no todos cumplen con tal comportamiento. Un tercer punto es el costo efectivo para manufactura de un SLC, el cual es en general mayor que el de una forma farmacéutica convencional[5].

Clasificación

Los SLC se clasifican en tres grandes grupos[2]:

- a) Sistemas de liberación continua o sostenida. Se mantienen niveles constantes de fármaco en sangre o en el órgano deseado.
- b) Sistemas de liberación prolongada. Inicialmente proporcionan una cantidad de fármaco igual a una dosis simple para luego ceder gradualmente el resto en un periodo de tiempo que normalmente es de menor duración que el total deseado. Ésta permite una reducción de al menos dos veces la frecuencia de administración en comparación con una forma convencional.
- c) Sistemas de liberación repetida o diferida. Son aquellos que liberan el fármaco en fracciones semejantes y a determinados tiempos. Se diferencia de los otros sistemas porque hay un control en cuanto a la forma y el tiempo de liberación; ya que esta no puede ser constante por periodos extensos, de hecho lo que permite es retardar la entrega del fármaco hasta que el sistema alcanza un cierto punto en el tracto gastrointestinal.

Mecanismos de liberación controlada

Como ya se mencionó anteriormente, los sistemas de liberación controlada tienen como objetivo incrementar la duración del proceso de liberación del principio activo y conseguir que los niveles plasmáticos eficaces se mantengan por más tiempo. La velocidad de liberación es de orden cero, y en algunas ocasiones se involucra el efecto de vectorización y marcaje.

El control de los niveles plasmáticos de un fármaco se puede lograr mediante métodos farmacocinéticos. Estos métodos se basan en las modificaciones de las formas farmacéuticas y es necesario conocer los mecanismos de liberación de cada una de las formas de dosificación que existen. Dentro de los diferentes sistemas de liberación controlada tenemos[5]:

- Sistemas tipo reservorio o membrana
- Sistemas tipo matriz
- Sistemas controlados por biodegradación
- Sistemas activados por el disolvente

Sistemas tipo reservorio o membrana. En estos sistemas el fármaco se encuentra en una zona determinada y recubierto por una membrana que controla la liberación. En estos dispositivos se observan dos capas de difusión, una en el interior del reservorio y otra en el exterior, y ambas se encuentran separadas por una membrana. Estos sistemas llevan a cabo una liberación de orden cero, solo que existe el riesgo de que los dispositivos se rompan provocando una liberación masiva y rápida del fármaco (efecto *dose dumping*)[5,6].

Sistemas tipo matriz. Las matrices poliméricas son dispersiones moleculares o partículas uniformes de un fármaco en un soporte, generalmente tipo polimérico.

Las matrices poliméricas se caracterizan por emplear tecnología simple y rápida, costos bajos, menor efecto *dose dumpin* y se clasifican de acuerdo al polímero de soporte en hidrofílicas, lipofílicas e inertes.

Las matrices hidrofílicas contienen polímeros gelificantes que al entrar en contacto con el agua, sufren una rápida hidratación, seguida por la formación de una capa viscosa. El sistema así formado puede pasar a través del tracto gastrointestinal sin romperse, liberando al fármaco de forma progresiva[2,5]. La migración del fármaco puede realizarse por dos procesos simultáneos:

- a) Erosión o desgaste de las capas más externas, el cual es observado si el fármaco es poco soluble en agua. Este proceso de liberación puede mostrar una distribución

heterogénea, esto dependiendo del mecanismo de secado y almacenamiento de los sistemas matriciales durante su manufactura.[2,6].

- b) Disolución del fármaco en el medio de liberación y difusión a través del gel barrera, una vez que éste se ha formado. Este proceso está relacionado con la hidrosolubilidad del fármaco[6].

En las matrices lipofílicas el fármaco puede estar suspendido, disuelto o incrustado en un excipiente lipofílico, liberando al fármaco por erosión o difusión, prevaleciendo uno u otro según las características del fármaco[2].

Las matrices inertes están constituidas por polímeros biodegradables. Estos polímeros proporcionan una estructura porosa y coherente. En estos sistemas la liberación del fármaco depende del coeficiente de difusión de la solución formada en el interior de la matriz, así como de la porosidad de la misma.

La liberación del fármaco a partir de estos sistemas se realiza en tres etapas. Se inicia con la penetración de los fluidos corporales en los poros de la matriz, seguida de la disolución del fármaco que se encuentra en la superficie de la matriz (liberación rápida), y por último, la difusión del fármaco a través de los poros de la matriz (liberación lenta)[2,5].

Sistemas controlados por degradación. Todos los polímeros involucrados en la formación de estos sistemas sufren biodegradación. La biodegradación de los polímeros se define de manera muy amplia, pero básicamente es la rotura de la cadena principal para posterior reducción en el peso molecular y pérdida de la tensión mecánica[5]. Un polímero es considerado biodegradable si la degradación es por acción del medio ambiente, ya sea por un proceso biocatalítico (incluyendo bacterias, hongos o enzimas) o por un proceso químico (hidrólisis, oxidación, radiación UV, etc.). Los mecanismos de biodegradación se clasifican en: formación de carga seguida de disolución, hidrólisis y degradación enzimática.

En la elaboración de sistemas de liberación controlada sólo se utilizan aquellos polímeros que se degradan dentro del periodo en el que el polímero es inocuo para el organismo del hombre y que de preferencia no dejen polímero residual después de la liberación del fármaco. Además deben ser biocompatibles, permeables al agua y con la suficiente tensión mecánica. Los polímeros biodegradables utilizados en el área farmacéutica para la

producción de SLC son degradados principalmente por hidrólisis y degradación enzimática[7].

Sistemas activados por el disolvente. *Sistema osmótico.* Estos sistemas están constituidos por un núcleo osmótico que está rodeado por una membrana que controla la permeabilidad; el núcleo contiene al fármaco sólido, el cual está mezclado con el agente osmótico y excipientes de compresión, o bien, puede encontrarse en solución separado del agente osmótico.

La membrana semipermeable puede tener uno o varios orificios, por los cuales se libera el fármaco mediante el impulso generado por la presión osmótica que se crea dentro del dispositivo.

Hinchamiento del polímero. Este sistema es activado por el disolvente, es decir, la liberación del fármaco está regulada por la velocidad de hinchamiento del polímero. Estos sistemas utilizan principalmente polímeros con muchos grupos hidrofílicos, los cuales tienden a hincharse más que los polímeros que tienen mayor número de grupos hidrofóbicos. Por ejemplo, los hidrogeles con grupos hidrofóbicos se hinchan mucho menos que los hidrogeles con grupos hidrofílicos, pues los grupos hidrofóbicos se colapsan en el agua minimizando su exposición a las moléculas de agua[5,8].

Vectores farmacéuticos

Los sistemas de liberación controlada abarcan una amplia gama de técnicas, desde aerosoles hasta cápsulas de alta tecnología que liberan su carga en sitios específicos del cuerpo. Otra forma de lograrlo es usando acarreadores que lleven al fármaco al lugar de acción en la dosis y tiempo deseados.

Los sistemas acarreadores presentan algunas ventajas, ya que el organismo es protegido de la posible toxicidad de los activos, mientras que estos a su vez son protegidos de la acción del organismo, del medio ambiente y al mismo tiempo mantienen la velocidad de liberación. Los materiales más utilizados para estos sistemas deben ser biodegradables, y dentro de ellos destacan las ciclodextrinas, fosfolípidos, esteroides, diferentes tipos de tensoactivos y

polímeros naturales (albúmina, gelatina, colágeno) o sintéticos (polianhidridos, poli ϵ -caprolactona, poliláctico–glicólico, poliortoésteres, etc.).

Para conseguir sistemas altamente eficaces se necesita que:

- La superficie sea hidrofílica
- La superficie no sea activante
- La adsorción de componentes del suero sea baja
- El tamaño de la partícula no importa si la superficie es la adecuada

Su éxito en la terapéutica depende de su capacidad para mantenerse en la circulación y su capacidad para alcanzar al tejido blanco.

Los acarreadores más utilizados se pueden clasificar en tres grandes grupos[5]:

- a) Coloidales
- b) Moleculares
- c) Celulares

1.1. Sistemas moleculares

Ciclodextrinas

Los carbohidratos, tales como la celulosa y la sacarosa, son probablemente los más abundantes en la naturaleza, y desde hace mucho tiempo se han utilizado para la producción de ropa y alimentos. Por muchos años los humanos han procesado carbohidratos mediante el proceso de fermentación y han observado que sufren degradación enzimática. Ahora es bien sabido que estos procesos de degradación llevan a la formación de mezclas de monosacáridos, disacáridos y varios oligosacáridos, tales como las dextrinas de forma lineal, y bajo ciertas condiciones, pequeñas cantidades de dextrinas cíclicas o ciclodextrinas[9]. Estos oligosacáridos cíclicos están constituidos por unidades de α -D-glucopiranosas unidas entre sí por enlaces α -1,4 glucosídicos. Su cavidad central es lipofílica y los bordes exteriores son hidrofílicos. Debido a la conformación de la silla que forman las unidades de

glucopiranososa, las ciclodextrinas forman un cono truncado, más bien parecido a un cilindro (Fig. 1.1.1). Las ciclodextrinas mas comunes son las α , β y γ -ciclodextrinas, las cuales constan de 6, 7 y 8 unidades de glucopiranososa respectivamente.

Las α y β -ciclodextrinas, al contrario de la γ -ciclodextrina, no pueden ser hidrolizadas por la saliva ni la amilasa pancreática del humano. Sin embargo, ambas ciclodextrinas pueden ser fermentadas por la microflora intestinal.

Las ciclodextrinas tienen un peso molecular entre un rango de 1000 hasta 2000Da (Tabla 1.1.1)[10].

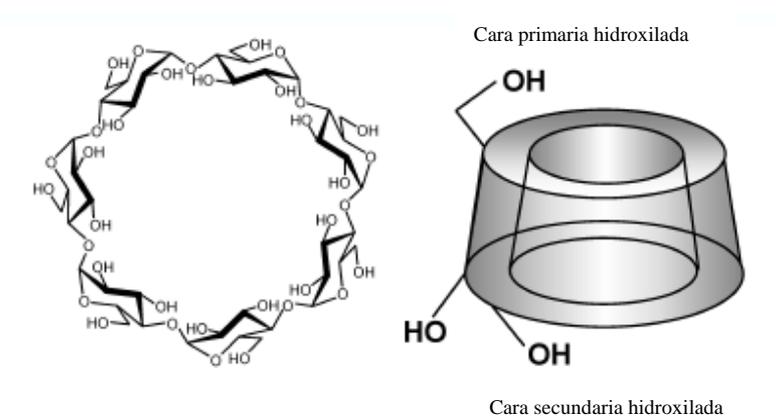


Fig. 1.1.1. Estructura de las ciclodextrinas naturales.

Tabla 1.1.1. Propiedades de las ciclodextrinas naturales.

Ciclodextrina	Peso molecular	Diámetro de la cavidad (Å)	Volumen de la cavidad (Å ³)	Solubilidad en agua (% w/v)
α -CyD	972	4,7-5,3	~ 174	14,5
β -CyD	1135	6,0-6,5	~ 262	1,85
γ -CyD	1297	7,5-8,3	~ 427	23,2

Generalmente, en soluciones acuosas, las ciclodextrinas forman los llamados “complejos de inclusión”, donde las moléculas de agua se localizan en el exterior de la ciclodextrina y la cavidad central lipofílica se encuentra ocupada por una molécula huésped lipofílica o una molécula de fármaco.

Se ha observado que las α -ciclodextrinas forman complejos de inclusión y no inclusión con ácidos dicarboxílicos, y los dos tipos de complejos coexisten en solución. En soluciones

acuosas saturadas los complejos huésped/ciclodextrina están formados por mezclas de complejos de inclusión y no inclusión[9].

Existen diversos factores que afectan la formación de los complejos de inclusión, tales como el tipo de ciclodextrina, el tamaño de la cavidad, pH y el estado de ionización, así como la temperatura[11].

Uniones no covalentes se forman o se rompen durante la formación de complejos fármaco/ciclodextrina. El manejo de las fuerzas que le confieren carga al complejo de inclusión permite la liberación de moléculas de agua de la cavidad. Estas fuerzas son interacciones electrostáticas, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno e interacciones de transferencia de carga. Todas estas fuerzas son relativamente débiles, permitiendo que las moléculas de fármaco libre en solución lleguen rápidamente al equilibrio con las moléculas de fármaco que se encuentran unidas dentro de la cavidad de la ciclodextrina[10].

El uso de las ciclodextrinas en farmacia se relaciona con su capacidad para aumentar la velocidad de disolución y la solubilización de fármacos poco solubles. Este mismo efecto puede hacer que aumente la absorción de fármaco, ya que sólo el fármaco libre puede ser absorbido.

Las ciclodextrinas pueden proteger al fármaco de la degradación por su efecto de camuflaje, o bien, encapsular a los substratos que van a reaccionar, disminuyendo su movilidad e impidiendo que interaccionen[5].

Dendrímeros

Los dendrímeros son macromoléculas ampliamente ramificadas, con muchos brazos emanando del centro. Los primeros reportes sobre dendrímeros fueron publicados hace tres décadas aproximadamente, pero estos estudios fueron enfocados a su síntesis y a sus propiedades físicas y químicas, y fue hasta la década pasada que se estudió su aplicación en el área biológica. Recientemente, los dendrímeros han mostrado ser de gran utilidad en el campo terapéutico, sobre todo para el desarrollo de vacunas, antivirales, antibacterianos y anticancerígenos. Los conjugados de polímeros lineales como el óxido de polietileno con algunas proteínas han mostrado tener mejores propiedades farmacocinéticas y

farmacodinámicas que los sistemas convencionales, sólo que una comparación entre los dendrímeros y los polímeros lineales es su arquitectura nanoscópica, su forma globular compactada, tamaños monodispersos y propiedades de superficie muy controlables, lo que los hace unos excelentes candidatos para su evaluación como acarreadores de fármacos[12,13].

Actualmente se usan dendrímeros PAMAM (poliamidoamina) (Fig. 1.1.2), poli(propilenimina) con diaminobutano (DAB) o diaminoetano (DAE) como núcleo y PEO (polióxido de etileno) injertado con carbosilano (Csi-PEO) para su estudio sistemático in vitro.

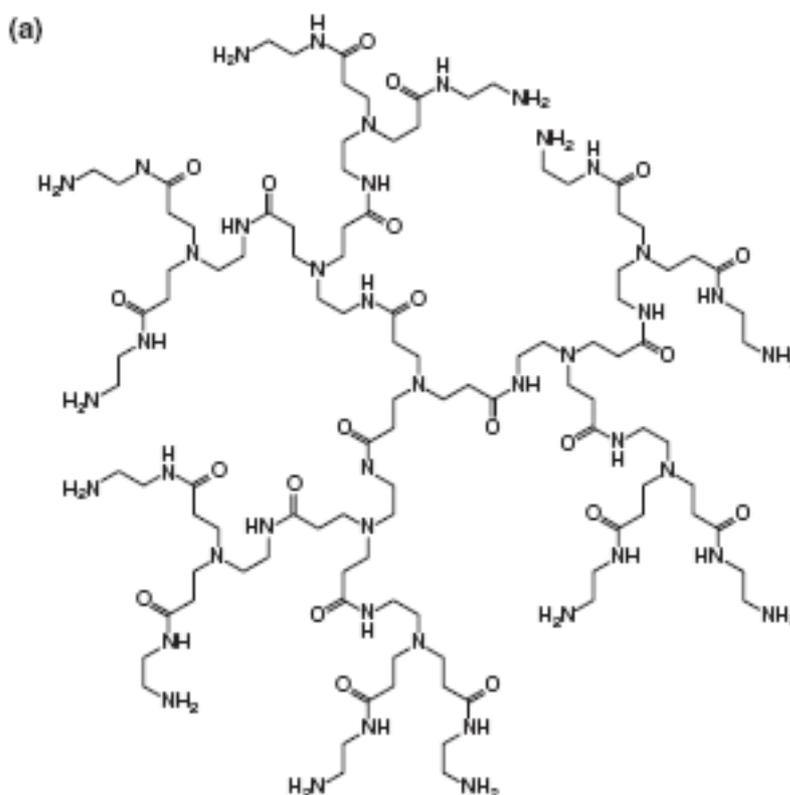


Fig. 1.1.2. Dendrímtero PAMAM.

Inicialmente los dendrímeros se estudiaron como acarreadores de fármacos usándolos como micelas convencionales unimoleculares (núcleo hidrofóbico y periferia hidrofílica) solubles en agua, micelas inversas unimoleculares (núcleo hidrofílico y periferia hidrofóbica) y cajas dendríticas para la encapsulación no covalente de fármacos. Tiempo después, como

alternativa para el desarrollo de anticancerígenos, se aprovecho la definida multivalencia de los dendrímeros para la unión covalente de éstos fármacos en la periferia del dendrímero[5,12].

Por lo tanto, los dendrímeros pueden ser utilizados como acarreadores de fármacos de dos maneras[13]:

- a. Las moléculas de fármaco pueden estar atrapadas físicamente dentro de la estructura dendrítica.
- b. Las moléculas de fármaco pueden estar unidas covalentemente en la superficie o en otros sitios del dendrímero, formando conjugados fármaco-dendrímero.

Anticuerpos

La liberación en el sitio específico es un prerequisite para la alta eficacia y baja toxicidad de un fármaco. Esta claro que los anticuerpos pueden participar en este contexto, facilitando el transporte del fármaco cargado al sitio deseado, funcionando como acarreador o “bala mágica”, concepto establecido por Ehrlich para nombrar a estos sistemas acarreadores.

La conjugación de un fármaco con un anticuerpo hace posible la liberación del fármaco en un sitio específico, incrementando su efectividad terapéutica. Por lo tanto, esta liberación dirigida logra reducir la dosis de fármaco administrada, y con ello su toxicidad.

Los tratamientos convencionales para el cáncer frecuentemente involucran fármacos quimioterapéuticos, los cuales pueden ser utilizados desde un inicio o como adyuvantes en la eliminación quirúrgica de la masa tumoral. La administración de fármacos quimioterapéuticos provoca la muerte de las células tumorales, pero también de otras células, destruyendo la mucosa oral e intestinal, los folículos del cuero cabelludo y la médula ósea. Como alternativa para solucionar estos problemas, se administraron conjugados de estos agentes con anticuerpos dirigidos al tumor, para aumentar la eficacia y disminuir los efectos secundarios.

Por otro lado, la aplicación de coloides, tales como las nanopartículas y los liposomas ha sido de gran ayuda para el desarrollo de acarreadores dirigidos. El tamaño de partícula tan pequeño de estos coloides permite su paso a través del tejido endotelial, lo que permite la

liberación sostenida del fármaco por periodos de tiempo más largos. Sin embargo, estos acarreadores pueden acumularse en sitios específicos y no liberar el fármaco en el sitio deseado, o bien, ser eliminados por el sistema fagocítico mononuclear (MPS).

Varios estudios han demostrado que los conjugados de acarreadores coloidales con anticuerpos pueden reconocer tejidos específicos, logrando una liberación dirigida y con ello un incremento en la eficiencia de estos acarreadores[14].

En la elección de los anticuerpos se desea que sea altamente específico y posea gran afinidad para unirse con las células correspondientes. En la elección del fármaco, éste debe tener un grupo funcional al cual se pueda unir el anticuerpo, sin pérdida de la actividad farmacológica. Para conseguir la conjugación entre fármaco y anticuerpo normalmente se utiliza una molécula de unión. Entre las más utilizadas están el dextrano y el ácido poliglutámico[5].

1.2. Sistemas celulares

Eritrocitos

Los eritrocitos o células rojas constituyen la población más grande de las células sanguíneas, las cuales transportan oxígeno a todos los tejidos del cuerpo. Los eritrocitos tienen una vida de aproximadamente 120 ± 20 días, y cuando envejecen son destruidos por el bazo.

Los eritrocitos forman parte de los vectores para diferentes sustancias bioactivas, incluyendo fármacos y proteínas. En los 70's varios estudios se enfocaron a la encapsulación de fármacos en eritrocitos, y subsecuentemente a la encapsulación de enzimas y péptidos con actividad terapéutica[15].

Desde una perspectiva terapéutica, los eritrocitos han sido empleados con dos objetivos principales:

1. Actuar como reservorios de fármacos, liberándolo de forma sostenida dentro del cuerpo, con lo cual se logra modificar la posología del fármaco, así como los intervalos de dosificación.

2. Dirigir al fármaco específicamente al sistema fagocítico mononuclear para que lleguen al hígado, bazo y médula ósea, que son los sitios donde se lleva a cabo la destrucción de los eritrocitos.

Dentro de las ventajas de estos acarreadores, se pueden mencionar las siguientes[15]:

1. Su alta biocompatibilidad, comparada con la de otros acarreadores, puede ser optimizada utilizando eritrocitos autólogos.
2. La cantidad de fármaco encapsulada puede ser muy grande, utilizando poca cantidad de células.
3. El fármaco tarda en eliminarse el mismo tiempo que tarda en eliminarse el eritrocito, por lo que se puede mantener una liberación prolongada.
4. Los eritrocitos pueden actuar o ser utilizados como reservorios de fármacos, permitiendo una liberación sostenida dentro de la circulación. El mecanismo de liberación del fármaco va a depender de la naturaleza del fármaco que ha sido encapsulado.
5. Los eritrocitos no sólo pueden encapsular fármacos, también pueden encapsular péptidos de alto peso molecular con aplicaciones biotecnológicas o terapéuticas.

Al igual que los otros acarreadores, los eritrocitos también tienen algunas desventajas[15]:

1. Al igual que los acarreadores hechos con materiales biodegradables, estos son eliminados fácilmente por el sistema fagocítico mononuclear, lo cual puede provocar efectos tóxicos en el paciente por una liberación masiva del fármaco.
2. Debido a que estos acarreadores son de origen biológico, los procesos de encapsulación pueden tener una gran variabilidad.
3. La formulación de los eritrocitos cargados puede ser un futuro problema, ya que las condiciones de almacenamiento no tienen que afectar su viabilidad.
4. Se requieren controles sanitarios rigurosos a la hora de la recolección y almacenamiento de los eritrocitos.

1.3. Sistemas coloidales

El destino de un fármaco después de la administración es determinada por una combinación de procesos: distribución, metabolismo y eliminación, cuando es administrada por vía intravenosa, o bien, absorción, distribución, metabolismo y eliminación cuando es por vía extravascular. Sin importar el mecanismo involucrado, el resultado depende básicamente de las propiedades fisicoquímicas del fármaco y de su estructura química. Durante muchas décadas atrás, muchos trabajos han sido dirigidos hacia el desarrollo de sistemas de liberación, los cuales permitirán que el fármaco llegue a su destino modificando estos procesos. Aunque dicho sistema actúa básicamente en el segundo proceso; la distribución del fármaco en el organismo, también pueden afectar la absorción, metabolismo y eliminación[4].

Los sistemas de liberación controlada pueden obtenerse a partir de formas farmacéuticas convencionales, y los más novedosos son los sistemas coloidales.

Los sistemas coloidales son utilizados para incrementar la disponibilidad del fármaco así como su índice terapéutico, mejorar su estabilidad química, controlar la velocidad de liberación o cambiar la velocidad de deposición del fármaco, marcar al fármaco para una liberación dirigida y disminuir el reconocimiento por el sistema inmune[16,17].

Los sistemas coloidales han llamado mucho la atención en los últimos años. Dentro de los sistemas coloidales mas investigados están las nanopartículas, micro y nanoemulsiones, liposomas y los conjugados de polímeros-fármaco.

La existencia de estos sistemas coloidales ha sido de gran importancia debido a su gran impacto en el área farmacéutica y al uso que se les ha dado para conseguir los efectos deseados. Por supuesto, se deben considerar otros aspectos para que dichos sistemas cumplan su objetivo[18]:

- La cantidad de fármaco que puede ser encapsulada,
- La posibilidad de marcar al fármaco de interés,
- El destino del sistema in vivo (interacción con el medio biológico, velocidad de degradación, acumulación en tejidos),
- Toxicidad aguda y crónica,

- Producción a grande escala,
- Características físicas y químicas que le confieren estabilidad al fármaco,
- Costos de producción.

Existen diversas características por las cuales se pueden clasificar a los sistemas coloidales. Algunos de estos sistemas pueden ser clasificados de acuerdo a su forma física o a sus propiedades funcionales.

Una de las propuestas para su clasificación ha sido la de llamarlos sistemas coloidales de primera, segunda y tercera generación[19]. Los llamados sistemas de la primera generación son capaces de ir liberando la sustancia activa específicamente en el sitio blanco, pero no son considerados como vectores porque ellos tienen que ser implantados en el sitio de acción. Los sistemas de la segunda generación son acarreadores y tienen un tamaño de partícula menor a 1 μm . Ellos son capaces no solo de liberar la sustancia activa en el sitio blanco, también pueden llevarlo por una ruta general después de su administración. Este grupo incluye a los llamados acarreadores coloidales pasivos, tales como los liposomas, nanocápsulas y nanoesferas. Sin embargo, después de la administración la mayoría de los acarreadores coloidales son rápidamente eliminados de la circulación por las células fagocíticas del hígado y del bazo. Esto limita su potencial para liberar su contenido en sitios específicos.

Los sistemas que forman la tercera generación también son acarreadores, y son capaces de reconocer el sitio blanco. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pertenecen a este grupo, así como también los liposomas, nanocápsulas y nanoesferas recubiertas con estos anticuerpos específicos u otros ligantes. Por supuesto, el acarreador coloidal es mucho más eficiente si es estable[4].

Los sistemas coloidales de liberación controlada pueden ser de dos tipos: los acarreadores particulados (capsulares, monolíticos o celulares) y acarreadores solubles o moleculares (conjugados de macromoléculas y fármaco).

Dentro de los sistemas acarreadores particulados se encuentran los liposomas, microesferas, nanopartículas, microemulsiones y eritrocitos[16]. Las partículas acarreadoras más biocompatibles son las células del mismo paciente, tales como eritrocitos o linfocitos, los cuales son cargados ex vivo por electroporación o procesos osmóticos. La desventaja de

estos acarreadores son los procedimientos tan complejos que se llevan a cabo en su preparación.

Los sistemas moleculares incluyen polímeros solubles en los cuales las moléculas del fármaco se han unido covalentemente, conjugados de fármaco y anticuerpos como las inmunotoxinas y conjugados de fármacos con otras macromoléculas (ciclodextrinas y dendrímeros). Aunque los acarreadores moleculares permiten una extensa distribución del fármaco incorporado, una limitante para su uso es la pequeña carga de fármaco que puede estar llevando cada molécula, contrario a los acarreadores particulados, que pueden llevar un gran número de moléculas de fármaco en cada entidad[4].

Microemulsiones

El término microemulsión fue introducido en 1940 por Hoar y Schulman, quienes generaron una solución transparente a partir de la titulación de una emulsión con hexanol[20]. Las microemulsiones se definen como sistemas transparentes obtenidos de una emulsión normal la cual es titulada hasta claridad con un medio conteniendo alcoholes de cadenas intermedias entre 3 y 12 carbonos. El término microemulsión algunas veces es restringido para los sistemas en los cuales las gotas están tan pequeñas que las propiedades físicas de las dispersiones en una fase oleosa o acuosa son indistinguibles de las que corresponden a cada una de las fases.

La transparencia de las microemulsiones se debe a los diámetros tan pequeños de las gotas, normalmente menores a 140nm, las cuáles son muy pequeñas comparadas con las gotas de las emulsiones normales (1 - 10 μ m).

Una diferencia importante entre las microemulsiones y las emulsiones es que las microemulsiones se forman espontáneamente, a diferencia de las emulsiones que requieren un trabajo mecánico para su formación. En las microemulsiones, la tensión interfacial es lo suficientemente baja como para compensar la entropía de dispersión, haciendo de la microemulsión un sistema termodinámicamente estable.

Un requerimiento esencial para la formación y estabilidad de estos sistemas es disminuir la tensión interfacial (γ). El rol de los tensoactivos en estos sistemas es el de reducir la tensión interfacial entre el aceite y el agua (básicamente alrededor de 50 mNm⁻¹)[21]. Los

tensoactivos utilizados para la formación de microemulsiones de una sola fase pueden ser: (i) no iónicos, (ii) zwitteriónicos, (iii) catiónicos, o (iv) aniónicos. La combinación de éstos, principalmente iónicos y no iónicos, puede ser efectiva para agrandar la zona de microemulsión. La presencia de moléculas hidrofílicas como el glicerol y el sorbitol en la fase acuosa también agrandan la zona de microemulsión, ya que se altera la solubilidad de los grupos hidrofóbicos de la fase oleosa. Debido a estos efectos es que se han utilizado materiales hidrofílicos solubles en agua para la formación de microemulsiones.

A excepción de los tensoactivos de cadenas dobles alquilo y unos pocos tensoactivos no iónicos, generalmente no es posible lograr el área interfacial requerida con el uso de un solo tensoactivo. Sin embargo, si una segunda molécula anfifílica es adicionada al sistema, el efecto de las dos moléculas puede ser aditivo, siempre y cuando la adsorción de uno no sea afectada por el otro y que la formación de micelas mixtas no reduzca la concentración de moléculas de tensoactivo disponibles. La segunda molécula anfifílica se refiere a un cotensoactivo. Los alcoholes con cadenas de longitud media son comúnmente adicionados como cotensoactivos, los cuales tienen como función reducir la tensión interfacial, aunque se esté incrementando la fluidez de la interfase y por eso se incremente la entropía del sistema[17,20].

La representación más simple de las microemulsiones es un modelo de gotas pequeñas (5-140nm) de un líquido rodeadas por una película interfacial compuesta por moléculas de tensoactivo y cotensoactivo. La orientación de las moléculas anfifílicas en la interface será diferente, lo que provocará que se formen gotas de aceite en agua (o/w) o gotas de agua en aceite (w/o), y en su defecto, microemulsiones bicontínuas (Fig. 1.3.1).

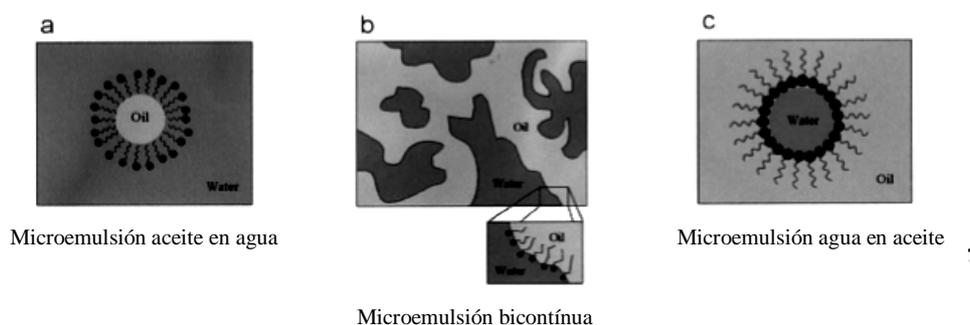


Fig. 1.3.1. Representación esquemática de las tres estructuras más comúnmente encontradas: (a) aceite en agua, (b) bicontínua y (c) agua en aceite.

Como se muestra en la figura 1.3.1, las porciones hidrofóbicas de estas moléculas residirán en las gotas de aceite dispersas de los sistemas o/w, con los grupos hidrofílicos sobresalientes en la fase continua, y sucede lo contrario con las microemulsiones w/o.

El que el sistema forme microemulsiones o/w o w/o está determinado en gran parte por la naturaleza del tensoactivo, pero generalmente, las microemulsiones o/w son favorecidas cuando están presentes pequeñas cantidades de aceite, y los sistemas w/o se forman en presencia de cantidades pequeñas de agua.

La selección de los componentes para microemulsiones de uso farmacéutico tiene que considerar el factor toxicidad, ya que no deben ser tóxicos[20].

Muchos tensoactivos no iónicos tienen propiedades convenientes para la administración tópica, pero para la generación de microemulsiones destinadas a la administración oral o parenteral están muy limitados. Algunos ejemplos de estos tensoactivos son los polioxietilados (Brij®), los polisorbatos (Tween®) y el sorbitan monooleato (Span®)[21]. Los estudios que se han hecho recientemente sobre microemulsiones indican que los tensoactivos no iónicos pueden afectar las funciones de las barreras de la piel. En experimentos realizados en piel de ratas *in vitro* se encontró que el Span 20®, Tween 20® y Azone® tienen diferentes mecanismos de acción, por ejemplo, el Span 20® y Azone® afectan a los lípidos intracelulares del estrato corneo haciéndolos más fluidos[22].

También se debe considerar que opciones de cotensoactivos se tienen, pues la utilización de alcoholes de cadena corta y mediana se limita un poco por su toxicidad y propiedades irritantes, y aunque estos pueden ser eliminados por evaporación se puede perder la estabilidad del sistema. Dentro de los cotensoactivos más utilizados están el 1-butanol, 2-butanol y terc-butanol, así como el propanol, isopropanol y etanol[20,21].

Liposomas

Los liposomas son estructuras altamente versátiles con grandes aplicaciones terapéuticas y analíticas. Están compuestos por una bicapa lipídica, donde las cadenas hidrofóbicas de los lípidos forman la bicapa y sus cabezas polares están orientadas tanto hacia la parte extravesicular como hacia la cavidad interna. Estas estructuras son similares a las células, y pueden ser utilizados para acarrear moléculas de DNA, proteínas y fármacos[23]. Los

liposomas utilizados para el área farmacéutica consisten en un esqueleto de fosfolípidos y un tamaño menor a 100 nm.

El rasgo común que todos los componentes formadores de bicapas tienen, es su porción anfifílica. Ellos tienen una región polar y una no polar. En el agua, la región hidrofóbica tiende a agregarse y la región polar tiende a quedar en contacto con la fase acuosa (Fig.1.3.2)[24].

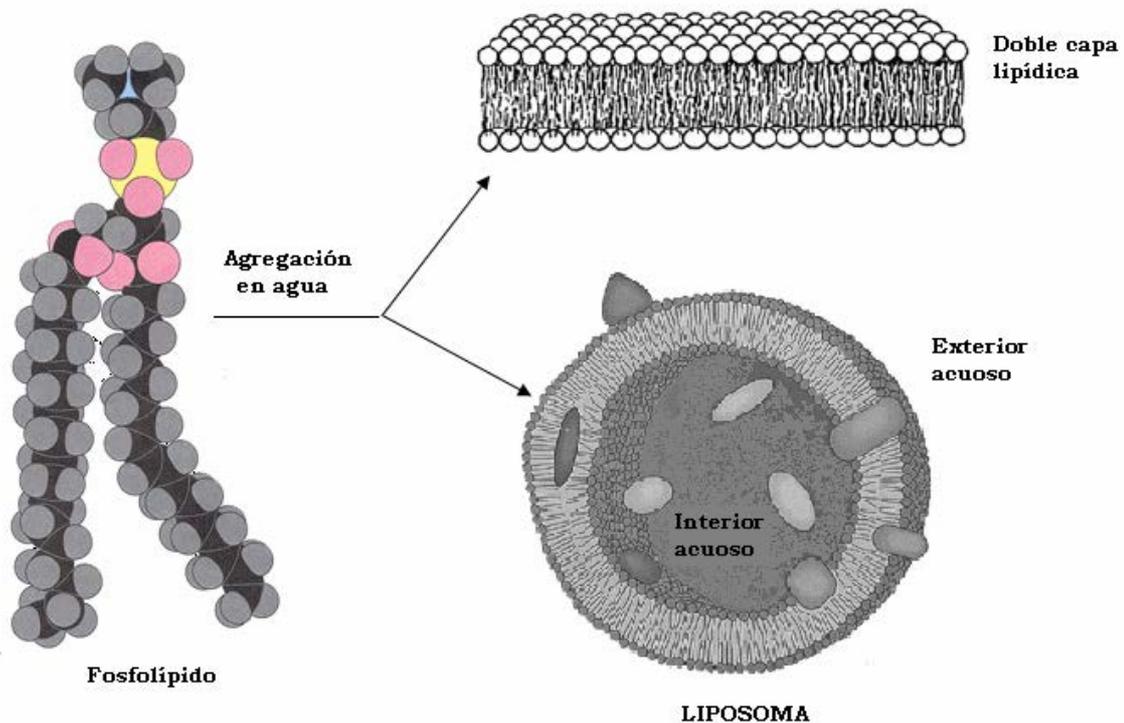


Fig.1.3.2. Formación de la bicapa lipídica con fosfolípidos.

Los liposomas pueden ser clasificados en base a sus propiedades estructurales (Fig. 1.3.3) o en base al método de preparación utilizado. Según sus propiedades estructurales se clasifican en[5]:

- Vesículas grandes multicapas (MLV), $> 0,5 \mu\text{m}$
- Vesículas oligocapas (OLV), $0,1-1 \mu\text{m}$
- Vesículas unicapas (UV), cualquier tamaño
- Vesículas unicapas pequeñas (SUV), $20-100 \text{ nm}$

- Vesículas unicapa medianas (MUV)
- Vesículas unicapa grandes (LUV), $> 100 \text{ nm}$
- Vesículas unicapa gigantes (GUV), $> 1 \mu\text{m}$
- Vesículas multivesiculares (MVV), $> 1 \mu\text{m}$

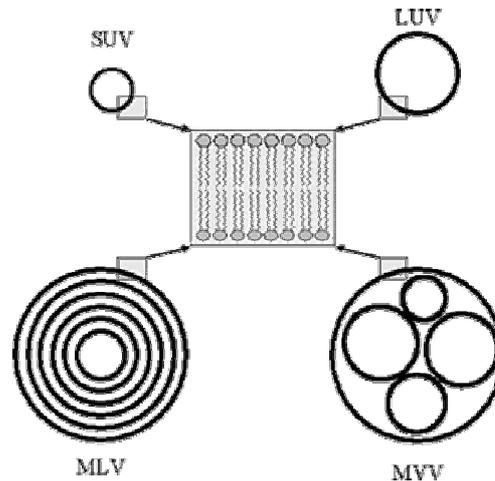


Fig. 1.3.3. Representación esquemática de algunos de los diferentes tipos de liposomas.

Según su método de preparación, se pueden clasificar en[21,24]:

- Evaporación por fase reversa (REV),
- Método extrusión (VET),
- Por fusión (FUV),
- Dehidratación / rehidratación (DRV)

Por lo general, los liposomas convencionales son considerados inestables físicamente, es decir, su estructura permanece intacta sólo por unos meses. Debido a esto es que se ha modificado la superficie de los liposomas, y es por esto que los liposomas también se pueden clasificar de acuerdo a su recubrimiento (Fig. 1.3.4)[24]:

- Convencionales (fosfolípidos naturales como la lecitina)
- Liposomas Stealth (recubiertos con polímeros como el PEG)
- Liposomas target (recubiertos por antígenos)
- Liposomas catiónicos (fosfolípidos con cargas positivas)

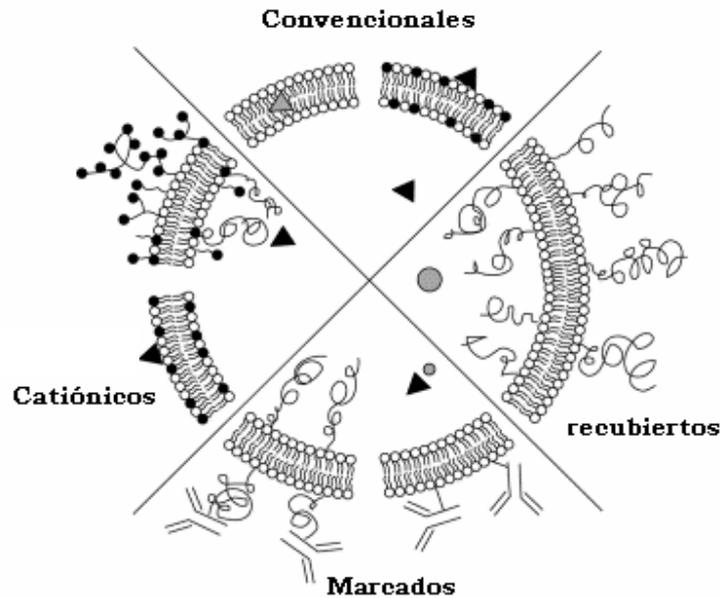


Fig. 1.3.4. Representación esquemática de los diferentes tipos de recubrimiento para liposomas.

Dependiendo de la selección de los lípidos y de la técnica y condiciones de preparación, los liposomas pueden variar fácilmente en tamaño, número y posición de las capas, carga y rigidez de la bicapa.

Los liposomas utilizados como acarreadores para fármacos deben estar constituidos de materiales que son para uso humano.

Las fosfatidilcolinas y los fosfatidilgliceroles son de fuentes naturales, semisintéticas y sintéticas, y los que frecuentemente se encuentran en los liposomas designados para formar sistemas acarreadores de fármacos son el colesterol y la fosfatidiletanolamina con polietilenglicol.

La fosfatidilcolina es frecuentemente utilizada por sus fosfolípidos zwitteriónicos y el fosfatidilglicerol es utilizado a menudo por sus lípidos con carga negativa[21,25].

Las aplicaciones terapéuticas de los liposomas son:

- 1) Generar nuevos sistemas de liberación que sean estables, que permanezcan por largo tiempo en circulación, y formen complejos de DNA- liposomas catiónicos.
- 2) Liposomas para liberación tópica, ocular, dérmica, pulmonar, parenteral, oral, etc.

Nanopartículas

Las nanopartículas son partículas poliméricas, con un tamaño entre 10 a 1000 nm (1 μm). Están compuestas por materiales macromoleculares en los cuales el principio activo (fármaco o material biológico activo) es disuelto, atrapado o encapsulado, y/o adsorbido en la superficie. A continuación se describen ampliamente.

2. NANOPARTÍCULAS

Como ya se mencionó anteriormente, las nanopartículas son partículas coloidales en el intervalo de tamaños entre 10 y 1000 nm. Están hechas de material macromolecular en el cual el activo está disuelto, atrapado o encapsulado, el cual puede ser adsorbido o unido covalentemente. Este material debe ser preferentemente biodegradable en el caso de las nanopartículas poliméricas, que como su nombre lo dice; están formadas por polímeros.

Además de las nanopartículas poliméricas, destacan las formadas a partir de lípidos sólidos, conocidas como SLN (nanopartículas sólidas lipídicas)[5]. Las nanopartículas pueden ser clasificadas como nanoesferas y nanocápsulas. Las nanocápsulas son sistemas vesiculares en los cuales el fármaco está contenido en una cavidad oleosa o acuosa, la cual está rodeada de una membrana polimérica. Las nanoesferas son sistemas matriciales en los cuales el fármaco está uniformemente disperso[26].

Los polímeros naturales (proteínas y polisacáridos) no han sido ampliamente usados para la obtención de nanopartículas, pues dada su variedad en pureza resulta ser inconveniente el uso de dichos polímeros. Consecuentemente, los polímeros sintéticos tienen una mayor aplicación en esta área. Los polímeros utilizados mas frecuentemente para la obtención de nanopartículas son ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), y su copolímero, el ácido poliláctico-glicólico (PLGA), los poliacrilatos y policaprolactonas. Estos polímeros son ampliamente usados debido a que algunos de ellos (PLA y PGA) son hidrolizados en el cuerpo, formando metabolitos como el ácido láctico y el ácido glicólico, los cuales son eventualmente eliminados por el ciclo del ácido cítrico. La toxicidad de estos polímeros ha sido evaluada en animales, y los resultados han sido diversos, pero algunos han resultado ser

muy poco dañinos, tal es así que muchos de estos polímeros han sido utilizados como materiales para la elaboración de órganos artificiales[8,27,28].

2.1. Métodos de preparación

Desplazamiento de disolvente

Las nanopartículas poliméricas pueden obtenerse mediante este proceso. En dicho proceso, el polímero se disuelve en un disolvente orgánico que se evapore fácilmente y que sea miscible en agua. Una solución de fármaco en el mismo disolvente se adiciona a la solución del polímero, y una vez obtenida la mezcla se agrega agua conteniendo 0,5% de un estabilizante. La suspensión obtenida debe ser concentrada, evaporando el disolvente orgánico, y el agua residual debe eliminarse bajo presión reducida[5,28,29].

Emulsión–Evaporación

El método de evaporación de disolventes fue establecido para la preparación de microesferas con tamaños de aproximadamente 1 μm . Sin embargo, con este proceso se pueden obtener partículas menores a 1000 nm.

En esta técnica el polímero se disuelve junto con el fármaco en un disolvente orgánico inmisible con el agua, el cual es emulsificado en una disolución acuosa y subsecuentemente evaporado por calentamiento o presión reducida. Por esta razón, el tamaño de partícula de las partículas poliméricas resultantes depende del tamaño de las gotas de la emulsión antes de evaporar el disolvente. El tamaño de partícula puede ser controlado por varios factores, incluyendo la velocidad de agitación, el tipo y la cantidad de agente dispersante, la viscosidad y la cantidad de la fase acuosa y la fase orgánica, así como por la temperatura.

En este método, la emulsificación de la fase oleosa puede ser por sonicación, y la eliminación de la fase acuosa puede ser mediante ultracentrifugación o liofilización[21,27,30].

Emulsificación-difusión

En este método se utiliza un disolvente miscible en agua, por ejemplo la acetona o el carbonato de propileno. El polímero y el activo se disuelven en el disolvente y posteriormente se emulsifica en una fase acuosa, la cual contiene un estabilizador. El estabilizador previene la agregación de las gotas ya que éste se adsorbe a la superficie de las gotas. Se agrega un poco más de agua para permitir la difusión del disolvente a la fase acuosa y se formen las nanopartículas. La solución se agita para precipitar a las nanopartículas, y pueden recolectarse por centrifugación o se puede eliminar el disolvente por diálisis[31,32].

Salting-out

Este método se basa en la separación de un disolvente miscible con agua de una disolución acuosa mediante efecto de *salting-out*. En esta técnica no pueden ser utilizados los disolventes clorados, ya que puede existir alguna competencia entre los iones. Mediante esta técnica se obtiene una emulsión agua en aceite (w/o). La fase oleosa de la emulsión está compuesta por el polímero y el activo, los cuales están disueltos en acetona (ya que se conoce muy bien su comportamiento) y la fase acuosa contiene acetato de magnesio tetrahidratado (electrolito) y un estabilizante coloidal. Posteriormente se agrega agua hasta tener un volumen suficiente en el cual se permita la difusión de la acetona a la fase acuosa y se formen las nanopartículas. Esta suspensión puede ser separada por filtración o liofilización[5,33,34].

Microemulsión por fusión

Se entiende por microemulsión un sistema de dos fases, compuesto por una fase interna y una fase externa donde el tamaño es menor a 1µm, lo cual le confiere la característica de ser transparentes (por ejemplo, las microemulsiones o/w). Estas se obtienen por agitación constante a 60–70° C hasta obtener una mezcla ópticamente transparente, que normalmente está compuesta por un ácido graso de punto de fusión bajo, un tensoactivo, un cotensoactivo

y agua. La microemulsión caliente se dispersa en agua fría (2-3° C) bajo agitación. El volumen de agua fría que debe agregarse a la microemulsión caliente debe ser de 25 a 50 veces mayor. Es importante considerar que esta técnica es recomendada para obtener nanopartículas sólidas lipídicas, ya que el punto de fusión de los ácidos grasos es menor que el de los polímeros sintéticos, pero en algunos casos resulta ser una buena opción aplicarla para polímeros con bajo punto de fusión y que tengan la capacidad de disolver al fármaco en cuestión[18].

2.2. Caracterización de nanopartículas

Existe un gran número de métodos para caracterizar nanopartículas. El tamaño es el rasgo más destacado en las nanopartículas, sin embargo otros parámetros como la densidad, el peso molecular y sus características cristalinas tendrán una gran influencia en sus propiedades de liberación y degradación; al igual que las características de su superficie, tales como la carga en superficie, la hidrofilia y la lipofilia, que influirán en la interacción con el medio ambiente después de su administración a humanos y animales, y esto a su vez influirá en su distribución.

La información acerca de la estructura de las nanopartículas se puede obtener por difracción de rayos X y métodos termoanalíticos., tales como la calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis diferencial térmico (DTA), análisis gravimétrico térmico (TGA), análisis mecánico térmico (TMA) y el análisis óptico térmico (TOA)[21].

Tamaño de partícula

La espectroscopia de correlación de fotones (PCS) y la difracción láser (LD) son las técnicas más utilizadas para medir tamaño de partícula. La PCS (también conocida como dynamic light scattering) mide la fluctuación de la intensidad de la luz esparcida, la cual es causada por el movimiento browniano de la partícula. Por esta razón, el tamaño de partícula está influenciado por la interacción de las partículas con el medio en el que se encuentran, por lo cual debe conocerse la viscosidad del medio. La precisión de los tamaños de partícula mejora si se utilizan factores de esparcimiento derivados de la teoría de Mie. El cálculo de

los factores de Mie requieren conocer el índice de refracción de las partículas, el cual puede sustituirse por el índice de refracción del polímero con el cual se hayan fabricado las nanopartículas[21]. Este método abarca tamaños en un intervalo de pocos nanómetros hasta 6 micras. La PCS es una buena herramienta para la caracterización de nanopartículas, pero no es una buena opción para determinar tamaños de partículas muy grandes[18].

Potencial zeta

La medida del potencial zeta permite hacer predicciones acerca de la estabilidad de la dispersión coloidal. En general, la agregación de las partículas es menor en aquellas que están cargadas (potencial zeta alto) debido a la repulsión eléctrica. Sin embargo, esta regla no puede aplicarse estrictamente a los sistemas que contienen estabilizantes, ya que la adsorción de los estabilizantes disminuirá el potencial zeta debido al cambio en la superficie de la nanopartícula[18,35].

Carga en superficie

La carga de la superficie de las nanopartículas es determinada comúnmente por movilidad electroforética[21].

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Con el análisis por DSC se puede obtener información cuantitativa y cualitativa acerca de los cambios físicos y químicos que ocurren en una muestra. La DSC es ampliamente utilizada en la industria farmacéutica para determinar puntos de fusión, pureza y la temperatura de transición de los materiales, la cual depende del peso molecular de la muestra y de su acomodo estructural[18]. Existen otros parámetros que pueden medirse con DSC, como por ejemplo, cristalización, cuantificación de la cristalinidad y formación de polimorfos. Los tipos de eventos térmicos, exotérmicos y endotérmicos que pueden medirse por DSC se reportan en la Tabla 2.2.1, apéndice I[16]:

Encapsulación de fármaco

La encapsulación del fármaco se refiere a la eficiencia de la incorporación del fármaco en la matriz polimérica. Sin embargo, hay varias alternativas donde el fármaco puede ser incorporado, y esto depende de la estructura del acarreador (micelas, micelas mixtas, liposomas, etc.), del tamaño de partícula, potencial zeta, modificación de la superficie, etc. El porcentaje de fármaco encapsulado dentro de la nanopartícula se reporta como porcentaje de encapsulación. Para determinar el porcentaje de encapsulación se utilizan la espectroscopia UV, HPLC entre otras[18,36].

Liberación del fármaco

Un estudio de liberación in vitro revela información fundamental de la estructura de la nanopartícula, así como de la conducta de la formulación a nivel molecular, posibles interacciones entre el fármaco y el polímero, y su influencia en la velocidad y el mecanismo de liberación. Los métodos más comúnmente utilizados para sistemas nanoparticulados son flujo continuo, filtración, ultracentrifugación y diálisis[37]. Los estudios de liberación van a depender de factores como la temperatura del medio de disolución, el pH, la velocidad de agitación y si el sistema se encuentra en condiciones sink (cuando la concentración del fármaco en el medio de disolución es mucho menor que la solubilidad del fármaco)[38].

2.3. Modificación de la superficie de nanopartículas con polímeros

Los sistemas micro y nanoparticulados han sido considerados como buenos sistemas acarreadores de fármacos. Sin embargo, se sabe que el Sistema Fagocítico Mononuclear (MPS) (células de Kupffer del hígado y macrófagos del bazo) también conocido como Sistema reticuloendotelial (RES) es el mayor obstáculo para un alojamiento prolongado de estos sistemas en circulación, ya que son fácilmente eliminados, sobre todo aquellas partículas que tienen una superficie hidrofóbica[39-42].

Para que estos sistemas permanezcan por mas tiempo en circulación es necesario modificar o recubrir su superficie hidrofóbica, y así prevenir la fagocitosis[27].

Los recubrimientos más comunes son los polisacáridos y el polietilenglicol (PEG). Los polisacáridos más usados son el dextran, chitosan y heparina; sin embargo, polímeros como la polivinil pirrolidona (PVP), alcohol polivinílico (PVA), la poliacrilamida, y especialmente el PEG resultan ser una mejor alternativa para recubrir nanopartículas[43].

Trabajos recientes han demostrado que la modificación de nanopartículas con cadenas de PEG, independientemente de la longitud y la densidad de las cadenas de PEG en la superficie de la partícula, no pueden prevenir totalmente la activación del complemento. Sin embargo, cadenas muy largas de PEG (20 kDa PEG) son más efectivas, incluso teniendo una baja densidad en el recubrimiento[44]. Muchos estudios han definido al recubrimiento con PEG como un parámetro para designar al tiempo que los sistemas acarreadores permanecerán en circulación. El PEG fue elegido por no tener cargas, ser hidrofílico y no inmunogénico, por incrementar su biocompatibilidad en algunos casos y además, puede ser unido, adsorbido o incorporado fácilmente en la formulación de los sistemas acarreadores. Sin embargo, la capacidad del PEG para repeler proteínas y no interactuar con la membrana de los macrófagos depende de parámetros como el peso molecular, la densidad, la conformación y flexibilidad de las cadenas[41].

Algunos estudios han mostrado que la adsorción de proteínas disminuye cuando se incrementa el peso molecular del PEG utilizado, sobre todo con los que tienen un peso molecular entre 1500 y 3500 Da. En este caso, una mayor densidad del cepillo que forman las cadenas de PEG provoca una mayor repulsión de las opsoninas, aunque también depende del tamaño de las proteínas[45].

El efecto de las cadenas de PEG en el rechazo de las proteínas, desde un punto de vista entrópico, muestra que el PEG acomodado como ramas es menos eficiente que un acomodamiento lineal. Muchas conformaciones de las cadenas poliméricas han sido descritas basándose en la relación que hay entre la distancia que existe entre dos cadenas poliméricas (D) y el radio del giro que forma la cadena (R_g). Cuando $R_g < D < 2R_g$, la conformación que se observa es parecido a un hongo apretado (interdigitated mushroom) y cuando $D > 2R_g$ la conformación es parecida a un hongo laxo (mushroom). Si los valores de D y R_g se aproximan entre sí, la conformación cambia de hongo laxo a hongo / cepillo, y cuando la relación es $D \ll R_g$ las cadenas poliméricas toman una conformación de cepillo (Fig. 2.3.1)[43]. Las conformaciones que hasta ahora han mostrado una mayor resistencia a

la fagocitosis son la de hongo/cepillo y la de cepillo[45].

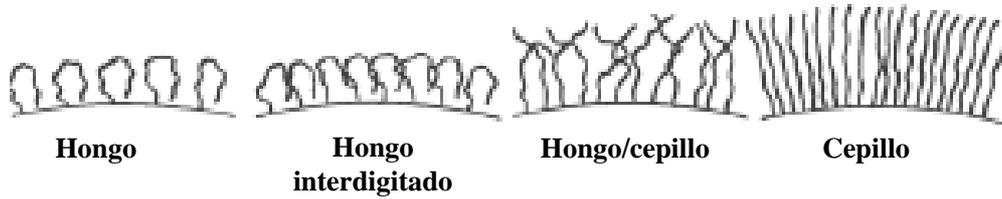


Fig 2.3.1. Representación esquemática de las diferentes conformaciones observadas en la superficie de los acarreadores coloidales.

Papisov et al.[43] encontraron la influencia de la densidad del cepillo, la rigidez, el tamaño molecular y el tamaño del sustrato en la interacción o repulsión de las proteínas a estos acarreadores coloidales, y propusieron que cuando las proteínas son muy grandes la probabilidad de que penetren o interaccionen con la superficie del acarreador es menor (Fig.2.3.2)[43,46].

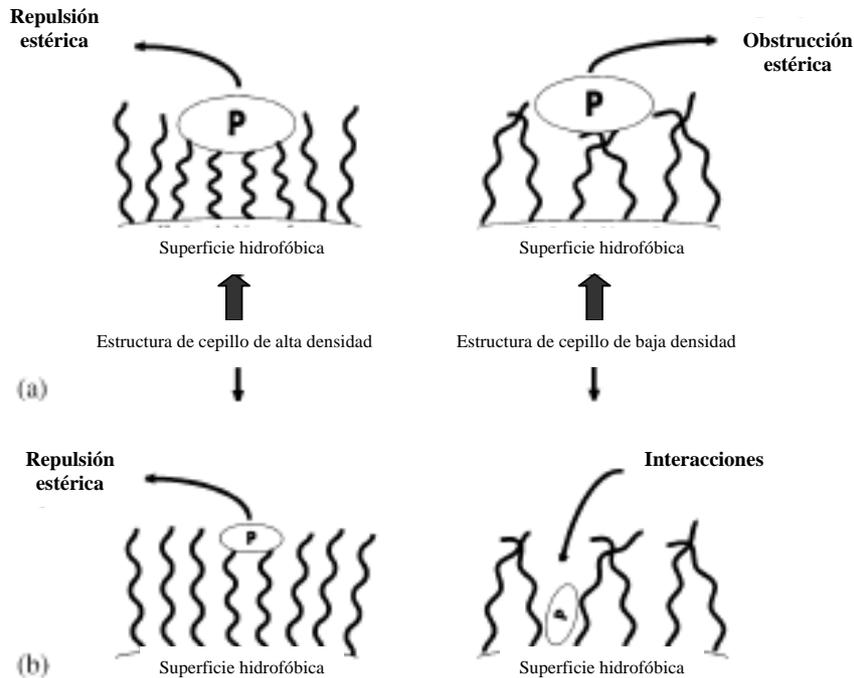


Fig.2.3.2. Representación esquemática de la relación entre la estructura del cepillo y las proteínas grandes (a) y las proteínas pequeñas (b).

El mecanismo por el cual este polímero puede modificar la superficie de la partícula es por

adsorción física, o bien, realizando la modificación con copolímeros, donde la unión del polímero en la partícula es de tipo covalente[47]. Los copolímeros están compuestos por diferentes monómeros y se clasifican en cuatro grupos: copolímeros hechos al azar, copolímeros alternados, copolímeros insertados y bloques de copolímeros (Fig.2.3.4)[8]. Algunos ejemplos de copolímeros son el PLA-b-PEG, PLGA-b-PEG, PCL-b-PEO y PCL-b-PEG[48]. En el caso de las nanopartículas biodegradables, las cadenas de PEG pueden ser incorporadas como copolímeros, para que algunas de las cadenas de PEG estén siempre disponibles[8].

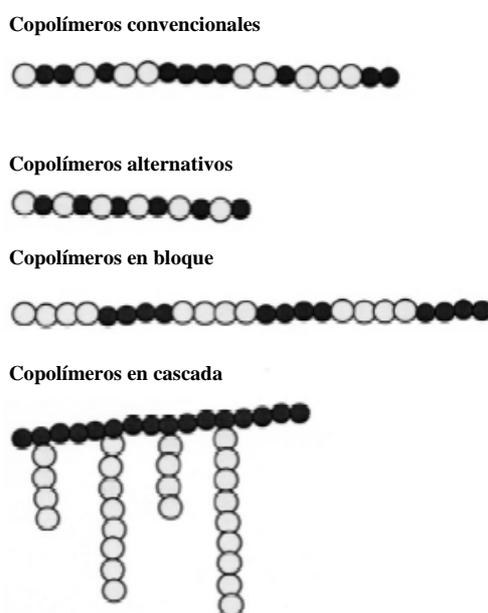


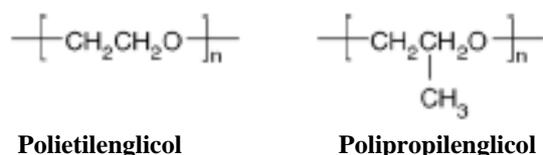
Fig.2.3.4. Diferentes tipos de copolímeros (las esferas negras son un tipo de polímero y las grises otro).

El método preferido para impartir recubrimiento o propiedades de estabilización a las nanopartículas es a través de la “PEGylation”. La “PEGylation” simplemente se refiere al recubrimiento de la superficie de la partícula con cadenas de PEG, atrapado o adsorbido, o bien, unido por enlaces covalentes (copolímeros)[41].

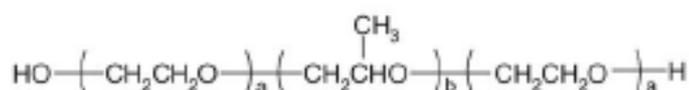
El polietilenglicol (PEG) es un polímero compuesto por varias unidades o monómeros de poli éteres. El PEG puede ser líquido o sólido, con un punto de fusión bajo, dependiendo del peso molecular (véase Tabla 2.3.1, apéndice I). El PEG puede ser preparado por polimerización del óxido de etileno.

La estructura básica de los polietilenglicoles es la siguiente: $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$.

Debido a que se ha observado una significativa disminución en la interacción de los macrófagos con la superficie de las nanopartículas recubiertas con cadenas de óxido de etileno, se han utilizado bloques de copolímeros formados por unidades de óxido de etileno (PEO) y óxido de propileno (PEO), también conocidos como poloxámeros (Pluronic® de BASF)[41].

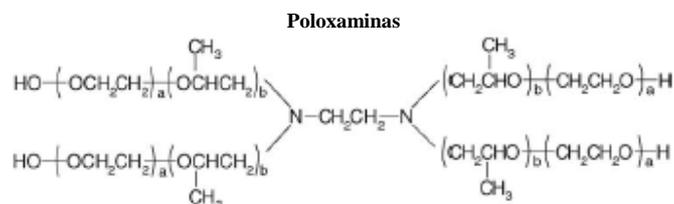


Poloxámeros



Los Pluronic ® pueden funcionar como agentes antiespumantes, agentes hidratantes, dispersantes y emulsificantes. Los Pluronic ® R tienden a generar menos espuma que los Pluronic ® comunes, pero sus funciones son similares (Véase Tabla 2.3.2, apéndice I).

Otros bloques de copolímeros que también están formados por unidades de óxido de etileno y óxido de propileno, son las poloxaminas (Tetronic® de BASF)[41].



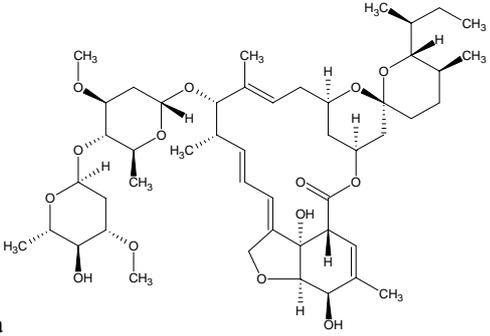
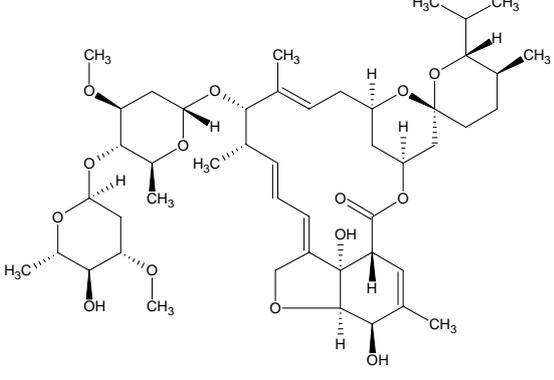
Los Tetronic ® son copolímeros formados por cuatro unidades de óxido de etileno y óxido de propileno. Funcionan como agentes antiespumantes, agentes hidratantes, dispersantes y emulsificantes. Los Tetronic ® se distinguen por su gran capacidad de dispersión, lubricación y por su acción antiespumante (véase Tabla 2.3.3, apéndice I).

Se han realizado varios estudios de fagocitosis de nanopartículas poliméricas, las cuales se han modificado con diversos polímeros. En la Tabla 2.3.4 y 2.3.5, apéndice I, se enlistan los diferentes polímeros que se han utilizado para estudios de opsonización[41].

3. IVERMECTINA

3.1. Ficha técnica

La Ivermectina es un derivado de los productos de fermentación de la dihidro avermectina B1a (abamectina), la cual posee un anillo lactona macrocíclico que proviene originalmente de la fermentación de *Streptomyces avermitilis*. Consta de una mezcla de 22,23- dihidro avermectina B1a (un poco más del 90%) y 22,23-dihidro- avermectina B1b (menos del 10%)[49,50]. La Ivermectina es el primer endectócido con un anillo lactona macrocíclico, descubierto por Merck a la mitad de los 70`s, valiéndose de un programa de escaneo. Históricamente, los fármacos derivados de fermentaciones bacterianas o fúngicas han tenido aplicaciones como agentes anticancerígenos o antibacterianos, pero gracias al análisis de los productos obtenidos de las fermentaciones se encontró que la Ivermectina podría ser un antiparasitario muy eficaz en la industria farmacéutica que se enfoca a la salud de los animales[51].

<p>Estructura</p>	 <p>Ivermectina B1a</p>  <p>Ivermectina B1b</p>
<p>Fórmula química</p>	<p>$C_{48}H_{74}O_{14}$</p>
<p>Peso molecular</p>	<p>875.10 g/mol</p>
<p>ρ relativa</p>	<p>1.1268 g/cm³</p>
<p>pH</p>	<p>8.1</p>
<p>Punto de fusión</p>	<p>155 ° C</p>
<p>Solubilidad en agua</p>	<p>Insoluble</p>
<p>Estado</p>	<p>Sólido</p>
<p>Log P/ Hidrofobia</p>	<p>6,704</p>
<p>Toxicidad</p>	<p>LD₅₀ 29.5 mg/kg (ratón, vía oral). LD₅₀ 10 mg/kg (rata, vía oral). Los efectos adversos son dolor muscular o abdominal, vértigo, fiebre, dolor de cabeza salpullido, ritmo cardiaco acelerado.</p>
<p>Unión a proteínas</p>	<p>93%</p>
<p>Tiempo de vida media</p>	<p>16 horas (también se reportan de 22 a 28 h) en animales de pastoreo.</p>
<p>Almacenamiento</p>	<p>Mantener los paquetes bien cerrados, en un lugar seco, protegidos de la luz y del calor. Límites de temperatura de conservación sugeridos: 0-30° C.</p>

3.2. Farmacodinamia

La Ivermectina es un antihelmíntico de amplio espectro frente a formas adultas e inmaduras de nemátodos que afectan a los animales de producción. Este antihelmíntico presenta una gran eficacia contra endo y ectoparásitos de las diferentes especies animales. Su mecanismo de acción involucra la potenciación de los efectos del ácido γ -amino butírico (GABA) tipo A ($GABA_A$ R), un neurotransmisor inhibitorio de las respuestas motoras de los parásitos, como la interacción con canales glutamato-cloruro independientes de GABA, incrementando la permeabilidad de la membrana celular de las neuronas del parásito a los iones cloruro (Figura 3.2.1)[52]. Estos canales están asociados a la subunidad α del receptor de glutamato (GluClR) que se encuentra en el músculo de la faringe y en la musculatura somática[51,53,54]. De esta manera la Ivermectina causa bloqueo neuromuscular, resultando en parálisis flácida y la eventual muerte del parásito. Ambos receptores, mediante los cuales actúa la Ivermectina pertenecen a la súper familia de los receptores de tipo canal iónico. La Ivermectina activa irreversiblemente al receptor GluClR por encima de una concentración de 0.1 a 1 μ M.

En los humanos GABA y glutamato no afectan las funciones motoras periféricas, por lo cual la Ivermectina paraliza selectivamente a invertebrados. La Ivermectina es tolerada por mamíferos, ya que los receptores de glutamato y GABA dependientes de canales de cloro están localizados sólo en el sistema nervioso central (SNC), y el fármaco no puede cruzar la barrera hematoencefálica (BHE). Su gran tamaño molecular y el alto grado de unión a las proteínas del plasma limitan su paso hacia el SNC a través de la BHE. Esta limitada distribución hacia el SNC parece ser el factor más importante en la seguridad para el huésped mamífero vertebrado. Sin embargo, algunos factores como el insuficiente desarrollo de la BHE en los recién nacidos o la acción de procesos febriles pueden determinar que se incremente el paso de moléculas de Ivermectina hacia el SNC y logre concentraciones que sean capaces de actuar sobre las neuronas gabaérgicas y ejercer alguna acción farmacológica[53,54].

Merck identificó al receptor de glutamato como el sitio blanco de la Ivermectina. Los experimentos realizados con el nematodo *Caenorhabditis elegans* enfatizan la importancia de los receptores de glutamato en el mecanismo de acción de la Ivermectina. Sin embargo, la

resistencia de estos organismos hacia la Ivermectina se logra después de la mutación de tres genes que codifican para la liberación de las subunidades de los receptores de glutamato dependientes de cloro. Estos resultados sugieren que GABA es de menor importancia en la farmacodinamia de la Ivermectina en nematodos[51].

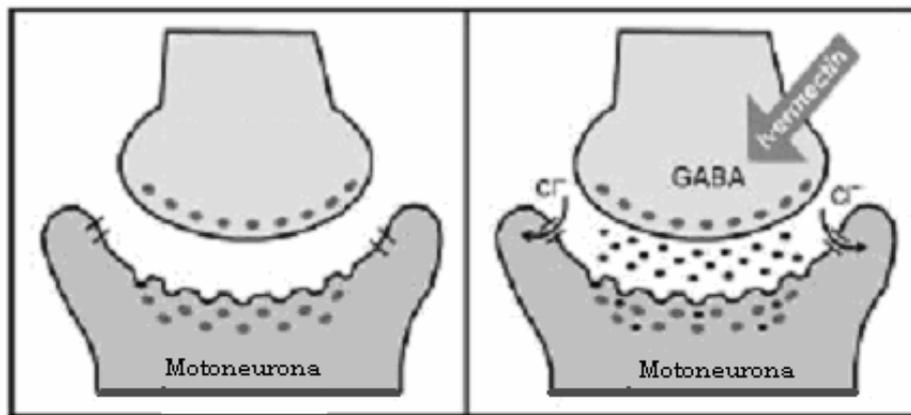


Fig. 3.2.1. Acción de la Ivermectina sobre el receptor de GABA dependiente del canal de cloro.

3.3. Farmacocinética

El estudio farmacocinético de la Ivermectina ha mostrado una buena disponibilidad, ya que debido a su alto peso molecular y una elevada lipofilia muestra un alto volumen de distribución, con una gran afinidad por la grasa corporal y prolongada persistencia de sus concentraciones en el organismo[54]. Esta es absorbida rápidamente si es administrada por vía oral y en estado de ayuno, se metaboliza principalmente en el hígado y es excretada en heces fecales (98%) y por orina (1%). Sin embargo, en hembras en lactancia una fracción significativa de fármaco (5% de la dosis) se excreta por la leche, en donde tiene una prolongada vida media

La concentración de Ivermectina en sangre alcanzada 4 h después de su administración es de 30 a 46 ng/mL, y después de este tiempo disminuye lentamente. La mayor concentración de metabolitos en el plasma permanece mucho más tiempo que el mismo fármaco, lo que indica una reabsorción entero hepática. La Ivermectina alcanza los niveles plasmáticos más altos hasta 5 h después de su administración por vía oral, y el tiempo de vida media es de 36 h[53].

La Ivermectina se distribuye en el organismo, aunque se concentra en la bilis, hígado y grasa. En el ganado, los residuos de Ivermectina son detectables en plasma a los 80 días después de su administración por vía subcutánea en dosis de 200µg/kg de peso, los cuales resultan ser no tóxicos[55].

Parece ser que la biotransformación de la Ivermectina se lleva a cabo por procesos de hidroxilación dentro y fuera del sistema microsomal, incluso rumial o intestinal. El porcentaje de recuperación de metabolitos en plasma puede ser de un 91.5%[53].

3.4. Uso, dosis recomendadas y vías de administración

La Ivermectina (22,23-dihidro-avermectina B1a) es un antiparasitario de amplio espectro perteneciente a la clase de las lactonas macrocíclicas, mejor conocidas como avermectinas.

La Ivermectina tiene una estructura similar a la de los antibióticos que pertenecen a la familia de los macrólidos, sólo que ésta carece de actividad antibacterial.

La Ivermectina es usada contra un extenso grupo de endoparásitos (nematodos) y ectoparásitos (insectos) de animales y humanos. Para el uso humano, la Ivermectina fue introducida después de la infestación por *Onchocerca volvulus* en 1982[53]. La introducción de la Ivermectina en este año elevó enormemente el control de algunos gusanos, pues se combinó su potencia y su amplio espectro como agente antiparasitario, principalmente para tratar enfermedades causadas por nematodos y ectoparásitos, administrándose en dosis bajas (200-300 µg/kg para el ganado, ovejas, cerdos y caballos) (Tabla 3.4.1, apéndice I)[56].

En particular, la remarcada lipofilia y la potencia de la Ivermectina (potencia intrínseca < 1 nM para muchas especies) abrió nuevas aplicaciones, las cuáles fueron de gran impacto en la producción de ganado[51]. La Ivermectina ha sido utilizada en la medicina veterinaria por casi un cuarto de siglo y aprobada para uso humano por casi 18 años. Además de su uso en el tratamiento de parasitosis en animales causadas por nematodos y artrópodos, resulta ser una esperanza para el control e incluso la erradicación de la filariasis en el humano[57].

En los últimos años varios estudios han detallado la importancia de la Ivermectina como una solución para infecciones endoparasitarias como la sarna, pediculosis, gnatostomiasis y miasis, así como su administración por vía parenteral para tratar la estrogiloidiasis[58].

La Ivermectina se usa a dosis de 200µg/kg por vía subcutánea, ya que por vía intramuscular induce necrosis tisular, sólo que al estar protegida por los excipientes el daño es mucho menor. También se ha visto que se puede administrar por vía oral pero tiene la desventaja de que debe administrarse repetidas veces, dado que su biodisponibilidad es limitada. Sin embargo, el fármaco es muy liposoluble y puede absorberse incluso por vía cutánea. Se ha observado que a dosis bajas de 10 ó 40 µg/kg/día puede ser eficaz para el control de las infestaciones por parásitos sensibles al medicamento[55].

Algunas dosis que se manejan en animales se enlistan a continuación[55]:

200 µg/kg de peso corporal para bovinos, ovinos y caprinos (inyección subcutánea);

200 µg/kg de peso corporal para equinos (oral)

300 µg/kg de peso corporal para cerdos (inyección subcutánea)

500 µg/kg de peso corporal para bovinos (solución tópica)

200 µg/kg de peso corporal (solución oral) para ovinos y caprinos

6 µg/kg de peso corporal para caninos (tabletas)

24 µg/kg de peso corporal para felinos (tabletas)

3.5. Sistemas de liberación controlada para animales

En la medicina veterinaria, unas de las principales razones por las cuales es importante el desarrollo de fármacos dentro de sistemas de liberación controlada y/o prolongada son la reducción del estrés causado a los animales por la administración tan repetida del fármaco, así como la reducción de costos en términos de dinero y tiempo.

Para los sistemas de liberación controlada es más conveniente administrarlos en forma de inyección y en dosis repetidas, ya que nos permite conocer la cantidad de fármaco que se está administrando, lo cual no sucede cuando son administrados mediante los alimentos o el agua[59].

El mayor mercado para la aplicación de la tecnología de liberación controlada en el campo de la veterinaria está en prevención y control de enfermedades, vía la liberación de antimicrobianos y agentes antiparasitarios. Otros mercados incluyen el control de la

fertilidad en los animales, promoción del crecimiento (vía liberación de hormonas) y suplementos alimenticios (liberación de nutrientes para animales de rastro)[60].

Debido a que existe una gran variedad en la fisiología de las diferentes especies de animales, cada producto con aplicación veterinaria tendrá que ser designado de forma especial. Esto dependerá de la eficacia y potencia del fármaco en cada una de las especies.

Bolos ruminales

Existen diferentes formas de los fármacos de liberación controlada, y los primeros que se encuentran en el mercado son las formulaciones orales, en forma de bolos ruminales.

Dentro de los rumiantes se encuentran las ovejas y el ganado vacuno, los cuales tienen varios rasgos fisiológicos que proveen importantes oportunidades para liberar al fármaco. Su estómago está compuesto por cuatro compartimientos: el rumen, el retículo, el omaso y el abomaso. El más largo de estos compartimientos es el rumen[61]. Este compartimiento tiene pequeñas aperturas al esófago y al omaso, por lo que presenta una región donde el dispositivo liberador de fármacos puede ser alojado, previniendo que el dispositivo sea regurgitado a lo largo de la alimentación. Esto normalmente se logra por la producción de dispositivos muy densos (hechos con sales de metales pesados que son incorporadas a las tabletas convencionales) o por la producción de dispositivos que se expanden, alcanzando grandes dimensiones del rumen[62]. Después de la liberación del fármaco, algunos de estos sistemas permanecen de manera permanente en el rumen y son removidos por magnetos durante su muerte o son regurgitados en varias partes. Algunos de estos ejemplos de sistemas intrarumiales se muestran en la tabla 3.5.1[63].

Tabla 3.5.1. Ejemplos de bolos ruminales.

Nombre comercial	Manufactura	Fármaco	Duración in vivo
Paractect Flex® Bolus	Pfizer Animal Health	Tartrato de morantel	3 meses
Rumensin ABC®	Elanco Animal Health	Monensin de sodio	3 meses
Spanbolet®II	Norden Laboratories	Sulfametazina	3-50 días
Dura SE®	Schering-Plough Animal Health	Selenito de sodio	4 meses
Ivomec SR®	Merial	Ivermectina	4-5 meses
Penacur SR®	Intervet/Hoechts Roussel Vet	Fenbendazol	4-5 meses

Sistemas que son desviados al rumen

Estos sistemas de liberación en forma oral (usualmente multiparticulados) pasan a través del rumen sin liberar el fármaco, y cuando el fármaco es liberado en el tracto gastrointestinal es porque el sistema ha llegado al obomaso. Una de las aplicaciones de estos sistemas es en la liberación de metionina, la cual es degradada por la flora microbiana del rumen. Para prevenir la liberación del fármaco en el rumen se usan algunos polímeros que previenen la disolución del fármaco en los fluidos del rumen, similares a los que se utilizan para la producción de formas farmacéuticas con recubrimiento entérico para uso humano[64].

Sistemas inyectables-implantables

Existe una variedad de sistemas de liberación prolongada, los cuales han sido una alternativa para remplazar a las inyecciones hechas a base de hormonas, destinadas a controlar el ciclo sexual del ganado, de algunos rumiantes y caballos.

Los avances en la liberación de fármacos a nivel vaginal en el ganado a sido una gran aportación, ya que las inyecciones están limitadas por los daños que pueden causar en la piel o en otro tejido que esté implicado, causando un gran estrés en el animal.

En el mercado existen varios dispositivos de liberación de hormonas, como los dispensores internos de liberación controlada (CIDR®, por sus siglas en ingles; Controlled internal drug release dispenser). Estos sistemas son dispositivos intravaginales en forma de T, impregnados de progesterona, la cual se encuentra en el silicón que cubre al centro de nylon[65]. Los productos comerciales que se manejan son CIDR-S®, CIDR-G® y CIDR-B®[66,67].

Otro ejemplo de estos sistemas son las esponjas, que son dispositivos de poliuretano en forma cilíndrica, impregnados con varias cantidades de progesterona sintética. Syncro-Part® y Syncro-Part®PMSG (pregnant mares serum gonadotrophin;CEVA) son esponjas disponibles en el mercado, para ovejas y ganado respectivamente.

Los dispositivos intravaginales liberadores de progesterona (progesterone-releasing intravaginal device, PRID) están compuestos por progesterona micronizada, la cual está

uniformemente suspendida a lo largo de un dispositivo de silicón, que a su vez, está dentro de un espiral de acero que forma un cilindro[60,68].

Implantes subcutáneos

La posibilidad de liberar suficiente cantidad de progesterona natural o sintética por medio de implantes subcutáneos colocados bajo la piel de las orejas del ganado, ha sido muy investigada, y se ha logrado un gran avance en la producción de estos.

Los implantes son manufacturados incorporando progesterona dentro un polímero. SYNCRO-MATE-B® (CEVA, Libourne, France) es un pequeño implante que se coloca en la oreja del ganado. Otros implantes como Synovex®, Ralgro® y Crestar® también se encuentran disponibles en el mercado[68,69].

Sistemas implantados para veterinaria terapéutica (Veterinary implantable therapeutic system; VITS)

Los VITS son pequeños implantes de liberación controlada en los cuales el fármaco está aislado del ambiente acuoso del cuerpo hasta su liberación. Estos sistemas están destinados a liberar el fármaco de forma controlada, y los fármacos de mayor interés son las somatotropinas, parasiticidas, agonistas de receptores β , suplementos alimenticios y antibióticos.

Estos sistemas forman un reservorio impermeable que contiene al fármaco, el cual es liberado lentamente por la semipermeabilidad de la membrana del dispositivo generada por cambios osmóticos y un pistón. Una vez que la membrana es semipermeable, el agua del cuerpo del animal entra al reservorio y disuelve al fármaco. El ALZET® es un implante que funciona como una bomba osmótica, la cual puede ser programada para liberar al fármaco a una velocidad establecida fijando intervalos de tiempo[70-72].

Microesferas-microcápsulas e implantes

Las microesferas son pequeñas esferas menores a 200µm de diámetro. Se trata de sistemas monolíticos formados por matrices poliméricas en las cuales el fármaco se encuentra disperso o disuelto, dependiendo de su solubilidad. Las microcápsulas son reservorios que contienen al fármaco en un núcleo que está cubierto por una membrana biodegradable que controla la velocidad de liberación[73].

Líquidos en base oleosa

Algunos productos disponibles en el mercado son Terramycin®LA de Pfizer, así como Ivomec® inyección, que es una solución de Ivermectina en propilenglicol y glicerol, administrada por vía subcutánea en cerdos. El Clamoxy1® inyección (amoxicilina) también desarrollada por Pfizer, es otro ejemplo de un inyectable de larga actividad[60].

Formas de dosificación tópicas

Existen formulaciones tópicas con bases oleosas, las cuáles son aplicadas directamente en la zona dañada. Estas formulaciones se utilizan para el control de ectoparásitos (pomadas, sprays o líquidos) y el tratamiento dura pocos días, ya que el fármaco se elimina rápidamente por efecto de la lluvia o cuando el ganado es aseado.

Ejemplos de estos productos incluyen al Frontline®TopSpot, Advantage® y ExSpot®.

El poder de estos medicamentos depende únicamente de las propiedades de los activos y de la capacidad que tienen los excipientes de adherirse al activo y a la piel[60].

Etiquetas para la oreja

El control de ectoparásitos es muy importante en el campo ganadero. Las etiquetas que se pegan a la oreja del animal liberan al fármaco por periodos muy largos, alcanzando varios meses de tratamiento. El principio activo es transferido al cuerpo del animal por los

movimientos naturales de las orejas y de la cabeza. Un ejemplo de estos sistemas es el Atroban®Eartag, el cual libera permetrina por un periodo de 3 meses[74].

Otros sistemas, llamados collares, es el más tradicional de los métodos para el control de ectoparásitos. Estos consisten en la incorporación del fármaco a una matriz de plástico. La incompatibilidad entre el plástico y el fármaco (líquido o sólido) fuerza al activo a migrar de la superficie del collar hasta la piel, para que posteriormente llegue al lugar donde se encuentran los parásitos dentro del animal[64].

Dispositivos oftálmicos

El desarrollo de insertos oftálmicos representan una buena alternativa para remplazar las gotas para los ojos. Su uso requiere una administración menos frecuente, ya que hay un incremento en el tiempo de contacto entre el fármaco y el tejido. Los insertos oftálmicos son preparaciones de consistencia sólida o semisólida, colocados en la cornea[75].

Dispositivos tópicos orales

El desarrollo de la gingivitis y periodontitis en perros está relacionado con la multiplicación de microorganismos en la placa dental y la liberación de los productos de su metabolismo. Para prevenir o retardar el desarrollo de estas enfermedades, la clorexidina ha mostrado ser mas efectiva cuando se aplica de manera local. El Stomadhex® (Vetoquinol) son tabletas con propiedades bioadhesivas, habilitándolas para que permanezcan en la mucosa oral después de haber sido hidratadas por los fluidos orales. La liberación del diacetato de clorexidina es continua, actuando como antimicrobiano y antiinflamatorio[76].

4. RECONOCIMIENTO DE SISTEMAS COLOIDALES POR EL MPS

Aunque varias células tienen la capacidad de ingerir partículas, sólo los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) y los macrófagos (MFs) lo hacen “de manera profesional”. Ambos tipos celulares se originan en la médula ósea a partir de un ancestro común que pronto dará origen a los precursores específicos: el mieloblasto que dará origen a

la línea granulocítica, y el monoblasto que más tarde dará origen al sistema fagocítico mononuclear.

En la médula ósea, durante una etapa proliferativa que dura aproximadamente 6,5 días, el mieloblasto se transforma en promielocito y después en mielocito. Durante una etapa de maduración que dura unos 7,5 días, el mielocito se transforma en metamielocito, después en polimorfonuclear (PMN) juvenil o “en banda” y finalmente en PMN maduro o segmentado. La mayoría de los leucocitos PMN maduros se mueren en la médula ósea por apoptosis para luego ser eliminados por los macrófagos presentes en ese tejido. Los PMN maduros que pasan a la circulación permanecen ahí por aproximadamente 6-10 h, antes de ser atrapados por los órganos del Sistema Retículo Endotelial donde sobreviven un promedio de 1 a 2 días, luego también se mueren por apoptosis y son eliminados por los macrófagos tisulares. La pérdida de la molécula CD16, un receptor para Fc γ (Fc γ RIII) en las células apoptóticas parece ser la señal para que ocurra la fagocitosis de estas células por los macrófagos.

Los monoblastos, por su parte, proliferan y se transforman en promonocitos en un lapso de tiempo que va de 3 a 5 días aproximadamente, y después a monocitos (MN), estado en el cual pasan a la circulación y ahí se mantienen durante un periodo que oscila entre 36 y 104 h. A diferencia de los PMN circulantes, los MN son células relativamente inmaduras que alcanzan la maduración hasta que se establecen en los tejidos en donde sobreviven durante varias semanas (y quizá meses) como macrófagos o histiocitos[77]. Los macrófagos pueden activarse por una gran variedad de estímulos y pueden adquirir diferentes formas (Fig. 4)[78]. Dado que los macrófagos tisulares han recibido diferentes nombres según el tejido donde se encuentran, se ha tratado de agruparlos a todos ellos dentro del llamado Sistema Fagocítico Mononuclear (MPS), al mismo tiempo que se ha tratado de separarlos del Sistema Retículo Endotelial, en donde además se incluyen otros tipos de células de soporte, no necesariamente fagocíticas y de diferente origen (Tabla 4, apéndice I)[79]:

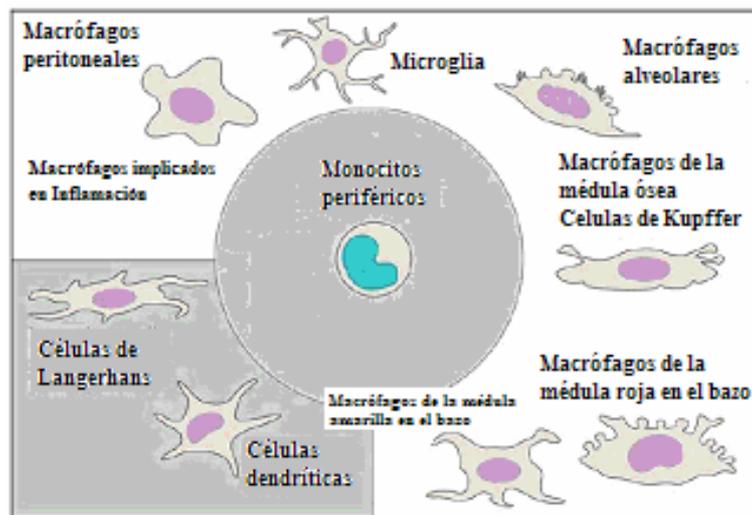


Fig. 4. Representación esquemática de monocitos/ macrófagos y células dendríticas durante la diferenciación in vivo.

4.1. Proceso fagocítico

Los fagocitos mononucleares intervienen de forma importante en las interacciones bidireccionales entre la inmunidad innata y la específica. Los macrófagos que responden a microorganismos como una reacción de inmunidad innata también sirven para disparar la respuesta de linfocitos específicos frente a un microorganismo. Por el contrario, los linfocitos efectoros y sus productos estimulan las funciones antimicrobianas de los macrófagos[77].

Los macrófagos fagocitan partículas extrañas como microorganismos, macromoléculas, entre ellas antígenos, e incluso tejidos propios que están dañados o muertos, por ejemplo los eritrocitos viejos. En el reconocimiento de sustancias extrañas y tejidos dañados por parte de los macrófagos intervienen receptores de fosfolípidos y azúcares, por ejemplo, la manosa. Los macrófagos también fagocitan activamente partículas recubiertas por proteínas del complemento, las cuales pueden ser producidas tanto en la respuesta inmunitaria innata como en la específica[78,80]. Las sustancias fagocitadas son degradadas dentro de los macrófagos por las enzimas lisosomales. Los macrófagos funcionan como las principales “células barredoras” del cuerpo. Además, las células secretan enzimas, reactivos de oxígeno y óxido nítrico, que en conjunto sirven para matar microorganismos y controlar la diseminación de infecciones, e incluso dañar los tejidos normales de alrededor[79,81].

Los macrófagos producen citocinas que reclutan a otras células inflamatorias, especialmente neutrófilos, y son responsables de muchos de los efectos sistémicos de la inflamación, por ejemplo, la fiebre. Los macrófagos también producen factores de crecimiento para los fibroblastos y el endotelio vascular, lo que promueve la reparación del tejido dañado.

Los macrófagos muestran en su superficie antígenos extraños de forma que puedan ser reconocidos por linfocitos T antígeno-específicos. Esta función de los macrófagos se conoce como células presentadoras de antígeno[80-82].

En la fase efectora de la respuesta inmunitaria humoral, los antígenos extraños, como los microorganismos, son recubiertos u opsonizados por moléculas de anticuerpos y proteínas del complemento. Puesto que los macrófagos expresan en su superficie receptores para anticuerpos y ciertas proteínas del complemento, fijan y fagocitan estas partículas opsonizadas más ávidamente que las partículas no recubiertas[77].

No obstante que hay disparidades específicas entre la función fagocítica de los macrófagos y neutrófilos, el proceso fagocítico incluye varias etapas secuenciales que son comunes en ambas células y que comprenden la quimiotaxis, la adhesión, la endocitosis (la cual se optimiza por la opsonización de las partículas), y los cambios físicos y bioquímicos intracelulares que capacitan a los fagocitos para matar y digerir a los microorganismos: el incremento en el metabolismo general de las células, la formación del fagosoma, la interacción del fagosoma con endosomas y lisosomas para formar el fagolisosoma, la acidificación del fagolisosoma, la formación de metabolitos reactivos del oxígeno y del nitrógeno, la activación de las hidrolasas lisosomales, y finalmente la expulsión del material de desecho mediante el proceso de la exocitosis (Fig. 4.1.1[79])[79,81,83]. Estos cambios son generales y ocurren aun cuando se trate del enfrentamiento entre los fagocitos y partículas o parásitos de tamaño muchas veces mayor que el de ellos. En estos casos, los fagocitos al hacer contacto con las micropartículas, estimulan sus mecanismos citocidas y vierten al exterior el contenido de sus gránulos. La “fagocitosis frustrada”, como se llama a este fenómeno, ocasiona no sólo la destrucción de la partícula, sino también daño del tejido circundante[79].

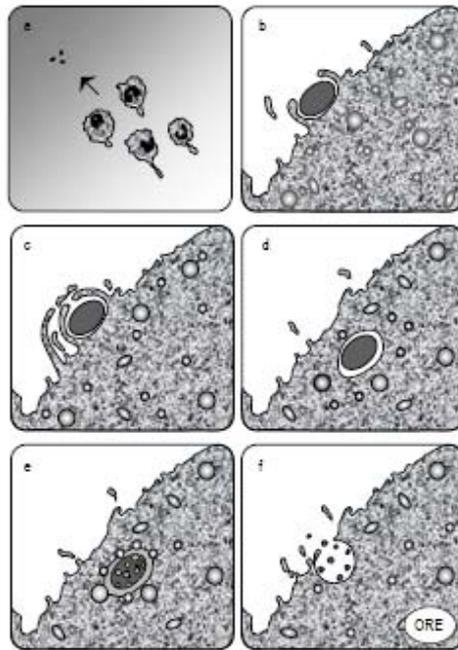


Fig. 4.1.1. Etapas del proceso de la fagocitosis: (a) quimiotaxis, (b) adherencia de las células a los microorganismos, (c) endocitosis, (d) formación del fagosoma, (e) formación del fagolisosoma con la consecuente destrucción del microorganismo, y (f) eliminación de desechos (exocitosis).

Diapédesis y quimiotaxis

Los procesos de infección o trauma propician cambios en el microambiente tisular, lo cual da origen a la formación de materiales exógenos (derivados de microorganismos) y endógenos (los que resultan de las alteraciones tisulares), con actividad quimiotáctica. Para que las células fagocíticas acudan a los sitios de lesión, deben salir primero de los vasos sanguíneos. Los cambios físicos observados durante la salida de las células incluyen, primero el flujo entorpecido de los leucocitos, después su desplazamiento por rodamiento sobre la superficie interna de los vasos sanguíneos, más tarde su marginación, adhesión y expansión sobre el endotelio vascular, y finalmente su salida por diapédesis a través de las uniones entre las células endoteliales (Fig.4.1.2[79]). En el proceso de diapédesis participan de manera muy importante las proteínas de adhesión tanto de los leucocitos como de las células endoteliales (Tabla 4.1.1[79], apéndice I).

Las proteínas de adhesión participan en los mecanismos de señalización celular y transmiten señales tanto del interior como del exterior de las células. En el primer caso, en condiciones de reposo, las integrinas presentan una conformación inactiva, manteniendo a los leucocitos en estado no adhesivo. La activación de los leucocitos por diversos mediadores como los quimioatrayentes de origen endotelial y microbiano, origina cambios conformacionales en los heterodímeros de las integrinas. Estos cambios aumentan la afinidad de las integrinas por sus ligandos ICAM y la adhesividad de los leucocitos a los endotelios. En el segundo caso, el mecanismo de señalización comienza con el enlazamiento de un ligando exógeno con una integrina de la superficie celular, evento que genera señales bioquímicas en el interior de las células que activan diversas proteínas G y proteincinasas, y que culminan con la polimerización de la actina, con el consecuente movimiento celular (quimiotaxis y fagocitosis), y con la expresión de algunos genes codificantes de proteínas de adhesión, de citocinas, y de otras proteínas[79,81].

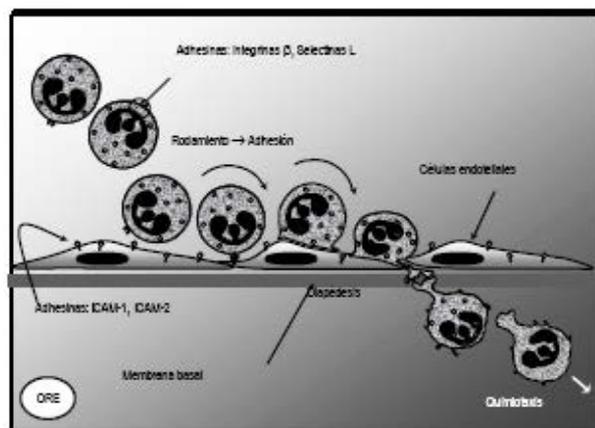


Fig. 4.1.2. Proceso de salida de las células fagocíticas de los vasos sanguíneos a los sitios de lesión.

La interacción entre los factores quimiotácticos y sus receptores sobre las células fagocíticas no sólo inicia la migración dirigida de las células, también induce la liberación de enzimas y de metabolitos del oxígeno, sin embargo, las concentraciones de los factores que inician las funciones de migración y de secreción de las células son muy diferentes; la quimiotaxis ocurre a bajas concentraciones de los quimioatrayentes (ng-fg), la secreción sucede a concentraciones 10 a 50 veces mayores. La quimiotaxis requiere de energía, calcio y magnesio, y depende de la existencia y función de las estructuras contráctiles de las células que constituyen el citoesqueleto[80,81].

Opsonización

La opsonización es un fenómeno que mejora el proceso de la endocitosis y que requiere de la interacción de las partículas ingeribles con los factores del suero de diversa naturaleza denominadas opsoninas. Las opsoninas incluyen anticuerpos (principalmente IgG), componentes del complemento, y algunas otras proteínas presentes en el suero, en el moco y en el fluido pleural (Tabla 4.1.2, apéndice I). El papel de las opsoninas como promotoras de fagocitosis está relacionado con la presencia de receptores para ellas en la membrana de las células fagocíticas.

En el caso de los anticuerpos, por ejemplo, éstos funcionan como opsoninas una vez que han interactuado con determinantes antigénicos homólogos presentes en las partículas ingeribles. Los leucocitos PMN y los MN de la mayoría de las especies, tienen receptores específicos para la región Fc de las inmunoglobulinas IgG1, IgG3, IgG2 e IgG4, en ese orden de abundancia[81,82,84].

Endocitosis

La endocitosis, el mecanismo por el cual las partículas penetran a las células; usualmente ocurre a través de receptores localizados en regiones de la membrana revestida por clatrina. El proceso comprende la invaginación de la membrana plasmática alrededor del material extracelular, formando una vacuola fagocítica. En la mayoría de los casos la vacuola se fusiona, reversiblemente con los lisosomas para dar origen a la vacuola digestiva o fagosoma. Esta fusión permite el contacto de la partícula fagocitada con las hidrolasas lisosomales del fagocito. Como resultado de esta actividad, continuamente se remueven porciones de la membrana plasmática para formar la envoltura de la vesícula endocítica. Tulkens y cols[85] propusieron que durante el proceso de fusión fago-lisosomal, los componentes transportados por las vesículas podrían: (a) mantenerse ligados a los componentes de la membrana celular, (b) permanecer en solución, o (c) ligarse a la fracción de membrana lisosomal, según las afinidades particulares entre ligandos y membranas. Enseguida, cuando las dos vesículas (fagosoma y lisosoma) se separasen, los componentes endocitados o sus productos de hidrólisis podrían ser reciclados al exterior junto con la

membrana celular, o podrían ser retenidos en los lisosomas para ser procesados y posteriormente integrados al citoplasma. De esta manera, aquellos ligantes que tuvieran gran afinidad por componentes de la membrana celular, serían retenidos firmemente por la membrana y reciclados junto con ella a la superficie celular. Los ligandos sin una afinidad particular por la membrana externa, podrían ser retenidos en los lisosomas[81,84].

Receptores mediadores de endocitosis

Existen dos tipos fundamentales de receptores en la superficie de los fagocitos: los receptores para constituyentes propios de los microorganismos y los receptores para opsoninas. Los primeros incluyen a los receptores para manosa, los receptores para mananas e integrinas (DEC-205) y los receptores para lipopolisacáridos o receptores carroñeros (del inglés *scavenger receptors*). Los segundos receptores incluyen a los receptores para la proteína fijadora de manosa (MBPR), la cual también es reconocida por el receptor para C1q, los receptores para la proteína surfactante A (SPR2), los receptores para inmunoglobulinas IgG (Fc γ RI, RII y RIII) y los receptores para complemento C3b (CR1) y C3bi (CR3)[78,81,84].

Transducción de señales

La mayor parte del conocimiento sobre las vías de señalización que conducen a la fagocitosis proviene del estudio de los receptores para inmunoglobulinas (Fc γ R). Estos receptores, en los fagocitos humanos, incluyen a Fc γ R1, Fc γ RII y Fc γ RIII. Fc γ RII es una sola cadena polipéptica con un dominio extracelular, un dominio transmembranal, y un dominio intracitoplasmático con dos regiones ITAM (immunoglobulin gene family tyrosine activation motif). Los receptores Fc γ R1 y Fc γ RIII carecen de ITAMs, pero se encuentran asociados a proteínas adaptadoras (dímeros de cadenas gamma) que tienen las regiones ITAM requeridas para la transducción de señales. El entrecruzamiento de los receptores Fc γ RI y Fc γ RIII por sus ligandos correspondientes, promueve la fosforilación de tirosinas en los dominios ITAM de las subunidades gamma. La protein-tirosin-cinasa inicial (PTK) responsable de esta fosforilación es Lyn, un miembro de la familia Src. Las tirosinas

fosforiladas en los dominios ITAM funcionan como sitios de unión de alta afinidad para los dominios SH2 de las protein-tirosin-cinasas Src y Syk. Syk fosforila a la proteína p85bp y ésta se torna un sitio de captura para la protein-tirosin 3 cinasa, PI3-K. PI3-K cataliza la formación de fosfoinositidos fosforilados como PIP3 (PIP3bp). Ésta y otras proteínas, a través de las GTPasa Rac o Ras, promueven la polimerización de la actina. Así, la activación de Syc ó SyK inicia una serie de cascadas de señalización que son causa de activación transcripcional, rearrreglos en el citoesqueleto, y liberación de mediadores inflamatorios. El entrecruzamiento de los receptores IgyR por sus ligandos, resulta, finalmente, en la polimerización de la actina y la fagocitosis[80-82,84].

Rafts y caveolas

Además de la entrada de microorganismos a las células fagocíticas a través de receptores para opsoninas y de receptores de reconocimiento patrón, algunos de ellos al menos, también pueden penetrar a los fagocitos a través de rafts y de caveolas.

Los rafts son microdominios lipídicos presentes en las membranas plasmáticas y endosomal de todas las células eucariotas. Estas regiones se encuentran enriquecidas de colesterol, glucoesfingolípidos y glucolípidos con fosfatidil inositol a través de los cuales se enlazan las membranas celulares.

Las caveolas por su parte, son de variedad de rafts, localizadas en la membrana plasmática que adoptan una forma de botella y que además de los lípidos antes mencionados tienen unida al colesterol una o más proteínas de la familia de las caveolinas (caveolinas 1, 2 y 3) que se encuentran recubriendo la superficie citoplasmática de la caveola. Las caveolinas transportan colesterol del retículoendoplasma donde se produce, a la caveola y regulan la actividad de las proteínas de señalización (tirosin cinasas) que se encuentran en la caveola[80,84].

Maduración de la vacuola fagosomal

Poco después de la internalización de la partícula ocurre la despolimerización de la actina F que en un principio queda asociada al fagosoma, y la recién desnudada membrana vacuolar

se hace accesible a los endosomas tempranos. Luego, a través de una serie de eventos de fusión y de fisión, la membrana vacuolar y su contenido maduran, fusionándose con endosomas tardíos y finalmente con lisosomas para formar el fagolisosoma. La velocidad de la fusión fagolisosomal varía ampliamente dependiendo de la partícula ingerida. También se ha propuesto que la naturaleza de la superficie de la partícula ingerida modifica la velocidad de maduración del fagosoma y que las superficies hidrofóbicas interfieren con la fusión de los fagosomas con otros organelos. La fusión fagolisosomal no necesariamente implica la fusión completa de las membranas, el paso del contenido lisosomal a la vacuola fagocítica puede ocurrir a través de puentes acuosos estrechos que sólo permiten el intercambio limitado del contenido vacuolar.

Varias proteínas participan en la maduración del fagosoma, dentro de ellas, las anexinas. Estas proteínas se enlazan a fosfolípidos en una forma dependiente de calcio y funcionan como puentes entre la membrana y el citoesqueleto. Otras proteínas como las GTPasas rab5, rab7 y rap1 (proteínas G pequeñas), se asocian secuencialmente a los fagosomas, conforme estos maduran.

Como resultado de su interacción con el compartimiento endosomal, los fagosomas no sólo presentan cambios en la composición de su membrana, también muestran cambios en su contenido; por ejemplo, adquieren tempranamente catepsina H, una enzima abundante en los endosomas tempranos, y más tardíamente catepsina S, una enzima distintiva de los endosomas tardíos. Conforme maduran, los fagosomas se mueven sobre los microtúbulos y esto les permite interactuar con los componentes del sistema endosomal.

En los lisosomas hay numerosos mecanismos microbicidas. El pH del fagolisosoma puede ser tan bajo como 4 debido a la acumulación de ácido láctico, lo que previene el crecimiento de la mayoría de los patógenos. Además este microambiente ácido optimiza la actividad de numerosas enzimas microbicidas presentes en los lisosomas entre las que se incluyen numerosas hidrolasas ácidas (proteasas, nucleasas, glucosidasas, lipasas, etc.). También contiene otras moléculas que inactivan a numerosos microorganismos como las proteínas catiónicas que dañan la permeabilidad de las membranas bacterianas por interacción con sus superficies cargadas negativamente, o la lactoferrina, potente quelante de hierro, factor de crecimiento imprescindible para muchos microorganismos.

Además, tras la unión de los receptores endocíticos se incrementa la captación de oxígeno por los macrófagos y neutrófilos, que es utilizado para generar productos intermedios reactivos de oxígeno, los cuales son agentes oxidantes muy reactivos capaces de destruir a los microorganismos. A este fenómeno se le conoce como estallido respiratorio. La generación de intermediarios reactivos de oxígeno comienza con la activación de un complejo enzimático localizado en la membrana del fagocito y del fagolisosoma denominada NADPH oxidasa que reduce el oxígeno molecular a superóxido (O_2^-). El superóxido puede reducirse a radicales hidroxilo (OH^-) o dismutarse a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la acción de la superóxido dismutasa. El OH^- y H_2O_2 son potentes agentes oxidantes con gran capacidad microbicida. Además, los neutrófilos poseen una enzima denominada mieloperoxidasa que utiliza el peróxido de hidrógeno generado en estallido respiratorio y cataliza la halogenación (generalmente su cloración) de los microorganismos fagocitados. Tales halogenaciones son un potente mecanismo microbicida. Los macrófagos cuentan también con un segundo sistema de generación de radicales libres, la sintetasa del óxido nítrico inducible (iNOS). La iNOS se induce durante la fagocitosis y cataliza la generación de óxido nítrico (NO) que es también un potente agente microbicida. Para algunos autores la capacidad microbicida se debe al flujo de cationes (K^+ , H^+) que entra en la célula para equilibrar el pH alterado por el O_2^- , lo que libera proteasas catiónicas de los gránulos de la matriz aniónica del proteoglicano sulfatado para digerir al patógeno. La activación incontrolada de los fagocitos puede ser muy dañina para los tejidos propios, por lo que debe estar estrictamente controlada. Los mecanismos microbicidas de los macrófagos se activan por la fagocitosis de los microorganismos, pero su capacidad fagocítica se puede incrementar notablemente mediante señales producidas por los linfocitos Th1 y las células NK[83,84,86,87].

4.2. Fagocitosis de sistemas coloidales

Los acarreadores coloidales biodegradables en forma de emulsiones, liposomas o nanopartículas pueden tener una gran utilidad para la liberación de fármacos en la circulación. Su tamaño y propiedades de superficie necesitan evitar la captura por simple mecanismo de filtración o por la presencia de macrófagos en el hígado (células de Kupffer) y

en el bazo. Las partículas que permanecen en circulación se encuentran en niveles altos después de la administración intravenosa, y tienen la potencia suficiente para dirigir al fármaco a lugares específicos o sitios donde haya inflamación. Normalmente, una partícula al ser administrada por vía intravenosa será recubierta por opsoninas y reconocida por el MPS. Las células de Kupffer son extremadamente eficientes para la eliminación de partículas extrañas[88].

El atrapamiento de sistemas particulados puede ocurrir mediante varios procesos tales como la fagocitosis, pinocitosis por fase fluida o por endocitosis mediada por receptores. Se ha observado que en las células del músculo liso, la internalización de las nanopartículas es en parte por pinocitosis por fase fluida y a través de hoyos recubiertos con clatrininas[41,43,89,90]. A lo largo de su atrapamiento, las nanopartículas han mostrado ser transportadas a los endosomas primarios y existe la posibilidad de que se vayan ordenando. De los endosomas ordenados, una fracción de nanopartículas sale al exterior de la célula a través de los endosomas que son reciclados, y la otra fracción de nanopartículas es transportada por los endosomas secundarios, los cuales se fusionarán con los lisosomas. Después las nanopartículas escapan del endo-lisosoma y entran al compartimiento citosólico, donde puede haber degradación del fármaco[41,43].

La inversión de la carga en superficie de las nanopartículas, principalmente en el pH ácido del endo-lisosoma, es el mecanismo responsable del escape de las nanopartículas del endo-lisosoma. La inversión de la carga en superficie resulta de la transferencia de protones e iones hidronio de la solución a la superficie de la nanopartícula bajo condiciones ácidas (Fig. 4.2.1)[91]:

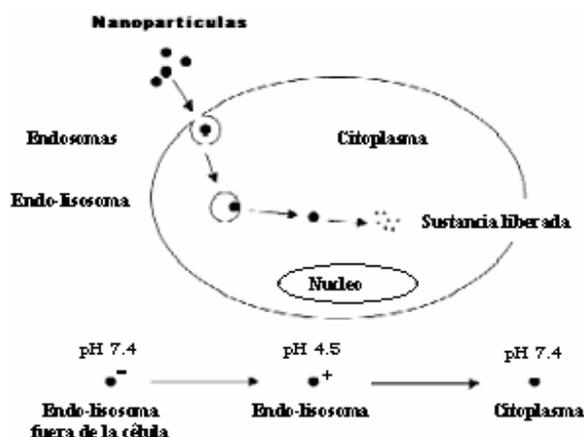


Fig. 4.2.1. Transporte de nanopartículas.

Opsonización y fagocitosis

La opsonización es el proceso por el cual un organismo o partícula extraña es recubierta por proteínas opsoninas, haciéndolas más visibles para las células fagocíticas. Después de la opsonización, la fagocitosis puede ocurrir, la cual consiste en engullir y eventualmente destruir y eliminar los materiales de la circulación. Juntos estos dos procesos, forman muchos de los mecanismos para eliminar los componentes indeseables de la sangre. En el caso de las nanopartículas poliméricas, las cuales no pueden ser destruidas por los fagocitos, son secuestradas por el MPS. Si la nanopartícula polimérica no es biodegradable, la acumulación de estas partículas en estos órganos, normalmente en el hígado y bazo, puede causar toxicidad y otros efectos secundarios. En caso de que la nanopartícula sea biodegradable los efectos secundarios serán casi nulos, e incluso podrían no existir[41,43,92,93].

La opsonización normalmente tiene lugar en la circulación sanguínea, y puede tardar segundos o muchos días para completarla. El mecanismo exacto a través del cual este proceso es activado es muy complicado y no ha sido entendido en su totalidad[43]. Las inmunoglobulinas y componentes del sistema del complemento, tales como C3, C4 y C5 son conocidos como opsoninas, al igual que las proteínas del suero sanguíneo, tales como la laminina, la fibronectina, proteína C reactiva, colágeno tipo 1 y muchas otras[41,78,80]. La importancia de estas proteínas en el proceso de eliminación ha sido indirectamente demostrada en muchos estudios in vivo en animales con deficiencia de C3.

Las opsoninas, las cuales están presentes en la sangre; están en contacto con las nanopartículas poliméricas que son administradas, y pueden adherirse a su superficie por medio de fuerzas de van der Waals, fuerzas electrostáticas, iónicas, hidrofóbicas/ hidrofílicas y otras[92,94].

Después de la opsonización viene el ataque del fagocito a la nanopartícula vía unión de opsoninas a la superficie. Sin la presencia de opsoninas unidas o adsorbidas a la superficie de la nanopartícula, la fagocitosis no ocurriría debido a la falta de reconocimiento de estas partículas.

Una de las formas para atacar a las nanopartículas se lleva a cabo cuando es modificada la conformación estructural de algunas proteínas séricas, de tal forma que al cambiar su

conformación se activan y pueden ser reconocidas por los fagocitos. La superficie de las células fagocíticas posee receptores especializados que interactúan con las proteínas activadas, alertando la presencia de materiales extraños. Un segundo método de ataque fagocítico es la adherencia no específica de nanopartículas recubiertas con proteínas del suero sanguíneo a la superficie de los fagocitos, dando como resultado la estimulación de la fagocitosis. Este proceso es normalmente atribuido a la asociación de las opsoninas a la superficie hidrofóbica de la partícula.

El tercer modo de ataque es por la activación del complemento[78,80,95]. El sistema del complemento puede ser activado por varios mecanismos: vía clásica, vía alterna y la vía de las lectinas. El tercer y último paso en el proceso de eliminación es la ingestión del material extraño por fagocitosis. Este paso involucra la endocitosis de la partícula o del material extraño por el fagocito. Siguiendo la endocitosis de la partícula, el fagocito comenzará a secretar enzimas y otros factores químicos oxidativos, tales como el superóxido, óxido nítrico y peróxido de hidrógeno para degradar al material fagocitado[77,82,96].

Desafortunadamente, las nanopartículas no biodegradables no pueden ser degradadas por este proceso y, dependiendo de su peso molecular y tamaño, serán eliminados por el sistema renal o secuestrados y guardados en uno de los órganos del MPS[90]. Como una primera aproximación, la eliminación por el sistema renal ocurre sólo en las moléculas con un peso molecular alrededor de 5000 o menos, pero pueden ser mayores que 100000 para polímeros más densos como los dendrímeros. Sin embargo, las partículas no biodegradables y la degradación de moléculas con un peso molecular mas grande que el umbral renal, vuelve a ser secuestrado en los órganos del MPS[41]. La distribución final de este secuestro depende de factores de distribución y farmacocinéticos[41].

Como una regla general, la opsonización de partículas hidrofóbicas, comparada con la de partículas hidrofílicas, ocurre más rápidamente, ya que aumenta la adsorción de proteínas séricas en su superficie.

Se ha demostrado, por estudios in vitro, una correlación entre la carga en superficie de las partículas y la opsonización, y estos resultados han mostrado que las partículas con carga neutra tienen una menor velocidad de opsonización que las partículas con otra carga[41].

Los sistemas coloidales (SC) son generalmente eliminados por el MPS. Estos SC pueden ser eliminados de la circulación sanguínea por varias rutas, tales como la transcitosis, en la cual

se lleva a cabo un proceso de transporte a través de las células endoteliales, o mediante transferencia intracelular[43].

El fenómeno que describe el atrapamiento de una entidad exterior a la célula es llamado endocitosis y es un mecanismo irreversible. Los principales tipos de endocitosis son fagocitosis y pinocitosis, los cuales tienen diferentes características. La fagocitosis es un proceso activo realizado por células especializadas vía receptores específicos y no específicos, y la formación de pseudópodos (extensiones de la membrana), resulta de la espontánea polimerización de la actina[80,81,84].

La endocitosis mediada por receptores difiere de la fagocitosis por el involucramiento de hoyos recubiertos con clatrina. En relación a la pinocitosis (endocitosis por fase fluida) no depende de receptores y es una ingestión pasiva de partículas insolubles, tales como las lipoproteínas o complejos inmunes, macromoléculas solubles como los anticuerpos, enzimas u hormonas y solutos de bajo peso molecular. Vesículas de 100 nm están algunas veces, cubiertas con clatrina. Estos mecanismos se observan en la Fig. 4.2.2[43].

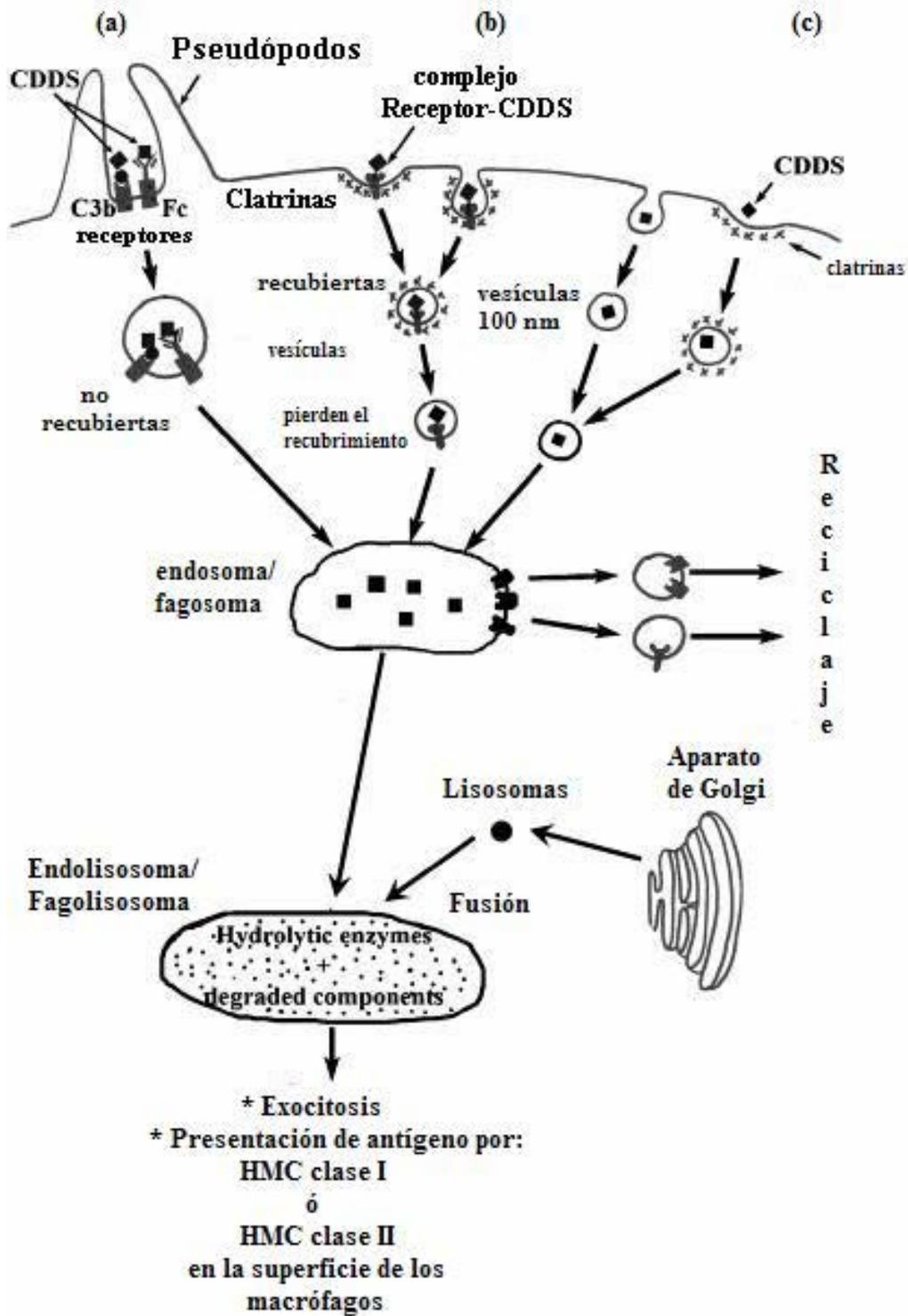


Fig. 4.2.2. Representación esquemática de los diferentes mecanismos de captura por endocitosis: (a) fagocitosis, (b) endocitosis mediada por receptores y (c) pinocitosis vía clatrina/vesículas no recubiertas. (CDDS: Sistemas coloidales de liberación controlada)

Muchos tipos de receptores están presentes en la membrana plasmática de los macrófagos. Algunas opsoninas contienen uno o mas sitios de unión reconocidos por receptores. No obstante, en la superficie uno de los que comúnmente se encuentra es el receptor para el complemento, y después los receptores para los fragmentos constantes de varias inmunoglobulinas (Fc) que difieren de acuerdo a la endocitosis mediada por receptores (FcγRIIa) o a la fagocitosis (FcγRIIb), los receptores para manosa/mucosa/N-acetilglucosamina y para fibronectina.

La distribución de estos receptores es diferente de acuerdo a la función de las células fagocíticas, su grado de activación, su tejido de origen y las especies estudiadas[43,80,81].

El sistema de complemento

El sistema de complemento es uno de los mecanismos mediante el cual los cuerpos extraños son reconocidos. Está compuesto por alrededor de 30 proteínas, las plasmáticas, teniendo una función enzimática o de unión, y otras que presentan receptores a la superficie de muchas células del sistema inmune (Fig. 4.2.3).

La activación de estas proteínas ocurre en cascada, constituyendo tres vías principales: (i) la vía clásica, que es activada después de la fijación de la proteína C1q a un anticuerpo o directamente a un receptor de C1q en la superficie, (ii) la vía alterna, que es activada espontáneamente por la unión de fragmentos C3 a la superficie del patógeno, y (iii) la vía de las lectinas, la cual es activada por la unión de manosa-unida a lectina a carbohidratos que contienen manosa, encontrados en bacterias y en virus[96,97].

Cualquiera que sea la vía, la cascada enzimática lleva a la formación de una enzima común, la C3 convertasa, la cual fragmenta en dos a la proteína mas abundante del sistema del complemento; el componente C3. El fragmento más grande, C3b es el componente activo que participa en el anclaje de las proteínas C5 a la C9. El ensamblaje de estas proteínas contribuye a la formación del MAC (complejo de ataque a la membrana), que es el que va a desestabilizar la superficie del SCLC. En adición, C3b y su fragmento inactivo (C3bi) pueden ser reconocidos por receptores específicos de las células fagocíticas llevando al engullimiento de cuerpos opsonizados. Las proteínas C3a, al igual que las C4a y C5a que resultan de la ruptura de las proteínas C4 y C5, son fuertes agentes inflamatorios llamados

anafilatoxinas. Una de sus funciones es atraer a las células del MPS y la liberación de células mediadoras de la inflamación (basófilos y eosinófilos). Estas anafilatoxinas también liberan proteínas inhibitoras como C1 INH, factor I o H, las cuales regulan el sistema del complemento[77,78,82,96].

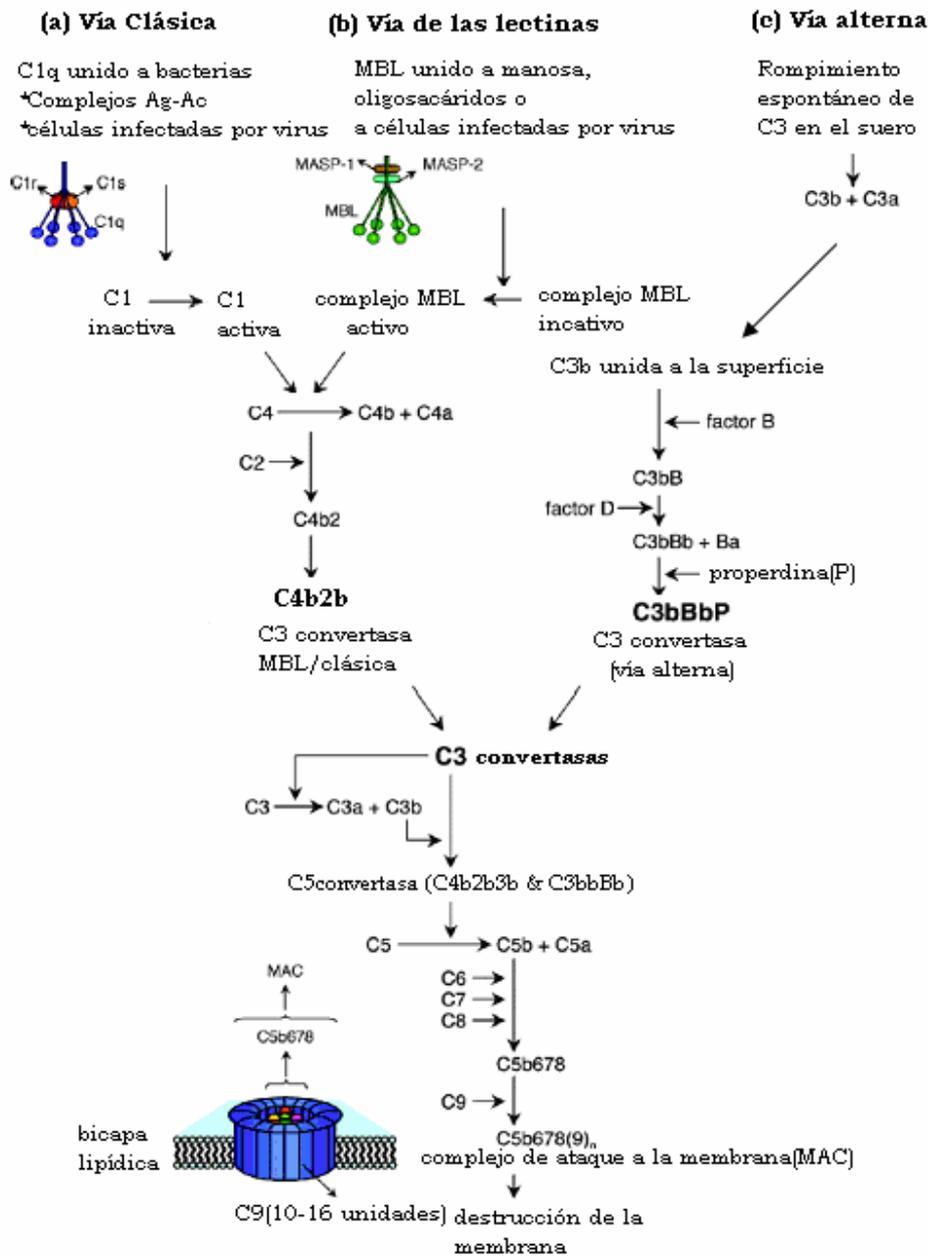


Fig. 4.2.3. Activación del complemento por la vía clásica (A), lectinas (B) y alterna (C)[96].

4.3. Factores que influyen en la eliminación de los SC

Naturaleza de los componentes

Eliminación de SC vía activación del complemento. La activación del complemento puede estar mediada por mecanismos independientes de anticuerpos y dependientes de anticuerpos. Los liposomas pueden ser fuertes activadores del complemento por su alto contenido de fosfolípidos. Algunos autores sugieren que la existencia de interacciones covalentes entre la proteína C-reactiva y la fosfatidilcolina de huevo o la fosfatidiletanolamina lleva a la activación de la vía clásica en ausencia de anticuerpos[44,98].

Por otro lado, los anticuerpos anti -fosfolípidos han sido capaces de unirse a los lípidos aniónicos oxidados. La unión puede ocurrir en asociación con el cofactor β 2-glicoproteína, la cual interacciona fuertemente con las vesículas que contienen fosfolípidos aniónicos como la cardiolipina y el ácido fosfatídico. Posteriormente, estos anticuerpos pueden jugar un papel muy importante en la activación de la vía clásica[43].

Reconocimiento por macrófagos. La habilidad de los macrófagos para reconocer e interactuar con varias moléculas está mediada principalmente por los receptores específicos o glicoproteínas de la superficie. Estas proteínas del complemento o anticuerpos y sus receptores pueden mediar la captación de los SC después de reconocer fosfolípidos, polímeros o residuos de azúcar.

La superficie de los macrófagos tiene diferentes receptores para fibronectina. Respecto al colágeno, esta proteína es capaz de unirse a la gelatina, fibrina, IgG y C3[41,43,99].

Tamaño de partícula

El tamaño de los SC es uno de los factores determinantes en su destino dentro del cuerpo. Algunos estudios han mostrado que SC de tamaños muy pequeños son eliminados más lentamente de la circulación que otros más grandes. Muchos autores han descrito que la activación del complemento para partículas menores a $1\mu\text{m}$ dependen de su tamaño, ya sea que se active por la vía clásica o por la vía alterna[100]. Concerniente a la fagocitosis de los

SC por los macrófagos, se ha observado que existe un incremento en la degradación de los liposomas conforme va aumentando su tamaño[101]. Sin embargo, usando macrófagos de la médula ósea provenientes de rata, Schwendener et al.[102] y Allen et al.[103] han descrito que en presencia de suero los liposomas más grandes son eliminados más lentamente, aunque podrían comportarse así debido a su estructura[43].

Harashima et al.[104] ha descrito dos formas de atrapar a los SC en el hígado: uno dependiente del tamaño vía receptores del complemento y otro independiente del tamaño y de la vía de activación de complemento. También se ha mostrado que en presencia de opsoninas, el grado de opsonización incrementa con el tamaño de las nanopartículas y se correlaciona directamente con su atrapamiento. Esto ha llevado a concluir que los macrófagos son capaces de reconocer partículas no en función a su tamaño, sino en función a la cantidad de opsoninas adheridas a su superficie.[44,82,105].

Respecto al mecanismo de captación, Pratten et al.[106] describe que, para partículas de aproximadamente 30 nm, la captación puede ocurrir por pinocitosis, mientras que para partículas de 100 nm aproximadamente, la eliminación puede ser por fagocitosis. Sin embargo, Lee et al.[107] ha mostrado que la pinocitosis juega un papel insignificante en la captación de liposomas y nanopartículas, y que mas bien son eliminados por las células de Kupffer. Finalmente, sin importar el mecanismo, algunos autores han descrito una pobre captación de nanopartículas con un tamaño aproximado de 100 nm, estén cubiertas o no.

Carga eléctrica aparente

La influencia de la carga en la eliminación de los SC ha sido bien descrita en varios estudios[102,108]. La adsorción de proteínas a la superficie de las partículas depende de las interacciones que ocurren entre dichas partículas y las proteínas. De hecho, diferentes tipos de estructuras, presentando cargas negativas o positivas y grupos hidroxilo en la superficie han mostrado que ejercen diferentes fuerzas, y que la densidad de carga, así como la hidrofobia, definen el tipo de adsorción de proteínas.

La superficie de las proteínas es muy heterogénea, ya que expone grupos con cargas positivas y negativas, puentes de hidrógeno y regiones no polares. La interacción de estas proteínas con los SC pueden ser de diferente naturaleza: repulsivas y atractivas. Dentro de

las interacciones de tipo repulsivas están las fuerzas de hidratación y solvatación, repulsiones de tipo estérico y electrostáticas. Las interacciones atractivas involucradas son puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, hidrofóbicas e interacciones acido-base[43,109].

Algunos estudios han demostrado que algunas nanopartículas con carga positiva, tienen una gran capacidad de adsorber proteínas del complemento, las cuáles confieren un cambio en la carga de superficie, volviéndola negativa, y que las nanopartículas con carga negativa adsorben proteínas, pero en menor cantidad[94,110].

Los estudios de fagocitosis de sistemas coloidales se enfocan principalmente a encontrar los factores que influyen en la activación de la respuesta inmune. En la mayoría de los estudios se trata de modificar la superficie de la partícula, y los recubrimientos más acertados son los que se han hecho con polietilenglicol, ya sea como copolímeros o por adsorción. Sin embargo, también se han hecho modificaciones con lípidos, y tales modificaciones han sido muy acertadas[40,48,97,110-114].

Otra variante que tienen estos estudios son los realizados con partículas donde se varía su tamaño, la carga en superficie y la naturaleza de la matriz polimérica[45,92,98,99,109,115].

4.4. Detección/ cuantificación del Proceso Fagocítico

Algunas de las técnicas para cuantificar los mecanismos antes descritos se muestran en la Tabla 4.4.1[43]:

Tabla 4.4.1. Técnicas de visualización y detección /cuantificación de endocitosis.

Técnica	Material	Objetivo
Microscopía de contraste de fase	Nanopartículas (NP)	Visualización
Microscopía óptica	NP fluorescentes	
Microscopía confocal	NP fluorescentes	
Resonancia magnética	NP magnéticas	
Citometría de flujo	NP fluorescentes	Detección /cuantificación
Conteo Gamma	NP radiactivas	

Algunos de estos métodos resultan ser muy tardados y en algunas ocasiones peligrosos debido al uso de radiactividad. En este apartado se hablará de la citometría de flujo, ya que en este caso es el de mayor interés.

Citometría de flujo

La citometría de flujo es un proceso que permite que las células (500-4000/seg) pasen en fila dentro de un flujo a través del Citómetro. Mientras esto sucede, se puede hacer la medición simultánea de múltiples características físicas de una sola célula. La ventaja analítica de la citometría de flujo tiene como base la habilidad de hacer mediciones cuantitativas y multiparamétricas en un número estadísticamente adecuado de células para definir las propiedades de una población celular o de las subpoblaciones que la componen. El análisis multiparamétrico hace posible evaluar poblaciones celulares particulares dentro de una mezcla compleja, ya que aprovecha propiedades intrínsecas de la célula como la dispersión de la luz, y características controladas como la fluorescencia. Al mismo tiempo, es posible separar las poblaciones definidas por este análisis[116]. Estas ideas son la base de la técnica conocida como FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting).

El FACS proporciona datos tales como el tamaño relativo de la célula, granularidad o complejidad interna y la intensidad relativa de la fluorescencia. Para llevar a cabo lo anterior, el aparato necesita de un sistema combinado de flujo, óptico y electrónico (Fig 4.4.1). El sistema de flujo introduce y restringe a las células para su análisis individual, el sistema óptico excita la muestra y colecta las señales de luz provenientes de la misma y el sistema electrónico convierte la señal óptica en una señal electrónica y la digitaliza para el análisis en computadora[117]. El sistema de citometría de flujo está compuesto por cinco unidades principales: una fuente de luz (lámpara de mercurio o láser), flujo celular, unidad de filtros ópticos para la detección de longitudes de onda específicas, fotodiodos o fotomultiplicadores para la amplificación de la señal y una unidad de operación y procesamiento de datos.

El funcionamiento del FACS es relativamente sencillo; pues una suspensión celular se inyecta al flujo laminar donde las células pasan una después de la otra a través de un capilar y llegan hasta un rayo láser. Cuando este rayo incide en una célula, la luz de excitación sale

hacia adelante y hacia los lados de la célula y esto genera información. La luz dispersada hacia delante provee información sobre el tamaño de la célula. La luz dispersada hacia los lados provee información sobre la granularidad, tamaño y morfología celular. Si la célula va marcada con un fluoróforo, la luz fluorescente se procesa, a través del fotomultiplicador, en el sistema procesador de datos y los resultados son analizados por el software del citómetro. El FACS posee una unidad de “sorteo” que ofrece la posibilidad de separar subpoblaciones seleccionadas. Las células se cargan eléctricamente y las gotas resultantes se desvían al pasar a través de un campo eléctrico[116].

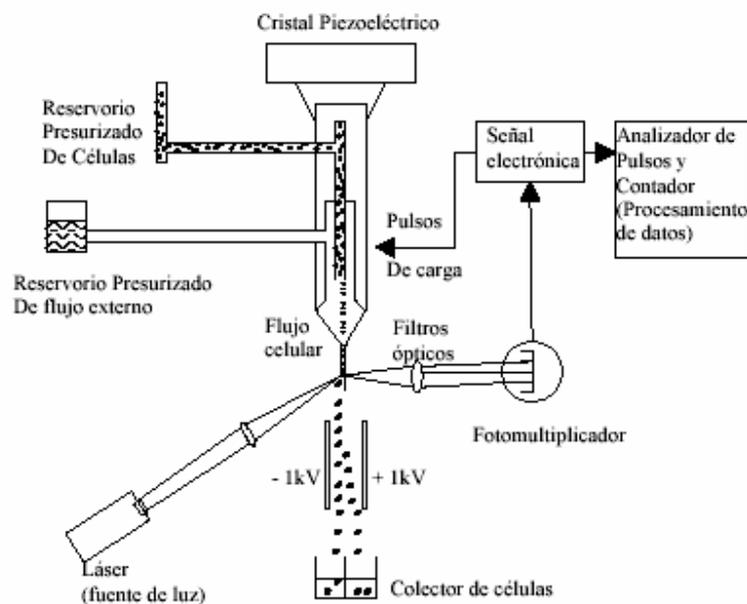


Fig. 4.4.1. Esquema generalizado de los componentes de un citómetro-sorteador.

La fagocitosis es uno de los principales mecanismos de defensa, por ello su evaluación in vitro es muy importante. La citometría de flujo se aplica para conocer el buen funcionamiento de las células fagocíticas, y tiene la gran ventaja de evaluar grandes números de células, haciéndolo célula por célula, proporcionando una mayor precisión que los métodos convencionales, los cuales cuentan o miden la respuesta de un grupo de células[118]. Las subpoblaciones de células pueden ser identificadas y evaluadas, sin importar que éstas tengan que separarse, lo cual consumiría más tiempo y alteraría su fisiología al utilizar otra metodología, además de que se pueden utilizar células viables o fijas[119].

Los ensayos de fagocitosis por citometría de flujo permiten conocer el porcentaje de células fagocíticas y el número de esferas fagocitadas, las cuales tienen que estar marcadas fluorescentemente. También se puede conocer la velocidad de degradación intracelular de cada partícula, y en el caso de bacterias; la velocidad en la que mueren dichos patógenos. Esta técnica también ha sido adaptada para estudiar fagocitosis de eritrocitos y células en apoptosis[119,120].

III. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Elaboración de nanopartículas de poli ϵ -caprolactona (PCL) e Ivermectina modificadas con PEG 6000 y su estudio a nivel tecnológico y fagocítico.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Aplicación de la técnica de microemulsión por fusión para la obtención de nanopartículas poliméricas.
- Optimización de la técnica de microemulsión por fusión.
- Caracterización de nanopartículas poliméricas modificadas y sin modificar.
- Determinación de la activación del complemento
- Análisis del proceso fagocítico de sistemas nanoparticulados.

**IV. PARTE
EXPERIMENTAL**

1. REACTIVOS, MATERIAL Y EQUIPO

Poli ϵ -caprolactona (Fluka)

Brij® 56 (Sigma)

Isopropanol grado analítico (Baker)

Ivermectina lote 20030408. Laboratorios Aranda

Cloruro de sodio (Baker)

Polietilenglicol 6000 (Fluka)

Agua destilada y desionizada, filtrada por membrana 0,02 μ m

Fluoresceína sódica Sigma Lote 1275h

Acetonitrilo grado HPLC (Baker)

Metanol grado HPLC (Baker)

Ácido acético glacial (Baker)

Medio de cultivo DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Médium) Gibco, complementado y sin complementar.

Medio DGVB²⁺

Amortiguador de boratos pH 8,5

Amortiguador de fosfatos (PBS) pH 7,5

Solución diluyente para fijación de complemento (CFD)

Material biológico

Eritrocitos de carnero

Suero de cobayo

Anticuerpos α -DNP de conejo

Macrófagos murinos de la línea celular J774

Descripción de los reactivos

PARTE EXPERIMENTAL

Poli ϵ -caprolactona: $(C_6H_{10}O_2)_n$ PM. 10000 g/mol. Polímero biodegradable no tóxico, con un punto de fusión de 60 °C, temperatura de transición vítrea de 60 °C y densidad de 1.146 g/mL a 25 °C. Presentación en hojuelas.

Brij® 56: $C_{16}H_{33}(OCH_2CH_2)_nOH$, $n \sim 10$, PM. 682 g/mol. Polioxietilen 10-cetil éter. Tensoactivo no iónico, semisólido, HLB 12.9, parcialmente soluble en agua y soluble en etanol e isopropanol. Punto de fusión: 32-34 °C y densidad de 0.977 g/mL a 25 °C.

Isopropanol: $C_3H_8O/(CH_3)_2CHOH$, PM. 60.1 g/mol, densidad 0.79 g/mL, P_{eb} . 83°. Líquido incoloro miscible en agua y en otros alcoholes. Produce irritación en ojos y en el sistema respiratorio superior, así como náuseas, dolor de cabeza y depresión del SNC.

Mezcla Brij® 56 /Isopropanol (1:1 p/p): densidad 0.8811 g/mL.

Cloruro de sodio: NaCl, PM 58,44 g/mol, punto de fusión de 801°C. Sal inorgánica soluble en agua.

Polietilenglicol (PEG) 6000: $HO-[CH_2CH_2O]_n-H$, PM 5000-7000, punto de fusión 56-63°C, densidad de 1.2 g/mL a 25°C. Polímero muy soluble en agua, sirve como emulsificante y estabilizante.

Acetonitrilo: CH_3CN , PM 41,05 g/mol, grado HPLC, densidad 0.777 g/mL a 25°C.

Metanol: CH_3OH , PM 32,64 g/mol, grado HPLC.

Ácido acético glacial: CH_3COOH , PM. 60.05 g/mol. Afecta al sistema respiratorio, ojos, piel, dientes y pulmones.

Instrumentos y equipos

Celdas de vidrio acopladas a un baño de agua con temperatura y agitación controlada.

Baño circulador Haake DC10 P5

Balanza Ohaus Adventur
Parrillas de agitación
Sonicador Cole-Parmer 8890
Ultraturrax IKA T18 Basic
Centrífuga Eppendorf 5810R
Tubos para ultracentrífuga Nalgene
Centrífuga Eppendorf 5415C
Tubos eppendorf 2 mL
Zetasizer Marlven Instruments Modelo ZS3600
Espectrofotómetro Ocean Optics, Inc., UV SAD 500
Calorímetro Termal Análisis System TA-60WS, Shimadzu
Frascos para cultivo de células 75cm², Corning Flask
Microscopio óptico Zeiss
Microscopio de fluorescencia Zeiss Axioskop
Incubadora Napco 5100 con control del ambiente
Citómetro de flujo FACScan
Tubos para FACS 5mL, BD Falcon

2. METODOLOGÍA

2.1. Elaboración de nanopartículas sin PEG 6000

La técnica utilizada para la obtención de nanopartículas fue *microemulsión por fusión*, donde se hace uso de la capacidad que tiene la PCL para disolver un 10% de Ivermectina. Esta técnica resulta ser eficiente y segura, ya que no se tiene que utilizar un disolvente orgánico en el cual el polímero se tenga que disolver, como se hace en la mayoría de las técnicas para la obtención de nanopartículas de polímeros biodegradables. Sin embargo, existe una gran problemática al utilizar esta técnica, pues la cantidad de tensoactivo que se requiere para formar la microemulsión es muy grande.

La composición en porcentaje p/p de la microemulsión de la cual se van a generar las nanopartículas poliméricas es la siguiente:

- 2.87 % de PCL
- 39.3 % de Brij® 56
- 39.3 % de Isopropanol
- 18.2 % de H₂O
- Ivermectina: 10% del peso de la PCL

La técnica para generar las nanopartículas a partir de la microemulsión se muestra en el diagrama 2.1.1.

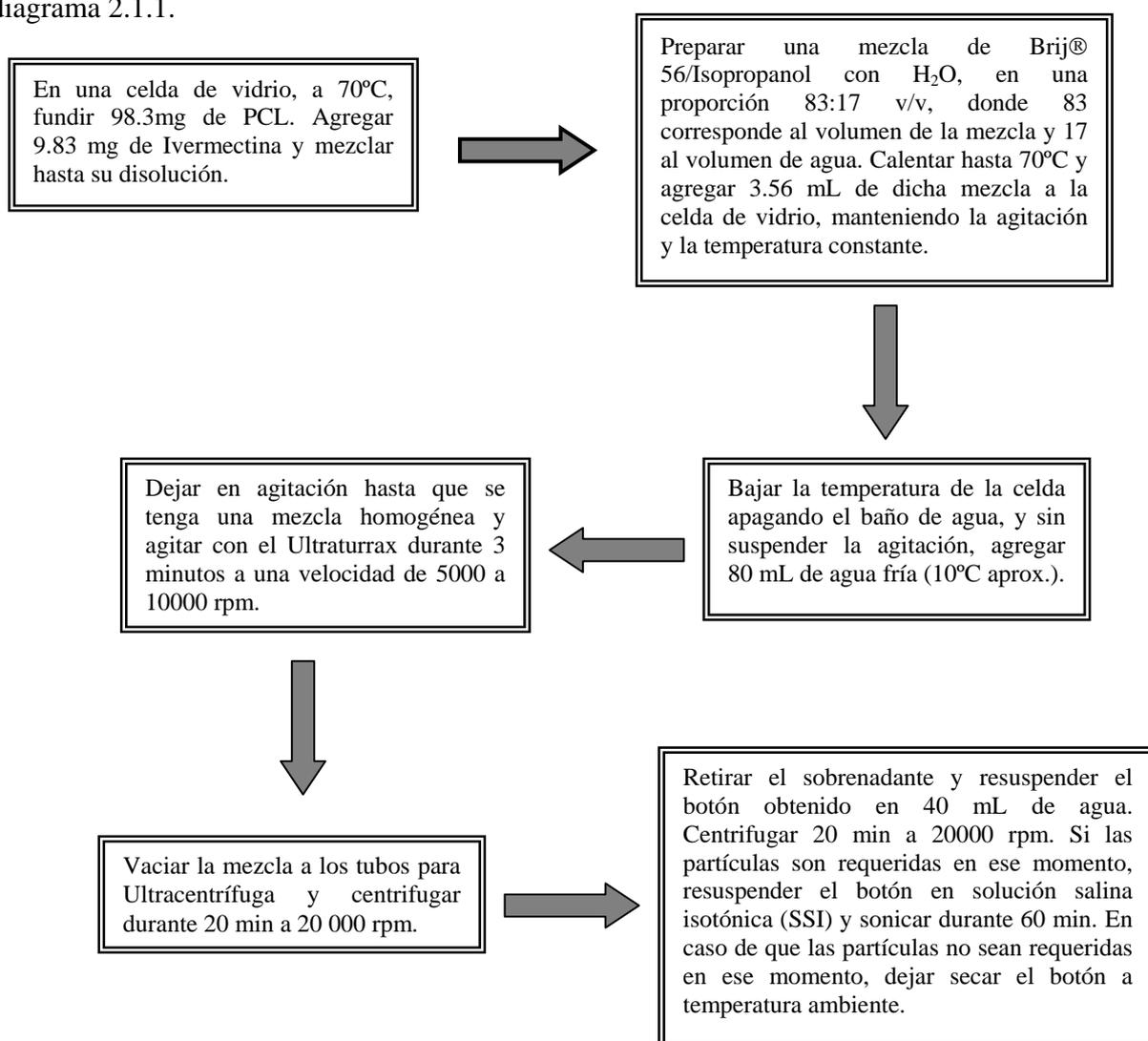


Diagrama 2.1.1. Elaboración de nanopartículas sin PEG 6000.

Al determinar el tamaño de partícula de las nanopartículas obtenidas, se observó que no era el esperado (200-300 nm), sobre todo después de la centrifugación, por lo que se hicieron modificaciones en la composición del agua fría con la cual se precipitan las nanopartículas. Las mezclas que se probaron para la generación de las nanopartículas fueron:

- Agua + Isopropanol (10:1)
- Solución salina al 0.001% p/v
- Solución salina al 0.001% + Isopropanol (10:1)

La técnica utilizada fue la misma, sólo que el agua fría se reemplazó por las mezclas antes mencionadas, y el agua con la que se resuspende el botón después de la primera centrifugación también se reemplaza por la mezcla.

Al observar que los tamaños de partícula de las nanopartículas obtenidas mejoraron al utilizar la sal de sodio, y que el Isopropanol no aportó beneficio alguno, se estudiaron las siguientes mezclas para su generación:

- Solución salina al 0.002%
- Solución salina al 0.003%
- Solución salina al 0.005%

Después de la caracterización de estas últimas nanopartículas, se eligió como la mejor opción para la precipitación de éstas a la solución salina al 0.001%.

2.2. Elaboración de nanopartículas con PEG 6000

La técnica utilizada para la elaboración de las nanopartículas recubiertas se muestra en el diagrama 2.2.1.

PARTE EXPERIMENTAL

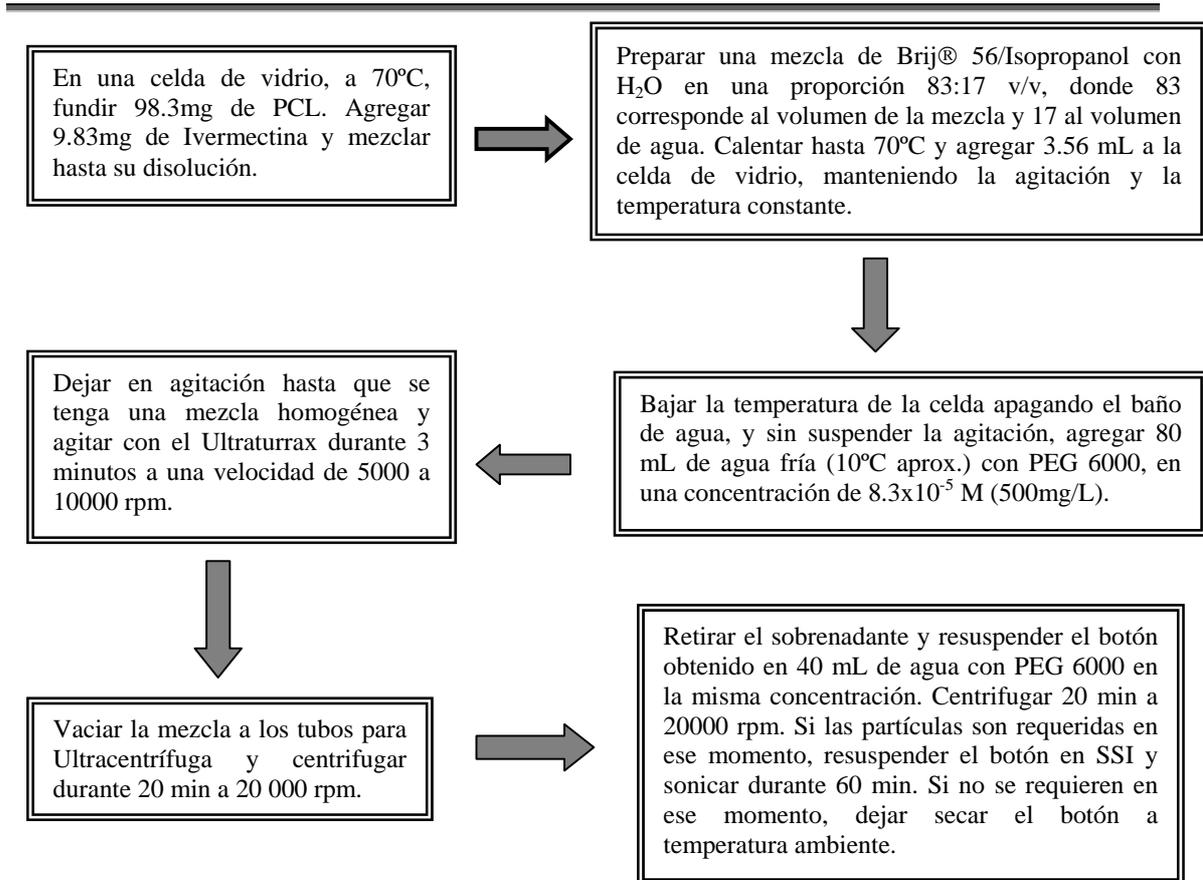


Diagrama 2.2.1 Obtención de nanopartículas recubiertas con PEG 6000.

Para saber qué concentración de PEG 6000 era la adecuada para obtener las nanopartículas con las características deseadas, se realizaron varios lotes con cantidades diferentes de PEG 6000, siguiendo la misma metodología. Las concentraciones de PEG 6000 evaluadas fueron las siguientes:

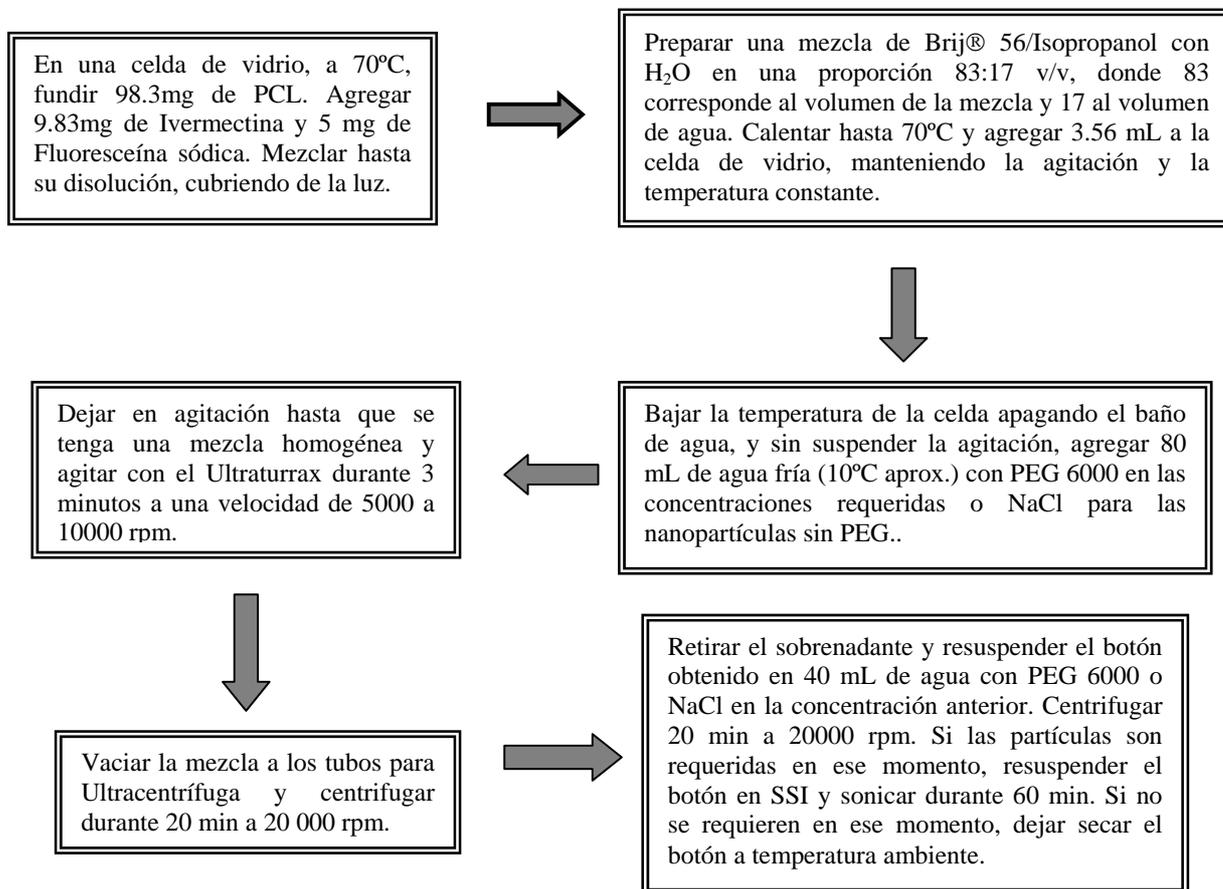
- 8.33 x 10⁻⁵ M (500 mg/L)
- 1.66 x 10⁻⁴ M (1000 mg/L)
- 2.50 x 10⁻⁴ M (1500 mg/L)
- 3.33 x 10⁻⁴ M (2000 mg/L)

2.3. Elaboración de nanopartículas fluorescentes

PARTE EXPERIMENTAL

Para los estudios de fagocitosis es preciso que las nanopartículas estén marcadas con un fluorocromo, ya que la cuantificación se realizará mediante citometría de flujo[118].

El proceso para obtener nanopartículas fluorescentes se muestra en el diagrama 2.3.1.



2.4. Caracterización de nanopartículas

Tamaño de partícula y potencial zeta

Una vez obtenido el botón de nanopartículas después de la segunda centrifugación, se pasó a una caja Petri y se dejó secar a temperatura ambiente. Ya que se secó, se tomó una porción de la masa y se resuspendió en la mezcla que se utilizó para precipitar y lavar a dichas nanopartículas. Se sonicó durante 60 minutos a 20 °C y posteriormente se leyó el tamaño de partícula y el potencial zeta en las celdas correspondientes.

Calorimetría diferencial de barrido

Del botón obtenido después de la segunda centrifugación, se tomó $1 \text{ mg} \pm 0.03$ de la muestra y se encapsuló en crisoles para muestras sólidas, esto para su posterior análisis en el calorímetro. Las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

Atmósfera: Nitrógeno

Velocidad de flujo del nitrógeno: 30 ml/min

Celda: aluminio

Velocidad de la temperatura de calentamiento: $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$

Intervalo de temperatura: $20\text{-}200^{\circ}\text{C}$

2.5. Proliferación de macrófagos murinos J774

Para la proliferación de los macrófagos J774 se utilizaron células criopreservadas, las cuales fueron descongeladas y posteriormente cultivadas en medio DMEM complementado. Las células se mantuvieron en incubación a 37°C en una atmósfera con 5% de CO_2 . Las condiciones de trabajo fueron en completa esterilidad.

2.6. Activación de complemento y proceso fagocítico

Activación del complemento

La activación del complemento puede ser evaluada mediante métodos inmunolectroforéticos, por ensayos de ELISA o por ensayos hemolíticos.

En este caso, se va a utilizar el método CH50 (cuantificación del 50 por ciento de hemólisis) permite determinar la actividad hemolítica de las proteínas del complemento en suero, expresándola en unidades CH50/mL, donde una unidad CH50 produce el 50 por ciento de

hemólisis de una suspensión de eritrocitos bajo condiciones estándar. Para dicho método se realizan los siguientes pasos:

Sensibilización de eritrocitos con TNBS (trinitro bencen-sulfóxido)

1. Lavar 2 mL de paquete globular con 15 mL de medio DGVB por 12 minutos a 2200 rpm y 4°C.
2. Lavar una vez con 15 mL de amortiguador de boratos por 12 minutos a 2200 rpm y 4°C.
3. Retirar el sobrenadante y agregar TNBS en amortiguador de boratos* para sensibilizar a los eritrocitos. Incubar en agitación constante y cubiertos de la luz, a temperatura ambiente durante 10 minutos.
4. Agregar 15 mL de amortiguador de boratos, centrifugar 12 minutos a 2200 rpm y retirar el sobrenadante.
5. Lavar con 7,5 mL de amortiguador de boratos y 7,5 mL de DGVB por 12 minutos a 2200 rpm y 4°C.
6. Lavar los eritrocitos 2 veces con 15 mL de DGVB o hasta que el sobrenadante quede claro. Resuspender el botón en 15 mL de DGVB.
7. Guardarlos cubiertos de la luz a 4°C. De esta manera se mantienen viables por una semana.

* 6,22 mg de TNBS en 7 mL de buffer de boratos (para 1 mL de paquete globular).

Opsonización de eritrocitos.

1. Los eritrocitos sensibilizados se lavan 3 veces con medio DMEM sin complementar.
2. Del pellet de eritrocitos obtenido, se hace una suspensión al 2% en medio sin complementar.
3. Se prepara una solución de anticuerpo (Ac) α -DNP de conejo en medio DMEM sin complementar (10 μ L de Ac + 790 μ L de medio DMEM sin complementar).
4. Tomar el volumen requerido de la suspensión de eritrocitos y posteriormente agregar el mismo volumen de la solución de anticuerpos α -DNP, de tal forma que los eritrocitos queden al 1%.
5. Dejar agitando por 30 minutos a temperatura ambiente y cubiertos de la luz.

PARTE EXPERIMENTAL

6. Centrifugar 12 minutos a 2200 rpm y retirar el sobrenadante
7. Resuspender el botón en un volumen de medio DMEM sin complementar necesario para obtener una suspensión al 1%.
8. Mantener a 4°C cubiertos de la luz. Los eritrocitos opsonizados se mantienen funcionales durante 24 h.

Determinación del 50 por ciento de hemólisis. Preparación de la curva de calibración.

1. Preparar una suspensión al 1% de eritrocitos opsonizados en CFD.
2. Preparar una solución stock de suero de cobayo 1:40 en CFD. Del stock, en tubos eppendorf, preparar las diluciones de acuerdo al siguiente cuadro:

μL stock	-----	4	8	20	40	60	80	100	200
μL CFD	200	196	192	180	160	140	120	100	-----

3. Agregar a cada uno de los tubos 50μL de la suspensión de eritrocitos e incubar a 37°C durante 30 min.
4. Después de haber incubado, agregar 750μL de CFD a cada tubo y centrifugar 1 minuto en la centrífuga para eppendorf. La hemoglobina liberada se puede estimar en un espectrofotómetro a 415 nm. Utilizar como blanco CFD.

Preparación de las muestras

1. En un tubo eppendorf colocar 150μL de una dilución de suero de cobayo 1:1000 en CFD. Agregar 50μL de una suspensión de partículas al 5% en CFD, previamente sonicada por 60 min. Preparar al mismo tiempo dos muestras control, una donde se agreguen 150 μL de CFD y 50 μL de la suspensión de partículas sin PEG 6000 y otra donde se agreguen 150 μL de la dilución de suero y 50 μL de CFD.
2. Agregar 50μL de la suspensión de eritrocitos opsonizados al 1% a todos los tubos e incubar a 37°C durante 30 min.
3. Adicionar a ambos tubos 750μL de CFD y centrifugar durante 1 minuto en la centrífuga para eppendorf. Determinar la cantidad de hemoglobina liberada en el espectrofotómetro a 415 nm. Es necesario realizar estos ensayos por triplicado.

Toxicidad del Brij56® en macrófagos murinos J774

1. En tubos eppendorf agregar entre 100000 y 300000 células en 200µL de medio DMEM complementado.
2. Preparar las suspensiones de partículas al 1% que serán evaluadas en medio DMEM complementado y sonicar durante 60 min a 20°C.
3. Agregar 50µL de cada una de las suspensiones e incubar una serie de tubos durante 60 min a 37 °C y la otra serie de tubos durante 60 min a 4 °C.
4. Después de la incubación lavar dos veces con medio DMEM sin complementar y una vez con PBS.
5. Decantar el sobrenadante del último lavado y agregar 200µL de PBS.
6. Tomar 25µL de la suspensión celular y vaciar a un tubo con 25 µL de solución de azul tripano.
7. Tomar la cantidad suficiente para contar las células vivas en una cámara de Neubauer. Es importante que la muestra se observe inmediatamente después del contacto con el azul tripano, ya que después de 5 minutos todas las células se teñirán de azul.

Proceso fagocítico

Para evaluar la fagocitosis de las nanopartículas se realizaron nanopartículas fluorescentes. La técnica mediante la cual se obtuvieron las nanopartículas siguió siendo microemulsión por fusión, sólo que se adicionó 1 mg de fluoresceína sódica junto con el fármaco, para que ésta quedara encapsulada en el interior de la partícula y no se eliminara con los lavados.

Para la fagocitosis de las nanopartículas se utilizaron macrófagos de la línea celular J774.

Fagocitosis en placa

1. En una placa de cultivo de 96 pozos se siembran 40000 células por pozo con 100 µL de medio DMEM complementado.
2. Incubar las placas con las células por lo menos durante 2 h a 37 °C y 5% de CO₂ para permitir la adherencia de los macrófagos.

3. Preparar una suspensión de partículas fluorescentes al 1% en medio DMEM complementado y sonicar durante 60 min a 20°C.
4. Agregar a la placa con células 30µL por pozo de la suspensión de partículas.
5. Incubar durante 3 h a 37 °C y 5% de CO₂.
6. Lavar la placa sumergiéndola en PBS por 20 s y tirar el sobrenadante. Hacer tres lavados.
7. Después del último lavado retirar todo el sobrenadante de la placa con un movimiento fuerte y de un solo golpe.
8. Para fijar a las células, agregar 200µL de para-formaldehído (PFA) y dejar incubar a temperatura ambiente durante 20 min.
9. Lavar con PBS dos veces y agregar 200µL del mismo amortiguador.
10. Observar la placa en un microscopio fluorescente e invertido.

Fagocitosis en tubo

1. En tubos eppendorf agregar entre 100000 y 300000 células en 200µL de medio DMEM complementado.
2. Añadir 50µL de una suspensión de partículas en medio DMEM complementado al 1% previamente sonicada durante 60 min a 20°C.
3. Incubar una serie de tubos durante 3 h a 37 °C y otra serie de tubos durante 3 h a 4 °C.
4. Lavar con centrifugación dos veces con medio DMEM sin complementar y una vez con PBS.
5. Después del último lavado agregar 400µL de PFA y dejar incubar a temperatura ambiente durante 20 min.
6. Lavar con centrifugación con PBS una vez y resuspender en 300µL de PBS.
7. Leer las muestras en el citómetro de flujo. Hacer 10000 conteos.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. ELABORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS SIN PEG 6000

La técnica de microemulsión por fusión consiste en formar una microemulsión donde la fase oleosa sea un polímero (en el caso de nanopartículas de polímeros biodegradables) o un lípido (en el caso de nanopartículas lipídicas). La fase acuosa consta de una mezcla de agua y tensoactivo, el cual, a su vez, está mezclado con un cotensoactivo, que en este caso es el isopropanol.

Debido a las propiedades de la PCL, es difícil formar la microemulsión, pues es totalmente insoluble en agua. Para disminuir la tensión superficial que existe entre la PCL en estado líquido y el agua, es necesario hacer uso de un tensoactivo mezclado con un cotensoactivo, sólo que existe un inconveniente, pues la cantidad de tensoactivo que se necesita para formar la microemulsión es muy grande.

Para encontrar la proporción adecuada de cada uno de los componentes para la formación de una microemulsión o/w, se prepararon las siguientes mezclas:

Tabla 5.1.1. Composición (p/p) de las mezclas evaluadas para formar microemulsiones.

Mezcla	% PCL	% Brij 56/Isopropanol	% H ₂ O
A	2.23	83.62	14.14
B	7.57	83.62	8.7
C	12.75	83.62	3.52
D	2.32	79.05	18.62
E	6.88	79.05	14.06
F	12.62	79.05	8.32
G	1.71	87.64	10.64
H	5.87	87.64	6.48
I	10.8	87.64	1.56

Con los resultados obtenidos se realizó el siguiente diagrama ternario:

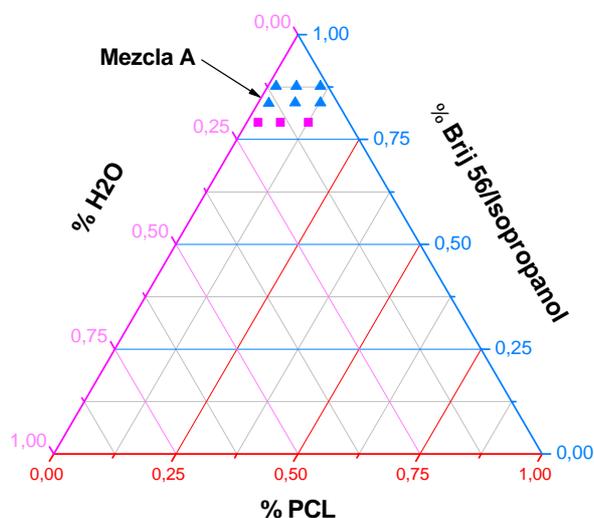


Gráfico 5.1.1. Diagrama ternario de PCL, Brij 56 y H₂O (los cuadros indican que no se forma una microemulsión, y los triángulos indican que si se formó una microemulsión).

Como se observa en el gráfico 5.1.1, los triángulos (mezclas A, B, C, G, H e I) indican que las mezclas forman una microemulsión (una fase), y los cuadros (mezclas D, E y F) indican que la mezcla no logra formar una microemulsión, observándose dos fases; la oleosa y la acuosa. A pesar de que el diagrama no se completó, se realizaron los puntos de mayor interés, ya que la cantidad de tensoactivo es determinante en este sistema. En las regiones donde la cantidad de tensoactivo es muy baja y la PCL muy alta no se forma microemulsión, esto a causa de la pobre miscibilidad que hay entre la PCL y el agua, y al haber muy poca incorporación de estos dos componentes, se necesitan cantidades muy grandes de tensoactivo para disminuir la tensión interfacial y que se forme la microemulsión. Por otro lado, en la región donde la cantidad de agua es muy grande respecto a la de PCL, se requieren cantidades pequeñas de tensoactivo, pero la pobre cantidad de PCL en estas mezclas no es conveniente, ya que el fármaco se incorpora a la fase oleosa, y no sería posible incorporar una cantidad considerable de fármaco. El objetivo de estos sistemas coloidales es incorporar una cantidad considerable de fármaco, por lo que poca PCL llevaría a tener muy poca Ivermectina en la nanopartícula. Debido al comportamiento de este sistema, sólo se

realizaron los puntos mostrados en el diagrama, que son los que se consideraron de mayor de interés.

Las mezclas ideales para formar una microemulsión son la A, B, C, G, H e I (véase Tabla 5.1.1).

La mezcla elegida para formar la microemulsión que sería la precursora de las nanopartículas fue la A, ya que a pesar de que las otras cinco mezclas forman una microemulsión, es una de las que menos tensoactivo tienen. Si se compara la composición de A, B y C se observa que la cantidad de tensoactivo es la misma, y que las que difieren son la cantidad de agua y PCL. Dado que el objetivo es obtener una microemulsión o/w, es conveniente utilizar la mezcla que tenga mayor porcentaje de agua con respecto al porcentaje de PCL. Tomando en cuenta tal criterio para elegir la mezcla adecuada, parecería que A y B son ideales, pero B tiene el inconveniente de contener un porcentaje de agua casi igual al porcentaje de PCL, y aunque éste sea mayor, no nos garantiza que la microemulsión obtenida sea una o/w.

Una de las técnicas utilizadas para eliminar el tensoactivo y los disolventes utilizados para la obtención de las nanopartículas es la centrifugación. Al centrifugar logramos que las partículas sedimenten, y de esta manera se puede separar el botón de partículas de los demás componentes, principalmente del tensoactivo que se encuentra disuelto en el medio. Una vez obtenido el botón de partículas, se dispersó en agua y se determinó el tamaño de partícula. Los resultados no fueron los deseados, ya que se esperaba obtener un tamaño de 200-300nm, y los tamaños obtenidos eran mayores a 300nm. Estos resultados indicaban que había aglomeración de las partículas. Para evitar el problema de aglomeración se tenían dos alternativas: a) realizar sólo un lavado para evitar un poco la aglomeración de las partículas y b) agregar al medio en el que se precipitan las partículas una sal que modifique la carga en superficie de la partícula, y así evitar su aglomeración.

Para eliminar la mayor cantidad de tensoactivo posible realizando un solo lavado, es preciso agregar un componente que aumente la solubilidad del tensoactivo. El componente de elección fue el isopropanol, que también funciona como cotensoactivo en la generación de las partículas. Por otro lado, la sal con la que se decidió trabajar fue NaCl[35].

Las mezclas de agua fría que se trabajaron para la generación de las partículas fueron las siguientes:

- Agua + Isopropanol (10:1)
- Solución salina al 0.001% p/v
- Solución salina al 0.001% + Isopropanol (10:1)

Después de obtener las partículas con estas mezclas, se realizaron los centrifugados pertinentes y se determinó el tamaño de partícula. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

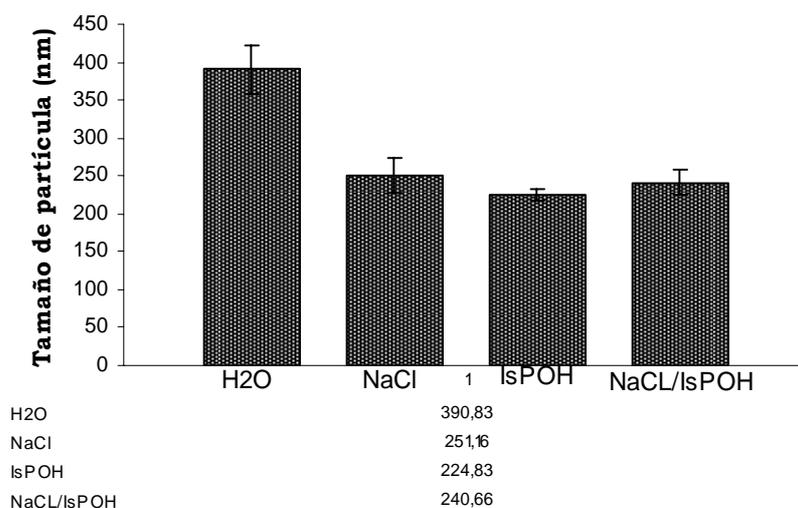


Gráfico 5.1.2. Tamaño de las partículas obtenidas con diferentes mezclas de isopropanol (IsPOH), NaCl y agua (H2O).

Con estos resultados se puede observar que hay una cierta disminución en el tamaño de partícula, y que agregar NaCl e Isopropanol fue de gran ayuda. Sin embargo, el cambio no fue muy considerable entre las partículas con NaCl y las que tienen NaCl/Isopropanol. Al ver estos resultados, se considera innecesaria la adición de isopropanol, a menos que éste tuviera influencia en la solubilidad del tensoactivo como ya lo habíamos predicho. Para saber si el isopropanol pudiera ser útil en la optimización de la metodología, se analizaron por espectrofotometría UV los sobrenadantes obtenidos en el primer lavado de las nanopartículas, esto con el fin de observar si existía una mayor cantidad de Brij®56 en el sobrenadante cuando se adiciona isopropanol.

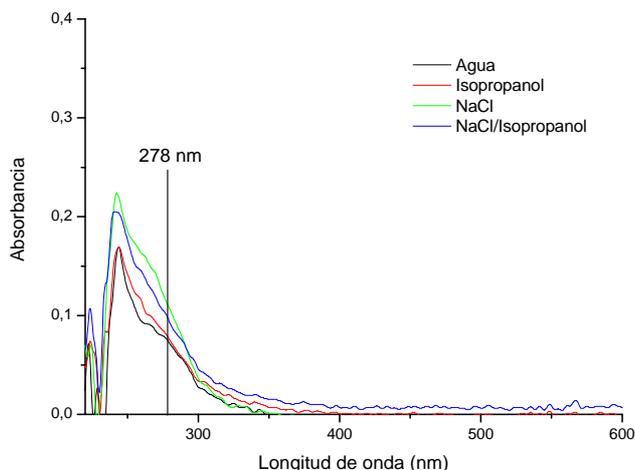


Gráfico 5.1.3. Espectros de los sobrenadantes obtenidos en el primer lavado de las nanopartículas.

En este gráfico se trata de mostrar la influencia que tienen las mezclas utilizadas en la eliminación del tensoactivo. Esto sólo se puede hacer de manera cualitativa, porque en los sobrenadantes no sólo hay tensoactivo, también hay Ivermectina y PCL disuelta. Como se puede observar, el isopropanol no provocó que la señal del tensoactivo aumentara; incluso, los espectros son muy similares entre si, y a 278 nm; que es la longitud de onda a la cual absorbe el Brij®56 no se ve que las señales cambien en magnitud de manera significativa.

Por lo tanto, la adición de Isopropanol es innecesaria, pero la del NaCl si influye en el tamaño de partícula (gráfico 5.1.2).

La aglomeración de las partículas se puede deber a su carga en superficie, pues es recomendable que para que las partículas sean estables y no se aglomeren deben tener un potencial zeta de aproximadamente -30 mV o mayor, hasta +30 mV. La presencia del NaCl puede modificar la carga en superficie de las partículas, evitando su aglomeración, y por lo tanto, el tamaño de las partículas mejorará, así como su uniformidad en el mismo.

Para comprobar esta hipótesis se prepararon nanopartículas utilizando 0.001, 0.002, 0.003, 0.005 % p/v de NaCl y sin sal[35].

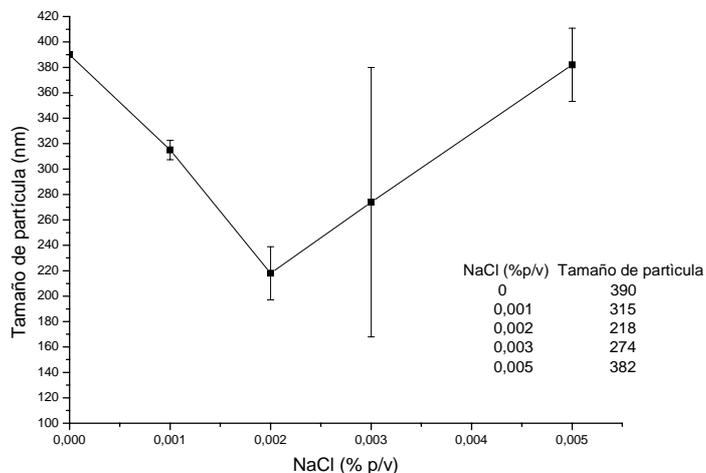


Gráfico 5.1.4. Tamaño de partícula de nanopartículas sin Ivermectina, en presencia de diferentes cantidades de NaCl.

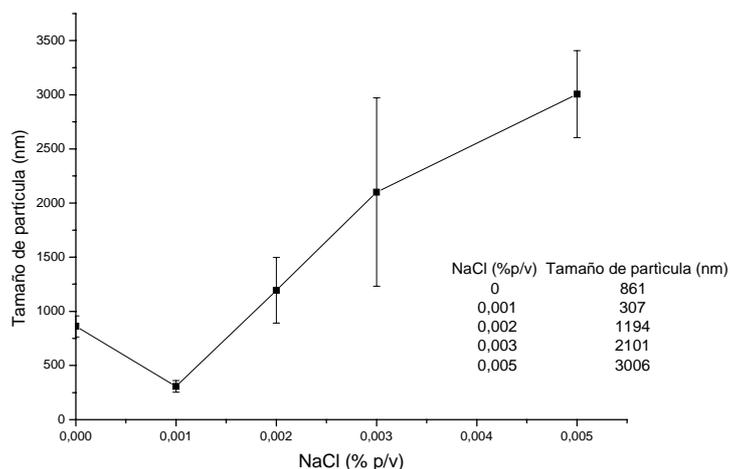


Gráfico 5.1.5. Tamaño de partícula de nanopartículas con Ivermectina, en presencia de diferentes cantidades de NaCl.

(Los tamaños de partícula se determinan después de la centrifugación)

Tal como se observa en los gráficos 5.1.4 y 5.1.5, es evidente que la presencia, así como la concentración de NaCl en el agua fría con la que se precipitan las nanopartículas, tiene una gran influencia en el tamaño de partícula de las mismas, viéndose afectadas de manera más notoria las nanopartículas que contienen Ivermectina. No obstante, las nanopartículas sin Ivermectina también se ven afectadas por la cantidad de NaCl presente. También es evidente que existe una marcada diferencia entre las nanopartículas que tienen Ivermectina y las que no tienen, y esta diferencia puede deberse a la incorporación del fármaco a la nanopartícula.

En ambos casos, el cambio en el tamaño de partícula cuando no se utiliza NaCl y cuando si se utiliza es muy notorio, aunque se puede percibir mejor en las nanopartículas con Ivermectina. Con esto, se puede asegurar que en ambos tipos de nanopartículas, la presencia de NaCl ha mejorado el tamaño de partícula. En el caso de las nanopartículas sin Ivermectina se observa una disminución en el tamaño al ir aumentando la concentración de sal, aunque hay una desviación con el punto donde el NaCl está al 0,002% p/v, ya que el tamaño comienza a aumentar, lo cual indicaría que hasta 0,002% de sal es factible utilizar, al menos para obtener los resultados deseados.

Con la información obtenida en el gráfico 5.1.4 podría pensarse que la concentración de NaCl ideal es 0,002% p/v, ya que con dicha concentración se obtiene el tamaño de partícula menor. Sin embargo, en las nanopartículas con Ivermectina se observa que al 0,001% de sal disminuye el tamaño, pero después de esta concentración comienza a aumentar el tamaño. De alguna manera, el comportamiento en ambos tipos de nanopartículas es el mismo, solo que en las nanopartículas sin Ivermectina el cambio se observa a una concentración mayor de sal que en las nanopartículas con Ivermectina.

En ambos gráficos también se puede observar la dispersión de los datos en cada uno de los puntos, la cual nos va a indicar que tan variados son los tamaños de partícula en cada composición. Con dicha información se puede pensar que la concentración de NaCl menos adecuada para generar nanopartículas de tamaño uniforme, es la de 0,003% p/v, y que la más adecuada es la de 0,001% p/v.

Como ya se mencionó anteriormente, la influencia del NaCl en el tamaño de partícula de las nanopartículas se puede deber al cambio en la carga de superficie de la partícula. Para comprobar que el cambio en el tamaño de partícula se debe a la carga en superficie, se determinó el potencial zeta de las partículas obtenidas con cada una de las concentraciones de NaCl.

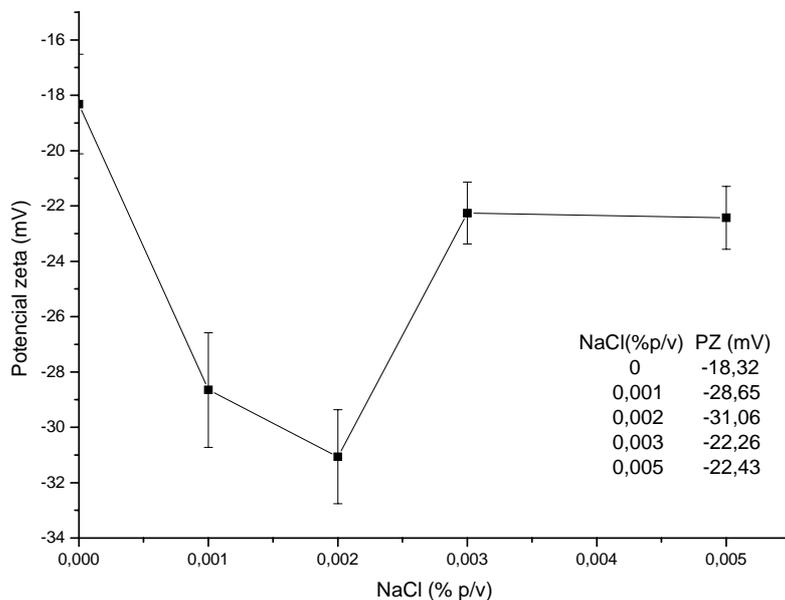


Gráfico 5.1.6. Potencial zeta de las nanopartículas sin Ivermectina, a diferentes concentraciones de NaCl. (Tamaños obtenidos después de centrifugar)

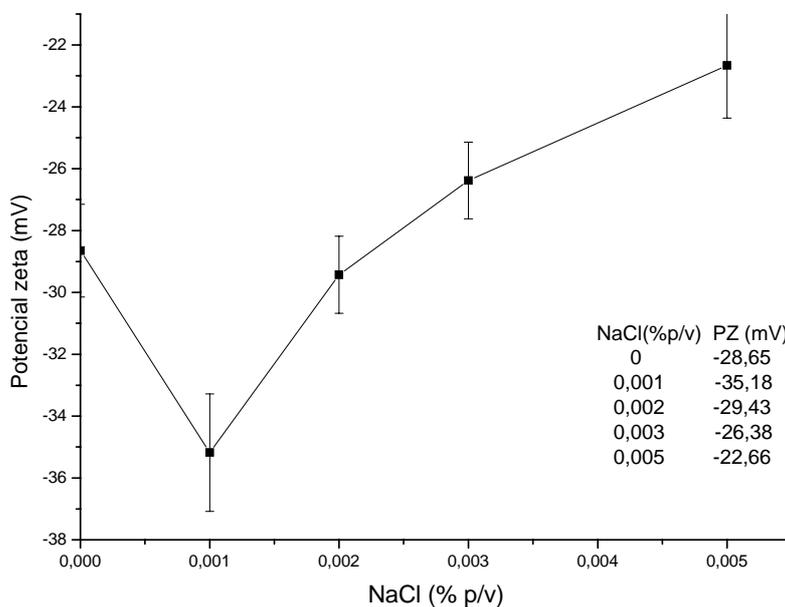


Gráfico 5.1.7. Potencial zeta de las nanopartículas con Ivermectina, a diferentes concentraciones de NaCl. (Tamaños obtenidos después de centrifugar)

Si se relaciona el tamaño de partícula con el potencial zeta, se observa que cuando el tamaño de partícula disminuye el potencial zeta también disminuye, por lo que se puede

suponer que el potencial zeta entre más pequeño sea, la repulsión entre las partículas será mayor y de esta manera se evita que se aglomeren. Este comportamiento es similar para las nanopartículas sin Ivermectina y con Ivermectina.

Si se observan los gráficos 5.1.6 y 5.1.7 se podrá notar que la caída del potencial ocurre cuando la concentración de NaCl va desde cero hasta 0,002%, lo cual nos indica que una pequeña cantidad de NaCl es suficiente para modificar la carga en superficie de la partícula, quizá por sus propiedades iónicas impartidas por los iones Na^+ y Cl^- y su afinidad por la superficie de la partícula en cuestión.

Dado que el objetivo de este trabajo es optimizar la técnica para la obtención de nanopartículas por microemulsión por fusión; y que ya se ha resultado el problema de la aglomeración, es necesario evaluar otros parámetros como: a) tiempo de homogeneización en el Ultraturrax, b) el tiempo de centrifugado para cada lavado y c) tiempo de sonicado para resuspender a las partículas.

Tiempo de homogeneización en el Ultraturrax

Para encontrar el tiempo óptimo de homogeneización se evaluaron 5 tiempos: 1, 2, 3, 4 y 5 min, manteniendo una velocidad constante (5000-10000 rpm) Los resultados obtenidos se muestran en el siguiente gráfico:

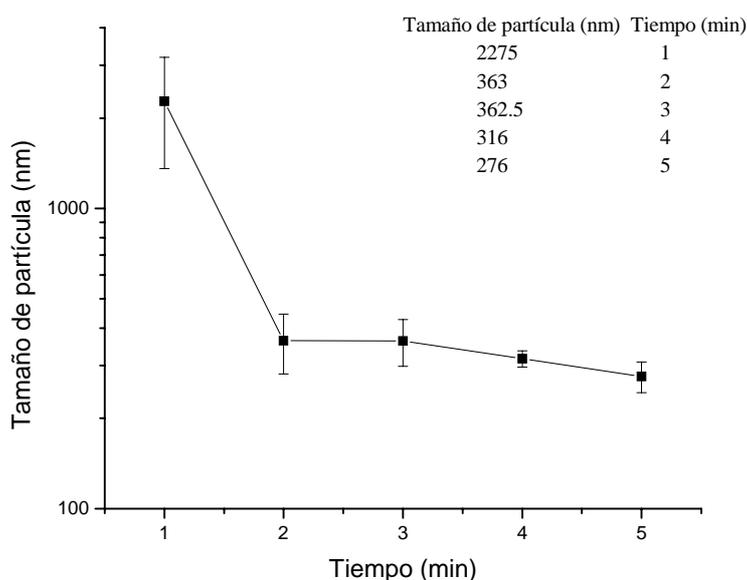


Gráfico 5.1.8. Influencia del tiempo de homogeneización en el tamaño de partícula.

Es evidente que el tamaño de partícula se ve muy influenciado por el tiempo de homogeneización, sobre todo en los primeros dos minutos. Una vez que han pasado los primeros dos minutos, el cambio en el tamaño ya no es tan notorio, aunque si se desea obtener partículas de tamaño muy pequeño es una buena opción homogeneizar hasta 5 minutos, aunque también a los 4 minutos se obtienen tamaño de partícula muy pequeños.

Debido a esto, el tiempo que se elige para obtener nanopartículas con las características deseadas es 4 minutos.

Tiempo de centrifugado para cada lavado

Para este estudio se evaluaron los siguientes tiempos de centrifugado: 10, 13, 16 y 20 minutos. Para realizar este experimento se mantuvieron constantes la velocidad de agitación con el Ultraturrax durante 4 minutos. Los resultados obtenidos son los siguientes:

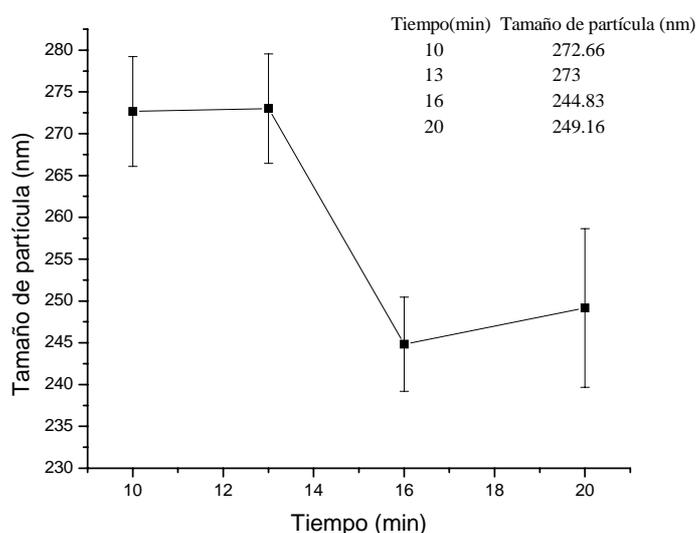


Gráfico 5.1.9. Influencia del tiempo de centrifugado en el

tamaño de partícula.

Tomando en cuenta el tamaño de partícula obtenido y la desviación estándar de los datos, se ve que el tamaño de partícula no está siendo afectado por el tiempo de centrifugado, pues los tamaños parecen comportarse de manera uniforme, por lo cual, resultaría lo mismo

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

centrifugar 10 ó 20 minutos, aunque se debe tomar en cuenta que probablemente a los 20 minutos se han sedimentado más partículas que las que se pueden sedimentar en 10 minutos. Es importante tomar en cuenta que para que la técnica sea óptima se debe disminuir el tiempo de cada proceso, pero en este caso es más importante el rendimiento obtenido y no el tiempo que se tarde en centrifugar. Tomando en cuenta esta observación, se eligieron 20 minutos como el tiempo mínimo para realizar cada lavado.

Tiempo de sonicado para resuspender partículas

Debido a la fuerza a la que se están sometiendo las partículas durante el proceso de centrifugado, puede ser que las partículas lleguen a formar aglomerados, independientemente de que se esté utilizando el NaCl para evitar tal suceso. Por esto, se decidió sonicar la suspensión de partículas obtenidas después del segundo lavado. Para comprobar la hipótesis se evaluaron varios tiempos de sonicado, obteniéndose los siguientes resultados:

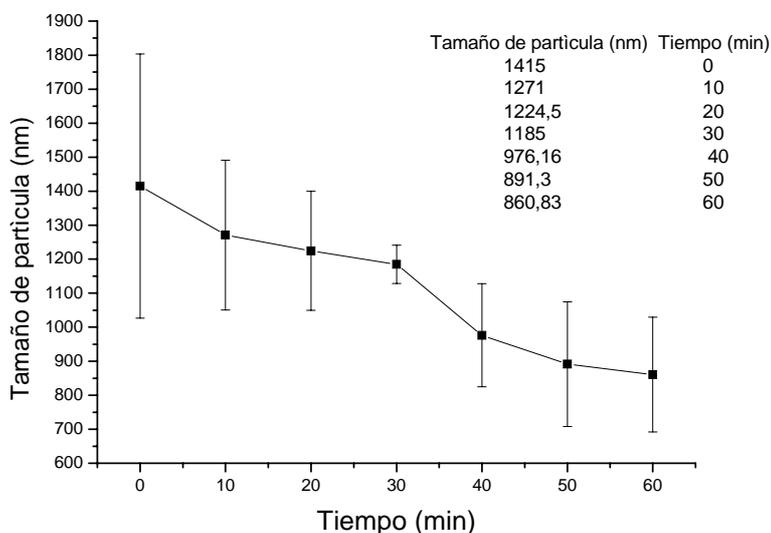


Gráfico 5.1.10. Influencia del tiempo de sonicado en el tamaño de partícula.

Nota: las nanopartículas utilizadas en este experimento no tienen NaCl ni Ivermectina, la agitación en el Ultraturax fue a velocidad constante durante 4 minutos y centrifugadas durante 20 minutos.

Tal como se observa en el gráfico, el tamaño de partícula es modificado por el proceso de sonicación, y dependiendo del tiempo que se deje sonicando, será que el tamaño de partícula llegue a ser más pequeño en comparación con el tamaño inicial. Esto se debe a la vibración que causa el sonicador, ya que las partículas al estar en continuo movimiento, no logran aglomerarse. En el caso de las partículas que ya se encuentran aglomeradas, dado que las interacciones entre ellas son débiles, éstas se rompen por el efecto de vibración y se generan aglomerados más pequeños, incluso, la dispersión de partículas independientes.

Integrando la información obtenida en cada uno de estos estudios, se eligieron como condiciones ideales: a) homogeneizar con el Ultraturrax durante 4 minutos a una velocidad constante entre 5000 y 10000 rpm, b) centrifugar 20 minutos a 12000 rpm en cada lavado y c) sonicar las partículas obtenidas en el segundo lavado durante 60 min a temperatura ambiente.

2. ELABORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS CON PEG 6000

Las nanopartículas recubiertas con PEG 6000 deben tener un tamaño menor a 500 nm para que cumpla con los objetivos que un sistema coloidal debe cumplir[5]:

- Disminuir el efecto en la respuesta inmune
- Tener la capacidad de llegar a capilares, alvéolos y otros tejidos (pensando que la administración sea vía intramuscular, intravenosa y nasal).

Debido a esto, las nanopartículas deben tener un tamaño menor a 500 nm, y mientras más pequeñas sean, las ventajas son mayores. En este trabajo el tamaño que se desea manejar es de 200 a 300 nm.

Para la elaboración de nanopartículas recubiertas con PEG 6000 se estudiaron diferentes concentraciones de PEG 6000, esto para saber que concentración es la mas adecuada para obtener partículas con las características deseadas. Las concentraciones de PEG se eligieron de acuerdo a la cantidad de PCL presente en cada lote.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para elaborar un lote de nanopartículas se utilizan 98.3 mg de PCL. Para que exista un buen recubrimiento es ideal trabajar con cantidades similares de ambos polímeros, pero para monitorear como es que la cantidad del polímero recubridor influye en dicho proceso, es importante utilizar una cantidad menor y una mayor a la requerida.

Las concentraciones que se trabajaron fueron las siguientes:

- 8.30×10^{-5} M (500 mg/L)
- 1.66×10^{-4} M (1000 mg/L)
- 2.50×10^{-4} M (1500 mg/L)
- 3.33×10^{-4} M (2000 mg/L)

Estas concentraciones de PEG 6000 están en la siguiente relación peso/peso con la cantidad de PCL utilizada:

- 98.3 mg PCL/40 mg PEG 6000
- 98.3 mg PCL/80 mg PEG 6000
- 98.3 mg PCL/120 mg PEG 6000
- 98.3 mg PCL/160 mg PEG 6000

Una vez obtenidas las partículas como se describe en la metodología, se lavaron dos veces en las condiciones ya descritas y se caracterizaron; obteniéndose el tamaño de partícula y el potencial zeta. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

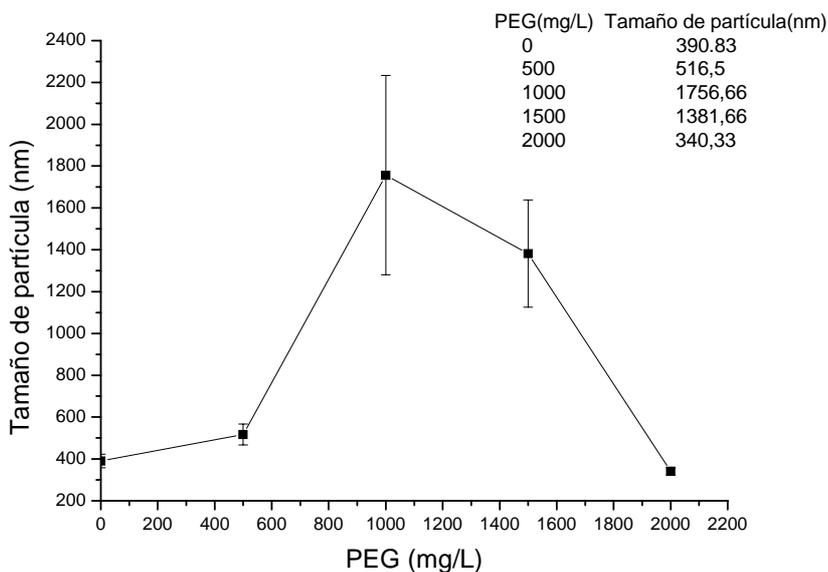


Gráfico 5.2.1.

Comportamiento del tamaño de partícula en partículas sin Ivermectina respecto a la concentración de PEG presente.

Por los resultados obtenidos, se podría pensar que la concentración de PEG es determinante en el tamaño de partícula, pues es muy notorio el cambio que existe en el tamaño de partícula de una concentración a otra.

El PEG 6000 tiene la propiedad de conferir estabilidad a las partículas, de tal forma que éstas no se aglomeran y su tamaño no incrementa[41,43,115]. Debido a esta propiedad el aumento del tamaño de partícula de una concentración a otra no se puede atribuir a la aglomeración de las partículas. Cabe la posibilidad de que las partículas aumenten de tamaño por la presencia de las cadenas de PEG en su superficie, y por tal razón, en las concentraciones de 1000 y 1500 mg/L de PEG, el tamaño de las partículas sea mayor. Además, si se observa el gráfico 4.2.1 se verá que el tamaño de las partículas sin PEG es menor al tamaño encontrado en las partículas con PEG en 500 mg/L y 1000 mg/L, aunque para las partículas con PEG 2000 mg/L ya no se cumple tal comportamiento. Cuando el PEG se trabaja en 2000mg/L el tamaño de partícula disminuye abruptamente, llegando a ser casi igual al tamaño de las partículas cuando se trabaja a 500mg/L de PEG. Estas diferencias indican que cuando se trabaja con 500mg/L de PEG la cantidad de cadenas que se encuentra pegada a la superficie de la partícula es mucho menor que la cantidad de cadenas pegadas

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

cuando se trabaja con 1000 y 1500 mg/L de PEG. Incluso podría suponerse que 1000mg/L de PEG es la concentración ideal de PEG, pues es ésta la concentración en la cual se alcanza el máximo tamaño de partícula, sólo que existe el inconveniente de que estas partículas ya no cumplen con las características deseadas, pues el tamaño que se requiere para que estas partículas se consideren como un buen sistema coloidal debe ser menor a 500 nm.

Por otro lado, se observa que a partir de 1000 mg/L de PEG, conforme aumenta la concentración de PEG comienza una caída en el tamaño de partícula, indicando que un exceso de PEG no beneficia que las cadenas de éste polímero se peguen a la superficie de la partícula, o bien, que el exceso de PEG 6000 en el medio puede facilitar la solubilidad de la PCL, pues al tener acción como tensoactivo, no se puede descartar la posibilidad que la PCL se esté disolviendo, y por eso los tamaños a esta concentración sean menores.

Para saber un poco más sobre la superficie de las partículas obtenidas, se determinó el potencial zeta de las partículas. Los resultados obtenidos son los siguientes:

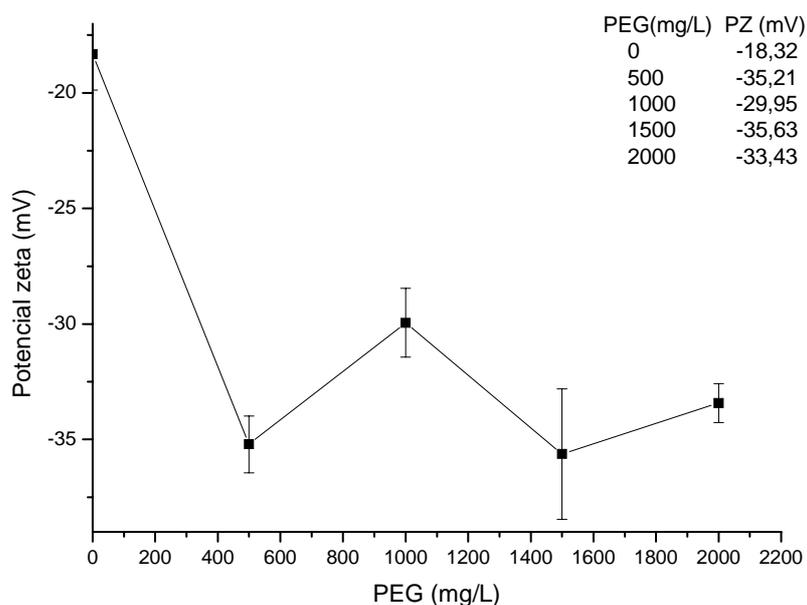


Gráfico 5.2.2. Influencia del PEG 6000 en el potencial zeta de las partículas sin Ivermectina.

En el gráfico 5.2.2 se observa que todas las partículas obtenidas con diferentes concentraciones de PEG tienen un potencial zeta menor a -30 mV, y aunque el potencial de las partículas con 1000 mg/L de PEG no sea exactamente de -30 mV, ya está muy cercano a

dicho valor. Estos datos nos pueden indicar que la presencia de poco o mucho PEG no afecta de manera sistemática al potencial zeta de las partículas, y que por la carga que tienen se podría pensar que en todos los casos las partículas no permanecen aglomeradas; por lo tanto, la variación en el tamaño de partícula se debe a la presencia de las cadenas del PEG en la superficie de la partícula. Otra observación muy importante es el potencial zeta que tienen las partículas sin PEG (punto 1 del gráfico), pues este es mucho mayor que el potencial registrado a cualquier otra concentración de PEG, y es mayor a -30 mV. Esta variación indicaría que la presencia del PEG si cambia el potencial de la partícula, y con esto que también existe un cambio en la superficie de la partícula, pues las cadenas de PEG le están confiriendo una carga de superficie diferente, a la que le confiere la PCL.

No obstante, es importante mencionar que el dato de mayor potencial zeta, a parte del potencial de las partículas sin PEG, es el registrado cuando el PEG se encuentra a 1000mg/L , lo que nos permitiría descartarlas como una buena opción, pues lo que se requiere es partículas con un potencial igual o menor a -30 mV. Sin embargo, en el gráfico 5.2.1, se observa que a esta concentración se tienen partículas de mayor tamaño, y por lo tanto, partículas que más PEG pegado tienen.

Con estas observaciones se puede suponer que para las nanopartículas elaboradas sin Ivermectina la concentración óptima de PEG 6000 para conseguir un mayor recubrimiento es la de 1000mg/L , pero tomando en cuenta que las nanopartículas deben tener un potencial zeta muy pequeño, las que mejor resultados muestran son las que se obtienen con 1500 mg/L de PEG 6000. Tomando en cuenta el tamaño de las partículas obtenidas con 1500 mg/L de PEG, se podrá observar que no son una mala opción, pues su tamaño también es grande en comparación con el tamaño de las partículas sin PEG y con 500 mg/L de PEG, lo cual indica que también parecen tener una cantidad considerable de PEG pegado a su superficie. Por lo tanto, las que tienen mejores características para los fines deseados son las partículas obtenidas con 1500 mg/L de PEG.

Por otra parte, las nanopartículas elaboradas con Ivermectina mostraron las siguientes características:

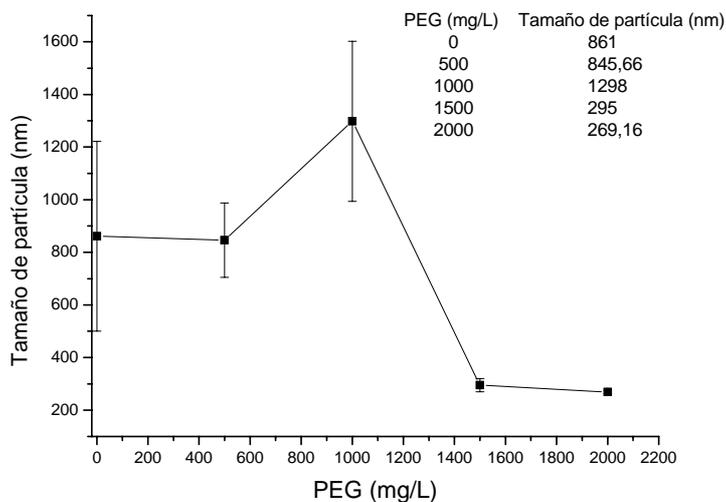


Gráfico 5.2.3. Comportamiento del tamaño de partícula respecto a la concentración de PEG 6000. Nanopartículas con Ivermectina.

En el caso de las nanopartículas con Ivermectina el comportamiento del tamaño de partícula respecto a la concentración de PEG es el mismo que en las partículas sin Ivermectina. Debido a esto, dicho comportamiento se podría argumentar de igual manera que en las partículas vacías. Sin embargo, cabe mencionar que los tamaños de partícula varían mucho de un experimento a otro. El tamaño de las partículas con Ivermectina es mayor en las primeras dos concentraciones de PEG (500 y 1000 mg/L), lo cual podría deberse a la presencia de la Ivermectina. Cuando se utilizan 1000 mg/L de PEG el tamaño no varía mucho, aunque a partir de esta concentración el tamaño de las partículas con Ivermectina es menor que el de las partículas vacías. Por lo tanto, es evidente que la variación en el tamaño de las partículas se puede deber a que la Ivermectina le confiere propiedades de superficie a la partícula que no tiene cuando sólo son de PCL, y que por estas propiedades se pegan menos cadenas de PEG en la superficie de la partícula, además de que es evidente que existe otro factor determinante en la adhesión de muchas o pocas cadenas de PEG, y que dicho factor es la concentración de PEG, ya el exceso de PEG en el medio no es favorable, porque al igual que en las partículas sin Ivermectina puede ser que a bajas concentraciones (menores a 500 mg/L) no se esté pegando el suficiente PEG, o bien, que el exceso esté propiciando la solubilidad de la PCL.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Si la concentración de PEG influye en la mucha o poca adhesión del PEG a la superficie de la partícula, el tamaño de las partículas sin PEG y el de las partículas con 500 mg/L de PEG deberían de ser similares, y en efecto, son muy similares (gráfico 5.2.3). Con estos resultados se puede pensar que al inicio no hay adhesión de PEG a la superficie de la partícula, y que sólo hasta 1000 mg/L de PEG hay un cambio notorio.

Por otro lado, si se observan los gráficos 5.2.2 y 5.2.4 se verá que el potencial zeta de las nanopartículas con Ivermectina a cualquier concentración de PEG generalmente es mayor que el potencial zeta de las partículas sin Ivermectina a cualquier concentración de PEG. A pesar de que la diferencia es muy poca, esto nos puede indicar que al existir una pequeña diferencia en el potencial de las partículas con y sin Ivermectina también puede existir diferencia en la superficie de cada uno de los tipos de partículas obtenidas. De igual manera, el potencial zeta de las partículas sin Ivermectina y sin PEG (punto 1 del gráfico 5.2.2.) es mayor que el potencial zeta de las nanopartículas con Ivermectina y sin PEG (punto 1 del gráfico 5.2.4), lo cual nos indica que la adsorción de las cadenas de PEG en la superficie de la partícula puede estar en función de la presencia o ausencia de la Ivermectina. En algunos estudios[94,113,114] se ha reportado que algunos copolímeros hechos con PEG, tienen segmentos policatiónicos, los cuales tienen una gran afinidad por las superficies sólidas con cargas negativas. En este caso, las partículas sin PEG con Ivermectina tienen carga negativa, y posiblemente el PEG tenga una mayor afinidad. Si recordamos nuevamente que el potencial zeta de las partículas vacías sin PEG (punto 1 del gráfico 5.2.2) es mayor que el potencial zeta de las partículas con Ivermectina sin PEG (punto 1 del gráfico 5.2.4) se puede suponer que el PEG se pegó en mayor cantidad a las partículas con Ivermectina (por tener el potencial mas pequeño), por ello el tamaño de estas partículas es mayor. Por lo tanto, en este caso en particular, las partículas que tienen un potencial zeta menor tienden a adherir más cadenas de PEG, y por tal razón el tamaño de partícula es mayor.

Otro factor importante es la conformación del PEG adherido a la superficie de las partículas, el cual también puede influir en su tamaño, y aunque el PEG esté unido en las mismas concentraciones el tamaño va a diferir, ya que el PEG puede estar acomodado en forma de cepillo o en forma de hongo[97,114].

Por otro lado, a pesar de que la presencia de PEG en la superficie si provoca cambios en el potencial zeta, sin importar la cantidad de PEG, la carga en superficie se encuentra alrededor

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

de un valor, tengan o no tengan Ivermectina, y dicho valor siempre es menor a -30 mV, a excepción de las partículas formadas con 1000 mg/L de PEG, que en ambos casos (vacías y con Ivermectina) es mayor a -30 mV. Es importante aclarar que a pesar de que este valor sea similar en todas las nanopartículas obtenidas con diferentes concentraciones de PEG, siempre existirá una diferencia entre ellas, y que en el organismo van a desencadenar procesos diferentes, sobre todo en la adhesión de proteínas del complemento.

Finalmente, las partículas con Ivermectina con mejores características, por lo menos para los intereses de este trabajo, son las partículas obtenidas con 1500 mg/L de PEG.

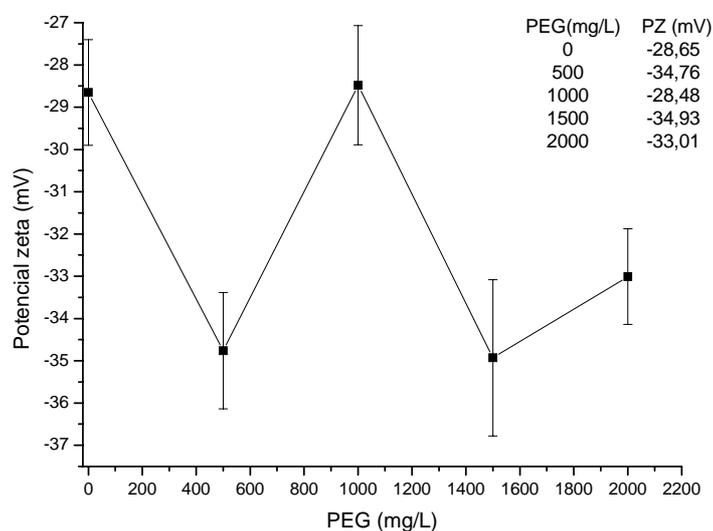


Gráfico 5.2.4. Influencia del PEG en el potencial zeta de partículas con Ivermectina.

3. TOXICIDAD DEL BRIJ 56®

En la elaboración de las nanopartículas existe un paso importante: el lavado de las partículas. Dado que las partículas van a ser evaluadas en células, es importante eliminar la mayor cantidad de tensoactivo, para que éste no cause la lisis de las células implicadas. La eliminación del tensoactivo se realizó mediante la centrifugación de las partículas en el paso final, para que de esta manera el tensoactivo disuelto se eliminara junto con el agua y el disolvente utilizado como cotensoactivo. Dado que la solubilidad del Brij 56® no es muy

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

grande en el agua, un lavado no es suficiente para eliminar la mayor parte del tensoactivo, por tal razón se tuvieron que realizar dos lavados.

Cuantificar el tensoactivo eliminado en cada lavado resulta ser complicado, ya que las nanopartículas son sistemas muy complejos, en los cuales las propiedades de cada componente pueden variar, o bien, tener similitudes entre sí, lo cual podría dificultar su identificación individual. En un inicio, para cuantificar la cantidad de tensoactivo eliminado en cada lavado se utilizó la espectroscopia UV, pero los resultados obtenidos no fueron muy convincentes, ya que las señales al UV de cada uno de los componentes se encimaban.

La señal en la región UV del espectro para el Brij 56® es la siguiente:

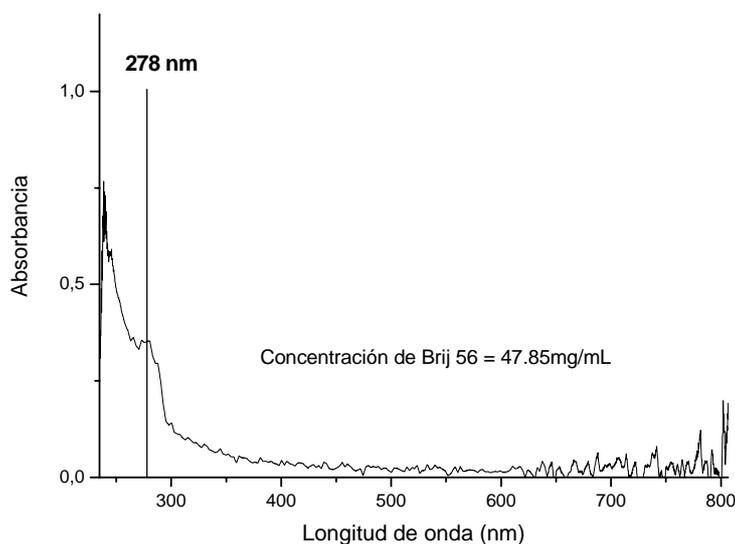


Gráfico 5.3.1. Espectro del Brij 56® en mezcla de agua /Isopropanol.

La señal de la Ivermectina en la misma mezcla de agua /Isopropanol es la siguiente:

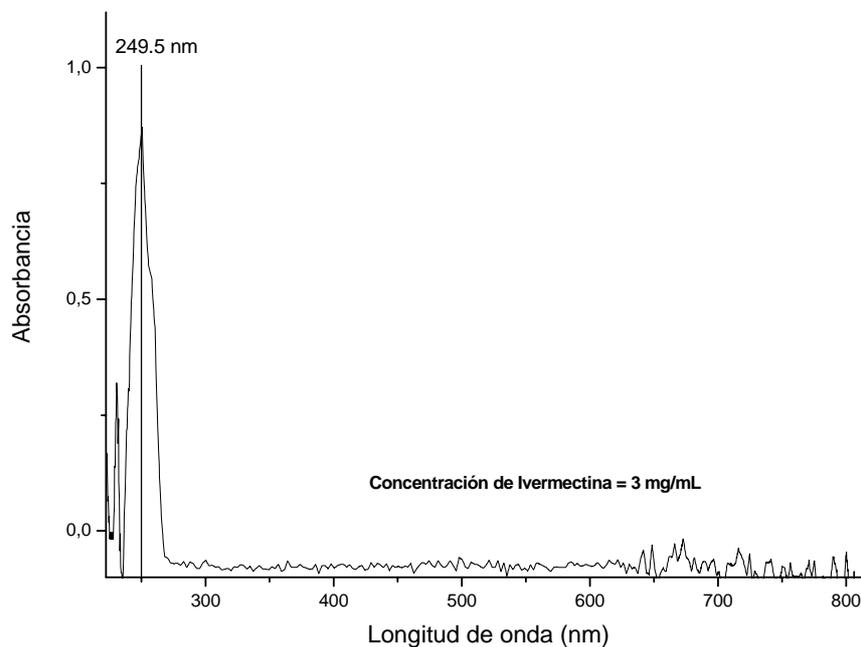


Gráfico 5.3.2. Espectro de la Ivermectina en mezcla agua/ Isopropanol.

A grandes rasgos, las señales de la Ivermectina y el Brij®56 no se enciman después de 280 nm, por lo que el tensoactivo podría cuantificarse después de 280 nm. Sin embargo, cuando se trató de cuantificar el Brij®56 eliminado en cada uno de los sobrenadantes, se encontró otra señal, la cual no pertenecía ni al tensoactivo ni a la Ivermectina, sino a la PCL.

A continuación se muestra el espectro de la PCL, la cual se disolvió a lo largo de la homogeneización y de los centrifugados. El tratamiento para esta muestra fue el mismo que se le dio a las nanopartículas, sólo que se trabajó únicamente con PCL.

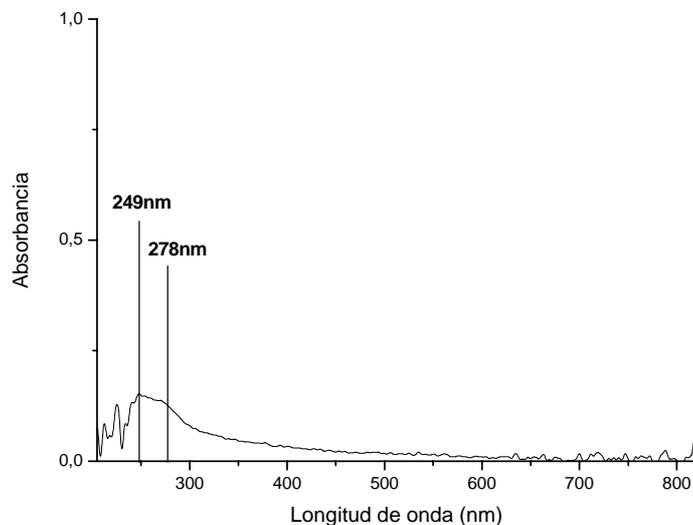


Gráfico 5.3.3. Espectro de la PCL en mezcla agua/Isopropanol.

Debido a que las señales del Brij®56 y de la Ivermectina quedan escondidos por la señal de la PCL, la cuantificación del tensoactivo mediante esta técnica es imposible. Para solucionar dicho problema, se utilizó el análisis termoquímico, en este caso, la calorimetría diferencial de barrido. Con esta técnica se puede saber, de manera cualitativa, si existe mayor contenido de tensoactivo en las partículas resultantes del primer lavado y menor cantidad en las partículas resultantes del segundo lavado.

Para asegurarnos de que las señales del tensoactivo, la Ivermectina y la PCL no se confunden tal y como ocurre por espectroscopia UV, se obtuvieron los termogramas de cada componente.

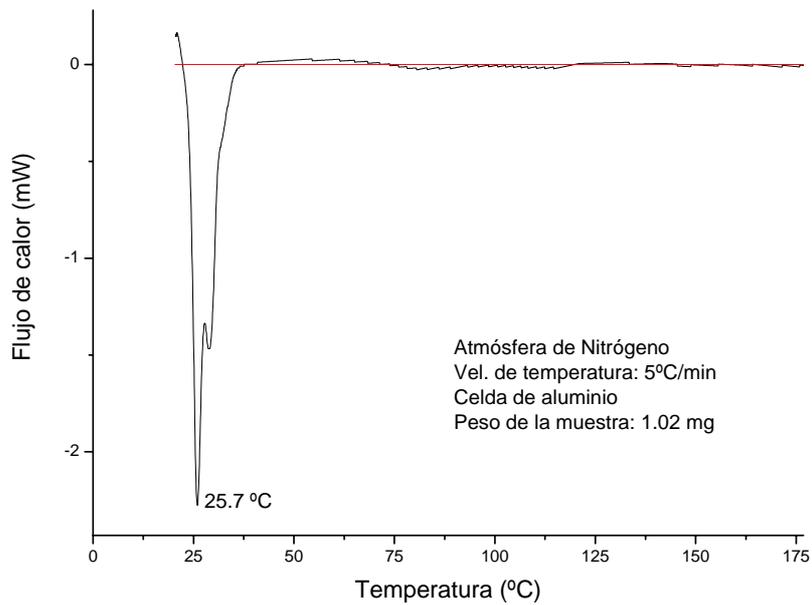


Gráfico 5.3.4. Termograma del Brij 56®.

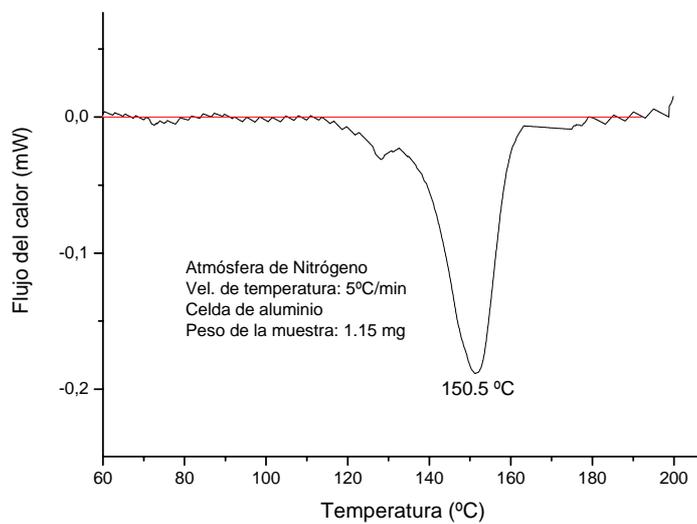


Gráfico 5.3.5. Termograma de la Ivermectina.

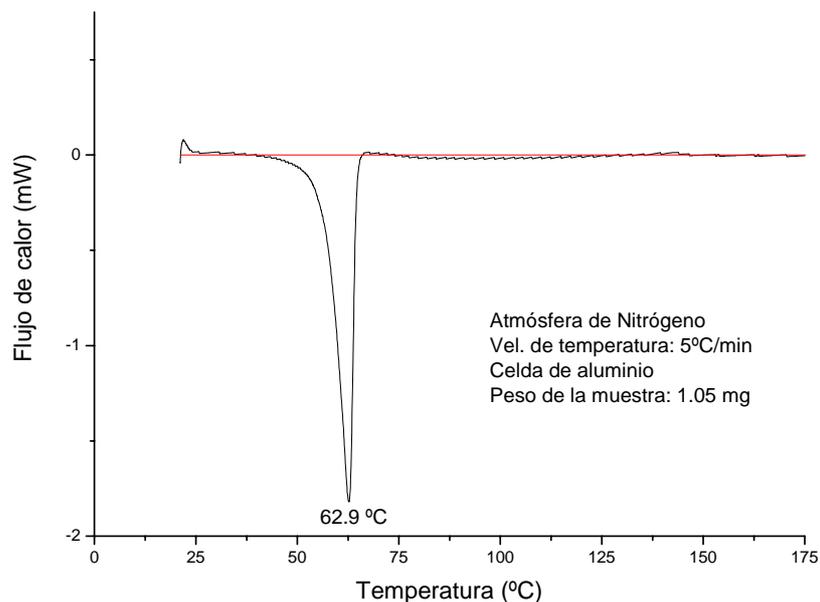


Gráfico 5.3.6. Termograma de la poli- ϵ -caprolactona (PCL).

Como se logra observar en los gráficos 5.3.4, 5.3.5 y 5.3.6 las señales; que indican el punto de fusión de cada componente, no se enciman ni se confunden, por lo cual resulta una buena opción para determinar de manera cualitativa qué tipo de partículas tienen mayor cantidad de tensoactivo.

En este estudio se obtuvieron los termogramas de tres muestras de partículas. La primera muestra corresponde a las partículas obtenidas antes de los lavados (control, gráfico 5.3.7). La segunda muestra es de las partículas obtenidas después del primer lavado (gráfico 5.3.8), y la última muestra corresponde a las partículas obtenidas después del segundo lavado (gráfico 5.3.9). Los termogramas se muestran a continuación:

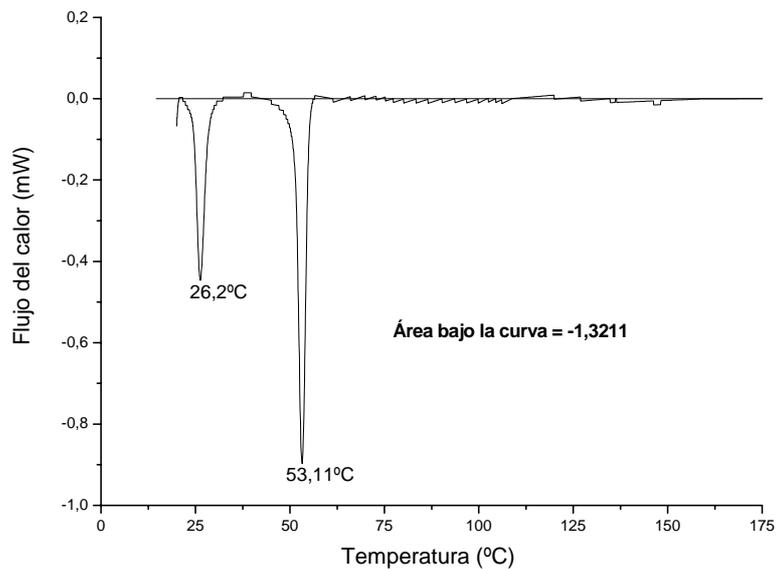


Gráfico 5.3.7. Termograma de las partículas antes de ser lavadas (muestra control).

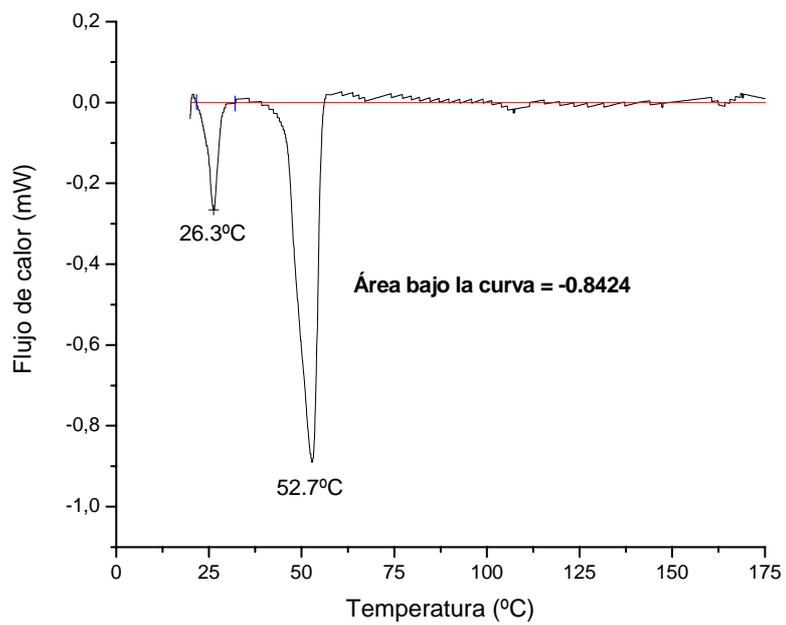


Gráfico 5.3.8. Termograma de las partículas obtenidas después del primer lavado.

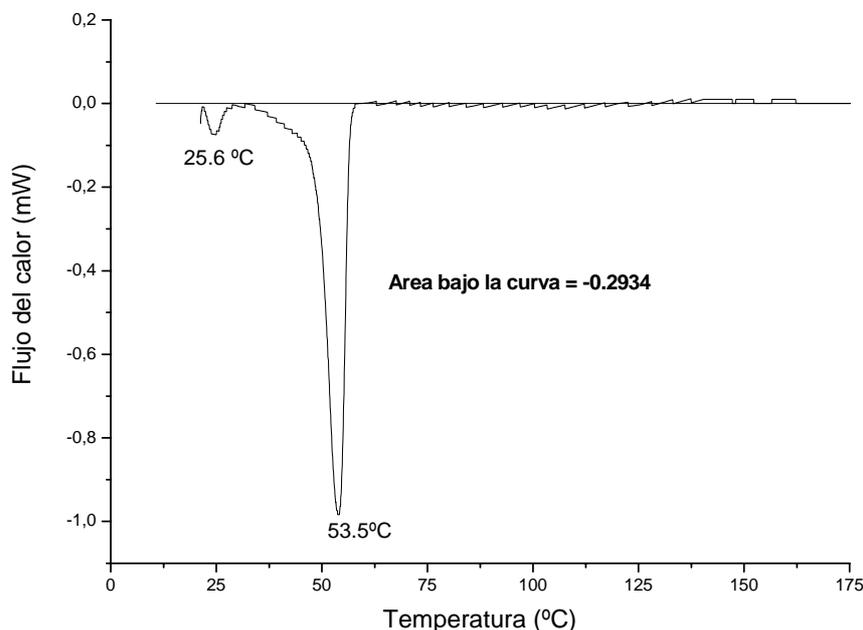


Gráfico 5.3.9. Termograma de las partículas obtenidas después del segundo lavado.

El área bajo la curva (ABC) nos indica el ΔH de fusión, el cual está íntimamente relacionado con la cantidad de sustancia que se colocó en la celda a la hora del análisis térmico. Las unidades en las cuales se expresa el ΔH de fusión es J/mol. El peso de la muestra para todos los casos fue $1\text{mg} \pm 0.01$. La diferencia en cada muestra es la cantidad de Brij®56 que hay, y esta va a diferir conforme a los lavados. Si aceptamos como cierto que en cada lavado se eliminará una fracción del tensoactivo, la cantidad del mismo tendría que ir disminuyendo, hasta ser casi imperceptible después del segundo lavado.

En la primera muestra se espera tener la máxima cantidad de Brij®56 respecto a las otras muestras, por lo tanto, la cantidad de energía utilizada para fundir al tensoactivo deberá ser la mayor. En este caso la ΔH fue de 1.3211 J/mol. Como la segunda muestra corresponde a las nanopartículas lavadas una vez, la cantidad de tensoactivo debería ser menor que en la primera muestra (nanopartículas sin lavar), y esto se ve reflejado en la cantidad de energía gastada para fundir al tensoactivo en cuestión, ya que el ΔH es de 0.8424 J/mol, lo que indica que se gastó menos energía porque hay menos Brij®56.

Como ya se vio, la cantidad de tensoactivo fue menor, y por lo tanto, se espera lo mismo para la muestra 3. En el caso de la muestra 3, el ΔH es de 0.2934 J/mol, lo cual indica que la energía gastada para fundir al tensoactivo fue mucho menor, y esto es lógico, pues las nanopartículas de la muestra 3 corresponden a las obtenidas después del segundo lavado. Con estos resultados podemos decir que en cada uno de los lavados se fue eliminando una cantidad considerable de tensoactivo, pues si tomamos en cuenta que la energía necesaria para fundir el tensoactivo presente en las partículas iniciales fue 1.3211 J/mol, y que la energía necesaria para fundir el tensoactivo en las partículas lavadas una vez fue 0.8424 J/mol, se está eliminando aproximadamente un 36.2% del tensoactivo total en el primer lavado. Por otro lado, si la energía requerida para fundir el tensoactivo presente en las partículas finales fue 0.2934 J/mol, se está eliminando alrededor del 41.6%. Sumando ambos porcentajes tenemos que en total se eliminó un 77.8% de tensoactivo, y que posiblemente el 22.2% restante no se haya eliminado porque no se encuentra en la superficie de la partícula, si no entre la matriz polimérica.

Es importante mencionar que con estos resultados no sólo podemos conocer qué cantidad de tensoactivo se logró eliminar en cada uno de los lavados, también podemos saber como cambian cada uno de los componentes cuando ya se encuentran incorporados formando la nanopartícula.

Existe una gran posibilidad de que la energía aplicada a cada uno de los componentes provoque un cambio en ellos, y esto también se ve reflejado en los termogramas, pues los picos observados en los termogramas de cada componente (gráficos 5.3.4, 5.3.5 y 5.3.6) se ven ligeramente desplazados cuando la muestra se refiere a las nanopartículas. Además, el pico de la Ivermectina no aparece en ninguna de las muestras de nanopartículas (pico a 150.5°C), lo cual indica que la Ivermectina al estar disuelta en la PCL, se encuentra en estado molecular y no se logra detectar en un análisis térmico.

El estudio de toxicidad del Brij 56® es una parte importante en este trabajo, ya que el proceso fagocítico de las nanopartículas será evaluado con macrófagos murinos, los cuales son sensibles a cualquier tipo de tensoactivo, ya que puede provocar lisis de la célula.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el experimento anterior ya se mencionó que no se sabe con seguridad donde queda el tensoactivo que no se logró eliminar con los lavados, por lo cual se evaluó la toxicidad del tensoactivo en las células.

La primera evaluación se realizó con el tensoactivo totalmente disuelto, en concentraciones a las cuales se encuentra presente en las partículas.

El Brij 56® se disolvió en SSI. Los resultados fueron los siguientes:

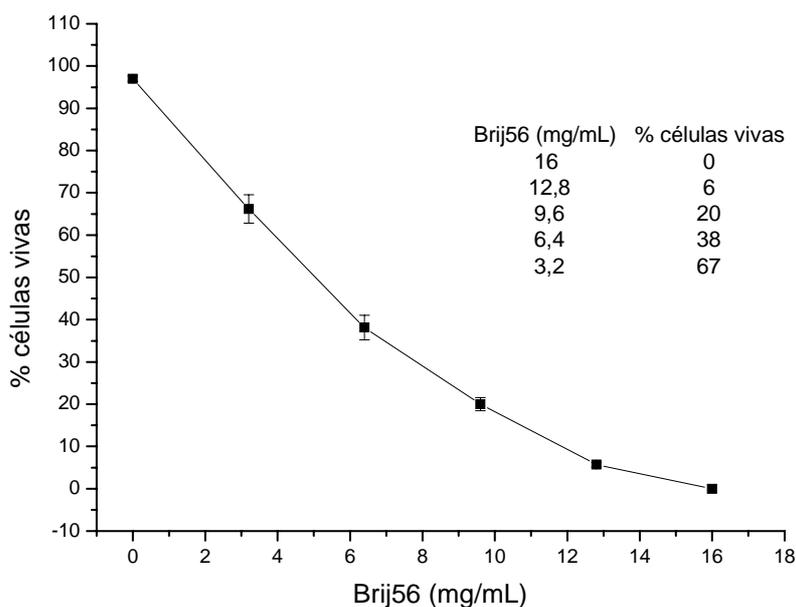


Gráfico 5.3.10. Curva de toxicidad del Brij56® en macrófagos murinos J774.

En la curva de toxicidad del Brij56® se observa que aún a concentraciones muy bajas, el tensoactivo es altamente tóxico para las células. Sin embargo, en la última dilución (3.2 mg/mL) el tensoactivo ya no es tan dañino, pues el porcentaje de células vivas es mayor que el 50%, por lo que se supone que si se trabaja máximo a una concentración de 3 mg/mL de Brij 56® quedarán suficientes células para cuantificar la fagocitosis de las partículas. Tomando en cuenta este dato, se preparó una suspensión de nanopartículas obtenidas en el segundo lavado al 10%, se realizaron las diluciones pertinentes y se realizó una curva de toxicidad. Los resultados fueron los siguientes:

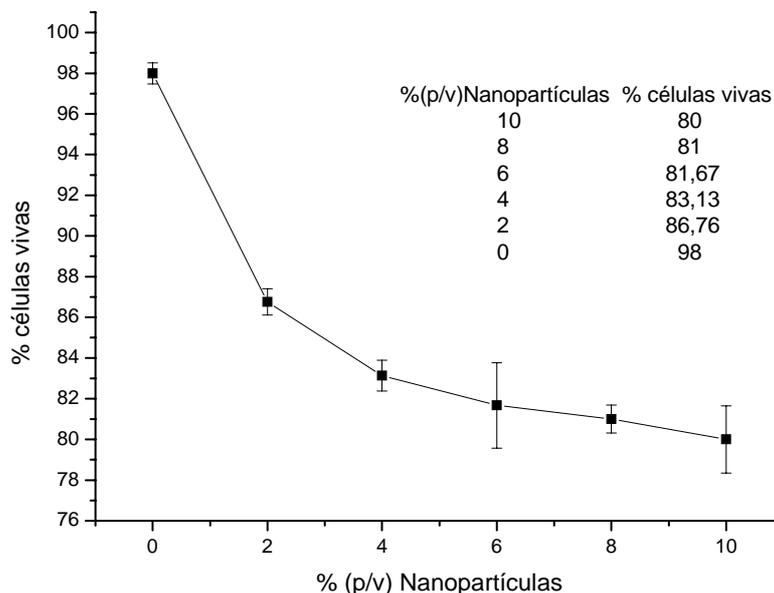


Gráfico 5.3.11. Curva de toxicidad de las nanopartículas en macrófagos murinos J774.

Es evidente que las células mueren en presencia de bajas concentraciones de tensoactivo, sobre todo cuando éste se encuentra disuelto (gráfico 5.3.10), pero también se observa que cuando se trabaja con las nanopartículas, a pesar de trabajar con la concentración de Brij®56 que mostró ser letal cuando está disuelto, las células no mueren en tan alto porcentaje (gráfico 5.3.11). Por lo tanto, cuando el Brij®56 se encuentra disuelto, resulta ser muy tóxico para los macrófagos J774, pero al encontrarse incorporado en las partículas su toxicidad disminuye, pues aún estando en contacto con las células, la mayoría de estas sobrevivieron. Con estos resultados, y los obtenidos en el análisis térmico, se puede considerar que la centrifugación es un buen método para eliminar el exceso de tensoactivo en las partículas, además de ser un proceso rápido.

4. ACTIVACIÓN DE COMPLEMENTO Y PROCESO FAGOCÍTICO

La activación del complemento fue evaluada mediante la capacidad lítica del suero de cobayo expuesto a las nanopartículas cubiertas y no cubiertas con PEG. Los eritrocitos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

utilizados fueron sensibilizados con TNBS, y la lisis se cuantificó mediante espectrofotometría UV.

La curva de calibración realizada en este estudio permitió encontrar la concentración adecuada de suero para lisar el 50% de los eritrocitos.

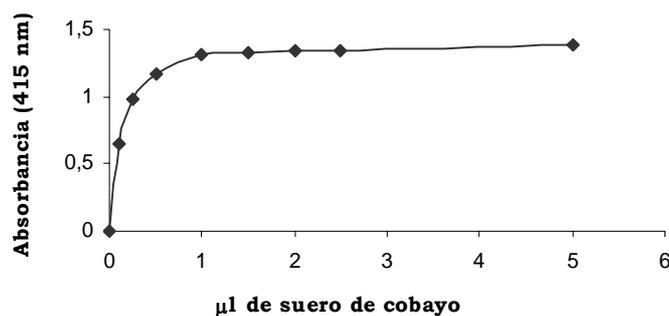


Gráfico 5.4.1. Curva de calibración para activación de complemento.

En el gráfico 5.4.1 se puede observar el comportamiento que muestra el suero de cobayo en la lisis de los eritrocitos. A 415 nm se puede cuantificar la hemoglobina liberada por los eritrocitos al momento de ser lisados, por lo que el aumento de la absorbancia se puede relacionar con la lisis de los eritrocitos. Por lo tanto, a mayor cantidad de suero, mayor es la lisis de los eritrocitos.

Para conocer exactamente la cantidad de suero que se necesita para lisar el 50% de los eritrocitos, se aplicó la ecuación de Von Krogh[121].

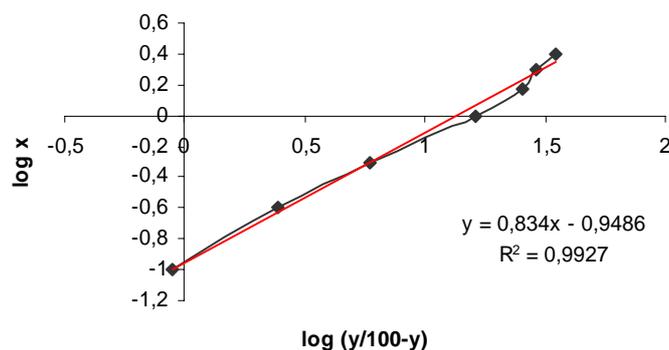


Gráfico 5.4.2. Curva de calibración para activación de complemento aplicando la ecuación de Von Krogh.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el gráfico 5.4.2 se observa como la curva tomó una forma lineal después de aplicar los logaritmos correspondientes a la ecuación de Von Krogh:

$x = K[y/(100-y)]^{1/n}$, donde:

x = cantidad de suero adicionado (μL)

y = hemólisis (en porcentaje)

Si se grafica el $\log x$ contra $\log [y/(100-y)]$, y se obtiene la ecuación de la recta; la ordenada al origen será el valor en logaritmo de la cantidad de suero necesaria para lisar el 50% de los eritrocitos. Por lo tanto, la cantidad de suero necesario para lisar el 50% de los eritrocitos es 0.1125 μL .

Con esta cantidad de suero se trabajaron las muestras de nanopartículas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.4.1.

Tabla 5.4.1. Datos obtenidos en el estudio de activación de complemento.

Muestra	Absorbancia (415nm)	Eritrocitos lisados(%)
Control suero	0.527	50
Control partículas	0.092	-
Partículas sin PEG	0.467	44.3
Partículas con PEG(500mg/L)	0.464	44.0
Partículas con PEG(1000mg/L)	0.506	48.0
Partículas con PEG(1500mg/L)	0.646	61.3
Partículas con PEG(2000mg/L)	0.684	64.9

Cuando las partículas provocan una fuerte activación del complemento, los eritrocitos no se lisan en gran porcentaje, ya que las proteínas del complemento son fuertemente atraídas por la superficie de la partícula, y al no existir tantas proteínas libres, éstas ya no causan lisis de los eritrocitos[43,97]. Debido a esto, las partículas sin PEG son las que más proteínas del complemento atraen, y por lo tanto, son las muestras que menos hemólisis deberían de mostrar, y por el contrario, la lisis de los eritrocitos debería de aumentar al utilizar partículas recubiertas con PEG, sobre todo aquellas que contienen grandes concentraciones. Si se observa el gráfico 5.4.3 podrá notarse que el porcentaje de hemólisis va aumentando conforme aumenta la concentración de PEG 6000, por lo que se puede suponer que las partículas sin PEG comparadas con las partículas con PEG; en cualquier concentración, si

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

tienen una mayor afinidad por las proteínas del complemento[43,94,97]. Sin embargo, las muestras trabajadas con 1500 y 2000mg/L de PEG muestran una hemólisis mayor al 50%, y esto no es lógico, pues en cada muestra se agregó la cantidad de suero de cobayo necesario para lisar el 50% de los eritrocitos y no más. Por lo tanto, es evidente que en el sistema existe algo que esta lisando a los eritrocitos.

Por los resultados observados, tal parece que la causa del exceso de lisis de los eritrocitos es las grandes cantidades de PEG 6000 que se están utilizando, pues el problema sólo se observa con las últimas dos concentraciones de PEG evaluadas. Puede ser que el PEG, que también se puede utilizar como tensoactivo, sea dañino a las concentraciones de 1500 y 2000mg/L, y que se tenga que trabajar a menor concentración.

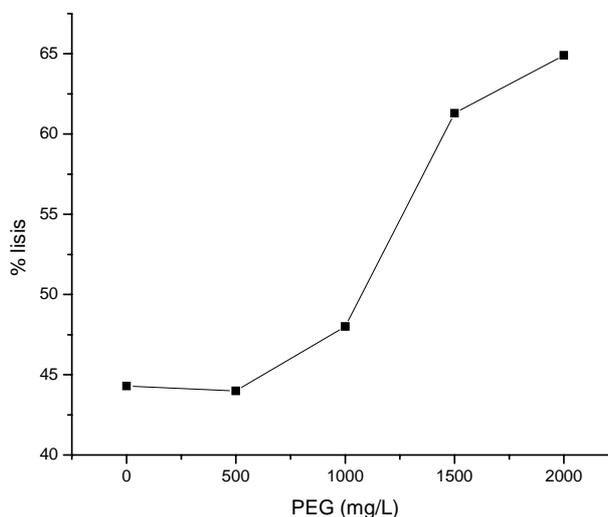


Gráfico 5.4.3. Porcentaje de lisis provocado por los diferentes tipos de nanopartículas evaluadas.

En este gráfico se puede observar que al utilizar 500mg/L de PEG las nanopartículas no parecen tener un buen recubrimiento, pues el porcentaje de hemólisis de estas partículas es similar al obtenido con las partículas sin PEG. También es importante hacer notar que el porcentaje de hemólisis provocado por las partículas sin PEG no es tan pequeño como se esperaba, pues casi se acerca al 50%, lo que indica que estas partículas tampoco tienen mucha afinidad por las proteínas del complemento, aunque es evidente que tienen más afinidad que las partículas que se encuentran recubiertas con PEG.

Los resultados obtenidos en los estudios de activación del complemento dan paso a suponer que el comportamiento de las partículas en los estudios de fagocitosis será similar que en el observado anteriormente. Con todo y sus excepciones, las partículas sin PEG y con PEG, en cualquiera de sus variedades, han mostrado ser diferentes, y los estudios de fagocitosis serán los que concluyan con esta caracterización.

La fagocitosis de estos sistemas coloidales se realizó con macrófagos murinos J774, los cuales han mostrado ser muy eficientes para estudios de esta índole[39,41,48,92,94,112,113,122]. La cuantificación de la fagocitosis se llevo a cabo mediante citometría de flujo[118,120,123], y para poder realizar la cuantificación, las nanopartículas se marcaron con fluoresceína sódica (véase la sección 2.3 de la metodología). Los resultados obtenidos en el estudio de la fagocitosis se resumen en la tabla 5.4.2. Los gráficos obtenidos se muestran a continuación:

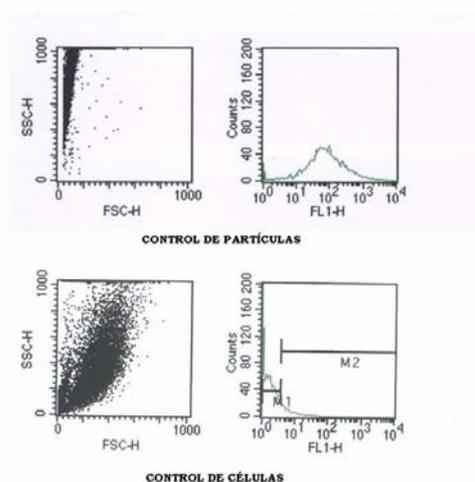


Fig. 5.4.1. Gráficos de las muestras control de las partículas y de las células.

En la figura 5.4.1, las gráficas que se encuentran a la izquierda muestran la población de las partículas y la población de las células. Los parámetros FSC-H y SSC-H indican el tamaño y la densidad/granularidad respectivamente.

Como se puede observar en las gráficas; las nanopartículas resultan ser más pequeñas y más densas que las células, por lo tanto, las nanopartículas pueden ser fácilmente fagocitadas por los macrófagos, pues el tamaño no será un impedimento.

En las gráficas situadas a la derecha se tiene el parámetro FL1-H, que indica la fluorescencia de la partícula o célula. Como se puede observar en la gráfica que corresponde a las células,

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

éstas no tienen una fluorescencia muy grande, pues el pico máximo no alcanza siquiera las 10 unidades (10^1 FL1-H). En cambio, las nanopartículas muestran un pico entre 10^2 y 10^3 unidades, lo cual indica que su fluorescencia es mayor.

Con estos antecedentes, las células con las partículas fagocitadas se esperan observar en el intervalo de 10^2 y 10^3 en el eje FL1-H.

Los resultados de la fagocitosis se muestran en la figura 5.4.2.

Tabla 5.4.2. Porcentaje de células fluorescentes y no fluorescentes.

Muestra	Región M1	Región M2
Partículas sin PEG	83.1 %	17.1 %
Partículas con PEG(500mg/L)	83.4 %	16.9 %
Partículas con PEG(1000mg/L)	86.0 %	14.2 %
Partículas con PEG(1500mg/L)	85.1 %	15.1 %
Partículas con PEG(2000mg/L)	84.7 %	15.6 %

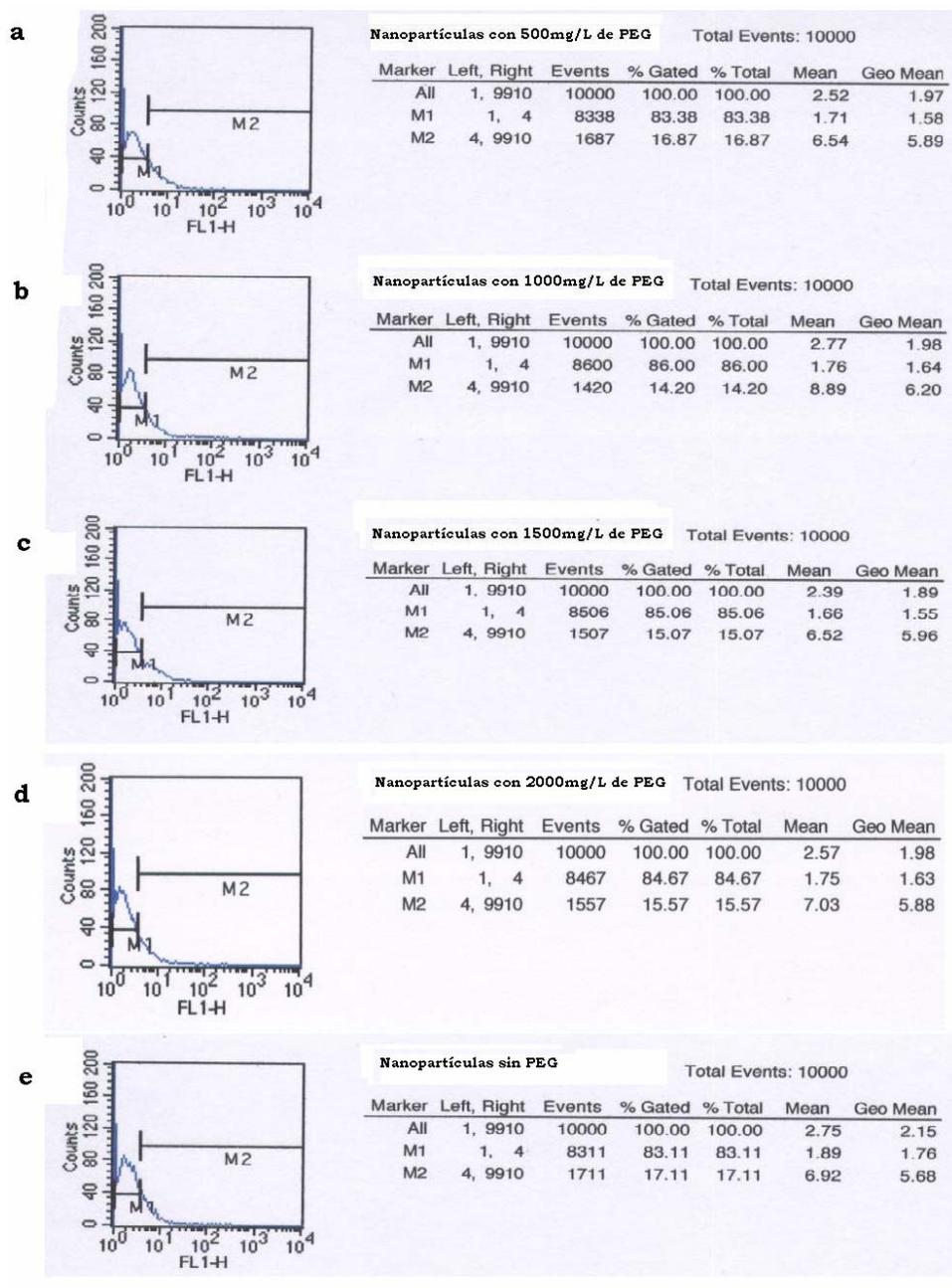


Fig. 5.4.2. Fagocitosis de las nanopartículas obtenidas a diferentes concentraciones de PEG 6000.

Los histogramas de la figura 5.4.2 muestran la intensidad de la fluorescencia en las células, la cual es detectada por la presencia de las nanopartículas fluorescentes en el interior de la misma. Cada histograma se dividió en dos regiones: M1 y M2. En la región M1 se muestra la población de células sin fluorescencia, o sea, las células que no fagocitaron

nanopartículas. En la región M2 se muestra la población de células fluorescentes, o sea, las células que si fagocitaron nanopartículas fluorescentes.

Los resultados obtenidos indican que la fagocitosis en todos los casos fue muy pobre, casi nula, pues el porcentaje de células fluorescentes no pasa el 18%. Si consideramos que uno de los objetivos de este trabajo experimental es modificar la superficie de la nanopartícula con PEG 6000 para que no sea fagocitada, pues tal parece que el objetivo se cumplió. Sin embargo, nuestro control; que es la muestra donde las partículas no tienen PEG se comportó igual que las otras muestras, y lo que se esperaba observar era un porcentaje mucho mayor en la región M2, ya que un porcentaje grande en esta región indica que la mayoría de las células están fluorescentes a causa de las nanopartículas fluorescentes en su interior.

Es muy claro que la diferencia en los porcentajes de la región M2 no es significativa, por tal razón no se podría asegurar que la presencia del PEG en las nanopartículas influye en la poca fagocitosis de las mismas. Sin embargo, si se puede decir que las partículas obtenidas en este trabajo experimental no activan a los macrófagos. Tal vez el hecho de que las partículas no se opsonizaron antes de ponerlas en contacto con los macrófagos, tuvo cierta influencia en los resultados obtenidos, o posiblemente la carga en superficie de la partícula impidió que los macrófagos se activaran.

No todos los estudios de fagocitosis de SC se realizan con previa opsonización de las partículas, pues éstas son capaces de activar la respuesta inmune por parte de los macrófagos, sobre todo cuando se dejan en contacto por varias horas[92]. Posiblemente, en este caso en particular, sea necesario que las nanopartículas estén en contacto con proteínas del complemento (opsonizarlas), para que éstas, al estar en contacto con los macrófagos, tengan la capacidad de desencadenar su actividad fagocítica de manera más rápida y que de esta forma se tengan resultados evidentes.

VI. CONCLUSIONES

- Para obtener una microemulsión mediante la técnica de microemulsión por fusión, utilizando como matriz polimérica a la PCL, se necesita una cantidad muy grande de mezcla tensoactivo/cotensoactivo (aproximadamente el 84% de la composición final).
- El lavado de las partículas mediante centrifugación permite eliminar cerca del 80% del tensoactivo inicial, sin embargo causa la aglomeración de las partículas.
- La adición de NaCl en bajas concentraciones (0.001% p/v) disminuye la aglomeración de las partículas por efecto de la centrifugación, ya que influye en la disminución del potencial zeta.
- Concentraciones mayores al 0.003% p/v de NaCl provoca que las partículas se aglomeren en el proceso de centrifugado.
- El tamaño de partícula se ve modificado por el tiempo de agitación con el Ultraturrax, favoreciéndose la obtención de partículas de 250 nm aproximadamente cuando se agita por más de 3 minutos.
- El tiempo de centrifugado no afecta al tamaño de la partícula, pero si favorece el rendimiento de partículas recuperadas.
- El proceso de sonicado influye en el tamaño de las partículas, ya que las vibraciones emitidas destruyen los agregados formados e impiden la formación de nuevos agregados.
- De las diferentes concentraciones de PEG 6000 que se utilizaron, la de 1500mg/L provoca una mayor modificación de las características de las partículas.
- Las partículas recubiertas con PEG 6000 activan complemento en porcentajes menores que las partículas sin recubrimiento.
- El Brij®56 es más tóxico para los macrófagos cuando se encuentra soluble que cuando está incorporado en la nanopartícula.
- El PEG 6000 a concentraciones de 1500 y 2000mg/L es tóxico para los eritrocitos en los ensayos de activación de complemento.
- Al tener un delta de carga negativa (potencial zeta) en las nanopartículas obtenidas la adsorción de proteínas del complemento en su superficie es menor.
- La adsorción de proteínas del complemento es un factor importante en la fagocitosis de las nanopartículas por los macrófagos.

- Las partículas sin recubrir se comportan igual que las recubiertas en los estudios de fagocitosis, indicando que ninguna de las partículas obtenidas activan la función fagocítica de los macrófagos, por lo menos en ausencia de opsoninas.

**VII. APÉNDICE I
(Información
complementaria)**

APÉNDICE I (Información complementaria)

Tabla 2.2.1. Eventos térmicos comunes que pueden ser detectados usando técnicas calorimétricas.

Evento	Ejemplo
<i>Endotérmico</i>	
Fusión	Fusión de fármacos y evaluación de pureza
Vaporización	Evaporación de excipientes líquidos o semisólidos
Sublimación	Eliminación de agua por liofilización
Desorción	Secado de granulados mojados
Desolvatación	Eliminación de agua de cristales hidratados
<i>Exotérmicos</i>	
Cristalización	Evaporación de disolventes inducido por cristalización de excipientes amorfos
Precipitación	Formación de la sal del fármaco
Adsorción	Evaporación del disolvente por adsorción en el fármaco
<i>Otros</i>	
Descomposición	Descomposición térmica del fármaco
Disolución	Disolución del fármaco en un medio de disolución
Complejación	Formación de complejos entre fármacos y ciclodextrinas

Tabla 2.3.1. Propiedades de diversos polietilenglicoles[124].

Tipo de PEG	Peso molecular	Estado físico	Solubilidad en agua	Densidad a 25 °C (g/mL)	Punto de fusión	Toxicología (vía oral LD50)
400	380-420	líquido	soluble	1.128	4-8 °C	30.2gm/kg
600	570 - 630	Líquido viscoso	soluble	1.126	20-25°C	30gm/kg
3350	3000 - 3700	sólido	soluble	1.2	54°C	50gm/kg
8000	7000-9000	sólido	Soluble	1.1-1.3	59-63°C	50gm/kg
6000	5000-7000	Sólido	Soluble	1.2	56-63°C	> 50gm/kg

APÉNDICE I (Información complementaria)

Tabla 2.3.2. Propiedades de los Pluronic® de BASF[125].

Pluronic	Forma	Peso mol.	Gravedad específica ^{25°C}	Viscosidad (cps)	Punto de eb. ó fusión	Tensión superficial	HLB	Solubilidad en agua ^{25°C}
10R5	Líquido	1950	1,058	440 a 25°C	69°C	50 dinas/cm	12-18	>10%
17R4	Líquido	2650	1,048	600 a 25°C	46°C	44 dinas/cm	7-12	>10%
25R2	Líquido	3100	1,028	680 a 25°C	29°C	38 dinas/cm	1-7	>1%
25R4	Líquido	3600	1,048	1110 a 25°C	40°C	41 dinas/cm	7-12	>10%
31R1	Líquido	3250	1,018	660 a 25°C	25°C	34 dinas/cm	1-7	>1%
F38	Sólido	4700	1,070	260 a 77°C	>100°C	52 dinas/cm	>24	>10%
L10	Líquido	3200	1,040	660 a 25°C	32°C	41 dinas/cm	12-18	>10%
L110	Líquido	3800	1,020	800 a 25°C	15°C	insoluble	1-7	Insoluble
L121	Líquido	4400	1,010	1200 a 25°C	14°C	33 dinas/cm	1-7	insoluble
F108	Sólido	14600	1,060	2800 a 77°C	>100°C	41 dinas/cm	>24	>10%
F68	Sólido	8400	1,060	1000 a 77°C	>100°C	50 dinas/cm	>24	>10%
F127	Sólido	12600	1,050	3100 a 77°C	>100°C	41 dinas/cm	18-23	>10%
F77	Sólido	6600	1,040	480 a 77°C	>100°C	47 dinas/cm	>24	>10%
F87	Sólido	7700	1,040	700 a 77°C	>100°C	44 dinas/cm	>24	>10%
F88	Sólido	11400	1,060	2300 a 77°C	>100°C	48 dinas/cm	>24	>10%
F98	Sólido	13000	1,060	2700 a 77°C	>100°C	43 dinas/cm	>24	>10%
L44NF	Líquido	2200	1,050	440 a 25°C	65°C	45 dinas/cm	12-18	>10%

Tabla 2.3.3. Propiedades de los Tetronic® de BASF[125].

Tetronic	Forma	Peso Mol.	Gravedad específica ^{25°C}	Viscosidad (cps)	Punto de fusión	Tensión superficial	HLB	Solubilidad en agua ^{25°C}
1107	sólido	15000	1.04	1100 a 77°C	51°C	43 dinas/cm	18-23	> 10%
901	líquido	4700	1.02	700 a 25°C	***	36 dinas/cm	1-7	Insoluble
1301	líquido	6800	1.02	1000 a 25°C	***	33 dinas/cm	1-7	Insoluble
1307	sólido	18000	1.05	2700 a 77°C	54°C	44 dinas/cm	>24	> 10%
150R1	Líquido	8000	1.01	1840 a 25°C	***	Insoluble	1-7	Insoluble
304	líquido	1650	1.06	450 a 25°C	***	53 dinas/cm	12-18	> 10%
701	líquido	3600	1.02	600 a 25°C	***	36 dinas/cm	1-7	Insoluble
904	semisólido	6700	1.04	320 a 60°C	***	35 dinas/cm	12-18	> 10%
908	sólido	25000	1.06	8200 a 77°C	58°C	46 dinas/cm	> 24	> 10%
90R4	líquido	6900	1.05	3870 a 25°C	***	43 dinas/cm	1-7	> 10%

APÉNDICE I (Información complementaria)

Tabla 2.3.4. Estudios de opsonización de nanopartículas poliméricas con PEG adsorbido.

Nanopartícula	Contenido de la superficie
Poly(butil 2-cianoacrilato) (PBCA)	Poloxámero-338 Poloxamina-908
Poli (ε-caprolactona) (PCL)	PEG (6000 y 20000) Poloxámero-407
Poli(β-hidroxibutirato) (PHB)	Poloxámero (338 y 407) Poloxamina-908
Poli(ácido láctico) (PLA)	PEG (6,20kDa) Poloxámero-188 Poloxámero-338 Poloxámero-407 Poloxamina-908
Poli (ácido láctico glicólico) (PLGA)	PEG (2000 o 5000)-b-PLA Poloxámero (184, 188 y 388) Poloxámero-407 Poloxamina-904 Poloxamina-908
Poli(ácido láctico):poli(acetato etilen vinílico) (PLA:EVA) 50:50	Poloxámero-407
Poli(metil metacrilato) (PMMA)	Poloxámero-184 Poloxámero-188 Poloxámero-338 Poloxámero-407 Poloxamina-904 Poloxamina.908 Poloxamina-1508 Polisorbato (20, 60, 80) (Tween) Polixietileno (23) lauril eter (Brij 35)
Poliestireno (PS)	PEG (2000) PEG(22000) PEG(550)-b-BSA (albúmina de suero bovino) PEG (5000)-b-BSA (albúmina de suero bovino) PEG (5000)-b-IgG (rata) PEG (2000 o 5000)-b-PLA Poloxámero-184 Poloxámero-188 Poloxámero-235

APÉNDICE I (Información complementaria)

	Poloxámero-237 Poloxámero-238 Poloxámero-338 Poloxámero (401 y 402) Poloxámero-407 Poloxamina-904 Poloxamina-908 Poloxamina-1508
--	---

Tabla 2.3.5. Estudios de opsonización de nanopartículas poliméricas con PEG y PEG-polímeros unido covalentemente o anclado en la superficie.

Nanopartículas	Contenido de la superficie
Albúmina (BSA)	PEG (1750)
Gelatina (tipo-B)	PEG(5000)
Polialquilcianoacrilato (PACA)	PEG (2000)-b-polihexa decilcianoacrilato
Poli(ϵ -caprolactona) (PCL)	PEG (5000)-b-PCL PEG (12000, 20000)-b-PCL Poloxámero-188 Poloxámero-338 Poloxámero (188, 237, 238, 407)-b-PCL
Poli(isobutil 2-cianoacrilato) (PIBCA)	PEG (4500)-PIBCA
Poli(ácido láctico) (PLA)	PEG (2000)-b-PLA PEG (5000)-b-PLA PEG (10000 o 15000)-b-PLA PEG (20000)-b-PLA PLA-b-PEG (6000 o 20000)-b-PLA Poloxámero-188
Poli (ácido láctico glicólico) (PLGA)	PEG (2000 o 5000)-b-PLA PEG (5000)-b-PLGA PEG (12000 o 20000)-b-PLGA Poloxámero-407 Poloxamina-904 Poloxamina-908
Poliestireno (PS)	PEG(1500)-PS PEG(3400 o 5000)-PS PEG (2000)-PS

APÉNDICE I (Información complementaria)

	PS-NH-CH ₂ -(CHOH) ₂ -PEG (línea 250, 500, 1000, 1500, 4000, 19000)
	PS-NH-CH ₂ -(CHOH) ₂ -PEG (ramas de 1000, 1700 y 6000)

Tabla 3.4.1. Padecimientos más frecuentes causados por parásitos.

Ganado	Ovejas	Humanos
Haemonchus	Trichuris	<i>Onchocerca volvulus</i>
Trichostrongylus	Haemonchus	<i>Wucheraria bancrofti</i>
Oesophagastomum	Trichostrongylus	<i>Ascaris lumbricoides</i>
Ostertagia	Oesophagastomum	Strongyloides
Cooperia	Ostertagia	Enterboius
Strongyloides	Cooperia	Strongyloides
Toxocara	Strongyloides	Enterboius
Dictyocaulus	Dictyocaulus	Trichuris
cattle grubs	itch mites	
lice	nasal bots	
mites		
ticks		
screwworm larvae		
Cerdos	Caballos	Perros
Ascaris	Parascaris	<i>Dirofilaria immitis</i>
Trichuris	Strongylus	Toxocara
Strongyloides	Dictyocaulus	Ancylostoma
Metastrongyloids	<i>Onchocerca</i>	Strongyloides
Stephanurus	<i>cervicalis</i>	Capillaria
	Bots	Trichuris
	sarcoptic mange	sarcoptic mange
		fleas

Tabla 4. Sistema Fagocítico Mononuclear.

Nombre	Localización predominante
Células “veladas”	Tejido linfoide
Células de Kupffer	Hígado
Células de Langerhans	Piel
Células Interdigitantes	Tejido linfoide
Células mesangiales	Riñón
Histiocitos	Tejido conectivo
Macrófagos	Tejido linfoide
Macrófagos alveolares	Pulmón
Macrófagos de la microglia	Tejido del sistema nervioso
Macrófagos peritoneales	Cavidad peritoneal
Osteoclastos	Tejido óseo
Células epitelioides y células gigantes	Reacciones inflamatorias crónicas

Tabla 4.1.1. Principales familias de moléculas de adhesión.

Familia	Miembros representativos	Localización
Integrinas $\beta 2$	LFA-1	LcT, NK, PMN, LcB-EBV
	Mac-1 o Mo-1	PMN, MN
	Gp 150/95	PMN, MN, Lc
“De las Igs”	ICAM-1,	Endotelios
	ICAM-2,	Endotelios
	VCAM-1	Endotelios
Selectinas	Selectina-E	Endotelios, plaquetas
	Selectina-P	Endotelios, plaquetas
	Selectina-L	Leucocitos

Ligandos

De las integrinas $\beta 2$: Adhesinas IgCAMs

De las IgCAMs: Integrinas $\beta 2$

De las selectinas:

Ac-5-Neu- $\alpha(2-3)$ -Gal- $\beta(1-3)$ -Fuc- $\alpha(1-4)$ NacGlu (sLe^a)

Ac-5-Neu-((2-3)-Gal-((1-4)-Fuc-((1-3)NacGlu (sLe^x)

Gal-((1-4)-Fuc-((1-3)-NacGlu (Le^x)

Algunos polisacáridos sulfatados (heparina)

Algunos polisacáridos fosforilados

Tabla 4.1.2. Factores del suero con actividad de opsonina.

IgG1, IgG2, IgG3

IgM en presencia de Ca²⁺ (sólo en el ratón)

C3b y C3bi

Globulinas (-1, (-2 y (-1

Proteína C-reactiva

Fibronectina

Colectinas (proteína enlazadora de manosa, MBP)

Proteína surfactante A, SP-A (en líquido pleural)

**VIII. APÉNDICE II
(Composición de las
soluciones)**

Medio DMEM

Medio DMEM complementado

Para 500 mL de medio:

- 5 mL de antibiótico (100x)
- 5 mL de antibiótico (100x)
- 5 mL de Glutamina (100x)
- 2,5 mL de aminoácidos no esenciales (100x)
- 2,5 mL de piruvato sódico (100x)
- 50 mL de suero fetal de bovino al 10%

Medio DGVB²⁺

Para 1000 mL de medio:

- 0,5 g de gelatina
- 0,46 g de barbital
- 25 g de dextrosa
- 4,38 g de NaCl
- 150 µL de CaCl₂ 1M
- 500 µL de MgCl₂ 1M

Indicaciones: pH de 7,5, esterilizar por filtración con membrana 0,22 µm, preferentemente cuando la solución se encuentre entre 40 y 45 °C.

Buffer de boratos (0,2M)

Para 500 mL de buffer:

- 6,184 g de ácido bórico
- 4,389 g de NaCl

Indicaciones: pH de 8,5. Utilizar agua desionizada.

Buffer de fosfatos (20x)

Para 1000 mL de buffer:

- 7,2 g de NaH₂PO₄ · H₂O

APÉNDICE II (Composición de las soluciones)

- 22 g de Na_2HPO_4 anhidro ó 55,418 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- 175 g de NaCl

Indicaciones: pH 7,5. Utilizar agua desionizada.

Solución diluyente para fijación de complemento (CFD)

Para 500 mL de solución 5x:

- 92,5 mg de barbital sódico
- 4,25 mg de NaCl
- 84,0 mg de MgCl_2
- 14,0 mg de CaCl_2

Indicaciones: pH 7,2. Utilizar agua desionizada.

Formaldehído para fijación de células

Para 100 mL de paraformaldehído (PFA):

- 1 g de PFA
- 100 mL de PBS

Calentar el PBS a 45 °C y agregar el PFA. Se puede agregar NaOH concentrado para terminar de disolver. Cuando se disuelva y enfríe ajustar el PH a 7,5 con HCl. Filtrar la solución con membrana de 0,45 μm . Guardar a 4 °C cubierto de la luz.

IX. BIBLIOGRAFÍA

-
- [1] **U. Edlund A, C. Albertsson.** Biodegradable Polymer Microspheres for Controlled Drug Delivery. *Adv in Polymer Sci* (2002) 157:68-105.
- [2] **Luz María Melgoza C. LCC, Sandra Rodriguez H., Mario Gonzalez T.** Sistemas matriciales de liberación controlada. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* (2002); 33 (4):58-67.
- [3] **Joseph Kost RL.** Responsive polymeric delivery systems. *Adv Drug Del Rev* (2001); 46:125-48.
- [4] **Barratt G.** Colloidal drug carriers: achievements and perspectives *Cell and Mol Life Sci.* (2003); 60:21-37.
- [5] **Maria Josefa Bernad B. AGR, Luz Maria Melgoza C., David Quintanar G.** Sistemas de liberación controlada de activos farmacéuticos. México: *Asociación Farmacéutica Mexicana A. C.*, 2003.
- [6] **Xiao Huang CSB.** On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of Cont Rel* (2001); 73:121-36.
- [7] **U.Edlund A-CA.** Degradable Polymer Microspheres for Controlled Drug Delivery. *Adv in pol Sci* (2002); 157:68-106.
- [8] **Neeraj Kumar MNVR, A.J. Domb.** Biodegradable block copolymers. *Adv Drug Del Rev* (2001); 53:23-44.
- [9] **Thorsteinn Loftsson DD.** Cyclodextrins and their pharmaceutical applications *International Journal of Phar* (2007); 329:1-11.
- [10] **Thorsteinn Loftsson MEBaMM.** Role of Cyclodextrins in Improving Oral Drug Delivery. *Am Journal Drug Del* (2004); 2(4):261-75.
- [11] **Rajeswari Challa AA, Javed Ali, R.K. Khar.** Cyclodextrins in Drug Delivery: an Updated Review. *AAPS Pharmaceutical Tec Sci* (2005); 6(2):329-53.
- [12] **Elizabeth R. Gillies JMJF.** Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discovery Today* (2005); 10(1):35-43.
- [13] **H. Namazi MA.** Dendrimers of citric acid and poly (ethylene glycol) as the new drug-delivery agents. *Biomaterials Sci* (2005); 26:1175-83.
- [14] **Paul A. McCarron SAO, Waleed M.Y.Marouf, Richard J.Buick, Brian Walker, Christopher J.Scott.** Antibody Conjugates and Therapeutics Strategies *Molecular Interventions* (2005); 5(6):368-79.

-
- [15] **Carmen Gutiérrez Millán MLSM**, Aránzazu Zarzuelo Castañeda JML. Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as carriers. *Journal of Cont Rel* (2004); 95:27-49.
- [16] **Boylan. JSyJC**. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. New York: Ed. *Marcel Dekker, Inc*, (1998).
- [17] **H. MR. Colloidal** Carriers for Controlled Drug Delivery and Targeting. Paris: WVS, (1991).
- [18] **Wolfgang Mehnert KM**. Solid lipid nanoparticles. Production, characterization and applications. *Adv Drug Del Rev* (2001); 47:165-96.
- [19] **Barratt G. CG, Couvreur P., Dubernet C., Fattal E., Grey R.** Polymeric micro and nanoparticles as drug carriers, (2002).
- [20] **M. Jayne Lawrence GDR**. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv Drug DelRev* (2000); 45:89-121.
- [21] **Kreuter J**. Colloidal Drug Delivery Systems New York: Marcel Dekker, Inc., (1994).
- [22] **Anna Kogan NG**. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Adv in Coll and Inter Sci* (2006); 123-126:369-85.
- [23] **Katie A. Edwards AJB**. Analysis of liposomes. *Talanta* (2006); 68:1432-41.
- [24] **Hu CR**. Proniosomes: novel drug carrier preparation. *Inter Journal of Phar* (1999); 185(5):23-35.
- [25] **Cevc G**. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Adv Drug Del Rev* (2004); 56:675-711.
- [26] **Wassim Abdelwahed GD, Hatem Fessi**. A pilot study of freeze drying of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly(vinyl alcohol): Formulation and process optimization. *Inter Journal of Phar* (2006); 309:178-88.
- [27] **M.L.Hans AML**. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State & Mat Sci* (2002); 6:319-27.
- [28] **Jugminder S. Chawla MMA**. Biodegradable poly(e-caprolactone) nanoparticles for tumor targeted delivery tamoxifen. *Inter Journal of Phar* (2002); 249:127-38.

-
- [29] **Ying Zhang R-xZ.** Synthesis and in vitro drug release behavior of amphiphilic triblock copolymer nanoparticles based on poly (ethylene glycol) and polycaprolactone. *Biomaterials* (2005); 26:6736-42.
- [30] **Jung Chul Ha SYK, Young Moo Lee.** Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (Pluronic)/poly(ϵ -caprolactone)(PCL) amphiphilic block copolymeric nanospheres. 1. Preparation and characterization. *Journal controlled release* (1999); 62:381-92.
- [31] **H.Y. K.** Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification-diffusion method. . *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2001); 182:123-30.
- [32] **Takeuchi H. YH, Kawashima Y.** Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery *Advanced Drug Del Rev* (2001); 47:39-54.
- [33] **M.L. V.** Preparation and characterization of nanoparticles containing an antihypertensive agent. *Europe Jornal Phar Bioph* (1998); 46:137-43.
- [34] **J.C. L.** Biodegradable nanoparticles from sustained release formulations to improved site specific drug delivery *Journal controlled release* 1(1996); 39:339-50.
- [35] **Inc Z-M.** Potencial zeta: Un curso completo en 5 minutos.
- [36] Clive A. Prestidge SS. Nanoparticle encapsulation of emulsion droplets. *Inter Journal of Phar* (2006); 324:92-100.
- [37] **Susan S. D'Souza PPD.** Methods to Assess in Vitro Drug Release from Injectable Polymeric Particulate. Sys. *Pharm Resea* (2006); 23(3):460-76.
- [38] **Khan MZI.** Dissolution testing for sustained or controlled release oral dosage forms and correlation with in vivo data: challenges and opportunities. *Inter Journal of Pharm* (1996); 140:131-43.
- [39] **Susan E. Dunn AGAC, Martin C. Garnett, Stanley S. Davis, Martyn C. Davies, Lisbeth Illum.** In vitro cell interaction and in vivo biodistribution of poly(lactide-co-glycolide) nanospheres surface modified by poloxamer and poloxamine copolymers. *Journal of Contr Rel* (1997); 44:65-76.
- [40] **M.T. Peracchia EF, D. Desmaele , M. Besnard , J.P. Noel , J.M. Gomis , M. Appel , J. d'Angelo , P. Couvreur. Ò** Stealth PEGylated polycyanoacrylate

-
- nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting. *Journal of Contr Rel* (1999); 60:121-8.
- [41] **Donald E. Owens III NAP.** Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Inter Journal of Pharm* (2006); 307:93-102.
- [42] **Fernández-Urrusuno R, Fattal E, Rodrigues Jr JM, Couvreur P, Féger J, Bedossa P.** Effect of polymeric nanoparticle administration on the clearance activity of the mononuclear phagocyte system in mice. *Journal of Biomater Resh* (1996); 31(3):401-8.
- [43] **Arnaud Vonarbourg CP, Patrick Saulnier, Jean-Pierre Benoit.** Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biom* (2006); 27:4356-73.
- [44] **S.M. Moghimia JS.** Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog in Lip Res* (2003); 42:463-78.
- [45] **I. S.** Polymers and proteins: interactions at interfaces *Current Opinion Solid State Mat Sci* (1997); 2:337-44.
- [46] **M.I. P.** Theoretical considerations of RES-avoiding liposomes: molecular mechanics and chemistry of liposome interactions. *Adv Drug Del Rev* (1998); 32:119-38.
- [47] **R. Gref ML, P. Quellec, M. Marchand, E. Dellacherie, S. Harnisch, T. Blunk, R.H. Müller.** `Stealth` corona-core nanoparticles surface modified by polyethylen glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition of phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colls and Surfs B: Biointerfaces* (2000); 18:301-13.
- [48] **Ma. Teresa Peracchia RG, Yoshiharu Minamitake, Avi Dumb, Noah Lotan, Robert Langer.** PEG-coated nanospheres from amphiphilic diblock and multiblock copolymers: Investigation of their drug encapsulation and release characteristics. *Journal Cront Rel* (1997);46 :223-31.
- [49] **DrugBank.** www.drugbank.com/ivermectin.htm. (2005).
- [50] **M. S. Sajid ZI, G. Muhammad and M. U. Iqbal.** Immunomodulatory effect of various anti-parasitics : A review. *Parasitology* (2005):1-13.

-
- [51] **Geary TG.** Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. *Tren in Par* (2005); 21 (11):530-2.
- [52] **Quintin A. McKellar FJ.** Veterinary anthelmintics: old and new. *Tren in Par* (2004); 20(10):456-61.
- [53] **Assen L. Dourmishev LAD, and Robert A. Schwartz.** Ivermectin: pharmacology and application in dermatology. *Inter Journal of Derma* (2005); 44:981-8.
- [54] **L. Pérez CP, R.Villegas, M.Vega, R.Pérez.** Metodología analítica y detección de residuos de Ivermectina en muestras de leche de rebaños de la provincia de Ñuble, Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria* (2006); 38(2):143-50.
- [55] **Natalie J. Medlicott NAW, Todd P. Foster.** Sustained release veterinary parenteral products. *Adv in Coll and Inter Sci* (2004); 56:1345-65.
- [56] **Meinke PT.** Perspectives in Animal Health: Old Targets and New Opportunities. *Journal of Med Chem* (2001); 44(5):641-59.
- [57] **Abdul Jabbar ZI, Dominique Kerboeuf, Ghulam Muhammad,, Muhammad N. Khan MA.** Anthelmintic resistance: The state of play revisited. *Life Sciences* (2006); 79:2413-31.
- [58] **Fox LM.** Ivermectin: Uses and impact 20 years on. *Current Opinion in Infectious Diseases* (2006); 19(6):588-93.
- [59] **Gardner DL.** Controlled-release parenteral systems for veterinary applications *Proc. Int. Control. Rel. Bioact. Mater.* (1987); 14:16-7.
- [60] **Rathbone MJ.** Veterinary applications In: Mathiowitz E, editor. *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*, (1999). pag. 1006-37.
- [61] **Boettner WAea.** The morantel sustained release trilaminate:a device for the controlled ruminal delivery of morantel to cattle. *Journal Controlled Release* (1988); 8:23-30.
- [62] **Cardinal JR.** Controlled Drug Delivery: veterinary applications. *Journal Contr Rel* (1985); 2:393-403.
- [63] **Alexandra Rothen-Weinhold MDyRG.** Formulation and technology aspects of controlled drug delivery in animals. *PSTT* (2000); 3 (7):222-32.

-
- [64] **Cardinal JRyW-L, L.** Drug delivery in veterinary medicine. In: Kydonieus A. Treatise on controlled drug delivery: Fundamentals, optimization, application, (1992). pag. 465-89.
- [65] **Bunt CRea.** Elevation of plasma progesterone levels in cattle using a poly(ϵ -caprolactone) and cyclodextrin intravaginal insert containing progesterone *Proc. Int. Control. Rel. Bioact. Mater.* (1999); 26:1172-3.
- [66] **Ogle CR,** Development of an injection moldable, biodegradable intravaginal insert technology. *Proc. Int. Control. Rel. Bioact. Mater.* (1999); 26:66-7.
- [67] **Ogle CR.** Optimization of a silicone based intravaginal insert for the control of strus in sheep. *Proc. Int. Control. Rel. Bioact. Mater.* (1999); 26:68-9.
- [68] **Rathbone MJ,** Fertility regulation in cattle. *Journal Cont Rel* (1998); 54:117-48.
- [69] **Klink PR.** Formulation of Veterinary dosage forms. *Development and formulation of veterinary dosage forms*, (1998). pag. 145-229.
- [70] **Kesler D.J..** The effect of constant delivery of GnRH on the episodic secretion of equine. *Journal Cont Rel* (1988); 8:55-61.
- [71] **Fleury Jea.** Evaluation of the SABER TM delivery system for the controlled release of deslorelin for advancing ovulation in the mare; effect of formulation and dose *Proc. Int. Control. Rel. Bioact. Mater.* (1998); 25:657-8.
- [72] **Jonhson CA.** Biodegradable delivery systems for estradiol: comparison between poly(DL-lactide) microspheres and the saber delivery system. *Proc. Int. Control. Rel. Bioact. Mater.* (1999); 26:74-5.
- [73] **Sondhof AE.** Poly lactic acid (biodegradable) microspheres for sustained antimicrobial drug release in the equine joint: preliminary in vivo results. *Control. Rel. Bioact. Mater.* (1998); 25:551-2.
- [74] **Herbig SMyS, K.L.** A membrane-based cattle insecticide eartag. *Journal Cont Rel* (1988); 8:63-72.
- [75] **Gurtler Fea.** Long-acting soluble bioadhesive ophthalmic drug insert (BODI) containing gentamicin for veterinary use: optimization and clinical investigation. *Journal Cont Rel* (1995); 33:231-6.
- [76] **Gruet Pea.** Use of an oral antiseptic bioadhesive tablet in dogs. *J. Vet. Dent.* (1995); 12:87-91.

-
- [77] **Abul K. Abbas MB BSea.** Inmunología celular y molecular. Madrid, (1999).
- [78] **P.R. Taylor LM-P, M. Stacey, H-H. Lin, G.D. Brown y S. Gordon.** Macrophage Receptors and Immune Recognition. *Annual Review Immunology* (2005); 23:901-44.
- [79] **Paredes OREyPA.** Fagocitosis:mecanismos y consecuencias (primera parte). *Bioc* (2003);28(4):19-28.
- [80] **Underhill AAyDM.** Mechanisms of Phagocytosis In Macrophages. *Annual Review Immunology* (1999); 17:593–623.
- [81] **Espinosa OR.** Bioquímica de la fagocitosis: *Rev. Bioc* (1997); 22 (1):612-37.
- [82] **Hongming Chen RLyDAE.** A film tension yheory of phagocytosis. *Journal Of Coll and Inter Sci* (1997);190 :118-33.
- [83] **Pitt A ML, Stahl PD y Schwartz AL.** Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. *Journal Clinical Investigations* (1992); 90:1978-83.
- [84] **Paredes OREyPA.** Fagocitosis: mecanismos y consecuencias (segunda parte). *Bioc* (2004); 29(1):18-31.
- [85] **Tulkens P SyJ, Trouet A.** The fate of the plasma membrane during endocytosis *Bioc Rev* (1977); 5: 1809-15.
- [86] **SC. SJyB.** Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biology* (1995); 5:89-93.
- [87] **JA. REyS.** Macropinosome maturation and fusion with tubular lysosomes in macrophages. *Journal Cell Biol* (1993); 121:1011-20.
- [88] **H.M. Redhead SSD, L. Illum.** Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation. *J Cont Rel* (2001); 70:353-63.
- [89] **Marina Demoy J-PA, Colette Weingarten, Bruno Gouritin, ValCrie Guilloux y Patrick Couvreur.** Intro Evaluation of Nanoparticles Spleen Capture. *Life Sci* (1999);64(1):1329-37.
- [90] **Kayser O, Kiderlen AF, Gelderblom HR.** Uptake of nanoparticles in macrophages [Aufnahme von wirkstoff-nanopartikeln in makrophagen]. *Journal Deutsche Apotheker Zeitung* (2001); 141(15):86-8.

-
- [91] **Jayanth Panyama VL.** Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Del Rev* (2003); 55:329-47.
- [92] **Bocca C, Gabriel L, Miglietta A, Caputo O, Cavalli R, Gasco MR.** Phagocytic uptake of fluorescent stealth and non-stealth solid lipid nanoparticles. *Inter Journal of Pharm* (1998); 175 (2):185-93.
- [93] **Olivier JC, Vauthier C, Taverna M, Ferrier D, Couvreur P.** Preparation and characterization of biodegradable poly(isobutylcyano acrylate) nanoparticles with the surface modified by the adsorption of proteins. *Colloids and Surfaces B: Journal Bio* (1995); 4 (6):349-56.
- [94] **Vanessa Carla Furtado Mosqueira PL, Annette Gulik, Olivier Bourdon, Ruxandra Gref , Denis Labarre y Gillian Barratt.** Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modificate nanocapsules. *Biomaterials* (2001); 22:2967-79.
- [95] **Gaspar R, Preat V, Opperdoes FR, Roland M.** Macrophage activation by polymeric nanoparticles of polyalkylcyanoacrylates: Activity against intracellular *Leishmania donovani* Associated with hydrogen peroxide production. *Journal Pharm Res* (1992); 9(6):782-7.
- [96] **Herman W. Favoreel GRVdW, Hans J. Nauwynck y Maurice B. Pensaert.** Virus complement evasion strategies *Journal of General Virology* (2003); 84:1-15.
- [97] **Maria Teresa Peracchia CV, Catherine Passirani, Patrick Couvreur y Denis Labarre.** Complement Consumption By Poly (Ethylene Glycol) In Different Conformations Chemically Coupled To Poly (Isobutyl 2xyanoacrylate) Nanoparticles. *Life Sciences* (1997); 61(1):749-61.
- [98] **Sharon A. Johnstone DM, Lawrence Mayer y Marcel B. Bally.** Surface-associated serum proteins inhibit the uptake of phosphatidylserine and poly (ethylene glycol) liposomes by mouse macrophages. *Journal Bioc Biop Acta* (2001); 1513:25-37.
- [99] **Schafer V, Briesen v H, Rubsamen-Waigmann H, Steffan AM, Royer C, Kreuter J.** Phagocytosis and degradation of human serum albumin microspheres and nanoparticles in human macrophages. *Journal of Microencapsulation* (1994); 11(3):261-9.

-
- [100] **Tabata Y IY.** Phagocytosis of polymer microspheres by macrophages. *Adv Polym Sci* (1990); 94:107-41.
- [101] **Harashima H HT, Ochi Y., Kiwada H.** Size dependent liposome degradation in blood: in vivo/in vitro correlation by kinetic modeling. *Journal Drug Targetting* (1995); 3:253-61.
- [102] **Schwendener R.A. LPA, Rahman Y.E.** The effects of charge and size on the interaction of unilamellar liposomes with macrophages. *Journal Bioc Biop Acta* (1984); (772):93-101.
- [103] **Allen TM AG, Chonn A, Lin L, Lee KC.** Uptake of liposomes by cultured mouse bone marrow macrophages: influence of liposome composition and size. *Journal Bioc Biop Acta* (1991); 1061:56-64.
- [104] **Harashima H YC, Kume Y, Kiwada H.** Kinetic analysis of AUC-dependent saturable clearance of liposomes: mathematical description of AUC dependency. *Journal. Pharm Biop* (1993); 21:299-308.
- [105] **Sahu A LJD.** Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. *Immunology Reviews* (2001); 180:35-48.
- [106] **Pratten MK LJB.** Pinocytosis and phagocytosis: the effect of size of a particulate substrate on its mode of capture by rat peritoneal macrophages cultured in vitro. *Journal Bioch Biop Acta* (1986); 881:307-13.
- [107] **Lee KD NS, Papahadjopoulos D.** Quantitative analysis of liposome cell interactions in vitro: rate constants of binding and endocytosis with suspension and adherent J774 cells and human monocytes. *Journal Bioch Rev* (1993); 32:889-99.
- [108] **Roerdink F. WNM, Richardson E.C., Alving C.R.** Effects of negatively charged lipids on phagocytosis of liposomes opsonized by complement. *Journal Bioch Biop Acta* (1983); 734:33-9.
- [109] **Jeon S.I LJH, Andrade J.D.** Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide II: effect of protein size. *Journal Coll Inter Sci* (1991); 142:159-66.
- [110] **Lars Thielea JED, Regina Reszkab, Hans P. Merklea y Elke Waltera.** Competitive adsorption of serum proteins at microparticles affects phagocytosis by dendritic cells. *Journal Biom* (2003); 24:1409-18.

-
- [111] **Lars Thiele BR-R, Samantha Jilek, Heidi Wunderli-Allenspach, Hans P. Merkle y Elke Walter.** Evaluation of particle uptake in human blood monocyte-derived cells in vitro. Does phagocytosis activity of dendritic cells measure up with macrophages? *Journal of Contr Rel* (2001); 76:59-71.
- [112] **Gref R, Quellec P, Marchand M, Dellacherie E.** Influence of residual surfactants and surface hydrophobicity on nanoparticle phagocytosis. *Proceedings of the Controlled Release Society* (1997); (24):979-80.
- [113] **Meagher PVyL.** Interactions of phospholipid- and poly(ethylene glycol)- modified surfaces with biological systems: relation to physico-chemical properties and mechanisms. *Colloids and Surfaces B: Journal Biointerfaces* (2003); 28:153-98.
- [114] **J.K. Gbadamosi ACHySMM.** PEGylation of microspheres generates a heterogeneous population of particles with differential surface characteristics and biological performance. *Journal FEBS Letters* (2002);532:338-44.
- [115] **Mansoor M. Amiji DBS.** Poly(ethylene oxide)-modified poly(ϵ -caprolactone)nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. *International Journal of Pharmaceutics* (2005); 293:261-70.
- [116] **Parks DRyH, L.A.** Fluorescence Activated Cell Sorting: Theory, Experimental Optimization, and Applications in Lymphoid Cell Biology. *Journal Methods in Enzymology* (1984); 108:197-241.
- [117] **Salgado Lynn Milena SR.** Citometría de flujo: Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS). Universidad Nacional Autónoma de México, (2002), pag. 18.
- [118] **Lilius JNyEM.** Flow cytometric quantitative determination of ingestion by phagocytes needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells *Cytometry Part A* (2005);65:93-102.
- [119] **Kobzik L.** Alveolar Macrophage- Environmental Particle Interaction: Analysis by Flow Cytometry. *Journal Immunology Methods* (2000); 21:241-7.
- [120] **S.I.Raidal GDByDNL.** The Flow Cytometric Evaluation of Phagocytosis by Equine Pheripheral Blood Neutrophils and pulmonary Alveolar Macrophages. *The Veterinary Journal* (1998); 156:107-16.
- [121] **D.M.Weir.** Complement technology. In: Oxford AP, editor. Handbook of Experimental of Immunology (1978), pag. 512-513

- [122] **Rudt S, Wesemeyer H, Muller RH.** In vitro phagocytosis assay of nano-and microparticles by chemiluminescence. Effect of surface modification by coating of particles with poloxamine and AntaroX CO on the phagocytic uptake. *Journal of Contr Rel* (1993); 25(1-2):123-32.
- [123] **Rolland A, Merdrignac G, Gouranton J.** Flow cytometric quantitative evaluation of phagocytosis by human mononuclear and polymorphonuclear cells using fluorescent nanoparticles. *Journal of Immo Met* (1987); 96(2):185-93.
- [124] **CHEMICAL SF.** www.info@silverfernchemical.com. USA.
- [125] **Puronics-BASF CBTb.** www.performance.basf-corp.com.