

МОНГОЛ УЛАСЫН ХУУЛЬ  
ЭРХ ЗУМГААНЫ ТӨСВИЙН  
ЭРХ



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



BASES MOLECULARES Y ESTRUCTURALES  
DE LA INTERACCIÓN DE GANGLIÓSIDOS  
CON PACLITAXEL

TRABAJO DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS  
PRESENTADO POR BIÓL. VALERIA HEREDIA

BIBLIOTECA DE CIENCIAS QUÍMICAS

Autor: R-T  
 Agrícola: 577 19293  
 H  
 Levantado: 13719  
 Aclar  
 Clasificación: /20  
 Fecha de ingreso:

ML		
----	--	--

## COMISIÓN DE TESIS:

DIRECTOR: DR. DANTE M. BELTRAMO

CO DIRECTOR: DR. BRUNO MAGGIO

DR. SANTIAGO D. PALMA

DR. GERMÁN A. ROTH

EVALUADOR EXTERNO:

DR. MARIANO BOCCIA






A mis padres,  
mi principal ejemplo de esfuerzo y  
sacrificio.

*Lo que sabemos es una gota de agua;  
lo que ignoramos es el océano.*  
(Isaac Newton; 1642 - 1727)

# Agradecimientos

Gracias al CEPROCOR, Ministerio de Ciencia y Tecnología de Córdoba; y a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, que hicieron posible la realización de esta tesis.

Muchas gracias a Dante y Bruno por confiar en mí para llevar adelante este proyecto. Y en nombre de ellos agradezco a todos los que estuvieron conmigo a lo largo de este camino. Muchas gracias, a ustedes dedico este logro:

Dante, quien con energía inagotable y poderosa capacidad de insistencia, me empujó a este desafío. Siempre con entusiasmo contagioso, me guió, me enseñó, me acompañó, me molestó por momentos también, pero siempre estuvo cerca para mis inquietudes. Gracias por sacarme de “la laguna de la ignorancia” y por ayudarme a crecer. Espero algún día me perdone por ser bióloga.

Bruno, en quien descubrí un gran maestro y una gran persona. Gracias por estar siempre disponible a mis dudas y atento a mis momentos. Gracias por tanta paciencia y cordialidad. Gracias por brindarme sin mezquindad todo lo que estaba a su alcance.

Los chicos de Biofísica que me ayudaron en la diaria, gracias por recibirme, por ayudarme, prestarme y enseñarme, siempre con muy buena onda. Particularmente a Laura y Natalia, que fueron las que más molesté. Mil gracias. Un agradecimiento especial a quien le debo gran parte de este trabajo, Fernando, quien fue mi mentor en el uso de los equipos, el manejo de software, en el procesamiento matemático de los resultados, en la interpretación y muchas cosas más. Fer, te llevaste la peor parte, porque me costó muchísimo aprender todo eso. A sí que, muchas gracias por tu paciencia y claridad, también por todo el tiempo dedicado, incluso a la distancia. Siempre con la mejor voluntad de colaborar, de estar y resolver. Gracias por brindarte por completo, por abrirme las puertas de tu casa y compartir tu familia conmigo.

Mis compañeros del CEPRO, por todas las horas de trabajo compartidas y

también por los mates y festejos. Toti, Ariel, Vicky, Kari, gracias por su generosidad y buena predisposición a colaborar siempre. Un agradecimiento especial para Gabi por tantas horas de dedicación a este manuscrito, por los mates, cafecitos y las charlas. Gracias por tu amistad, por escucharme, aguantarme en mis días difíciles y compartir el día a día.

A mi familia entera por el apoyo incondicional. A mi mamá por estar siempre disponible para cubrirme con mis niñas, dedicándose a nosotras con tanto amor. Gracias por ser el pilar de mis debilidades y por levantarme el ánimo. Gracias por ser mi mamá. A mi viejo por su respaldo, por su generosidad, comprensión y cariño. A mi abuela, por todas sus horas dedicadas a ayudarme. Quiero agradecer especialmente a mi bebé grande, mi mayor orgullo, Malena. Por bancarme en todas mis locuras, por entender mis ausencias y por ser tan bondadosa, gracias mi amor, mamá te ama.

A Diego mi compañero de vida por contagiarme su energía, entusiasmo y optimismo. Por regalarme una familia y un sol de personita que me acompañó durante muchos experimentos con el monocapas, Olivia!

Gracias a todos! Porque sin su presencia en mi vida, no hubiera llegado hasta acá.

# Resumen

La formulación de principios activos hidrofóbicos para administración parenteral es un problema que enfrenta la industria farmacéutica. Particularmente, el Paclitaxel (Ptx) es uno de los fármacos oncológicos más utilizados actualmente pero debido a su baja solubilidad en agua ( $< 1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), resulta muy difícil de vehiculizar. La formulación comercial existente, Taxol<sup>®</sup>, es una solución de 50 % aceite de castor (Cremophor EL) y 50 % etanol. Sin embargo, el Cremophor puede provocar una serie de efectos no deseados tales como hipersensibilidad, neurotoxicidad y nefrotoxicidad. En las últimas décadas se ha invertido mucho esfuerzo en investigar nuevos vehículos para el Ptx. El Abraxane<sup>®</sup>, una nanopartícula de albúmina que une Ptx, fue aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) para el tratamiento del cáncer de mama en 2005 y presenta mayor eficacia y menor toxicidad que el Taxol<sup>®</sup>.

Recientemente nuestro laboratorio describió un sistema nanotransportador constituido por una micela lipídica autoensamblable. Este sistema, a base de micelas de gangliósidos monosialos (GM), incorpora Ptx de forma espontánea. El Ptx vehiculado dentro de las micelas demostró poseer actividad biológica citotóxica y antiangiogénica equivalente a la actividad del fármaco libre y a la formulación comercial Taxol<sup>®</sup>. Las diferencias estructurales que determinan las propiedades de los agregados de distintos gangliósidos, afectan la capacidad de carga del fármaco. Por ejemplo, la capacidad de carga de gangliósidos que se agregan en micelas, como el GM1 y el GM2, es significativamente mayor que la de los que se agregan en vesículas unilamelares como el GM3.

GM1, GM2 y GM3 difieren en el tamaño de su porción hidrofílica, ya que poseen cuatro, tres y dos azúcares, respectivamente. A medida que disminuye el tamaño de la región hidrofílica de la molécula de gangliósido aumenta el radio hidrodinámico ( $R_H$ ) y el número de agregación ( $N$ ). Así, GM1, GM2 y GM3, poseen  $N$  de 300, 450 y  $\sim 14000$ , respectivamente. La misma tendencia se observa

cuando el tamaño de la región hidrofílica varía por la cantidad de residuos siálicos presentes. La serie GM1, GD1a y GT1b, poseen uno, dos y tres ácidos siálicos y consecuentemente  $N$  de GM1 es mayor que el de GD1a que es mayor que el de GT1b. Además, distintas cantidades de residuos siálicos en la molécula implican distinta carga neta, dado que este residuo se encuentra cargado negativamente. Estas diferencias estructurales pueden determinar capacidades de asociación distintas con moléculas de interés farmacológico como el Ptx. El impacto de la diferencia en composición de ácido siálico en las propiedades de las micelas como vehículo de fármacos, no ha sido evaluado y resulta información relevante para el diseño de vehículos farmacéuticos.

Estudiamos las propiedades de micelas de gangliósidos disíalos (GD) y trisialos (GT) como sistema nanotransportadores de Ptx en comparación con los vehículos basados en GM.

Los resultados revelaron que micelas de GD y GT pueden ser consideradas como vehículo para la administración de Ptx, dado que incorporan el fármaco y poseen propiedades bioquímicas y farmacéuticas adecuadas. La actividad biológica citotóxica *in vitro* y antiangiogénica en un modelo biológico del fármaco vehiculizado en los complejos GD/Ptx y GT/Ptx es equivalente a la actividad del fármaco libre o la de la formulación comercial Taxol<sup>®</sup>. En términos generales, micelas de GD y GT tienen propiedades similares a las micelas de GM como transportadores de Ptx. Sin embargo, las micelas de GD y GT presentan mejor capacidad de carga que los GM, ya que incorporan 4 veces más fármaco.

En principio esta diferencia significativa en la capacidad de carga podía ser atribuida a una mayor repulsión electrostática entre las regiones hidrofílicas de dos monómeros adyacentes en las micelas de GD. Lo que permitiría que la región hidrofóbica acomodase más cantidad de Ptx. Sin embargo, esta explicación no se aplicaría cuando uno compara las capacidades de carga de los GD con los GT, por lo que las propiedades estructurales presentan limitaciones para explicar el comportamiento de algunos sistemas binarios.

Las interacciones moleculares que se establecen entre los gangliósidos y el Ptx en los distintos complejos podrían jugar un papel importante para determinar las diferencias observadas en la capacidad de carga del fármaco.

Propusimos caracterizar las propiedades moleculares de los complejos gangliósidos/fármaco. Seleccionamos dos de los sistemas, por tener capacidad de carga significativamente diferente: GM1/Ptx y GD1a/Ptx y evaluamos sus pro-

propiedades dispersos en agua o en monocapas en la interfaz agua/aire.

Las propiedades de monocapa de Langmuir de GM1, GD1a, Ptx y sus mezclas revelaron que el Ptx interacciona con ambos gangliósidos y que cualquiera de ellos estabiliza al fármaco en la interfaz. El Ptx permanece en la interfaz a presiones muy por encima ( $30mN.m^{-1}$ ) de las presiones que es capaz de soportar en ausencia de gangliósidos ( $8 - 10mN.m^{-1}$ ). Sin embargo, a altas presiones laterales de superficie ocurre desorción de moléculas de Ptx. Esto se evidencia porque la forma de la isoterma a altas presiones laterales es similar a la isoterma del gangliósido puro. Además, la presencia de Ptx en la interfaz está típicamente caracterizada por hiperpolarización del potencial de superficie. Esta característica, no reportada hasta el momento, reveló la presencia de Ptx luego de ciclos de compresión en donde el análisis del área molecular reflejaba pérdida total de moléculas de Ptx de la interfaz.

El análisis termodinámico reveló que, la energía libre de exceso de mezcla ( $\Delta G_m^E$ ) de monocapas mixtas de GD/Ptx es negativa en todo el rango de proporciones evaluado, mientras que para mezclas GM/Ptx puede ser negativa o positiva dependiendo de la proporción. Además la energía de las mezclas con GD fueron siempre de mayor intensidad que las de GM, demostrando que el Ptx tiene mayor afinidad por GD1a que por GM1.

Mediante microscopía de ángulo de Brewster (BAM) se determinó que la reflectividad de monocapas mixtas es mayor que la de los films de gangliósidos puros o de los films de Ptx, especialmente en el caso de mezclas con GD, lo que sugiere un engrosamiento de la interfaz óptica. Por su parte, los estudios de dispersión dinámica de la radiación (DLS) y microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las micelas cargadas con Ptx revelaron que después de incorporar Ptx, las micelas de GD se agrandan mientras que las micelas de GM no.

En su conjunto las evidencias en sistemas de monocapas y en dispersión demuestran que el GD1a tiene mayor y mejor capacidad de asociarse al Ptx que GM1, explicando la diferencia de capacidad de carga de Ptx observada entre micelas de estos gangliósidos.

## Abstract

The formulation of hydrophobic active pharmaceutical ingredients for parenteral administration is one of the main concerns of the pharmaceutical industry. Paclitaxel (Ptx) is an anticancer drug with low water solubility ( $< 1g.mL^{-1}$ ).

The existing commercial formulation, Taxol<sup>®</sup>, is a solution of 50% castor oil (Cremophor EL) and 50% ethanol. However, Cremophor can cause many undesirable effects, such as hypersensitivity, neurotoxicity and nephrotoxicity. With advances in nanotechnology, much effort has been invested in investigating new vehicles for Ptx.

Abraxane<sup>®</sup> was the first nanotechnology delivery systems for Ptx that was approved by the FDA for the treatment of breast cancer in 2005. Abraxane<sup>®</sup> is a nanoparticle albumin binded to Ptx and has greater efficacy and lower toxicity than Taxol<sup>®</sup>. Recently we described a nanocarrier consisting of lipid micelles. This system is based on monosialic ganglioside (MG) micelles that incorporate Ptx spontaneously. Cytotoxic activity demonstrated that Ptx within MG/Ptx complexes micelles possess equivalent biological activity to the free drug and the commercial formulation Taxol<sup>®</sup>. Of all gangliosides studied so far, GM1 or GM2 micelles shows greater loading capability of Ptx than unilamellar vesicles of GM3. These MG differ in the size of its hydrophilic portion owing to their sugar content, GM1 four, GM2 three and GM3 two sugars. Hence, differences in structural and aggregation properties of different gangliosides determine different drug loading capabilities.

It is known that when the size of the hydrophilic region of ganglioside molecule decreases the hydrodynamic radius ( $R_H$ ), increases aggregation number ( $N$ ) and may change the aggregation structures. For example, GM1, GM2 with an  $N$  of 300, 450 respectively, formed micelles while GM3 with an  $\sim 14000$  formed vesicles. The same trend is observed when the hydrophilic region becomes more voluminous by the increase in the number of sialic residues. Thus, GM1 has an  $N$  greater than GD1a which has two sialic acids, and greater than GT1b which has three sialic acids. In addition, different amounts of sialic residues in the molecule involve different net charge, since this residue is negatively charged. Structural differences that determine the properties of different gangliosides aggregates affect loading capacity of a delivery system. Therefore we decided to evaluate the impact of the difference in composition of sialic acid in the properties of the micelles as drug carrier. In this work we have studied the properties of disialic (DG) and trisialic (TG) ganglioside micelles as Ptx nanocarriers compared to MG carrier.

The results revealed that GD and GT micelles can be considered as a vehicle for administration of Ptx, as they incorporate the drug and possess appropriate biochemical and pharmaceutical properties. In addition, results demonstra-

ted that in vitro cytotoxic activity and antoangiogenic activity of GD/Ptx and GT/Ptx complexes are equivalent to the activity of free drug and commercial formulation Taxol. Therefore, GD and GT micelles have similar properties as carriers of Ptx as GM micelles. However, GD and GT micelles loaded 4 times more drug than GM micelles.

In principle, the significant difference in loading capacity between DG and MG micelles could be attributed to structural differences in the aggregate. The greater electrostatic repulsion between the hydrophilic regions of two adjacent monomers in the micelles of DG, would allow more Ptx to access the hydrophobic core. However the same trend was not observed between DG and TG loading capabilities. The structural properties have limitations in explaining the behavior of some binary systems. Molecular interactions established between gangliosides and Ptx in different complexes could play an important role to determine the differences in the capacity of the drug. Therefore we propose characterize the molecular properties of these complexes.

We select two systems with significantly different loading capacity: GM1/Ptx and GD1a/Ptx. Molecular interactions and surface properties of GM1, GD1a, Ptx and mixtures were evaluated in the water-air interface by Langmuir monolayer technique.

The results showed that the Ptx interacts with both gangliosides stabilizing it in the interface. In presence of either ganglioside Ptx is able to reach surface pressures well above ( $30mN.m^{-1}$ ) of the pressures is able to withstand in the absence of gangliosides ( $8 - 10mN.m^{-1}$ ). Although desorption of Ptx molecules from the interface occurs at high lateral pressure. The presence of Ptx in the interface always produced a hyperpolarization of the potential surface, either in the presence or absence of gangliosides. This feature, not reported so far, revealed the presence of Ptx in the interface after compression cycles, when the analysis of molecular indicated a total loss of molecules of Ptx from the interface.

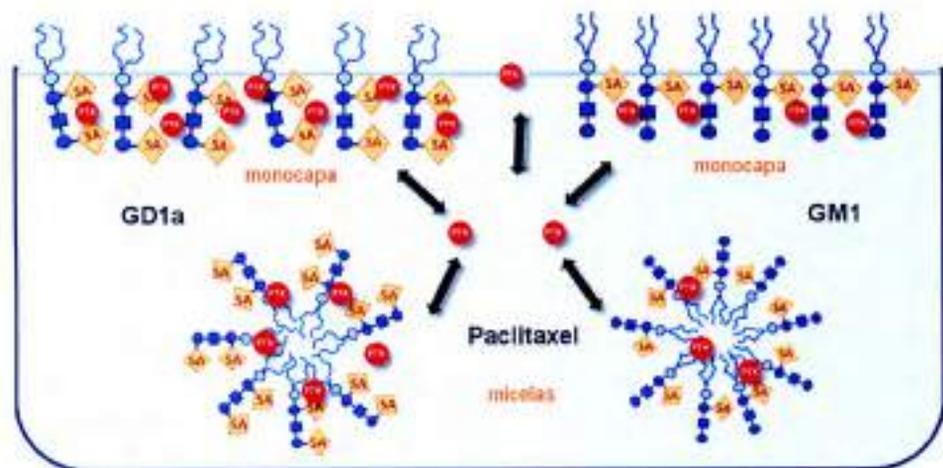
The free energy of mixing excess ( $\Delta G_m^E$ ) of GD1a/Ptx mixed monolayers was negative in all the proportions studied, while the energy of GM1/Ptx mixtures was negative or positive depending on the ratio. Furthermore the intensity of the energy of mixtures with GD1a was always greater than the one of MG.

Brewster angle microscopy (BAM) shows that the reflectivity of the blends was higher than the films of pure monolayer of either gangliosides or Ptx, especially in the case of mixtures with GD1a, suggesting a thickening of the optical interfa-

ce. Moreover, dynamic light scattering (DLS) studies and transmission electron microscopy (TEM) of Ptx loaded micelles revealed that after incorporating Ptx, GD1a micelles are enlarged while GM1 micelles do not.

Whole evidences from studies with monolayers and dispersion systems shows that GD1a have greater and better ability to interact with Ptx than GM1 do. Evidently, these differences play an important role in determining the loading capability of gangliosides micelles.

# Resumen Gráfico



# Índice general

Agradecimientos	5
Resumen	7
Resumen Gráfico	13
Abreviaturas	24
<b>1. Introducción General</b>	<b>26</b>
1.1. Cáncer . . . . .	26
1.2. Tratamientos . . . . .	27
1.3. Fármacos oncológicos . . . . .	28
1.4. Nanotransportadores . . . . .	30
1.4.1. Nanotransportadores de fármacos oncológicos . . . . .	31
1.5. Termodinámica de micelas . . . . .	40
1.6. Gangliósidos: lípidos anfipáticos . . . . .	47
1.6.1. Agregación de gangliósidos en solución . . . . .	48
1.7. Termodinámica de monocapas . . . . .	54
1.7.1. Tensión superficial . . . . .	55
1.7.2. Presión Superficial . . . . .	59
1.7.3. Potencial de superficie . . . . .	61
1.7.4. Reflectividad de la superficie . . . . .	62
1.8. Monocapas de gangliósidos . . . . .	63
1.9. Monocapas de Ptx . . . . .	65
<b>2. Antecedentes</b>	<b>68</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>71</b>
3.1. Objetivos generales . . . . .	71

3.2. Objetivos específicos . . . . .	71
<b>4. Materiales y Métodos</b>	<b>73</b>
4.1. Materiales . . . . .	73
4.2. Métodos . . . . .	73
4.2.1. Purificación de gangliósidos . . . . .	73
4.2.2. Cuantificación de Ptx . . . . .	74
4.2.3. Cuantificación de gangliósidos . . . . .	74
4.2.4. Preparación de micelas cargadas con Ptx . . . . .	75
4.2.5. Tratamientos a micelas cargadas con Ptx . . . . .	75
4.2.6. Hemólisis . . . . .	76
4.2.7. Citotoxicidad in vitro . . . . .	76
4.2.8. Angiogénesis en membrana corioalantoidea (CAM) de pollo	77
4.2.9. Monocapas de Langmuir . . . . .	77
4.2.10. Microscopía de ángulo de Brewster . . . . .	78
4.2.11. Dispersión dinámica de la radiación . . . . .	78
4.2.12. Microscopía electrónica . . . . .	79
<b>5. Resultados</b>	<b>80</b>
5.1. Gangliósidos di y trisialos como nanotransportadores de Ptx . . .	80
5.2. Interacciones moleculares y propiedades de superficie . . . . .	87
5.2.1. Adsorción de Ptx a la interfaz aire-agua . . . . .	87
5.2.2. Inserción de Ptx en monocapas de gangliósidos . . . . .	88
5.2.3. Isotermas presión-área de componentes puros . . . . .	88
5.2.4. Monocapas mixtas de gangliósidos y paclitaxel . . . . .	90
5.2.5. Interacciones moleculares . . . . .	93
5.2.6. Microscopía del ángulo de Brewster . . . . .	95
<b>6. Discusión</b>	<b>99</b>
6.1. Gangliósidos di y trisialos como nanotransportadores de Ptx . . .	99
6.1.1. GD1a, GD1b y GT1b tienen cuatro veces más capacidad de carga que GM1 . . . . .	100
6.1.2. La capacidad de carga de micelas de gangliósidos disialos no se ve afectada por la temperatura . . . . .	100
6.1.3. Los complejos GD/Ptx tienen menor estabilidad física y química que los complejos GM/Ptx . . . . .	101

6.1.4. Los complejos GD/Ptx no modifican la actividad biológica del principio activo . . . . .	102
6.2. Interacciones moleculares y propiedades de superficie . . . . .	103
6.2.1. Los gangliósidos estabilizan a Ptx en la interfaz agua-aire .	103
6.2.2. Ptx y los gangliósidos interactúan favorablemente en monocapas mixtas . . . . .	104
6.2.3. El comportamiento superficial de monocapas mixtas gangliósidos/Ptx correlaciona con el tamaño de las micelas . .	106
<b>7. Conclusiones</b>	<b>108</b>
<b>A. Protocolo de evaluación de angiogénesis in vivo en membrana corioalantoidea de embriones de pollo</b>	<b>110</b>
<b>B. Fórmulas para el análisis de las isothermas</b>	<b>112</b>
<b>Referencias Bibliográficas</b>	<b>114</b>

# Índice de figuras

- 1.1. Características fisiológicas del tejido tumoral y su vasculatura. Adaptado de Kobayashi y col. [59]. . . . . 27
- 1.2. Estructura química del Paclitaxel. Fórmula molecular:  $C_{47}H_{51}NO_{14}$ . Peso molecular:  $853,90 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . La molécula es insoluble en agua. 29
- 1.3. Esquema y tamaño de nanotransportadores estudiados para aplicación en quimioterapia contra el cáncer . . . . . 31
- 1.4. Nanopartículas con distinta estructura y ubicación del principio activo. Las nanoesferas son matrices mientras que las nanocápsulas son cubiertas. El principio activo puede estar disperso o encapsulado en el interior de la nanopartícula o adsorbido en la superficie. 35
- 1.5. Equilibrio dinámico de copolímeros dibloque en agua. Los unímeros anfipáticos se autoagregan espontáneamente. . . . . 38
- 1.6. Efecto hidrofóbico. A) ácido graso con cadena hidrocarbonada rodeada de moléculas de agua altamente ordenadas. B) Al agruparse en micelas reducen al mínimo la exposición de las regiones apolares al agua, minimizan la cantidad de moléculas de agua ordenadas y maximizan la entropía del sistema. La energía generada al liberar las moléculas de agua inmovilizadas estabiliza las micelas. . . . . 41
- 1.7. Tensión superficial en función de la concentración de anfifilo. A baja concentración las moléculas migran a la superficie libre del líquido disminuyendo la tensión superficial (B), hasta una concentración crítica ( $c^*$ ) donde la densidad de moléculas en la superficie no puede aumentar más, los anfifilos deben organizarse en el seno de la solución (C), y la tensión superficial permanece constante. . . . . 42

- 1.8. Parámetro crítico de empaquetamiento ( $P$ ), forma de la molécula de anfifilo y estructura de agregación asociadas. Volumen efectivo ocupado por la cadena hidrofóbica  $V$ , longitud máxima efectiva de la cadena  $l_c$ , y área efectiva de la cabeza hidrofílica en la interfaz del agregado con el medio circundante  $a_0$ , que definen a  $P$  como  $P = V/a_0 l_c$  . . . . . 46
- 1.9. Esfingolípidos. La ceramida, formada por la unión de esfingosina y un ácido graso, constituye la región hidrofóbica común de los esfingolípidos. La región hidrofílica varía para los distintos esfingolípidos. Las esfingomielinas poseen fosfocolina, los cerebrósidos poseen monosacáridos y los gangliósidos poseen oligosacáridos . . . 47
- 1.10. Vías de biosíntesis de los gangliósidos más comunes. Las flechas negras indican la actividad de sialosiltransferasas que incorporan ácido N-Acetilneuroamínico; las flechas grises la actividad de glucosiltransferasas que incorporan azúcares. . . . . 49
- 1.11. Los cuatro principales gangliósidos de cerebro de mamíferos y aves comparten el mismo núcleo tetrasacárido neutro (Gal  $\beta$ 1-3  $\beta$ 1-3 GalNAc  $\beta$ 1-4 Gal  $\beta$ 1-4 Glc) unido a la ceramida, con distintos números y posiciones de enlace de ácido siálico. En color amarillo: Gal/GalNAc; azul: Glc y púrpura: NeuAc. Los porcentajes molares son respecto al total de gangliósidos de cerebro humano [100] . . . 50
- 1.12. Representación esquemática del grupo polar de distintos gangliósidos. Aumento progresivo del volumen ocupado por la cadena oligosacárida, debido al aumento en la complejidad estructural. La colina, que es el grupo polar más grande de los fosfolípidos, se muestra a la derecha para comparar con las cadenas de los glicolípidos. La región hidrofóbica no está representada [105]. . . . . 51
- 1.13. Recuadro: detalle de la interfaz agua-aire mostrando las interacciones intermoleculares de atracción de moléculas de agua ubicadas en el seno y en la superficie. A la derecha: esquema del trabajo ( $w$ ) necesario para aumentar el área interfacial ( $w = F \cdot d$ ). . . . . 56
- 1.14. Isoterma típica, presión( $\pi$ )-área( $A$ ) de una monocapa. Esquema del ordenamiento de las moléculas en las distintas fases y en el colapso [116]. . . . . 60
- 1.15. Modelo de Helmholtz. . . . . 62

- 1.16. Presión de superficie (A) y Potencial de superficie (B) por área molecular promedio determinadas a pH 5,6 y 20°C, para gangliósidos con un ácido siálico: GM3 (rojo), GM2 (verde), GM1 (celeste); con dos siálicos: GD3 (bronce) y GD1a (anaranjado); y con tres: GT1b (gris). En la parte superior derecha se muestra la compresibilidad de la superficie en función de la cantidad de residuos de ácido siálico presentes en las moléculas. Adaptado de Maggio y col. [76] . . . . . 64
- 1.17. Isotherma de compresión de Ptx y del fosfolípido dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), realizadas a temperatura corporal. Adaptado de Zhao y col. [131] . . . . . 66
- 1.18. Estructura química e isoterma de compresión a 25°C, de fosfolípidos con distinta cantidad de carbonos en la cola hidrofóbica. (DMPC: dimiristoil fosfatidilcolina; DPPC: dipalmitoil fosfatidilcolina; DSPC: distearoil fosfatidilcolina [53]. . . . . 67
- 2.1. Porcentaje de Ptx incorporado en micelas de gangliósidos en función de la relación molar. GM1 (rombo), GM2 (cuadrado), GM3 (triángulo). Las barras de error indican la desviación estándar de la media (n=3) [66]. . . . . 69
- 5.1. Porcentaje de Ptx incorporado en micelas de gangliósidos en función de distintas relaciones molares de gangliósido/Ptx. GM1 (triángulo), GD1a (círculo vacío), GD1b (cuadrado) y GT1b (rombo). Barras de error indican la desviación estándar de la media (n = 3) . . . . . 81
- 5.2. Efecto de la temperatura sobre la capacidad de las micelas de GM1 (A) y GD1a (B) para incorporar Ptx. Porcentaje de Ptx incorporado en función de la composición. Barra rellena: 4°C, barra vacía: 55°C, barra rayada: 4°C luego de ser incubada 1h a 55°C. Las barras de error indican la desviación estándar de la media (n = 3) . . . . . 82

- 5.3. Hidrólisis alcalina de Ptx. (A) Porcentaje de Ptx soluble en soluciones GD1a/Ptx 5/1 mol/mol incubadas a pH 5 (círculo negro) o pH 10 (círculo vacío) y Ptx en 50% etanol-agua pH 5 (estrellas) o etanol-buffer pH 10 (cruces) en función del tiempo. (B) Detalle de las primeras 24 horas del gráfico (A) ms el perfil de hidrólisis de Ptx en soluciones GM/Ptx 25/1 mol/mol incubadas a pH 5 (triángulo negro) o pH 10 (triángulo vacío). Las barras de error indican la desviación estándar de la media ( $n = 3$ ) . . . . . 84
- 5.4. Distribución de tamaño de micelas de GM1 (A) y GD1a (B) en ausencia (líneas negras) y en presencia (línea roja) de Ptx determinada por dispersión dinámica de la radiación. . . . . 85
- 5.5. Micrografías de micelas de GD1a (A), GD1a/Ptx 5/1 (mol/mol) (B), GM1 (C) y GM1/Ptx 20/1 (mol/mol) (D). . . . . 86
- 5.6. Citotoxicidad de Ptx, GM1/Ptx 20/1, GD1a/Ptx 10/1 mol/mol en cultivo de células Hep-2 bares. Las barras de error indican la SD de la media ( $n = 3$ ) . . . . . 86
- 5.7. Fotografías de membrana corioalantoidea de embriones de pollo. DE: día Embrionario, SF: solución fisiológica, G/Ptx: Ptx vehiculizado en gangliósidos, Taxol: Ptx vehiculizado en Cremophor. . . . . 87
- 5.8. Adsorción de Ptx en la interfaz aire-agua a 24 °C. A) Presión de superficie (círculos) y el de superficie (cuadrados) se midieron simultáneamente como una función de la concentración de Ptx en la subfase. B) Diferencia de presión en función de la presión inicial de monocapas de GM1 (símbolos abiertos) y GD1a (símbolos cerrados). Se muestra la presión de exclusión de Ptx. Los datos son la media de tres experimentos independientes. . . . . 89
- 5.9. Isotermas de compresión (A), módulo de compresibilidad de la superficie ( $K$ ) (B) y potencial de superficie por unidad de densidad molecular (C) en función del área molecular media para monocapas de GD1a (triángulos), GM1 (cuadrados) y Ptx (círculos). Las curvas que se muestran son representativas de cinco experimentos independientes . . . . . 90

- 5.10. Isotermas de compresión de mezclas de GM1/Ptx con diferentes composiciones. La flecha señala el colapso de Ptx en la mezcla con  $X_{Ptx} > 0,5$ . Inset: isotermas con *MMA* calculada considerando sólo las moléculas de gangliósidos. Relación molar 1:0 (negras), 12:1 (rojo), 6:1 (verde), 3:1 (azul), 1:1 (cian), 1:3 (magenta), 1:6 (amarillo oscuro), 0:1 (naranja) . . . . . 91
- 5.11. Isotermas de compresión de mezclas de GD1a/Ptx con diferentes composiciones. La flecha seala el colapso de Ptx en la mezcla con  $X_{Ptx} > 0,5$ . Inset: isotermas con *MMA* calculada considerando sólo las moléculas de gangliósidos. Relación molar 1:0 (líneas negras), 12:1 (rojo), 6:1 (verde), 3:1 (azul), 1:1 (cian), 1:3 (magenta), 1:6 (amarillo oscuro), 0:1 (naranja) . . . . . 91
- 5.12. Compresión de mezcla 1:1 GM1/Ptx. A) Isotherma después de un ciclo de compresión de hasta  $10 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  (negro), hasta  $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  (rojo) y hasta  $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  (azul). Isotermas de compresión de GM1 (naranja). B) Isotherma (negro) y potencial de superficie ( $\delta V \cdot n^{-1}$ ) (rojo) del ciclo de compresión/expansión hasta  $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  e isoterma de compresión a colapso (azul) y potencial de superficie a colapso (verde). Isotherma de compresión GM1 (naranja) y  $\delta V \cdot n^{-1}$  (morada). . . . . 92
- 5.13. Parámetros de mezcla en  $2,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  de la mezcla de Ptx con los gangliósidos GM1 (símbolos cerrados) y GD1a (símbolos abiertos). El área molecular media (A), el módulo de compresibilidad (B) y el potencial de superficie por unidad de densidad molecular (C) se grafican para diferentes composiciones de mezcla. Las líneas de puntos son los valores que predice el comportamiento ideal de las mezcla . . . . . 93
- 5.14. Parámetros de mezcla en  $5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  de la mezcla de Ptx con los gangliósidos GM1 (símbolos cerrados) y GD1a (símbolos abiertos). El área molecular media (A), el módulo de compresibilidad (B) y el potencial de superficie por unidad de densidad molecular (C) se grafican para diferentes composiciones de mezcla. Las líneas de puntos son los valores que predice el comportamiento ideal de las mezcla . . . . . 94

- 5.15. Potencial de superficie por molécula ( $\Delta V.n^{-1}$ ) de las mezclas 1:1 en función de la presión de superficie para monocapas mezclas de GM1/Ptx (círculos cerrados), GD1a/Ptx (círculos abiertos), monocapas puras de GM1 (cuadrados cerrados) y GD1a (cuadrados abiertos) . . . . . 95
- 5.16. Imágenes de BAM de monocapas de GD1a a distintas presiones de superficie. magnificación= 20X . . . . . 96
- 5.17. (A) p-Reflectividad de monocapas puras de Ptx, GM1 y GD1a en función de la presión superficial. (B) p-reflectividad a  $5 \text{ mN.m}^{-1}$  de monocapas mixtas de GM1/Ptx (rojo) y GD1a/Ptx (negras) en función de la fracción molar. Fase más brillante (símbolos abiertos) y fase oscura (símbolos cerrados) . . . . . 96
- 5.18. Imágenes de BAM de monocapas de Ptx a distintas presiones de superficie. Magnificación= 20X . . . . . 97
- 5.19. Imágenes de BAM de monocapas de mezcla GM1/Ptx 1:1 a diferentes presiones superficiales. magnificación= 20X. . . . . 97
- 5.20. Imágenes de BAM de monocapas de mezcla GD1a/Ptx 1:1 a diferentes presiones superficiales. magnificación= 20X. . . . . 97

# Índice de tablas

1.1. Ventajas y desventajas de distintos sistemas nanotransportares de fármacos . . . . .	32
1.2. Formulaciones liposomales para fármacos anticancerígenos actualmente aprobadas o en fase de investigación clínica . . . . .	34
1.3. Micelas poliméricas en distinta fase de estudios clínicos. Adaptado de Oerlemans y col. [89]. . . . .	40
1.4. Parámetros físico-químicos de distintos gangliósidos: cantidad de azúcares en la cabeza polar, peso molecular del unímero ( $PM_u$ ) en Daltons ( $Da$ ), estructura de agregación, número de agregación ( $N$ ), peso molecular del agregado ( $PM_a$ ) en kiloDaltons ( $KDa$ ), radio hidrodinámico ( $R_H$ ) en Angstrom ( $\text{Å}$ ) y área de superficie interfacial del unímero en el agregado ( $a_0$ ) en Angstrom cuadrados ( $\text{Å}^2$ ) . . . . .	52
1.5. Valores de módulo de compresibilidad ( $C_s^{-1}$ ) de las diferentes fases en una monocapa. . . . .	61
5.1. Porcentaje de gangliósido en muestras de GM1, GD1a, GM1/Ptx y GD1a/Ptx dializadas durante distintos periodos de tiempo. Promedio de tres ensayos independientes. . . . .	83
5.2. Porcentaje de Ptx soluble en muestras de complejos GM1/Ptx 20/1, GD1a/Ptx, GD1b/Ptx y GT1b/Ptx 10/1, después de ser liofilizados, centrifugados 1 hora a 100.000 g o congelados a $-80^\circ C$ . Promedio de tres ensayos independientes. . . . .	84
5.3. Exceso de energía $\Delta G_m^E$ ( $J.mol^{-1}$ ) de monocapas mixtas de relación molar 6:1, 1:1 y 1:6 (gangliósidos:Ptx) . . . . .	94

# Abreviaturas

**BAM:** Microscopía de ángulo de Brewster

**CAM:** Membrana corioalantoidea

**CMC:** Concentración micelar crítica

**DHA:** Ácido docosahexaenoico

**DMPC:** Dimiristoil fosfatidilcolina

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DSPC:** Distearoil fosfatidilcolina

**Dox:** Doxorrubicina

**Dtx:** Docetaxel

**DPPC:** Dipalmitoil fosfatidilcolina

**DPPE:** Dipalmitoil fosfatidiletanolamina

**FDA:** Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos

**GD:** Gangliósido disialo

**GM:** Gangliósido monosialo

**GT:** Gangliósido trisialo

**HDL:** Lipoproteínas de alta densidad

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta presión

---

**HPTLC:** Cromatografía en capa fina de alta resolución

**NANA:** Ácido N-acetilneuramínico

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PEG:** Polietilenglicol

**PLA:** Ácido poliláctico

**PTFE:** Politetrafluoroetileno

**Ptx:** Paclitaxel

**SRE:** Sistema retículo endotelial

**SPARC:** Proteína secretada ácida y rica en cisteína

# Capítulo 1

## Introducción General

### 1.1. Cáncer

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Las estadísticas indican que en 2012 causó 8,2 millones de muertes en todo el mundo y casi 62.000 en la Argentina. La OMS prevé que las muertes por cáncer sigan aumentando en todo el mundo y alcancen la cifra de 13,1 millones en 2030. En Argentina, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) estimó que en 2012 se produjeron 115.162 casos nuevos de tumores malignos, lo que nos posiciona en relación al resto del mundo, en un nivel de incidencia de esta enfermedad medio-alto [106].

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado y la propagación de células anormales. Más de 100 formas distintas de cáncer son conocidos, afectando a casi todos los órganos y sistemas del cuerpo humano. Durante el transcurso de la vida, las células crecen y se dividen con cierta frecuencia para mantener sano el organismo. Algunas veces este proceso ordenado se descontrola, formando una masa de tejido que se denomina tumor. Las células tumorales tienen anomalías que provocan que se dividan sin control y sin orden, que invadan y destruyan el tejido a su alrededor y que puedan entrar al torrente sanguíneo o al sistema linfático y diseminarse a otros órganos, proceso denominado metástasis [45]. Por su parte, también el microentorno de los tumores de un cáncer tiene una fisiología alterada en comparación con los tejidos normales [46]. Debido a su proliferación no regulada, las células cancerosas tienen una alta tasa metabólica caracterizada por la hipoxia y por privación de glucosa. Para cumplir con el requisito de energía adicional tienen mayor glucólisis, lo que crea

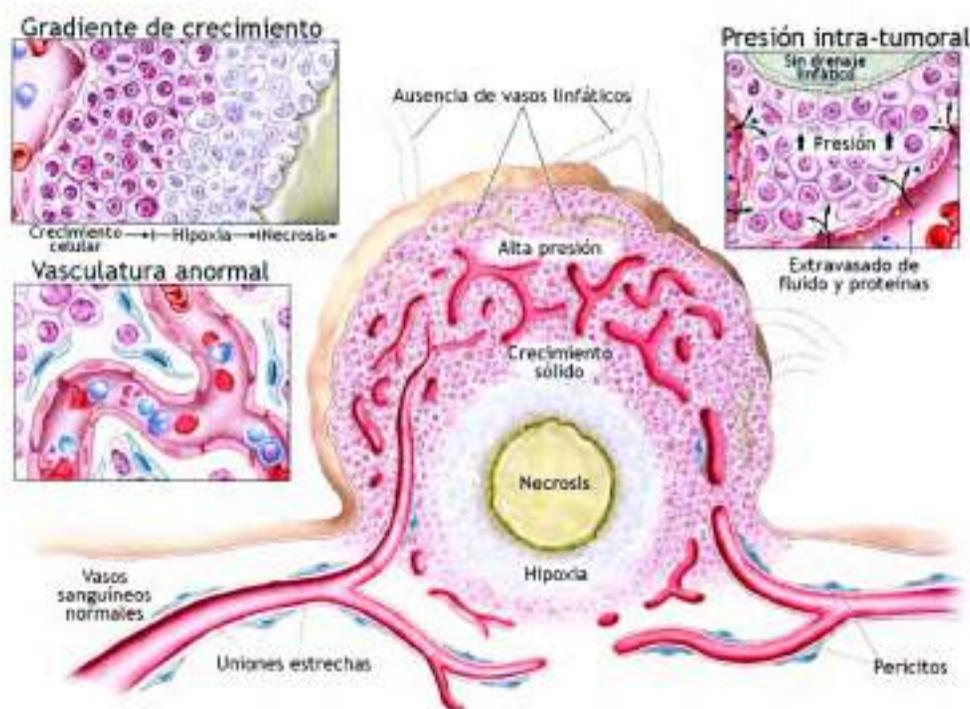


Figura 1.1: Características fisiológicas del tejido tumoral y su vasculatura. Adaptado de Kobayashi y col. [59].

un microambiente ácido. La alta tasa metabólica también induce la angiogénesis para suministrar nutrientes y oxígeno al tumor. Sin embargo, la vasculatura es atípica y desorganizada, con vasos largos y tortuosos. Las uniones entre células endoteliales tipo gap, también llamadas de hendidura, y los poros de los vasos sanguíneos están agrandados ( $\sim 200\text{nm}$ ). Además, poseen fraccionamiento de la membrana basal y revestimiento incompleto de los pericitos. Por su parte, el drenaje linfático en el microentorno es deficiente, generando una alta retención de líquidos en el tumor [59] (ver Figura 1.1).

## 1.2. Tratamientos

Hay muchos tipos de tratamiento para el cáncer y dependen del tipo de cáncer y de qué tan avanzado está. Éstos incluyen cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal e inmunoterapia. Cada una de estas modalidades tiene sus ventajas y desventajas y generalmente es necesaria una combinación de ellas para producir resultados más eficaces. La quimioterapia es el tratamiento del cáncer con un medicamento antineoplásico o una combinación de varios medicamentos

en un régimen de tratamiento estándar. Los agentes de quimioterapia más comunes actúan afectando la mitosis o división celular. Pero como la mitosis no es un proceso exclusivo de células tumorales las quimioterapias también puede dañar células que se dividen rápidamente bajo circunstancias normales, como las células en la médula ósea, el tracto digestivo o el folículo piloso. Esto provoca efectos secundarios muy variados, que van desde inmunosupresión, mucositis hasta alopecia, lo que disminuye notablemente la calidad de vida de los pacientes. Los esfuerzos de investigación para mejorar las quimioterapias en los últimos 25 años han dado lugar a una mejora en la supervivencia del paciente. Sin embargo, los altos costos, la baja eficacia y efectos secundarios indeseados son las principales limitaciones de estos tratamientos. Varios fármacos oncológicos más eficaces y menos costosos están actualmente en fase de desarrollo. No obstante, se necesitan por lo menos 10 años y miles de millones de dólares para descubrir nuevos compuestos antineoplásicos con potencial de formularse como medicamento para las quimioterapias. Por ello es que los investigadores han puesto énfasis en el desarrollo de nuevos sistemas para la administración de fármacos oncológicos existentes o nuevos regímenes de administración, que ofrezcan más eficacia y menos efectos secundarios, al menor costo posible [69].

### 1.3. Fármacos oncológicos

El Paclitaxel (Ptx), es un taxano que fue aislado de la corteza de tejo del Pacífico *Taxus brevifolia* en 1968 [122] y, junto con su análogo sintético, Docetaxel (Dtx), están aprobados para uso clínico por la FDA (Food and Drug Administration) en el tratamiento del cáncer de mama, de ovario, de pulmón no microcítico y de próstata [9, 93].

El Ptx es citotóxico y antiangiogénico, ambas propiedades contribuyen a su eficacia como agente anticancerígeno. El mecanismo de acción citotóxico está relacionado con su capacidad de bloquear el ciclo celular en la fase tardía G2-mitótica mediante la polimerización de la tubulina. Esta polimerización genera microtúbulos muy estables, que impide la dinámica normal de la reorganización de la red microtubular, proceso indispensable para completar la mitosis [99]. El efecto antiangiogénico puede ser atribuido tanto a la actividad citotóxica o citostática sobre células endoteliales, como a la inhibición de la formación de capilares y la migración celular. Es más, se ha demostrado que Ptx inhibe la

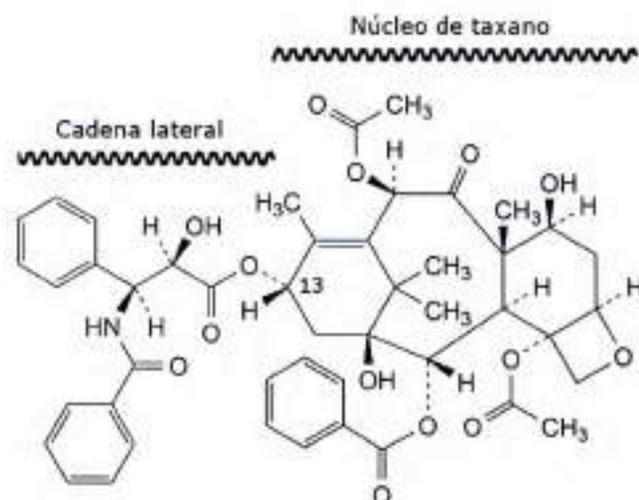


Figura 1.2: Estructura química del Paclitaxel. Fórmula molecular:  $C_{47}H_{51}NO_{14}$ . Peso molecular:  $853,90 \text{ g.mL}^{-1}$ . La molécula es insoluble en agua.

liberación de VEGF y Ang-1 de las células tumorales y aumenta la secreción de TSP-1 al microentorno tumoral [10].

El Ptx tiene una estructura química muy compleja en la que destaca un esqueleto hidrocarbonado formado por tres ciclos de 6, 8 y 6 carbonos polisustituido con cuatro metilos y ocho funciones oxigenadas, entre ellas, una de  $\beta$ -fenilisoserina que esterifica la posición C-13 (Figura 1.2). La molécula posee un total de once estereocentros. Tiene una baja solubilidad acuosa (menos de  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) lo que dificulta su formulación para administración parenteral [9]. Además emergen otros problemas importantes, tiene baja tasa de absorción, baja biodisponibilidad y problemas de agregación al ser administrados, lo que provoca alta concentración localizada y riesgo de embolia en los vasos sanguíneos.

Se han producido varios derivados del Ptx con la intención de mejorar la solubilidad, sin embargo la mayoría de estos derivados solubles tienen menor actividad antitumoral.

A partir de la década de los 90, Bristol-Myers comercializa Taxol<sup>®</sup> (Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ), una formulación en la que el Ptx se solubiliza en aceite de ricino polietoxilado (Cremophor<sup>®</sup>) al 50 % (v/v) en etanol deshidratado, para su administración parenteral. A pesar de que su uso está extendido el Taxol<sup>®</sup> presenta varias desventajas toxicológicas, farmacológicas y farmacéuticas. Entre ellas se ha descrito que, esta formulación precipita frente a la dilución con el líquido de infusión, y que puede formar precipitados fibrosos durante el almacenamiento por periodos prolongados de tiempo [41, 108]. Además, el Cremophor<sup>®</sup>

es un solvente orgánico tóxico, que provoca hipersensibilidad, neurotoxicidad y nefrotoxicidad por lo que es necesario premedicar con esteroides y antihistamínicos [109, 123].

Con el advenimiento de la nanotecnología farmacéutica mucho esfuerzo se volcó en la búsqueda de formulaciones alternativas menos tóxicas basadas en nanotransportadores.

## 1.4. Nanotransportadores

Los nanotransportadores resultan las formulaciones, tecnologías y sistemas para el transporte de un compuesto farmacéutico en el cuerpo que debe alcanzar de forma segura el efecto terapéutico deseado.

Un nanotransportador es un vehículo farmacéutico de dimensiones nanométricas. Típicamente están formados por uno o más compuestos organizados que pueden almacenar una molécula de interés, transportarla de manera segura y entregarla sin modificar su actividad biológica.

Se espera que un vehículo farmacéutico ideal tenga las siguientes propiedades: 1) una alta capacidad de carga, 2) un tamaño inferior a 100 nm, 3) una vida media en circulación prolongada y 4) compatibilidad con los entornos biológicos. A la vez se busca que el vehículo se acumule en sitios específicos para aumentar la efectividad y reducir la toxicidad del tratamiento. Además, por supuesto, debe ser susceptible de producirse a gran escala. Cualquier formulación que pueda cumplir con estos criterios, presenta grandes potencialidades de llegar a ser utilizada como un transportador [114].

Los nanotransportadores superan a los sistemas de administración de fármacos tradicionales en varios aspectos importantes. Destacándose por: 1) la posibilidad de solubilizar en agua compuestos altamente lipofílicos; 2) reducir la toxicidad; 3) aumentar la circulación media en sangre; 4) aumentar la concentración del principio activo en el tejido diana y 5) reducir la dosis. También aportan nuevas ventajas, como: 1) proteger al fármaco de la degradación prematura, 2) proteger al fármaco del reconocimiento del sistema de resistencia a fármacos, 3) evitar que el fármaco interaccione precozmente con ciertos entornos biológicos, 4) permitir la administración activa en tipos celulares seleccionados, 5) controlar el perfil farmacocinético mediante mecanismos de liberación físicos o químicos, 6) permitir ser aplicados como agentes de contraste para diagnóstico por imágenes, 7) ser

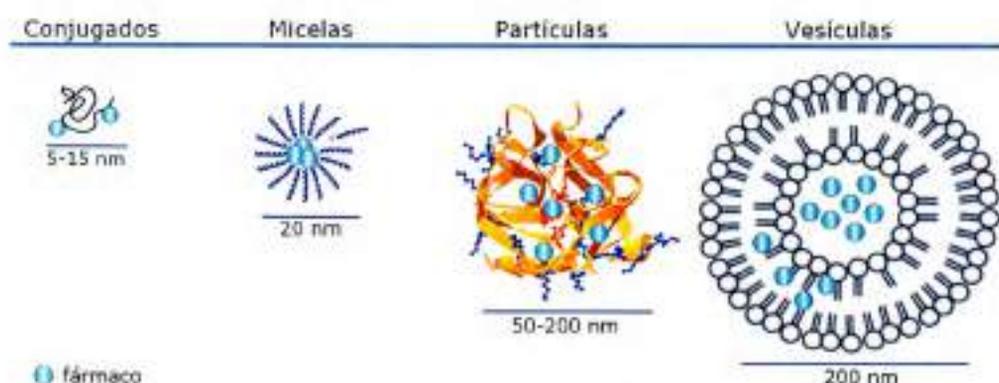


Figura 1.3: Esquema y tamaño de nanotransportadores estudiados para aplicación en quimioterapia contra el cáncer

diseñados para terapias génicas personalizadas [114]. Cabe destacar que, el nanotransportador diseñado debe superar los obstáculos de la producción y de las variables del mercado para llegar a ser comercializado.

En la Tabla 1.1 se resumen las principales características, ventajas y desventajas de sistemas nanotransportadores. Se puede apreciar que los nanotransportadores pueden ser preparados a partir de una variedad de materiales que incluyen polímeros (nanopartículas, micelas, conjugados o dendrímeros), lípidos (liposomas), virus (nanopartículas virales) o compuestos organometálicos (nanotubos) [20, 52, 85, 98, 127]. Aunque mucho interés han despertado estos sistemas en el área de la investigación de la manipulación de materiales a escala nanométrica muy pocos llegan a cumplir con los requisitos necesarios para ser aplicados clínicamente.

### 1.4.1. Nanotransportadores de fármacos oncológicos

Particularmente para cáncer se busca un incremento de la eficacia y disminución de la toxicidad controlando la biodistribución e incrementando la penetración intracelular. Los nanosistemas más estudiados para el desarrollo de medicamentos antineoplásicos han sido liposomas, nanopartículas, micelas poliméricas y conjugados poliméricos (Figura 1.3).

#### Liposomas

Son vesículas nanométricas formadas por una o más bicapas lipídicas constituidas por dos filas de lípidos enfrentadas por sus colas hidrofóbicas. El interior

Sistema	Estructura	Ventajas	Desventajas	Ejemplo
Partículas	Matriz Polimérica	-Variedad Morfológica -Funcionalizables	-Capacidad de carga limitada	Abtaxane
	Cubierta Polimérica	-Direccionables -Degradación Controlable	-Estabilidad por liofilización	Albúmina-Ptx
Micelas	Centros reservorio + Cubierta Copolímeros en bloque anfífilos	-Autoensamblables -Solubilizan PA hidrofóbicos espontáneamente -Evitan RES y riñón -Funcionalizables -Multifuncionables -Direccionables	-Inestabilidad frente a dilución -Polidispersión de tamaño	Genexol (PGA-Ptx)
Conjugados	Polímero lineal con unión covalente al PA	-Entrega pasiva -Biodegradable	-Localización inespecífica	Xyotax (PGA-Ptx)
Dendrímeros	Polímero sintético Monómeros hiper-ramificados emergiendo radialmente del centro	-Estables -Homogeneidad química y estructural -Baja Polidispersión -Alta densidad funcional -Degradación ajustable -Biodistribución	-Toxicidad -Biocompatibilidad reducida -Rápida liberación	PANAM MTX[61]
Liposomas	Vesícula Bicapa de fosfolípidos encerrando espacio acuoso	-Versátiles -Funcionalizables -Direccionables -Incorporan PA de distinta polaridad simultáneamente	-Elaboración compleja y costosa -Tamaño -Estabilidad por liofilización -Opsonización (RES) -Toxicidad	Doxeil Myocet
Partículas Virales	Caja de proteínas de cápside viral	-Autoensamblables -Variedad Morfológica -Geometría definida -Multivalentes -Multifuncionales -Direccionables	-Riesgo de respuesta inmune	HSP-DOX[33]
Nanotubos de Carbono	Cilindro hueco Bencenos	-Multifuncionales -Multivalentes	-Toxicidad -Insolubles en cualquier solvente -Bioincompatibles	NTC-MTX [91]

Tabla 1.1: Ventajas y desventajas de distintos sistemas nanotransportadores de fármacos

acoso de estas estructuras brinda la posibilidad de encapsular fármacos de naturaleza polar. Por otro lado, las moléculas lipofílicas y anfifílicas se pueden solubilizar dentro de la bicapa lipídica de acuerdo a su afinidad con los fosfolípidos (Figura 1.3) [68, 79].

Los procedimientos actuales de elaboración de liposomas son numerosos y, en general, tediosos y largos con resultados no siempre iguales. Además, estos preparados se desestabilizan con bastante rapidez en solución, por lo que deben ser conservados liofilizados para evitar la inestabilidad tanto física como química de la formulación [22]. Sumado a esto el uso de liposomas para administración endovenosa está limitado por la desestabilización que sufren en el torrente sanguíneo, relacionada con su interacción con las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Aunque esta interacción no es totalmente conocida, se sabe que las HDL actúan removiendo bicapas lipídicas, lo cual facilita la adsorción de opsoninas que juegan un papel importante en el reconocimiento de los liposomas y otras partículas por parte de los macrófagos del sistema retículo-endotelial [86]. Esta problemática ha conducido al desarrollo de los llamados liposomas "stealth" o estéricamente estabilizados, recurriendo al recubrimiento con polímeros hidrofílicos, flexibles y biocompatibles como polietilenglicoles (PEG). Estos liposomas pegilados tienen mayor vida media en circulación [112].

Una amplia variedad de fármacos citostáticos han sido incluidos en liposomas y en su mayoría se ha observado disminución de la toxicidad sobre todo para las antraciclinas como la doxorubicina (Dox), aunque también se ha observado la aparición de nueva toxicidad como la eritrodisestesia palmo-plantar [96, 127].

En la tabla 1.2 se presentan algunos ejemplos de formulaciones comercializadas basadas en la tecnología de los liposomas con sus principales características, el fármaco encapsulado, sus aplicaciones y su status de estudio clínico [69, 93].

## Nanopartículas

Las nanopartículas son partículas coloidales sólidas con un tamaño de 10 a varios cientos de nanómetros constituidas por polímeros naturales o sintéticos. Dependiendo del proceso seguido en su elaboración se pueden obtener dos tipos de estructuras: nanoesferas o nanocápsulas. Las primeras tienen una estructura tipo matriz, en la que el principio activo se encuentra dispersado y las segundas poseen un núcleo de carácter oleoso, que contiene el fármaco, rodeado de una cubierta polimérica. Debido a la elevada superficie específica de estos sistemas, el fármaco también puede ser adsorbido en su superficie (Figura 1.4) [52].

## Formulaciones liposomales

Nombre	Características	Fármaco	Indicación	Status
Doxil <sup>®</sup>	Pegilado	Doxorubicina	Cáncer de ovario y mama	Aprobado (1995)
Myocet <sup>®</sup>	No Pegilado	Doxorubicina	Cáncer de mama	Aprobado Europa y Canadá (2000)
DuonoXome <sup>®</sup>	No Pegilado	Dauxorubicina	Sarcoma de Kaposi	Aprobado (1996)
Thermodos <sup>®</sup>	Pegilado Termosensible	Doxorubicina	Carcinoma hepatocelular	Fase Clínica III
Marqibo <sup>®</sup>	No Pegilado	Vincristina	Leucemia linfoblástica aguda negativa para cromosoma Filadelfia	Aprobado (2012)
Depocyt <sup>®</sup>	Vesículas exocitricas empaquetadas	Citarabina	Meningitis linfomatosa	Aprobado (2007)

Tabla 1.2: Formulaciones liposomales para fármacos anticancerígenos actualmente aprobadas o en fase de investigación clínica.

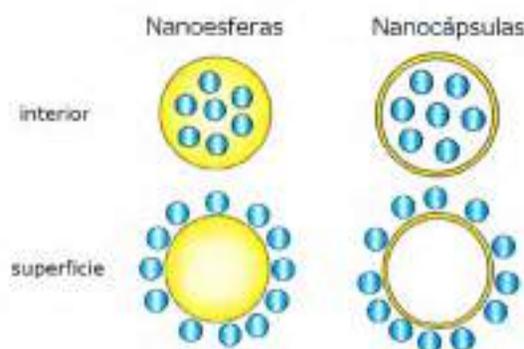


Figura 1.4: Nanopartículas con distinta estructura y ubicación del principio activo. Las nanoesferas son matrices mientras que las nanocápsulas son cubiertas. El principio activo puede estar disperso o encapsulado en el interior de la nanopartícula o adsorbido en la superficie.

Los métodos de preparación de las nanopartículas son muy numerosos. La elección del método de preparación depende de las características del material formador del sistema y de las características de solubilidad del principio activo que se desea incorporar. Las propiedades del material en aspectos como la biocompatibilidad, características de degradación, características de liberación deseadas para el principio activo son fundamentales a la hora de definir el tipo de aplicación biomédica. La conservación estable de estos sistemas se logra mediante la liofilización, siendo necesaria la incorporación de crioprotectores como la trehalosa que impidan la agregación de las nanopartículas durante el proceso, hecho que se presenta frecuentemente en las nanocápsulas [52].

La primera formulación de nanopartículas, Abraxane<sup>®</sup> fue aprobada por la FDA en 2005 para el tratamiento del cáncer de mama metastásico, en 2012 como un tratamiento de primera línea contra cáncer de pulmón de células no pequeñas en combinación con carboplatín para pacientes no candidatos cirugía o radioterapia, y en 2013 se aprobó para cáncer pancreático. El Abraxane<sup>®</sup> usa nanotecnología para combinar Ptx con partículas de albúmina de un tamaño medio de 130 nm, resultando en nanoesferas que vehiculizan un fármaco hidrofóbico y aprovechan el consumo preferencial de albúmina por parte de los tumores. Estudios han puesto de manifiesto que la albúmina interacciona con dos proteínas. La primera, llamada gp60, se localiza en la superficie de las células del endotelio vascular e interviene en el proceso de transición endotelial permitiendo que las nanopartículas se acumulen en el fluido intersticial que rodea el tumor [24]. La segunda, denominada SPARC o BM40 u osteonectina, se encuentra sobreexpresada en la superficie de muchas células tumorales [35].

Abraxis Bioscience ha empleado esta misma tecnología para la formulación de nanopartículas de albúmina con el fármaco citostático Dtx (ABI-008) y con el antibiótico rapamicina (ABI-009) [47]. Un aspecto importante del Abraxane es que se puede reconstituir para su administración endovenosa a concentraciones de  $2-10 \text{ mg.mL}^{-1}$ , aproximadamente diez veces más que la concentración a la que se puede reconstituir el Taxol<sup>®</sup> ( $0,3-1,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Esto permite disminuir el volumen de inyección y, por lo tanto, el tiempo de administración. Lo que elimina la necesidad de pre-medicación con esteroides y disminuye el peligro de lixiviación de plastificantes de las bolsas o tubos de infusión [93].

### Conjugados

El término conjugado se refiere a macromoléculas híbridas consistentes en polímeros enlazados covalentemente a un agente terapéutico. El objetivo perseguido con estos conjugados va desde mejorar la estabilidad del fármaco y reducir su inmunogenicidad hasta conseguir una biodistribución más adecuada [27, 69].

El DHA-paclitaxel o Taxoprexin<sup>®</sup> es un nuevo compuesto formado por unión covalente del ácido graso natural docosahexaenoico (DHA) y el paclitaxel. Este conjugado fue diseñado para funcionar como un profármaco y acumularse preferentemente en el tejido tumoral. El DHA-paclitaxel es preparado en un vehículo que contiene 80% menos de Cremophor<sup>®</sup> y etanol que la formulación estándar de Taxol<sup>®</sup>. Puede ser reconstituido en dextrosa al 5% a una concentración máxima de  $8 \text{ mg.mL}^{-1}$  y administrarse por vía intravenosa durante 2 horas cada 21 días. Sin embargo, debido a la presencia de Cremophor<sup>®</sup>, esta formulación también requiere una pre-medicación con esteroides y antihistamínicos, así como tubos y sistemas de filtración libres de policloruro de vinilo (PVC) [125].

Polyglumex-paclitaxel (CT-2103; Xytotax<sup>®</sup>) es otro conjugado postulado para aumentar la solubilidad de los fármacos hidrofóbicos, aumentar la permeabilidad al tumor y la retención del Ptx, reducir al mínimo la exposición del tejido normal al principio activo libre y evadir las bombas de flujo de múltiples fármacos a través de la captación tumoral por pinocitocis. Polyglumex-paclitaxel es una macromolécula que consiste en un polímero de ácido glutámico, un aminoácido de origen natural, biodegradable, soluble en agua que contiene 37% de Ptx. Cuando está unido al polímero el Ptx es inactivo, lo que permite proteger los tejidos sanos de la toxicidad del fármaco [93]. Es removido del polímero por una proteasa lisosomal, catepsina B, sobre-expresada en muchos tumores [83]. A diferencia de la formulación estándar de Ptx, la preparación clínica de polyglumex-

paclitaxel no contiene el vehículo tóxico Cremophor<sup>®</sup>, debido a la capacidad del ácido poliglutámico para mantener en estado soluble a moléculas altamente hidrofóbicas. Esto se traduce en tiempos de infusión más cortos y eliminación de la pre-medicación con esteroides y antihistamínicos. Estudios farmacocinéticos en humanos son consistentes con exposición prolongada del principio activo en el tumor y exposición sistémica limitada [19, 102]. Este conjugado está siendo evaluado clínicamente para tratamiento contra cáncer de mama metastásico [88].

### Micelas poliméricas

Las micelas son sistemas con una estructura tipo reservorio en donde se distingue un núcleo generalmente hidrofóbico y una superficie hidrofílica. Estos sistemas pueden ser utilizados para la solubilización, estabilización y liberación de numerosos fármacos de mayor o menor complejidad estructural. Las propiedades funcionales de las micelas formadas a partir de copolímeros anfífilicos las convierten en sistemas ideales para la encapsulación y liberación de fármacos de carácter hidrófobo. Los copolímeros dibloque anfífilicos están constituidos por al menos dos regiones de naturaleza química diferente que sufren una separación de fases como consecuencia de la asociación de las cadenas en solventes que selectivamente disuelven uno de los bloques. Durante el proceso de micelización los bloques hidrofóbicos se asocian, para formar un núcleo, en el que se asocia el fármaco, mientras que los segmentos hidrofílicos se sitúan entre el núcleo y el medio acuoso externo (Figura 1.5). La concentración de anfífilo a la cual se forman las micelas se denomina concentración micelar crítica (cmc), está dada por la estructura química del anfífilo y está asociada con la integridad del reservorio en solución [2].

Existe un gran interés en el uso de las micelas poliméricas como portadoras de fármacos como lo demuestran Adams [2] y Duncan [27]. En sus revisiones señalan que los tres grandes grupos de polímeros que forman el núcleo hidrofóbico son los poli-L-aminoácidos, los poliésteres o los polioxipropileno, en combinación con polioxietilenos como copolímero hidrofílico.

Algunas de las propiedades que destacan a las micelas como buenos sistemas de administración de fármacos son:

- El aumento de la solubilidad en agua de un fármaco hidrofóbico, mejora su biodisponibilidad; reduce su toxicidad y otros efectos adversos, aumenta su permeabilidad a través de las barreras fisiológicas y produce cambios sustanciales y favorables en la biodistribución del fármaco [112].

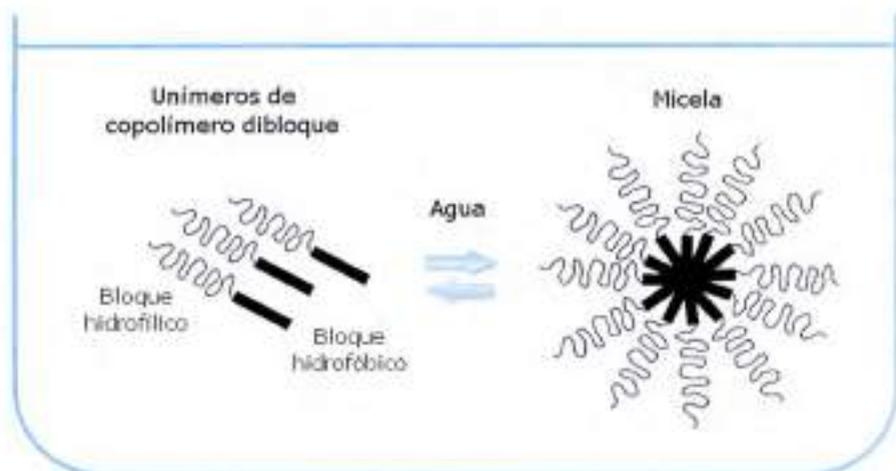


Figura 1.5: Equilibrio dinámico de copolímeros dibloque en agua. Los unímeros anfipáticos se autoagregan espontáneamente.

- La protección del fármaco contra hidrólisis o degradación enzimática gracias a la cubierta hidrofílica que lo separan del ambiente acuoso externo.
- El aumento de la vida media en circulación del fármaco evadiendo mecanismos fisiológicos normales de eliminación. Por un lado las micelas tienen un peso molecular del orden de  $10^6$  Da por lo que no son filtradas por riñón [52], y por otro la cubierta hidrofílica impide fenómenos indeseables como agregación inter-micelar, adhesión, fusión con glóbulos rojos o reconocimiento por los macrófagos del sistema retículo endotelial (SRE). El PEG es uno de los polímeros más aplicados para conseguir cubiertas hidrofílicas, no solo en micelas sino también en otros sistemas como los liposomas pegilados mencionados anteriormente. El PEG minimiza la adsorción de proteínas a las superficies debido a que disminuye la energía libre interfacial con el agua, eleva la hidrosolubilidad, aumenta la movilidad por lo que mejoran la biocompatibilidad de numerosas sustancias extrañas [62, 64, 128]. Las micelas poliméricas que hacen uso de esta estrategia construyen la región hidrofílica del polímero con PEG, como por ejemplo el Genexol-PM que transporta Ptx encapsulado en micelas de un polímero anfipático dibloque de ácido poliláctico (PLA) y PEG (PLA-PEG). Este nanomedicamento está aprobado para tratamiento contra cáncer de mama en Europa y Korea [89, 93] y en fase II de estudios clínicos para cáncer avanzado de pulmón de células no pequeñas [4]. Finalmente cabe destacar que, al aumentar la vida media en circulación las micelas permiten reducir dosis, volúmenes y tiempo de

inyección.

- El direccionamiento pasivo al tumor por efecto de la permeabilidad y retención aumentadas que ocurre en el microentorno tumoral. El tamaño habitual de las micelas varía entre 20-50 nm, lo que les permite pasar a través de los capilares defectuosos que alimentan los tejidos tumorales [112]. Por otro lado, el pequeño tamaño de las micelas poliméricas permite la esterilización, relativamente sencilla, por filtración [52, 89].
- Las micelas poliméricas pueden ser funcionalizadas y direccionadas. Además de la posibilidad de este direccionamiento pasivo debido a su tamaño, las micelas pueden unir químicamente moléculas destino-específicas en su superficie, como anticuerpos específicos [60] o ligandos de receptores de membrana sobre-expresados en tumores como ácido fólico [126] o proteínas de cubierta de fagos [121]. Las micelas son tan versátiles que pueden ser diseñadas con sistemas de activación mediados por cambios en el pH del medio ambiente [37] o por temperatura [13]. Tales modificaciones ofrecen control sobre la tasa de liberación y ubicación del fármaco y la integridad de la partícula.
- La versatilidad de las micelas permiten que se utilicen para distintas vías de administración. Se han descrito formulaciones basadas en micelas poliméricas para aplicaciones de uso parenteral [103], oral [81], nasal y ocular [94].

Los métodos más frecuentemente utilizados para la inclusión de fármacos en micelas son: la disolución directa, diálisis, emulsión aceite-agua, conjugación química, complejación y diversos métodos de evaporación del disolvente. Por otra parte, dependiendo del método utilizado, la carga del fármaco se puede realizar durante la micelización o posteriormente [52].

Las micelas poliméricas típicamente poseen *cmc* bastante menores ( $cmc \sim 10^{-6}M$ ) que las micelas preparadas de detergentes convencionales ( $cmc \sim 10^{-3}M$ ) [52]. Sin embargo, uno de los principales obstáculos que retrasa la aplicación clínica de los sistemas micelares de administración de fármacos es la capacidad de conservar su integridad frente a la dilución en la vía endovenosa. Además, aunque no se puede descartar del todo el riesgo de respuesta inmune no deseada o toxicidad, por su sencillez y versatilidad en cuanto a preparación y componentes empleados, las micelas son consideradas hoy en día como los nanomedicamentos con mayor potencial en clínica a corto plazo [107, 133].

Algunas de las formulaciones que se encuentran en estudios clínicos avanzados para la terapia de diferentes tipos de cáncer con resultados prometedores se detallan en la Tabla 1.3. Los taxanos, como el Ptx, debido a su naturaleza hidrofóbica y a su muy baja solubilidad en agua son algunos de los candidatos ideales para ser formulados mediante esta herramienta.

Nombre	Copolímero de Bloque	Principio Activo	Diámetro (mm)	Cáncer	Fase Clínica	Ref.
NK012	PEG PGlu(SN-38)	SN-38	20	Mama	II	[82]
NK105	PEG P(aspartato)	Paclitaxel	85	Estómago	II	[110]
SP 1049C	Plurónico L61 y F127	Doxorrubicina	22-27	Adenocarcinoma de esófago, unión estómago	III	[23]
NC-0004	PEG	Cisplatino	30	Tumor sólido	I / II	[124]
Generxol-PM	PEG P(D,L-láctico)	Paclitaxel	20-50	Mama	II	[56]
				Pancreático	II	[95]
				Pulmón	II	[57]
				Ovario	I / II	[58]

Tabla 1.3: Micelas poliméricas en distinta fase de estadios clínicos. Adaptado de Oerlemans y col. [89].

Cabe mencionar también, que se encuentra en fase III de estudios clínicos para el tratamiento de cáncer ovárico una formulación (Paclical), que vehiculiza Ptx en micelas no poliméricas. Esta tecnología a partir de vitamina A, en una plataforma denominada XR-17, ha sido recientemente suscripta para su aprobación para comercialización en Europa [118, 119].

## 1.5. Termodinámica de micelas

Las moléculas anfipáticas o anfífilos presentan una porción hidrofóbica y otra hidrofílica (Figura 1.6 A). La dispersión de un anfífilo en agua implica que moléculas de agua se estructuren alrededor de la región hidrofóbica a costa de perder

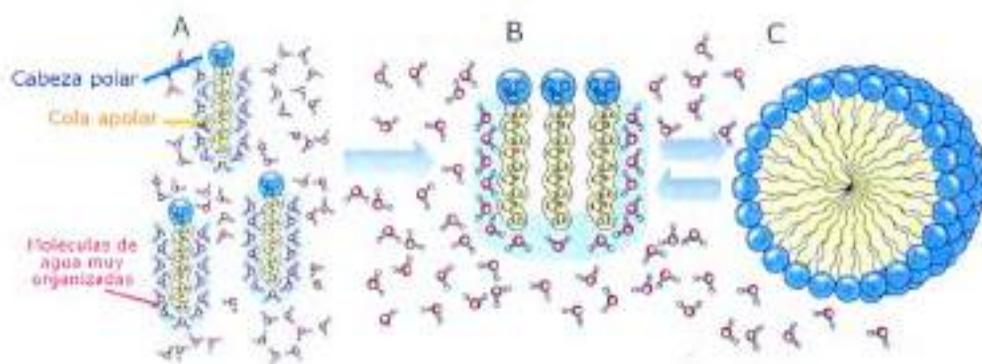


Figura 1.6: Efecto hidrofóbico. A) ácido graso con cadena hidrocarbónica rodeada de moléculas de agua altamente ordenadas. B) Al agruparse en micelas reducen al mínimo la exposición de las regiones apolares al agua, minimizan la cantidad de moléculas de agua ordenadas y maximizan la entropía del sistema. La energía generada al liberar las moléculas de agua inmovilizadas estabiliza las micelas.

los puentes hidrógenos con los que interaccionan con otras moléculas de agua en el seno del líquido (Figura 1.6 A). Cuando los anfifilos se agrupan el área superficial hidrofóbica expuesta al agua es menor, por lo que se “liberan” moléculas de agua y el sistema adquiere más desorden, disminuyendo la energía libre (Figura 1.6 B). Así, la formación de micelas en agua (Figura 1.6 C) es impulsada por la disminución de la energía libre del sistema debido a la remoción de fragmentos hidrofóbicos del ambiente acuoso y el re-establecimiento de la red de puentes hidrógeno en el agua. La ganancia adicional de energía resulta de la formación de uniones de Van der Waals entre los bloques hidrofóbicos en el núcleo de las micelas [54].

Es bien sabido que las moléculas anfifílicas tienen propiedades surfactantes. De hecho cuando se agregan pequeñas cantidades al agua, disminuye progresivamente la tensión superficial a medida que aumento la concentración del anfifilo. Esto se debe a que las moléculas migran espontáneamente hacia la superficie libre del líquido, organizándose en una monocapa, que determina dos dominios: uno hidrofóbico y otro hidrofílico (Figura 1.7).

La tensión superficial ( $\gamma$ ) de la solución está dada por

$$\gamma = \gamma_w - \pi \quad (1.1)$$

Donde  $\gamma_w$  es la tensión superficial del agua y  $\pi$  es la presión de superficie de la monocapa de anfifilo, cuando las moléculas están en equilibrio con las moléculas en el volumen de la solución.

El agregado progresivo de moléculas a la solución disminuye la tensión super-

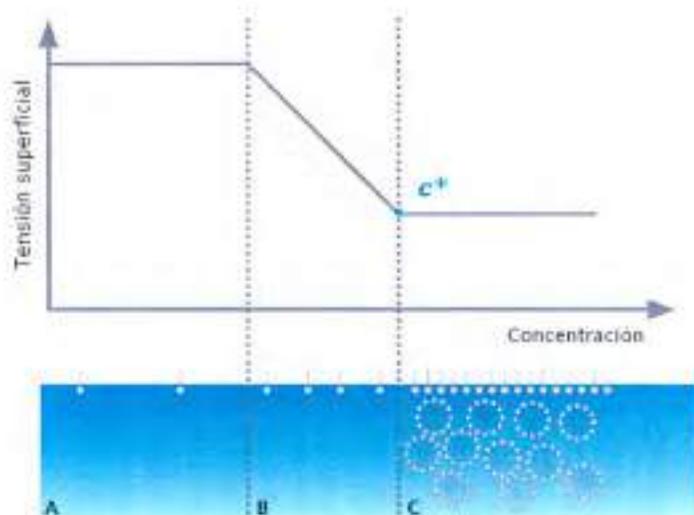


Figura 1.7: Tensión superficial en función de la concentración de anfifilo. A baja concentración las moléculas migran a la superficie libre del líquido disminuyendo la tensión superficial (B), hasta una concentración crítica ( $c^*$ ) donde la densidad de moléculas en la superficie no puede aumentar más, los anfifilos deben organizarse en el seno de la solución (C), y la tensión superficial permanece constante.

ficial hasta una concentración  $c^*$  en la que la densidad del anfifilo en la monocapa no puede aumentar más (Figura 1.7 C), la superficie de la solución está totalmente ocupada por moléculas.

A partir de  $c^*$ ,  $\gamma$  no cambia, y los anfifilos deben organizarse de otra manera para obtener una interfaz en el volumen de la solución. Esto se logra mediante la autoagregación supramolecular en estructuras en donde las moléculas una a lado de las otras exponen su lado hidrofílico hacia el agua y ocultan el lado hidrofóbico del agua, formando así dominios hidrofóbicos dispersos en una fase continua acuosa (Figura 1.7). Nuevamente las moléculas que participan de los agregados están en equilibrio con moléculas libres (unímeros) en el volumen de la solución, o, en términos termodinámicos, la energía libre de la fracción molar de los anfifilos no asociados ( $X_1$ ) es igual a la energía libre de la fracción molar de los anfifilos agregados ( $X_N$ ) con  $N$  cantidad de moléculas [104]:

$$\mu_N^0 + \frac{RT}{N} \ln \left( \frac{X_N}{N} \right) = \mu_1^0 + RT \ln X_1 \quad (1.2)$$

Los términos entálpicos, representados por los potenciales químicos de los agregados ( $\mu_N^0$ ) y de los unímeros ( $\mu_1^0$ ), están relacionados con las interacciones entre moléculas del anfifilo o moléculas de solvente. El término entrópico está relacionado con las posibles configuraciones del sistema.

La ecuación de la energía libre puede expresarse en términos de la función de distribución de las moléculas en estructuras con número de agregación  $N$ :

$$X_N = N \left[ X_1 \exp \left( \frac{\mu_1^0 - \mu_N^0}{RT} \right) \right]^N \quad (1.3)$$

Algunas observaciones se desprenden de esta expresión. Primero, los agregados se forman solo cuando  $\mu_N^0 < \mu_1^0$ , de otra forma el signo negativo del exponencial haría  $X_N$  muy pequeño en relación a  $X_1$ , y el estado no asociado sería el favorecido. En otras palabras, la agregación debe aportar ventajas energéticas al sistema.

Segundo,  $X_N$  aumenta abruptamente cuando  $f(X_1, \mu_1^0, \mu_N^0)$  alcanza 1, este es el caso cuando  $X_1$  alcanza el siguiente valor:

$$X_1^* = \exp \left( -\frac{\mu_1^0 - \mu_N^0}{RT} \right) \quad (1.4)$$

Desde este punto en adelante, cualquier molécula incorporada en la solución poblará  $X_N$ , dejando a  $X_1^*$  casi sin cambios. De hecho, un aumento importante en  $X_1$  por encima de  $X_1^*$  difícilmente ocurra en presencia de una condición de asociación más probable. Una disminución significativa de  $X_1$  por debajo de  $X_1^*$  llevaría la  $f(X_1, \mu_1^0, \mu_N^0)$  por debajo de la unidad, favoreciendo la población de unímeros  $X_1^*$  [6].

El valor de  $X_1^*$  es equivalente a la *cmc* para el caso de los anfifilos que forman micelas. Para anfifilos que forman otras estructuras distintas de las micelas en solución acuosa la *cmc* es la concentración de agregación crítica, que es la concentración a la cual se comienzan a formar los agregados.

$$cmc = X_1^* = \exp \left( -\frac{\mu_1^0 - \mu_N^0}{RT} \right) \quad (1.5)$$

La *cmc* está determinada por el balance hidrofílico hidrofóbico de la molécula de anfifilo, uno tendiendo a aumentar, el otro a disminuir, su valor. La *cmc* y las características estructurales de los agregados dependen de los mismos parámetros, como por ejemplo la forma y profundidad del  $\mu_N^0$ , que está relacionado con las características hidrofóbicas e hidrofílicas del anfifilo. Estos parámetros gobiernan las interacciones entre las moléculas de soluto y las de solvente.

La evaluación del término  $-\Delta\mu = \mu_1^0 - \mu_N^0$  de la expresión 1.5, como la energía ganada por la asociación, permite la estimación del valor de la *cmc* para

un anfífilo dado y sus posibles modificaciones en función del cambio en las características hidrofílicas-hidrofóbicas de la molécula. Una contribución negativa a  $\mu_N^0$ , favoreciendo la agregación, estará dada por cualquier arreglo que tienda a evitar los contactos desfavorables entre el solvente y las regiones hidrofóbicas. Contribuciones positivas a  $\mu_N^0$  provendrán de los contactos de residuos en la interfaz, aumentadas por la repulsión de las cabezas polares (efectos de carga, estéricos e hidratación).

De acuerdo a Tanford [111], la parte atractiva  $\Delta\mu$ ,  $\Delta\mu_A$ , puede estimarse a partir de la energía ganada al remover una cadena hidrocarbonada del solvente acuoso. Teniendo en cuenta que los grupos  $-CH_3$  terminales de las cadenas de los lípidos aportan  $-2100 \text{ cal.mol}^{-1}$  y los  $CH_2$   $-700 \text{ cal.mol}^{-1}$ . Por lo tanto para un anfífilo con una cadena hidrofóbica con  $n$  átomos de carbonos

$$\Delta\mu_A \approx -2100 - (n - 2) \cdot 700 \cdot \text{cal.mol}^{-1} \quad (1.6)$$

La parte repulsiva de  $\Delta\mu$ ,  $\Delta\mu_R$ , es difícil de evaluar a partir de consideraciones generales sobre la estructura del anfífilo, porque las variables estéricas, de hidratación y de carga que intervienen en la interacción entre cabezas polares no están bien establecidas. Sin embargo, una enunciación muy simple puede ayudar a sobrepasar esta dificultad. Los contactos entre los residuos de los dominios hidrofílico e hidrofóbico en la interfaz tienden a obstaculizar la agregación, lo que reduce la energía ganada por la asociación. La dimensión de esa interfaz por molécula está influenciada por la repulsión entre cabezas polares. Se podría decir que, una vez que el agregado se ha formado, el área efectiva por molécula en la interfaz,  $a_0$ , es el resultado de esas interacciones, sin necesidad de profundizar en la esquematización. La contribución repulsiva es proporcional a  $a_0$  vía una constante que tiene la dimensión de la tensión superficial y un valor que cae entre 20 y  $50 \text{ erg/cm}^2$  ( $29.72 \text{ cal/mol.Å}^2$ ) [49].

Las dificultades para evaluar el  $\Delta\mu$  no quedan todavía totalmente resueltas considerando la estructura de agregación. La optimización de la configuración energética del sistema anfífilo-agua también depende de  $\Delta\mu$ .

Como no hay una forma simple, más que la geométrica, para esquematizar la parte repulsiva de  $\Delta\mu$ , se ha propuesto un modelo geométrico para describir la organización de los números en agregados. Las consideraciones termodinámicas y los requerimientos descriptos hasta el momento han sido resumidos y traducidos en términos geométricos.

Hay algunas reglas simples de empaquetamiento de un anfifilo en agregados. Por un lado, excepto por la rugosidad de la superficie, no puede haber agua dentro del dominio hidrofóbico, por lo que la dimensión de un agregado no puede exceder el largo de dos regiones hidrofóbicas. Y, por otro lado, la cabeza polar necesita contacto con el agua.

En el marco del modelo de las "fuerzas opuestas" [111] las fuerzas hidrofóbicas y tensiones de superficie se resumen en una interacción atractiva actuando en la interfaz cadena hidrocarbonada-agua y fuerzas repulsivas entre cabezas polares, debido a efectos electrostáticos, de hidratación o estéricos que se suman a las interacciones repulsivas que, en el caso de cabezas polares pequeñas, actúan en la misma interfaz. Por lo tanto hay dos fuerzas opuestas en dicha interfaz, una tendiendo a aumentar, otra a disminuir el área interfacial por cabeza polar expuesta a la fase acuosa: ambas encuentran un balance que corresponde a un área superficial óptima  $a_0$ , que se asume es el área de interfaz que ocupa un número en el agregado.

Seguindo estas observaciones se puede trazar unas pautas de empaquetamiento basadas en constricciones geométricas [51]. La región ocupada por la molécula del anfifilo dentro del agregado puede caracterizarse con tres parámetros: el volumen efectivo ocupado por la cadena hidrofóbica  $V$ , la longitud máxima efectiva de la cadena  $l_c$ , y el área efectiva de la cabeza hidrofílica en la interfaz del agregado con el medio circundante  $a_0$  Figura 1.8. Los tres parámetros se relacionan a través del llamado parámetro crítico de empaquetamiento  $P = V/a_0 l_c$ , el cual toma valores límites de  $1/3$  para un verdadero cono y  $1$  para un cilindro. Vesículas, liposomas y en general estructuras tipo membrana se forman cuando  $1/2 < P < 1$  y micelas cuando  $1/3 < P < 1/2$ . Valores de  $P$  más altos identifican micelas más grandes y asimétricas (Figura 1.8) [50].

La facilidad de evaluar  $\Delta\mu_A$  en relación a  $\Delta\mu_R$ , se traduce acá en el hecho de que mientras  $l_c$  y  $V$  se pueden calcular con buena aproximación una vez que se conoce la estructura química de la porción hidrofóbica, el área interfacial  $a_0$  es una propiedad de los números en el estado agregado, y es la resultante del set completo de interacciones que están ocurriendo entre ellos.

Un poco más de ambigüedad en la evaluación de  $a_0$  surge cuando las interacciones repulsivas entre las cadenas de lípidos, o entre cabezas polares considerando su extensión, carga y ramificaciones, son tenidas en cuenta. Como una esquematización detallada es casi imposible, la resultante dentro del marco de modelo, es

Parámetro de empaquetamiento	Forma de la molécula	Agregado
$P < 1/2$	Cono 	 <b>Micela</b>
$1/2 < P < 1$	Cono truncado 	 <b>Vesícula</b>
$P \approx 1$	Cilíndrica 	 <b>Lamelar Cúbico</b>
$P > 1$	Cono truncado invertido 	 <b>Micela invertida</b>

Figura 1.8: Parámetro crítico de empaquetamiento ( $P$ ), forma de la molécula de anfifilo y estructura de agregación asociadas. Volumen efectivo ocupado por la cadena hidrofóbica  $V$ , longitud máxima efectiva de la cadena  $l_c$ , y área efectiva de la cabeza hidrofílica en la interfaz del agregado con el medio circundante  $a_0$ , que definen a  $P$  como  $P = V/a_0 l_c$ .

que la superficie donde las fuerzas opuestas actúan no se puede asumir como el límite entre la región hidrofóbica-hidrofílica, sino más bien una superficie dentro de una distancia  $D$  por debajo y por encima de la interfaz, de acuerdo a si prevalecen las fuerzas repulsivas de la cola o la cabeza del lípido [50]. En cualquier caso un área de superficie interfacial óptima  $a_0$  puede ser definida y calculada a posteriori de conocer las propiedades físicas de los agregados, o estimada a priori con algunas consideraciones razonables o por comparación con moléculas similares.

Hemos visto que el comportamiento físico de los anfifilos en solución depende de la extensión y el balance hidrofóbico-hidrofílico, resumido en términos termodinámicos en muchas de las expresiones descriptas previamente. Diferentes aspectos de ese comportamiento están muy relacionados. Por ejemplo, una característica hidrofílica fuerte en comparación con la hidrofóbica, se verá reflejada en una alta *cmc* y en un número mayor de unímeros libres con una alta tasa de recambio al estado de agregación constituido por pequeños agregados cuasi-esféricos de mucha curvatura. Cualquier cambio en las características hidrofóbicas o hidrofílicas afectará estas propiedades con cierta consistencia en la tendencia [104].

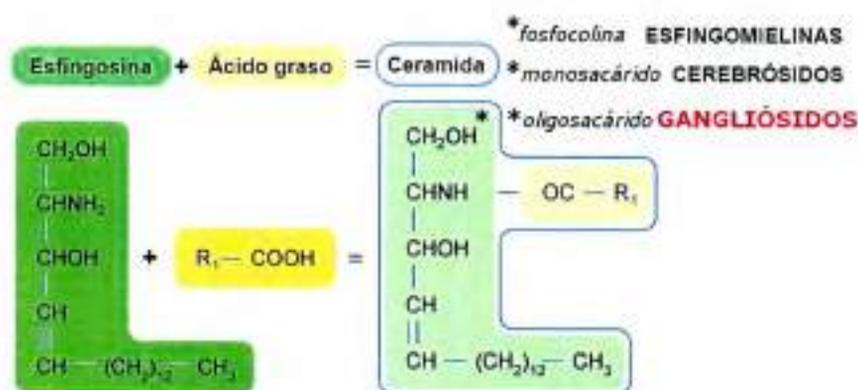


Figura 1.9: Esfingolípidos. La ceramida, formada por la unión de esfingosina y un ácido graso, constituye la región hidrofóbica común de los esfingolípidos. La región hidrofílica varía para los distintos esfingolípidos. Las esfingomielinas poseen fosfolina, los cerebrosidos poseen monosacáridos y los gangliósidos poseen oligosacáridos

Lo expuesto señala que, la forma y tamaño de los agregados micelares dependen de la geometría molecular de las moléculas de tensioactivo que lo constituyen. Pero también las condiciones de la solución como la concentración de tensioactivo, temperatura, pH, y fuerza iónica afectan las propiedades de agregación. El control sobre las formas da una posibilidad de manipular la arquitectura de las nanoestructuras. De esta manera, se pueden desarrollar sistemas funcionales para una amplia gama de aplicaciones tecnológicas en diferentes campos de la ciencia [25].

## 1.6. Gangliósidos: lípidos anfipáticos

Los gangliósidos son lípidos altamente anfipáticos. La región hidrofóbica está constituida por la ceramida formada por una doble cola hidrofóbica, común a todos los esfingolípidos de esfingosina, y un ácido graso (Figura 1.9). La región hidrofílica está compuesta por carbohidratos, que incluye al menos entre uno y cuatro monosacáridos y entre uno y cuatro residuos de ácido siálico (Figura 1.10). Así estos glicolípidos complejos son reconocidos por ser ácidos, solubles en agua y pobremente dializables [1].

La cadena de oligosacáridos de los gangliósidos es variable en estructura, contenido, secuencia, y conexiones de los azúcares. Esto hace que los gangliósidos formen una familia muy grande de compuestos que se sintetizan a través de la adición de monosacáridos en un proceso paso a paso, por medio de glucosiltransferasas y sialiltransferasas (Figura 1.10).

Estos lípidos se encuentran en grandes cantidades en las membranas de células eucariotas, particularmente en los tejidos del sistema nervioso. La ceramida está inserta en la capa externa de la bicapa con la voluminosa cabeza polar sacárida protruyendo al medio extracelular [105]. Los gangliósidos influyen en la dinámica funcional de las membranas celulares de varias maneras: contribuyen a la rigidez de las membranas, están implicados en la transferencia de información entre las células vecinas o entre las superficies de células y el medio extracelular (neurotransmisores, hormonas) y modulan el crecimiento celular mediante la regulación de procesos de proliferación y maduración [44]. Por otro lado, estos glicosfingolípidos se unen específicamente a virus y diversas toxinas bacterianas, tales como la botulínica, tetánica y colérica, y median las interacciones entre los microbios y las células huésped durante las infecciones [32].

Además de estas funciones endógenas, se ha observado que los gangliósidos administrados exógenamente poseen actividad biológica. Varios reportes han sugerido que los gangliósidos podrían exhibir una actividad antioxidante, en particular sobre la peroxidación lipídica. Hay evidencias de que esta actividad antioxidante sería a través de cambios en la fluidez de la membrana y la estabilización de la misma [7, 117].

En la Figura 1.11 se puede ver en detalle la estructura de la cadena de oligosacáridos de la serie de gangliósidos estudiados en este trabajo, GM1, GD1a, GD1b y GT1b.

### 1.6.1. Agregación de gangliósidos en solución

Como ya se mencionó anteriormente por su carácter anfifílico los gangliósidos en solventes acuosos se organizan en estructuras en las que se distinguen dominios hidrofóbicos e hidrofílicos. La extensión y conexión entre estos dominios depende principalmente de la concentración. Limitaremos la descripción de las propiedades de agregación de soluciones de gangliósidos muy diluidas, donde las propiedades termodinámicas simples describen en detalle el fenómeno de agregación [104].

Los gangliósidos tienen un carácter hidrofílico grande comparado con otros lípidos, que aumenta progresivamente a medida que aumenta la complejidad de la cabeza polar a lo largo de la serie de moléculas en la que se adicionan anillos de azúcar de forma extendida o ramificada. (Figura 1.12)

Como el balance hidrofílico-hidrofóbico es la resultante de la competencia entre dos requerimientos opuestos muy fuertes, cualquier variación en esos requie-

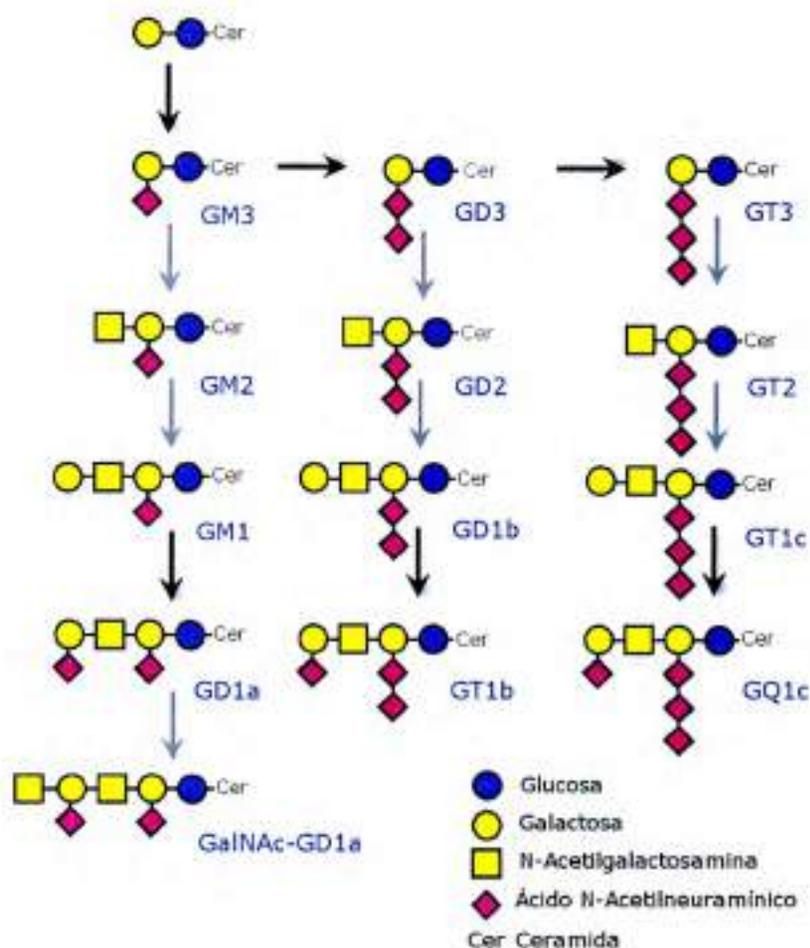


Figura 1.10: Vías de biosíntesis de los gangliósidos más comunes. Las flechas negras indican la actividad de las glucosiltransferasas que incorporan ácido N-Acetilneuramínico; las flechas grises la actividad de las glucosiltransferasas que incorporan azúcares.

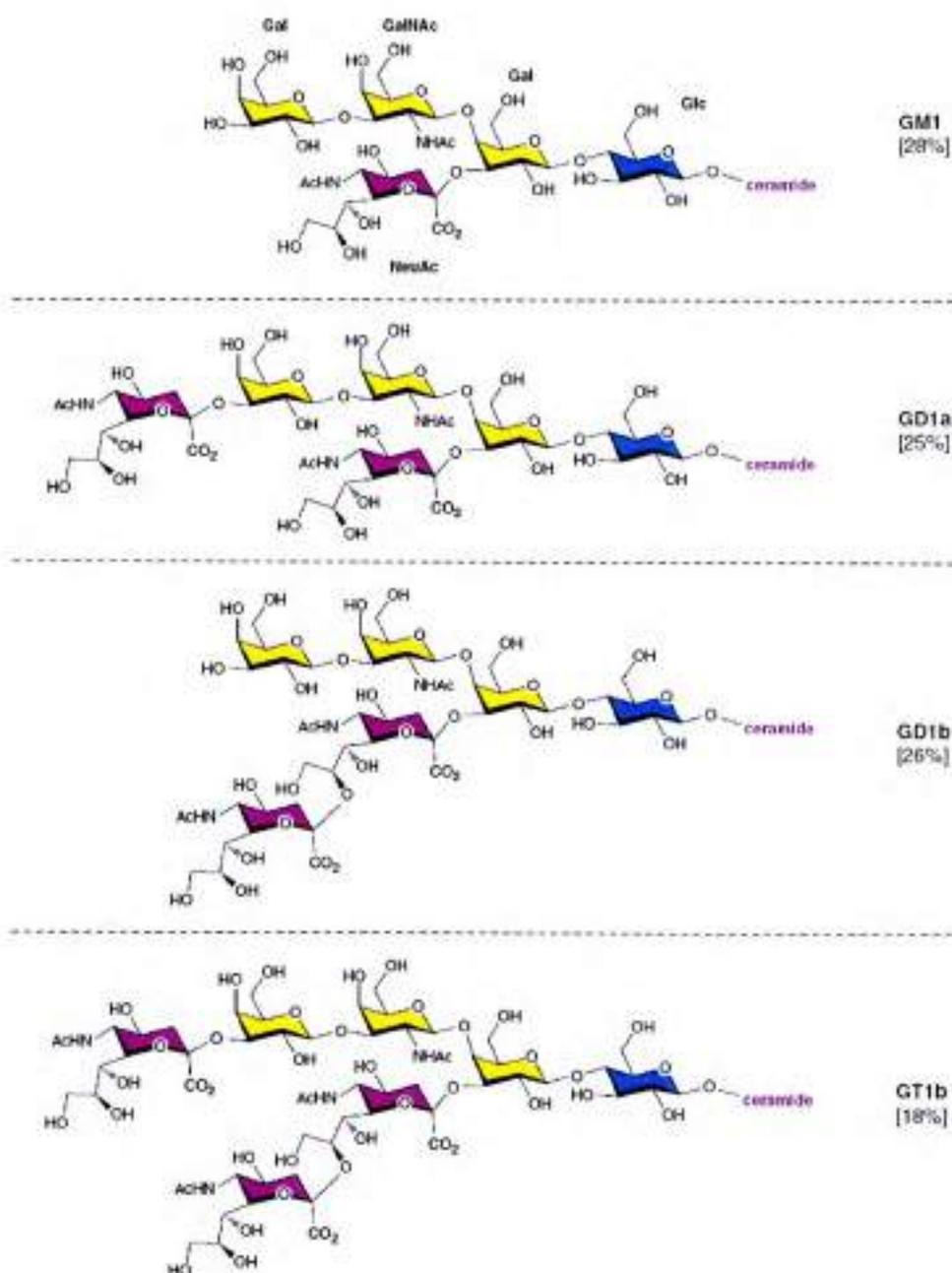


Figura 1.11: Los cuatro principales gangliosidos de cerebro de mamíferos y aves comparten el mismo núcleo tetrasacárido neutro (Gal  $\beta$ 1-3  $\beta$ 1-3 GalNAc  $\beta$ 1-4 Gal  $\beta$ 1-4 Glc) unido a la ceramida, con distintos números y posiciones de enlace de ácido siálico. En color amarillo: Gal/GalNAc; azul: Glc y púrpura: NeuAc. Los porcentajes molares son respecto al total de gangliosidos de cerebro humano [100]

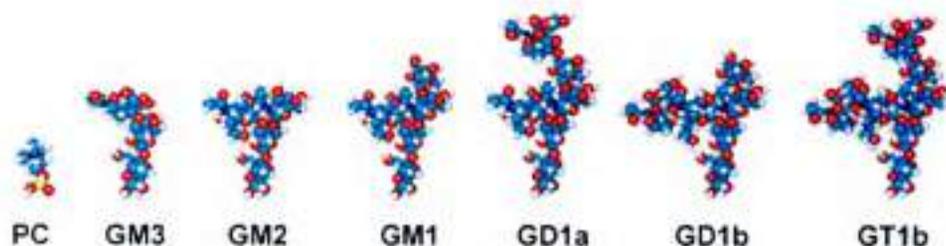


Figura 1.12: Representación esquemática del grupo polar de distintos gangliósidos. Aumento progresivo del volumen ocupado por la cadena oligosacárida, debido al aumento en la complejidad estructural. La colina, que es el grupo polar más grande de los fosfolípidos, se muestra a la derecha para comparar con las cadenas de los glicolípidos. La región hidrofóbica no está representada [105].

rimientos afectará el comportamiento de agregación.

Dentro de la serie de gangliósidos GM3, GM2, GM1, GD1a, GalNAc-GD1a, GD1b, GD1b-L y GT1b (Figura 1.10 y 1.12), todos comparten la misma región hidrofóbica pero exhiben diferentes cabezas polares (Figura 1.12), por lo que las propiedades geométricas de agregación pueden atribuirse cualitativamente a la región hidrofílica. De hecho, diferentes gangliósidos dentro de un agregado necesitan un área interfacial lo suficientemente grande para acomodar las cadenas oligosacáridas y su agua de hidratación. Cuanto mayor es el área interfacial necesaria, más pequeño es el agregado y menor el número de agregación. Por lo tanto las propiedades de agregación de los gangliósidos en solución pueden utilizarse para revelar pequeños cambios conformacionales [104].

La Tabla 1.4 muestra los parámetros físicos-químicos de diferentes gangliósidos deducidos a partir de resultados de dispersión dinámica y estática de la radiación, realizados a partir de soluciones muy diluidas [14, 104, 105]. Las dimensiones hidrofóbicas de los anfifilos se calcularon de acuerdo a lo sugerido por Tanford [111] y las consideraciones específicas son una longitud de cadena  $l_c = 26,64\text{Å}$  y un volumen  $V = 965\text{Å}^3$ . El valor de  $l_c$  fue utilizado como parámetro para evaluar el área  $a_0$  de acuerdo al modelo geométrico de Israelachvili [51], mientras que el largo de semieje menor del core de micelas globulares en la simulación hidrodinámica se asumió como  $l = l_c \cdot 0,8 = 18,91\text{Å}$ . La extensión de la capa hidrofílica fue evaluada de acuerdo a Maggio [74], por ejemplo  $4\text{Å}$  por cada residuo de azúcar en la cadena lineal, reducido por un factor de flexibilidad de 0,68.

En principio, la extensión de la doble cadena hidrofóbica debería conferir a los gangliósidos la posibilidad de formar bicapas. De hecho GM3, el de menor cabeza polar de la serie (Figura 1.12) forma vesículas, aunque distintas a las clásicas

	Azúcares	$PM_n$ (Da)	Agregado	N	$PM_a$ (KDa)	$R_H$ (Å)	$a_0$ (Å <sup>2</sup> )
GM3	3	1195	vesículas	~14000	~16700	~250	~80
GM2	4	1398	micelas	451	630	66	92
GM1	5	1560	micelas	301	470	58.7	95.4
GD1a	6	1851	micelas	226	418	58	98.1
GD1b	6	1851	micelas	170	311	52	100.8
GT1b	7	2142	micelas	176	377	53.2	100.8

Tabla 1.4: Parámetros físico-químicos de distintos gangliósidos: cantidad de azúcares en la cabeza polar, peso molecular del número ( $PM_n$ ) en Daltons (Da), estructura de agregación, número de agregación (N), peso molecular del agregado ( $PM_a$ ) en kiloDaltons (KDa), radio hidrodinámico ( $R_H$ ) en Angstrom (Å) y área de superficie interfacial del número en el agregado ( $a_0$ ) en Angstrom cuadrados (Å<sup>2</sup>).

vesículas de fosfolípidos. Una particularidad de las vesículas de gangliósidos es que se forman espontáneamente, sin necesidad de energía externa adicional (sonicación, cambios de pH, etc.). Este comportamiento se debe a una propiedad de las bicapas, la curvatura. La curvatura determina si esa bicapa puede curvarse lo suficiente para formar una vesícula. Dicho en otras palabras, para que se forme una vesícula en agua la organización de los números debe tener la suficiente "elasticidad" para ofrecer opciones de curvatura que posibilite una esfera hueca con paredes de lípidos organizados en bicapas. El balance hidrofílico-hidrofóbico de los gangliósidos permite estructurarse en bicapas con la curvatura suficiente para formar una estructura globular espontáneamente, lo cual no sucede en las bicapas de fosfolípidos [105].

Para gangliósidos de mayor complejidad que el GM3 el papel que juega la región hidrofílica de la molécula es sumamente importante. Desde GM2 a GT1b, la cabeza polar está tan extendida que a pesar de la presencia de una doble cola hidrofóbica, estos gangliósidos forman micelas y no vesículas [14].

La teoría de autoagregación de anfífilos hidrocarbonados de Israelachvili [50] permite calcular el parámetro de empaquetamiento a partir de las dimensiones de la molécula de glicoesfingolípido y otras características termodinámicas de los autoagregados. Aplicando los principios que establece dicha teoría Maggio y col. [71]

predijeron que la estructura autoensamblada permitida para GM1, GD1a, GD1b o GT1b a pH 5.6 correspondería a la micelar, es sus diferentes tipos (esférica, globular, elipsoidal o cilíndrica). En cambio, para los gangliósidos GM3 y GM2, los datos predicen que las estructuras formadas serían vesículas de bicapas con las cadenas hidrocarbonadas muy tensionadas. Sin embargo, esta estructura no sería posible debido a que el largo de la cabeza polar es mayor que el radio interno de la vesícula, por lo que sugieren a las micelas cilíndricas como estructura alternativa [71]. Las estructuras posibles que podrían adoptar estos gangliósidos en solución correlacionan con lo observado por microscopía electrónica con tinción negativa [74] y por dispersión dinámica de la radiación (DLS) [104], excepto para el GM3 que según microscopía formaría micelas esféricas cilíndricas [74] mientras que según los datos de DLS formaría vesículas [104]. Los valores de parámetros geométricos, como el diámetro de agregación, obtenidos por microscopía [74] son aproximadamente la mitad de los obtenidos por DLS [104]. A pesar de estas diferencias, relacionadas posiblemente con limitaciones de las técnicas, la tendencia general de los resultados refleja que, independientemente de la técnica utilizada, hay una disminución progresiva del tamaño con el incremento de la complejidad del grupo polar.

Considerando los tres gangliósidos monosialos (GM) GM3, GM2 y GM1 queda claro que aumentar el carácter hidrofílico de los gangliósidos conlleva a una disminución en el número de agregación (ver Tabla 1.4). Esto es lo esperado si consideramos lo siguiente. A medida que aumenta el número de unidades de azúcar, aumenta la contribución de la repulsión hidrofílica al balance de las "fuerzas opuestas", el agregado se hace más curvo y más pequeño y las moléculas se acomodan en una mayor área interfacial. Por lo tanto el número de agregación disminuye.

Los gangliósidos GM1, GD1a, GD1b, GT1b necesitan de consideraciones más complejas. Todos tienen 4 azúcares neutros como cadena principal pero difieren en el número y posición de los residuos de ácido siálico (Figura 1.10). La contribución de ellos al empaquetamiento del agregado es debido sólo a las dimensiones físicas. Si consideramos la secuencia de GM1, GD1a, GT1b, se cumple la regla de la cantidad de azúcares, cinco, seis y siete residuos, respectivamente, resultando mayor contribución de la repulsión hidrofílica, menor tamaño, agregado más esférico y menor número de agregación (Tabla 1.4). Algunas confusiones aparecen cuando se considera al GD1b, que van más allá de las reglas descriptas

más arriba. GD1b tiene la misma composición de azúcares de GD1a, pero tiene propiedades de agregación similares a GT1b, un gangliósido más hidrofílico. Por otro lado el GD1b lactona (GD1b-L), con un enlace en la molécula de GD1b, tiene propiedades similares a GD1a. El  $R_H$  de GD1b-L es 57 Å y su  $N = 229$ . En consecuencia, se alcanza un nivel en donde la extensión y ramificación de la estructura de la cabeza polar del gangliósido no puede ser subestimada con la evaluación aproximada de la hidrofiliidad.

Considerando el modelo descrito arriba, esto es equivalente a decir que la repulsión estérica entre las cabezas polares juega un papel adicional y como consecuencia de esto las “fuerzas opuestas” actúan a distinta distancia de la interfaz hidrofílica-hidrofóbica para los diferentes gangliósidos. Cantú y col. [14] propusieron que dentro del agregado, la molécula de gangliósido ocupa un ángulo sólido que, además de ser determinado por las reglas generales del core de ceramida, se ve afectado sensiblemente por la conformación de la cabeza polar. Esto permite identificar a lo largo de la cabeza polar dos regiones: una “caliente” y otra “fría”; de acuerdo a si modificaciones en esas posiciones ocasionan cambios significativos o despreciables en el ángulo sólido necesario para la molécula [14]. Como regla general, se puede establecer que: cuanto mayor es el área interfacial, más pequeños son los agregados y menor es el número de agregación. Por lo tanto, el aumento en el número de unidades de azúcar en la cabeza polar del gangliósido conduce a un incremento general en el área interfacial de la molécula, que hace que los agregados tengan progresivamente mayor curvatura y menor tamaño [105]. Resultando en valores característicos de  $cmc$  del orden de los  $10^{-8}M$  [104], mucho más baja que la  $cmc$  de micelas poliméricas ( $\sim 10^{-6}M$ ).

## 1.7. Termodinámica de monocapas

Cualquier fase de un sistema se encuentra siempre en contacto con otra, la superficie de separación de ambas fases, es la **interfaz**. En adelante una de las fases a considerar será el agua, mientras que la otra será el aire conteniendo vapor de agua (Figura 1.13).

Las monocapas son un sistema experimental constituido por una capa monomolecular en la interfaz aire-agua. Permite estudiar la respuesta de moléculas anfipáticas organizadas frente a cambios de variables como: presión lateral, concentración o composición. La respuesta de las monocapas se registran como cam-

bios en la presión de superficie ( $\pi$ ) en función del área molecular media ( $MMA$ ) a temperatura constante (Figura 1.14).

Las moléculas contenidas en la región interfacial tienen propiedades comunes a las dos fases, que varían continuamente a lo largo de dicha región, como la tensión, la presión, el potencial eléctrico, la reflectividad y la termodinamia.

### 1.7.1. Tensión superficial

La tensión superficial es una propiedad que se manifiesta en la superficie de los líquidos y que, es consecuencia de las fuerzas intermoleculares de los mismos. Las moléculas de agua situadas en la interfaz experimentan menos atracciones que las que se encuentran en el interior de la masa líquida, ya que la interacción con las moléculas de la fase vapor es insignificante (Figura 1.13). Como las interacciones moleculares atractivas provocan una disminución de la energía del sistema (potencial de Lennard-Jones)<sup>1</sup>, las moléculas en la interfaz poseen una energía media superior a las que se encuentran en la fase líquida (Figura 1.13). Por lo tanto, para aumentar el área de la interfaz se debe realizar trabajo para trasladar las moléculas desde el interior del líquido hasta la capa superficial (derecha de Figura 1.13). Los sistemas tienden a adoptar la configuración que corresponde a la menor superficie posible, ya que en esta situación la estabilidad del sistema es máxima (mínima energía). Para adquirir la mínima superficie existe una fuerza por unidad de longitud que actúa en una interfaz líquido-gas, que recibe el nombre de tensión superficial. [36].

#### La ecuación de Gibbs. Adsorción

Entre 1774 y 1778 varios fenómenos de superficie fueron estudiados. Los fenómenos de capilaridad y tensión superficial fueron descritos en trabajos de Young, Laplace, Plateau y otros. Hasta que en 1778 Gibbs publica su análisis termodinámico de adsorción y efectos de tensión superficial [36].

En su trabajo Gibbs describe lo que hoy conocemos como energía libre de Gibbs:

$$G \equiv U - T \cdot S + P \cdot V \quad (1.7)$$

donde  $U$  es energía,  $T$  es temperatura,  $S$  es entropía,  $P$  es presión y  $V$  es

<sup>1</sup> Modelo matemático sencillo que representa las fuerzas de atracción y repulsión entre dos partículas.

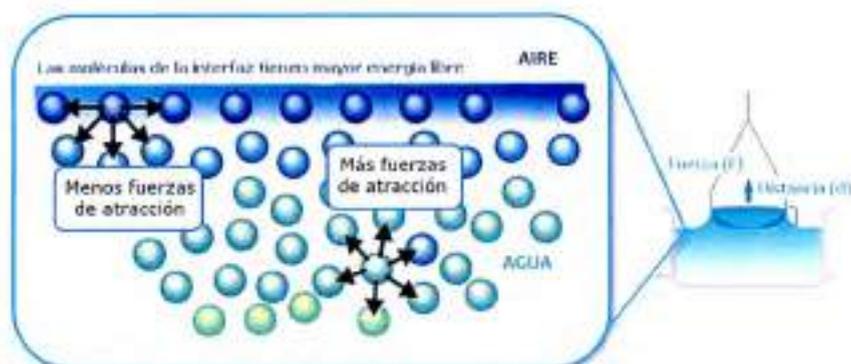


Figura 1.13: Recuadro: detalle de la interfaz agua-aire mostrando las interacciones intermoleculares de atracción de moléculas de agua ubicadas en el seno y en la superficie. A la derecha: esquema del trabajo ( $w = F \cdot d$ ) necesario para aumentar el área interfacial ( $w = F \cdot d$ ).

volumen. La expresión anterior se aplica en termodinámica de muchos y variados sistemas.

En el caso de sistemas de monocapas con interfaz simple como aire-agua, donde las capas son planas y la superficie divisoria tiende a ubicarse en determinadas posiciones, se puede demostrar que cualquier variación del estado de equilibrio cumple:

$$dUT \cdot dS + \sum_i \mu_i dn_i - P \cdot dV + \gamma ds \quad (1.8)$$

donde  $\mu_i$  es el potencial químico del componente  $i$ ,  $n_i$  es el número de moles del componente  $i$ ,  $\gamma$  es la tensión de superficie y  $s$  es el área total de la interfaz.<sup>2</sup>

Por integración y diferenciación total<sup>3</sup> se puede obtener la siguiente expresión

$$S^s \cdot dT + \sum_i \mu_i dn_i + s \cdot d\gamma = 0 \quad (1.9)$$

se obtiene así una expresión que relaciona la tensión superficial con los potenciales químicos de los componentes. En el caso que la temperatura no varíe la expresión anterior resulta en

$$\sum_i \mu_i dn_i + s \cdot d\gamma = 0 \quad (1.10)$$

<sup>2</sup>Se reserva el símbolo  $A$  para el área molecular que es el área que ocupa una sola molécula en una monocapa insoluble

<sup>3</sup>Ver trabajos de Guggenheim [42] y Adamson [3].

Sin embargo es conveniente trabajar con el exceso de moles por unidad de área que se define como  $\Gamma_i \equiv n_i/s$ . Así a temperatura constante y en un sistema con dos componentes tenemos:

$$d\gamma + \Gamma_1 \cdot \mu_1 + \Gamma_2 \cdot \mu_2 = 0 \quad (1.11)$$

Ya que se trata de una interfaz plana, es posible colocar la superficie divisoria en una zona donde uno de los componentes no exista al establecer, por ejemplo,  $\Gamma_1 = 0$ . De esta manera resulta:

$$d\gamma = -\Gamma_2 \cdot \mu_2 \quad (1.12)$$

Por otra parte se pueden determinar los potenciales químicos en base a potenciales químicos estándares y a las actividades ( $a$ ). Asimismo  $a$  se puede expresar como el producto entre el coeficiente de actividad ( $f$ ) y la fracción molar ( $N$ ). Entonces para el componente 2 tendremos:

$$\mu_2 = \mu_2^0 + RT \ln a_2 = \mu_2^0 + RT \ln f_2 N_2 \quad (1.13)$$

De la combinación de las anteriores se obtiene la isoterma de absorción de Gibbs, una de las expresiones más importantes en física y química de superficies:

$$\Gamma_2^{(1)} = -\frac{1}{RT} \frac{\partial \gamma}{\partial \ln a_2} = -\frac{f_2 N_2}{RT} \frac{\partial \gamma}{\partial (f_2 N_2)} \quad (1.14)$$

Las expresión de Gibbs <sup>4</sup> muestra que la tensión de superficie de la solución disminuye cuando incrementa la actividad del soluto en la región de superficie (Figura 1.7).

Hay que mencionar en en soluciones ideales  $f_2 = 1$  y que en soluciones suficientemente diluidas se puede expresar la fracción molar como concentración  $c$  que resulta en:

$$\Gamma_2^{(1)} = -\frac{c}{RT} \frac{\partial \gamma}{\partial c} \quad (1.15)$$

Cuando 2 es una molécula de soluto, su concentración superficial en exceso,  $\Gamma_2$ , puede ser positiva o negativa. En el primer caso, habrá una acumulación de soluto en la superficie y se dice que hay adsorción superficial del mismo; parte de las moléculas de soluto han emigrado del interior a la superficie. Por el contrario, si  $\Gamma_2$

<sup>4</sup>El superíndice (1) hace referencia a la superficie divisoria.

es negativa existe una desorción superficial y alguna moléculas de soluto emigran hacia el interior. Con la ecuación de Gibbs se puede ver que, si hay exceso de moléculas soluto en la superficie (adsorción) la tensión superficial disminuye y el soluto es superficialmente activo, por lo que se lo llama sustancia tensioactiva o surfactante [36].

Veamos su comportamiento molecular. Como la tensión superficial es una medida de las interacciones moleculares, los tensioactivos, que la rebajan, serán compuestos que presenten interacciones menores con el disolvente que las existentes entre las moléculas de éste. Por ello, tienden a escapar del líquido, pues energéticamente son más favorables los contactos solvente-solvente que los de solvente-soluto. El efecto será máximo cuanto mayor sea esta diferencia, pero no tanto como para que el soluto precipite. En la superficie, estas moléculas se orientan con el grupo hidrofílico dirigido hacia el agua y el resto alifático hacia fuera, reduciendo las interacciones desfavorables entre la cadena alifática y el agua. Es claro, por otra parte, que  $\gamma$  debe disminuir, ya que en la capa superficial van a abundar cada vez más las interacciones cadena-cadena, que son menos fuertes que las de agua-agua del disolvente puro.

Tal como acabamos de ver, un soluto tensioactivo se adsorbe en la interfaz líquido-gas acomodándose en una película (film) de una sola molécula de espesor; en tal caso se dice que se ha formado un film monomolecular o **monocapa de adsorción**. Esta monocapa se encuentra en equilibrio reversible con la disolución, ya que en cada instante un cierto número de moléculas se disuelven en la subfase y, simultáneamente, igual número de aquellas pasan al film, de modo que estadísticamente la cantidad de moléculas que constituyen la monocapa permanece invariable [116].

Cuando se trata de sustancias insolubles y no volátiles, tales como ácidos grasos y alcoholes de cadena larga con un grupo polar en uno de sus extremos, se pueden extender sobre la superficie del agua formando un film monomolecular insoluble o **monocapa de Langmuir**, semejante a las monocapas de adsorción, pero en la que no tiene lugar ningún intercambio entre las moléculas de la misma y las del medio subyacente. Tal monocapa representa el límite máximo de adsorción en la interfaz, puesto que todas las moléculas están concentradas en la misma [36].

### 1.7.2. Presión Superficial

La interfaz agua-aire da lugar a la aparición de una fuerza ( $\gamma_{\text{agua}} \cdot x$ ) mientras que la interfaz agua-monocapa origina una fuerza dada por la diferencia entre ( $\gamma_m \cdot x$ ). Como  $\gamma_{\text{agua}} > \gamma_m$  existe una fuerza neta [ $(\gamma_{\text{agua}} \cdot x) - (\gamma_m \cdot x)$ ]. Esta fuerza neta, por unidad de longitud ( $x$ ), recibe el nombre de presión superficial ( $\pi$ ) [116]:

$$\pi = \gamma_{\text{agua}} - \gamma_m \quad (1.16)$$

#### Isotermas de compresión

Si se reduce el área de superficie de la monocapa (y en consecuencia el área ocupada por molécula ( $A$ )), se incrementa la concentración de moléculas por unidad de superficie, lo que disminuye la tensión superficial ( $\gamma_m$ ) y aumenta la presión superficial ( $\pi$ ), obteniéndose una curva típica de  $\pi$  frente a  $A$  (a temperatura constante) a medida que se comprime la monocapa. Tal curva recibe el nombre de isoterma de compresión (Figura 1.14). A partir de las isotermas se pueden obtener parámetros estructurales, termodinámicos y reológicos que caracterizan el comportamiento superficial de las moléculas en estudio. Para entender que estamos calculando y como medimos las propiedades de las monocapas es útil introducir algunos conocimientos básicos en química de superficies.

Una de las propiedades que se observan en las isotermas son los **estados o fases**. A lo largo de la isoterma se observan regiones con distinta pendiente que se asocian a diferentes estados, equivalentes a los de los sistemas tridimensionales, **gaseoso, líquido o sólido** (Figura 1.14). Los estados difieren en el grado de compactación de las moléculas, resultante de la suma de las fuerzas de atracción y/o repulsión característica entre las moléculas que forman el film.

Un parámetro muy utilizado para diferenciar las distintas fases superficiales es la compresibilidad de la monocapa, que se define (por analogía con la compresibilidad en fase volumen) como:

$$C_s = -1/A(\partial A/\partial \pi) \quad (1.17)$$

en donde  $A$  es el área molecular del film y  $\pi$  su presión de superficie. El valor inverso de la compresibilidad, llamado módulo de compresibilidad superficial o elasticidad ( $C_s^{-1}$ ), es también utilizado para describir las propiedades de la monocapa; su valor está relacionado con la pendiente de la curva  $\pi/A$  y posee

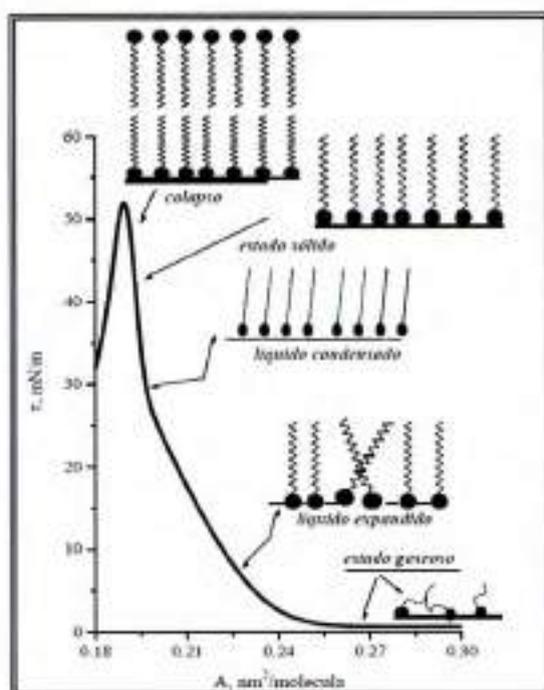


Figura 1.14: Isoterma típica, presión( $\pi$ )-área( $A$ ) de una monocapa. Esquema del ordenamiento de las moléculas en las distintas fases y en el colapso [116].

unidades de  $mN.m^{-1}$ , las mismas que la tensión superficial. Los distintos estados posibles de una monocapa están caracterizados por valores típicos de módulos de compresibilidad (Tabla 1.5).

La elasticidad de un film es una medida de su resistencia a cambiar de área. Altos valores de elasticidad son característicos de films que presentan una estructura con un elevado grado de cohesión. Cuando se comprime este tipo de films, las moléculas se resisten a cambiar de conformación y, por lo tanto, ejercen una mayor resistencia a la compresión, que se traduce en un aumento de presión superficial. Por el contrario, si las moléculas en la superficie cambian de estructura rápidamente durante la compresión, o si no están densamente empaquetadas en la superficie, no dan origen a elevadas presiones superficiales.

Otra propiedad molecular que se obtiene a partir de las isotermas de compresión, es el **área molecular media (MMA)**, la cual permite obtener información del tamaño y la forma de las moléculas, así como su orientación en la interfaz, especialmente en films condensados.

La **energía libre de compresión ( $\Delta G_c$ )** es un parámetro termodinámico que se puede obtener a partir de las isotermas  $\pi - A$ . Esta energía representa el trabajo necesario para comprimir el film desde el estado de gas ideal, en el

Estado de la monocapa (fase)	$C_s^{-1}$ ( $mN.m^{-1}$ )
Gaseoso	0-12
Líquido expandido ( $L_e$ )	15-50
Líquido intermedio ( $I$ )	50-100
Líquido condensado ( $L_c$ )	100-250
Sólido (S)	> 300

Tabla 1.5: Valores de módulo de compresibilidad ( $C_s^{-1}$ ) de las diferentes fases en una monocapa.

que no existe contacto alguno entre las moléculas, hasta un determinado estado condensado, en el que se supone la existencia de un importante empaquetamiento molecular. Matemáticamente la  $\Delta G_c$  está representada por el área debajo de la curva  $\pi - A$  [116].

$$\Delta G_c = \int_{A_1}^{A_c} \pi \cdot dA \quad (1.18)$$

### 1.7.3. Potencial de superficie

El potencial eléctrico de la superficie se debe a que los dipolos de agua se encuentran orientados con el átomo de oxígeno dirigido hacia el aire, la interfaz agua-aire está polarizada. Por lo tanto, la formación de una monocapa en la interfaz da lugar a cambios del potencial eléctrico de la superficie, como consecuencia de la sustitución de un cierto número de dipolos del agua por los de otra molécula adsorbida. Estos cambios dependen de la **densidad superficial** de los dipolos adsorbidos, de la **orientación** de los mismos y de su **carácter químico y estructural**. Por lo tanto, el potencial de superficie refleja las propiedades microscópicas de la monocapa. Al cambio de potencial eléctrico, se le conoce con el nombre de **potencial de superficie** ( $\Delta V$ ). Helmholtz desarrolló un modelo que considera la monocapa como un condensador de placas paralelas (Figura 1.15). En este modelo define el **momento dipolar efectivo** ( $\mu_n$ ) como la componente vertical del momento dipolar de la molécula en la superficie, el cual no debe confundirse con el momento dipolar de la molécula libre que es resultante de la suma

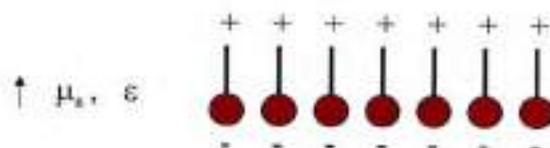


Figura 1.15: Modelo de Helmholtz.

vectorial de los momentos de enlace de la misma. El valor de  $\mu_n$  puede obtenerse a partir de la representación de  $\Delta V$  en función al número de dipolos (moléculas) por unidad de superficie ( $N$ ) o en función del área de la superficie ( $A$ ), asumiendo que la monocapa tiene una permitividad  $\epsilon_r = 1$ . Quedando representado por la siguiente ecuación:

$$\mu_n = \epsilon_0 \frac{\Delta V}{N} = \epsilon_0 \cdot A \Delta V \quad (1.19)$$

Cuando  $\Delta V$  es positivo,  $\mu_n$  también lo es, lo que significa que el extremo positivo del dipolo está dirigido hacia el aire. La mayoría de las monocapas exhiben potenciales de superficie positivos [115].

Por su parte el Modelo de Oliveira plantea que, si el ángulo de inclinación de los dipolos de las moléculas, con relación a la superficie del agua, se mantiene constante durante la compresión de la monocapa, el valor de  $\Delta V$  (o de  $\mu_n$ ) cambia muy poco. Por el contrario, si varía la inclinación de los dipolos, se produce un cambio de  $\mu_n$ . Lo mismo sucede cuando se produce una reorientación de las moléculas de agua. De esta forma, el valor del **momento dipolar superficial** es el mejor indicador de la existencia de cambios de **orientación** de las moléculas, como sucede en muchas ocasiones durante las transiciones de fase de una monocapa. Si, como consecuencia de las mismas, se origina una mayor inclinación de los dipolos con relación a la vertical, se debe esperar una disminución de  $\mu_n$ . Esto se aplica a films neutros, cuando se consideran monocapas ionizadas, es necesario tener en cuenta el potencial eléctrico ( $\Psi_0$ ) debido a la doble capa eléctrica que se establece entre la monocapa cargada y los contra-iones existentes en la subfase [115].

#### 1.7.4. Reflectividad de la superficie

Recientemente está adquiriendo mucho auge la utilización de otras técnicas complementarias, como son las técnicas espectroscópicas (espectroscopía visible,

ultravioleta y de fluorescencia, fundamentalmente) y las microscópicas (microscopía electrónica, de fluorescencia y de ángulo de Brewster), las cuales permiten profundizar en el conocimiento **estructural** y **morfológico** de las monocapas. De todas ellas, la más novedosa es la microscopía basada en la observación bajo el ángulo de Brewster (BAM), cuya principal ventaja es que la monocapa puede ser visualizada sin necesidad de marcadores, que implican una modificación del sistema en estudio.

La visualización directa de la morfología de la monocapa por medio de esta técnica permite sacar conclusiones acerca de los **cambios estructurales durante la compresión** [116].

## 1.8. Monocapas de gangliósidos

El estudio de las propiedades de superficie de una serie de moléculas estructuralmente relacionadas, como es la familia de los gangliósidos (Figura 1.10), permite por ejemplo, obtener información sobre la influencia que la complejidad del grupo polar tiene en la interacción, orientación y morfología de las monocapas. A la vez estas propiedades pueden relacionarse con el comportamiento y función biológica de estos compuestos en las membranas celulares.

Maggio y col. [75, 76] describieron el comportamiento en superficie de los gangliósidos y otros glicoesfingolípidos relacionados. En este estudio vieron que la cantidad de grupos sialos en la molécula afecta el área molecular límite, el estado y la compresibilidad de las monocapas. Así, los gangliósidos monosialos, como GM3, GM2 y GM1 tienen isothermas dentro de un rango de área molecular promedio menor que el área de las isothermas de los disialos, GD1a y GD3 (Figura 1.16 A). Otro aumento del área se observa con la presencia de un tercer grupo sialo como en el GT1b, reflejada por una isoterma muy expandida. Esta intensificación del carácter líquido de los films de los gangliósidos con el aumento de los grupos sialo también se demostró con el aumento de la compresibilidad de las monocapas. Estos resultados conjuntamente con los resultados de experimentos realizados a pH 1,2 ( $pK_a$  del ácido siálico libre = 2,6), sugieren que la expansión de los films debe estar relacionada al aumento de la repulsión electrostática entre las cargas negativas de los ácidos siálico de la cabeza polar. La protonación de los grupos sialos, a pH 1,2, provoca, no solo una disminución en el área por molécula (por la disminución de la repulsión electrostática); sino también un aumento en la

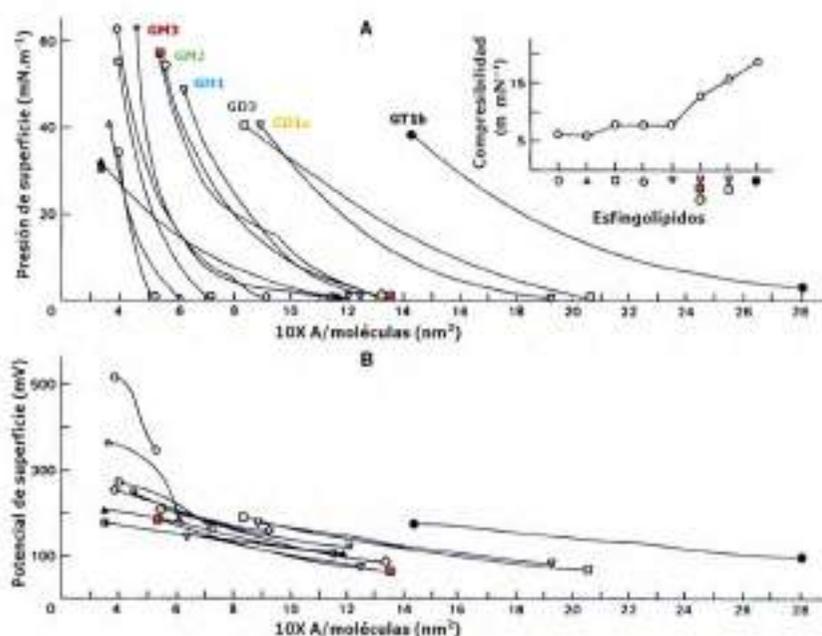


Figura 1.16: Presión de superficie (A) y Potencial de superficie (B) por área molecular promedio determinadas a pH 5,6 y  $20^\circ\text{C}$ , para gangliósidos con un ácido siálico: GM3 (rojo), GM2 (verde), GM1 (azul); con dos siálicos: GD3 (bronce) y GD1a (amarillado); y con tres: GT1b (gris). En la parte superior derecha se muestra la compresibilidad de la superficie en función de la cantidad de residuos de ácido siálico presentes en las moléculas. Adaptado de Maggio y col. [76]

presión de colapso de la monocapa, probablemente debido a un aumento en las fuerzas cohesivas entre moléculas con un empaquetamiento más cercano [76].

Además el potencial de superficie por molécula ( $\Delta V/n$ ) de los films de gangliósidos con dos o tres grupos sialo, como el GD1a y GT1b a pH 5,6, son significativamente más grandes que el  $\Delta V/n$  de aquellos gangliósidos con un solo grupo sialo (Figura 1.16). Maggio y col. [76] profundizaron en la interpretación de estos resultados y calcularon la contribución al momento dipolar vertical de cada residuo de carbohidratos de una serie de glicosfingolípidos relacionados. De esta forma se pudo apreciar que, en los gangliósidos la contribución del segundo y tercer residuo de ácido siálico al campo eléctrico perpendicular a la superficie es diferente que la contribución del primer residuo de ácido siálico. El primer residuo introduciría un momento dipolar neto con dirección opuesta al momento dipolar perpendicular neto ( $\mu_{\perp}$ ) de la molécula, mientras que el segundo y tercer residuo de ácido siálico sería de magnitud similar pero de dirección opuesta al primero. Por lo tanto el primer residuo disminuiría  $\mu_{\perp}$ , mientras que el segundo y tercero lo aumentarían [76].

En conjunto estos resultados muestran que, glicosfingolípidos relacionados

poseen una variedad de propiedades de superficie debidas a las variaciones estructurales en su cabeza polar. Esta variabilidad estructural también determina la interacción con otras moléculas. Por ejemplo, monocapas mixtas de GM1 con dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) tienen mayor área molecular promedio y potencial de superficie que la que tendría una mezcla ideal. Mientras que, monocapas mixtas de GD1a con DPPC tienen menor área molecular promedio y potencial de superficie comparada con la mezcla ideal. Por su parte, la energía de exceso de mezcla GM1/DPPC en monocapas es positiva, indicando que no se mezclan espontáneamente, mientras que mezclas GD1a/DPPC poseen energía de interacción negativa por lo que se mezclarían espontáneamente [75]. También, las interacciones de gangliósidos con  $\text{Ca}^{2+}$  dependen de la cantidad y posición de el o los ácidos siálicos en la cadena de oligosacáridos [77].

Las evidencias apuntan a que las repulsiones electrostáticas y las limitaciones estéricas entre los grupos polares son responsables de aumentar la distancia entre las moléculas de glicoesfingolípidos en una monocapa de un único lípido [76]. Esto determina que, cuanto más grande es la región polar del glicolípido menor es la energía de interacción molecular en la monocapa [75].

## 1.9. Monocapas de Ptx

A la fecha no es muy extensa la bibliografía disponible del comportamiento del Ptx en la interfaz agua-aire. El interés se ha enfocado en la interacción de Ptx con fosfolípidos constituyentes de membranas naturales o bicapas artificiales. El interés por estudiar estos sistemas radicaba en caracterizar el mecanismo de acción del fármaco o a evaluar la vehiculización en liposomas. En este sentido, cabe mencionar que si bien el Ptx particiona en bicapas de liposomas la aplicación de esta tecnología posee serias limitaciones relacionadas principalmente con la capacidad de carga limitada ( $\sim 5\%$ ) y la baja estabilidad de la formulación [21].

El carácter altamente hidrofóbico de la molécula de Ptx, determina una actividad de superficie baja en comparación con moléculas anfipáticas como los fosfolípidos. Monocapas de Ptx comprimidas no superan los  $10\text{-}12 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  de presión lateral (Figura 1.17). Además, al comprimir films mezcla de Ptx con distintos fosfolípidos existe pérdida de moléculas de la interfaz, lo que también evidencia la poca actividad de superficie. Por ejemplo si bien *L*- $\alpha$ -distearoil fosfatidilcolina (DSPC C18:0) y Ptx son miscibles a distinta temperatura, se observa

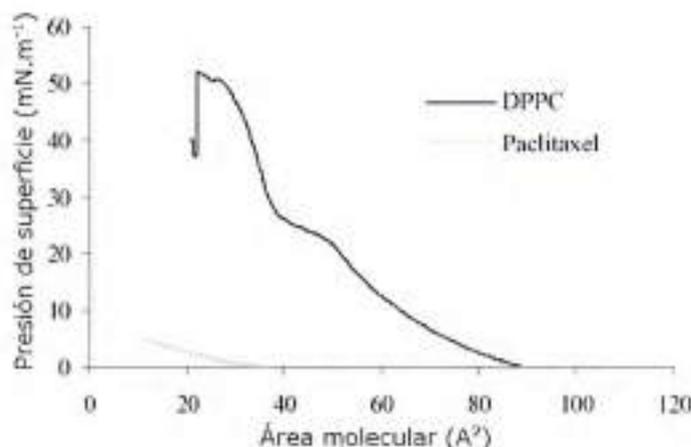


Figura 1.17: Isoterma de compresión de Ptx y del fosfolípido dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), realizadas a temperatura corporal. Adaptado de Zhao y col. [131]

pérdida de moléculas de Ptx a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  y no se puede descartar pérdida parcial a  $24,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a pesar de que el perfil de las isotermas mezclas sea diferente al de la isoterma de DSPC puro [21].

En general, la incorporación de Ptx a monocapas de fosfolípidos provoca aumento en el área molecular promedio, aumento del área de lift off <sup>5</sup> [21, 29], aumento de la fluidez ("fluidizing effect"), aumento del área de exceso y energía libre de mezcla negativas [8, 21, 29, 129]. El Ptx en bicapas de fosfolípidos en sistemas dispersos (liposomas) también provoca un aumento de la fluidez de las mezclas, evaluado tanto por FTIR [29] como por polarización de fluorescencia [8].

En su conjunto, las evidencias apuntan a que las mezclas de Ptx con fosfolípidos son más laxas y termodinámicamente más estables que el lípido en ausencia del fármaco. Sin embargo, el comportamiento de las mezclas está directamente relacionado con la proporción de Ptx en la mezclas y con la presión de superficie a la que se encuentra el sistema. Así, por ejemplo, la mezcla de DSPC con 5% Ptx no se comportan con la tendencia general ya que con alta compactación poseen máxima interacción de atracción y mayor estabilidad termodinámica [21].

Estudios de penetración de Ptx en monocapas de DPPC, demostraron que Ptx particiona en estos fosfolípidos hasta una concentración máxima  $500\text{ ng.mL}^{-1}$  de Ptx en la subfase, a partir de la cual no se observa más incorporación de Ptx en las monocapas [132]. Además se vió que, algunos aspectos estructurales de los

<sup>5</sup>Área a la que comienza a elevarse la presión de superficie, durante la compresión de una monocapa.

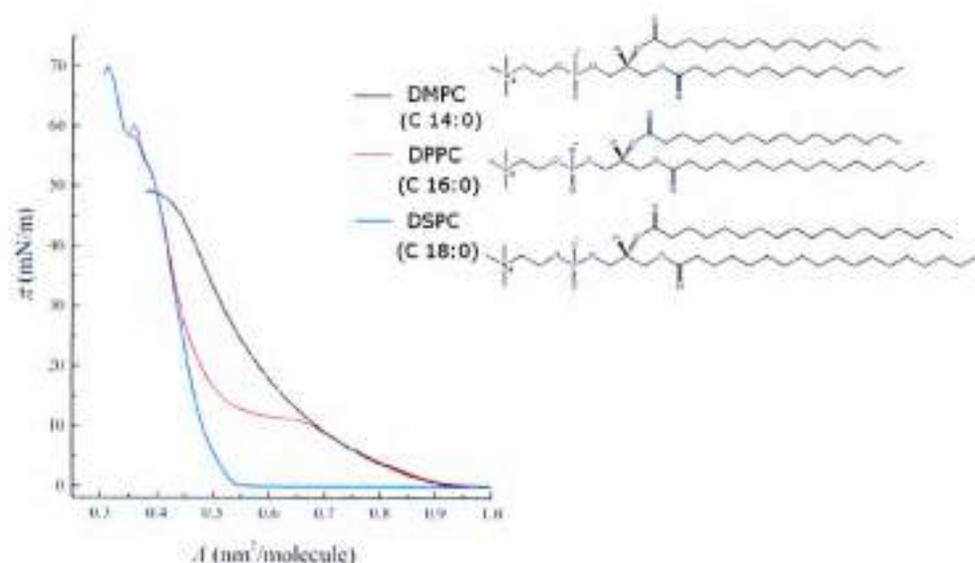


Figura 1.18: Estructura química e isoterma de compresión a 25°C, de fosfolípidos con distinta cantidad de carbonos en la cola hidrofóbica. (DMPC: dimiristoil fosfatidilcolina; DPPC: dipalmitoil fosfatidilcolina; DSPC: disteuroil fosfatidilcolina [53].

fosfolípidos modifican su interacción con Ptx. Por ejemplo, cuanto mayor es la cantidad de carbonos en la cadena del fosfolípido, o sea mayor hidrofobicidad de la molécula, mayor es la presión superficial crítica para la penetración de Ptx. Dicho en otras palabras el Ptx presenta mayor afinidad por monocapas de fosfolípidos de cadena más corta, como el dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC, C14:0) comparado con el DPPC, C16:0 o el DSPC C18:0. Esta tendencia también se reflejó termodinámicamente, los films más estables fueron las mezclas con fosfolípidos con cadenas más cortas [129].

Otro aspecto estructural evaluado fue el tamaño de la cabeza polar de los fosfolípidos. El Ptx interacciona mejor con fosfolípidos de cabeza polar más grande, como el DPPC, comparado con dipamitoil fosfatidiletanolamina (DPPE), sobre todo para films con 50 % de Ptx [130].

Además de los estudios de penetración mencionados anteriormente, que dan la pauta de que Ptx particiona en monocapas de fosfolípidos, estudios de DSC [8, 129, 130, 132], fluorescencia y dicroísmo circular [8] demostraron que Ptx particiona en bicapas de fosfolípidos y que se localizaría en la región hidrofóbica externa de la bicapa. Aunque a altas concentraciones de Ptx también se lo encontraría en zonas más profundas del dominio hidrofóbico [8].

# Capítulo 2

## Antecedentes

Recientemente nuestro laboratorio demostró que Ptx y Dtx pueden ser espontáneamente incorporados en micelas de gangliósidos [66].

Los gangliósidos son glicoesfingolípidos con una cabeza polar compleja formada por varias unidades de azúcares. La mayoría de ellos se autoagregan formando micelas cuando se los disuelve en agua, con una *cmc* muy baja. Los distintos miembros de la familia de gangliósidos comparten una porción hidrofóbica común, la ceramida, y varían en la composición de su cabeza polar. Estas diferencias estructurales condicionan las propiedades y estructuras de agregación y en consecuencia la capacidad de solubilizar estos fármacos.

Los antecedentes demostraron que gangliósidos con un solo ácido siálico en su cabeza polar (monosialos) y con distinta cantidad de azúcares tienen diferente capacidad de carga. En la Figura 2.1 se muestra como GM3, con dos azúcares en su cabeza polar, carga 20% de Ptx mientras que GM2, con tres azúcares carga 80% y GM1, con 4 azúcares carga el 95% [66].

El GM3 forma vesículas mientras que GM2 o GM1, con cabezas polares progresivamente más grandes forman micelas. Por lo tanto las diferencias estructurales de las moléculas de diferentes gangliósidos y sus propiedades de agregación determinan diferencias en la capacidad de carga de un fármaco dado.

Un aumento en la capacidad de carga de un sistema de administración de fármacos, significa una gran ventaja farmacológica, que permite reducir la dosis administrada, en volumen de inyección y el tiempo de administración; además de disminuir los costos de producción. La disminución en la toxicidad del tratamiento y como consecuencia el aumento en la satisfacción del paciente, son características muy buscadas en las terapias contra el cáncer.

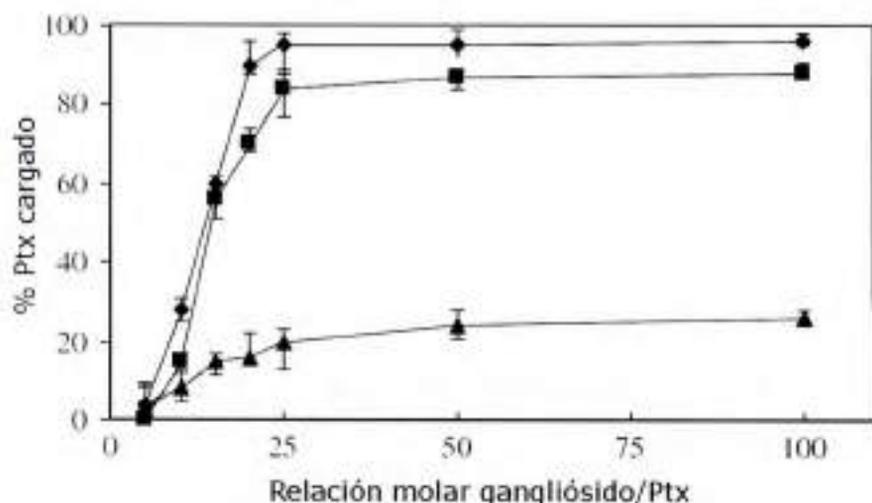


Figura 2.1: Porcentaje de PtX incorporado en micelas de gangliósidos en función de la relación molar. GM1 (rombo), GM2 (cuadrado), GM3 (triángulo). Las barras de error indican la desviación estándar de la media ( $n=3$ ) [66].

La caracterización de estos sistemas como nanotransportadores oncológicos, permitió establecer varios aspectos relevantes. Los complejos GM1/PtX, con una relación molar de 20/1  $mol/mol$  solubilizan hasta  $6 mg \cdot mL^{-1}$  de PtX, 6000 veces más que su solubilidad en agua ( $1 mg \cdot mL^{-1}$ ). La asociación entre el fármaco y el núcleo de la micela está dominada principalmente por interacciones de tipo hidrofóbicas. La temperatura modifica esta interacción, aumentando la capacidad de carga cuando las micelas se precientan a  $55^{\circ}C$  al menos 30 minutos [66].

Además, los complejos GM1/PtX 20/1  $mol/mol$  resisten centrifugación a alta velocidad, diálisis prolongadas, temperaturas de  $-80^{\circ}C$  y liofilización, sin perder el PtX incorporado, lo que da idea de una buena estabilidad.

Es recomendable que un sistema nanotransportador para administración parenteral no interactúe con los componentes sanguíneos en su camino al sitio de acción. El complejo GM1/PtX, no lisa glóbulos rojos ni afectan la actividad plaquetaria pero sí disminuye parcialmente la población linfocitaria, aunque probablemente se deba a la citotoxicidad del PtX sobre cualquier célula en división [66].

Por otro lado, las micelas GM1/PtX se asocian de manera espontánea con la albúmina sérica humana mediante interacciones de tipo hidrofóbicas, formando un complejo ternario, GM1/PtX/Alb.

Los complejos GM1/PtX y GM1/PtX/Alb son capaces de liberar PtX encapsulado.

sulado al entrar en contacto con células en cultivo, con un efecto citotóxico *in vitro* similar al del fármaco libre [65, 66].

La posibilidad de formar un complejo GMI/Ptx/Alb constituye una ventaja para formulaciones de principios activos oncológicos porque existen evidencias de que las células tumorales sobre-expresan receptores específicos para albúmina. Contar con micelas recubiertas de albúmina permitiría acumular Ptx específicamente en el tejido tumoral, además la molécula de albúmina podría proteger la nanoestructura. Cumpliendo un rol semejante al que cumple el PEG en los liposomas: disminuir la inmunogenicidad y evadir el reconocimiento por el SRE, aumentando su biodisponibilidad y el tiempo de vida media en circulación [65, 66]. Otra funcionalización posible es la conjugación con espermidina, que modifica la carga superficial y mejora la captación del fármaco por células tumorales [38].

La versatilidad de estas micelas, permiten modelarlas como nanotransportadores para dirigir los tratamientos a los tejidos afectados, haciéndolos más específicos, y menos tóxicos.

Como la familia de gangliósidos está constituida por muchas moléculas estructuralmente relacionadas resultan un conjunto de moléculas con potenciales aplicaciones farmacológicas aún no exploradas.

# Capítulo 3

## Objetivos

### 3.1. Objetivos generales

El siguiente trabajo de tesis tiene como objetivos:

1. Caracterizar las propiedades como sistema de vehiculización de paclitaxel de micelas de gangliósidos disialos y trisialos.
2. Estudiar las bases moleculares de la interacción entre paclitaxel y gangliósidos con distinto contenido de ácido siálico.

### 3.2. Objetivos específicos

1. Evaluar la capacidad de micelas de gangliósidos di y trisialo para cargar paclitaxel.
2. Establecer las condiciones óptimas para la formación de los complejos.
3. Caracterizar las propiedades fisicoquímicas y estructura de los complejos gangliósido/fármaco formados.
4. Evaluar la estabilidad de los complejos frente a variables fisicoquímicas y bioquímicas.
5. Evaluar la eficacia citotóxica in vitro y ex vivo del paclitaxel vehiculizado en micelas de gangliósidos di y trisialos.

6. Caracterizar las propiedades de superficie de mezclas gangliósido y paclitaxel.
7. Estudiar las bases moleculares de la interacción de gangliósidos con paclitaxel.
8. Caracterizar la topografía de superficie de mezclas gangliósido/paclitaxel.
9. Comparar las propiedades de superficie, bases moleculares de interacción y topografía de mezclas de GM1/Ptx y GD1a/Ptx.

# Capítulo 4

## Materiales y Métodos

### 4.1. Materiales

El Paclitaxel (Ptx) es de Yunnan Smandbet Co. Ltd. (Kumming, China). El Taxol comercial usado fue DALYS 300, con una concentración de  $6 \text{ mg.mL}^{-1}$  de Ptx disuelto en una mezcla Cremophor/Etanol (50:50) de Laboratorio DOSA S.A. Los gangliósidos GM1, GD1a, GD1b y GT1b fueron purificados por medio de cromatografía de exclusión por tamaño a partir de un extracto de gangliósidos totales de cerebro bovino, que fue donado por el Dr. Pablo Rodríguez. El resto de los productos químicos utilizados fueron de grado analítico.

### 4.2. Métodos

#### 4.2.1. Purificación de gangliósidos

La purificación se realizó por cromatografía de exclusión por tamaño en columna de Iatrobeads (Iatron Lab, Inc., Tokio, Japón) de 2,0 cm de diámetro x 30 cm de alto. Brevemente; 1,5 g de gangliósidos totales se disuelven en 20 mL de metanol:agua:cloroformo (54,1:39:6,9) y se siembran en la columna equilibrada con la misma mezcla de solventes. La columna se eluye con 2 volúmenes de columna de metanol:agua:cloroformo (54,1:39:6,9) y 3 volúmenes de columna de metanol:agua:cloroformo (30:60:8). Se trabaja a temperatura ambiente con un caudal de  $0,5 \text{ mL.min}^{-1}$  y se recolectan fracciones de 5 mL. Se evalúan las fracciones por cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) revelando la presencia de gangliósidos por carbonización con 50 % (v/v)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Las fracciones

seleccionadas se corren en HPTLC sembrando 10 veces más volumen del habitual para detectar presencia de impurezas.

#### 4.2.2. Cuantificación de Ptx

La cuantificación de Ptx se realizó mediante HPLC, con una columna de Curosil B C18 (250 x 3,20 mm ID, tamaño de partícula 5 micras) y una columna de guarda Curosil B C18 (30 x 4,60 mm ID, tamaño de partícula 5 micras) marca Phenomenex.

La fase móvil fue 60% (v/v) de acetonitrilo y 40% (v/v) agua bidestilada. La tasa de flujo fue de  $0,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  y el eluyente fue monitoreado a 227 nm. Las corridas se realizaron a temperatura ambiente (20 °C) y la curva de calibración de Ptx fue lineal en un rango de 5 a 150 µg.

##### Extracción de Ptx de micelas

Brevemente; las muestras de micelas cargadas con Ptx se mezclaron con 10 volúmenes de acetato de etilo, se agitaron bien y se centrifugaron a 500 g durante 5 minutos. Se recupera la fase orgánica, que contienen el Ptx, en un tubo limpio y se evapora a 40 °C hasta sequedad. Luego se solubiliza en etanol a concentración necesaria para inyectar en el HPLC.

#### 4.2.3. Cuantificación de gangliósidos

Se empleó el ensayo de resorcinol modificado, donde se determina cantidad de ácido siálico [84]. Brevemente; a 1 mL de muestra se le añade 1 mL de reactivo de resorcinol <sup>1</sup> y se calienta a 100°C por 15 min. Una vez que las muestras enfrían y el cromóforo se desarrolla se realiza un extracción agregando 2,5 mL de n-butyl acetato:n-butanol (85:15). Se centrifuga a 500 g por 5 minutos, se recupera el sobrenadante y se lee absorbancia por espectrofotometría a 580 nm. Se utiliza ácido N-Acetilneuramínico (NANA) como testigo, rango lineal de curva de calibración: entre 10 y 50 nmoles de NANA.

<sup>1</sup>2 mg de resorcinol se disuelven en 0,1 mL de agua bidestilada + 0,8 mL de HCl 37,9% p/v + 2,5 µL de 0,1 M CuSO<sub>4</sub> + c.s.p. de agua bidestilada para volumen final de 1 mL.

#### 4.2.4. Preparación de micelas cargadas con Ptx

Alicuotas de una solución madre de gangliósido<sup>2</sup> (GD1a, GD1b o GT1b) se mezclan con el volumen de solución stock de  $20 \text{ mg.mL}^{-1}$  de Ptx en dimetil-sulfóxido (DMSO) necesario para alcanzar la relación molar entre gangliósido y paclitaxel (G/Ptx) deseada. Se invierte el tubo suavemente 2 veces para homogeneizar. Las mezclas se incuban a  $4^\circ\text{C}$  por 24 *hs* y luego se dializan utilizando membranas con 14 *kDa* de corte durante 15 *hs* a  $4^\circ\text{C}$  para eliminar el DMSO.

Para el estudio del efecto de la temperatura en la carga de Ptx, se utilizan soluciones madre de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  de gangliósidos en agua bidestilada, se incuban a  $4^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$  y  $55^\circ\text{C}$  durante 60 minutos, se deja reposar hasta llegar a temperatura ambiente y se carga Ptx como se describe arriba. Relaciones molares G/Ptx de 10/1, 5/1 y 1/1 mol/mol.

Para el estudio del efecto del pH en la carga de Ptx, se utilizan soluciones madre de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  de gangliósidos en 50 *mM* glicina-HCl pH 2, 50 *mM*, en acetato de sodio pH 4.5, o en 50 *mM* fosfato de sodio pH 7. La incorporación de Ptx se realiza como se describe arriba para alcanzar relaciones molares G/Ptx de 25/1 y 10/1 mol/mol. Luego de la diálisis las muestras quedan a pH  $\sim 6$ .

Para el estudio del efecto del pH en la estabilidad química de Ptx incorporado a las micelas, se incuban micelas G/Ptx 10/1 en carbonato de sodio pH 10 o en agua bidestilada pH 5,5 a temperatura ambiente. Soluciones de Ptx en 50% etanol-agua bidestilada o Ptx en 50% etanol-buffer carbonato de sodio pH 10 fueron utilizadas como controles.

Para el estudio del efecto de la temperatura de almacenamiento en la integridad del complejo GD/Ptx, micelas de GD1a/Ptx 10/1 mol/mol fueron almacenadas por 3 meses a  $4^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$  y  $37^\circ\text{C}$ .

Después de cada tratamiento se cuantifica Ptx por HPLC.

#### 4.2.5. Tratamientos a micelas cargadas con Ptx

Se trabaja con micelas de G/Ptx (GD1a, GD1b o GT1b) 10/1 mol/mol preparadas según el método ya descrito. Luego de cada tratamiento se cuantifican gangliósidos y Ptx en el sobrenadante como se describe previamente.

<sup>2</sup>Se disuelve la cantidad necesaria de gangliósido en agua bidestilada y se deja reposar entre  $4^\circ\text{C}$  y  $8^\circ\text{C}$  durante 24 *hs*. Se centrifuga a 2.000 *g* durante 15 minutos, se recupera el sobrenadante y se filtra a través de  $0,22 \mu\text{m}$ .

### Centrifugación a alta velocidad

Se centrifuga a 100.000 *g* durante 1 hora a 4°C en una ultracentrifuga XL-90 (Beckman Coulter Inc., EE.UU.).

### Diálisis

Se dializa con membrana con un corte de 12-14 *kDa* contra agua bidestilada pH 5,5. Peso molecular de gangliósidos libres (unímero) entre 1,6 - 2,1 *kDa* y de las micelas  $PM_{aparente} = 350kDa$ .

### Liofilización

Se liofiliza y re-disuelve en el volumen inicial con agua bidestilada, y se deja reposar durante 1 hora. Luego, se filtra a través de un poro de 0,22  $\mu m$ .

### Congelado

Se congela a -80°C por 24 *hs*, se deja a temperatura ambiente hasta que estén totalmente descongeladas, se centrifuga a 18.000 *g* por 10 minutos.

## 4.2.6. Hemólisis

Muestras de eritrocitos humanos lavados con una densidad aproximada de  $4,0 \times 10^6$  células/ $m^3$  se incuban a temperatura ambiente con micelas de G/Ptx (GD1a, GD1b o GT1b) 10/1 mol/mol. Alícuotas a distintos tiempos se centrifugan por 5 minutos a 300 *g* y se determina el porcentaje de hemoglobina libre por espectroscopía UV-visible a 540 nm. Se toma como 100% una muestra de eritrocitos en agua.

## 4.2.7. Citotoxicidad in vitro

Monocapas celulares en 90% de confluencia de células de carcinoma de epitelio de laringe humano (Hep2) y células de epiteliales de riñón de mono verde africano (VERO) crecidas en medio MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (NATOCOR, Córdoba, Argentina) a 37 °C con 5% de  $CO_2$  se incubaron con: a) concentraciones crecientes de Ptx en DMSO; b) micelas de gangliósido o c) micelas de gangliósido/Ptx (10/1) durante 24 *hs*. Se lava la placa con PBS para remover células no adheridas y se cuantifica supervivencia celular por ensayo de reducción de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) como se describió anteriormente [87]. Brevemente; se colocan 100  $\mu L$  de medio sin suero, ni rojo fenol por pocillo. Se añaden 50  $\mu L$  de 1  $mg \cdot mL^{-1}$  MTT en PBS. Se incuba por 4 horas a 37 °C, se elimina el sobrenadante, se añaden 100  $\mu L$  de isopropanol. Se

deja reposar 10 minutos para disolver el compuesto coloreado y se lee a longitud de onda de 540 nm. El porcentaje de viabilidad se obtiene como % Viabilidad =  $DO^3$  células tratadas x 100 /  $DO$  células control.

#### 4.2.8. Angiogénesis en membrana corioalantoidea (CAM) de pollo

Huevos fecundados, lavados con etanol al 70 % se incuban 72 hs a 37°C y 60-70 % de humedad, rotando su posición 3 veces al día. Al tercer día, trabajando en campana de flujo laminar, se realiza un corte en la parte superior de la cáscara y se retiran 3 mL de albúmen. Se tapa nuevamente y se sella con parafina. Se vuelve a incubar el huevo en las mismas condiciones de temperatura y humedad.

Entre el octavo y noveno día de desarrollo embrionario (DDE), se retira la tapa y se realiza la aplicación tópica de las muestras sobre una zona de la membrana con vasos sanguíneos en desarrollo. Se aplica 2  $\mu$ g de Ptx libre (en DMSO) o en encapsulado en micelas de gangliósidos, con una relación molar de 25/1 para GM1/Ptx y 10/1 para GD1a/Ptx.

Se toman en fotografías con un Sistema de Documentación para geles de electroforesis, Image Master VDS Video (Amersham Bioscience) usando un aumento de 40 X cada 24 horas.

#### 4.2.9. Monocapas de Langmuir

Los estudios de monocapas en interfase agua-aire se realizaron con un equipo de balanza de Langmuir provisto de cuba de politetrafluoroetileno (PTFE) con un volumen de 15 mL y agitación magnética. La presión superficial se mide mediante la técnica de Wilhelmy, utilizando una placa de Pt platinizada de 21 mm de perímetro. El potencial de superficie se registra en simultáneo por medio de un electrodo de  $^{241}$ Am ionizante de aire situado 5 mm por encima de la superficie y un mini-electrodo de referencia Ag/AgCl (Cypress) inmerso en la subfase. En experimentos con la cuba de mayor superficie se utilizó un medidor de potencial de superficie con placa vibrante (SPOT, KSV-NIMA). Para reducir las interferencias externas se aisló al sistema con una caja de acrílico cubierta por una rejilla metálica conectada a tierra.

<sup>3</sup>Densidad óptica.

Para las isotermas de compresión se trabajó con un equipo comercial KSV-Minitrough (KSV-NIMA, Biolin Scientific) equipado con una cuba de PTFE 266  $cm^2$  y compresión isométrica por medio de dos barreras hidrofílicas móviles (Delrin). Las monocapas se comprimieron a  $3 \text{ \AA}^2 \cdot \text{molecula}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ . Se chequeó que la reducción a la mitad de la tasa de compresión no causara cambios en las isotermas. El equipo cuenta con un baño de agua circulante externo (Haake F3C) y un sensor de temperatura en la cuba que permite mantener la temperatura de trabajo estable a  $24 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ .

La subfase utilizada fue NaCl 145  $mM$  en agua obtenida de tratamientos sucesivos en sistemas Elix 10 y Gradient A10 (Millipore).

Las solución stock de Ptx fueron preparadas en etanol y las soluciones de trabajo de gangliósidos en cloroformo, metanol y agua 2:1:0,15  $v/v/v$ , fueron preparadas a partir de una solución madre de 7  $mM$  gangliósidos en agua bidestilada.

#### 4.2.10. Microscopía de ángulo de Brewster

Las imágenes de microscopía de ángulo de Brewster (BAM) de monocapas fueron realizadas con un elipsómetro de imágenes autonulling (Nanofilm EP3sw de imágenes elipsómetro, Accurion GmbH, Alemania) equipado con un láser de 532  $^\circ$ , objetivo 20X, y la cámara CCD, que opera a una resolución de 1  $\mu m$  en el modo de BAM. La reflectividad cuantitativa, que depende de las propiedades ópticas de la interfaz (espesor e índice de refracción) [67, 120] fue medida después de la calibración del ángulo real de Brewster de la subfase, mediante la detección de la luz polarizada p reflejada en varios ángulos de incidencia. El software público Image J (1.43u Wayne Rasband, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD) se utilizó para la determinación del nivel de gris en las imágenes obtenidas por BAM.

#### 4.2.11. Dispersión dinámica de la radiación

Soluciones de 10  $mg \cdot mL^{-1}$  de GM1, GD1a, GM1/Ptx (25/1) o GD1a/Ptx (10/1) en NaCl 145  $mM$  fueron medidas en un analizador de tamaño de partícula Delsa Nano Submicron y Analizador de Potencial Zeta con un ángulo de dispersión fijo de  $165^\circ$ . Los datos se analizaron por el software Delsa Nano Beckman Coulter (versión 2.2) proporcionado por el fabricante con el método de análisis

CONTIN.

#### 4.2.12. Microscopía electrónica

La muestra se adhiere a una rejilla de carbono, colocando 50  $\mu L$  sobre rejilla por 5 minutos, se lava el exceso de muestra con agua bidestilada y se incuban las rejillas con 50  $\mu L$  de una solución de acetato de uranilo al 10% por 1 minuto. Luego se secan y se observan usando un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1200 EX II a 250.000 aumentos.

# Capítulo 5

## Resultados

### 5.1. Gangliósidos di y trisialos como nanotransportadores de Ptx

Entre los factores que más influyen en la estructura de las micelas y en su comportamiento en solución se encuentran, la composición y la masa del monómero que las constituye. Todos los gangliósidos comparten la misma porción hidrofóbica en su molécula y se diferencian en el grupo polar, por lo que las diferencias en las propiedades de empaquetamiento pueden atribuirse cualitativamente a la composición de la porción hidrofílica de la molécula. Entre esas propiedades, podemos mencionar los requerimientos estéricos debidos a la hidratación de las cabezas polares que afectan el área interfacial de cada molécula en el agregado, lo que determina el número de agregación. Mientras más grande es la cabeza polar, el agregado es más pequeño y de menor número de agregación [55].

Cuando se piensa en estas micelas como nanotransportadores de fármacos, se cuenta con esa variabilidad estructural como alternativas de agregados con una gama de propiedades y funcionalidades. Se vió, por ejemplo, que los gangliósidos GM3, GM2 y GM1 poseían capacidades de carga de Ptx significativamente distintas. Esta diferencia se relacionaron con la estructura de agregación que forman. El que forma vesículas o micelas cilíndricas (GM3), carga menos cantidad que los que forman micelas (GM2 y GM1). Es razonable pensar que las micelas ofrecen un dominio hidrofóbico de mayor extensión que las vesículas, donde tendría la posibilidad de acomodarse mayor cantidad de Ptx. La serie GD1a, GD1b y GT1b de gangliósidos no había sido explorada como nanotransportadores farmacéuti-

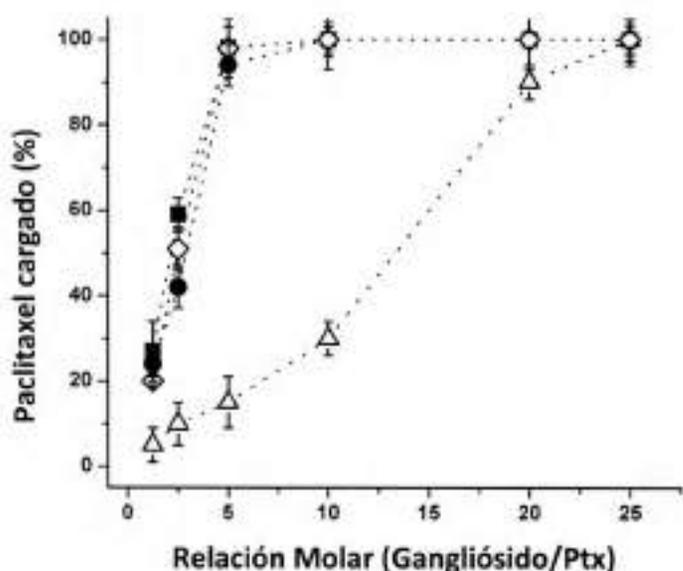


Figura 5.1: Porcentaje de Ptx incorporado en micelas de gangliósidos en función de distintas relaciones molares de gangliósido/Ptx. GM1 (triángulo), GD1a (círculo vacío), GD1b (cuadrado) y GT1b (rombo). Barras de error indican la desviación estándar de la media ( $n = 3$ )

cos. Esta serie, posee distinta cantidad y posición de ácido siálico en su cabeza polar, por ende distinta hidrofiliidad y electronegatividad superficial. Además de tener progresivamente menor radio hidrodinámico y número de agregación.

Los estudios revelaron que se puede alcanzar el 100 % de incorporación de Ptx con relaciones molares de 5/1 G/Ptx, para micelas de GD1a, GD1b y GT1b (Figura 5.1). Mientras que el GM1 lo consigue con relaciones molares de 25/1 [66]. Dicho de otra forma, se puede solubilizar la misma cantidad de Ptx con 4 veces menos cantidad de gangliósido. Una solución de  $200 \text{ mg.mL}^{-1}$  de GM1 puede solubilizar unos  $6 \text{ mg.mL}^{-1}$  de Ptx en agua, para una relación molar de 20/1 [66]. Una solución de  $200 \text{ mg.mL}^{-1}$  de GD y GT podría solubilizar alrededor de  $24 \text{ mg.ml}^{-1}$  de Ptx.

Es conocido que las micelas de gangliósidos tienen un comportamiento bi-estable que se debe a cambios conformacionales que involucran a las cadenas de oligosacáridos y que pueden ser producidos por algunos agentes externos como la temperatura [12]. Estos dos estados se caracterizan por tener diferentes propiedades de agregación y grados de hidratación [16, 90]. La incubación de micelas de GM1 a  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  induce deshidratación de la cadena oligosacárida produciendo un encogimiento significativo de la región hidrofílica de la micela que es acompañado

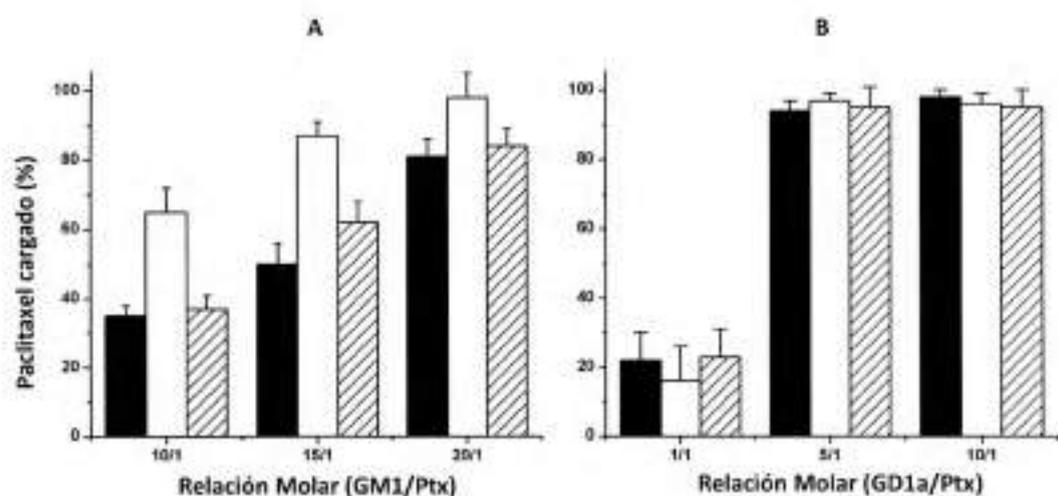


Figura 5.2: Efecto de la temperatura sobre la capacidad de las micelas de GM1 (A) y GD1a (B) para incorporar Ptx. Porcentaje de Ptx incorporado en función de la composición. Barra rayada: 4°C, barra vacía: 55°C, barra rayada: 4°C luego de ser incubada 1h a 55°C. Las barras de error indican la desviación estándar de la muestra ( $n = 3$ ).

por una ligera expansión de la región hidrofóbica [15]. Si se incorpora Ptx a micelas de GM1 a 55 °C aumenta significativamente<sup>1</sup> su capacidad para solubilizar taxanos comparado con la capacidad de solubilizarlos si la incorporación se realiza a 4 °C [66]. Sin embargo, si las micelas se pre-incuban a 55 °C, y el Ptx se incorpora cuando las micelas alcanzan los 4 °C, la capacidad de carga es similar a micelas que no han sido pre-incubadas (no hay diferencias significativas) (Figura 5.2 A).

El efecto de la temperatura en la capacidad de carga de micelas de GD1a (Figura 5.2 B), no es el mismo que para GM1. No se observaron diferencias significativas en los porcentajes de carga de Ptx entre las tres condiciones de temperatura evaluadas. Similares resultados se obtuvieron para GD1b/Ptx y GT1b/Ptx.

La agregación de gangliósidos en solución es un proceso espontáneo que ocurre cuando la concentración de unímeros es igual o mayor a su *cmc*. A concentraciones superiores a la *cmc* se establece un equilibrio dinámico entre los agregados y los unímeros [39, 70, 113].

Los gangliósidos tienen un valor de *cmc* mucho menor (del orden de  $10^{-8}M$  -  $10^{-10}M$ ) que la de polímeros anfifílicos (del orden de  $10^{-4}M$ ), sin embargo un alto recambio de unímeros puede aún, ser causante de problemas de integridad del agregado por dilución [105].

La presencia del fármaco en el centro hidrofóbico de la micela modifica el equi-

<sup>1</sup>prueba T de student de diferencia de medias  $P = 0,95$

librio unímero-agregado. Cuando se dializan por 72 horas micelas de GM1/Ptx, más moléculas son encontradas formando micelas que cuando se dializan micelas de GM1 sin Ptx (Tabla 5.1). O sea que, la presencia de Ptx desplaza el equilibrio hacia el agregado, dicho de otra forma “retiene” moléculas de gangliósidos formando parte de micelas. Por su parte, la cantidad de moléculas agregadas encontradas en muestras dializadas de GD1a/Ptx es similar a la de GD1a sin Ptx (Tabla 5.1).

Dializado (h)	GM1	GM1/Ptx	GD1a	GD1a/Ptx
0	100	100	100	100
24	98 ± 2	96 ± 1	90 ± 5	106 ± 5
48	96 ± 1	95 ± 1	69 ± 4	72 ± 3
72	76 ± 2	95 ± 1	30 ± 4	40 ± 4

Tabla 5.1: Porcentaje de gangliósido en muestras de GM1, GD1a, GM1/Ptx y GD1a/Ptx dializadas durante distintos períodos de tiempo. Promedio de tres ensayos independientes.

Un problema con el que se ha enfrentado la nueva formulación de Ptx a base de nanopartículas de albúmina (Abraxane) es la inestabilidad en solución, debido a esto debe ser administrada rápidamente luego de ser resuspendida.

Los complejos gangliósido-fármaco evaluados en el presente trabajo resistieron centrifugación a alta velocidad, liofilización y congelado. Como muestra la Tabla 5.2 la cantidad Ptx soluble (dentro de las micelas) encontrado es, para todos los tratamientos, superior al 90%. Además, los porcentajes de Ptx encontrados en micelas de GD1a almacenadas 3 meses a 4°C, 25°C y 37°C fue 93 ± 2, 95 ± 1 y 94 ± 3, respectivamente.

Se sabe que la molécula de Ptx tiene un enlace éster que se hidroliza a pH alcalino [26]. Como se ve en la Figura 5.3 A el 100% del Ptx libre se hidrolizó durante las primeras 20 horas de exposición a medio alcalino. Sin embargo, cuando el Ptx se encuentra dentro de micelas de GD1a el porcentaje hidrolizado es mucho menor, ~ 50% a las 20 horas de incubación. Llegando a un máximo de 70% a partir de las 48 horas (véase que en la Figura 5.3 A se representa el porcentaje de Ptx no hidrolizado). Los porcentajes de Ptx soluble fueron similares para los complejos GD1b/Ptx y GT1b/Ptx.

Complejos	Liofilización	Centrifugación	Congelado
GM1/Ptx	93 ± 2	94 ± 1	95 ± 2
GD1a/Ptx	93 ± 4	92 ± 3	96 ± 5
GD1b/Ptx	90 ± 5	95 ± 5	96 ± 4
GT1b/Ptx	94 ± 4	95 ± 6	96 ± 4

Tabla 5.2: Porcentaje de Ptx soluble en muestras de complejos GM1/Ptx 20/1, GD1a/Ptx, GD1b/Ptx y GT1b/Ptx 10/1, después de ser liofilizados, centrifugados 1 hora a 100.000 g o congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Promedio de tres ensayos independientes.

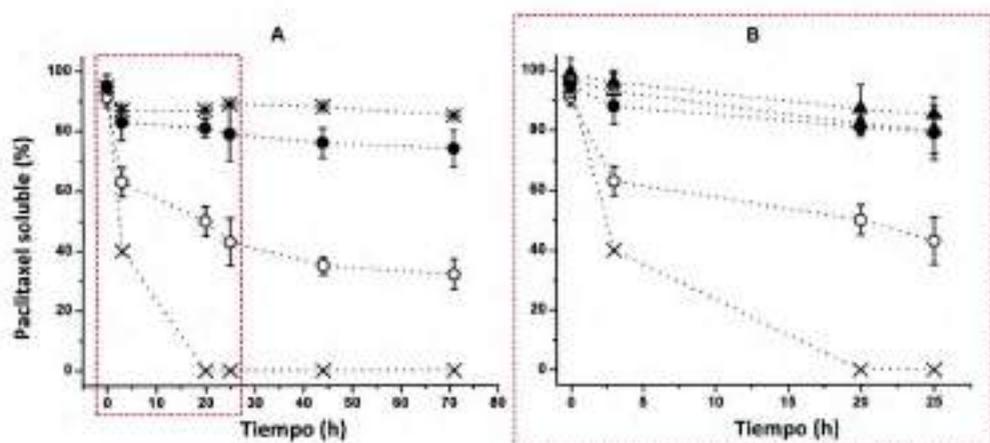


Figura 5.3: Hidrólisis alcalina de Ptx. (A) Porcentaje de Ptx soluble en soluciones GD1a/Ptx 5/1 mol/mol incubadas a pH 5 (círculo negro) o pH 10 (círculo vacío) y Ptx en 50% etanol-agua pH 5 (estrellas) o etanol-buffer pH 10 (crucetas) en función del tiempo. (B) Detalle de las primeras 24 horas del gráfico (A) más el perfil de hidrólisis de Ptx en soluciones GM1/Ptx 25/1 mol/mol incubadas a pH 5 (triángulo negro) o pH 10 (triángulo vacío). Las barras de error indican la desviación estándar de la media ( $n = 3$ ).

Sin embargo, cuando el Ptx está incorporado en micelas de GM1 el porcentaje de hidrólisis es aún menor. En la Figura 5.3 B se ven las primeras 25 horas de las Figura 5.3 A, y se agregan las curvas de hidrólisis para micelas de GM1/Ptx. Allí se puede ver que el alrededor de un 80% del Ptx permanece soluble después de 24 horas de exposición a medio alcalino. Por lo tanto se hidrolizó  $\sim 20\%$  de Ptx.

Mediciones de DLS indicaron que el GD1a forma micelas más pequeñas, con diámetros de  $9,2 \pm 1,1 \text{ nm}$ , mientras que las micelas de GM1 tienen un diámetro de  $12,8 \pm 1,0 \text{ nm}$  (Figura 5.4 líneas negras) en concordancia con trabajos anteriores [17, 74].

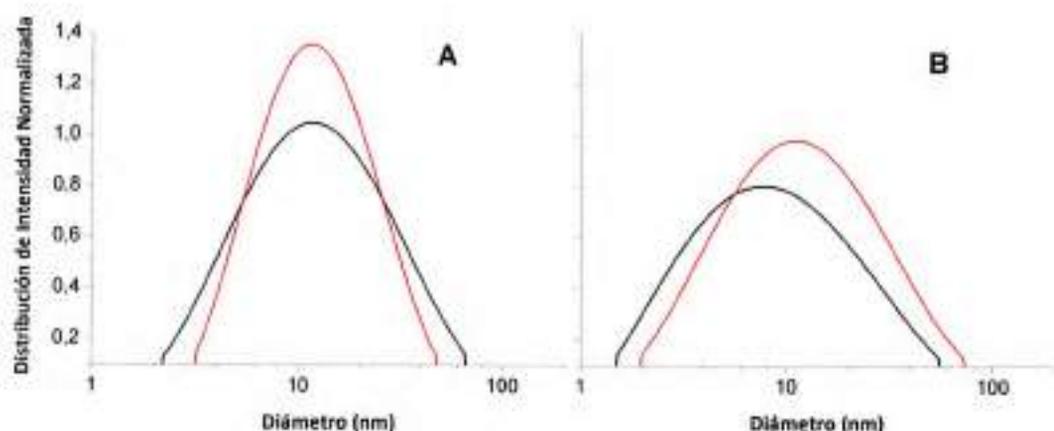


Figura 5.4: Distribución de tamaño de micelas de GM1 (A) y GD1a (B) en ausencia (líneas negras) y en presencia (línea roja) de Ptx determinada por dispersión dinámica de la radiación.

Tras la interacción con Ptx, las micelas de GD1a fueron capaces de aumentar su diámetro hasta  $12.6 \pm 0.9 \text{ nm}$  (Figura 5.4 B), mientras que el tamaño de las micelas GM1 cargadas con Ptx es similar al tamaño de las micelas de GM1 sin el fármaco (Figura 5.4 A).

Las micrografías electrónicas, muestran una población homogénea de micelas esféricas tanto para GD1a como para GM1 en presencia o ausencia de Ptx (Figura 5.5).

La actividad biológica del Ptx vehiculizado en micelas de gangliósidos se evaluó en líneas celulares de origen tumoral y no-tumoral. En la Figura 5.6 se observa que la sobrevivencia celular es similar en los cultivos expuestos a Ptx disuelto en DM-SO que el Ptx solubilizado en micelas de GD1a independientemente de la dosis utilizada en un rango de de  $0,1$  a  $1000 \text{ ng.ml}^{-1}$ . Además, las micelas de GD1a puras no muestran actividad citotóxica en cultivos celulares.

Por otro lado, la actividad antiangiogénica del Ptx incorporado en micelas de GM1 y GD1a se evaluó en la CAM de embriones de pollo. La Figura 5.7 muestra una selección representativa de fotografías de la membrana corioalantodica de embriones de pollo que recibieron una aplicación tópica de Ptx vehiculizado en micelas de gangliósidos (G/Ptx) o en Cremophor (Taxol). En ellas se puede apreciar un efecto cualitativo equivalente entre las formulaciones G/Ptx y el Taxol. En los tres casos se observó un máximo de ruptura y desaparición de vasos sanguíneos en la membrana a las 48 hs de la aplicación del fármaco. En la Figura 5.7 se muestra también el desarrollo normal de la CAM, cuando se aplica solución fisiológica (SF) como control. Cabe mencionar que, se descartó que el GM1,

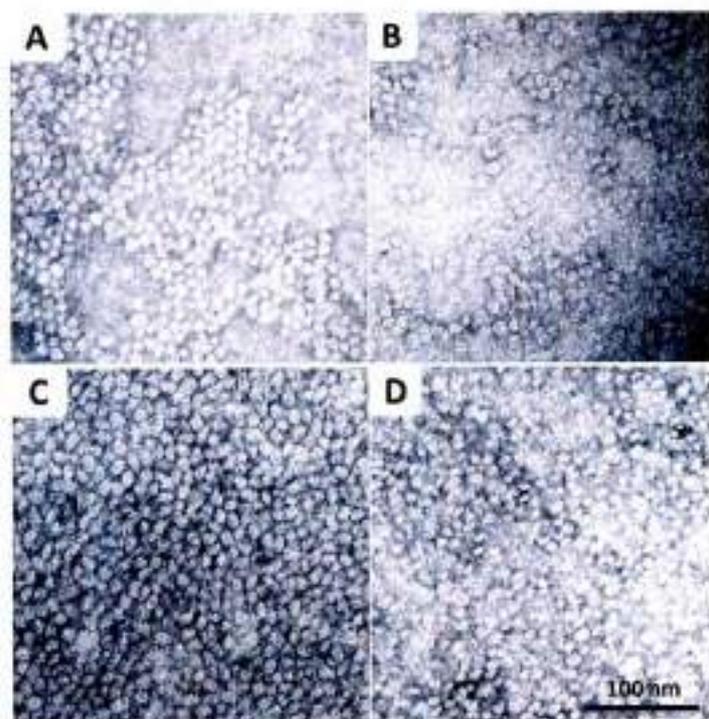


Figura 5.5: Micrografías de micelas de GD1a (A), GD1a/Ptx 5/1 (mol/mol) (B), GM1 (C) y GM1/Ptx 20/1 (mol/mol) (D).

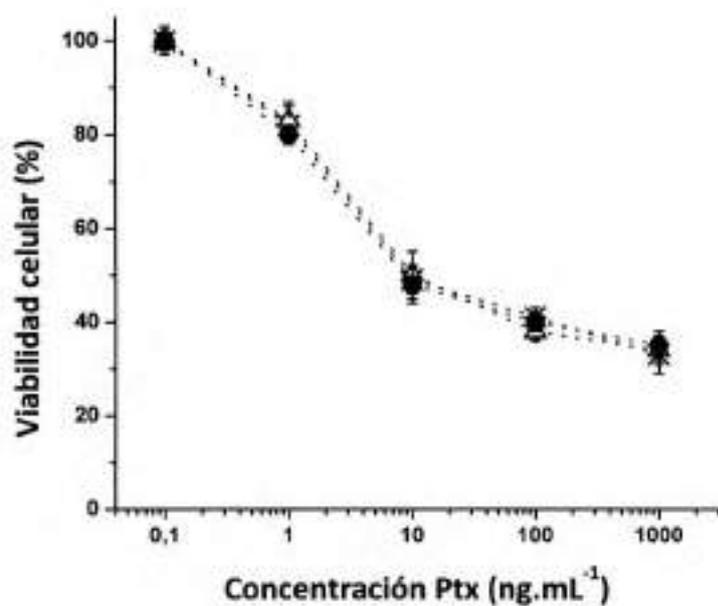


Figura 5.6: Citotoxicidad de Ptx, GM1/Ptx 20/1, GD1a/Ptx 10/1 mol/mol en cultivo de células Hep-2 bares. Las barras de error indican la SD de la media ( $n = 3$ )

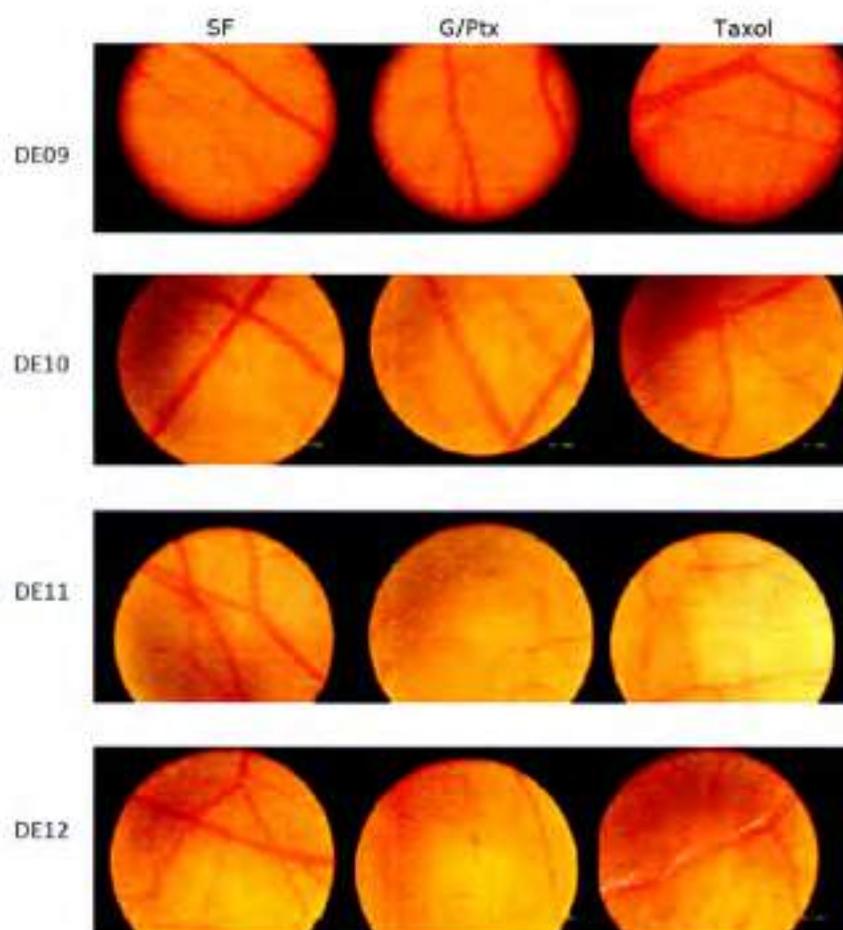


Figura 5.7: Fotografías de membrana corioalantoidea de embriones de pollo. DE: día Embrionario, SF: solución fisiológica, G/Ptx: Ptx vehiculizado en gangliósidos, Taxol: Ptx vehiculizado en Cremophor.

GD1a o DMSO tuvieran efecto antiangiogénico per se o afectaran de otra manera el desarrollo de la membrana corioalantoidea.

## 5.2. Interacciones moleculares y propiedades de superficie

### 5.2.1. Adsorción de Ptx a la interfaz aire-agua

La adsorción de moléculas Ptx en la interfaz acuosa se monitoreó mediante la medición de la presión superficial ( $\pi$ ) alcanzada cuando se inyecta Ptx en la subfase. La máxima presión de superficie alcanzada, con  $30 \mu M$  de Ptx en la subfase, fue de  $\sim 18 mN.m^{-1}$  (Figura 5.8 A). Un comportamiento similar posee

el análogo, Dtx, que alcanza un máximo de  $16 \text{ mN.m}^{-1}$  con  $20 \mu\text{M}$  de concentración en la subfase [30]. Concentraciones mayores a  $10 \mu\text{M}$  de Ptx en la subfase no generan cambios en la presión de superficie (Figura 5.8 A), por lo que se utilizó esta concentración para los ensayos de penetración de Ptx en monocapas de gangliósidos.

Además, el Ptx aumentó el potencial de superficie en comparación con la interfaz limpia, aunque el efecto máximo en  $\Delta V$  se obtuvo a concentraciones de Ptx en subfase inferiores a las concentraciones que generan el  $\Delta\pi$  máximo (Figura 5.8 A), lo que refleja la mayor sensibilidad del  $\Delta V$  para detectar la adsorción de moléculas a la interfaz.

### 5.2.2. Inserción de Ptx en monocapas de gangliósidos

La penetración de Ptx en monocapas de GM1 y GD1a preformadas en la interfaz aire-agua a distintas presiones de superficie inicial ( $\pi_i$ ) fue monitoreada como el aumento de presión superficial ( $\Delta\pi = \pi_{final} - \pi_{inicial}$ ). En la Figura 5.8 B se presenta el  $\Delta\pi$  en función de  $\pi_i$ . El aumento de presión indica que Ptx se incorporó en monocapas de gangliósido, permaneciendo en la interfaz incluso a presiones superficiales superiores a  $18 \text{ mN.m}^{-1}$ , que es la presión superficial máxima alcanzada por el Ptx en la interfaz aire-agua limpia. Además se determinó la presión superficial de exclusión, como la intersección de la línea extrapolada de los valores de  $\Delta\pi$  al eje de las abscisas (cuando no se produce adsorción de moléculas de Ptx en la monocapa,  $\Delta\pi \sim 0 \text{ mN.m}^{-1}$ ). Esta presión fue  $53,9 \text{ mN.m}^{-1}$  para monocapas GM1 y  $41,8 \text{ mN.m}^{-1}$  para GD1a (Figura 5.8 B). En ambos casos fue mayor que la presión superficial de equilibrio de Ptx solo, lo que indica que la estabilización interfacial del fármaco fue inducida por la interacción con los lípidos.

### 5.2.3. Isotermas presión-área de componentes puros

Las isotermas  $\pi - A$  de GM1 y GD1a puros son similares a las encontradas en la literatura (Figura 5.9 A), con un punto de colapso en  $54,2 \pm 1,9 \text{ mN.m}^{-1}$  y  $49,9 \pm 3,4 \text{ mN.m}^{-1}$  y el área molecular media límite de  $44,1 \pm 1,8 \text{ \AA}^2 \cdot \text{molec}^{-1}$  y  $56,3 \pm 5,7 \text{ \AA}^2 \cdot \text{molec}^{-1}$ , respectivamente [18, 34, 73, 78]. Los valores más grandes de  $MMA$  de las monocapas de GD1a reflejan su cabeza polar más voluminosa y su mayor carga negativa en comparación con GM1. Las isotermas de GM1 y

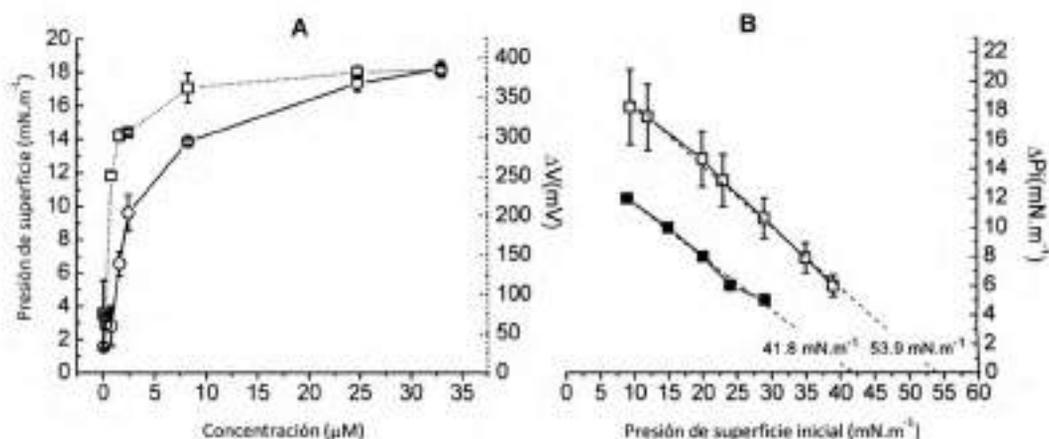


Figura 5.8: Adsorción de Ptx en la interfaz aire-agua a 24 °C. A) Presión de superficie (círculos) y el de superficie (cuadrados) se midieron simultáneamente como una función de la concentración de Ptx en la subfase. B) Diferencia de presión en función de la presión inicial de monocapas de GM1 (símbolos abiertos) y GD1a (símbolos cerrados). Se muestra la presión de exclusión de Ptx. Los datos son la media de tres experimentos independientes.

GD1a también mostraron un ligero cambio de pendiente entre 20 y 25  $mN.m^{-1}$  (Figura 5.9 A), que es más fácilmente detectado por el cambio del módulo de compresibilidad de superficie ( $K$ ) en ese rango de presión de superficie (Figura 5.9 B). Esto se debe a la presencia de gangliósido lactonizado. Se sabe que la formación de lactonas en la cadena oligosacárida del gangliósido está asociado al método de purificación empleado y a las condiciones de almacenamiento [31].

Por otro lado, el Ptx no formó monocapas muy estables. Se observó una presión de colapso alrededor de los 10  $mN.m^{-1}$  (Figura 5.9 A), similar a la presión de colapso reportada previamente [29, 40, 132]. Cuando monocapas mixtas de gangliósido y Ptx se someten a sucesivos ciclos de compresión-expansión las curvas  $\pi - A$  se desplazan progresivamente hacia valores de área inferiores, lo que indica la pérdida de material desde la interfaz (Figura 5.12).

El análisis de la elasticidad de superficie de monocapas de los componentes puros (Figura 5.9 B) indica que los gangliósidos forman films líquido expandidos con un módulo de compresibilidad de superficie por debajo de 100  $mN.m^{-1}$ , mientras que monocapas de Ptx fueron más expandidas, con un módulo de compresibilidad superficial inferior a 10  $mN.m^{-1}$ .

Los valores de  $\Delta V \cdot n^{-1}$  graficados vs  $MMA$  de los monocapas puras de GM1, GD1a o Ptx se muestran en la Figura 5.9 C. A pesar de la presencia de una cabeza polar grande con grupos químicos cargados como los residuos siálicos, el  $\Delta V \cdot n^{-1}$  de los gangliósidos es bajo ( $\sim 0.3 fV.cm^2.molec^{-1}$ ) y muestra pocos cambios a lo largo de la compresión (Figura 5.9 C), como se describió previamente

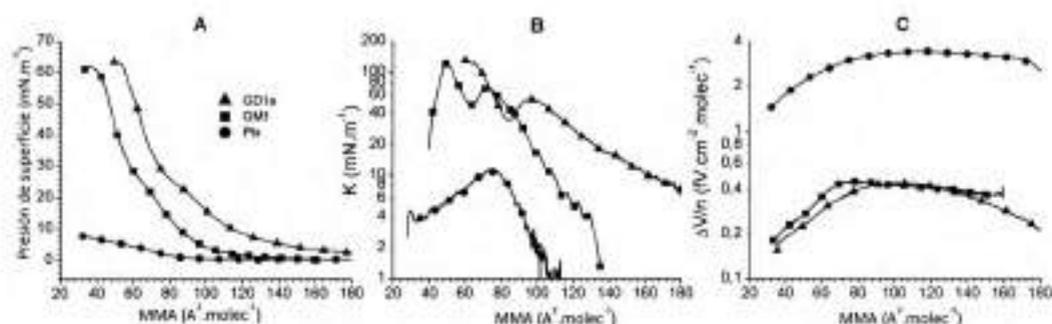


Figura 5.9: Isotermas de compresión (A), módulo de compresibilidad de la superficie ( $K$ ) (B) y potencial de superficie por unidad de densidad molecular (C) en función del área molecular media para monocapas de GD1a (triángulos), GM1 (cuadrados) y Ptx (círculos). Las curvas que se muestran son representativas de cinco experimentos independientes.

[18, 72, 97]. Esto indica que hay poco reordenamiento global del momento dipolar de las moléculas en función de la presión de superficie.

El potencial superficial de monocapas de Ptx que, hasta donde conocemos no se ha reportado anteriormente, se caracterizó por valores altos de  $\Delta V \cdot n^{-1}$  entre 2 y 3  $\text{fV} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{molec}^{-1}$  (Figura 5.9 C). Por lo tanto, la interfaz de monocapas de Ptx está hiperpolarizada en comparación con la de monocapas de gangliósidos.

#### 5.2.4. Monocapas mixtas de gangliósidos y paclitaxel

En la Figura 5.10 se muestran isotermas de compresión representativas de mezclas GM1/Ptx con distintas relaciones molares. Se puede ver que el área por molécula de lift off de monocapas mixtas de GM1/Ptx disminuyó gradualmente con el aumento de la fracción molar de Ptx. Lo mismo se observó en monocapas mixtas de GD1a/Ptx (Figura 5.11). Además, mezclas de GM1 y Ptx forman monocapas estables a contenidos de Ptx menores al 50%, que colapsan a presiones superficiales más altas que la presión de colapso de los films de los componentes puros, lo que sugiere una estabilización interfacial del Ptx promovida por la mezcla. Sin embargo, un mayor contenido de Ptx parece inducir la pérdida de moléculas de la interfaz. De hecho, a pesar de que los gangliósidos, probablemente no pueden tener un área mínima de sección transversal más pequeña que la de dos cadenas de hidrocarburos paralelas apretadas ( $30\text{-}40 \text{\AA}^2$ ) [72, 80], las monocapas mixtas con más del 50% de Ptx mostraron áreas moleculares menores de  $40 \text{\AA}^2$ , sobre todo a presiones superficiales altas (Figura 5.10 y 5.11). Lo que sugiere que se estarían perdiendo moléculas de la interfaz.

Para evaluar la pérdida de moléculas de la superficie, se calculó el área mo-

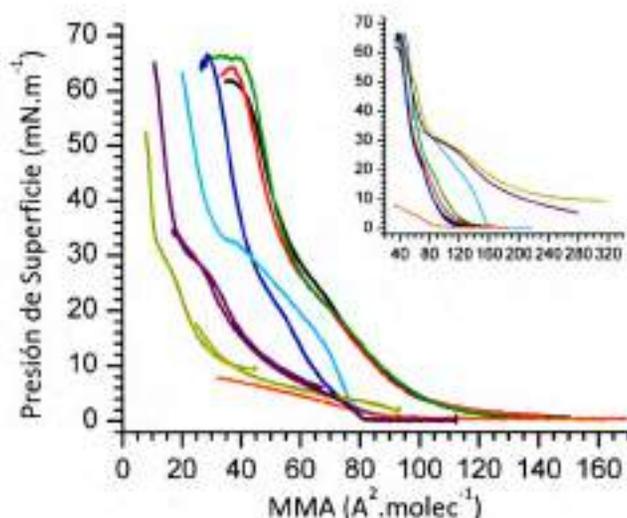


Figura 5.10: Isothermas de compresión de mezclas de GM1/Ptx con diferentes composiciones. La flecha señala el colapso de Ptx en la mezcla con  $X_{Ptx} > 0,5$ . Inset: isothermas con  $MMA$  calculada considerando sólo las moléculas de gangliósidos. Relación molar 1:0 (negras), 12:1 (rojo), 6:1 (verde), 3:1 (azul), 1:1 (cian), 1:3 (magenta), 1:6 (amarillo oscuro), 0:1 (naranja)

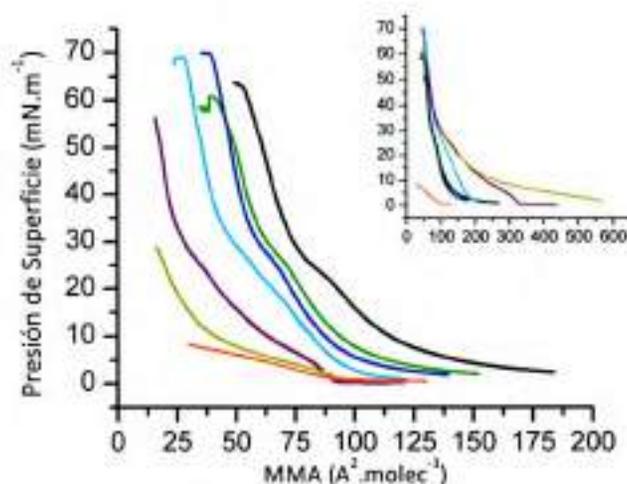


Figura 5.11: Isothermas de compresión de mezclas de GD1a/Ptx con diferentes composiciones. La flecha señala el colapso de Ptx en la mezcla con  $X_{Ptx} > 0,5$ . Inset: isothermas con  $MMA$  calculada considerando sólo las moléculas de gangliósidos. Relación molar 1:0 (línea negra), 12:1 (rojo), 6:1 (verde), 3:1 (azul), 1:1 (cian), 1:3 (magenta), 1:6 (amarillo oscuro), 0:1 (naranja)

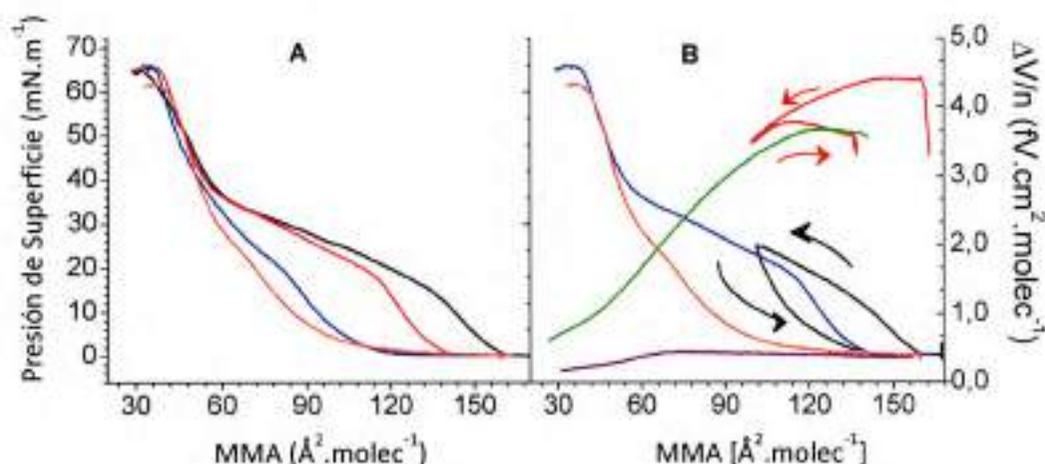


Figura 5.12: Compresión de mezcla 1:1 GM1/Ptx. A) Isothermas después de un ciclo de compresión de hasta  $10 \text{ mN.m}^{-1}$  (negro), hasta  $20 \text{ mN.m}^{-1}$  (rojo) y hasta  $30 \text{ mN.m}^{-1}$  (azul). Isothermas de compresión de GM1 (naranja). B) Isotherma (negro) y potencial de superficie ( $\delta V \cdot n^{-1}$ ) (rojo) del ciclo de compresión/expansión hasta  $20 \text{ mN.m}^{-1}$  e isoterma de compresión a colapso (azul) y potencial de superficie a colapso (verde). Isotherma de compresión GM1 (naranja) y  $\delta V \cdot n^{-1}$  (morada).

lecular media de las isothermas de compresión, considerando sólo las moléculas GM1 presentes en el film (inset-Figura 5.10). Se puede ver que, ninguna de las isothermas se extiende a la zona de valores menores que  $40 \text{ \AA}^2$  y también que a presiones superficiales superiores a  $30 \text{ mN.m}^{-1}$ , las curvas de compresión de las mezclas son similares a la curva de GM1 puro. Sin embargo, a presiones de superficie inferiores, las isothermas fueron cada vez más expandidas, especialmente los films con más del 50% de Ptx.

Además, cuando se llevaron a cabo ciclos de compresión/expansión a presiones relativamente altas de superficie, se produjo pérdida de moléculas de la monocapa (Figura 5.12 A), probablemente debido a la expulsión de moléculas de Ptx. Con sucesivos ciclos de compresión, las curvas  $\pi - A$  se asemejaban a la de los gangliósidos puros (Figura 5.12 A).

Las isothermas de compresión de monocapas mixtas de GD1a/Ptx esencialmente siguieron la misma tendencia que se observa el sistema GM1/Ptx, con desplazamiento sucesivos hacia las áreas moleculares medias menores con el incremento del contenido de Ptx en los films (Figura 5.11).

Las presiones superficiales de colapso de mezclas con relación molar gangliósido/Ptx de 3:1 y 1:1 se acercó a los  $70 \text{ mN.m}^{-1}$ , más alta que el colapso de los componentes individuales, lo que sugiere no sólo buena miscibilidad sino también la estabilización interfacial de la monocapa mixta.

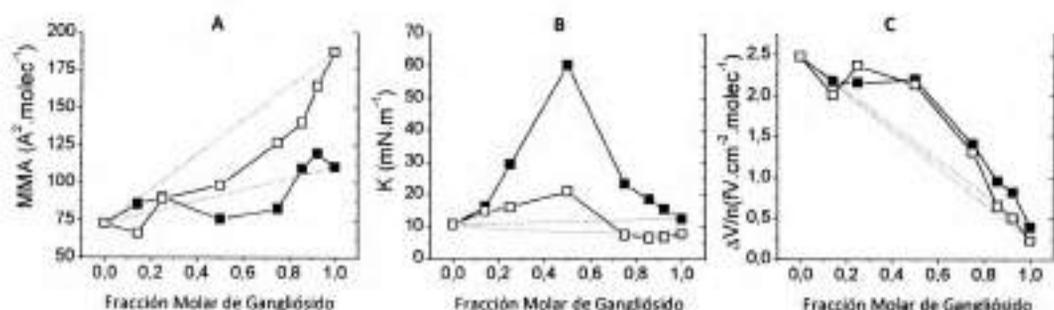


Figura 5.13: Parámetros de mezcla en  $2,5 \text{ mN.m}^{-1}$  de la mezcla de Ptx con los gangliósidos GM1 (símbolos cerrados) y GD1a (símbolos abiertos). El área molecular media (A), el módulo de compresibilidad (B) y el potencial de superficie por unidad de densidad molecular (C) se grafican para diferentes composiciones de mezcla. Las líneas de puntos son los valores que predice el comportamiento ideal de las mezcla.

### 5.2.5. Interacciones moleculares

Las interacciones moleculares de los componentes y sus mezclas se analizaron mediante el estudio de diferentes parámetros de mezcla en función de la composición del film y su comparación con el comportamiento de una mezcla ideal. Debido a la baja presión en la superficie de colapso de Ptx, el análisis pudo llevarse a cabo sólo en el rango de  $0\text{--}7 \text{ mN.m}^{-1}$ .

Para  $2,5 \text{ mN.m}^{-1}$  (Figura 5.13 A) y  $5 \text{ mN.m}^{-1}$  (Figura 5.14 A), los valores de  $MMA$  de mezclas GD1a/Ptx mostraron desviaciones negativas del área molecular media en casi toda la gama de composiciones indicando una interacción favorable entre este gangliósido y el Ptx. Por su lado, las monocapas mixtas de GM1/Ptx a  $5 \text{ mN.m}^{-1}$  son expandidas comparadas con el comportamiento esperado de monocapas ideales de igual composición, sobre todo en mezclas de 50% de Ptx o más (Figura 5.14 A), mientras que a menor  $X_{Ptx}$  los films mixtos fueron ligeramente condensados (Figura 5.14 A). Una condensación significativa de las mezclas de GM1/Ptx fue observada solo a  $2,5 \text{ mN.m}^{-1}$  y para monocapas con contenido de Ptx entre  $0,3 < X_{Ptx} < 0,8$  (Figura 5.13 A), sugiriendo que Ptx interactuó más favorablemente con GD1a que con GM1.

Por otro lado, los módulos de compresibilidad de superficie de monocapas mixtas a  $2,5 \text{ mN.m}^{-1}$  (Figura 5.13 B) y  $5 \text{ mN.m}^{-1}$  (Figura 5.14 B) fueron considerablemente más altos que los valores teóricos para las mezclas de Ptx con cualquiera de los gangliósidos, especialmente en el caso de la mezcla 1:1 que mostró un módulo de compresibilidad seis veces mayor para mezclas de GM1 y dos veces mayor para mezclas de GD1a, a  $2,5 \text{ mN.m}^{-1}$  (Figura 5.13 B).

Mediciones de la electrostática de superficie revelaron hiperpolarización de

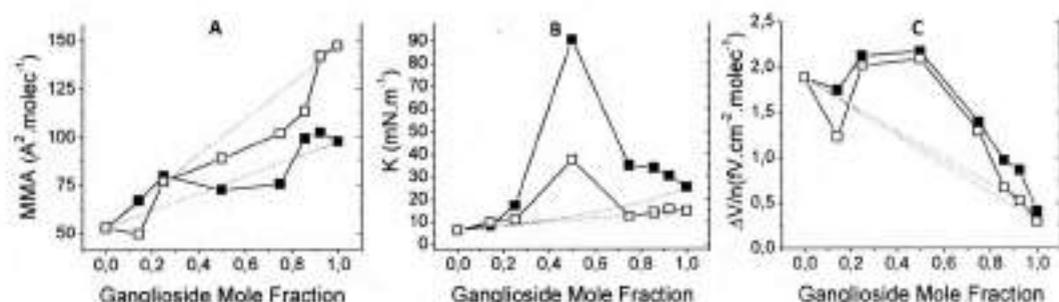


Figura 5.14: Parámetros de mezcla en  $5 \text{ mN.m}^{-1}$  de la mezcla de Ptx con los gangliósidos GM1 (símbolos cerrados) y GD1a (símbolos abiertos). El área molecular media (A), el módulo de compresibilidad (B) y el potencial de superficie por unidad de densidad molecular (C) se grafican para diferentes composiciones de mezcla. Las líneas de puntos son los valores que predice el comportamiento ideal de las mezcla.

las interfaces mixtas cuando se compararon con el comportamiento ideal a  $2.5 \text{ mN.m}^{-1}$  (Figura 5.13 C) y  $5 \text{ mN.m}^{-1}$  (Figura 5.14 C), con una desviación positiva máxima también en las mezclas 1:1 de cualquiera de los gangliósidos, indicando reordenamientos del dipolo inducido por Ptx.

Relación molar (G/Ptx)	6:1	1:1	1:6
<b>GM1</b>	-202,0	-29,1	176,8
<b>GD1a</b>	-1067,8	-607,1	-315,5

Tabla 5.3: Exceso de energía  $\Delta G_m^E$  ( $\text{J.mol}^{-1}$ ) de monocapas mixtas de relación molar 6:1, 1:1 y 1:6 (gangliósidos:Ptx)

El exceso de energía libre de mezcla ( $\Delta G_m^E$ ), que da información sobre si una mezcla particular está energéticamente favorecida en comparación con las mezcla ideal de los componentes puros [36, 73] es negativa para todas las mezclas GD1a/Ptx, mientras que mezclas de GM1/Ptx mostraron  $\Delta G_m^E$  negativo y positivo dependiendo de la composición del film (Tabla 5.3)

La mezcla equimolar (1:1) de gangliósido/Ptx mostró las desviaciones más altas de los parámetros moleculares de mezcla y por lo tanto aparece como un umbral para la solubilización interfacial del fármaco (Figura 5.13 y 5.14). Cantidades más altas de Ptx en la mezcla generan un exceso de fármaco, que es expulsado de la monocapa, como lo evidencia la presencia de un punto de colapso de Ptx puro durante la compresión de monocapas mixtas de GM1/Ptx o GD1a/Ptx (Figuras 5.10 y 5.11).

Como se mencionó anteriormente, hay evidencias de que las mezclas equimo-

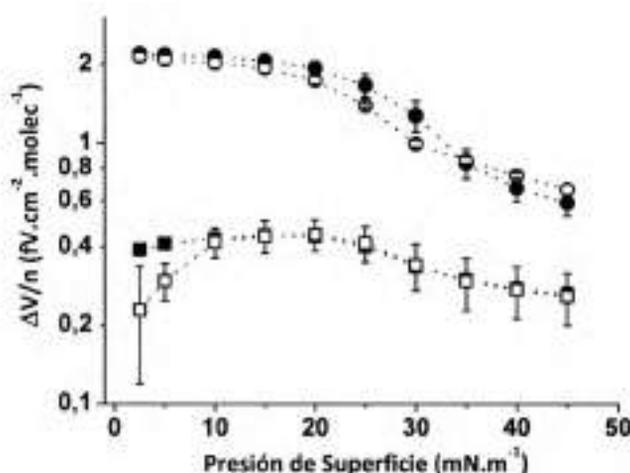


Figura 5.15: Potencial de superficie por molécula ( $\Delta V.n^{-1}$ ) de las mezclas 1:1 en función de la presión de superficie para monocapas mezclas de GM1/Ptx (círculos cerrados), GD1a/Ptx (círculos abiertos), monocapas puras de GM1 (cuadrados cerrados) y GD1a (cuadrados abiertos)

lares de gangliósido/Ptx pierden moléculas durante la compresión (Figura 5.10 y 5.11). Los valores  $\Delta V.n^{-1}$  de monocapas mixtas equimolares disminuyeron tras la compresión a presiones superficiales superiores a  $20 \text{ mN.m}^{-1}$  (Figura 5.15), lo que sugiere que algunas moléculas del fármaco fueron expulsados de la interfaz en ese rango de presiones, teniendo en cuenta que el momento dipolar perpendicular de Ptx es mucho mayor que el de los gangliósidos (Figura 5.9 C). Curiosamente, la recuperación parcial de moléculas Ptx podría inferirse de los ciclos de compresión/expansión. Cuando el área de la monocapa se incrementó después de la compresión hasta  $20 \text{ mN.m}^{-1}$ , se produjo re-polarización de la interfaz (Figura 5.12 B). Además, tras la compresión hasta el punto de colapso, las monocapas mixtas estaban todavía hiperpolarizadas a  $40 \text{ mN.m}^{-1}$  en comparación con monocapas de gangliósido puro (Figuras 5.12 B y 5.15). Esto indica que el Ptx puede permanecer en la monocapa mixta a valores de presión de superficie mucho más altos de los que se puede permanecer en una monocapas de Ptx puro, siendo una evidencia más de que las interacciones favorables con los gangliósido estabilizan el fármaco en la interfaz.

### 5.2.6. Microscopía del ángulo de Brewster

La topografía de monocapas de GM1 [97] y GD1a (Figura 5.16) fue evaluada por BAM. Típicamente los gangliósidos muestran una superficie homogénea y un aumento constante de la reflectividad hasta valores  $5,0 \times 10^{-6}$  durante la compre-

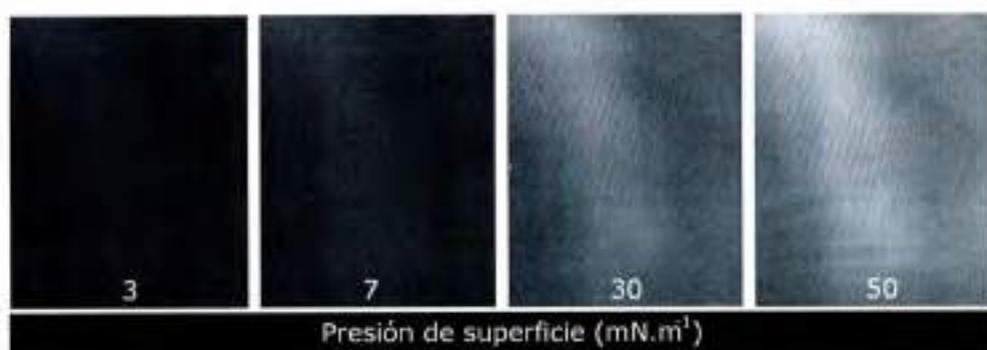


Figura 5.16: Imágenes de BAM de monocapas de GD1a a distintas presiones de superficie, magnificación= 20X.

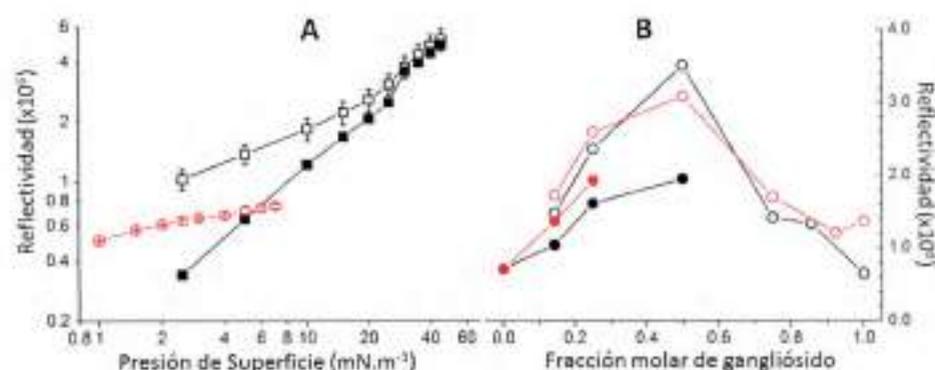


Figura 5.17: (A) p-Reflectividad de monocapas puras de Ptx, GM1 y GD1a en función de la presión superficial. (B) p-reflectividad a  $5 \text{ mN.m}^{-1}$  de monocapas mixtas de GM1/Ptx (rojo) y GD1a/Ptx (negras) en función de la fracción molar. Fase más brillante (símbolos abiertos) y fase oscura (símbolos cerrados).

sión de la monocapa de  $0 \text{ mN.m}^{-1}$  hasta el punto de colapso (Figura 5.17 A). Monocapas de Ptx, por otro lado, mostraron valores más bajos de p-reflectividad que los films de gangliósidos, (Figura 5.17 A) pero también muestran una superficie homogénea sobre toda el rango de presiones de superficies de la isoterma (Figura 5.18).

Monocapas mixtas de gangliósido/Ptx con menos de 50% de Ptx mostraron superficies homogéneas por BAM, pero con aumento de los niveles de reflectividad en comparación con los componentes puros a  $5 \text{ mN.m}^{-1}$  (Figura 5.17 B).

Sin embargo, el aspecto de la superficie de las monocapas mezclas con  $X_{Ptx} > 0,5$ , ya sea con GM1 o GD1a, no fue homogéneo (Figura 5.19 y Figura 5.20). Presentaron dominios en forma de agujas brillantes en el intervalo de presiones superficiales entre 0 y  $5 \text{ mN.m}^{-1}$  en el caso de GM1 (Figura 5.19) y entre 5– $10 \text{ mN.m}^{-1}$  para las mezclas con GD1a (Figura 5.20). A presiones superficiales superiores, también se distinguían dos áreas de diferentes niveles de reflectividad



Figura 5.18: Imágenes de BAM de monocapas de Ptx a distintas presiones de superficie. Magnificación= 20X.

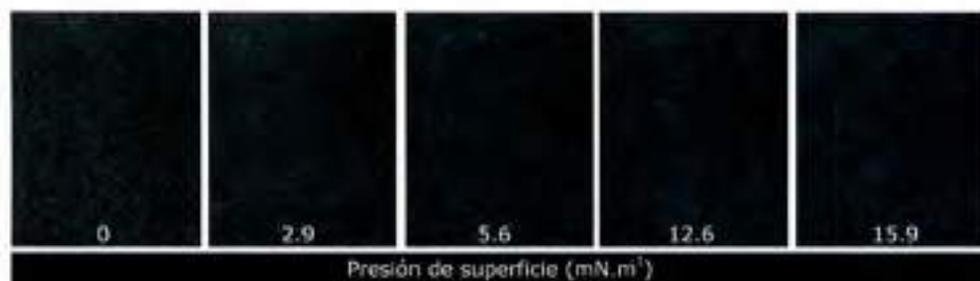


Figura 5.19: Imágenes de BAM de monocapas de mezcla GM1/Ptx 1:1 a diferentes presiones superficiales. magnificación= 20X.

hasta el colapso de las películas. Se ha demostrado que en soluciones saturadas, el Ptx forma agregados en forma de aguja [8, 109], lo que sugiere que los dominios observados en films mezclas podrían ser el resultado de la acumulación de Ptx en la interfaz debido a la partición favorable de estas moléculas Ptx de la monocapa de gangliósido.

La reflectividad de las mezclas fue mayor que la de los films de los gangliósidos puros y de Ptx a  $5 \text{ mN.m}^{-1}$  (Figura 5.17 B), especialmente en el caso de mezclas con GD1a, lo que sugiere un engrosamiento de la interfaz óptica del film mixto. Sin embargo, no se puede descartar posibles variaciones del índice de refracción.

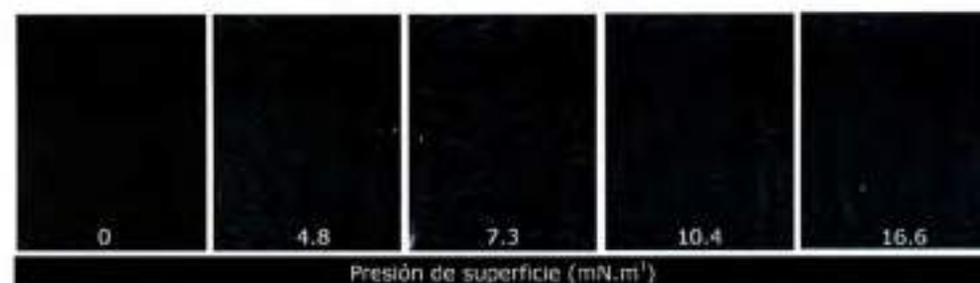


Figura 5.20: Imágenes de BAM de monocapas de mezcla GD1a/Ptx 1:1 a diferentes presiones superficiales. magnificación= 20X.

Teniendo en cuenta que también se observó hiperpolarización de la superficie, se propone que ocurriría deshidratación de la cabeza polar de los gangliósidos, inducida por la localización de Ptx en la región interfacial mediante la reducción de la cancelación de los momentos dipolares interfaciales que ocurre por la presencia de las moléculas de agua. Si tenemos en cuenta la menor reflectividad de monocapas de GD1a en comparación con las de GM1, los valores de reflectividad más altos observados para los films mixtos de GD1a/Ptx 1:1 en comparación con los de GM1/Ptx 1:1 (Figura 5.17) sugiere que la interfaz de GD1a es capaz de albergar mayor cantidad de moléculas de Ptx que GM1.

# Capítulo 6

## Discusión

### 6.1. Gangliósidos di y trisialos como nanotransportadores de Ptx

Recientemente nuestro laboratorio demostró que las micelas de GM1 pueden incorporar Ptx y Dox, constituyéndose en un nanotransportador autoensamblable con prometedoras aplicaciones clínicas. El sistema constituido por micelas de gangliósidos monosialos incorpora Ptx de forma espontánea, y posee actividad biológica citotóxica y antiangiogénica equivalente a la actividad del fármaco libre y a la formulación comercial Taxol<sup>®</sup>.

Una observación que se desprendió de estos estudios fue que las diferencias en las propiedades estructurales de las moléculas de diferentes gangliósidos y sus propiedades de agregación determinan diferencias en la capacidad de carga de un fármaco dado. Así, gangliósidos como GM2 y GM1, con 3 y 4 azúcares en su porción hidrófila, respectivamente; se agregan en micelas y cargan más Ptx que gangliósidos como GM3, con 2 azúcares y que se agregan en vesículas unilamelares. Un aumento en la capacidad de carga de un sistema de administración de fármacos, significa una gran ventaja farmacéutica, que permite reducir la dosis administrada, el volumen de inyección y el tiempo de administración; además de disminuir los costos de producción. La disminución en la toxicidad del tratamiento y como consecuencia el aumento en la satisfacción del paciente, son características muy buscadas en las terapias contra el cáncer.

En la serie de gangliósidos: GM1, GD1a, GD1b y GT1b, las diferencias estructurales están dadas por el aumento en la cantidad de residuos siálicos por

consiguiente una región hidrofílica cada vez más voluminosa. De ellos, el único estudiado hasta el momento es el GM1. En este trabajo caracterizamos los gangliósidos GD1a, GD1b y GT1b como sistemas nanotransportadores de Ptx. Profundizando en el estudio del impacto de la diferencia en contenido de ácido siálico en las propiedades de estos sistemas de transporte de fármacos.

### 6.1.1. GD1a, GD1b y GT1b tienen cuatro veces más capacidad de carga que GM1

La evaluación de distintos gangliósidos como nanotransportadores reveló que, los gangliósidos con dos y tres ácidos siálico cargan cuatro veces más Ptx que gangliósidos con un grupo siálico. Por lo tanto, la incorporación de un ácido siálico más en la molécula de gangliósido, independientemente de su posición, aumenta considerablemente la capacidad de carga de Ptx. Sin embargo, la adición de un tercer ácido siálico, no aumenta la capacidad de carga Ptx.

Resultados previos demostraron que  $200 \text{ mg.mL}^{-1}$  de GM1 solubilizan hasta  $6,3 \text{ mg.mL}^{-1}$  de Ptx en una relación molar 20/1 GM1/Ptx [66]. Considerando que GD1a, GD1b y GT1b tienen su máximo la capacidad en una relación molar de 5/1, se espera que  $200 \text{ mg.mL}^{-1}$  de estos gangliósidos serían capaces de solubilizar alrededor de  $24 \text{ mg.mL}^{-1}$  de Ptx.

Estructuralmente los agregados de la secuencia: GM1, GD1a, GT1b son progresivamente más pequeñas y esféricas, y de menor número de agregación. Estas diferencias pueden explicarse por la cantidad de azúcares: cinco, seis y siete azúcares, respectivamente, resulta en mayores contribuciones repulsivas hidrofílicas según el modelo de las fuerzas opuestas [14]. Este aumento de la repulsión electrostática podría facilitar la entrada de Ptx, lo que explicaría la mayor capacidad de carga observada en GD y GT comparada con GM. Sin embargo, no se observa esta tendencia entre micelas de GD1a y GT1b. La presencia de Ptx en el núcleo hidrofóbico quizás modifica la distancia desde la interfaz dominio hidrofóbico- dominio hidrofílico en el que las fuerzas opuestas tienen lugar.

### 6.1.2. La capacidad de carga de micelas de gangliósidos disialos no se ve afectada por la temperatura

La cantidad de Ptx cargado en micelas de GM1 aumenta con la temperatura alcanzando un máximo a  $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$  [66]. Este comportamiento parece ser consecuencia

de la contracción de la cabeza polar y el aumento de la hidrofobicidad de la estructura de agregación, fenómeno ampliamente estudiado [12, 15, 16, 90]. Sin embargo, las micelas de GD no mostraron este comportamiento.

La contracción, por deshidratación, de la cabeza polar por aumento de la temperatura ha sido estudiado en detalle para micelas de GM1, más que para GD y GT. Aunque cabe esperar que la pérdida de agua de hidratación también ocurra en micelas de GD1a, podría suceder que sea imperceptible debido a que hay más cantidad de moléculas de agua participando de la hidratación de esa estructura. Por otro lado, y teniendo en cuenta que micelas de GD y GT cargan cuatro veces más Ptx que GM1, es razonable pensar que el aumento en la capacidad de carga por efecto de la temperatura sea mucho menor que la capacidad intrínseca que las micelas de GD y GT, por lo que no vemos efecto.

### **6.1.3. Los complejos GD/Ptx tienen menor estabilidad física y química que los complejos GM/Ptx**

Los resultados de los ensayos de diálisis muestran que la presencia de Ptx dentro de las micelas no modifica el equilibrio entre el agregado y número de GD1a, que incluso se encuentra desplazado hacia la forma desagregada si se compara con el equilibrio de la estructura de GM1. Durante la diálisis de soluciones de GM1 la pérdida de números es menor que la pérdida de números de GD1a, sugiriendo diferencias de estabilidad. Incluso, micelas de GM1 cargadas con Ptx pierden aún menos números que las micelas sin Ptx. Por lo tanto el Ptx tiene un efecto estabilizador de la estructura de agregación para el GM1, pero no para GD1a. Sin embargo, la estabilidad de micelas de GD o GT cargadas con Ptx no se vio afectada después de 3 meses almacenada a 4 °C, ya que la cantidad de Ptx soluble fue similar a la cantidad de Ptx cargado inicialmente.

Se conoce que la molécula de Ptx posee enlaces éster que se hidrolizan a pH alcalino [26]. Nuestros resultados muestran que el 98% del Ptx libre se hidroliza durante las primeras 3 horas de incubación. Sin embargo, cuando el Ptx se encuentra encapsulado en las micelas de gangliósidos, no tiene la misma exposición al medio alcalino. En estas condiciones sólo un 40% del Ptx cargado en micelas de GD se hidroliza, evidenciando el efecto protector que poseen las micelas como sistemas de vehiculización de fármacos. Esto también se observó previamente para las micelas de GM. Sin embargo, con las micelas de GM, hay un 10% de

hidrólisis del Ptx cargado, 4 veces menos que el porcentaje de hidrólisis de GD. La diferencia puede estar dada por una diferencia en el acceso del medio alcalino al core de la micela donde se encuentra el Ptx. Las micelas de GD, con cabezas polares más voluminosas, poseen mayor agua de hidratación en la capa externa que las micelas de GM. Además, las micelas de GD poseen mayor capacidad de carga que las de GM, por lo que puede que más cantidad de Ptx se encuentre localizado cercano a la interfaz core/capa externa, y por ende más expuesto al medio alcalino. Trabajos previos hablan de una localización de Ptx dependiente de la concentración en bicapas de fosfolípidos [8].

#### **6.1.4. Los complejos GD/Ptx no modifican la actividad biológica del principio activo**

El patrón citotóxico de Ptx vehiculizado en micelas de GM1, GD1a o GT1b sobre viabilidad de células en cultivo es similar al patrón citotóxico del fármaco libre, lo que indica que el principio conserva su actividad y que la presencia de micelas de gangliósidos no interfiere con el mecanismo de acción celular. Cabe destacar que, es necesaria la presencia de una membrana celular "activa" para que el fármaco sea liberado de la micela, de lo contrario el Ptx permanece encapsulado. Esto sugiere que existe un mecanismo activo, más allá de la propia difusión, de liberación del fármaco, coordinado por las células. Explorando posibles mecanismos de entrega del Ptx a las células, la microscopía de fluorescencia reveló que el fármaco comienza a entrar en las células después de pocos minutos de contacto y que al cabo de un tiempo desaparece completamente del medio extracelular, lo que evidencia que se incorporó todo el fármaco administrado [66]. Estos resultados sugieren que estaría ocurriendo fusión de micelas con la membrana celular. Los ensayos *in vitro* pueden a veces no reflejar las condiciones fisiológicas características de la administración de un fármaco. Aunque resulta una muy buena aproximación y en general se puede extrapolar con bastante precisión, siempre es mejor contar con ensayos que imiten lo mejor posible el entorno biológico real. En este contexto, las micelas de gangliósidos cargadas con Ptx fueron evaluadas en el ensayo de CAM. Se pudo ver que la actividad angiogénica del Ptx vehiculizado en micelas de gangliósidos es equivalente a la de la formulación comercial Taxol®. Por otro lado, los complejos estudiados en el presente trabajo no tuvieron actividad hemolítica, ni produjeron agregación plaquetaria. Est descrito que los

gangliósidos tienen un rol inhibitorio de la agregación plaquetaria [43].

En su conjunto las propiedades descritas hasta aquí permiten considerar a las micelas de GD1a como un sistema de administración de fármacos hidrofóbicos. Tal como se describiera para GM1 [66]. La diferencia principal entre estos dos gangliósidos es su capacidad de carga Ptx. GD1a es capaz de solubilizar hasta cuatro veces más Ptx que GM1. Dicho en otras palabras, la eficiencia de los gangliósidos en la carga de fármaco depende del tipo de estructura formada.

## 6.2. Interacciones moleculares y propiedades de superficie

Aunque en primera instancia la presencia de un ácido siálico más en las moléculas de GD1a en relación a la de GM1, podría ser la responsable de que la eficiencia de carga de fármaco de los gangliósidos sea distinta. La misma tendencia no se observa para los GT, que poseen capacidad de carga similar a los GD. La comprensión de los parámetros moleculares que determina la configuración final del sistema es importante para interpretar estas diferencias y para entender el rol que juegan las diferencias estructurales en las características buscadas de las formulaciones micelares.

### 6.2.1. Los gangliósidos estabilizan a Ptx en la interfaz agua-aire

La actividad superficial de Ptx, a pesar de su hidrofobicidad, es relativamente baja y forma monocapas inestables que colapsan a presiones superficiales bajas ( $\sim 10mN.m^{-1}$ ), en concordancia con estudios anteriores [29, 40, 129]. Sin embargo, el Ptx presentó una afinidad importante hacia las interfaces de gangliósidos, con una reducción de la tensión superficial significativamente mayor que la causada por el fármaco en la interfaz aire-agua limpia, como lo evidencian las elevadas presiones superficiales de corte ( $53.9$  y  $41.8mN.m^{-1}$ , para GM1 y GD1a, respectivamente) en comparación con la presión superficial máxima de monocapas de Ptx puro ( $\sim 18mN.m^{-1}$ ).

### 6.2.2. Ptx y los gangliósidos interactúan favorablemente en monocapas mixtas

Los pocos estudios de monocapas de Ptx y Dtx que se encuentran disponibles, se han realizado con mezclas de glicerofosfolípidos, con el fin de entender la interacción de estos taxanos antineoplásico con membranas plasmática [11, 21, 29, 40, 129, 131, 132]. Ésto permitió ver que, monocapas mixtas de DPPC/Ptx tienen menor rigidez y mayor área molecular media [21] en comparación con monocapas de DPPC puro. Los autores sugieren que existirían fuerzas de repulsión entre los componentes mezclados. Por el contrario, monocapas mixtas de Ptx, ya sea con GM1 o GD1a tienen mayor rigidez y menor área molecular media, especialmente en el caso de mezclas con GD1a, sugiriendo interacciones favorables. Estas diferencias en las interacciones moleculares explican porque los gangliósidos son mejores agentes que las fosfatidilcolinas, para solubilizar fármacos insolubles en agua [48].

Por otra parte, la energía libre de exceso de mezcla de GD1a/Ptx fueron negativas para todas las fracciones molares y de magnitud mayor que la energía libre de mezclas de GM1/Ptx, que fueron negativas solamente para  $X_{Ptx} < 0,5$ . Evidencia de que mezclas GD1a/Ptx interactúan más favorablemente que mezclas GM1/Ptx. En la interfaz agua-aire, el GD1a con su grupo polar más voluminoso y mayor repulsión electrostática, se acomoda más libremente empaquetado mostrando isothermas más expandidas y de menor elasticidad que el GM1. En este sentido el Ptx tendría mayor afinidad por monocapas más laxamente empaquetadas. Similares resultados se encontraron con fosfatidilcolinas, ya que Ptx formó monocapas más estables con el fosfolípido con un mayor balance hidrofílico, como el DMPC, que forma monocapas menos empaquetadas que otros fosfolípidos como el DSPC [129].

Podríamos pensar que la interfaz de GD1a más flexible que la de GM1 es capaz de acomodar más moléculas de Ptx. Esta idea quedó respaldada por el análisis cuantitativo de las mediciones de BAM. Mezclas GD1a/Ptx mostraron una interfaz con mayor espesor óptico que mezclas GM1/Ptx. Esto puede producirse por la reorientación de la cabeza polar hacia la subfase acuosa [97], y el estiramiento de las cadenas hidrocarbonadas.

Por otra parte, la hiperpolarización y el aumento de reflectividad de las monocapas mezclas de gangliósidos/PTX en comparación con la de los componentes puros, pueden ser interpretadas como reorganizaciones de los componentes fun-

damentales de los dipolos de los residuos de carbohidratos de la cabeza polar de los gangliósidos (incluyendo variaciones en su capa de hidratación) como consecuencia de una localización interfacial de moléculas de Ptx.

Mediciones de BAM se habían realizado anteriormente en monocapas mixtas de Dtx y PCs [30]. Aunque no se informó ningún análisis cuantitativo de la reflectividad, la topografía de superficie de films de DPPC/Dtx no mostraron diferencias con la topografía de los films control de DPPC indicando que a presiones superficiales altas sólo estaría presente DPPC, a diferencia de lo observado en los sistemas de gangliósidos/Ptx [30]. Por el contrario, el aumento de la reflectividad de las monocapas mixtas gangliósido/Ptx indicó inserción de Ptx y estabilización en la interfaz a presiones superficiales que no son posibles de alcanzar en monocapas de fármaco puro. Además, la presencia de agregados en forma de aguja de Ptx en monocapas mixtas con  $X_{Ptx} > 0,5$  indica una alta concentración localizada de Ptx lograda en presencia de gangliósidos. Esto es otra evidencia de que los gangliósidos inducen estabilización interfacial del fármaco. Este tipo de agregados se observan en soluciones con altas concentraciones Ptx [8], pero curiosamente, están ausentes en las monocapas de Ptx puro. Podría ser que, las interacciones favorables entre moléculas de Ptx y gangliósidos promuevan la concentración de Ptx en zonas localizadas de la interfaz.

La electrostática de superficie de monocapas de Ptx y monocapas mixtas gangliósidos/Ptx no se habían estudiado anteriormente. Este parámetro, demostró ser muy útil para evaluar la presencia del Ptx en la interfaz, dado que la polarización de los films de Ptx es mucho mayor a la de los films de gangliósidos. La electrostática de mezclas equimolares de gangliósido/Ptx revela la presencia de Ptx asociada a la interfaz incluso a valores de presión alta de superficie ( $\sim 40mN.m^{-1}$ ), aún cuando el análisis del área molecular media indicaría que ocurrió expulsión completa del Ptx. Esta expulsión parcial de Ptx, revelada por la electrostática de superficie sería además reversible. Cuando la presión de superficie se reduce por la expansión de los films, las moléculas de Ptx previamente expulsadas se re-particionarían en el gangliósido ubicado en la interfaz.

Chou y col. [21] reportaron desorción parcial de Ptx desde la interfaz de monocapas mixtas de DSPC/Ptx a 24,5 °C, pero no evaluaron reversibilidad del proceso de desorción. Sin embargo, el equilibrio de la asociación gangliósido/Ptx puede ser modificado reversiblemente cambiando la presión lateral en una interfaz de lípidos. Dado que en una interfaz biológica la presión de superficie lateral

puede fluctuar en más de  $20mN.m^{-1}$  [28, 92], el hecho de que la presión modifique la asociación gangliósido/Ptx es un hallazgo importante para un sistema de administración de fármacos, en el que un equilibrio favorable de interacción durante el transporte al sitio de acción pero a la vez la liberación del fármaco es deseable. Este tipo de equilibrio podría tener lugar en los gangliósidos dispersos en agua formando micelas.

### 6.2.3. El comportamiento superficial de monocapas mixtas gangliósidos/Ptx correlaciona con el tamaño de las micelas

En su conjunto los resultados del comportamiento en superficie de mezclas de Ptx y gangliósidos explican por qué micelas de GD1a solubilizan más cantidades de Ptx que micelas de GM1. Los sistemas de gangliósidos en dispersión se autoagregan en micelas con distintas propiedades estructurales y funcionales. Las micelas de GD1a son más pequeñas que las de GM1, poseen un grupo polar más voluminoso y con mayor repulsión electrostática. Esta restricción geométrica determina que el área lateral de cada número de GD1a en el agregado sea mayor que el área de GM1, y en consecuencia el número de agregación de GD1a sea menor que el de GM1. Por su parte, el residuo hidrofóbico, la ceramida, es esencialmente la misma en ambas moléculas, GD1a y GM1. Pero debido al volumen de la cabeza polar las cadenas hidrocarbonadas tienen que área lateral más grande disponible para acomodarse en micelas de GD1a que en micelas de GM1. Las micelas más pequeñas, por lo tanto, están empaquetadas más libremente y tienen mayor curvatura [71, 74]. Esto determina propiedades particulares del centro hidrofóbico y de la capa externa hidrofílica para cada gangliósido. Cuando se carga estas micelas con Ptx, las micelas de GD1a aumentan su tamaño mientras que las micelas de GM1 no. El hecho de que GD1a cargue más cantidad de Ptx puede estar directamente relacionado a la posibilidad que tiene la estructura de aumentar su tamaño sin desagregarse. Esta diferencia puede deberse a que las moléculas de GD1a interaccionen con más fuerza con Ptx que las moléculas de GM1. Los resultados del comportamiento de mezclas de estos gangliósidos y Ptx apoyan esta hipótesis. En primera medida, podemos decir que los dos gangliósidos evaluados interaccionan con Ptx, dado que estabilizan al Ptx en la interfaz agua/aire. También podemos decir que mezclas de cualquiera de GM1 o GD1a

con Ptx son más condensadas, menos compresibles y más polarizadas que lo que se esperaría si fueran una mezcla ideal de iguales proporciones. Sin embargo, hay que tener en cuenta que este comportamiento ocurre a muy bajas presiones laterales (menos de  $10mN.m^{-1}$ ). El mismo análisis no puede hacerse a presiones superiores dado que la monocapa de Ptx pura no es estable a presiones de superficie mayores. Sin embargo, es posible estabilizar al Ptx por encima de esas presiones en presencia de cualquiera de los gangliósidos. El potencial de superficie por molécula revela que todavía hay moléculas de Ptx en la interfaz a presiones laterales muy altas, aunque del análisis del área molecular promedio concluyéramos que se habían perdido. El hecho de perder moléculas de Ptx de la interfaz, es un fenómeno ya descrito [21] y claramente relacionado con la baja actividad de superficie que demuestra la molécula de Ptx. Durante la compresión, la reorientación de la cabeza polar hacia la subfase acuosa [97], y el estiramiento de las cadenas hidrocarbonadas explicarían la rigidez y la disminución del módulo de compresibilidad de monocapas mixtas GD1a/Ptx por el aumento de las fuerzas de Van der Waals en la región de los hidrocarburos. Por otra parte, para formar monocapas mixtas de GD1a/Ptx se necesita menos energía que para monocapas de GM1/Ptx ( $\Delta G_{exGD1a} < \Delta G_{exGM1}$ ) indicando que termodinámicamente la interacción GD1a/Ptx se ve favorecida en relación a la de GM1/Ptx.

# Capítulo 7

## Conclusiones

A pesar de que las micelas poliméricas poseen buenas propiedades coloidales y solubilizan fármacos hidrofóbicos, la baja eficiencia de carga y la necesidad de solventes orgánicos para la carga de los principios activos son desventajas significativas para la aplicación de estos sistemas de liberación de fármacos [48, 63]. Recientemente, nuevos sistemas micelares a base de gangliósidos, lípidos anfipáticos que se autoagregan en agua, han resuelto estos inconvenientes [66]. Particularmente el GM1, ha demostrado ser una plataforma que permite solubilizar Ptx en concentración superior a la de las formulaciones comerciales aprobadas como el Taxol<sup>®</sup> y el Abraxane<sup>®</sup>.

En este trabajo estudiamos micelas de gangliósidos que se diferencian del GM1 en el contenido de ácidos siálicos, GD1a, GD1b y GT1b, como sistemas de administración de Ptx. En una primera etapa caracterizamos las propiedades de los sistemas como nanotransportadores y posteriormente evaluamos las propiedades moleculares de dos de los sistemas seleccionados por sus propiedades farmacológicas.

Los resultados demostraron que los disialos (GD) y trisialos (GT) son capaces de incorporar Ptx formando un complejo estable con propiedades fisicoquímicas y bioquímicas similares a los complejos GM1/Ptx. Sin embargo, los complejos GD/Ptx y GT/Ptx cargaron 4 veces más Ptx que los complejos GM/Ptx. Esto resulta una ventaja para la formulación de principios activos tóxicos dado que un sistema de mayor eficiencia de carga representa reducción en el volumen de inyección, en el tiempo de administración y, por lo tanto, menos efectos no deseados y mayor satisfacción de los pacientes.

Las micelas de GD se diferencian de las de GM1 en algunos aspectos. Por

un lado, micelas de GD cargadas con Ptx aumentan de tamaño, mientras que las de GM1 no. Por su parte las micelas de GM1 precalentadas aumentan su capacidad máxima de carga, mientras que las de GD no. Sin embargo, las micelas de GM1 precalentadas tienden a perder el Ptx incorporado más que las micelas no calentadas. Existe una relación de compromiso entre la cantidad de Ptx cargado y la estabilidad del complejo. A pesar de estas diferencias, la citotoxicidad *in vitro* y la antiangiogénesis *in vivo* del Ptx vehiculizado en GD1a, GM1 o en el Cremophor (Taxol®) son equivalentes. En su conjunto, estos resultados permiten concluir que, las micelas de GD1a son una alternativa para vehiculizar fármacos hidrofóbicos, y que la presencia de un único ácido siálico más en la molécula de gangliósido aumenta significativamente la capacidad de carga de Ptx.

Comparando las interacciones moleculares y propiedades estructurales de los sistemas GM1/Ptx y GD1a/Ptx, encontramos algunas causas de estas diferencias. Así, vimos que las moléculas de Ptx interaccionan favorablemente tanto con GM1 como con GD1a, estabilizándolo en la interfaz agua-aire, a presiones superficiales muy por encima de la que el fármaco es capaz de alcanzar por sí solo, lo que explica porque ambos gangliósidos son capaces de formar complejos con Ptx. Sin embargo, las mezclas GD1a/Ptx fueron más laxas y necesitaron menos energía para mezclarse que las mezclas GM1/Ptx, lo que podría explicar la diferencia en la capacidad de carga de dichas micelas. Además, las micelas de GD1a, de menor tamaño que las micelas de GM1, pueden aumentar de tamaño al incorporar Ptx sin desagregarse, mientras que las micelas de GM1 no modifican su tamaño con su máxima carga de Ptx. Este comportamiento es otra evidencia de que la interacción de Ptx con GD1a es más fuerte que con GM1.

Encontramos que un pequeño cambio en la estructura de la molécula se traduce en la mejora de una propiedad farmacéutica deseada como es la capacidad de carga del transportador. Además destacamos a la familia de gangliósidos como un pool de moléculas disponibles para explorar potenciales nanovehículos para el suministro de activos biológicos hidrofóbicos.

# Apéndice A

## Protocolo de evaluación de angiogénesis in vivo en membrana corioalantoidea de embriones de pollo

El diseño de nuevos sistemas de liberación controlada de fármacos se encuentra muchas veces con el inconveniente de que los resultados observados in vitro no se correlacionan con los efectos clínicos in vivo. La evaluación del comportamiento de un sistema de liberación in vivo en modelos animales o en estudios clínicos suele presentar inconvenientes relacionados a consideraciones éticas y a la dificultad de controlar todas las variables que afectan al sistema. Muchos esfuerzos se han llevado a cabo para encontrar modelos biológicos que permitan resolver estas dificultades de una manera sencilla y segura. En términos generales los modelos con mamíferos (ratones, conejos) son los más buscados por las similitudes con los sistemas biológicos humanos, pero resultan de los más costosos, demandan mucho tiempo y son complicados metodológicamente. Una alternativa que ha cobrado importancia en los últimos años es la utilización de la membrana corioalantoidea (CAM) de pollo. El interés en este modelo radica particularmente en su versatilidad, simplicidad y su bajo costo. La CAM es una membrana extraembrionaria que comienza a desarrollarse a partir del día 4 ó 5 del desarrollo embrionario (DDE) y se expande hasta el DDE 12 cuando envuelve al embrión completamente [134]. La función principal de la CAM es la de ser el órgano respiratorio embrionario [134], sin embargo también cumple función de almacenar excreciones, transportar

electrolitos (sodio y cloro) del saco alantoideo y la movilización de calcio para la calcificación de los huesos. La formación de un individuo a partir de dos células madres en sólo 21 días, como es el desarrollo de los pollos, supone un sistema dinámico altamente especializado en producir en tiempo y forma muchos cambios capaces de generar ni más ni menos que un individuo entero [134].

La industria farmacéutica apuesta a producir nuevos sistemas de liberación controlada capaces de regular la tasa de liberación de los fármacos, sostener su efecto terapéutico durante tiempos prolongados y/o dirigir la actividad biológica de los mismos. A través de la mejora de estas y otras variables, muchas veces los sistemas de liberación aportan beneficios extras al producir una disminución de los efectos adversos de los fármacos de elevada toxicidad. Los efectos no deseados de los quimioterápicos contra el cáncer son uno de los ejemplos más claros de este problema. La evaluación del comportamiento de estos sistemas en contacto con tejidos biológicos de forma rápida y sencilla es de suma importancia para el diseño de un sistema de liberación acorde a las necesidades del tratamiento.

Para este trabajo se estandarizó un protocolo de evaluación de angiogénesis en la CAM de embriones de pollo. Se pusieron a punto la dosis y el lugar de aplicación para un efecto antiangiogénico claramente visible. Para esto se evaluó un rango de concentraciones de paclitaxel y dos opciones de tratamiento: aplicación tópica, sobre la membrana corioalantoidea; o inyectada en la cavidad coriónica, por debajo de la membrana. Se encontró que la aplicación tópica de al menos 6  $\mu\text{g}$  de paclitaxel eran las condiciones óptimas del ensayo. Los detalles técnicos del protocolo final están detallados en materiales y métodos. Cabe mencionar que vimos que la sobrevivencia de los embriones tratados con Ptx vehiculizado en micelas de gangliósidos fue superior que la sobrevivencia de embriones tratados con Ptx en Cremophor (Taxol<sup>®</sup>). Esto quizá se deba a que los efectos tóxicos del Ptx sean menores en la formulación de las micelas, debido a una liberación paulatina del fármaco.

# Apéndice B

## Fórmulas para el análisis de las isotermas

El módulo de compresión de superficie (elasticidad en el plano,  $C_S^{-1}$ ) se calculó directamente de la gráfica de presión superficial vs área molecular media obtenidas de las isotermas de compresión de acuerdo a:

$$C_S^{-1} \equiv -A \left( \frac{\partial \pi}{\partial A} \right) \quad (\text{B.1})$$

donde  $\pi$  es la presión superficial y  $A$  es el área molecular media a la presión superficial  $\pi$  [5, 36].

La elasticidad de las mezclas gangliósidos/Ptx se comparó con la elasticidad media calculada de monocapas mezclas ideales, teniendo en cuenta el  $C_S^{-1}$  de monocapas de componentes puros 1 y 2, el área molecular media  $A_1$  y  $A_2$  y la fracción molar  $X_1$  y  $X_2$  de los componentes 1 y 2, respectivamente, a la  $\pi$  correspondiente, [5] de acuerdo con:

$$C_{S\pi}^{-1} \equiv \left[ X_1 \left( \frac{A_1}{C_{S1}^{-1}} \right)_{\pi} + X_2 \left( \frac{A_2}{C_{S2}^{-1}} \right)_{\pi} \right]^{-1} \cdot (A_1 X_1 + A_2 X_2) \quad (\text{B.2})$$

El potencial de superficie por densidad de moléculas ( $\delta V \cdot n^{-1}$ ), donde  $n$  es el número de moléculas por  $\text{cm}^2$  de superficie, se calculó a partir del potencial de superficie (dipolo) medido para las monocapas ( $\Delta V$ ) y el área molecular media  $A$  [101] a la presión de la superficie  $\pi$ :

$$\frac{\partial V}{n} \equiv \Delta V \cdot A \quad (\text{B.3})$$

El área molecular media y la  $\delta V \cdot n^{-1}$  de las mezclas a la presión de la superficie correspondiente se comparó con los valores predichos por la regla de aditividad [36] de acuerdo con:

$$A_{\pi} \equiv X_1 (A_1)_{\pi} + X_2 (A_2)_{\pi} \quad (\text{B.4})$$

$$\left(\frac{\delta V}{n}\right)_{\pi} \equiv X_1 \left(\frac{\delta V}{n_1}\right)_{\pi} + X_2 \left(\frac{\delta V}{n_2}\right)_{\pi} \quad (\text{B.5})$$

donde  $A_1$ ,  $A_2$  y  $\delta V \cdot n_1^{-1}$ ,  $\delta V \cdot n_2^{-1}$  son el área molecular media y potencial de superficie por densidad de moléculas de los componentes 1 y 2, respectivamente, en la  $\pi$  presión superficial [36].

El exceso de energía libre de mezcla ( $G_m^E$ ) se calculó a partir de la integral de las curvas de  $\pi - A$  de los componentes puros y las mezclas [36], entre 1 y 7  $mN.m^{-1}$ , de acuerdo con la fórmula:

$$\Delta G_m^E \equiv \int_1^7 A_{1,2} d\pi - \left( X_1 \int_1^7 A_1 d\pi + X_2 \int_1^7 A_2 d\pi \right) \quad (\text{B.6})$$

donde  $A_1$ ,  $A_2$  son el área molecular media de los componentes 1 y 2, respectivamente, y  $A_{1,2}$  son las áreas moleculares media de los componentes 1 y 2 de una monocapa mixta.

# Referencias Bibliográficas

- [1] D. Acquotti y S. Sonnino. Use of nuclear magnetic resonance spectroscopy in evaluation of ganglioside structure, conformation and dynamics. *Methods Enzymol*, 312:247–272, 2000.
- [2] M.L. Adams, A. Lavasanifar, y G.S. Kwon. Amphiphilic block copolymers for drug delivery. *J Pharm Sci*, 92:1343–1354, 2003.
- [3] A. W. Adamson y A. P. Gast. *Physical chemistry of surfaces*. Wiley Interscience Publication. Jhon Wiley & Sons Inc, 1997.
- [4] H.K. Ahn, M. Jung, S.J. Sym, D.B. Shin, S.M. Kang, S.Y. Kyung, J.W. Park, S.H. Jeong, y E.K. Cho. A phase ii trial of cremophor elfree paclitaxel (genexolpm) and gemcitabine in patients with advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 74:277–282, 2014.
- [5] S. Ali, J.M. Smaby, H.L. Brockman, y R.E. Brown. Cholesterol's interfacial interactions with galactosylceramides. *Biochemistry*, 33:2900–2906, 1994.
- [6] E.A.G. Aniansson, S.N. Wall, M. Almgren, H. Hoffmann, I. Kielmann, W. Ulbricht, R. Zana, J. Lang, y C. Tondre. Theory of the kinetics of micellar equilibria and quantitative interpretation of chemical relaxation studies of micellar solutions of ionic surfactants. *J Phys Chem*, 80:905–922, 1976.
- [7] N.F. Avrova, I.O. Zakharov, V.A. Tyurin, Y.Y. Tyurina, y IA Ganaley. Different metabolic effects of ganglioside gm1 in brain synaptosomes and phagocytic cells. *Neurochem Res*, 27:751–759, 2002.
- [8] S.V. Balasubramanian y R.M. Straubinger. Taxol-lipid interactions: taxol-dependent effects on the physical properties of model membranes. *Biochemistry*, 33:8941–8947, 1994.

- [9] H.J. Barrales-Cureño y M.S. Hernández. Bioquímica de los taxoides utilizados contra el cáncer. *REB*, 30:12-20, 2011.
- [10] G. Bocci, A. Di Paolo, y R. Danesi. The pharmacological bases of the antiangiogenic activity. *Angiogenesis*, 16:481-492, 2013.
- [11] C. Bourgaux y P. Couvreur. Interactions of anticancer drugs with biomembranes: what can we learn from model membranes? *Journal of Controlled Release*, 190:127-138, 2014.
- [12] P. Brocca, L. Cantú, M. Corti, E. Del Favero, y A. Raudino. Collective phenomena in confined micellar systems of gangliosides. *Physica A*, 304:117-190, 2002.
- [13] S. Cammas, K. Suzuki, C. Sone, Y. Sakurai, K. Kataoka, y T. Okano. Thermo-responsive polymer nanoparticles with a core-shell micelle structure as site-specific drug carriers. *J Controlled Release*, 48:157-164, 1997.
- [14] L. Cantú, M. Corti, D. Aquotti, y S. Sonnino. Aggregation properties of gangliosides: influence of the primary and secondary structure of the headgroup. *Le J de Physique IV*, 3:57-64, 1993.
- [15] L. Cantú, M. Corti, E. Del Favero, E. Digirolamo, y A. Raudino. Thermal hysteresis phenomena in micellar solutions of gangliosides: Theory and experiments. *J Phys II France*, 6:1037-1090, 1996.
- [16] L. Cantú, M. Corti, E. Del Favero, E. Muller, A. Raudino, y S. Sonnino. Thermal hysteresis in ganglioside micelles investigated by differential scanning calorimetry and light-scattering. *Langmuir*, 15:4975-4980, 1999.
- [17] L. Cantú, M. Corti, S. Sonnino, y G. Tettamanti. Light scattering measurements on gangliosides: dependence of micellar properties on molecular structure and temperature. *Chem Phys Lipids*, 41:315-328, 1986.
- [18] D.C. Carrer y B. Maggio. Transduction to self-assembly of molecular geometry and local interactions in mixtures of ceramides and ganglioside gm1. *Biochim Bioph Acta (BBA)-Biomembranes*, 1514:87-99, 2001.
- [19] S.D. Chipman, F.B. Oldham, G. Pezzoni, y J.W. Singer. Biological and clinical characterization of paclitaxel poliglumex (ppx, ct-2103), a macromolecular polymer drug conjugate. *Int J Nanomedicine*, 1:375-383, 2006.

- [20] K. Cho, X. Wang, S. Nie, Z. Chen, y D.M. Shin. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res*, 14:1310–1316, 2008.
- [21] T.H. Chou, I.M. Chu, y F.A. Chang. Interaction of paclitaxel with dspe in monolayers at the air/water interface at different temperatures. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 25:147–155, 2002.
- [22] J.H. Crowe y L.M. Crowe. Factors affecting the stability of dry liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 26:327–334, 1998.
- [23] S. Danson, D. Ferry, y V. Alakhov. Phase i dose escalation and pharmacokinetic study of phronic polymer-bound doxorubicin (sp1049c) in patients with advanced cancer. *Br J Cancer*, 90:2085–2091, 2004.
- [24] N. Desai, V. Trien, Z. Yao, L. Lonie, S. Ci, A. Yang, C. Tao, T. De, B. Beals, D. Dykes, P. Noker, R. Yao, E. Labao, M. Hawkins, y P. Soon-Shiong. Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, abi-007, compared with cremophor-based paclitaxel. *Clin Cancer Res*, 12:1317–1324, 2006.
- [25] L. Domenico, A.K. Mikhail, M. Salvatore, y C. Pietro. Amphiphiles self-assembly: Basic concepts and future perspectives of supramolecular approaches. *Adv Cond Matter Phys*, 1:1–22, 2015.
- [26] S.K. Dordunoo y H.M. Burt. Solubility and stability of taxol: effects of buffers and cyclodextrins. *Int J Pharm*, 133:1273–1289, 2004.
- [27] R. Duncan. Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. *Nature Reviews Cancer*, 6:688–701, 2006.
- [28] S.S. Feng. Interpretation of mechanochemical properties of lipid bilayer vesicles from the equation of state or pressure-area measurement of the monolayer at the air-water or oil-water interface. *Langmuir*, 15:998–1010, 1999.
- [29] S.S. Feng, K. Gong, y J. Chew. Molecular interactions between a lipid and an antineoplastic drug paclitaxel (taxol) within the lipid monolayer at the air/water interface. *Langmuir*, 18:4061–4070, 2002.

- [30] A. Fernandez-Botello, F. Comelles, M.A. Alsina, P. Cea, y F. Reig. A monolayer study on interactions of docetaxel with model lipid membranes. *J Phys Chem B*, 112:13834–13841, 2008.
- [31] G.D. Fidelio, T. Ariga, y B. Maggio. Molecular parameters of gangliosides in monolayers: comparative evaluation of suitable purification procedures. *J Biochem*, 110:12–16, 1991.
- [32] P.H. Fishman. Role of membrane gangliosides in the binding and action of bacterial toxins. *J Membr Biol*, 69:985–979, 1982.
- [33] M.L. Flenniken, D.A. Willits, A.L. Harmsen, L.O. Liepold, A.G. Harmsen, M.J. Young, y T. Douglas. Melanoma and lymphocyte cell-specific targeting incorporated into heat shock protein cage architecture. *Chem Biol*, 13:161–170, 2006.
- [34] S.L. Frey, E.Y. Chi, C. Arratia, J. Majewski, K. Kjaer, y K.Y.C. Lee. Condensing and fluidizing effects of ganglioside g m1 on phospholipid films. *Biophys J*, 94:3047–3064, 2008.
- [35] M. Fukunaga-Kalabis y M. Herlyn. Unraveling mysteries of the multifunctional protein sparc. *J Invest Dermatol*, 127:2497–2498, 2007.
- [36] G.L. Gaines. *Insoluble monolayer at liquid-gas interfaces*. Interscience Publishers - John Wiley & Sons, New York, 1966.
- [37] D. Le Garrec, J. Taillefer, J.E. Van Lier, V. Lenaerts, y J.C. Leroux. Optimizing ph responsive polymeric micelles for drug delivery in a cancer photodynamic therapy model. *J Drug Target*, 10:429–437, 2002.
- [38] A.G. Garro, R.V. Alasino, V. Leonhard, I. Bianco, V. Heredia, y D.M. Beltramo. Polyamines in the surface of lipid micelles improve the cellular uptake of antitumoral agents. *Current Biotechnol*, 5:1–1, 2015.
- [39] G. Gaucher, M.H. Dufresne, V.P. Sant, N. Kang, D. Maysinger, y J.C. Leroux. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *J Control Res*, 109:169–188, 2005.
- [40] M.C. Giuffrida, F. Dosio, F. Castelli, y M.G. Sarpietro. Lipophilic prodrug of paclitaxel: interaction with a dimyristoylphosphatidylcholine monolayer. *Int J Pharmaceutics*, 475:624–631, 2014.

- [41] F.A. Greco y T.M. Hainsworth. One-hour paclitaxel infusions: a review of safety and efficacy. *Cancer J. Sci. Am.*, 5:179-191, 1999.
- [42] E. A. Guggenheim. *Thermodynamics: An advanced treatment for chemists and physicists*. North Holland Co., 1985.
- [43] Bianco ID Fernandez EJ Fidelio GD Guglielmone HA, Daniele JJ. Inhibition of human platelet aggregation by gangliosides. *Thrombosis Res*, 98:51-57, 2000.
- [44] S. Hakomori. Bifunctional role of glycosphingolipids: modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions. *J Biol Chem*, 265:18713-18716, 1990.
- [45] D. Hanahan y R. A. Weinberg. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100:57-70, 2000.
- [46] D. Hanahan y R. A. Weinberg. The hallmarks of cancer. *Cell*, 144:646-674, 2011.
- [47] M.J. Hawkins, P. Soon-Shiong, y N. Desai. Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. *Adv Drug Del Rev*, 60:876-885, 2008.
- [48] K.M. Huh, S.C. Lee, Y.W. Cho, J. Lee, J.H. Jeong, y K. Park. Hydrotropic polymer micelle system for delivery of paclitaxel. *J Control Rel*, 101:59-68, 2005.
- [49] J.N. Israelachvili. Physics of amphiphiles: Micelles, vesicles and microemulsions. En *DeGiorgio V and Corti M (Eds.)*, North-Holland, 1985.
- [50] J.N. Israelachvili, S. Marcelja, y R.G. Horn. Physical principles of membrane organization. *Q Rev Biophys*, 13:121-200, 1980.
- [51] J.N. Israelachvili, DJ Mitchell, y BW Ninham. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *J Chem Soc Faraday Trans II*, 72:1525-1568, 1976.
- [52] J.L.V. Jato. Nanotecnología farmacéutica: una galénica emergente: discurso del excmo. sr. d. José Luis Vila Jato, leído en la sesión de día 9 de marzo de 2006 para su ingreso como académico de número y contestación del excmo. sr. d. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé. 2006.

- [53] M. Jones y J. Leroux. Polymeric micelles - a new generation of colloidal drug carriers. *Eur J Pharm Biopharm*, 48:101-111, 1999.
- [54] M. Jones y J. Leroux. Polymeric micelles - a new generation of colloidal drug carriers. *Eur J Pharm Biopharm*, 48:101-111, 1999.
- [55] I. Katime, J.R. Quintana, y M. Villacampa. Micelas. *Rev Iberoam Polim*, 4:123-151, 2003.
- [56] S.L. Keun, C.C. Hyun, A.I. Seock, H.P. Yeon, S.K. Chul, Sung-Bae, Y.R. Sun, Y.L. Min, y R. Jungsil. Multicenter phase ii trial of genexol-pm, a cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 108:241-250, 2008.
- [57] D.W. Kim, S.Y. Kim, H.K. Kim, S.W. Kim, S.W. Shin, y J.S. Kim. Multicenter phase ii trial of genexol-pm, a novel cremophorfree, polymeric micelle formulation of paclitaxel, with cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*, 18:20092014, 2007.
- [58] T.Y. Kim, D.W. Kim, J.Y. Chung, S.G. Shin, S.C. Kim, y D.S. Heo. Phase i and pharmacokinetic study of genexol-pm, a cremophor-free, polymeric micelle-formulated paclitaxel, in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res*, 10:3708-3716, 2004.
- [59] H. Kobayashi, R. Watanabe, y P. L. Choyke. Improving conventional enhanced permeability and retention effect. *Theranostics*, 4:81-89, 2014.
- [60] P. Kocbek, N. Obermajer, M. Cegnar, J. Kos, y J. Kristl. Targeting cancer cells using plga nanoparticles surface modified with monoclonal antibody. *J Controlled Release*, 120:18-26, 2007.
- [61] J.F. Kukowska-Latallo, K.A. Candido, Z. Cao, S.S. Nigavekarand Majoros, T.P. Thomas, L.P. Balogh, M.K. Khan, y J.R. Baker. Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer. *Cancer Res*, 65:5317-5324, 2005.
- [62] G.S. Kwon, S. Suwa, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, y K. Kataoka. Enhanced tumor accumulation and prolonged circulation times of micelle-forming poly (ethylene oxide- aspartate) block copolymer doxorubicin conjugates. *J Control Release*, 29:17-23, 1994.

- [63] J. Lee, S.C. Lee, G. Acharya, C.J. Chang, y K. Park. Hydrotropic solubilization of paclitaxel: Analysis of chemical structures for hydrotropic property. *Pharm Res*, 20:1022-1030, 2003.
- [64] J.H. Lee, H.B. Lee, y J.D. Andrade. Blood compatibility of polyethylene oxide surfaces. *Prog Polym Sci*, 20:1043-1079, 1995.
- [65] V. Leonhard, R.V. Alasino, I.D. Bianco, y D.M. Beltramo. Selective binding of albumin to gm1 ganglioside micelles containing paclitaxel. *J of Nanomedic Nanotechnol*, 4:1-7, 2013.
- [66] V. Leonhard, R.V. Alasino, I.D. Bianco, A.G. Garro, V. Heredia, y D.M. Beltramo. Self-assembled micelles of monosialogangliosides as nanodelivery vehicles for taxanes. *J Control Release*, 162:619-627, 2012.
- [67] C. Lheveder, J. Meunier, y S. Henon. *Physical Chemistry of Biological Interfaces in Brewster angle microscopy*. New York: M Dekker, 2000.
- [68] T. Lian y R.H. Ho. Trends and developments in liposome drug delivery systems. *J Pharm Sci*, 90:667-680, 2001.
- [69] G. Lollo, G. Rivera-Rodríguez, D. Torres, y M. J. Alonso. Nanoterapias oncológicas. aplicaciones actuales y perspectivas futuras. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 368:77-79, 2011.
- [70] A.N. Lukyanov y V.P. Torchilin. Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs. advanced drug delivery reviews. *Adv Drug Delivery Rev*, 56:1273-1289, 2004.
- [71] B. Maggio. Geometric and thermodynamic restrictions for the self-assembly of glycosphingolipid-phospholipid systems. *Biochim Biophys Acta*, 815:245-258, 1985.
- [72] B. Maggio. The surface behavior of glycosphingolipids in biomembranes: A new frontier of molecular ecology. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 62:55-117, 1994.
- [73] B. Maggio. Favorable and unfavorable lateral interactions of ceramide, neutral glycosphingolipids and gangliosides in mixed monolayers. *Chem Phys Lipids*, 132:209-224, 2004.

- [74] B. Maggio, J. Albert, y R.K. Yu. Thermodynamic-geometric correlations for morphology of self-assembled structures of glycosphingolipids and their mixtures with dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta*, 945:145–160, 1988.
- [75] B. Maggio, F.A. Cumar, y R. Caputto. Interactions of gangliosides with phospholipids and glycosphingolipids in mixed monolayers. *Biochem J*, 175:1113–1118, 1978.
- [76] B. Maggio, F.A. Cumar, y R. Caputto. Surface behavior of gangliosides and related glycosphingolipids. *Biochem J*, 171:559–565, 1978.
- [77] B. Maggio, F.A. Cumar, y R. Caputto. Configuration and interactions of the polar head group in gangliosides. *Biochem J*, 189:435–440, 1980.
- [78] B. Maggio, G.D. Fidelio, F. A. Cumar, y K.Y. Robert. Molecular interactions and thermotropic behavior of glycosphingolipids in model membrane systems. *Chem Phys Lipids*, 42:49–63, 1986.
- [79] Y. Malam, M. Loizidou, y A.M. Seifalian. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends Pharmacol Sci*, 30:592–599, 2009.
- [80] D. Marsh. *Handbook of lipid bilayers*. CRC press, 2013.
- [81] F. Mathot, L. Van Beijsterveldt, V. Preat, M. Brewster, y Arien. Intestinal uptake and biodistribution of novel polymeric micelles after oral administration. *J Controlled Release*, 111:47–55, 2006.
- [82] Y. Matsumura. Preclinical and clinical studies of nk012, an sn-38-incorporating polymeric micelles, which is designed based on epr effect. *Ad Drug Delivery Rev*, 63:184–192, 2011.
- [83] L.A. McCormick-Thomson y R. Duncan. Poly(amino acid) copolymers as a potential soluble drug delivery system. I. pinocytic uptake and lysosomal degradation measured in vitro. *J Bioactive and Compatible Polymers*, 4:242–251, 1989.
- [84] T. Miyoshi y S. Kato. Detailed analysis of the surface area and elasticity in the saturated 1, 2-diacylphosphatidylcholine/cholesterol binary monolayer system. *Langmuir*, 31:9086–9096, 2015.

- [85] S.M. Moghimi, A.C. Hunter, y J.C. Murray. Long circulation and target-specific nanoparticles: Theory to practice. *Pharmacol Rev*, 53:283-318, 2001.
- [86] S.M. Moghimi y H.M. Patel. *Liposome Technology*. CRC Press. Boca Ratón, Florida, 1993.
- [87] T. Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol Methods*, 65:55-63, 1983.
- [88] D.W. Northfelt, J.B. Allred, H. Liu, T.J. Hobday, M.W. Rodacker, A.P. Lyss, T.R. Fitch, y E.A. Perez. Phase 2 trial of paclitaxel polyglumex with capecitabine for metastatic breast cancer. *Am J Clin Oncol*, 37:167-171, 2014.
- [89] C. Oerlemans, W. Bult, M. Bos, G. Storm, J.F.W. Nijssen, y W.E. Hennink. Polymeric micelles in anticancer therapy: Targeting, imaging and triggered. *Release Pharm Res*, 27:2569-2589, 2010.
- [90] D. Orthaber y O. Glatter. Time and temperature dependent aggregation behaviour of the ganglioside gm1 in aqueous solution. *Chem Phys Lipids*, 92:53-62, 1998.
- [91] G. Pastorin, W. Wu, S. Wieckowski, J.P. Briand, K. Kostarelos, M. Prato, y A. Bianco. Double functionalization of carbon nanotubes for multimodal drug delivery. *Chem Commun*, 11:1182-1184, 2006.
- [92] M.C. Phillips, D.E. Graham, y H. Hauser. Lateral compressibility and penetration into phospholipid monolayers and bilayer membranes. *Nature*, 1:154-156, 1975.
- [93] G. Pillai. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *SOJ Pharm Pharm Sci*, 1:13-13, 2014.
- [94] D.J. Pillion, J.A. Amsden, C.R. Kensil, y J. Recchia. Structure-function relationship among quillaja saponins serving as excipients for nasal and ocular delivery of insulin. *J Pharm Sci*, 85:518-524, 1996.

- [95] N.A. Podoltsev, M. Rubín, J. Figueroa, M.Y. Lee, J. Kwonj, y J. Yu. Phase ii clinical trial of paclitaxel loaded polymeric micelle (gpm) in patients (pts) with advanced pancreatic cancer (apc). *J Clin Oncol*, 26:4627–4627, 2008.
- [96] P.G. Rose. Pegylated liposomal doxorubicin: Optimizing the dosing schedule in ovarian cancer. *J. Liposome Res*, 10:205–214, 2005.
- [97] C.M. Rosetti, R.G. Oliveira, y B. Maggio. Reflectance and topography of glycosphingolipid monolayers at the air-water interface. *Langmuir*, 19:377–384, 2003.
- [98] S.K. Sahoo y V. Labhasetwar. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *DDT*, 8:1112–1120, 2003.
- [99] P.B. Schiff, J. Fant, y S.B. Horwitz. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*, 277:665–667, 1979.
- [100] R.L. Schnaar, R. Gerardy-Schahn, y H. Hildebrandt. Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiol Rev*, 94:461–518, 2014.
- [101] D.O. Shah. Molecular interactions in mixed monolayers: Existence of a 1:2 molecular association between stearic acid and stearyl alcohol in mixed monolayers. *J. Colloid Interface Sci*, 32:577–583, 1970.
- [102] J.W. Singer. Paclitaxel poliglunex (xyotax, ct-2103): A macromolecular taxane. *J Control Release*, 109:120–126, 2005.
- [103] O. Soga, C.F. Van Nostrum, M. Fens, C.J. Rijcken, R.M. Schiffelers, y G. Storm. Thermosensitive and biodegradable polymeric micelles for paclitaxel delivery. *J Controlled Release*, 103:341–353, 2005.
- [104] S. Sonnino, L. Cantú, M. Corti, D. Acquotti, y B. Venerando. Aggregative properties of gangliosides in solution. *Chem Phys Lipids*, 71:21–45, 1994.
- [105] S. Sonnino, L. Mauri, V. Chigorno, y A. Prinetti. Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology*, 17:1–13, 2006.
- [106] B.W. Stewart y C.P. Wild. *World Cancer Report 2014*. International Agency for Research on Cancer. WHO, 2014.

- [107] K. Sungwon, S. Yunzhou, K. Ji Young, P. Kinam, y C. Ji-Xin. Overcoming the barriers in micellar drug delivery: loading efficiency, in vivo stability, and micelle-cell interaction. *Expert Opin Drug Deliv*, 7:49-62, 2010.
- [108] M.S. Surapaneni, S.K. Das, y N.G. Das. Designing paclitaxel drug delivery systems aimed at improved patient outcomes: current status and challenges. *ISRN Pharmacology*, 1:1-15, 2012.
- [109] J. Szebeni, C.R. Alving, S. Savay, Y. Barenholz, A. Prieu, D. Danino, y Y. Talmon. Formation of complement-activating particles in aqueous solutions of taxol: possible role in hypersensitivity reactions. *International Immunopharmacol*, 1:721-735, 2001.
- [110] H. Yasui C. Morizane M. Ikeda H. Ueno T. Hamaguchi, K. Kato. A phase I and pharmacokinetic study of nk105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation. *Br J Cancer*, 97:170-176, 2007.
- [111] C. Tanford. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes 2nd Ed.* Wiley, New York, 1980.
- [112] V.P. Torchilin. How do polymers prolong circulation time of liposomes? *J. Liposome Res*, 6:99-110, 1996.
- [113] V.P. Torchilin. Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. *Pharm Res*, 24:1-16, 2007.
- [114] V.P. Torchilin. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *The APPS J*, 2:128-147, 2007.
- [115] D. J. Miñones Trillo. La interfase aire/agua: monocapas de extensión: discurso de ingreso a la real academia de farmacia. 2002.
- [116] J. Miñones Trillo. la interfase aire/agua: monocapas de extensión: discurso del excmo. sr. d. j miñones trillo. 2002.
- [117] V.A. Tyurin, Y.Y. Tyurina Y.Y., y N. Avrova. Ganglioside-dependent factor, inhibiting lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem Int*, 20:401-407, 1992.

- [118] I. Vergote. An open, randomized, multicenter study in patients with recurrent epithelial cancer, primary peritoneal cancer or fallopian tube cancer to compare the efficacy and safety of paclitaxel (micellar) nanoparticles and paclitaxel (cremophor el). sponsor: Oasmia pharmaceutical ab. id: Nct00989131. <https://clinicaltrials.gov>. 2014.
- [119] I. Vergote, A. Brize, A.S. Lisyanskaya, y M. Lichinitser. Randomized phase iii study comparing paclitaxel-carboplatin with paclitaxel-carboplatin in patients with recurrent platinum-sensitive epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol*, 33:5517-5517, 2015.
- [120] D. Vollhardt y V.B. Fainerman. Characterisation of phase transition in adsorbed monolayers at the air/water interface. *Adv Colloid Interface Sci*, 154:1-19, 2010.
- [121] T. Wang, V.A. Petrenko, y V.P. Torchilin. Paclitaxel-loaded polymeric micelles modified with mcf-7 cell-specific protein: Enhanced binding to target cancer cells and increased cytotoxicity. *Mol Pharmaceutics*, 7:1007-1014, 2010.
- [122] M.C. Wani, H.L. Taylor, M.E. Wall, P. Coggon, y A.T. McPhail. Plant antitumor agents vi. the isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc*, 93:2325-2327, 1971.
- [123] R.B. Weiss, R.C. Donehower, P.H. Wiernik, T. Ohnuma, y R.J. Gralla. Hypersensitivity reactions from taxol. *J Clin Oncol*, 8:1263-1268, 1990.
- [124] R.H. Wilson, R. Plummer, J. Adam, M. Eatock, A.V. Boddy, y M. Griffin. Phase i and pharmacokinetic study of nc-6004, a new platinum entity of cisplatin-conjugated polymer forming micelles. En *ASCO Annual Meeting Proceedings*. 2008.
- [125] A.C. Wolff, R.C. Donehower, y M.K. Carducci. Phase i study of docosahexaenoic acid-paclitaxel: a taxane-fatty acid conjugate with a unique pharmacology and toxicity profile. *Clin Cancer*, 9:3589-3597, 2003.
- [126] J. You, X. Li, F. de Cui, Y.Z. Du, H. Yuan, y F. Hu. Folate-conjugated polymer micelles for active targeting to cancer cells: preparation, in vitro

- evaluation of targeting ability and cytotoxicity. *Nanotechnology*, 19:45102–45111, 2008.
- [127] W.C. Zamboni. Concept and clinical evaluation of carrier-mediated anti-cancer agents. *The Oncologist*, 13:248–260, 2008.
- [128] F. Zhang, E.T. Kang, K.G. Neoh, y W. Huang. Surface modification of poly(tetrafluoroethylene) films via grafting of poly(ethylene oxide) for reduction of protein adsorption. *J Biomater Sci Polym*, 11:169–186, 2000.
- [129] L. Zhao y S.S. Feng. Effects of lipid chain length on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within model biomembranes. *J Colloid Interface Sci*, 274:55–68, 2004.
- [130] L. Zhao y S.S. Feng. Effects of lipid chain unsaturation and headgroup type on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within model biomembrane. *J Colloid Interface Sci*, 285:326–335, 2005.
- [131] L. Zhao y S.S. Feng. Effects of cholesterol component on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within the lipid monolayer at the airwater interface. *J Colloid Interface Sci*, 300:314–326, 2006.
- [132] L. Zhao, S.S. Feng, y M.L. Go. Investigation of molecular interactions between paclitaxel and dppc by langmuir film balance and differential scanning calorimetry. *J Pharm Sci*, 93:86–98, 2004.
- [133] X. Zhao, Z. Poon, A.C. Engler, D.K. Bonner, y P.T. Hammond. Enhanced stability of polymeric micelles based on postfunctionalized poly(ethylene glycol)-b-poly(-propargyl glutamate): the substituent effect. *Biomacromolecules*, 13:1315–1322, 2012.
- [134] L. Zzspahn y S.S. Feng. Effects of lipid chain unsaturation and headgroup type on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within model biomembrane. *J Colloid Interface Sci*, 285:326–335, 2005.