

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

**«Estudio de la captación hepática de nanoesferas
biodegradables»**

**Autor: Jarold Justo González Concepción
Director: Dra. D^a Carmen Evora y
Dr. D. Matías Llabrés**

**Departamento de Ingeniería Química y
Tecnología Farmacéutica**

A la memoria de mis abuelos

Justo y Bonifacio

A mis padres

A mi hermana

A mi novia

Una vez finalizada esta memoria, deseo expresar mis agradecimientos a todas aquellas personas que de una forma directa o indirecta me han apoyado.

A los directores de la tesis Dra. Carmen Evora por la confianza depositada y el Dr. Matías Llabrés por sus valiosas sugerencias y gran ayuda en el ajuste de los modelos.

A los Profesores José B. Fariña y Obdulia Munguía, por su colaboración inestimable, siempre desinteresada y generosa.

A los Dres. Esther Sánchez, Jesús Mallol, Isabel Soriano y Araceli Delgado, por su compañerismo.

A Virginia, Juan, María Jesús, Alexis, Ana, Antonio, Laura y Carmen por las horas compartidas y las experiencias vividas durante estos años.

A Diego Molina, que gracias a su ingenio, colaboración y horas dedicadas; que contribuyeron a la elaboración y culminación de esta memoria.

A Margarita por su ayuda y disposición en todo momento.

A Juan Manuel de Medicina Nuclear, que con su ayuda desinteresada fue posible realizar esta memoria.

A mi familia y amigos que me han animado en todo momento durante estos años de trabajo y que sin su ayuda hubiera sido imposible realizar esta memoria. En especial a mis padres, a mi hermana y a mi novia que han tenido la paciencia de entenderme, apoyarme y comprenderme durante estos años.

A todos ellos mis más sinceros reconocimientos.

ÍNDICE

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1.- PRINCIPALES SISTEMAS COLOIDALES TRANSPORTADORES DE FÁRMACOS .	2
1.2.- MECANISMO DE RECONOCIMIENTO Y FAGOCITOSIS	3
1.3.- HÍGADO COMO ÓRGANO	6
1.3.1.- <i>Anatomo-fisiología del hígado</i>	7
1.3.2.- <i>Flujo sanguíneo a través del hígado</i>	8
1.3.3.- <i>Sistema macrófago hepático: función depuradora de la sangre del hígado</i>	8
1.4.- POLÍMEROS PROTECTORES DE LA CAPTACIÓN HEPÁTICA	8
1.5.- MÉTODO DE RECUBRIMIENTO DE PARTÍCULAS	10
1.5.1.- <i>Adsorción física de un polímero en la superficie de una partícula</i>	10
1.5.2.- <i>Unión química de cadenas de polímeros sobre una partícula</i>	11
1.6.- PROPIEDADES Y CARACTERÍSTICAS QUE HACEN DEL PEG UN BUEN AGENTE PROTECTOR	14
1.6.1.- <i>Mecanismo de acción de las cubiertas de peg</i>	15
1.7.- ESTUDIO IN VITRO E IN VIVO DE PARTÍCULAS RECUBIERTAS	16
1.7.1.- <i>Estudio in vitro</i>	16
1.7.2.- <i>Estudio in vivo de biodistribución de partículas recubiertas</i>	17
1.8.- FACTORES QUE INFLUYEN EN LA BIODISTRIBUCIÓN DE NANOPARTÍCULAS .	19
1.9.- MARCADORES APROPIADOS PARA EL ESTUDIO FARMACOCINÉTICO	23
1.10.- MODELOS HEPÁTICOS	24
1.10.1.- <i>Modelo de equilibrio venoso o “well-stirred” y modelo de tubos paralelos o “perfusión sinusoidal”</i>	25
1.10.1.1.- <i>Modelo de equilibrio venoso o “well-stirred”</i>	27
1.10.1.2.- <i>Modelo de tubos paralelos o “perfusión sinusoidal”</i>	29
1.10.1.3.- <i>Comparación entre los dos modelos</i>	29
1.10.2.- <i>Modelo de distribución</i>	30
1.10.3.- <i>Modelo de dispersión</i>	33
1.10.4.- <i>Modelos compartimentales para el estudio de perfusión in situ y biodistribución</i>	35

Capítulo 2

OBJETIVOS	43
-----------------	----

Capítulo 3

CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS

3.- ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS (NANOESEFERAS Y GLÓBULOS ROJOS)	44
3.1.- SÍNTESIS DE POLÍMEROS	44
3.2.- DETERMINACIÓN DE LOS PESOS MOLECULARES	44
3.3.- COMPOSICIÓN DE LOS POLÍMEROS	45
3.4.- PREPARACIÓN DE NANOESEFERAS	46
3.5.- CARACTERIZACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LAS NANOESEFERAS MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE FOTOELECTRONES	47
3.5.1.- <i>Fundamento de la espectroscopía de fotoelectrones xps</i>	47
3.5.2.- <i>Espectro xps</i>	48
3.5.2.1.- <i>Descomposición de un espectro en varios componentes</i>	49
3.5.2.2.- <i>Metodología</i>	49
3.5.2.3.- <i>Técnica de referencia vía carbono adventicio de contaminación</i>	50
3.5.2.4.- <i>Preparación de las muestras</i>	51
3.5.2.5.- <i>Resolución</i>	51
3.5.3.- <i>Análisis espectroscópico</i>	51
3.5.3.1.- <i>espectros generales y de perfil</i>	51
3.5.3.2.- <i>Estructura fina de los espectros c1s y o1s</i>	58
3.5.3.3.- <i>Estudio de los espectros xps c1s de peg-6000, mpeg-5000 y pluronic</i> ..	58
3.5.3.4.- <i>Estudio de los espectros xps c1s de plga, peg-plga y mpeg-plga</i> ..	67
3.5.3.5.- <i>Estudio de los espectros xps de las nanoesferas de plga, peg-Plga y mpeg-plga</i>	72
3.5.4.- <i>Caracterización morfológica de las nanoesferas mediante técnicas nanométricas</i>	78
3.5.4.1.- <i>Microscopía de fuerza atómica (afm)</i>	78
3.5.4.2.- <i>Obtención de imágenes</i>	80
3.5.4.3.- <i>Determinación de las dimensiones verticales</i>	81
3.5.4.4.- <i>Determinación de las dimensiones horizontales</i>	1
3.5.4.5.- <i>Preparación de las muestras</i>	82

3.5.4.6.- Unidades morfológicas aisladas (muestras en suspensión)	83
3.5.4.7.- Acúmulos de liofilizado (muestras sólidas)	84
3.5.4.8.- Estabilidad de los agregados de nanoesferas	96
3.5.5.- Perfilometría interferométrica	96
3.5.5.1.- Análisis de superficies mediante microscopía interferométrica ...	96
3.5.5.2.- Análisis perfilométrico de sedimentos de nanoesferas	96
3.6.- EFECTO DE LOS TENSIOACTIVOS EN LA ELABORACIÓN DE NANOESFERAS .	104
3.7.- DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE LAS NANOESFERAS	104
3.8.- CONDICIONES DE LIOFILIZACIÓN	104
3.8.1.- Efecto de la liofilización en el tamaño de nanopartículas	105
3.9.- CONTROLES REALIZADOS AL ELUIDO DE ^{99m} Tc	106
3.9.1.- Control físico-químico	106
3.9.2.- Control radiológico	107
3.10.- SISTEMAS DE MARCAJES	108
3.10.1.- Marcaje de nanoesferas con ^{99m} Tc	108
3.10.1.1.- Efecto del proceso de marcaje con ^{99m} Tc en el tamaño de las nanoesferas	108
3.10.2.- Marcaje de glóbulos rojos con ^{99m} Tc	110
3.10.3.- Marcaje de glóbulos rojos con ⁵¹ Cr	111
3.11.- ESTABILIDAD DEL MARCAJE	112
3.11.1.- Estabilidad del marcaje de nanoesferas con ^{99m} Tc	112
3.11.2.- Estabilidad de glóbulos rojos marcados con ⁵¹ Cr y ^{99m} Tc	114

Capítulo 4

PERFUSIÓN

4.- ENSAYOS DE PERFUSIÓN	96
4.1.- DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO (TÉCNICA DE PERFUSIÓN)	96
4.2.- ANÁLISIS DE DATOS MEDIANTE EL MÉTODO DE LOS MOMENTOS	98
4.2.1.- Normalización de las curvas de actividad - tiempo	98
4.2.2.- Tasa de extracción y momentos del tiempo de residencia hepático	100
4.2.2.1.- Cálculo de los momentos estadísticos	101
4.2.3.- Resultados experimentales	104
4.2.3.1.- Resultados de la captación hepática en la perfusión para los tres sistemas poliméricos y los glóbulos rojos	104
4.2.3.2.- Tasa de extracción	106

4.2.3.3.- <i>Tiempo medio</i>	108
4.3.- MODELO CINÉTICO DE CAPTACIÓN HEPÁTICA IN SITU	110
4.3.1.- <i>Caracterización del sistema de inyección</i>	111
4.3.1.1.- <i>Simulación del modelo de disposición</i>	112
4.3.1.2.- <i>Estimación de los parámetros del modelo de dispersión</i>	114
4.3.1.3.- <i>Resultados</i>	118
4.4.- MODELO DE DISPOSICIÓN HEPÁTICA	119
4.4.1.- <i>Identificación del modelo y estimación de los parámetros</i>	122
4.4.2.- <i>Momentos estadísticos</i>	123
4.4.3.- <i>Interpretación de las curvas experimentales</i>	124
4.4.3.1.- <i>Convolución numérica</i>	124
4.4.3.2.- <i>función de entrada del sistema</i>	125
4.4.4.- <i>Resultados de la perfusión hepática</i>	127
ANEXO	135

Capítulo 5

BIODISTRIBUCIÓN	
5.- ESTUDIO IN VIVO (BIODISTRIBUCIÓN)	151
5.1.- DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO	151
5.2.- RESULTADOS EXPERIMENTALES	151
5.3.- ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO	159
5.3.1.- <i>Estimación de los parámetros del modelo</i>	162
5.4.- RESULTADOS DEL ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO	163
ANEXO	168
6.-CONCLUSIONES	172
7.- BIBLIOGRAFÍA	174

Capítulo 1
INTRODUCCIÓN

El desarrollo de sistemas coloidales es de gran interés para el transporte de fármacos debido a la capacidad de suministrar pequeñas dosis durante tiempos más prolongados y así evitar problemas de sobredosificación, estos sistemas son administrados por vía intravenosa y permiten que el fármaco se libere de una forma controlada y continua; favoreciendo la permanencia en el lecho vascular.

Las aplicaciones más interesantes de estos sistemas en el campo farmacéutico son, el transporte de fármacos de naturaleza peptídica, ampliar las posibilidades de las distintas vías de administración y la posibilidad de liberar agentes terapéuticos y de diagnóstico de forma controlada (*Torchilin y Trubetskoy, 1995*), la protección de la actividad terapéutica de estas moléculas frente a la degradación in vivo antes de llegar al órgano o tejido deseado, reducir los efectos tóxicos, mayor comodidad del paciente evitando inyecciones repetidas o el uso de bombas de perfusión y lograr una mejor farmacocinética del fármaco (*Gref y col., 1995*).

Los principales objetivos de la administración de partículas coloidales cargadas con fármacos en el compartimento vascular es evitar las interacciones con el Sistema Retículo Endotelial (RES), ir al tejido deseado, liberar el compuesto activo con una velocidad óptima y finalmente degradarse en elementos no tóxicos, los cuales pueden ser eliminados del organismo sin causar efectos secundarios (*Verdun y col., 1986*).

El empleo de estos sistemas está justificado para la administración de macromoléculas del tipo de fármacos proteicos los cuales generalmente no pueden ser administrados oralmente, debido a que son hidrolizados o desnaturalizados en el tracto gastrointestinal. La administración parenteral también presenta algunos problemas, debido a que las proteínas son rápidamente metabolizadas y eliminadas.

Varios autores (*Singh y col. 1991; Alonso y col., 1993; Sánchez y col., 1996*), apuntan la posibilidad de desarrollar vacunas con estos sistemas de forma tal que no sea necesario dosis repetidas, siempre y cuando estas partículas no sean reconocidas por el RES y de esta forma ir liberando lentamente su contenido.

Los fármacos empleados en el tratamiento del cáncer o de infecciones vírales, por ejemplo, presentan graves efectos secundarios debido a la poca especificidad del fármaco (*Couvreur y Vauthier, 1991*), por lo que los sistemas coloidales podrían dirigir estos fármacos directamente al tejido deseado, aumentando su efectividad y reduciendo los efectos tóxicos (*Verdun y col., 1986*).

Por todas estas razones, algunos grupos de investigadores (*Gref, Illum, Bazile,*

etc.) en los últimos años han desarrollado un gran número de sistemas de partículas, en la mayoría de ellos, el vehículo empleado ha sido algún tipo de polímero biodegradable.

Los polímeros más utilizados y estudiados son los poliésteres, entre los que podemos citar el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA) y sus diferentes copolímeros poliláctoglicólico (PLGA), debido a su biocompatibilidad y su baja toxicidad (*Yamaguchi y Anderson, 1993*).

1.1.- PRINCIPALES SISTEMAS COLOIDALES TRANSPORTADORES DE FÁRMACOS

Varios tipos de sistemas (emulsiones submicrónicas, liposomas, micropartículas y nanopartículas) han sido desarrollados en la última década para transportar y liberar controladamente en sitios específicos determinadas biomoléculas.

Las **emulsiones submicrónicas** se han utilizado en los últimos años principalmente como un vehículo de fármacos lipofílicos para administración intravenosa y parenteral (*Collins-Gold y col., 1989; Prankerd y Stella, 1990; Magenheim y Benita, 1991*). Las emulsiones submicrónicas están disponibles y clínicamente bien aceptadas, pero no hay evidencias claras de como ocurre la incorporación del fármaco a dicha emulsión y si este altera el modelo farmacocinético (*Collins-Gold y col., 1990*).

Los **Liposomas** son sistemas coloidales formados por fosfolípidos los cuales se dispersan en agua y forman espontáneamente una estructura cerrada con un compartimento interno acuoso rodeado por una bicapa lipídica en forma de membrana. Una gran variedad de compuestos anfifílicos (formados por una parte hidrofóbica y otra hidrofílica) pueden ser usados junto con glicerofosfolípidos en su elaboración, también se pueden utilizar esterol (colesterol), esfingolípidos, glicolípidos, largas cadenas de ácido graso, etc (*Juliano y Layton, 1980; Juliano, 1983*). Estos sistemas han sido muy estudiados para el transporte de fármacos, los cuales presentan una gran cantidad de aplicaciones potenciales. Sin embargo, problemas asociados con su producción a gran escala todavía están por resolverse (*Magenheim y Benita, 1991*). El efecto destructivo del suero humano afecta la estabilidad y la integridad de los liposomas, además presentan poca estabilidad en el fluido gastrointestinal (*Woodley, 1986*).

Las **Micropartículas y Nanopartículas** son uno de los sistemas coloidales más estudiados actualmente, se elaboran con polímeros que una vez cumplida su función deben ser eliminados sin producir productos tóxicos (*Vittaz y col., 1996*).

Las micropartículas y las nanopartículas son sistemas coloidales con un rango de tamaño del orden de los micrómetros y nanómetros respectivamente. Se utilizan como vehículo de fármacos, enzimas o antígenos ya sean disueltos, encapsulados, unidos químicamente a la matriz o adsorbidos en la superficie de estas partículas (Covreur, 1988).

Estos sistemas han aventajado a los anteriores en su estabilidad durante su almacenamiento y en los fluidos biológicos (Covreur, 1988). Sin embargo, muchos de ellos han sido reconocidos por las células fagocitarias como productos extraños y eliminados rápidamente de la circulación sanguínea (Leroux, y col., 1995).

1.2.- MECANISMO DE RECONOCIMIENTO Y FAGOCITOSIS DE PARTÍCULAS

El aclaramiento de micropartículas y nanopartículas del lecho vascular puede deberse a diferentes factores destacándose, la agregación de partículas, salidas desde la zona vascular, desestabilización de partículas y liberación de su contenido, enlaces a células circulantes, impacto/adsorción en el forro endotelial y la captación por el sistema fagocitario (constituido principalmente por células del sistema fagocitario mononuclear (MPS) y leucocitos polimorfonucleares), siendo este último el de mayor interés. (Gref y col., 1995).

Los estudios de distribución después de administraciones intravenosas de nanopartículas de diferentes naturaleza (Poliestireno y Poliláctico) , demuestran que fueron reconocidas por células fagocitarias al ser consideradas partículas extrañas, ya que son retiradas del sistema de circulación en 5 minutos por los macrófagos del RES (Illum y col., 1987a).

El RES está formado principalmente por macrófagos y neutrófilos cuya función más importante es la de fagocitar a todos aquellos agentes ofensivos para el organismo.

Los fagocitos deben ser selectivos hacia el material que fagocitan; ya que de no ser así, se ingerirían algunas células y estructuras normales del cuerpo. El que se produzca o no la fagocitosis depende especialmente de tres procesos selectivos:

En primer lugar, la mayor parte de las estructuras naturales de los tejidos tienen superficies lisas, que se resisten a la fagocitosis. Pero si la superficie es rugosa aumenta la probabilidad de fagocitosis.

En segundo lugar, la mayor parte de las sustancias naturales del cuerpo tienen

cubiertas proteicas protectoras que repelen a los fagocitos. Por otra parte, los tejidos muertos y la mayor parte de las partículas extrañas carecen con frecuencia de películas protectoras, lo que les hace objeto de fagocitosis .

En tercer lugar, el cuerpo tiene medios específicos para reconocer ciertos materiales extraños. Esta es una función del sistema inmunitario. El sistema inmunitario produce anticuerpos contra agentes infecciosos y extraños, estos se adhieren entonces a las superficies de estos agentes, y por tanto, favorecen su fagocitosis. Para conseguirlo, la molécula de anticuerpo se combina también con el producto C3 de la cascada del complemento, que es una parte adicional del sistema inmunitario. La molécula C3 se une entonces a receptores de la membrana de los fagocitos, iniciando así la fagocitosis. El proceso completo se denomina opsonización.

Se denomina complementos a un sistema formado por 30 proteínas, muchas de las cuales son precursores enzimáticos (*Vittaz y col., 1996*). Los principales actores de este sistema son 11 proteínas denominadas C1 a C9, B, D. Todas ellas están presentes normalmente entre las proteínas del plasma, así como entre las proteínas plasmáticas que atraviesan los capilares hacia los espacios tisulares.

La fagocitosis no es específica para estas especies de partículas, pero es normalmente la responsable de la respuesta del sistema inmune al interactuar con partículas extrañas. El proceso de fagocitosis está medido por la opsonización y los complementos del suero son uno de los principales componentes de la misma en el sistema (*Artusson y Sjöholm, 1986; Kreuter, 1993*).

Otras proteínas tales como la γ globulina y el fibrinógeno pueden tener acción competitiva (*Patel, 1992*), por lo que participan en este proceso de adsorción el cual puede ser parcialmente reversible y frecuentemente se describen como irreversibles (*Soderquist y Walton, 1980*). Sin embargo, algunos artículos muestran que la desorción de proteínas también ocurre (*Kreuter, 1983*).

En recientes estudios se ha determinado que para nanoesferas de PLGA(45kD) las principales proteínas asociadas a dichas nanoesferas fueron las apolipoproteínas (apo) J, C-III, E y A-I después de 5 minutos de incubadas. Además se detectaron cantidades considerables de fibrinógeno, γ globulina y apolipoproteína A-IV. La cantidad total de proteínas adsorbidas en las partículas de PLGA fueron cuatro veces superior que las adsorbidas en nanoesferas de PEG-PLGA, resultados similares se obtuvieron para nanoesferas de PEG(5kD)-PLGA(45kD), PEG(12kD)-PLGA(100kD) y PEG(20kD)-PLGA

180(kD) (*Blunk y col., 1993*).

Leroux y col 1995, han puesto de manifiesto la importancia de las γ globulinas en el proceso de opsonización, ya que se unen eficientemente a nanopartículas (*Leroux, 1994*), pudiendo activar los complementos del suero, los cuales tienen receptores específicos en la fagocitosis (*Patel, 1992*).

Recientemente, apolipoproteínas tales como la apo E han sido identificadas por electroforesis de gel bidimensional (2-D PAGE) como posibles proteínas involucradas en la biodistribución de nanopartículas de PLA (*Leroux y col., 1994*) y de Poliestireno (PS) (*Blunk y col., 1993*). El reconocimiento de nanopartículas por monocitos vía apoE puede requerir la presencia simultánea de otras proteínas de la sangre, las cuales se desconocen pero pudieran estar relacionadas con las apolipoproteínas A1 (*Leroux y col., 1994; Norman y col, 1993*).

La adsorción de los componentes de la sangre es un proceso dinámico y que ocurre en la región interfacial, *Chuang y col. (1980); Coleman y col. (1980)* definieron esta región como un lugar muy concurrido.

Soderquist y Walton 1980, estudiaron los procesos de adsorción y desorción en la interfase de polímeros utilizando albúmina, γ globulina y fibrinógeno, donde proponen que este proceso está caracterizado por tres pasos:

1- La captación rápida y reversible de las proteínas, ocurre casi en un minuto alcanzando un seudoequilibrio. Una vez alcanzado un nivel de recubrimiento (50-60% de moléculas adsorbidas), se produce probablemente una reordenación de la superficie favoreciendo la posterior captación de más proteínas.

2- Las moléculas sobre la superficie sufren una transición estructural que aumenta la interacción proteína/superficie, haciéndose la desorción menos probable.

3- La probabilidad de desorción disminuye con el tiempo de residencia en la superficie. La proteína que se desorbe es desnaturalizada perdiendo su capacidad de adsorción, y por tanto se puede considerar que el proceso de desorción es más o menos irreversible.

Soderquist y Walton 1980, concluyeron que los enlaces hidrofóbicos son las fuerzas predominantes en la adhesión de proteínas a las superficies extrañas. Además, el desdoblamiento de las proteínas exteriorizan su carácter interior hidrofóbico, aumentando la superficie de interacción. Este proceso lleva consigo un aumento de entropía del material adsorbido, y una optimización de las interacciones hidrofóbicas.

Una vez que hayan actuado todos estos procesos de reconocimiento, las partículas extrañas para el organismo son fagocitadas en su gran mayoría por las células de Kupffer del hígado.

Schäfer y col 1994, determinaron por microscopía electrónica de barrido el proceso de fagocitosis en nanoesferas de albúmina. Las nanoesferas se unen a la superficie de las células fagocitarias siendo entonces detectadas por los pseudópodos de los macrófagos y englobadas por el citoplasma de los lamelípodos.

El sistema de fagocitosis de partículas presenta dos pasos en su mecanismo:

Adhesión de las partículas a la superficie de las células y posteriormente la ingestión. La fase de adhesión puede explicarse como los macrófagos presentan receptores en su superficie (*Chouly, 1996*). Esto sugiere que la carga de la superficie influye en la capacidad de las partículas para ser opsonizadas y fagocitadas (*Tröster y Kreuter, 1988*).

1.3.- HÍGADO COMO ÓRGANO

El hígado es el órgano mayor del cuerpo humano; en los adultos pesa unos 1400 g. Presenta un color pardo rojizo. En su mayor parte se halla en la porción derecha del cuerpo, con la superficie convexa adaptada a la superficie inferior cóncava del diafragma. Tiene dos lóbulos principales, el derecho mayor que el izquierdo.

Las funciones básicas del hígado se pueden dividir en:

- 1- Funciones vasculares para almacén y filtrado de la sangre.
- 2- Funciones metabólicas que tienen que ver con la mayor parte de los sistemas metabólicos del organismo.
- 3- Funciones secretoras y excretoras responsable de la bilis que fluyen a través de los conductos biliares al tubo digestivo.

1.3.1.- ANATOMO-FISIOLOGÍA DEL HÍGADO

La unidad funcional básica del hígado es el lóbulo hepático, que es una estructura cilíndrica de varios milímetros de longitud y de 0.8 a 2 milímetros de diámetro.

El lóbulo hepático cuyo corte esquemático se muestra en la figura 1.1, se construye alrededor de una vena central, que culmina en las venas hepáticas y después en la vena cava. El propio lóbulo está compuesto principalmente de muchas placas celulares hepáticas que irradian de forma centrifuga, desde la vena central. Cada placa

hepática suele tener dos células de espesor y entre las células adyacentes se encuentran pequeños canaliculos biliares, que se unen a conductos biliares en los tabiques fibrosos que separan los lóbulos hepáticos adyacentes.

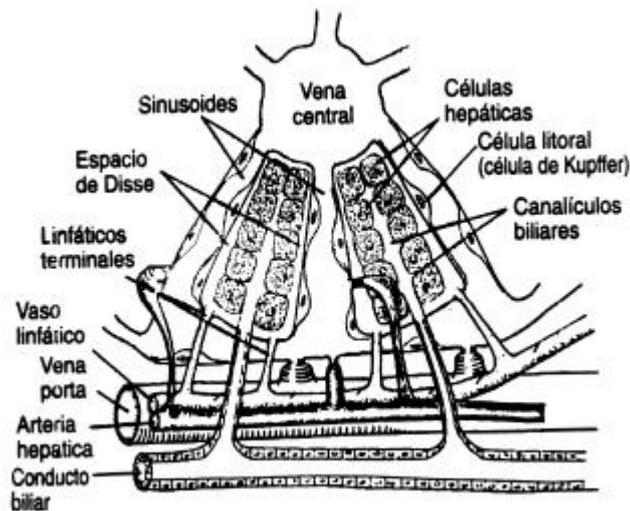


Figura 1.1.- Estructura básica de un lóbulo hepático, que muestra las placas celulares hepáticas, los vasos sanguíneos, el sistema colector de bilis y el sistema de flujo linfa compuesto de espacios Disse y de linfáticos interlobulares. (Reproducido de Guyton, Taylor y Granger (modificado de Elías), Guyton y Hall, 1996).

En los tabiques también hay pequeñas vénulas portales, que reciben la sangre principalmente del flujo venoso que procede del tubo digestivo por las venas portales. Desde estas vénulas, la sangre fluye a los sinusoides aplanados y ramificados que se encuentran en las placas hepáticas y después a la vena central. De este modo, las células hepáticas están expuestas continuamente a la sangre venosa portal.

Además de las vénulas portales, en los tabiques interlobulares están las arteriolas hepáticas. Estas arteriolas aportan sangre arterial a los tejidos septales situados entre los lóbulos adyacentes, y muchas de las pequeñas arteriolas se vacían también directamente en los sinusoides hepáticos, siendo lo más frecuente que se unan en ellos aproximadamente a un tercio de la distancia de los tabiques interlobulares, como se muestra en la figura 1.1.

Además de las células hepáticas, los sinusoides venosos están recubiertos de otros dos tipos de células, las células endoteliales típicas y las grandes células de

Kupffer (también llamadas células endoteliales), que son un tipo de macrófago capaz de fagocitar bacterias y otras sustancias extrañas en la sangre del seno hepático. El recubrimiento endotelial de los sinusoides tienen poros extremadamente grandes, algunos de los cuales miden aproximadamente 1 μm de diámetro. Por debajo de esta capa, entre las células endoteliales y las células hepáticas, hay un espacio tisular estrecho llamado espacio de Disse. Los millones de espacios de Disse se conectan a su vez con los vasos linfáticos en los tabiques interlobulares.

Por tanto, el exceso de líquido en estos espacios se elimina a través de los linfáticos. Debido a los grandes poros del endotelio, las sustancias del plasma pasan libremente al espacio de Disse. Incluso grandes porciones de las proteínas plasmáticas difunden libremente a este espacio.

1.3.2.- FLUJO SANGUÍNEO A TRAVÉS DEL HÍGADO

Unos 1100 ml aproximadamente de sangre fluyen desde la vena porta a los sinusoides hepáticos cada minuto, y aproximadamente unos 350 ml adicionales a los sinusoides desde la arteria hepática, dando una media total de unos 1450 ml/min. Esta cantidad supone aproximadamente el 29% del gasto cardíaco en reposo, casi una tercera parte del flujo sanguíneo corporal total.

1.3.3.- SISTEMA MACRÓFAGO HEPÁTICO: FUNCIÓN DEPURADORA DE LA SANGRE DEL HÍGADO

La sangre que fluye a través de los capilares intestinales recoge muchas bacterias de los intestinos. De hecho, cuando se cultiva una muestra de sangre de las venas portales antes de entrar en el hígado casi siempre crecen bacilos calóricos, mientras que es extremadamente raro que estos crezcan a partir de sangre de la circulación sistémica. Películas especiales de alta velocidad de la acción de las células de Kupffer, los grandes macrófagos fagocíticos que recubren los senos venosos hepáticos, han demostrado que estas células pueden depurar la sangre de una forma extremadamente eficaz a medida que atraviesa los senos; cuando una partícula extraña entra en contacto momentáneamente con las células de Kupffer, en menos de 0.01 segundos la partícula pasa a través de la pared de la célula de Kupffer a su interior, alojándose allí de forma permanente hasta que es digerida. Probablemente no más del 1% de las partículas extrañas que entran en la sangre portal consiguen atravesar el

hígado hacia la circulación sistémica.

1.4.- POLÍMEROS PROTECTORES DE LA CAPTACIÓN HEPÁTICA

Varias tentativas fueron realizadas para tratar de mantener nanoesferas y liposomas en circulación durante períodos relativamente prolongados de tiempo evitando ser reconocidos por el RES, principalmente se ha empleado adsorción o uniones químicas de polímeros o moléculas a la superficie de las partículas (*Illum y col., 1987a*); *Müller y Kissel, 1993*; *Tröster y Kreuter, 1992*; *Allen, 1994*), pudiendo reducir o minimizar las interacciones con los complementos y de esta forma evitar la fagocitosis. Diferentes polímeros han sido utilizados como agentes protectores destacándose por sus diversas propiedades los tensioactivos (*Illum y Davis, 1987*) y más recientemente el polietilenglicol (PEG) (*Dunn y col., 1994a*; *Gref y col., 1994*; *Leroux y col., 1994*) y el metoxi PEG (*Bazile y col., 1995*), entre otros.

En la actualidad se estudia el uso de diferentes polímeros los cuales pueden ser usados en el recubrimiento de partículas, para esto es necesario, por una parte que sean solubles e hidrofílicos, (*Allen, 1994*) escribió “Si tu quieres ser invisible, aseméjate al agua”, y por otra parte que tengan alta flexibilidad en la cadena principal, por esta razón, partículas con superficie hidrofílica sobre las cuales las moléculas de agua fácilmente se adsorben y a la vez con alta flexibilidad posibilitan un mayor tiempo de vida en la sangre (*Blume y Cevc, 1990*; *Tröster y Kreuter, 1992*; *Allen, 1994*).

Algunos polímeros anfifílicos han sido utilizados para la estabilización de nanopartículas de superficie hidrofóbica para prolongar su circulación en el lecho vascular y alterar su biodistribución. Una detallada descripción de polímeros modificadores de nanopartículas se ha llevado a cabo por *Moghimi, Stolnik, Illum y otros* (*Moghimi y col., 1993*; *Stolnik y col., 1994*; *Illum y col., 1987a*).

Uno de los más comúnmente usados es la serie de copolímeros lineales de óxido de polietileno y óxido de propileno (Pluronic/Tetronic o Polaxamer/Polaxamine), que se han utilizado para recubrir partículas de PS (*Moghimi y col., 1991a*). Para la protección estérica de liposomas se han empleado otros tipos de polímeros, destacándose los PEG-Fosfatidiletanolamina (PEG-PE) (*Klibanov y col., 1990*).

Dentro de los polímeros anfifílicos son los formados por dibloques y multibloques del tipo PEG-R o metoxi (m)PEG-R donde R puede ser tanto un polímero o copolímero biodegradable (PLA, PLGA, PGA, Policaprolactona PCL, etc) (*Krause y col., 1985*; *Gref*

y col., 1994), como polímeros no degradables (PS, policianocrilatos, etc), quedando el PEG siempre orientado hacia la fase externa y el R estaría en la fase interna junto con el fármaco encapsulado, dando lugar a micropartículas y nanopartículas estéricamente estables. (Shah y col., 1994)

Para que los polímeros realicen su función protectora Bazile y col. 1995 demostraron mediante el método combinado de hidrólisis alcalina y coloración del mPEG que las cadenas de mPEG están localizadas en la superficie de las nanoesferas.

A diferencia de los liposomas, en los cuales generalmente la parte hidrofóbica del polímero protector anfílico se encuentra dentro de la bicapa fosfolipídica, en las micropartículas y nanopartículas, estos se encuentran adsorbidos o unidos químicamente a la superficie de estas partículas.

1.5.- MÉTODOS DE RECUBRIMIENTO DE PARTÍCULAS

1.5.1.- ADSORCIÓN FÍSICA DE UN POLÍMERO EN LA SUPERFICIE DE UNA PARTÍCULA

El mecanismo de adsorción consiste en la formación de una capa protectora que se adhiere a la superficie de las partículas por fuerzas electrostáticas o van der Waals, pero sin llegar a formar nunca enlaces covalentes. Este proceso ocurre para partículas que presentan similitud estructural con el polímero que las recubre.

El espesor óptimo de la capa protectora para conseguir un buen efecto estabilizante en partículas pequeñas (60 nm) es difícil de predecir exactamente, pero un espesor de capa adsorbida de 100 Å podría ser adecuado para proporcionar no solamente una estabilización estérica a partículas de 60 nm en términos de una posible agregación, sino también para evitar la interacción con los macrófagos (Illum y col., 1987b).

La rápida captación por el RES de partículas de PS se reduce parcialmente recubriéndolas con surfactantes artificiales tales como polaxamine 908 (Illum y col., 1987a), 1508 (Tröster y Kreuter, 1992) o albúmina (Norman y col., 1992).

Porter y col (1992), demostraron que el recubrimiento de PS con determinados copolímeros no solamente reducen su captación por los macrófagos del hígado, sino que son capaces de redirigirse a otros órganos después de inyectadas por vía intravenosa. Nanopartículas de PS recubiertas con Polaxamer 407 se acumulan en médula ósea. Este mismo grupo demostró que un procedimiento análogo ayudó sustancialmente a

alterar la biodistribución de nanoesferas por vía subcutánea.

Los surfactantes Polaxamer y Polaxamine contienen bloques de polietilenglicol (PEG) y polipropilenglicol (PPG). Los bloques de PPG que son los más hidrofóbicos se adsorben en la superficie del PS y los más hidrofílicos PEG sobresalen fuera de la superficie y forman una película protectora (*Illum y Davis, 1983*). La adsorción disminuye con la rugosidad y polaridad de la superficie. No obstante, las partículas de PS recubiertas con tensioactivos y partículas de Polimetilmetacrilato recubiertas por polaxamer, no pueden ser utilizados como sistema terapéutico debido a que no son biodegradables (*Tröster y Kreuter, 1988*). Por esta razón los estudios llevados a cabo con el PS se realizaron con polímeros biodegradables (PLGA) (*Dunn y col., 1994b*), el cual se recubrió por adsorción con copolímeros dibloques PEG-PLA (*Illum y col, 1987a; Tröster y Kreuter, 1992*). Sin embargo, los resultados in vivo PLGA/PEG-PLA y PS/Polaxamine 908 indicaron que la adsorción de capas de PEG-PLA al polímero presenta una menor estabilidad o resistencia a la adsorción de proteínas que la mostrada por el PS recubierto con Polaxamer 908.

También se estudió la posible sustitución del PS por PLA, pero los resultados no fueron los esperados ya que estas partículas fueron captadas muy rápidamente y su tiempo de vida media en la sangre solamente llegaba a los 2 min. (*Verrechia y col., 1995*). Esto se debió seguramente a un rápido intercambio de los surfactantes por algunos complementos proteicos que se localizan en el lecho vascular. La diferencia en la captación entre partículas de PLA y PS se debe a que los surfactantes presentan una mayor afinidad por estos últimos lo cual permite que estén mayor tiempo en *circulación* (*Illum y Davis, 1983; Illum y Davis, 1984*).

Dunn y col (1994a) trataron de incorporar PEG a la estructura del PLGA mediante adsorción, pero fue imposible ya que se producían desorciones, con lo cual esta posibilidad también quedaba eliminada.

1.5.2.- UNIÓN QUÍMICA DE CADENAS DE POLÍMEROS SOBRE UNA PARTÍCULA.

Este método consiste en la formación de enlaces covalentes entre el polímero formador de la partícula y el agente de recubrimiento, lo cual pudiera solucionar los problemas de estabilidad de los agentes protectores presentados anteriormente.

Muchos autores (*Müller y Kissel, 1993; Gref y col., 1995*) plantearon además

como alternativa la incorporación de dichas cadenas mediante reacción química, que en la mayoría de los casos se basa en la polimerización por apertura del anillo de las formas cíclicas de los monómeros (Gref y col., 1995).

Moghimi y col (1991a), demostraron que el polaxamer 407 podía proteger de la captación del RES a nanoesferas de latex pero no a los liposomas de igual tamaño. Esto se debe, según Allen (1994) a que en la unión liposoma polaxamer la región hidrofóbica está perpendicular a las cadenas acílica de la bicapa, mientras que con PEG-PE el anclaje hidrofóbico está paralelo a la cadena acílica. Esto da como resultado que el espesor del recubrimiento sea considerablemente menor en liposomas que en nanopartículas (Jamshaid y col., 1988; Woodle y col., 1992). El PEG-PE funciona mejor que el polaxamer F-108 (Woodle y col., 1992), en el recubrimiento de liposomas, aumentando su tiempo de vida (Klibanov y col., 1990; Blume y Cevc, 1990; Mori y col., 1991; Torchilin y col., 1992). De forma general los liposomas recubiertos con PEG crean una barrera estérica en la superficie la cual impide su opsonización por parte de las proteínas plasmáticas (Senior y col., 1991; Chonn y col., 1991; Chonn y col., 1992).

El PEG ha presentado grandes ventajas en el caso de los liposomas superando a otros polímeros debido a que ha disminuido la captación por el RES, ha aumentado el tiempo de residencia en la sangre y la flexibilidad de la bicapa lipídica (Allen, 1994).

La flexibilidad de la bicapa lipídica es un factor esencial para prolongar el tiempo de circulación de los liposomas y por tanto disminuir la interacción con las proteínas del plasma. Sin embargo, una excesiva flexibilidad puede dar lugar a la desestabilización de la membrana y a la liberación del fármaco encapsulado, limitando la utilidad de estos sistemas (Juliano, 1988; Scherphof, 1978).

Con respecto a partículas poliméricas, Harper y col. 1991, concluyeron en su trabajo que el recubrimiento de nanopartículas de PS con polioxietileno (PEO) es más eficaz para evitar la fagocitosis cuando la unión es por enlace covalente que cuando se encuentra adsorbida a la superficie.

Dunn y col. 1994a observaron como partículas de PS unidas covalentemente a cadenas de PEG(2kD) en su superficie eran menos atrapadas por el hígado que el PS sin recubrir, e incluso recubiertas con Polaxamine 908. Además se encontró una correlación entre la densidad superficial del PEG y el tiempo de circulación en sangre.

Igualmente las nanopartículas de Polialquil-cianocrilatos (PACC) (Gref y col., 1995), albúmina (Müller y Kissel, 1993) o poliácido aspártico (Kataoka y col., 1993)

recubiertas covalentemente con PEG permanecen un tiempo más prolongado en sangre.

También se ha comprobado que es capaz de disminuir el carácter inmunogénico y antigénico de ciertas proteínas (Abuchowski y col., 1977), aumentar su biocompatibilidad (Sawhney y col., 1993) y reducir la adsorción de proteínas y componentes sanguíneos (Desai y Hubbell, 1992; Bergström y col., 1994; Han y col., 1993; Kishida y col., 1992; Prime y Whitesides, 1993).

Con la misma finalidad Torchilin y col. 1994, desarrollaron polímeros hidrofílicos con un grupo lipídico o acílico graso terminal tales como PEG-PE o poli(acrilamida-palmitil) (PAA-P), como posibles protectores covalentes de nanopartículas de PS. Las primeras tuvieron un tiempo de circulación prolongado ($t_{1/2}=4h$), mientras que las segundas fueron rápidamente eliminadas.

Stolnik y col (1994), demostraron que no todos los sistemas que utilizan PEG tienen el mismo comportamiento. Según se evidencia en la tabla 1.1, los sistemas PS/PLA:PEG 2:5 y PS/PLA:PEG 3:4 fueron rápidamente retirados de la circulación. Sin embargo, las nanopartículas de PLGA con PLA:PEG, permanecen circulando más tiempo (figura 1.2), estas diferencias pueden deberse a que el PLA-PEG se puede unir más fácilmente al PLGA que al PS, debido a su similar naturaleza química, confiriéndole una capa protectora estable que evita la unión de proteínas plasmáticas en su superficie.

Sistemas	% de Radiactividad asociada con el órgano		
	Hígado	Bazo	Sangre
PS sin recubrir	50.4 ± 3.1	5.6 ± 2.6	9.8 ± 4.0
PS/PLA:PEG 2:5	50.4 ± 0.5	11.8 ± 4.0	1.7 ± 0.4
PS/PLA:PEG 3:4	46.4 ± 3.3	17.3 ± 1.8	1.0 ± 0.1
PS/Polaxamine 908	14.0 ± 0.5	23.5 ± 1.2	38.6 ± 1.5
PLGA sin recubrir	63.8 ± 0.1	2.2 ± 0.3	4.6 ± 0.5
PLGA/PLA:PEG 2:5	22.7 ± 1.0	10.7 ± 1.9	28.5 ± 9.3
PLGA/PLA:PEG 3:4	20.9 ± 5.6	8.4 ± 1.1	17.5 ± 1.8
PLGA/Polaxamine 908	33.4 ± 0.4	12.0 ± 0.5	20.3 ± 0.8

Tabla 1.1.- Efecto del recubrimiento en nanopartículas de PS y PLGA con copolímeros de PLA:PEG 2:5 y 3:4 y Polaxamine 908 en la acumulación en diferentes órganos de rata a las tres horas después de la inyección (Stolnik y col., 1994).

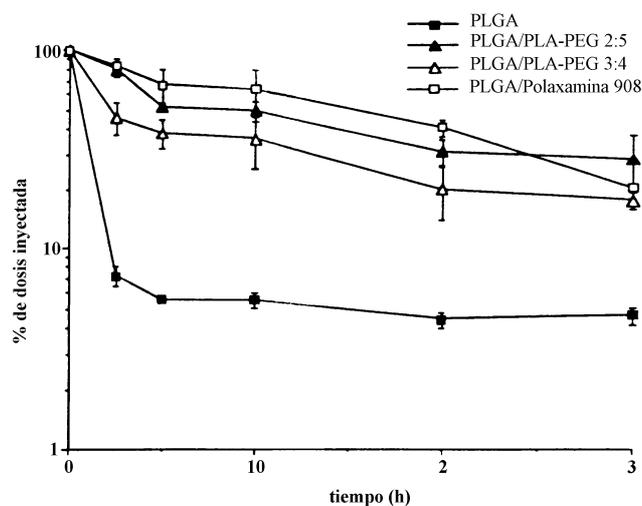


Figura 1.2.- Curvas de aclaramiento sanguíneo para nanoesferas de PLGA sin recubrir y recubiertas con copolímeros de PLA:PEG (2:5), PLA:PEG (3:4) y Polaxamine 908 después de una inyección intravenosa (Stolnik y col., 1994).

Bazile y col (1995), realizaron un estudio comparativo del efecto protector que producen los recubrimientos de Pluronic F-68 y mPEG, concluyendo que el recubrimiento con mPEG reduce más eficazmente la fagocitosis. El escaso éxito del F68 se debe probablemente a la desorción y el rápido reemplazamiento por los componentes del suero o a un recubrimiento insuficiente de la superficie dando un “material imperfecto”.

1.6.- PROPIEDADES Y CARACTERÍSTICAS QUE HACEN DEL PEG UN BUEN AGENTE PROTECTOR.

Según, Torchilin y Papisov (1994), un buen agente protector no debe presentar en su estructura grupos hidroxilos (polisacáridos), ni grupos aminos (polisinas) debido a que son blancos de los complementos C3 y C4 respectivamente, por estas razones el PEG se considera un buen protector.

El PEG confiere a las superficies de las partículas cierto carácter hidrofílico, así como suficiente densidad y flexibilidad para reducir las interacciones con los agentes opsonizantes (Torchilin y Papisov, 1994).

Además, el PEG posee una serie de propiedades entre las que destacan muy baja toxicidad por lo que fue aprobado por la FDA para uso humano (Harris, 1985; Pang,

1993), excelente solubilidad (Zalipsky, 1995), muy baja inmunogeneidad y antigenicidad (Dreborg y Akerblom, 1990; Delgado y col., 1992; Katre, 1993; Zalipsky y Lee, 1992) y finalmente cuando se administra al organismo, no se acumula en el RES y se elimina fácilmente (Yamaoka y col., 1994).

1.6.1.- MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS CUBIERTAS DE PEG

Conocer el mecanismo de acción de recubrimientos hidrofílicos y en particular los de PEG ha sido un gran avance en el diseño de partículas con óptimas propiedades superficiales. El PEG forma un recubrimiento hidrofílico que actúa como impedimento estérico evitando así la opsonización por las proteínas del plasma (Torchilin y Papisov, 1993; Tan y col, 1993; Blume y Cevc, 1993).

Las condiciones por las cuales las partículas hidrofóbicas rodeadas de PEG en forma de cepillo, evitan o reducen la interacción con las proteínas opsonizantes de la sangre fueron estudiadas por Jeon y col (1991) y Jeon y Andrade (1991), los cuales elaboraron un modelo matemático teniendo en cuenta cuatro tipo de interacciones entre proteína y partícula figura 1.3.

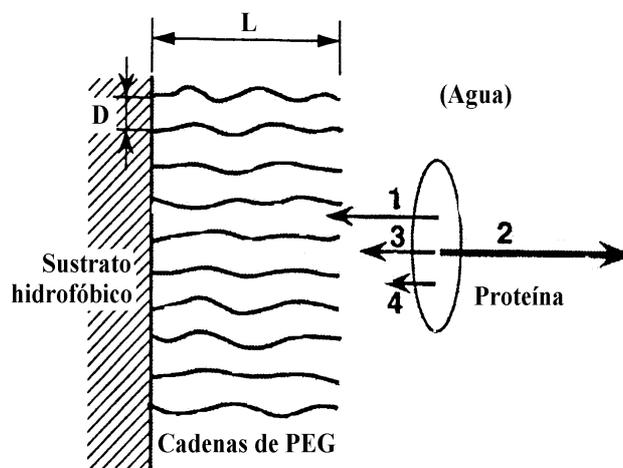


Figura 1.3.- Interacción entre una proteína y un sustrato hidrofóbico con cadenas de PEG. 1: Atracciones hidrofóbicas entre la proteína y el sustrato, 2: Repulsión estérica producidas por las cadenas de PEG. 3: Atracciones de van der Waals entre las proteínas y el sustrato. 4: Atracciones de van der Waals entre las proteínas y las cadenas de PEG (Gref y col., 1995).

La mayor repulsión de proteínas se consigue con largas cadenas de PEG y alta densidad superficial (Jeon y col., 1991). En la figura 1.3, se representa la distancia (D)

entre los anclajes al substrato de dos cadenas de PEG. En el caso de pequeñas proteínas (radio de 2 nm), D debe encontrarse alrededor de 1 nm, mientras que para proteínas mayores (6-8 nm), D se encuentra alrededor de 1.5 nm. Esto sugiere que ambos, la reducción en la adsorción de opsonizantes y la adsorción selectiva de ciertos componentes del plasma (desopsonización) impiden el reconocimiento y la captación de nanopartículas por los macrófagos, la competencia entre estos dos mecanismos se cree que es la clave para controlar la captación de las partículas por los macrófagos y por lo tanto su biodistribución (*Moghimi y col., 1993*).

Por todas las razones anteriores *Jeon y col. (1991)* llegaron a la conclusión que la alta densidad superficial y la longitud de las cadenas de PEG, en los casos anteriormente mencionados son necesarios para dotar de resistencia a las partículas.

1.7.- ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO DE PARTÍCULAS RECUBIERTAS

1.7.1.- ESTUDIOS IN VITRO

Estudios realizados in vitro con nanopartículas de PS-PEG(2kD) demostraron una clara relación entre la densidad superficial del PEG y la capacidad de estas partículas de evitar el reconocimiento por células aisladas no parenquimales del hígado (Tabla 1.2). En ausencia de suero, como muestra la figura 1.4 a medida que aumenta la densidad superficial del PEG reduce su captación por las células fagocitarias. La captación de nanopartículas de PS -PEG 2kD con 15% (b), 41% (c), 51% (d) de C-O en la superficie fue significativamente menor comparada con las nanopartículas de PS no recubiertas y con las nanopartículas PS-PEG 8%(a). Las nanopartículas de PS-PEG 2kD (c) y (d) mostraron similar captación por las células que las partículas PS-908. En presencia de suero la captación de todos los sistemas (excepto PS-PEG 2kDd) fue significativamente inferior que sin suero (*Dunn y col., 1994a*).

Partícula	razón molar estireno: macromonomero	% C-O	Tamaño (nm)	Potencial Zeta
PS	--	4	60.7	-43.8
PS-908	--	20	74.0	-1.9
PS-PEG 2kDa	1:0.004	8	155.3	-18.2
PS-PEG 2kDb	1:0.025	15	101.5	-5.5
PS-PEG 2kDc	1:1.053	41	66.9	-2.0
PS-PEG 2KDd	1:1.061	51	60.7	-1.2

Tabla 1.2.- Razón molar estireno:macromonomero, porcentajes de C-O en la superficie de la partícula, tamaño de partícula y potencial zeta (*Dunn y col., 1994a*).

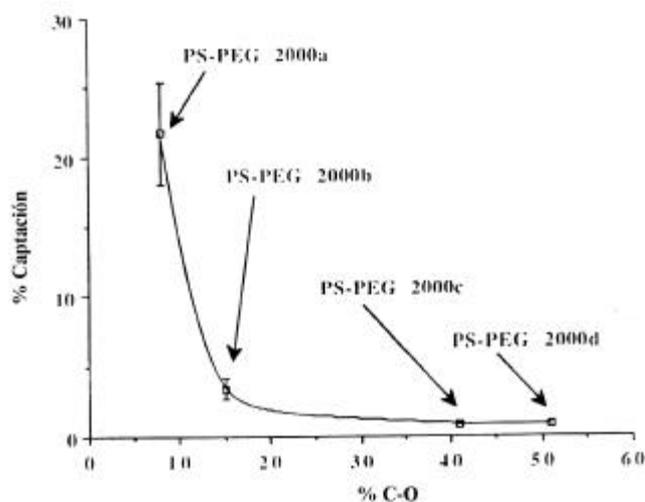


Figura 1.4.- Relación entre la densidad superficial de los carbonos etéreos (% C-O) del PEG en partículas de PS-PEG 2000 (2kD) y la captación in vitro de estas partículas por células no parenquimales del hígado de rata en ausencia de suero (Dunn y col., 1994a).

Illum y col (1987b), realizaron un estudio utilizando macrófagos peritoneales y nanopartículas de PS con diferentes espesores de recubrimiento. Los resultados indican que a mayor espesor de la capa adsorbente menor es la captación de estas partículas por los macrófagos. De esta forma se puede predecir que un recubrimiento de al menos 230 Å es necesario para superar las fuerzas de atracción de van der Waals entre macrófagos y partículas de 5.25 µm.

Bazile y col (1995), incubaron nanopartículas de $(^{14}\text{C})\text{PLA}_{50}(18)\text{-F68}$, $(^{14}\text{C})\text{PLA}_{50}(18)/\text{mPEG}(2)\text{-PLA}_{50}(30)$ y $\text{mPEG}(5)\text{-PLA}_{50}(30)$ en un cultivo celular THP-1. Después de 1 hora de incubación la radioactividad incorporada a los macrófagos procedentes de las nanopartículas de $(^{14}\text{C})\text{PLA}_{50}(18)\text{-F68}$ era de 4-8 veces superior que en el caso de las nanopartículas de $(^{14}\text{C})\text{PLA}_{50}(18)/\text{mPEG}(2)\text{-PLA}_{50}(30)$ y $(^{14}\text{C})\text{PLA}_{50}(18)/\text{mPEG}(5)\text{-PLA}_{50}(30)$ respectivamente, evidenciando la superioridad del efecto protector de los grupos PEG y mPEG sobre copolímeros biodegradables.

1.7.2.- ESTUDIOS IN VIVO DE BIODISTRIBUCIÓN DE PARTÍCULAS RECUBIERTAS

Dunn y col (1994a), comprobaron que al igual que in vitro las nanopartículas de PS-PEG 2000d son menos captadas por el hígado y permanecen mayor tiempo

circulando en sangre que las nanopartículas de PS sin recubrir.

Gref y col (1994), marcaron nanoesferas de PLGA y PEG(20kD)-PLGA con ^{111}In para realizar estudios de biodistribución en ratones. Inyectaron 0.35 ml de una suspensión de nanoesferas por vía intravenosa, muestras de sangre y órgano se midieron 5 minutos después. Como se esperaba las nanopartículas de PLGA no recubiertas se acumulan inmediatamente en el hígado, por el contrario menos del 30 % de nanoesferas de PEG 20(kD)-PLGA se encontraron en el hígado después de 5 horas. El tiempo de circulación de las nanoesferas en la sangre aumentó con el incremento del peso molecular del PEG (figura 1.5).

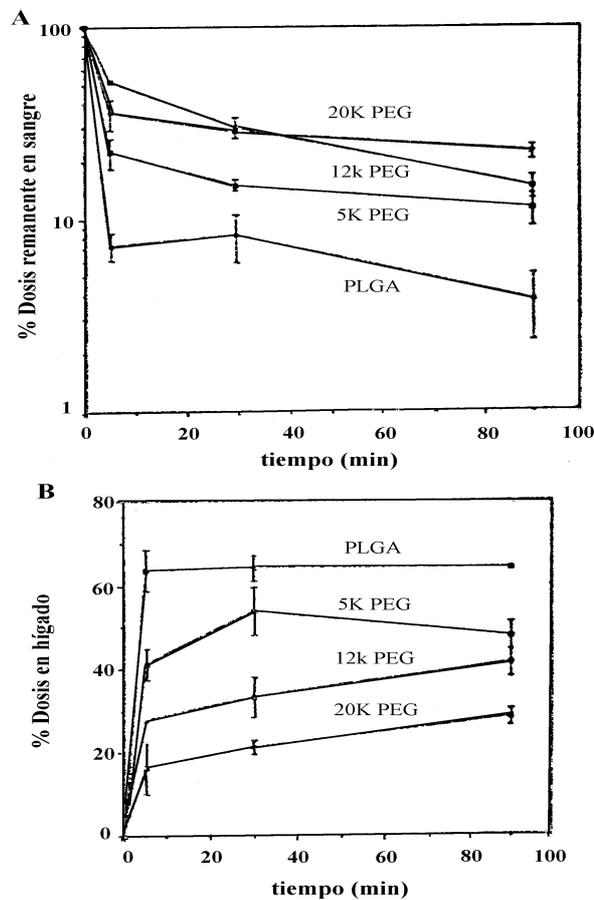


Figura 1.5.- Comparación de los tiempos de circulación en sangre y acumulación en el hígado de nanoesferas de PLGA y PEG-PLGA (*Gref y col., 1994*).

Bazile y col (1995), demostraron que nanopartículas de (^{14}C)PLA(18kD)/

mPEG(5kD)-PLA(30kD) con una alta radioactividad fueron localizadas en el corazón y en la sangre confirmándose que las partículas permanecían circulando durante 6 horas después de la inyección. Por el contrario, nanopartículas de (^{14}C)PLA(18kD)-F68 (Bazile y col., 1995) y PLGA-Albúmina (Verrecchia y col., 1995), no fueron capaces de evitar la fagocitosis, probablemente debido a la desorción y rápido reemplazamiento por los componentes del suero sanguíneo.

Varios autores (Illum y col., 1987a; Moghimi y col., 1993; Tan y col., 1993) han sugerido que las razones por las que disminuye la interacción de las células-partículas y por tanto su baja captación por el hígado de nanopartículas con PEG en su superficie, se debe a la creación de barreras estéricas que disminuyen la adsorción de las proteínas del plasma en la superficie de las nanopartículas. Sin embargo, también se ha sugerido que permite la captación selectiva de ciertos componentes plasmáticos que actúan como desopsonizante, evitando el reconocimiento por los macrófagos. (Moghimi y col., 1993). La biodistribución se debe al balance entre los procesos de opsonización y desopsonización.

Las nanoesferas biodegradables recubiertas con PEG y mPEG (Gref y col., 1994; Gref y col., 1993; Peracchia y col., 1994; Bazile y col., 1993), son uno de los sistemas más esperanzadores pues se ha conseguido prolongar los tiempos de permanencia en el sistema vascular debido a la modificación que produce en la superficie de las partículas (hidrofilicidad, flexibilidad, carga, longitud de la cadena, densidad superficial y homogeneidad superficial.)

1.8.- FACTORES QUE INFLUYEN EN LA BIODISTRIBUCIÓN DE NANOPARTÍCULAS

El tamaño y forma de estas partículas influyen en su distribución en el organismo para circular a lo largo de pequeños capilares, el tamaño de las partículas debe ser menor de 5 μm , además se requiere un diámetro menor de 200 nm para evitar los efectos filtrantes del bazo. Por ejemplo, a pesar de su recubrimiento hidrofílico, partículas modelo de PS de 250-300 nm con superficies modificadas mediante la adsorción de bloques de copolímeros fueron en gran parte atrapados por el bazo (Moghimi y col., 1991b). Gref y col (1995), observaron lo mismo con partículas de PEG-PLGA y PEG-PLA de ese orden de tamaño.

La hidrofilia fue considerada como uno de los principales requerimientos, pero no

el único. Por ejemplo partículas recubiertas con maltopentosa (*Blume y Cevc, 1993*) o con dextrano (*Pain y col., 1984*), son más hidrofílicas que las recubiertas con PEG(5kD), sin embargo fueron eliminadas de la circulación sanguínea con mayor celeridad que estas últimas.

Esto ha hecho pensar que además de la hidrofilia, la flexibilidad (libre rotación de unidades de polímeros individuales alrededor de la unión interunidad) de las cadenas es otro de los requisitos necesarios para el recubrimiento de polímeros. Quizás el bajo carácter inmunogénico y antigénico que sufre el PEG se deba a los cambios transitorios de flexibilidad y estructurales, dificultando la respuesta del sistema inmune (*Woodle y Lasic, 1992*).

La carga de las partículas es uno de los factores que influye en la fagocitosis de las mismas. En nanopartículas elaboradas con PEG-PLGA la presencia de cadenas de PEG orientadas hacia la superficie de la partícula reducen notablemente el potencial zeta.

Kayes y Rawlins (1979), propusieron la medida de la variación del potencial zeta como una medida indirecta del espesor de la capa de recubrimiento.

Müller y col (Illum y col., 1987b) estudiaron la variación del potencial zeta de partículas de PS recubiertas con diferentes surfactantes no iónicos. Se produce una disminución del potencial zeta desde -60 mV para partículas de PS no recubiertas hasta un valor de -26 mV para partículas de PS recubiertas con Polaxamine 908 a pH 7.5.

Tabata e Ikada (1988), determinaron que se produce menor fagocitosis para nanopartículas con superficies hidrofílicas no iónicas. Las superficies no iónicas son las propicias para prolongar el tiempo de circulación en sangre.

Illum y col (1987b), determinaron la relación inversa que se establece entre el potencial zeta y el espesor de la capa adsorbida, mostrada en la figura 1.6. A menor fuerza iónica, la capa de polímero adsorbida será menor que la doble capa difusa y como consecuencia la adsorción del polímero podrá depender de la reducción del potencial zeta. A mayor fuerza iónica la doble capa difusa se reduce y el espesor de la capa del polímero protector es mayor, incluso para polímeros de bajo peso molecular. A medida que aumenta el espesor de la capa protectora menor es el potencial zeta, disminuyendo la fagocitosis de estas partículas.

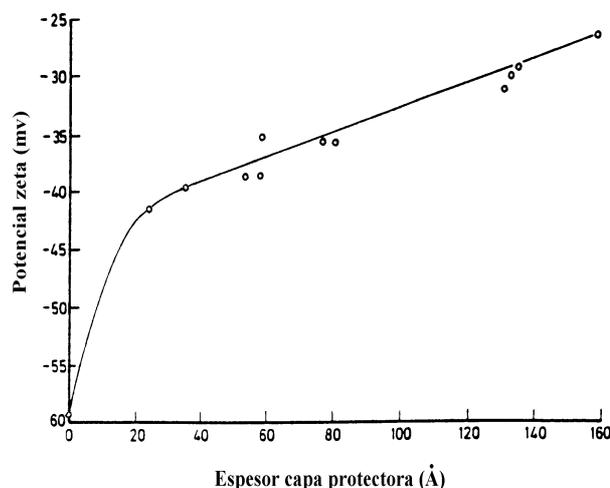


Figura 1.6.- Influencia del espesor de la capa protectora del polaxamer y el polaxamine en el potencial zeta de las partículas de PS (*Illum y col. 1987b*).

La longitud de la cadena juega un papel fundamental en la variación del potencial zeta, debido a que las partículas de PEG (5kD)-PLGA y PEG(3x5kD)-PLA poseen un potencial zeta de -16.74 y -14.56 mV respectivamente, mientras que las nanopartículas de PEG(20kD)- PLGA presentaron un potencial zeta menor en 8,58 mV. La longitud óptima de los bloques de copolímeros de polioxietileno ha sido determinada y debe ser del orden de 5-15 unidades de oxietilenos. (*Porter y col, 1992*).

Bazile y col (1995), en su trabajo demostraron que la fuerte barrera estérica que creaban las cadenas de mPEG en la superficie de la partícula, evita en gran medida la deposición de los complementos C3. Además, indicaron que al parecer, la densidad superficial juega una función más importante que la longitud de la cadena en la repulsión estérica.

Torchilin y col (1995), demostraron la importancia que presenta la densidad superficial (%C-O) y el efecto protector del PEG, para esto sintetizaron varios copolímeros de PEG-PLGA. El PEG utilizado fue de 20kD el cual se unió en diferentes proporciones al PLGA (1:9, 1:5, 1:4). Las nanoesferas fueron marcadas con ^{111}In , observándose que las nanopartículas con mayor densidad superficial permanecían mayor tiempo circulando y eran menos captadas por los macrófagos del RES, figura 1.7.

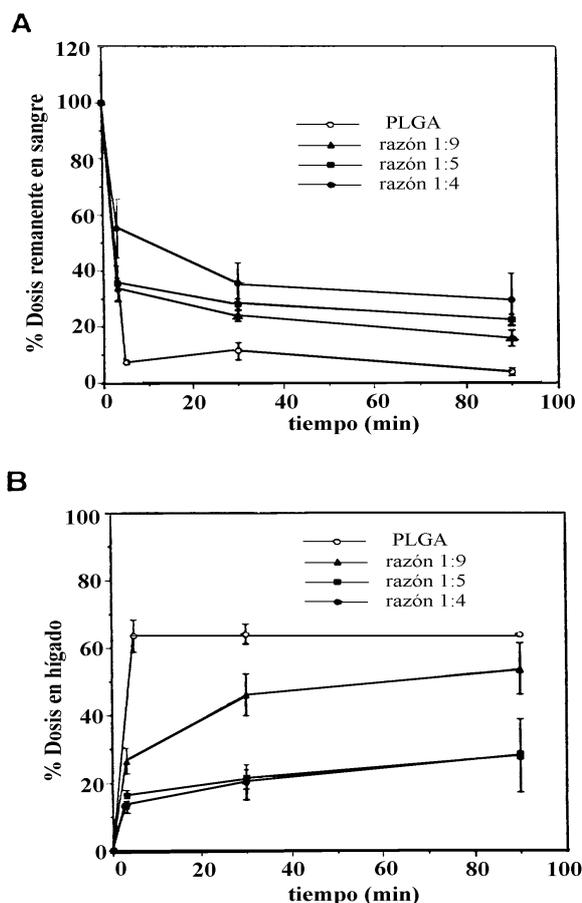


Figura 1.7.- Aclaramiento en sangre (A) y acumulación en hígado (B) de nanoesferas de (^{111}In) -PEG-PLGA con diferentes razones de polímero (w/w) (Torchilin y Trubetskoy, 1995).

Dunn y col (1994a), demostraron que utilizando XPS es posible comparar los niveles de PEG expuestos en la superficie midiendo el porcentaje de C-O enlazados a través del espectro del C1s para varios sistemas. Determinándose que una cierta densidad de PEG en la superficie de las partículas es necesario para obtener los resultados deseados, mientras que la longitud de las cadenas de PEG deben ser suficientemente largas para crear un efecto de estabilización estérica.

Las cadenas de PEG se orientan hacia la superficie en forma de cepillo, donde la relación entre el espesor de la capa superficial y la longitud de la cadena de PEG viene dada por la ecuación,

$$d_h = a^{0.84} \quad 1.1$$

donde (a) es el número de unidades de polioxietileno en la cadena de PEG (*Tan y col., 1993*). Se esperaría que las cadenas de PEG unidas pudieran ejercer mayor rigidez conformacional, la cual estaría controlada por la ecuación,

$$d_h = a^{1.00} \quad 1.2$$

Por lo tanto, en términos de estabilidad estérica se puede esperar que cadenas de PEG(2kD) (equivalente a 50 unidades de oxietileno) unidas covalentemente a la superficie del polímero, podrían presentar similar espesor que el polaxamer adsorbido con una longitud de la cadena de 106 unidades de oxietileno, presentando una gran efectividad en términos de estabilidad estérica y resistencia a los efectos de las proteínas (*Harper y col., 1991; Illum y col., 1987b; Tan y col., 1993*).

La homogeneidad superficial de nanopartículas fue explicada por *Bazile y col (1995)*, quienes concluyeron en su trabajo que para evitar los problemas de heterogeneidad se hizo necesario unir covalentemente cadenas de mPEG a la superficie, logrando una distribución homogénea y de esta forma se evita que queden zonas desprovistas de agentes protectores, como ocurrió para el PLA recubierto con Pluronic F68.

1.9.- MARCADORES APROPIADOS PARA EL ESTUDIO FARMACOCINÉTICO

Para seguir la farmacocinética y biodistribución de nanoesferas in vivo o in situ se necesitan radionúclidos apropiados, los cuales deben mantener intacta la estructura.

Un trazador ideal es aquel que cumple los siguientes requisitos.

- 1- Marcaje estable.
- 2- Resistencia a descomponerse y al metabolismo que puede sufrir una vez dentro del organismo.
- 3- Debe presentar una rápida eliminación del organismo y no debe distribuirse sobre tejidos o unirse a proteínas.
- 4- Poseer una fácil medición en la sangre y en tejidos.

Dentro de los radioisótopos más utilizados en el marcaje de nanopartículas de naturaleza polimérica se encuentran el ^{99m}Tc , ^{111}In y ^{14}C .

El primero se une directamente a las nanopartículas ya formadas a través de enlaces con los grupos COOH, OH, NH₂, SH. (*Malloí, 1989*).

Es emisor γ , confiriéndole una particular importancia, ya que pueden ser fácilmente medidos los tejidos directamente sin necesidad de solubilizarlos. El período de semidesintegración es de 6.6 horas, considerándose un isótopo de gran utilidad para estudios in vitro e in vivo.

El segundo forma un quelato con el DTPA a través del método de transquelación (*Khaw y col., 1984*) y posteriormente se une al polímero.

El tercero suele sustituirse por Carbonos del polímero que se sintetiza (*Le Ray y col., 1994*)

1.10.- MODELOS HEPÁTICOS

Los sistemas de liberación controlada de fármacos una vez que se encuentran en el lecho vascular, están sujetos a diferentes transformaciones, sobre todo en su paso por el hígado, el cual es el principal órgano de eliminación, por lo que se hace necesario conocer los diferentes modelos hepáticos que explican estos procesos.

La eliminación hepática de los fármacos es de gran importancia, en parte porque el hígado es el principal sitio de eliminación y por otra parte porque se encuentra situado en una posición anatómica exclusiva, entre el tracto gastrointestinal y la circulación general, siendo capaz de reducir la biodisponibilidad de fármacos orales y solo alcanza al sistema circulatorio general una parte de la dosis administrada.

El aclaramiento hepático de una sustancia o de un fármaco, está dado por el producto del flujo sanguíneo en el órgano y la razón de extracción del fármaco. Estas relaciones entre eliminación por el órgano, flujo sanguíneo y razón de extracción, presentan gran complejidad.

Varios modelos han surgido para explicar y cuantificar la posible influencia que ejercen factores fisiológicos, tales como, el flujo sanguíneo, unión a componentes hemáticos, actividad enzimática hepatocelular, razón de extracción y polaridad del fármaco (*Rowland y col., 1977; Wilkinson y Shand, 1975*), en la eliminación hepática. Independientemente, los procesos fundamentales implicados en el transporte hepático han sido estudiados, a partir de datos morfométricos del acinus hepático (*Miller y col., 1975*), la variación del flujo sanguíneo sinusoidal (*Koo y col., 1975*) y la heterogeneidad de los sistemas enzimáticos (*Gumucio y Miller, 1981*).

Los modelos in situ más frecuentemente empleados para describir la eliminación hepática de fármacos son los siguientes: El de equilibrio venoso o "Well- Stirred" (*Pang y*

Rowland, 1977a), tubos paralelos o “Perfusión Sinusoidal” (Pang y Rowland, 1977a), el de distribución (Bass y col., 1978, Forker y Luxor, 1978) y más recientemente el de dispersión (Roberts y Rowland, 1986), figura 1.8.

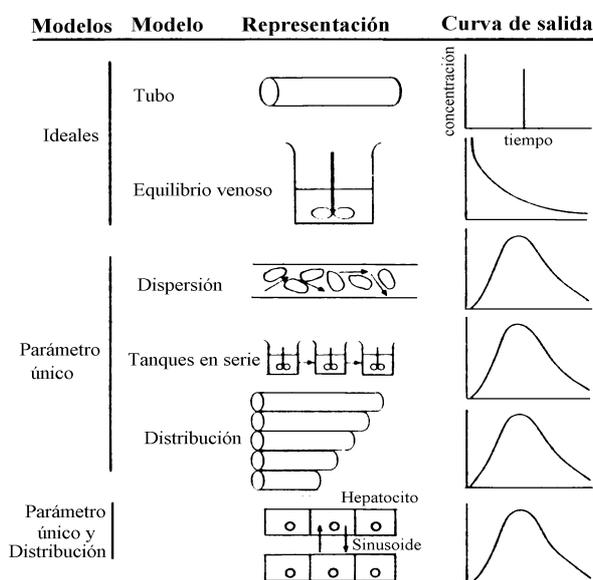


Figura 1.8.- Representación de modelos estocásticos para fármacos transportados a su paso por órganos aislados y su correspondiente curva a la salida del órgano. Cada uno de estos puede tener parámetros adicionales para la cinética del modelo de distribución del soluto entre los sinusoides y los hepatocitos (Roberts y col., 1988).

1.10.1.- MODELO DE EQUILIBRIO VENOSO O “WELL-STIRRED” Y MODELO DE TUBOS PARALELOS O “PERFUSIÓN SINUSOIDAL”

Dos modelos son los más comúnmente usados para describir la eliminación de fármacos por el hígado. Uno de ellos es el modelo equilibrio venoso o “Well-Stirred” y el otro es el modelo de tubos paralelos o “Perfusión Sinusoidal”. Estos dos modelos son equivalentes a los reactores de mezcla perfecta y flujo pistón utilizados en reacciones químicas (Levenspiel, 1972), en los que se asume un comportamiento ideal del flujo sanguíneo y de la dispersión de soluto en el hígado.

El modelo de equilibrio venoso (Rowland y col., 1973), asume que el hígado es un simple compartimento y que la concentración de fármaco libre en sangre está en equilibrio con el fármaco que se encuentra en el hígado

El modelo de tubos paralelos (Winkler y col., 1973; Winkler y col., 1974), asume

que el hígado está compuesto por un número de tubos idénticos y paralelos con enzimas distribuidos a nivel de cada sección transversal de los sinusoides vasculares y en el espacio perinusoidal. El total de la actividad enzimática en el hígado es la suma de la actividad enzimática de cada tubo.

Son consideraciones comunes para ambos modelos:

- La sangre entra y sale del hígado conteniendo fármaco libre y fármaco unido a cualquier constituyente del plasma (usualmente proteínas) o a constituyentes celulares sanguíneos, siendo (f_B) la fracción de fármaco libre en sangre.

- Dentro del hígado hay una variedad de enzimas (designados desde i hasta n) los cuales están caracterizados por una velocidad máxima ($V_{max,i}$) y la constante de Michaelis-Menten ($K_{m,i}$).

También se asume que:

- La mezcla tiene lugar entre la sangre portal hepática y la sangre arterial hepática antes de que el fármaco se divida en sinusoides. Evidencias experimentales generalmente sustentan esta hipótesis (*Greenway y Stark, 1971*).

- Solamente el fármaco libre puede atravesar las membranas.

- No hay una barrera que impida el contacto del fármaco y los enzimas del hepatocito; por lo que la velocidad de distribución, es limitada por la perfusión. (*Bass y col., 1976; Goresky y Goldsmith, 1976*).

- La velocidad de eliminación del fármaco es función de la concentración del fármaco libre en contacto con el enzima, ($C_{L,u}$).

A partir del balance de masas, la velocidad de eliminación del fármaco (V) viene dada por; la pérdida de fármaco la cual es consecuencia de la captación del fármaco en el hígado, del metabolismo y de la excreción biliar. De esta manera obtenemos la siguiente expresión:

$$V = Q \cdot (C_{in} - C_{Out}) = \text{Veloc. de Acumulación} + \text{Veloc. de Metabolismo} + \text{Veloc. de excreción Biliar} \quad 1.3$$

del fármaco en el hígado

Donde, (C_{in}) es la concentración a la entrada del órgano, (C_{out}) es la concentración a la salida del órgano y (Q) es el flujo sanguíneo.

En el estado de equilibrio, la velocidad neta de acumulación del fármaco en el hígado es cero y (V) es igual a la suma de las velocidades de metabolismo y excreción biliar. Por lo tanto, por definición, en el estado de equilibrio el aclaramiento hepático es:

$$CL = \frac{V}{C_{in}} = \frac{Q \cdot (C_{in} - C_{Out})}{C_{in}} = Q \cdot E \quad 1.4$$

Donde, (E) es la razón de extracción.

Además, la actividad enzimática hepática, independientemente del flujo hepático y de la unión del fármaco a componentes sanguíneos, viene dado por el aclaramiento intrínscico (CL_{int}) (*Wilkinson y Shand, 1975*), que relaciona la velocidad de eliminación hepática con la ($C_{L,u}$).

$$CL_{int} = \frac{V}{C_{L,u}} \quad 1.5$$

Por definición $CL_{int} > CL$.

1.10.1.1.- MODELO DE EQUILIBRIO VENOSO O “WELL-STIRRED”

Para utilizar dicho modelo es necesario realizar algunas consideraciones adicionales.

1- El Hígado se comporta como un compartimento bien agitado.

2- El equilibrio de distribución se logra de forma tan rápida que el fármaco en sangre venosa está en equilibrio con el que está en el hígado.

Se asume una difusión pasiva, dónde la concentración de fármaco libre en sangre venosa ($C_{out, u}$) y en hígado ($C_{L, u}$) son iguales.

En el estado de equilibrio, la ecuación de balance de masa es:

$$V = Q \cdot (C_{in} - C_{Out}) = \sum_{i=1}^n \frac{V_{max,i} \cdot C_{L,u}}{K_{m,i} + C_{L,u}} \quad 1.6$$

por tanto,

$$CL_{int} = \sum_{i=1}^n \frac{V_{max,i}}{K_{m,i} + C_{L,u}} \quad 1.7$$

Pueden darse dos situaciones:

a) $C_{L,u} \ll K_{m,i}$, si la concentración del fármaco es mucho menor que K_m , la cinética es lineal y el CL_{int} alcanza un valor máximo constante,

$$CL_{int} = \sum_{i=1}^n \frac{V_{max,i}}{K_{m,i}} \quad 1.8$$

b) Sistema unienzimático (n=1).

$$V = Q \cdot (C_{in} - C_{Out}) = \frac{V_{max} \cdot C_{Out}}{(K_m / f_{B,Out} + C_{Out})} \quad 1.9$$

Una extensión del modelo de equilibrio venoso o "Well-Stirred" es el modelo de Tanques en serie usados comúnmente en ingeniería química y que se ha venido aplicando en eliminación hepática. El tanque simple de equilibrio venoso se divide en (n) tanques de longitud (L/n) colocados en serie, donde la salida del primer tanque es la entrada del siguiente obteniéndose una serie de ecuaciones a partir de:

$$V \cdot (C_{in} - C_{Out}) = \frac{f_{B,Out} \cdot V_{max}}{(K_m + f_{B,Out} \cdot C_{Out})} \cdot C_{Out} \quad 1.10$$

Por lo que,

$$V \cdot (C_K - C_{K+1}) = \frac{L \cdot f_{B,Out} \cdot V_{max}}{n \cdot (K_m + f_{B,Out} \cdot C_{K+1})} \cdot C_K \quad 1.11$$

desde k=0 hasta (n-1) y $C_0=C_{in}$ y por tanto la concentración de salida $C_{out} = C_n$. Además, (n) es el número de tubos y (L) la longitud del tubo.

1.10.1.2.- MODELO DE TUBOS PARALELOS O “PERFUSIÓN SINUSOIDAL”

Para este modelo se asume además que:

1- El hígado está compuesto por un gran número de tubos cilíndricos idénticos, ordenados en paralelo, con enzimas uniformemente distribuidos rodeando los cilindros. El flujo de sangre es unidireccional a través de los cilindros. Por lo que puede considerarse una forma límite para el modelo de tanques aproximándose al infinito.

2- En cualquier punto a lo largo del cilindro existe un equilibrio de distribución entre el fármaco-enzima y el fármaco en el cilindro.

En el estado de equilibrio, la velocidad del fármaco a la salida (v_x) sobre un diferencial dx desde el punto x a lo largo del tubo está dado por la siguiente expresión

$$v_x = \frac{dx}{D} \sum_{i=1}^n \frac{V_{max,i,tubo} \cdot C_{L,u,x}}{K_{m,i} + C_{L,u,x}} = -Q_{tubo} dC_x \tag{1.12}$$

donde, (C_x) y ($f_{B,x}$) es la concentración y la fracción de fármaco libre en un punto x , (v_x) es la velocidad de eliminación en el punto x

Para este modelo al igual que para el de equilibrio venoso se pueden dar dos situaciones.

a) Cuando $C_{u,x} \ll K_m$, $f_{B,x} = f_{B,Out} = \text{constante}$

$$C_{Out} = C_{In} \cdot e^{\left(\frac{-f_{B,Out} CL_{int,l}}{Q} \right)} \tag{1.13}$$

b) Sistema unienzimático ($n=1$), $f_{B,x} = f_{B,Out} = \text{constante}$

$$C_{In} - C_{Out} = \left(K_m / f_{B,Out} \right) \cdot \ln(C_{Out} / C_{In}) + V_{max} \tag{1.14}$$

1.10.1.3.- COMPARACIÓN ENTRE LOS DOS MODELOS

La modelación de la eliminación hepática se ha llevado a cabo utilizando tres diferentes aproximaciones (Roberts y col., 1988).

- Primera aproximación y la más común es la obtención de algunos datos experimentales y comprobar el ajuste a uno u otro modelo ideal (Tubo o Equilibrio venoso) para la eliminación hepática (Pang y Rowland, 1977b; Ahmad y col., 1983; Jones y col., 1984).

El modelo de Equilibrio venoso ha sido mucho mejor que el de Tubo, para describir el efecto de variaciones del flujo sanguíneo en la disponibilidad de la lidocaina y meperidina (Wilkinson y Shand, 1975; Miller y col., 1979). En contraste, el modelo de tubos refleja mejor la influencia del Q sobre el aclaramiento de la galactosa (Keiding y Chiarantini, 1978) y la influencia sobre el aclaramiento del diazepam (Rowland y col., 1984).

- Segunda aproximación, es reconocer que la extracción del soluto no puede ser adecuadamente descrita por el modelo de tubo, y por tanto obtener una distribución estrecha (Bass, 1980) o normal (Forker y Luxon, 1978; Forker y Luxon, 1982) para la razón velocidad de sangre/actividad enzimática en tubo ha sido adoptada. El modelo de Well-Stirred ha sido descartado, debido a su tendencia no fisiológica. (Forker y Luxon, 1983).

-Tercera aproximación es usar conceptos estocásticos para describir la eliminación hepática (Roberts y Rowland, 1985). El grado de dispersión axial del flujo sanguíneo que se produce dentro del órgano es determinado a partir de las distribuciones de los tiempos de residencia (RTD) observados para solutos individuales, En esta última aproximación, el modelo de Well-Stirred y el de Tubo son formas extremas del modelo de dispersión cuando la eliminación es de primer orden y distribución enzimática uniforme (Roberts y Rowland, 1985).

1.10.2.- MODELO DE DISTRIBUCIÓN

El modelo de distribución, es una extensión del modelo de tubos paralelos, fue introducido por Bass y col (1978) y Forker y Luxon (1978). Estos modelos representan al hígado como un conjunto de tubos paralelos (sinusoides), cada uno de los cuales recibe una fracción del flujo total determinado por una función de distribución normal. Además, Bass y col (1978) en su modelo incluyeron también una distribución estadística del

contenido enzimático de cada sinusoide. Este modelo es más fisiológico que los dos anteriores, sin embargo su capacidad para interpretar datos farmacocinéticos en estado estacionario ha sido cuestionada.

La concentración total de salida (C_{out}) es la sumatoria de las concentraciones de salida de cada tubo y está dada por la siguiente expresión,

$$C_{out} = \sum_{i=1}^n \frac{a_i \cdot (2i-1)}{n} \cdot e^{\left[\frac{-R_{Ni}}{2i-1} \right]} \quad 1.15$$

donde, (α_i) es la fracción de sinusoide para la clase i -ésima calculado a partir de una función de densidad normal, (n) es el número de flujos diferentes para la misma función y R_N presenta la siguiente expresión.

$$R_N = \frac{f_{B,Out} \cdot V_{max}}{K_m \cdot Q} \quad 1.16$$

Observaciones realizadas por *Roberts y Rowland (1986b)* y *Roberts y col (1988)* indicaron que la función de densidad normal no es *apropiada*, por lo que es conveniente asumir la distribución de los tiempos de residencia, $f(t)$, correspondiente a la curva de concentración a la salida al introducirse una C_{in} en forma de bolus dentro de un modelo de dispersión. Para el caso de una cinética lineal *Roberts y Rowland (Roberts y Rowland, 1986a)* proponen que:

$$C_{out}(L) = e^{\left(\frac{-k_N \cdot L}{V} \right)} = e^{(-R_N \cdot L)} \quad 1.17$$

(k_N) es la constante de velocidad de eliminación.

La concentración a la salida viene dada:

$$C_{out} = e^{\left(\frac{1 - \left(1 + 4 \cdot R_N \cdot D_N\right)^{\frac{1}{2}}}{2 \cdot D_N} \right)} \tag{1.18}$$

donde, D_N es la dispersión de la distribución.

Asumiendo que esta distribución es la distribución de la longitud de los tubos, entonces para el caso de la cinética de Michaelis-Menten, la concentración a la salida será.

$$C_{out} = \int_0^{\infty} \frac{1}{2} \left[\frac{1}{p \cdot D_N \cdot L^3} \right]^{\frac{1}{2}} e^{\left[\frac{-(1-L)^2}{4 \cdot D_N \cdot L} \right]} \cdot C_{out}(L) dL \tag{1.19}$$

Bass y col., (1987), sugirieron que el modelo de distribución debe ser modificado para tener en cuenta las mezclas intrahepáticas que producen una dispersión del flujo de salida debido a una distribución estadística de vías convectiva y movimientos de solutos entre los sinusoides.

1.10.3.- MODELO DE DISPERSIÓN

Evidencias experimentales con varios compuestos han favorecido la utilización de uno u otro de los modelos anteriores (Pang y Rowland, 1977b; Keiding y Steiness, 1984; Ahmad y col., 1983; Rowland y col., 1984), no estando muy claro cual de los modelos es el ideal para explicar el comportamiento en el hígado. (Bass, 1983; Morgan, 1983; Forker y Luxon, 1983). Por estas razones se introdujo el modelo unificado de eliminación hepático llamado modelo de dispersión; que asume además de los movimientos de solutos por convección y eliminación hepática, que el movimiento debido a la heterogeneidad de los microvasos hepáticos puede ser descrito en términos de dispersión.

En este modelo el hígado es representado como un cilindro, en la figura 1.9 se representa de forma esquematizada una sección transversal del mismo.

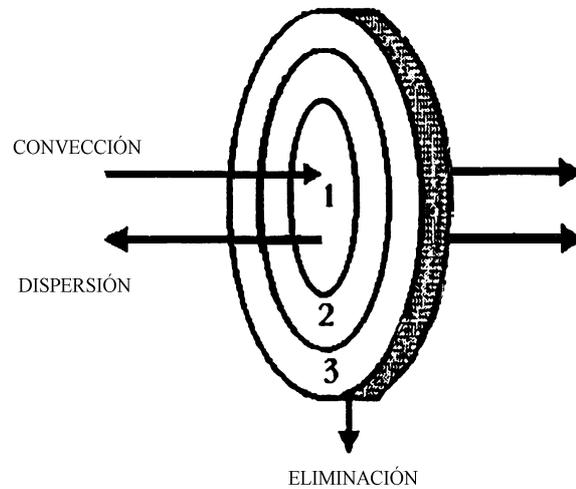


Figura 1.9.- Esquematación de los procesos que ocurren en el hígado observados a través de una sección transversal, representada como un cilindro. 1: La sangre; 2: Espacio de Disse y 3: Hepatocito (Roberts y Rowland, 1986).

El movimiento neto de fármaco en sangre dentro de sus elementos es en parte debido a las fuerzas de convección y dispersión y por otra parte a la difusión del fármaco desde la sangre a los hepatocitos, donde ocurre la eliminación.

Teniendo en cuenta el balance de masa, se puede plantear lo siguiente:

$$\text{Variación de velocidad del soluto} = \text{Incremento del flujo axial} - \text{Incremento del flujo convectivo} - \text{Velocidad de eliminación} \quad 1.20$$

Los solutos son transportados a través del órgano como consecuencia de movimientos aleatorios modificados por un flujo convectivo. De esta manera, después de la inyección en bolus de soluto, se produce una dispersión dentro del órgano que viene reflejada por el tiempo medio de residencia (RTD) (Roberts y Rowland, 1986a,b,c,d). El tiempo medio de permanencia de los elementos de la sangre en el hígado se expresa mediante la siguiente ecuación.

$$\bar{t} = \frac{V_B}{Q} \left(1 + \frac{fu_b}{fu_D} g + \frac{fu_b}{fu_c} qr \right) \quad 1.21$$

como se puede observar va a depender de varios factores, la razón de normalización de los espacios de Disse y células parenquimales, (γ) y (θ) respectivamente, son comúnmente consideradas constantes. (f_{u_b}) es la razón de (C_u/C_B), f_{u_D} es la fracción de fármaco no unida en los espacios Disse (C_{u_D}/C_D) y (f_{u_C}) es la fracción de fármaco no unido en los hepatocitos (C_{u_C}/C_C).

El modelo de dispersión, además de tener en cuenta el tiempo medio de residencia del soluto a su paso por el hígado, tiene presente otros parámetros como son, el número de dispersión axial (D_N) y el número de eficiencia (R_N). Donde el número de dispersión es una medida de la variación de los tiempos de residencia de los solutos en su paso por el hígado y está determinada por la relación que se establece entre los tiempos de convección y los tiempos de dispersión de los solutos a través del hígado, mientras que el número de eficiencia es una medida de la velocidad de eliminación de solutos por las células del *hígado* (Roberts y Rowland, 1986a).

De esta forma D_N y R_N quedan definidos de la siguiente manera.

$$D_N = \frac{D}{V \cdot L} = \frac{D \cdot A}{Q \cdot L} \quad 1.22$$

$$R_N = \frac{f_B \cdot CL_{int} \cdot r}{Q} \quad 1.23$$

$$\text{donde, } r = \frac{P}{P + CL_{int}}, \quad 1.24$$

(A) es el área de la sección transversal, (D) es el coeficiente de dispersión axial, (L) es la longitud del hígado y (P) permeabilidad de los hepatocitos.

Los modelos de equilibrio venoso o "Well-Stirred" y tubos paralelos o "Perfusión Sinusoidal" son inapropiados desde el punto de vista fisiológico ya que no contemplan la funcionalidad del hígado y la relación entre la disponibilidad observada y la constante de Michaelis-Menten in vitro.

Se han hecho esfuerzos para mejorar la relación entre la disponibilidad hepática y la fisiología del hígado aumentando la complejidad del modelo, para explicar los procesos que ocurren en el hígado. Ambos modelos el de Distribución y el de Dispersión presentan un mínimo de dos parámetros para relacionar la disponibilidad con factores tales como el cambio en el flujo de perfusión. La utilización de cinéticas saturadas ha aumentado la complejidad debido a la necesidad de adicionar otros parámetros por lo que se requiere de un análisis numérico y así poder seleccionar el modelo que mejor se ajuste a los datos obtenidos (*Roberts y col., 1989*), a pesar de la limitación que puede conllevar si el estudio se realiza para sistemas unienzimático.

Roberts y Rowland (1986c) plantearon en su artículo las ventajas que presentaba el modelo de dispersión con respecto al resto de los modelos estudiados hasta entonces. Debido a que ninguno de estos modelos anteriores podían predecir la variación en la distribución de los tiempos de residencia de los elementos de la sangre en el hígado (*Goresky, 1963*) o predecir la fisiología del hígado. Por lo que el modelo de dispersión si fue capaz de reflejar de una forma global las variaciones que sufren los elementos de la sangre a lo largo del hígado, brindando una información acerca de la naturaleza y localización de procesos que ocurren dentro del hígado, por lo que este modelo se considera empírico y de naturaleza estocástica.

No obstante, todos los modelos de eliminación hepática descritos hasta entonces solo se pueden utilizar para describir la eliminación de solutos con cinéticas de primer orden (*Roberts y Rowland, 1986b; Roberts y Rowland, 1986c; Ahmad y col., 1983; Rowland y col., 1984; Pang y Rowland, 1997c*).

1.10.4.- MODELOS COMPARTIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE PERFUSIÓN IN SITU Y BIODISTRIBUCIÓN

A pesar de que los modelos de flujo han sido los más estudiados (*Rowland, Bass, Roberts, etc.*) para explicar el paso de un soluto a través del hígado empleando técnicas de perfusión in situ. Los modelos compartimentales, también se han empleado con éxito para el ajuste de datos procedentes tanto de estudios en animal completo (biodistribución después de una administración intravenosa), como para el estudio de perfusión in situ.

El principal escollo que se observa en la actualidad para el desarrollo de sistemas con nanoesferas, etc., es la ausencia de un modelo animal adecuado para

medir en qué medida son capaces de eludir su reconocimiento y captación por el RES. La mayor parte de los autores realizan la interpretación directa de la curva de niveles plasmáticos. Un modelo más evolucionado es el propuesto por *Boisviux y Steimer (1979)*, para la fagocitosis de coloides y de esta forma poder cuantificar la función reticuloendotelial hepática. El estudio de los parámetros del modelo permite determinar el número de células de Kupffer activas o implicadas en la fagocitosis y el tiempo medio de su ciclo de fagocitosis. El ajuste de los datos experimentales después de una administración intravenosa del coloide al modelo fue buena.

El modelo asume que:

- Coloide circula en sangre.
- Coloide se adsorbe a la superficie de las células de Kupffer.

Una vez que el coloide es adsorbido, este puede liberarse o fagocitarse con lo que la superficie de las células de Kupffer quedan libres de nuevo.

$$\frac{dY_1}{dt} = -B(\Psi_2 - Y_2(t))Y_1(t) + K_{-1}Y_2(t) \quad 1.25$$

$$\frac{dY_2}{dt} = B(\Psi_2 - Y_2(t))Y_1(t) - (K_{-1} + I)Y_2(t) \quad 1.26$$

$Y_1(t)$: Cantidad total de coloide en la sangre a tiempo t ;

$Y_2(t)$: Cantidad total de coloide adsorbido a tiempo t ;

Ψ_2 : Cantidad máxima de coloide que puede ser adsorbida en la superficie de las células de Kupffer;

B : Afinidad del coloide por la superficie de las células de Kupffer;

K_{-1} : Coeficiente de reversibilidad;

λ : Tiempo inverso medio de fagocitosis

El proceso de adsorción superficial es saturable, admitiendo una cantidad máxima de coloide Ψ_2 .

En medicina nuclear se emplean muchas veces modelos compartimentales para trazadores, no difundibles, difundibles, extraíbles o eluidos para el transporte de sustancias a los diferentes órganos.

Szabó y col (1983), elaboró un modelo de dos compartimentos (figura 1.10) para

el estudio renal con trazadores (hipuran, ácido dietilenotriaminopentanoico (DTPA)), los compartimentos serían el glomerular y el tubular.

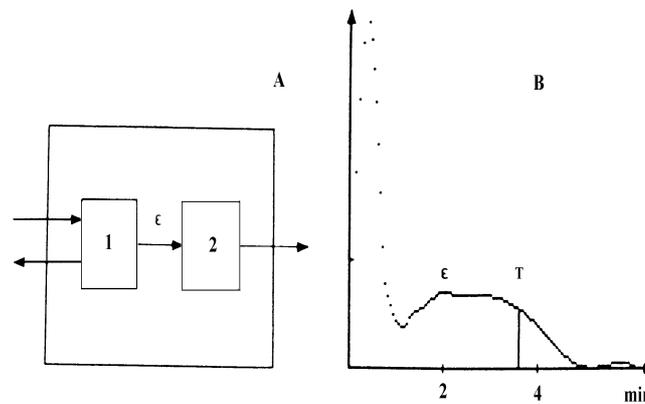


Figura 1.10.- Función Impulso-respuesta (IRF) Renal para el DTPA. A, Diagrama de flujo: 1. Compartimento capilar; 2. Compartimento tubular. B, IRF: ϵ . constante de velocidad de extracción; T. tiempo de tránsito medio parenquimal (Szabó y col., 1983).

$$F_{tot} = F_{cap} \cdot (1 + e \cdot F_{tub}) \tag{1.27}$$

donde, (F_{tot}) es la función Impulso-respuesta total, mientras que (F_{cap}) es la función capilar (glomerular) y (F_{tub}) es la función tubular, siendo (ϵ) la constante de velocidad de extracción.

Este mismo modelo lo emplearon para explicar el paso de derivados del ácido iminodiacético por el hígado, siendo el primer compartimento el sinusoidal y el segundo compartimento el de las células poligonales.

Por el contrario para el paso de microesferas de Albúmina sérica humana (HSA) marcadas con ^{99m}Tc proponen tres compartimentos figura 1.11.

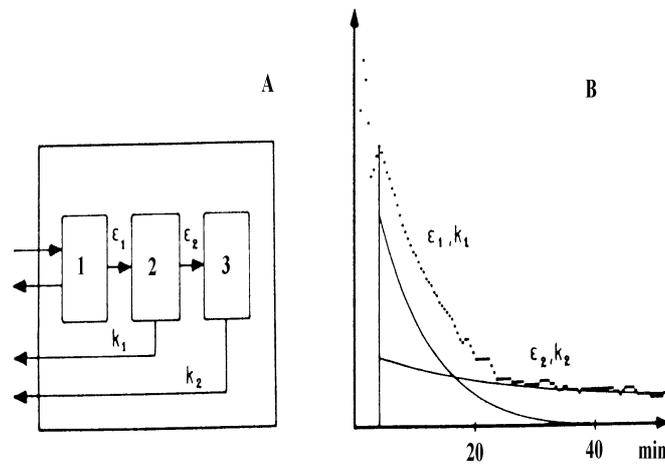


Figura 1.11.- IRF hepática para microesferas de HSA. A, Diagrama de flujo: Compartimento 1: Sinusoidal; compartimento 2: Membrana superficial de los macrófagos del RES; compartimento 3: Espacio intercelular de las células de Kupffer. B, IRF: ϵ_1 : Constante de velocidad de adsorción sobre superficies de los macrófagos; ϵ_2 : Constante de velocidad de internalización; k_1 : Constante de retorno al plasma. Constante de paso; k_2 : Constante de retorno del ^{99m}Tc procedente de microesferas fagocitadas. Donde $k=1/T$, inversa del tiempo medio de eliminación biliar (Szabó y col., 1983).

Nishikawa y col (1992, 1995, 1998), propusieron un modelo de tres compartimentos para estudiar la captación hepática utilizando proteínas modificadas como son, la galactosil o proteínas glicosiladas y monosiladas. Una vez realizada la administración intravenosa consideran que el proceso de captación sigue una cinética Michaelis-Menten al igual que la eliminación desde el compartimento plasmático, figura 1.12.

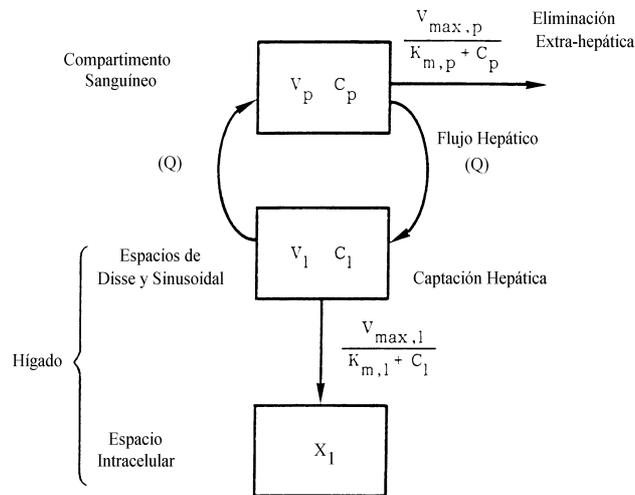


Figura 1.12.- Modelo farmacocinético fisiológico para analizar la acumulación de albúmina glicosilada marcada con ^{111}In (Nishikawa y col., 1992).

Las ecuaciones del balance de masa para la concentración de albúmina glicosilada según este modelo son:

$$\frac{dC_p}{dt} = \frac{\left(Q \cdot C_1 - Q \cdot C_p - \frac{V_{max,p} \cdot C_p}{K_{m,p} + C_p} \right)}{V_p} \tag{1.28}$$

$$\frac{dC_1}{dt} = \frac{\left(Q \cdot C_p - Q \cdot C_1 - \frac{V_{max,1} \cdot C_1}{K_{m,1} + C_1} \right)}{V_1} \tag{1.29}$$

$$\frac{dX_1}{dt} = \frac{V_{max,1} \cdot C_1}{\left(K_{m,1} + C_1 \right)} \tag{1.30}$$

donde, (C_1) y (C_p) son las concentraciones en el compartimento sinusoidal y en el compartimento sanguíneo respectivamente, $(V_{max,p})$ y $(V_{max,1})$ son la velocidad de eliminación desde el compartimento sanguíneo y de captación en el sinusoidal respectivamente, (V_p) y (V_1) son los volúmenes aparentes de distribución en el

compartimento sanguíneo y en el sinusoidal respectivamente y $(K_{m,p})$ y $(K_{m,i})$ son las constantes de Michaelis-Menten en ambos compartimentos.

Yasui y col (1995), desarrollaron un modelo basado en la fisiología hepática para evaluar el transporte hepatobiliar de fármacos mediante la técnica de perfusión hepática in situ. El esquema es recogido en la figura 1.13.

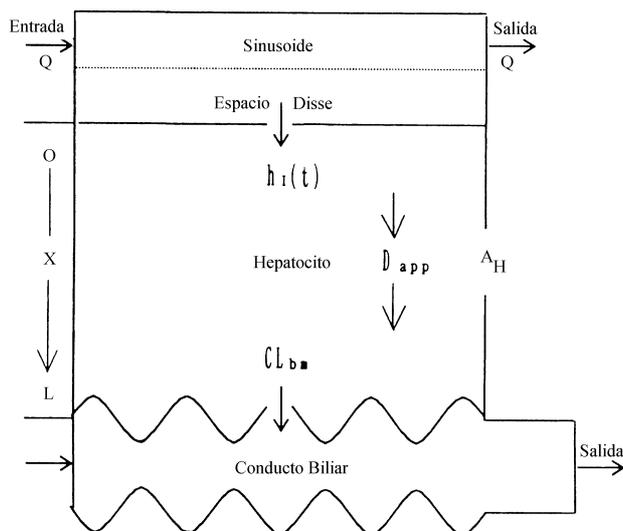


Figura 1.13.- Modelo de difusión hepatocelular. $h_1(t)$: Velocidad de captación (Entrada) de la membrana de los sinusoides; D_{app} : Coeficiente de difusión aparente en hepatocitos; CL_{bm} : Eliminación en el conducto biliar; L : Espesor medio de la monocapa de un hepatocito; A_H : Área de la sección transversal para la introducción a través de un hepatocito (Yasui y col., 1995).

El transporte hepatobiliar consiste en los siguientes procesos, el fármaco procedente de la circulación general accede al espacio sinusoidal y pasa a través del espacio de Disse hacia los hepatocitos, difunde (gradiente de concentración) a través de ellos hacia los conductos biliares y es vertido al exterior.

Considerando la fisiología del hígado, los hepatocitos constituyen una monocapa de espesor L , a lo largo de la cual difunde el fármaco con un coeficiente de difusión aparente desde la membrana sinusoidal hasta la membrana del conducto biliar. La captación de fármaco en sangre por los hepatocitos se considera que está representado por una velocidad de paso variable $h_1(t)$ (cantidad que pasa de sangre hacia los hepatocitos por unidad de tiempo). En la interfase hepatocitos-conducto biliar, el paso del

fármaco es considerado que sigue una cinética de primer orden con un aclaramiento CL. Es un modelo similar al propuesto por *Guy y Hadgraft (1983)* para el paso a través de la piel.

Furitsu y col (1997), propusieron un modelo para estudiar la captación hepática de proteínas no iónicas mediante la técnica de perfusión in situ. El compartimento 1 es el fármaco en el sinusoides que incluye el espacio de Disse donde se asume que es un tanque bien agitado. El compartimento 2 estaría formado por el fármaco unido a las células en el exterior, el equilibrio entre ambos compartimentos se alcanza rápidamente. Finalmente el compartimento intracelular, donde se asume que el proceso de internalización sigue una cinética de primer orden con una constante de velocidad k_{int} , figura 1.14.

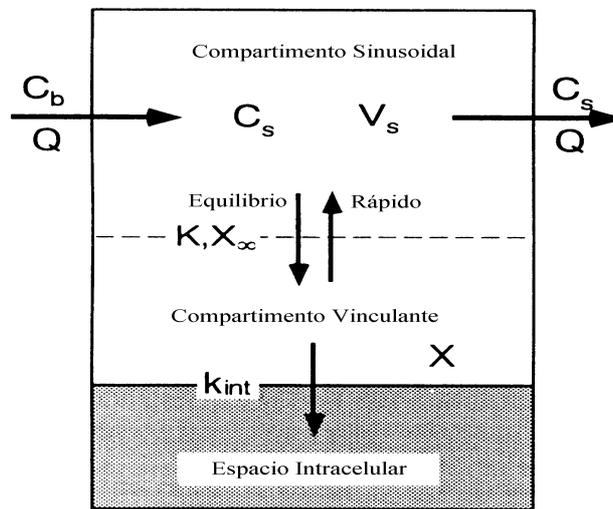


Figura 1.14.- Modelo farmacocinético fisiológico para la captación de proteínas no iónicas. Q, flujo (ml/min); C_b , concentración en el flujo de entrada ($\mu\text{g/ml}$); C_s , concentración sinusoidal ($\mu\text{g/ml}$); V_s , Volumen sinusoidal (ml); X, cantidad de sustancia atrapada (μg); X_∞ , cantidad máxima de sustancia atrapada (μg); K, constante de captación (ml/ μg); k_{int} , constante de internalización (min^{-1}) (*Furitsu y col., 1997*).

El balance de masa de ambos compartimentos será:

$$V_s \left(\frac{dC_s}{dt} \right) + \left(\frac{dX}{dt} \right) = Q \cdot C_b - Q \cdot C_s - k_{int} \cdot X \quad 1.31$$

donde,

$$X = \frac{X_{\infty} \cdot K \cdot C_s}{1 + K \cdot C_s} \quad 1.32$$

(V_s) representa la suma de los volúmenes de los espacios sinusoidales y de Disse, (dx/dt) es la velocidad de internalización, (X) es la cantidad de sustancia atrapada, (C_s) y (C_b) corresponden a las concentraciones de los sinusoides y entrada respectivamente, (k_{int}) es la constante de internalización y K es la constante de captación.

Capítulo 2

OBJETIVOS

2.- OBJETIVOS

- Caracterizar las nanoesferas elaboradas: PLGA, PEG-PLGA y mPEG-PLGA.
- Desarrollar un método experimental in situ para el estudio de la captación hepática de nanoesferas.
- Proponer un modelo teórico para evaluar los ensayos de captación hepático in situ de nanoesferas.
- Estudiar la biodistribución de nanoesferas elaboradas con distintos polímeros biodegradables utilizando un modelo compartimental.
- Comparar los resultados obtenidos en los ensayos de biodistribución con la captación hepática in situ

Capítulo 3
CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS

3.- ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS (NANOESFERAS Y GLÓBULOS ROJOS)

3.1.- SÍNTESIS DE POLÍMEROS

El ácido poli(d,l-láctico-co-glicólico) (D,L-PLGA) se obtuvo mediante polimerización por apertura del anillo de los correspondientes dímeros cíclicos según el método descrito por *Gilding y Reed (1979)*. El monómero de partida, la 3,6 dimetil 1,4 dioxano 2,5 diona (Aldrich), fue cristalizado varias veces en acetato de etilo (Merck) para su purificación hasta presentar un punto de fusión de 124-126 °C, correspondiente a la mezcla racémica del producto D,L-lactida.

La glicolida (Boehringer Ingelheim), que presenta un punto de fusión de 88-90°C, se utilizó directamente. La síntesis se llevó a cabo a partir de 75% de lactida y 25% de glicolida. Como catalizador de la reacción y controlador de la cadena se utilizaron octanoato de estaño (0.03%) y alcohol laúrico (0.01%) (ambos de Sigma), respectivamente. Se introdujo en un baño de silicona, la temperatura y el tiempo de polimerización fue de 120°C y 2 horas respectivamente. Previamente se añadió diclorobenceno (10%) para mantener la reacción en estado líquido.

En el caso de los polímeros en bloque, PEG-PLGA y mPEG-PLGA se siguió el método descrito por *Gref y col (1994)*. Se partió de un 70% de lactida cristalizada, 20% de glicolida y 10% polietilenglicol 6000 (Sigma) o metoxipolietilenglicol 5000 (Sigma) respectivamente. La reacción de polimerización para ambos polímeros se llevó a cabo a una temperatura de 114°C durante un tiempo de 2 horas, siendo la concentración del catalizador, octanoato de estaño, de 0.2%.

La síntesis de los polímeros se llevó a cabo en ampollas de vidrio, donde se hace vacío (0.1-0.2 mm Hg) durante 30 min., previo al inicio de la reacción.

En la extracción de los mismos se utilizó cloroformo para el PLGA y 1,4-dioxano para el PEG-PLGA y el mPEG-PLGA (ambos de Merck). La precipitación del PLGA se realizó con metanol (Panreac) y con agua destilada para el PEG-PLGA y el mPEG-PLGA. Una vez secos, se conservaron a 4°C en silicagel.

3.2.- DETERMINACIÓN DE LOS PESOS MOLECULARES

La determinación de los pesos moleculares de estos polímeros se realizó por cromatografía de permeación en gel (GPC), utilizando como referencia patrones de poliestireno monodisperso (Tokío Soda LTD), el equipo empleado es de Waters Millipore

compuesto por una bomba (Model 410), inyector manual (Rheodyne), refractómetro diferencial (Model 410), horno calefactor para el control de la temperatura de las cuatro columnas Waters (ultrastyrigel) colocadas en serie y con tamaños de poro de 100 , 10³, 10⁴ y 10⁵ Å respectivamente. Los datos fueron obtenidos y tratados mediante el programa Maxima 820, v. 3.30.

Condiciones cromatográficas:

- Columnas: Ultrastyrigel.
- Temperatura: 31°C (detector y columnas).
- Fase móvil : Tetrahidrofurano (Merck) filtrado (filtros Millipore FH con tamaño de poro de 0.5 µm) y desgasificado.
- Flujo: 0.9 ml/min.
- Tiempo de análisis: 50 min.
- Volumen de inyección: 20 µl
- Concentración: 0.04% (patrones) y 0.5% (muestras).

Para calibrar el sistema anterior se emplearon tres series de patrones de poliestireno monodisperso. En la serie I se encuentran los de peso molecular 7100, 102000 y 103000, en la serie II están los de peso molecular 355000, 43900 y 2800 y en la serie III encontramos los de 190000 y 5570. Tanto los patrones como las muestras a analizar, previo a la inyección, son filtradas (filtros Puradisc™ 25PP, 0.45 µm, Whatman®).

3.3.- COMPOSICIÓN DE LOS POLÍMEROS.

La composición de los diferentes copolímeros fue determinada por H¹- RMN (*Gilding y Reed, 1979*) usando un espectrómetro Bruker AMX 400 Mhz. Las muestras fueron preparadas dispersando 15 mg de copolímero en cloroformo deuterado (CDCl₃)

Los polímeros presentaron una baja solubilidad por lo que los espectros fueron obtenidos por acumulación de scan en períodos de tiempo aproximados a 15 min. Las señales que aparecen, se pueden asignar al grupo metileno de la unidad del ácido glicólico (GA) (4.82 δ) y el grupo metileno de la unidad del ácido láctico (LA) (5.21δ) y el grupo metilo de la unidad de este mismo ácido (señal compleja a 1.60 δ). De la relación de áreas de las dos primeras señales podemos determinar la composición, dada en % molar de láctico/glicólico. La señal correspondiente al etileno del PEG aparece como señal compleja a 3.70 δ.

Las proporciones relativas de las unidades LA-GA y GA-GA fueron determinadas por la técnica de C^{13} -RMN (Bendix, 1990) en un Bruker AMX 400 Mhz y utilizando al dimetilsulfóxido deuterado como disolvente. Las señales a 166.5 y 166.6 ppm correspondieron a los grupos carbonilos de las unidades LA-GA y GA-GA respectivamente; las proporciones relativas de estas unidades fueron determinadas por la relación de las intensidades relativas de esas señales (Dorta y col., 1993).

La composición de los monómeros de partida y las unidades LA-GA/GA-GA, determinadas por RMN- 1H y ^{13}C aparecen reflejadas en la tabla 3.1.

Copolímero	Mw	Mn	pd	Mz	% Monómero molar	unidades LA-GA/GA-GA
PLGA	33000	22000	1.50	47000	67-33	1/2
PEG-PLGA	25000	16000	1.59	35000	27-47-26	1/2
mPEG- PLGA	27000	19000	1.44	37000	25-48-27	1/2

Tabla 3.1.- Copolímeros de poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), copolímero de polietilenglicol-poli(láctico-co-glicólico) (PEG-PLGA) y metoxipolietilenglicol-poli(láctico-co-glicólico) (mPEG-PLGA) con sus correspondientes pesos moleculares medios (Mw, peso molecular medio en peso; Mn, peso molecular medio en número; Mz, peso molecular medio en Z), polidispersividad (pd), porcentajes de incorporación de los monómeros de lactida y glicolida para el primero, polietilenglicol, lactida y glicolida para el segundo y metoxipolietilenglicol, lactida y glicolida para el tercero, y proporción de las unidades de lactida-glicolida/glicolida-glicolida.

Los copolímeros de PEG-PLGA y mPEG-PLGA fueron elegidos porque como ya ha sido publicado (Gref y col., 1995) se consigue reducir la captación hepática y aumentar el tiempo de circulación, debido a que el PEG forma una capa protectora en forma de cepillo alrededor de las partículas.

3.4.- PREPARACIÓN DE NANOESFERAS

Las nanoesferas de los diferentes polímeros fueron preparadas por el método de evaporación-precipitación solvente (Stolnik y col., 1994).

125 mg de polímero fueron disueltos en 20 ml de acetona (Merck). Posteriormente la solución orgánica se introdujo en una jeringa de 25 ml y su contenido

se adicionó a 50 ml de una solución acuosa de Pluronic F-68 al 0.5% en un vaso de 100 ml, bajo agitación magnética (longitud de la barra = 1.5 cm) a una velocidad de 450-550 rpm. La emulsión formada se deja agitando durante 1 hora. Una vez transcurrido el tiempo se lleva al rotavapor (Buchi) para eliminar los restos de acetona y concentrar la muestra a un volumen de aproximadamente 6 ml, posteriormente se dividió la muestra en dos viales. La concentración final fue de 21 mg/ml.

3.5.- CARACTERIZACIÓN DE NANOESFERAS

3.5.1.- COMPOSICIÓN SUPERFICIAL MEDIANTE XPS

3.5.1.1.- FUNDAMENTO DE LA ESPECTROSCOPIA DE FOTOELECTRONES

XPS

También denominada ESCA (Electrón Spectroscopy for Chemical Analysis), la espectroscopia XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy) es un método de análisis no destructivo que permite identificar todos los elementos.

El principio de la espectroscopia de fotoelectrones X, consiste en el análisis de la energía cinética de los electrones fotoemitidos por una muestra irradiada mediante un haz monoenergético de fotones X. A partir de esta energía cinética y de la energía de excitación $h\nu$, se determina la energía de enlace del electrón emitido.

$$E_e = h \cdot \tilde{\nu} \cdot E_{\text{cin}} \quad 3.1$$

Todo electrón de "core" o de valencia, cuya energía de enlace sea inferior a $h\nu$, puede extraerse. Esto permite acceder al diagrama de las energías electrónicas de un elemento. El desplazamiento químico de los niveles del "core" (del orden del electronvoltio) depende del entorno químico del átomo, lo cual proporciona información sobre su "estado químico" en el material analizado.

En el caso de un sólido, el pequeño recorrido libre medio de los electrones en la materia, limita la profundidad analizada a una capa superficial cuyo espesor puede variar entre 1 y 10 nm según las condiciones experimentales y la naturaleza del material.

Esta técnica, desarrollada en los años 1960 - 70 es actualmente de utilización rutinaria en el análisis de la composición de superficies.

Las líneas utilizadas como fuentes de fotones en espectroscopía XPS (AlK α y MgK α), permiten obtener para todos los elementos un cierto número de niveles de "core".

Los fotoelectrones provenientes de estos niveles dan picos relativamente estrechos en los que la anchura total a media altura (anchura intrínseca + resolución experimental) es del orden del electronvoltio.

Esta medida precisa de las energías de enlace de los electrones, pone de manifiesto los desplazamientos de energía de enlace en función del entorno químico del átomo. Estos desplazamientos, cuyo orden de magnitud varía entre algunas décimas de electronvoltio y 10 eV se utilizan a distintos niveles de interpretación.

El desplazamiento, con relación a un compuesto de referencia, representa la huella de un entorno químico determinado. Puede servir, en el caso más simple, para localizar lugares químicos no equivalentes o para identificar el entorno químico del elemento, dado el conocimiento actual sobre un gran número de compuestos que proporciona un amplio conjunto de valores de referencia.

También se puede proceder a la cuantificación del elemento, en cada una de las situaciones químicas, por la medida del área de los picos, que es una expresión de la intensidad de la señal capturada.

3.5.1.2.- ESPECTRO XPS

El espectro de fotoelectrones (XPS) es el resultado de la convolución

$$F = F_a \cdot F_n$$

3.2

Donde F representa la forma de un pico fotoelectrónico, F_n es una lorenziana que representa la forma de la línea natural y F_a , asimilable a una gaussiana, representa la contribución instrumental.

Para obtener la función F_n se procede a la deconvolución de F a partir de una estimación de la función instrumental F_a . En el presente trabajo se utiliza la espectroscopía de los niveles de "core". La energía de los niveles de "core" se modifica si el entorno químico de un átomo cambia. Ello permite, como se ha indicado, identificar distintas situaciones químicas de un átomo en un compuesto, detectar la presencia de distintos compuestos químicos en una muestra heterogénea o comparar las energías de un nivel atómico para compuestos diferentes.

3.5.1.3.- DESCOMPOSICIÓN DE UN ESPECTRO EN VARIOS COMPONENTES

Consiste en representar un espectro experimental por una función teórica suma de varios componentes descritos por funciones analíticas, caracterizándose cada componente por distintos parámetros (posición, intensidad, anchura, etc.).

Puede decirse que la función de forma del espectro experimental es un espacio vectorial y se trata de determinar la dimensión de la base de este espectro.

Para ello se procede, en primer lugar, a un ajuste manual de la curva, definiendo el número de componentes o contribuciones y acotando el dominio de sus parámetros.

A continuación se aplica una rutina de minimización, que, básicamente, es el equivalente al ajuste por mínimos cuadrados extendido al espacio multidimensional definido por el producto de los parámetros que caracterizan a cada componente por el número de componentes o contribuciones.

En este espacio se puede definir una función que es la expresión de las diferencias punto a punto entre el espectro medido y el espectro ajustado por la suma de componentes. Esta función es a la que se aplica la rutina de minimización.

Deben aplicarse criterios químicos en la definición de los dominios de los parámetros y utilizar las relaciones porcentuales de átomos impuestas por la estequiometría para ajustar los parámetros de intensidad. El número de componentes también está condicionado por la posibilidad de situaciones químicas distintas.

Los resultados deben analizarse con espíritu crítico, examinando la validez física de los parámetros obtenidos.

3.5.1.4.- METODOLOGÍA

El objetivo del estudio espectroscópico realizado en el presente trabajo es la caracterización de la composición química de la superficie de las nanoesferas de PEG-PLGA, mPEG-PLGA y PLGA.

Se ha agrupado el estudio de los espectros de los compuestos en tres grupos (a continuación de los nombres se indican las claves de identificación de los espectros):

I - Materiales de referencia

PEG-6000 (OL07MN01.SPE)

mPEG-5000 (OL08MN01.SPE)

PLURONIC^á (OL02MN01.SPE)

II- Polímeros

PEG-PLGA (OL01MN01.SPE)

mPEG-PLGA (OL05MN01.SPE)

PLGA (OL09MN02.SPE)

III- Nanoesferas

PEG-PLGA (OL04MN01.SPE)

mPEG-PLGA (OL06MN01.SPE)

PLGA (OL10MN01.SPE)

En la descomposición de los espectros del primer grupo, se establecen los valores de referencia y se establecen las asignaciones que se utilizan en las descomposiciones del resto de espectros.

Se discute ampliamente la descomposición de los espectros del grupo II, buscando una buena discriminación en los ajustes.

A partir de los espectros de los grupos I y II, se analizan los del grupo III, estableciendo sus composiciones a partir de los espectros más simples.

3.5.1.5.- TÉCNICA DE REFERENCIA VÍA CARBONO ADVENTICIO DE CONTAMINACIÓN

Al ser las muestras, especímenes aislantes, las cargas positivas creadas en el interior de la muestra, como resultado de la fotoionización, no son completamente neutralizadas por los electrones presentes en la misma muestra y por los electrones secundarios que la alcanzan. El resultado es que la superficie de la muestra alcanza un potencial que provoca la disminución de la energía cinética de los electrones emitidos. Las medidas deben corregir este efecto de carga para ser correctas.

Esta corrección se efectúa para cada espectro, a partir de la asignación de posiciones que se consideran seguras. (*Seah, 1990*).

Una energía de enlace de 284.8 eV que se asigna a hidrocarburos saturados (*Swift, 1982*), con frecuencia procedentes de contaminación, se utiliza normalmente como valor de referencia.

3.5.1.6.- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

En este trabajo se somete a las muestras a la mínima manipulación posible para la preparación del análisis, ya que el objetivo de este análisis es la caracterización de la superficie de los materiales de referencia y de las nanoesferas en las condiciones de utilización rutinaria. El transporte de las muestras hasta el lugar de análisis se ha realizado en viales sellados herméticamente.

3.5.1.7.- RESOLUCIÓN

La resolución con la que se realizan las determinaciones se obtiene a partir de la medida de la anchura total a media altura de un pico cuya asignación sea segura y única. A partir de su anchura total a media altura se estima la resolución con la que se mide la energía del nivel 1s del Carbono que, en el presente estudio, es de 1.1 eV., resolución muy adecuada a los propósitos analíticos perseguidos.

3.5.1.8.- RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO

3.5.1.8.1.- ESPECTROS GENERALES Y DE PERFIL

Se ha seleccionado un conjunto de muestras constituido por:

PLURONIC^a

PEG-PLGA

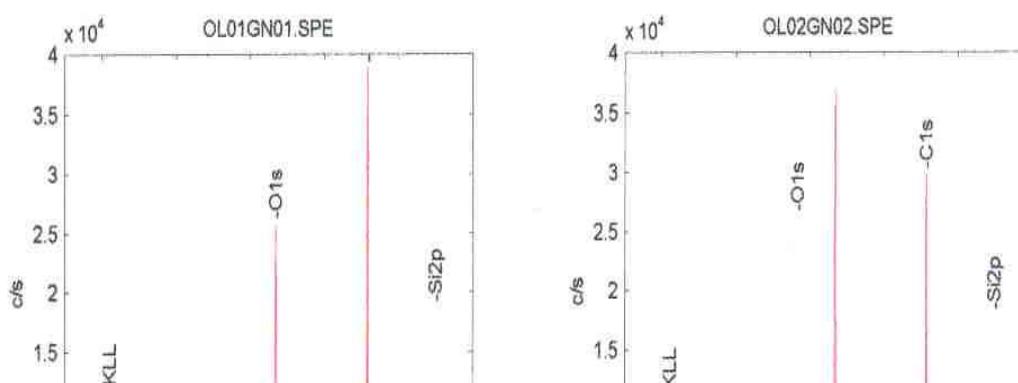
Nanoesferas de PEG-PLGA en suspensión en Pluronic^a al 0.5%.

Nanoesferas de PEG-PLGA liofilizadas que es uno de los tres sistemas estudiados: PLGA, PEG - PLGA, mPEG - PLGA.

Se realiza la adquisición del espectro general de estas cuatro muestras, cuyos registros y composición se reproducen en la figura 3.1.

Los espectros generales, que cubren de 0 a 1100 eV se han adquirido con una energía de paso del orden de 180 eV. Esta energía de paso, que controla la resolución energética del espectro, es un parámetro incluido en la contribución instrumental de la función de espectro F_a .

En estos espectros se observa la presencia de elementos espurios, probablemente procedentes de contaminación. Llama la atención el alto contenido en Si posiblemente proveniente de contaminación por siliconas.



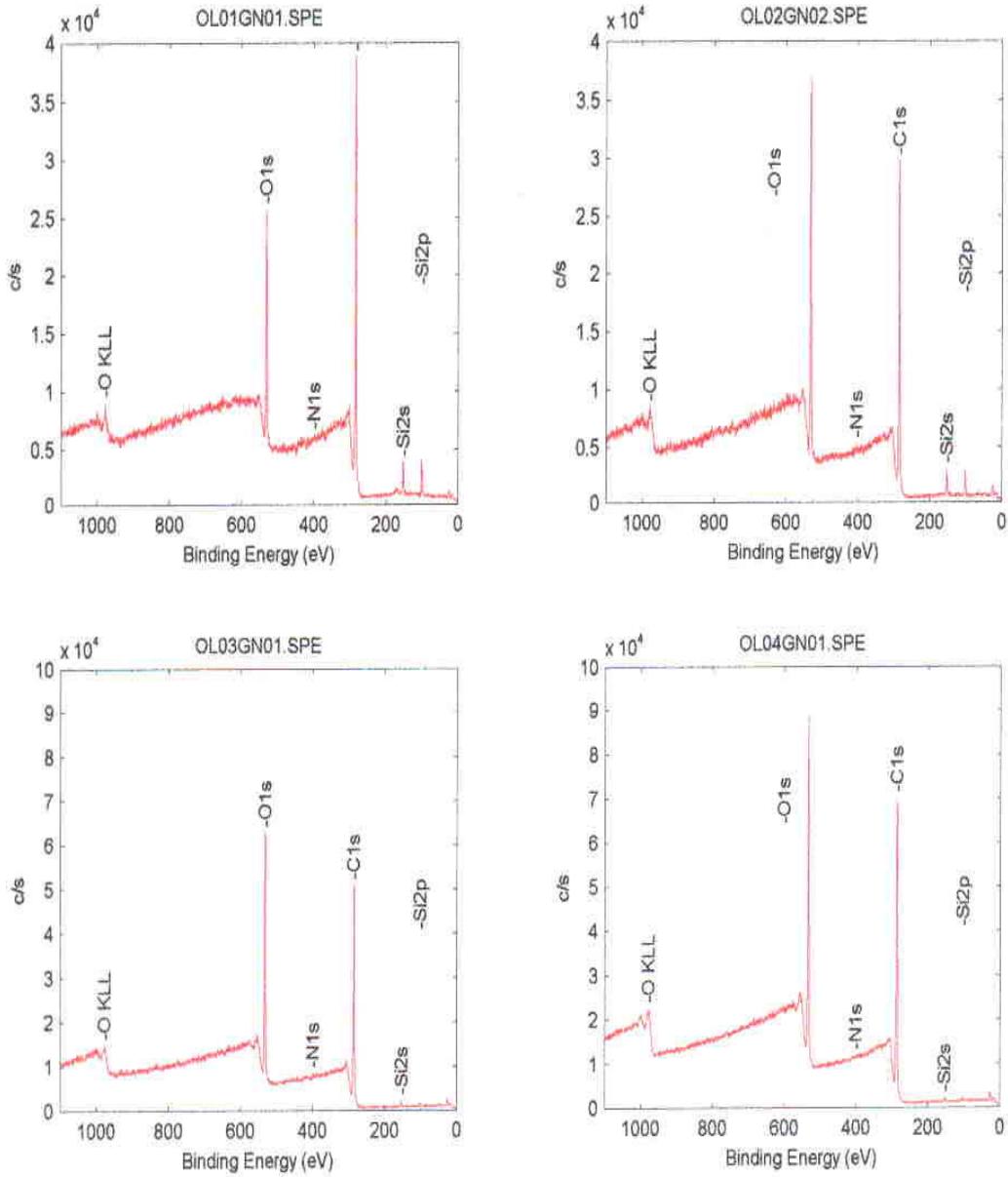


Figura 3.1.- Espectros generales de una muestra de Pluronic® (OL01GN01.SPE), PEG-PLGA (OL02GN02.SPE), nanoesferas de PEG-PLGA en suspensión (OL03GN01.SPE), y nanoesferas de PEG-PLGA liofilizadas (OL04GN01.SPE),.

Se ha sometido a la muestra de nanoesferas de PEG-PLGA lavadas y liofilizadas a una abrasión superficial por bombardeo iónico con una fuente de iones de 3.00 KeV en 2 ciclos previos y 26 ciclos de decaído. En su espectro de perfil se pone de manifiesto que la contaminación por elementos espurios es únicamente de adsorción superficial, ya que dichos elementos presentes en el espectro general, desaparecen ya en el primer ciclo.

3.5.1.8.2.- ESTRUCTURA FINA DE LOS ESPECTROS C1s Y O1s

La consideración de los valores porcentuales de composición frente a los valores analíticos en masa de las muestras de nanocápsulas, revela diferencias substanciales, lo cual evidencia una composición superficial diferenciada entre el interior de las nanocápsulas y su superficie. Por ello se plantea la conveniencia del análisis de la estructura fina de los espectros XPS.

La espectroscopía XPS de los niveles de "core", gracias a las informaciones analíticas que proporciona, se ha impuesto como una técnica de elección para caracterizar las superficies de los polímeros.

Se registran los espectros de alta resolución de C1s entre 296 y 276 eV y los de O1s entre 545 y 525 eV, con una energía de paso del orden de 26 eV.

Este parámetro condiciona la mínima separación que han de tener dos estados químicos con concentraciones similares para poderlos diferenciar y que para esta energía y en las condiciones en que se ha trabajado es típicamente de 0,1 eV.

En la figura 3.2 se representan los espectros C1s y O1s de las distintas muestras (cuyos códigos de identificación son los indicados en el apartado de Metodología), y se consignan los valores de intensidad fotoelectrónica.

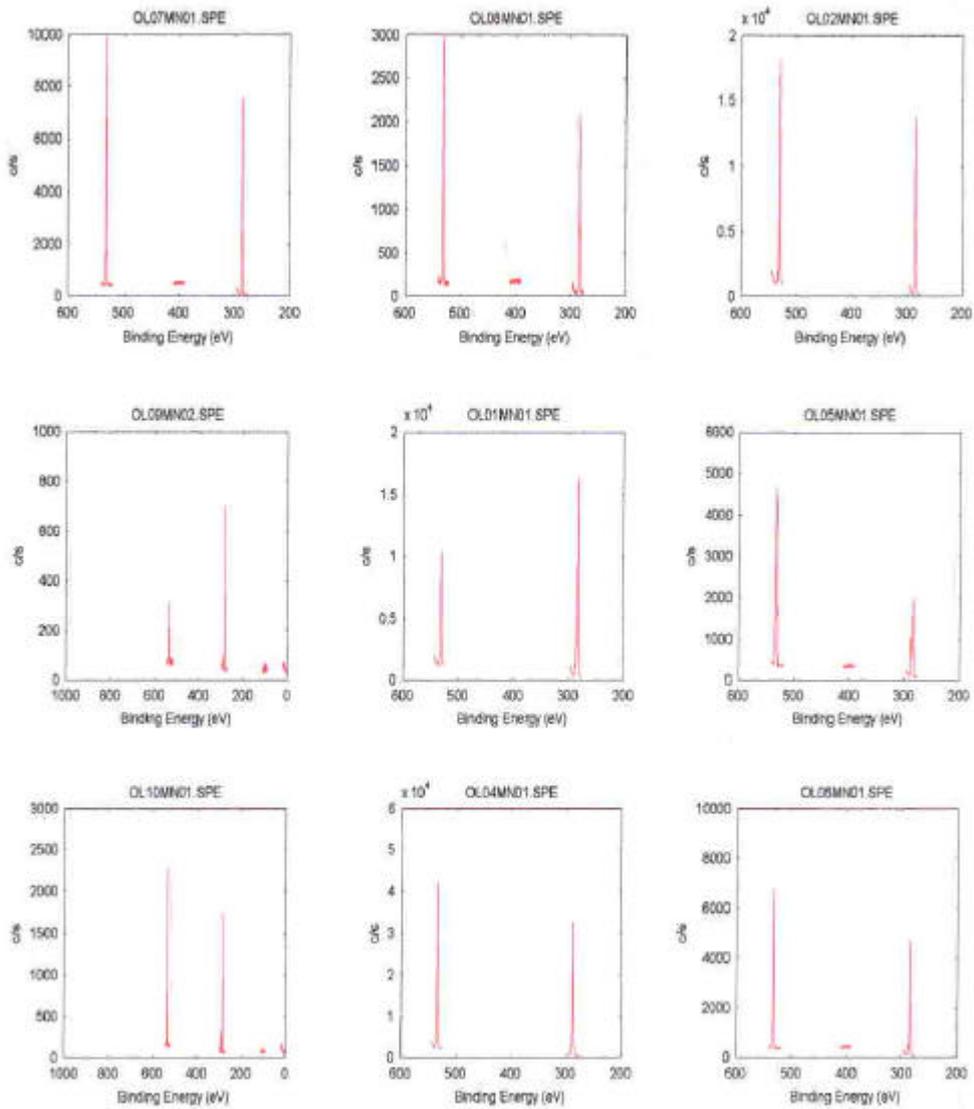


Figura 3.2.- Espectros C1s y O1s de las distintas muestras agrupadas en los grupos I (PEG-6000 (OL07MN01.SPE), mPEG-5000 (OL08MN01.SPE) y Pluronic[®] (OL02MN01.SPE)), II (PEG-PLGA (OL01MN01.SPE), mPEG-PLGA (OL05MN01.SPE), PLGA (OL09MN02.SPE)), III (PEG-PLGA (OL04MN01.SPE), mPEG-PLGA (OL06MN01.SPE), PLGA (OL10MN01.SPE)).

En la figura 3.3 se presentan los espectros C1s de alta resolución, y las composiciones porcentuales de átomos de Carbono de cada una de ellas.

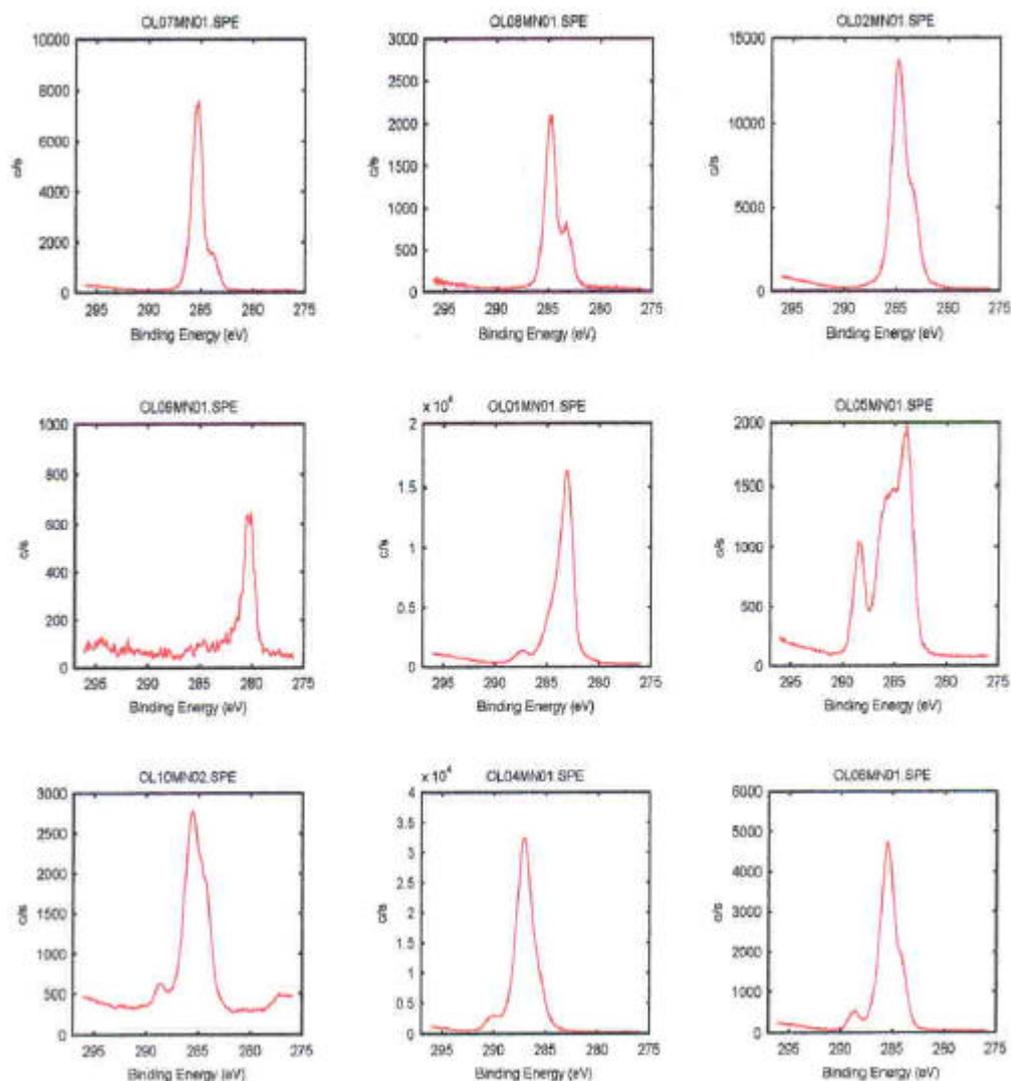


Figura 3.3.- Espectros C1s de alta resolución y las composiciones porcentuales del átomo de carbono de cada una de las muestras representadas en los grupos I (PEG-6000 (OL07MN01.SPE), mPEG-5000 (OL08MN01.SPE) y Pluronic[®] (OL02MN01.SPE)), II (PEG-PLGA (OL01MN01.SPE), mPEG-PLGA (OL05MN01.SPE), PLGA (OL09MN02.SPE)), III (PEG-PLGA (OL04MN01.SPE), mPEG-PLGA (OL06MN01.SPE), PLGA (OL10MN01.SPE)).

En la figura 3.4 se presentan los espectros del O1s y los porcentajes de átomos de Oxígeno en cada especie.

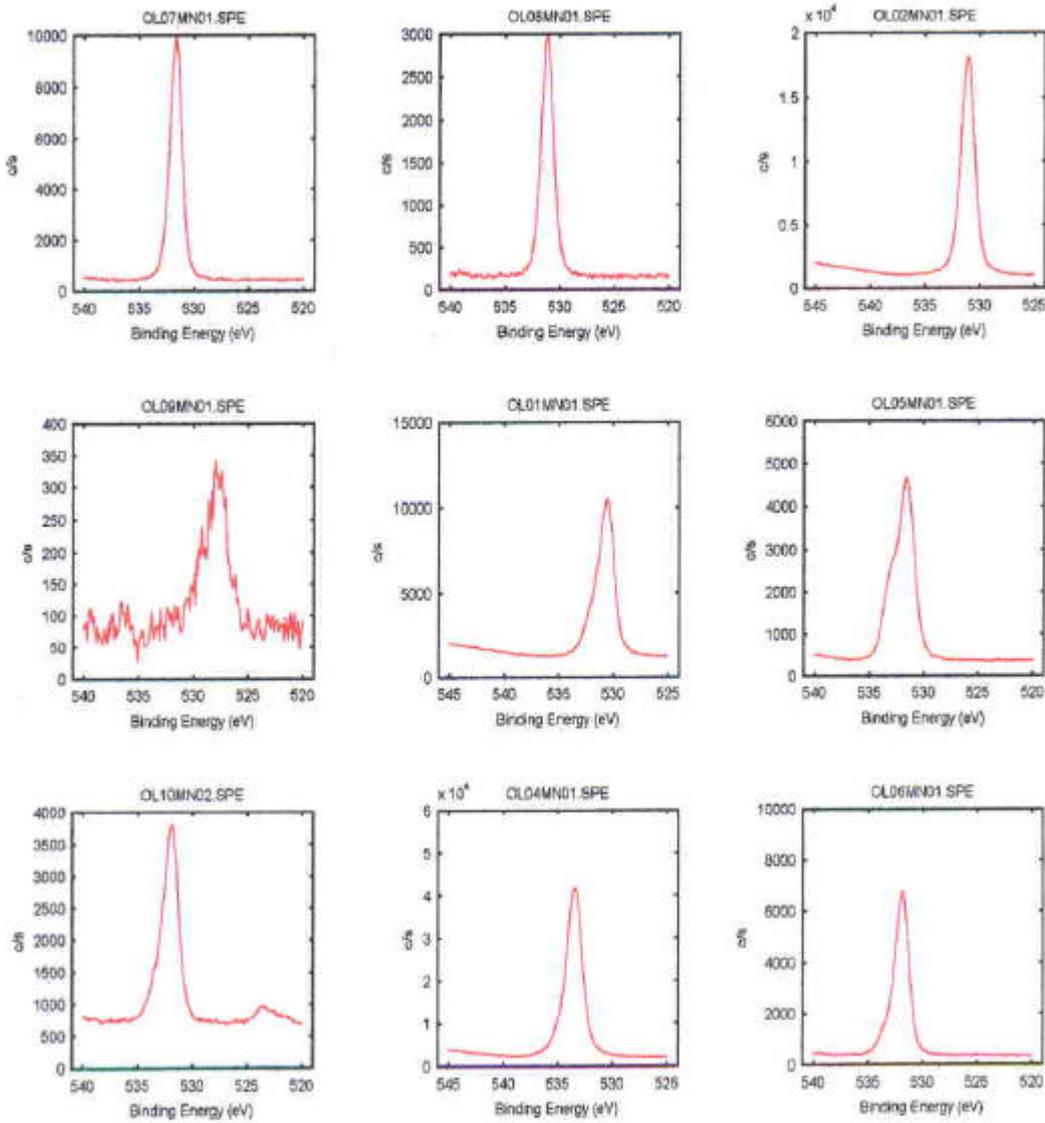


Figura 3.4.- Espectros del O1s y los porcentajes del átomo de oxígeno en cada una de las muestras pertenecientes a los grupos I (PEG-6000 (OL07MN01.SPE), mPEG-5000 (OL08MN01.SPE) y Pluronic^a (OL02MN01.SPE)), II (PEG-PLGA (OL01MN01.SPE), mPEG-PLGA

(OL05MN01.SPE), PLGA (OL09MN02.SPE)), III (PEG-PLGA (OL04MN01.SPE), mPEG-PLGA (OL06MN01.SPE), PLGA (OL10MN01.SPE)).

La relación entre estos valores permite determinar las razones porcentuales de átomos como criterio de comprobación de los ajustes de los espectros calculados frente a los experimentales.

3.5.1.8.3.- ESTUDIO DE LOS ESPECTROS XPS C1s DE PEG-6000, mPEG-5000 Y PLURONIC

Todos los espectros se corrigen energéticamente, tomando como referencia la posición del Carbono adventicio.

En las figuras 3.5, 3.6 y 3.7 se representa el espectro de alta resolución del C1s del PEG-6000, del mPEG-5000 y del Pluronic[®] respectivamente

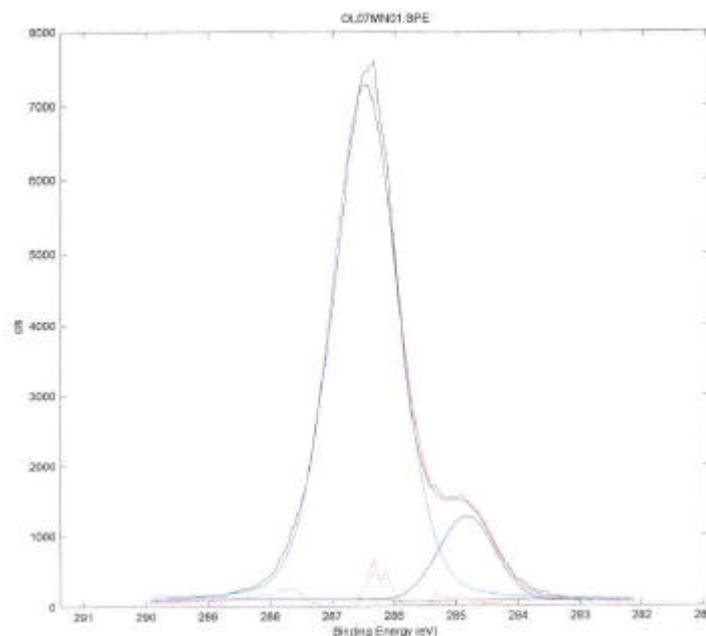


Figura 3.5.- Espectro de alta resolución del C1s del PEG-6000.

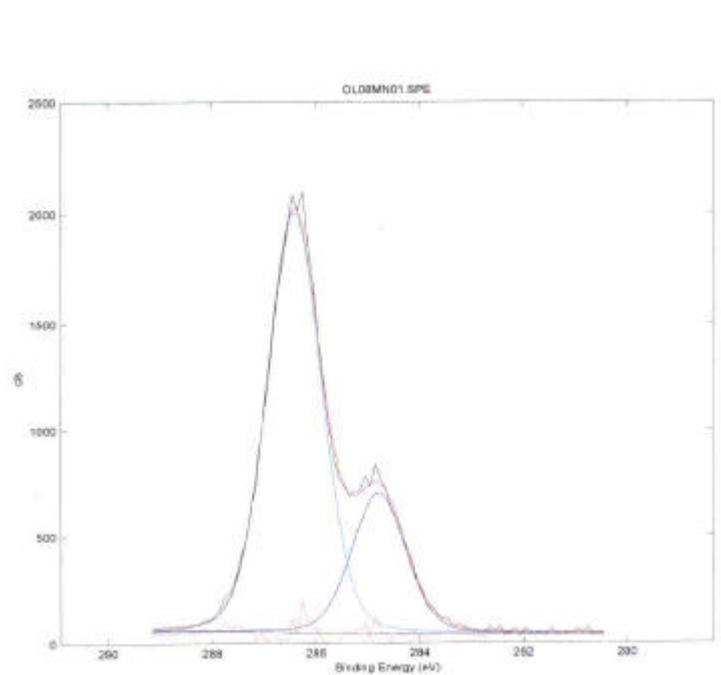


Figura 3.6.- Espectro de alta resolución del C1s del mPEG-5000.

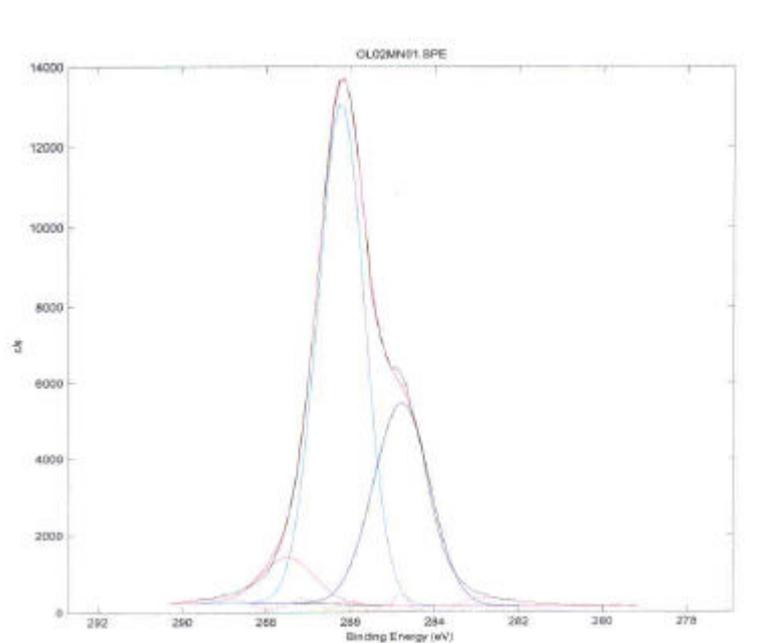


Figura 3.7.- Espectro de alta resolución del C1s del Pluronic[®].

En la tabla 3.2 se indican las diferentes posiciones de energías de enlaces de los diferentes grupos funcionales, así como su contribución porcentual.

	Grupos	Energía (eV)	% Area
PEG-6000	Carbono adventicio	284.83	11.49
	Metileno	286.48	88.51
mPEG-5000	Carbono adventicio	284.79	25.41
	Metileno	286.41	74.59
Pluronic ^â	Carbono adventicio	284.79	30.94
	Metileno	286.24	62.55
	Metino	287.51	6.50

Tabla 3.2.- Posiciones de energía de enlace de los diferentes grupos, así como su contribución porcentual.

A la vista de los resultados podemos plantear que en la descomposición del espectro del PEG-6000 hay dos picos bien definidos el primero de ellos (284.83 eV) se asigna a Carbono adventicio de contaminación. El segundo pico (286.48 eV), se asigna al carbono de los metilenos.

La descomposición del espectro del mPEG-5000, es consistente con la obtención de dos picos uno a 284.79 eV y otro a 286.41 eV, valores en concordancia con los del espectro anterior. No obstante el valor de 25.41%, claramente superior al 11.49% de contaminación del espectro del PEG-6000, sugiere que esta zona engloba la contribución debida al grupo metilo. Su ajuste se realiza a partir de la posición del pico principal.

La descomposición del espectro del Pluronic^â nos da información de la obtención de tres contribuciones, la de 284.79 eV, proviene de la contaminación, y la principal a 286.24 eV que asigna a los carbonos de grupos metilenos del Pluronic^â y la del metino a 287.51 eV. No obstante debemos considerar en el pico de 284.80 eV del Pluronic^â, la contribución aditiva en esta posición de los grupos metilo, por tanto los porcentajes reales de contaminación son inferiores al 30.94% correspondiente a esta posición. Como en el Pluronic^â el número de carbonos metílicos coincide con el de metino, puede concluirse que a la contaminación le corresponde un $30.94 - 6.50 = 24.44$ % de los carbonos. La

razón de carbonos metilénicos a carbonos metílicos y metino es $62.55: 6.50 = 9.62$, lo cual es consistente con la estequiometría del Pluronic^á.

Por otra parte, esta asignación permite establecer relaciones cuantitativas entre las señales obtenidas. En el Pluronic^á, se presentan el mismo número de grupos metilo que grupos metinos, por lo que se puede afirmar que el pico de 284.79 eV con un área del 30.94% incluye un 6.50% de grupos metílicos, por tanto el 24.44% es contaminación y el 75.56% restante es Pluronic^á.

Este grupo de muestras, permite establecer el siguiente conjunto de asignaciones autoconsistentes y concordantes con las obtenidas por *Shakesheff y col 1997* que se utilizan como referencias para la descomposición de los espectros de los grupos II y III:

Asignación	Energía de enlace
Carbono adventicio y grupo metilo	248.8 eV
Metileno	286.4 eV
Metino	287.4 eV

3.5.1.8.4.- ESTUDIO DE LOS ESPECTROS XPS C1s DE LOS POLÍMEROS: PLGA, PEG-PLGA Y mPEG-PLGA

En el espectro del PLGA, PEG-PLGA y mPEG-PLGA, que se encuentran en las figuras 3.8, 3.9, 3.10 respectivamente, pueden fijarse, mediante las asignaciones de la sección anterior, las energías de enlace correspondientes a los electrones 1s de los carbonos de todos los grupos constituyentes del polímero, a excepción del unido a oxígeno del grupo carboxilo.

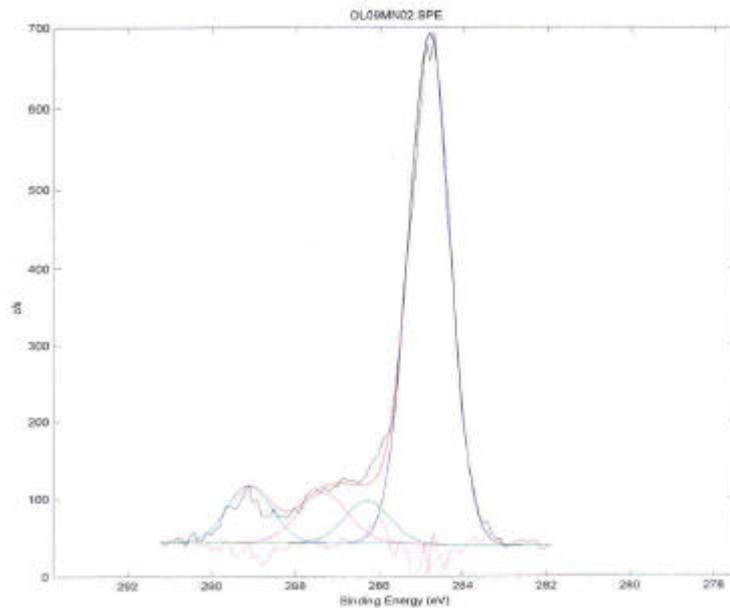


Figura 3.8.- Espectro de alta resolución del C1s del PLGA.

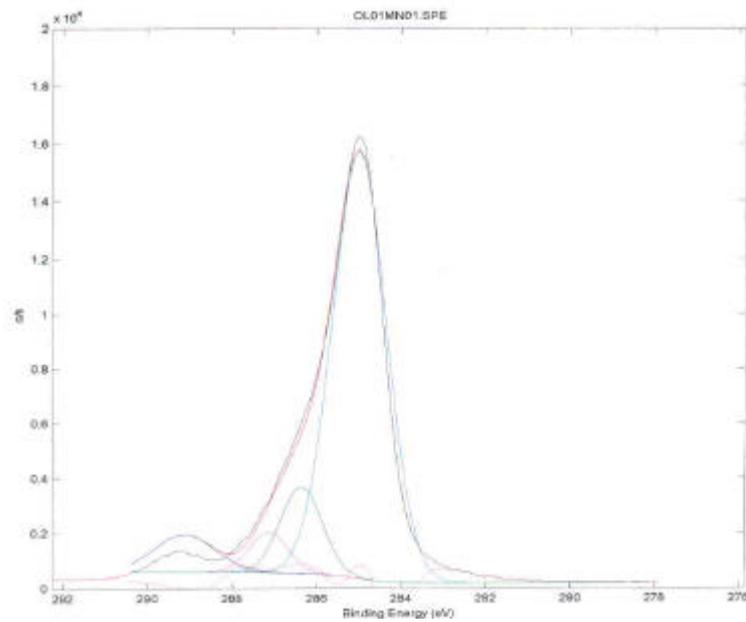


Figura 3.9.- Espectro de alta resolución del C1s del PEG-PLGA.

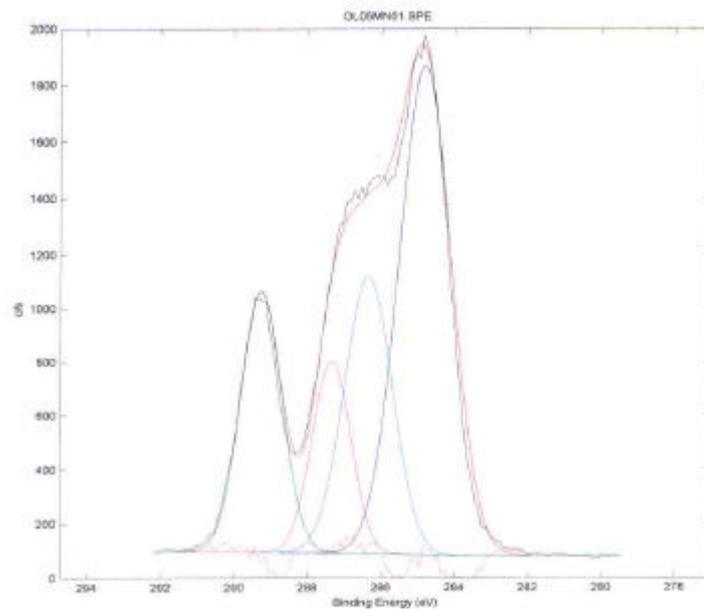


Figura 3.10.- Espectro de alta resolución del C1s del mPEG-PLGA.

En la tabla 3.3 se indican las diferentes posiciones de energías de enlaces de los diferentes grupos funcionales de los polímeros de PLGA, PEG-PLGA y mPEG-PLGA, así como su contribución porcentual. Comparando los resultados obtenidos por XPS y RMN no se observan diferencias importantes.

Polímero	Grupos	Energía (eV)	% Area	% Exp. XPS	% Exp. RMN
PLGA	Carbono adventicio	284.82	77.06	–	–
	Metilo	284.32	7.42	24.4	25.1
	Metileno	286.36	5.44	17.9	12.4
	Metino	287.42	7.42	24.4	25.1
	Carboxilo	289.25	10.08	33.2	37.5
PEG-PLGA	Carbono adventicio	285.00	75.68	–	–
	Metilo	285.00	5.08	17.3	19.0
	Metileno	286.36	11.86	40.3	32.4
	Metino	287.13	5.08	17.3	19.0
	Carboxilo	289.12	7.37	25.1	29.6
mPEG-PLGA	Carbono adventicio	284.82	44.79	–	–
	Metilo	284.82	13.00	19.1	19.4
	Metileno	286.36	23.50	34.5	35.1
	Metino	287.35	13.00	19.1	19.4
	Carboxilo	289.27	18.72	27.4	30.2

Tabla 3.3.- Posiciones de energías de enlaces de los diferentes grupos funcionales de los polímeros de PLGA, PEG-PLGA y mPEG-PLGA, así como su contribución porcentual determinada mediante la técnica de XPS y RMN.

En la representación gráfica del espectro del PLGA (figura 3.8), se registra un pico en la posición de energía de 289.25 eV, que se asigna al carbono de este grupo.

La descomposición del espectro sitúa las posiciones de energía de enlace del carbono adventicio en 284.82 eV, del grupo metileno en 286.36 eV, del grupo metino en 287.42 eV y del grupo carboxilo en 289.25 eV. El pico de 284.82 eV engloba la contribución del carbono del grupo metilo, que ha de ser idéntica a la del grupo metino, es decir de 7.42%, por tanto la contaminación es del 70.64%. El PLGA representa el 29.36%.

Con la asignación del carbono del grupo carboxilo, se completan las asignaciones de todos los carbonos del resto de compuestos.

En el espectro del PEG-PLGA (figura 3.9), se presentan carbonos metílicos y carbonos metilénicos en igual cantidad, lo que permite establecer que la contaminación es del 70.60%.

En el espectro del mPEG-PLGA (figura 3.10), el número de carbonos metílicos y metinos también coinciden, por lo que la contaminación es del 31.79%.

3.5.1.8.5.- ESTUDIO DE LOS ESPECTROS XPS DE LAS NANOESFERAS DE PLGA, PEG-PLGA Y mPEG-PLGA.

Analizando los espectros de PEG-6000, mPEG-5000, PLGA y Pluronic[®], se han establecido las asignaciones de los carbonos de los distintos grupos estableciendo así sus energías de enlace.

Mientras que a partir de los espectros de Pluronic[®] y los polímeros (PLGA, PEG-PLGA y mPEG-PLGA), pueden establecerse las razones experimentales, en las condiciones del análisis, entre los carbonos de los distintos grupos para cada polímero a través de las razones entre las áreas correspondientes.

En las figuras 3.11, 3.12 y 3.13, se representan los espectros correspondientes a nanoesferas de PLGA, PEG-PLGA y mPEG-PLGA respectivamente.

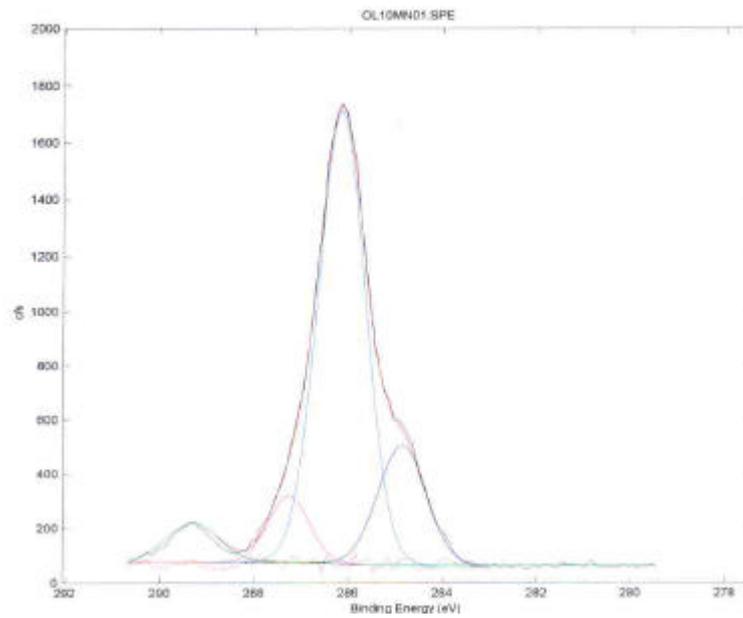


Figura 3.11.- Espectro de alta resolución del C1s correspondiente a nanoesferas de PLGA.

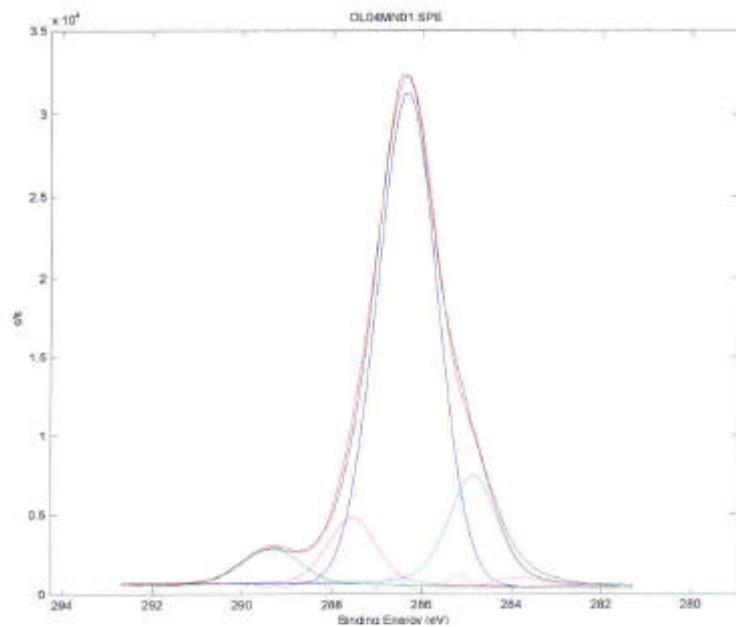


Figura 3.12.- Espectro de alta resolución del C1s correspondiente a nanoesferas de PEG-PLGA.

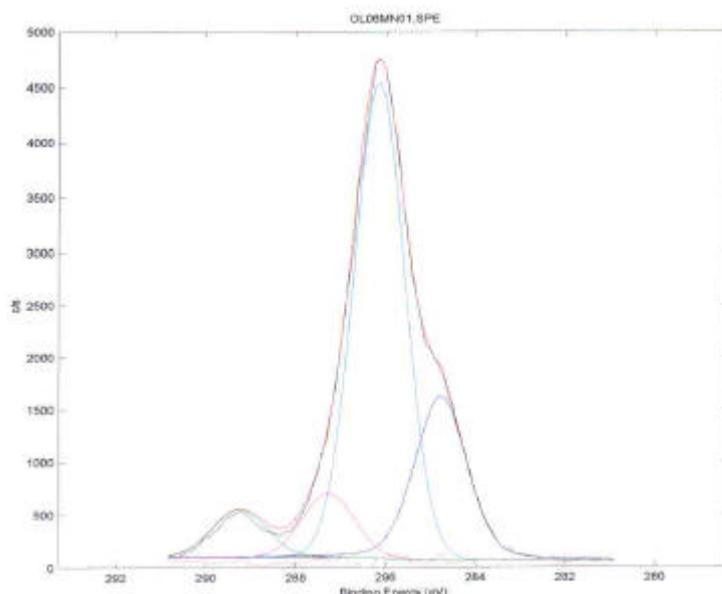


Figura 3.13.- Espectro de alta resolución del C1s correspondiente a nanoesferas de mPEG-PLGA.

Para cuantificar los porcentajes de las diferentes contribuciones, se ha utilizado como referencia el pico de 289.2 eV, ya que es debido únicamente a la contribución de los compuestos que contienen PLGA. A partir del área de este pico, se calcula la correspondiente a los otros grupos del PLGA, PEG-PLGA y mPEG-PLGA, utilizando las razones de áreas calculadas a partir de los espectros.

Estas razones permiten evaluar la contribución de cada compuesto en un espectro compuesto, por diferencia entre espectros. En los sistemas estudiados, solamente se presentan dos compuestos posibles en cada uno de ellos, por lo que se realiza una simple diferencia de contribuciones a partir de una contribución conocida en uno de los picos.

Las contribuciones porcentuales (tabla 3.4, 3.5 y 3.6) de los grupos metilenos del Pluronic[®], se calculan por diferencia entre el área total de esta posición y el área calculada para los grupos metinos de PLGA, PEG-PLGA y mPEG-PLGA. A partir de este valor, se calculan los porcentajes de contribución de los grupos metilo y metino del Pluronic en las áreas correspondientes. El porcentaje de contaminación se obtiene por diferencia entre el

área del pico de 284.81 eV y las contribuciones de los grupos metilo del resto de componentes.

Nanoesferas de PLGA					
GRUPOS	Energía(eV)	% Area	Contaminación	Pluronic	PLGA
Metilo	284.81	20.00	7.6	5.2	7.2
Metileno	286.16	56.77	-	51.6	5.2
Metino	287.19	12.91	-	5.2	7.2
Carboxilo	289.26	10.32	-	-	10.3

Tabla 3.4.- Contribuciones de los grupos del resto de los componentes para las nanoesferas de PLGA.

Nanoesferas de PEG-PLGA					
GRUPOS	Energía(eV)	% Area	Contaminación	Pluronic	PEG-PLGA
Metilo	284.89	16.05	5.6	5.4	5.1
Metileno	286.30	65.84	-	54.3	11.6
Metino	287.35	10.87	-	5.4	5.1
Carboxilo	289.29	7.24	-	-	7.2

Tabla 3.5.- Contribuciones de los grupos del resto de los componentes para las nanoesferas de PEG-PLGA.

Nanoesferas de mPEG-PLGA					
GRUPOS	Energía(eV)	%Area	Contaminación	Pluronic	mPEG-PLGA
Metilo	284.74	24.39	14.0	4.6	5.9
Metileno	286.21	56.46	-	45.6	10.9
Metino	287.20	10.79	-	4.6	5.9
Carboxilo	289.22	8.37	-	-	8.4

Tabla 3.6.- Contribuciones de los grupos del resto de los componentes para las nanoesferas de mPEG-PLGA.

Estos valores permiten concluir que las nanoesferas de PLGA, PEG-PLGA y mPEG-PLGA, lavadas y liofilizadas presentan en superficie una notable concentración de Pluronic^â, tal como puede verse en la tabla 3.7 de composiciones. El proceso de liofilización aplicado a las nanoesferas, justifica los valores encontrados para la

contaminación, esencialmente de hidrocarburos, ya que estos pueden proceder del aceite utilizado en las bombas de vacío.

Composición de la superficie de las nanoesferas			
	Contaminación	Pluronic ^a	Copolímero
PLGA	8 %	62 %	30 %
PEG-PLGA	6 %	65 %	29 %
mPEG-PLGA	14 %	55 %	31 %

Tabla 3.7.- Composición de la superficie de las nanoesferas.

3.5.2.- CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS NANOESFERAS MEDIANTE TÉCNICAS NANOMÉTRICAS

El objetivo de esta caracterización es poner de manifiesto la morfología espacial de las nanoesferas o de sus agregados, mediante la descripción tridimensional de su apariencia en el liofilizado y en el sedimento de una suspensión preparada a partir de aquel. Para ello se realiza un análisis topográfico de las muestras a escala nanométrica.

3.5.2.1.- MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM)

El Microscopio de Fuerza Atómica es un Microscopio de Barrido por Sonda. Esta singular familia de instrumentos permite obtener imágenes topográficas de las superficies de las muestras con una resolución nanométrica y, a diferencia de la microscopía electrónica, prácticamente sin restricciones del medio, es decir, permite trabajar en vacío, aire o líquidos. Por otra parte la muestra no debe someterse a ninguna manipulación especial para la exploración.

Todas las imágenes presentadas en este estudio se han obtenido mediante un sistema de AFM (figura 3.14) en el modo de contacto intermitente (Nanoscope III imaging in Tapping Mode). El instrumento se encuentra en la Unidad de Técnicas Nanométricas de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona.

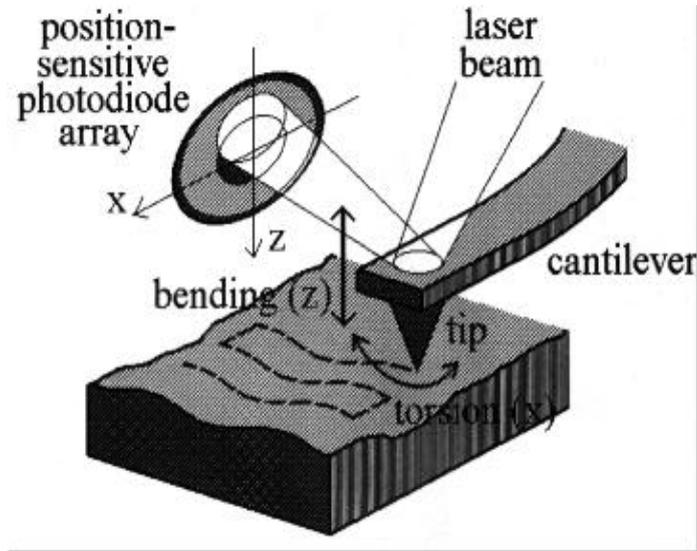


Figura 3.14.- Microscopio de fuerza atómica (AFM).

3.5.2.2.- OBTENCIÓN DE IMÁGENES

Esta técnica nanométrica obtiene las imágenes por cálculo a partir de los datos detectados por la sonda durante la exploración de la superficie de la muestra.

De este modo, la resolución lateral está condicionada por las dimensiones de la punta, y la resolución vertical depende únicamente del nivel de ruido ambiental.

3.5.2.3.- DETERMINACIÓN DE LAS DIMENSIONES VERTICALES

Si bien en el modo de contacto intermitente la probabilidad de alteración de la superficie de la muestra es menor que en el modo de contacto, en el estudio de materiales de baja consistencia la fuerza ejercida por la sonda puede igualmente deformar la superficie de las muestras (figura 3.15). A parte de esta posible deformación, a bajos niveles de ruido, la precisión en la determinación de las dimensiones verticales es del orden de 0.1 \AA .

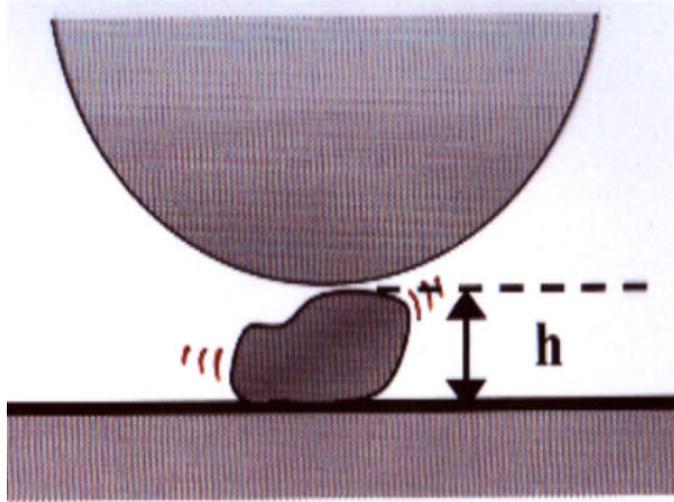


Figura 3.15.- Deformación de la superficie por la fuerza ejercida por la sonda.

3.5.2.4.- DETERMINACIÓN DE LAS DIMENSIONES HORIZONTALES

La determinación de las dimensiones horizontales está sujeta a convolución con la punta, de forma que se obtienen anchuras aparentes a veces muy superiores a las reales.

Es posible calcular la magnitud de esta distorsión a partir del modelo descrito para partículas idealmente esféricas (figura 3.16). Según este modelo, si el diámetro de la partícula es mucho menor que el radio de la punta, la anchura aparente (W) es proporcional a la raíz cuadrada del radio de la punta (R_p) y de la anchura real (diámetro, h) de la molécula y se calcula según la fórmula,

$$W = 2 \cdot \left(2 \cdot R_p \cdot h \right)^{1/2},$$

3.3

que se obtiene mediante cálculos trigonométricos sencillos a partir de los triángulos marcados en la figura 3.16.

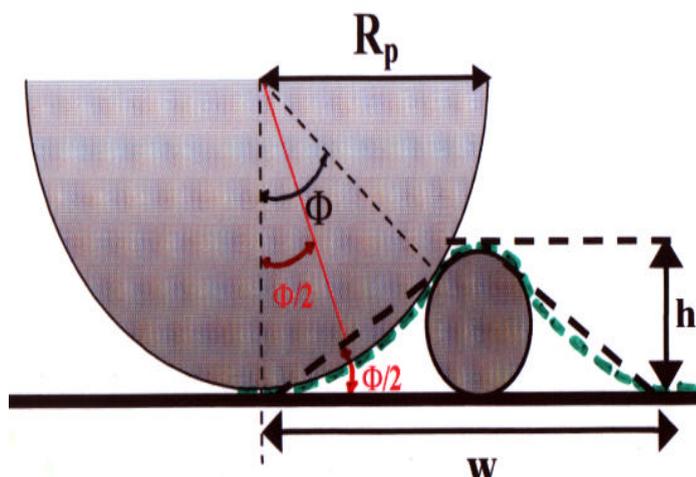


Figura 3.17.- Modelo para la determinación de las dimensiones horizontales.

3.5.2.5. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se caracterizarán las nanoesferas, o sus agregados, a partir del liofilizado de las nanoesferas y a partir del sedimento de una suspensión preparada a partir del liofilizado.

Muestras a partir de suspensión:

Se dispersa una pequeña porción de un acúmulo de nanoesferas de PEG-PLGA lavadas y liofilizadas, en agua calidad HPLC. Se ha calculado una concentración aproximada de 1 nanoesfera/ μm^2 . El sustrato de muestra utilizado es una superficie de 0,5 cm^2 grafito pirolítico altamente orientado (HOPG: Highly Oriented Pyrolytic Graphite), cuya elevada exfoliabilidad permite conseguir superficies atómicamente lisas. De este modo se consigue una mayor exactitud en las determinaciones del sistema.

Sobre esta superficie se extienden 5 μl de la suspensión de nanoesferas 1 nanoesfera/ μm^2 . Una vez depositada la muestra sobre el sustrato, se seca en cámara cerrada con corriente de nitrógeno seco a temperatura ambiente hasta completa evaporación del líquido.

Muestras sólidas:

Para el análisis de las muestras sólidas, se ha tomado directamente una pequeña porción de liofilizado (aproximadamente 2 x 1 x 0,5 mm) y se ha depositado sobre un sustrato de mica. La buena adherencia del material al sustrato, permite la obtención de

buenas imágenes, aunque se observan algunas deformaciones debidas a la elasticidad de la muestra.

3.5.2.6. UNIDADES MORFOLÓGICAS AISLADAS (muestras en suspensión)

En la Figura 3.17 se representa la proyección oblicua de dos unidades morfológicas del sedimento de la suspensión de nanoesferas de PEG - PLGA aisladas sobre sustrato de grafito.

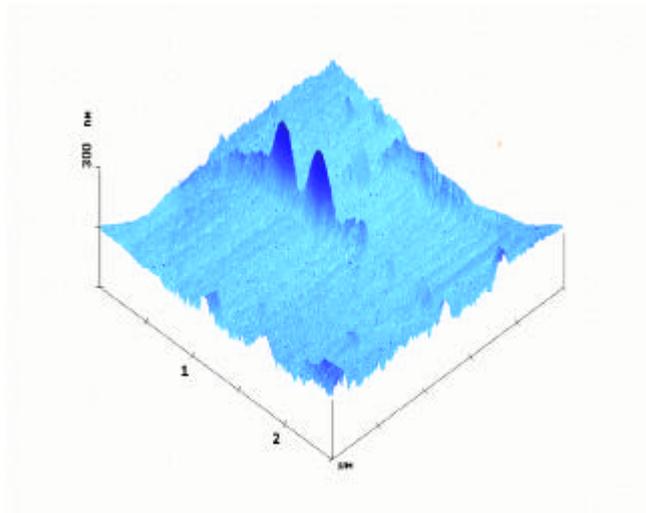


Figura 3.17.- Representación de la proyección oblicua de dos unidades morfológicas del sedimento de la suspensión de nanoesferas de PEG - PLGA aisladas sobre sustrato de grafito.

En la Figura 3.18 se realiza el análisis de sección de esta muestra. Se ha escogido el corte correspondiente a la alineación de las dos unidades que, por otra parte, coincide con un escalón del sustrato de grafito.

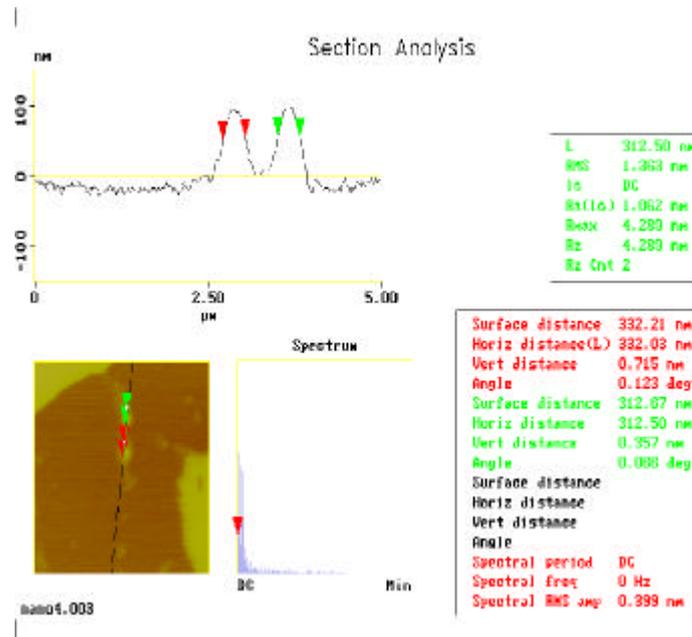


Figura 3.18.- Análisis de sección de nanoesferas de PEG-PLGA en suspensión.

Se determina el diámetro de las unidades morfológicas detectadas, midiendo la distancia entre marcadores verdes y rojos. Esta medición se hace a nivel de la altura media. Los valores obtenidos, 332 nm y 312 nm son totalmente concordantes con los datos obtenidos mediante perfilometría interferométrica como veremos posteriormente.

3.5.2.7. ACÚMULOS DE LIOFILIZADO (muestras Sólidas)

En la Figura 3.19 se representa la proyección plana de la imagen de las nanoesferas de PEG - PLGA obtenidas a partir de la muestra sólida de nanoesferas de PEG - PLGA liofilizadas sin ninguna manipulación para su preparación.

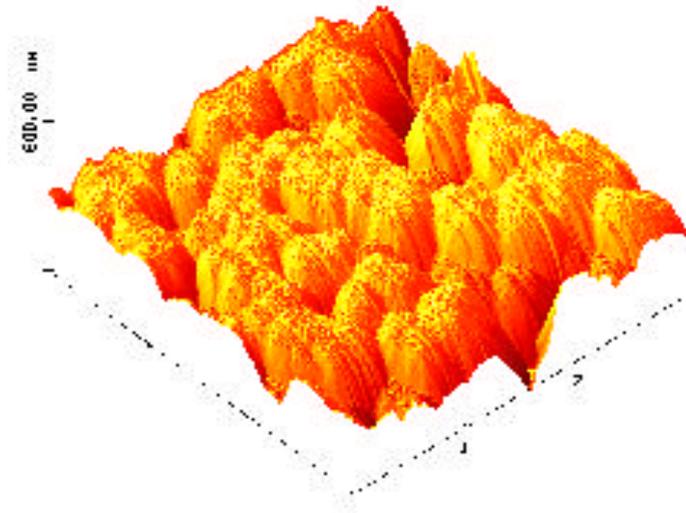


Figura 3.22.- Proyección oblicua de la imagen obtenida del liofilizado de nanoesferas de PLGA.

Los agregados de nanoesferas de PLGA tienen diámetros algo inferiores que las de PEG - PLGA y mPEG - PLGA.

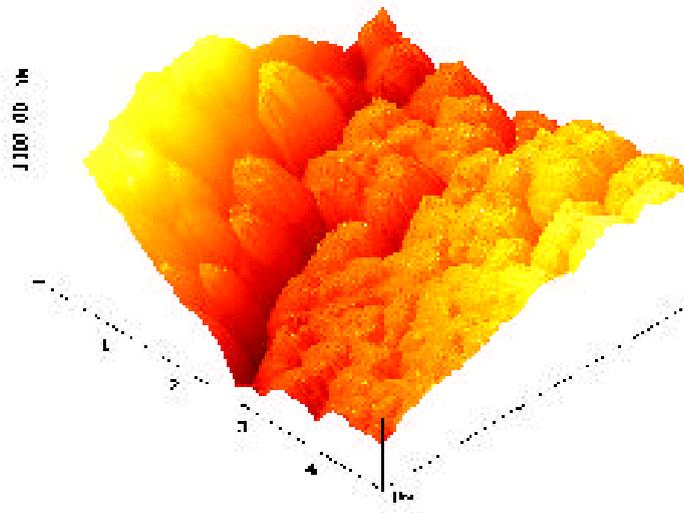


Figura 3.23.- Proyección oblicua de la imagen obtenida del liofilizado de nanoesferas de mPEG-PLGA.

Tamaño de las nanoesferas (nm) AFM		
PLGA	PEG-PLGA	mPEG-PLGA
152.5	217.0	–

Tabla 3.8.- Diámetro medio de las nanoesferas de los diferentes polímeros determinado por la técnica de AFM.

La confrontación de estas medidas con los resultados obtenidos en la determinación de tamaño de partícula en las suspensiones previas a la liofilización, sugiere la formación de agregados muy estables, los cuales presentan, desde el punto de vista morfológico, gran homogeneidad.

3.5.3.- PERFILOMETRIA INTERFEROMÉTRICA

3.5.3.1.- ANÁLISIS DE SUPERFICIES MEDIANTE MICROSCOPIA INTERFEROMÉTRICA

El microscopio interferométrico para análisis de superficie o perfilómetro interferométrico utiliza la dispersión de la luz interferométrica para imágenes y medidas superficiales para analizar la estructura superficial sin contactar con la superficie. Estas medidas son en tres dimensiones. Las medidas verticales, normal a la superficie, se llevan a cabo interferométricamente. Medidas laterales, se realizan en el plano de la superficie, se determinan por el cálculo del mínimo tamaño de los campos de visión del objetivo. La resolución lateral de 500 nm se obtiene con una mayor potencia del objetivo.

3.5.3.2.- ANÁLISIS PERFILOMÉTRICO DE SEDIMENTOS DE NANOSFERAS

La gran resolución vertical de esta técnica, se adapta muy bien a la medida de partículas depositadas sobre una superficie plana. Sin embargo su baja resolución lateral, no permite la detección de nanoesferas o de pequeños agregados aislados.

Se ha preparado un apilamiento compacto de partículas, mediante la evaporación de una gota de la suspensión sobre un sustrato de mica. De esta forma, las partículas, si son de tamaños homogéneos, se apilan formando estratos, quedando en la superficie desniveles que se corresponden con su tamaño, que son los parámetros que se exploran. En la figura 3.24 se representa la proyección oblicua de la superficie explorada del sedimento estratificado de las nanoesferas de PEG-PLGA. En ella se observa la

homogeneidad de alturas y el neto desnivel entre capas de nanoesferas, lo cual pone de manifiesto la homogeneidad de tamaño de las partículas analizadas.

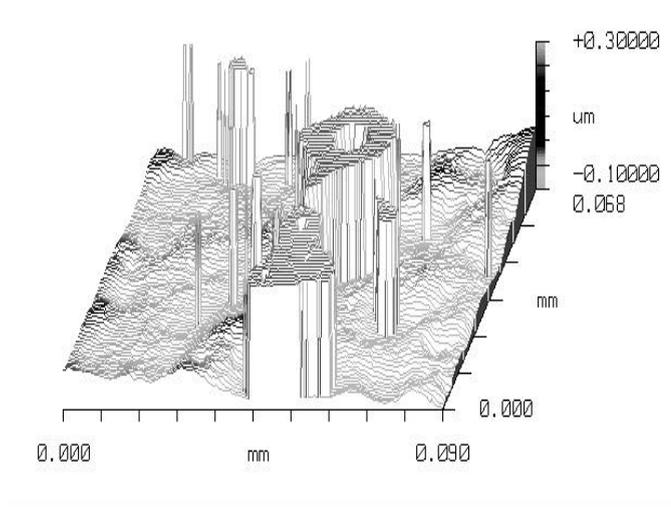


Figura 3.24.- Proyección oblicua de la superficie explorada del sedimento estratificado de las nanoesferas de PEG-PLGA.

En la Figura 3.25 se representa el mapa de alturas, en el que muestra la línea, a lo largo de la cual se hace el análisis del perfil de superficie.

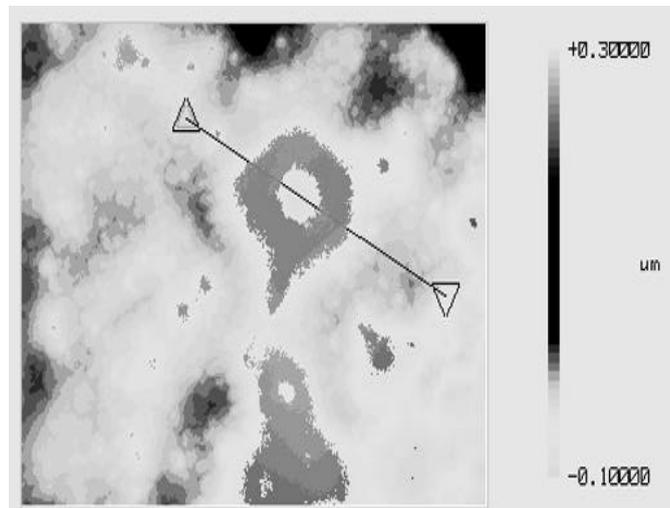


Figura 3.25.- Mapa de altura del sedimento estratificado de las nanoesferas de PEG-PLGA.

La gráfica correspondiente al perfil de superficie de la muestra analizada se representa en la figura 3.26. En ella se aprecia la homogeneidad de alturas de las partículas y cuyo valor es de 325 nm.

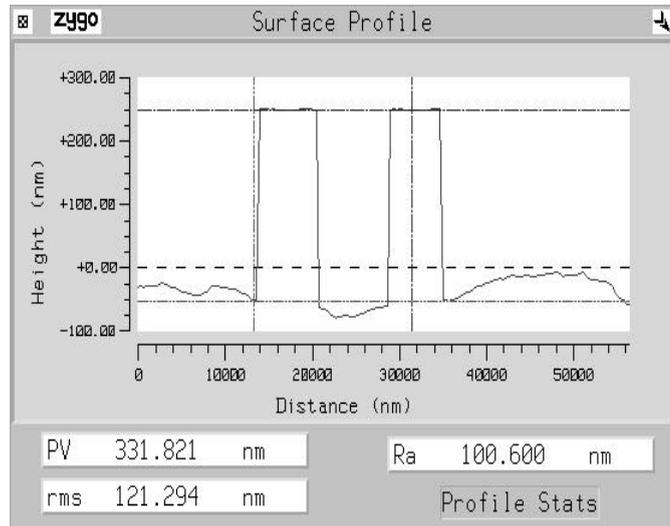


Figura 3.26.- Perfil de superficie del sedimento estratificado de las nanoesferas de PEG-PLGA..

Los parámetros de rugosidad (rms y Ra) que aparecen en la gráfica, son irrelevantes, ya que el recubrimiento no es homogéneo, asimismo la distancia entre puntos extremos (PV), aunque se ajusta al parámetro de tamaño, no tiene otra significación que la de nivelación del sustrato de la última capa de nanoesferas.

En la figura 3.27 se representa la proyección oblicua de la superficie explorada del sedimento estratificado de las nanoesferas de mPEG-PLGA. En ella se observa, también, la homogeneidad de alturas y el neto desnivel entre capas de nanoesferas.

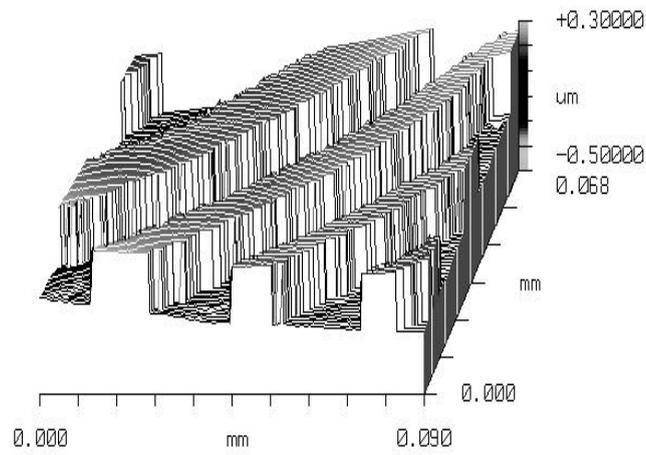


Figura 3.27.- Proyección oblicua de la superficie explorada del sedimento estratificado de las nanoesferas de mPEG-PLGA.

En la figura 3.28 se representa el mapa de alturas, en el que muestra la línea, a lo largo de la cual se hace el análisis del perfil de superficie.

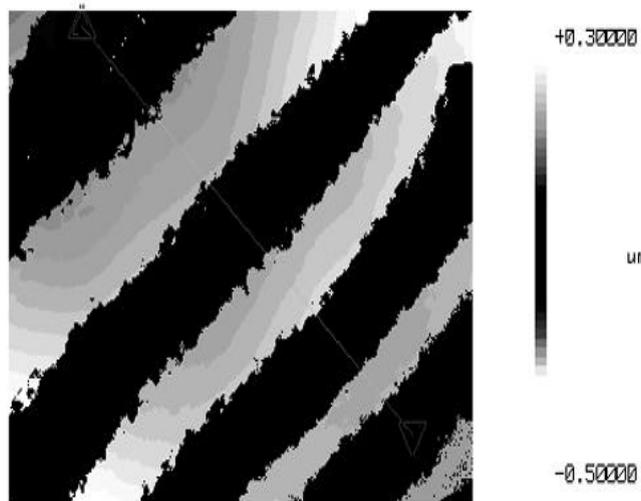


Figura 3.28.- Mapa de alturas del sedimento estratificado de nanoesferas de mPEG-PLGA..

El perfil de superficie de la muestra analizada se representa en la figura 3.29. En ella se aprecia la homogeneidad de alturas de las partículas, cuyo valor medio es de 325 nm.

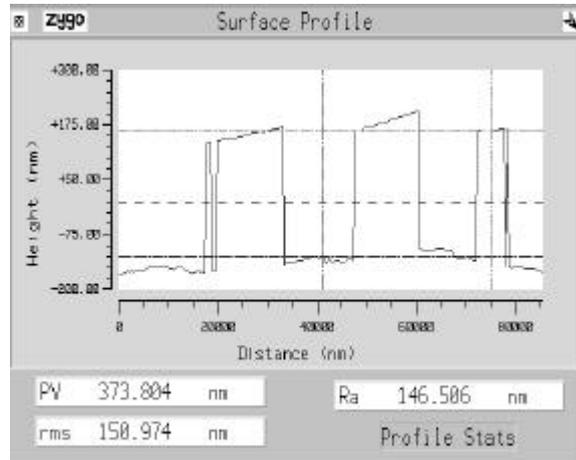


Figura 3.29.- Perfil de superficie del sedimento estratificado de nanoesferas de mPEG-PLGA.

En la figura 3.30 se representa la proyección oblicua del sedimento obtenido a partir de la suspensión de nanoesferas de PLGA liofilizadas, en la que se pueden observar tres niveles claramente diferenciados.

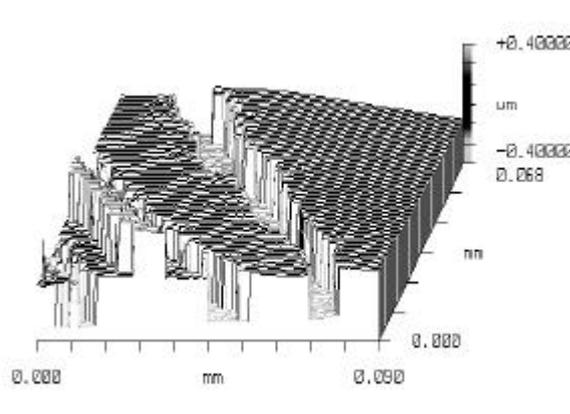


Figura 3.30.- Proyección oblicua del sedimento obtenido a partir de la suspensión de nanoesferas de PLGA liofilizadas.

En la figura 3.31 se representa el mapa de alturas, en el que muestra la línea, a lo largo de la cual se hace el análisis del perfil de superficie.

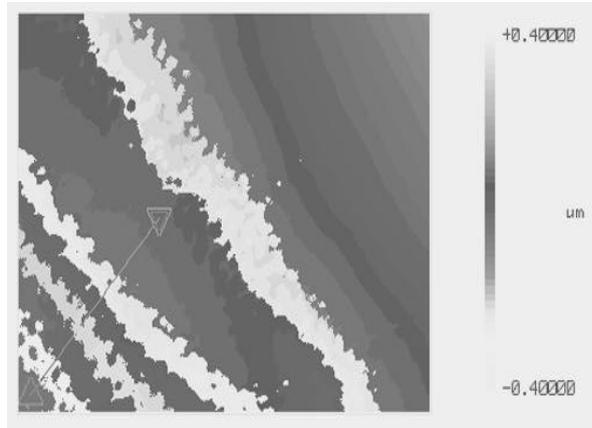


Figura 3.31.- Mapa de alturas del sedimento obtenido a partir de la suspensión de nanoesferas de PLGA liofilizadas.

En la figura 3.32 se representa la gráfica correspondiente al perfil de superficie de la muestra analizada. En ella se aprecia, una vez más, la homogeneidad de alturas de las partículas y cuyo valor es de 300 nm.

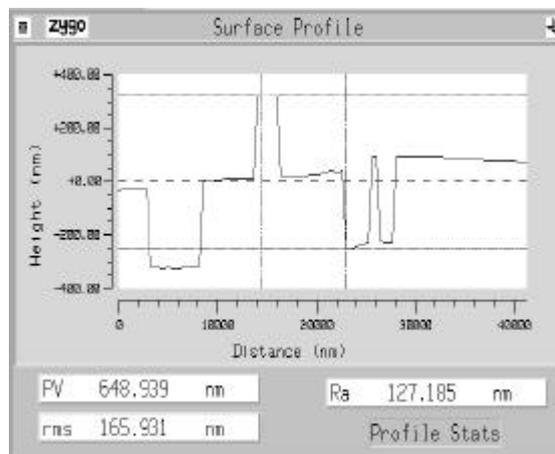


Figura 3.32.- Perfil de superficie del sedimento obtenido a partir de la suspensión de nanoesferas de PLGA liofilizadas.

El conjunto de mediciones efectuadas, mediante Perfilometría interferométrica, permite establecer el tamaño medio de las partículas constituyentes de los sistemas estudiados (tabla 3.9) y establecer la homogeneidad de sus dimensiones, obteniendo, como se acaba de detallar, resultados concordantes con los obtenidos mediante Microscopía de Fuerza Atómica.

Tamaño de las nanoesferas (nm) Perfilometría Interferométrica		
PLGA	PEG-PLGA	mPEG-PLGA
300.0	325.0	325.0

Tabla 3.9.- Diámetro medio de las nanoesferas de los diferentes polímeros determinado por la técnica de Perfilometría Interferométrica.

Se observa que la resuspensión de los liofilizados de nanoesferas de PLGA, PEG-PLGA y mPEG-PLGA conduce a sistemas dispersos en los que las partículas constituyentes son, aparentemente, agregados de las nanoesferas discretas presentes en la suspensión antes de la liofilización. El tamaño de estos agregados, que se mantiene en el rango nanométrico, es muy uniforme.

3.5.4.- CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA POR CORRELACIÓN FOTÓNICA

3.5.4.1.- DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE LAS NANOESFERAS

El diámetro medio en volumen de las nanoesferas se determinó utilizando un equipo de correlación fotónica (Coulter Model N4). La muestra de nanoesferas se suspendió en agua destilada y fueron sonicada durante 1 minuto.

Condiciones de medición:

- Temperatura: 20°C.
- Intervalo de concentración: $5 \cdot 10^4$ - 10^6 cps.
- Intervalo de tamaño de partícula: 1 - 10000 nm.
- Ángulo: 90°.
- Tiempo de medida: 200 seg.

3.5.4.2.- EFECTO DE LOS TENSIOACTIVOS EN LA ELABORACIÓN DE NANOESFERAS

El tensioactivo va a adsorberse sobre la superficie de las partículas y en principio va a disminuir la eficiencia del PEG y mPEG como agentes protectores. Por este motivo se intentaron elaborar nanoesferas sin Pluronic F-68. Los resultados se pueden observar en la tabla 3.10 siendo el tamaño de las nanoesferas elaboradas sin tensioactivo prácticamente el doble que las elaboradas con Pluronic^a-F68 al 0.5 % en peso. El principal problema no fue la obtención de nanoesferas de mayor tamaño, el tensioactivo resultó ser necesario para mantener las nanoesferas en suspensión, la ausencia de tensioactivo favorece la agregación de las partículas.

Muestras	\bar{X} medio (s)PLGA	\bar{X} medio (s)PEG-PLGA	\bar{X} medio (s)mPEG-PLGA
NSP	106±(0.58)	81±(3.5)	73±(2.6)
NCP	57±(0.58)	40±(1.5)	44±(1.2)

Tabla 3.10.- Tamaño de las nanoesferas (diámetro medio y desviación típica (\bar{X} medio (s)) de PLGA, PEG-PLGA y mPEG-PLGA en suspensión recién elaboradas sin pluronic (NSC) y con pluronic (NCP).

3.5.4.3.- EFECTO DE LA LIOFILIZACIÓN EN EL TAMAÑO DE NANOPARTÍCULAS

Condiciones de liofilización

Para la conservación de las suspensiones de nanoesferas se procedió a su liofilización, los primeros resultados indicaron la necesidad de añadir un crioprotector. Los crioprotectores empleados en nuestro estudio fueron el manitol y la glucosa al 5 %.

El proceso de liofilización de las nanoesferas se realizaron en un liofilizador (Labconco).

Las muestras se congelaron con nitrógeno líquido y se colocaron en el liofilizador, cuando este ya había alcanzado la temperatura de -54°C. La desecación primaria tiene un tiempo de duración de 24 horas a una temperatura de -20°C y posteriormente comenzaría la desecación secundaria durante 4 horas a una temperatura de 20°C. Todo el proceso se lleva a cabo al vacío ($15-16 \cdot 10^{-3}$ mm Hg). Transcurridas las dos desecaciones se extraen los viales tapados.

El tamaño de partícula fue medido antes y después de la liofilización. Solamente las nanoesferas elaboradas con Pluronic[®] y liofilizadas con glucosa fueron fácilmente redispersables, aunque como se observa en la tabla 3.11, la cual muestra los resultados obtenidos de los diámetros medios de las diferentes suspensiones de nanoesferas con los crioprotectores antes de liofilizar y después de liofilizar, se produce un aumento del tamaño (•NCPG y •NLPG), siendo menos acusado para el caso de nanoesferas de PLGA. En la figura 3.33 se aprecian las distribuciones de tamaños para un mismo lote antes y después de liofilizar con glucosa al 5 %. El resto de las suspensiones liofilizadas (nanoesferas de PLGA, PEG-PLGA y mPEG-PLGA liofilizadas sin Pluronic[®], con manitol y con glucosa, al igual que las nanoesferas liofilizadas que tenían Pluronic[®] y Pluronic[®]-manitol se agregaron y no se pudo medir sus tamaños debido a que no se resuspendieron, incluso empleando ultrasonido.

Muestras	Æ medio (s) PLGA	Æ medio (s) PEG-PLGA	Æ medio (s) mPEG-PLGA
NSPG	100±(0.81)	80±(3.6)	85±(2.9)
NSPM	91±(1.4)	75±(7.4)	92±(6.5)
•NCPG	59±(0.71)	45±(2.3)	50±(2.6)
NCPM	62±(1.2)	44±(2.1)	53±(2.7)
•NLPG	184±(1.5)	228±(8.9)	217±(8.0)

Tabla 3.11.- Tamaño de las nanoesferas (diámetro medio y desviación típica (∅ medio (s)) de PLGA, PEG-PLGA y mPEG-PLGA en suspensión sin pluronic y con glucosa (NSPG), sin pluronic y con manitol (NSPM), con pluronic y glucosa (NCPG), con pluronic y manitol (NCPM) y nanoesferas liofilizadas con pluronic y glucosa (NLPG).

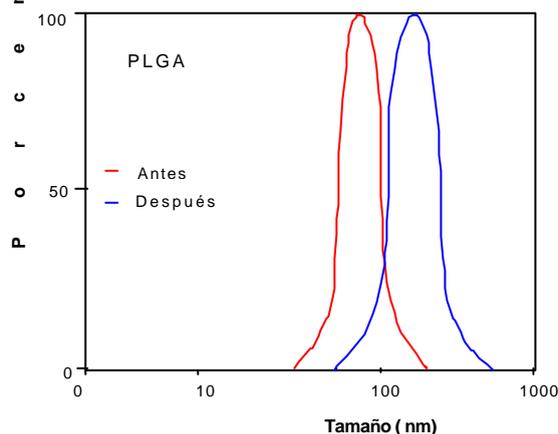


Figura 3.33.- Curvas de distribución de nanoesferas de PLGA antes y después de liofilizar.

Por lo tanto, consideramos que para la liofilización de nanoesferas es necesario la adición de un agente crioprotector, siendo los resultados obtenidos por nosotros con un 5 % de glucosa los más adecuados, aunque evidentemente la liofilización no ha sido optimizada. Además hemos de tener en cuenta que para el seguimiento de las nanoesferas necesitamos marcarlas con un radioisótopo, que en nuestro caso fue el ^{99m}Tc .

3.6.- CONTROLES REALIZADOS AL ELUIDO DE ^{99m}Tc

3.6.1.- CONTROL FÍSICO-QUÍMICO

1- Aspecto que presenta el eluido es incoloro y con ausencia de partículas extrañas.

2- El pH óptimo de un inyectable es de 7.4, pero este valor puede variar significativamente en función de la estabilidad del preparado radioquímico. Los valores de pH fueron determinados con papel indicador cuantitativo con una precisión de ± 0.5 unidades.

3- Ausencia de Al^{3+} el cual proviene de la columna de alúmina del generador y cuya concentración no debe superar los 20 ppm. Su detección es a través de papel indicador de pH (1-10, 4.8m, Merck).

4- La tonicidad se obtiene por adición de suero salino isotónico (NaCl 0.9%).

5- El tamaño de partícula fue determinado por la técnica antes descrita de correlación fotónica.

3.6.2.- CONTROL RADIOLÓGICO

1- La concentración radiactiva es la actividad presente por unidad de masa o volumen. Las nanoesferas (60 mg) fueron marcadas con 2 mCi ($7.4 \cdot 10^7$ Bq) contenidos en un determinado volumen de eluido. Esta actividad fue medida en un activímetro (Carpintec).

2- La actividad específica del ^{99m}Tc en el eluido es la actividad del radionúclido por unidad de masa de ese compuesto. No se considera ni la actividad debida a otros radionúclidos contaminantes diferentes a él, ni la masa debida a otros compuestos diferentes, por lo cual esta actividad solo debe estar vinculada a las nanoesferas y se expresa en Actividad/ unidad de masa.

3- La pureza radionuclídica es la fracción de actividad total debido al radionúclido en cuestión ya que pueden existir impurezas de otros radionúclidos por purificaciones incompletas.

El control de pureza radionuclídica se realiza por el análisis de espectro de emisión del ^{99m}Tc ya que este solo emite un pico 140 Kev, mientras que el posible radionúclido contaminante el ^{99}Mo emite fotones de 181, 740 y 780 Kev y por estas razones la Farmacopea Europea limita la radiactividad debido al ^{99}Mo en el eluido al 0.1 % de la actividad total, detectándose a través del espesor de semirreducción ya que este es más energético que el ^{99m}Tc , por lo que un blindaje de Pb de 5 mm de espesor atenúa la radiación del ^{99m}Tc a 0.002%.

4- La pureza radioquímica es la fracción de radionúclido presente en una preparación radiofarmacéutica como radiofármaco. Para los radiofármacos tecnecios la Farmacopea Europea establece que no menos del 95% de la radiactividad debe corresponder al ^{99m}Tc unido a las partículas en suspensión.

3.7.- SISTEMAS DE MARCAJES

3.7.1.- MARCAJE DE NANOESFERAS CON ^{99m}Tc

La técnica empleada para el marcaje de nanoesferas fue diseñada en nuestro Laboratorio por *Díaz y col (1993)*, para el marcaje de microesferas.

Se lleva a cabo en viales que contienen una suspensión de nanoesferas (20 mg/ml), cloruro de estaño como agente reductor al 15 % en peso y atmósfera de nitrógeno. Se adicionan aproximadamente 2 mCi ($7.4 \cdot 10^7$ Bq) de pertechnato de sodio (eluido de un generador Mo/ ^{99m}Tc , Eluter[®]), se agita 5 min. mecánicamente y se mantiene 10 minutos en reposo. Posteriormente la suspensión es colocada en una bolsa de microdiálisis (Spectra/Por[®] Membranes, MWCO: 12-14000) que se introduce en un vaso de precipitado conteniendo un volumen de 50 ml de agua destilada con el objetivo de eliminar el tecnecio libre de la muestra. Transcurrido el tiempo de equilibrio del trazador ^{99m}Tc -nanoesferas entre el medio interno y el externo de estas bolsas (1 hora aproximadamente) se toma una alícuota de 10 μl de la suspensión de nanoesferas y se mide en un contador gamma (Packard Autogamma) determinándose la actividad de la muestra. El tiempo de medición en el contador es de 30 segundos.

Utilizando la técnica anterior se obtuvo un rendimiento de marcaje del $92 \pm 5\%$ en los 36 marcajes efectuados. La eficiencia del contador para el ^{99m}Tc fue superior al 90% y el mismo se calibra con una fuente de ^{137}Cs . La actividad de fondo era del orden de 100-200 cpm.

Para determinar el Rendimiento del marcaje fue necesario aplicar la siguiente expresión.

$$\% \text{Rend. Marc aje} = \left(\frac{A_{\text{nano.Lavada}}}{A_{\text{nano.}}} \right) \cdot 100 \quad 3.4$$

3.7.1.1.- EFECTO DEL PROCESO DE MARCAJE CON ^{99m}Tc EN EL TAMAÑO DE LAS NANOESFERAS

El marcaje con ^{99m}Tc se llevó a cabo en nanopartículas recién elaboradas y por triplicado. En las tablas 3.12, 3.13 y 3.14 se recoge el tamaño de partículas antes y después de ser marcadas.

Lote	\bar{A} medio (s) ¹			\bar{A} medio (s) ²		
	M1	M2	M3	M1	M2	M3
PLGA-1	50±(16)	51.2±(16)	50.3±(15)	203	207	185
PLGA-2	45.1±(14)	44.6±(14)	45.9±(14)	149	180	168
PLGA-3	49.0±(15)	42.0±(16)	45.3±(15)	278	294	200
PLGA-4	47.0±(16)	47.5±(17)	47.9±(17)	207	215	212
PLGA-5	51.7±(19)	50.6±(18)	51.2±(17)	200	178	151
PLGA-6	52.3±(16)	59.1±(16)	50.2±(15)	198	219	203
PLGA-7	56.0±(17)	55.7±(17)	54.8±(15)	101	109	107
PLGA-8	49.1±(14)	45.3±(16)	44.7±(16)	148	145	147
PLGA-9	52.6±(15)	50.7±(16)	51.9±(16)	148	145	147
PLGA-10	43.0±(14)	43.4±(16)	42.8±(16)	140	162	159
PLGA-11	51.5±(18)	52.8±(18)	51.5±(18)	111	145	130

Tabla 3.12.- Efecto del marcaje con ^{99m}Tc en el tamaño de las nanopartículas de PLGA 33000 antes de marcar (diámetro medio y desviación típica ($\bar{\varnothing}$ medio (s)¹)) y después de marcar (diámetro medio y desviación típica ($\bar{\varnothing}$ medio (s)²)).

Lote	\bar{A} medio (s) ¹			\bar{A} medio (s) ²		
	M1	M2	M3	M1	M2	M3
PEG-PLGA-1	51.2±(18)	53.5±(18)	52.4±(19)	185	156	163
PEG-PLGA-2	50.1±(19)	48.2±(19)	48.5±(19)	170	167	168
PEG-PLGA-3	63.4±(20)	64.2±(19)	70.7±(20)	143	139	131
PEG-PLGA-4	58.2±(18)	58.6±(18)	57.7±(17)	249	276	260
PEG-PLGA-5	40.1±(19)	39.5±(18)	42.3±(19)	205	196	232
PEG-PLGA-6	50.1±(19)	49.1±(17)	49.6±(18)	102	99	110
PEG-PLGA-7	50.7±(20)	48.5±(19)	50.2±(20)	111	156	132
PEG-PLGA-8	49.8±(19)	47.3±(18)	50.7±(19)	181	195	200
PEG-PLGA-9	38.9±(18)	40.3±(19)	40.2±(19)	113	108	125

Tabla 3.13.- Efecto del marcaje con ^{99m}Tc en el tamaño de las nanopartículas de PEG-PLGA 25000 antes de marcar (diámetro medio y desviación típica ($\bar{\varnothing}$ medio (s)¹)) y después de marcar (diámetro medio y desviación típica ($\bar{\varnothing}$ medio (s)²)).

Lotes	\bar{A} medio (s) ¹			\bar{A} medio (s) ²		
	M1	M2	M3	M1	M2	M3
mPEG-PLGA-1	52.0±(19)	60.0±(18)	51.2±(18)	148	152	145
mPEG-PLGA-2	49.1±(20)	57.2±(21)	52.3±(21)	199	220	203
mPEG-PLGA-3	45.6±(18)	48.6±(18)	50.2±(20)	148	165	154
mPEG-PLGA-4	48.5±(20)	57.5±(18)	53.9±(19)	97	92	102
mPEG-PLGA-5	52.5±(19)	56.1±(19)	59.2±(18)	213	204	235
mPEG-PLGA-6	49.3±(20)	49.6±(19)	48.0±(19)	182	199	190

Tabla 3.14.- Efecto del marcaje con ^{99m}Tc en el tamaño de las nanopartículas de PEG-PLGA 27000 antes de marcar (diámetro medio y desviación típica ($\bar{\varnothing}$ medio (s)¹)) y después de marcar (diámetro medio y desviación típica ($\bar{\varnothing}$ medio (s)²)).

El marcaje con ^{99m}Tc, también da lugar a un aumento de tamaño probablemente debido a que durante el proceso se favorece la agregación de partículas (figura 3.34). Una posible explicación es que el Tc presenta un elevado número de coordinación y por tanto pueden unirse grupos carboxilos procedentes de varias nanoesferas.

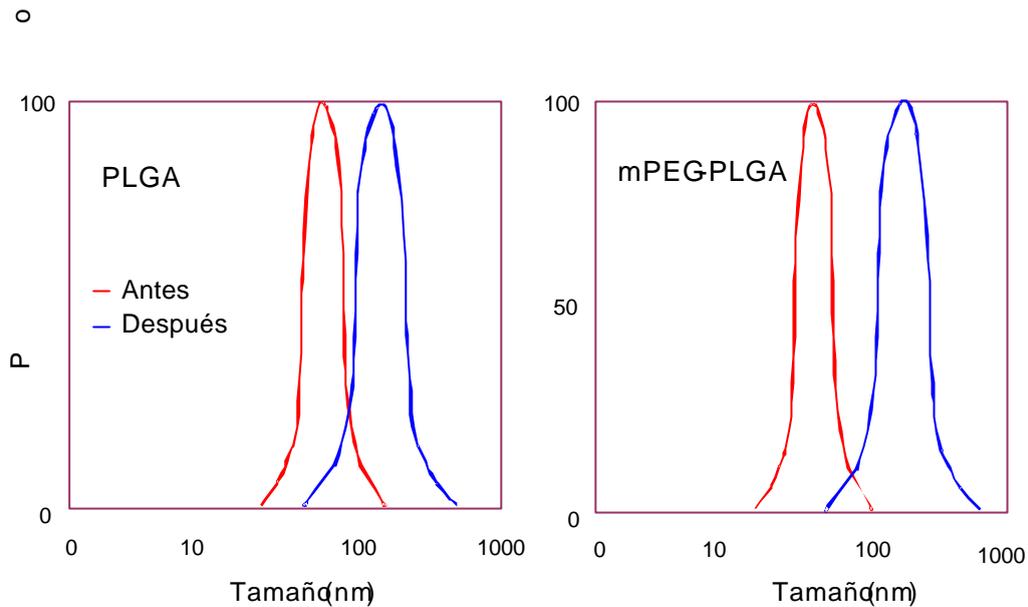


Figura 3.34.- Curvas de distribución de nanoesferas de PLGA y mPEG-PLGA antes de marcar y después de marcar con ^{99m}Tc .

3.7.2.- MARCAJE DE GLÓBULOS ROJOS CON ^{99m}Tc

Los métodos de marcaje con pirofosfato de estaño son en la actualidad los más utilizados. La concentración de Sn^{2+} y la pauta del marcaje (milímetros de sangre, tiempos de incubación y números de lavado con solución salina, principalmente) parece ser crítico a la hora de obtener buenos rendimientos. (Smith y Richards, 1976). La elección del anticoagulante es también de gran importancia, en este caso se utilizó una solución de Ácido Citrato-Dextrosa (ACD).

Protocolo empleado:

- 1- Extracción de 2 ml de sangre venosa con 0.5 ml de ACD.
- 2- Adición de la solución de pirofosfato de estaño que contenga 0.3-0.4 μg de Sn^{2+} (vial con 15 mg de pirofosfato de sodio decahidratado y 2 mg de cloruro de estaño dihidratado).
- 3- Incubación con agitación suave durante 10 min. a temperatura de 37°C.
- 4- Centrifugación a 1500 rpm (Centrifuga Econospin, Dupont) durante 10 min. con eliminación del sobrenadante (exceso de Sn^{2+} no utilizado).
- 5- Adición de 4 ml de suero fisiológico y repetición del paso 4.

6- Resuspensión de 3 ml con suero fisiológico y adición de 1ml de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (1-4 mCi).

7- Incubación con agitación suave durante 10 min. a temperatura de 37°C.

8- Centrifugación a 3000 rpm durante 10 min. y eliminación del sobrenadante (exceso del radionúclido).

9- Adición de 4 ml de suero fisiológico (NaCl 0.9%) y repetición del paso 8.

10- Resuspensión a 3 ml con suero fisiológico.

Con la técnica descrita, nuestro rendimiento de marcaje fue de un $90\% \pm 5\%$ en los tres marcajes efectuados.

3.7.3.- MARCAJE DE GLÓBULOS ROJOS CON ^{51}Cr

El método de marcaje utilizado para los glóbulos rojos con ^{51}Cr se describe a continuación (Gopal, 1979).

La sangre extraída a la rata se centrifuga (3000 rpm) con el objetivo de separar los hematíes del resto del plasma. Al volumen de hematíes se les adiciona un volumen de ácido citrato dextrosa (0.5 ml/ml sangre). Posteriormente se añaden 25 $\mu\text{Ci/ml}$ ($92.5 \cdot 10^4$ Bq) de $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (pH 8) (ICN) a la mezcla, la cual se incuba durante 15 min. a 37°C en un baño. El exceso de radionúclido que no se une a la globina se reduce añadiendo ácido ascórbico (5 mg/ml sangre) y después se elimina lavando las células con suero salino mediante centrifugación (3000 rpm). Por último se toman 100 μl de muestra y se mide la actividad en el contador Gamma. El rendimiento del marcaje utilizando esta técnica fue de un $89.5 \pm 2\%$ en los 15 marcajes efectuados. La eficiencia del contador para este isótopo fue del 7%, aproximadamente.

El rendimiento del marcaje se determinó por la siguiente ecuación.

$$\% \text{Marcaje} = \left(\frac{A_{\text{GRLavados}}}{A_{\text{GR}}} \right) \cdot 100 \quad 3.5$$

3.8.- ESTABILIDAD DEL MARCAJE

3.8.1.- ESTABILIDAD DEL MARCAJE DE NANOESFERAS CON ^{99m}Tc

La estabilidad del marcaje se realizó empleando bolsas de microdiálisis. Una vez marcadas las nanoesferas de PLGA, PEG-PLGA y mPEG-PLGA con ^{99m}Tc , según el

método descrito anteriormente. Se tomaron tres fracciones de 1 ml para realizar el estudio por triplicado y se colocaron en sus respectivas bolsas de microdiálisis, siendo el volumen externo de 50 ml de solución buffer (KBS, pH 7.4). Una vez transcurrido el tiempo de equilibrio durante 6 horas y a intervalos de 1 hora se toman muestras de 1 ml de la fase externa y se valoran en el contador gamma. El volumen utilizado se repone con el objetivo de no alterar la concentración de la solución de la fase externa.

A medida que transcurre el tiempo se corrige la actividad de las nanoesferas, aplicando la ley de desintegración radiactiva, donde A_0 corresponde a la actividad inicial de las nanoesferas marcadas ($t=0$), donde λ es la constante de semidesintegración y t son los tiempos transcurridos.

$$A_{total} = A_0 \cdot e^{-\lambda \cdot t} \tag{3.6}$$

$$\% \text{marcaje} - \text{remanente} = \left(\frac{A_{\text{experim}}}{A_{\text{teórica}}} \right) \cdot 100 \tag{3.7}$$

Los estudios de estabilidad se realizaron una vez finalizado el proceso de lavado con bolsas de microdiálisis, en las tablas 3.15, 3.16 y 3.17 muestran los porcentajes de ^{99m}Tc libre obtenidos del estudio de la estabilidad de los tres sistemas poliméricos realizados por triplicados, una vez que fueron marcados con dicho trazador.

Porcentajes de ^{99m}Tc libre				
t(h)	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Media(s)
0	18.73	19.64	19.95	19.44±(0.52)
1	21.80	22.27	18.95	21.01±(1.47)
2	19.00	18.20	22.53	19.91±(1.88)
3	23.02	21.79	20.84	21.88±(0.89)
4	22.43	22.71	19.36	21.50±(1.52)
5	18.92	19.34	23.50	20.59±(2.07)
6	22.75	18.45	23.07	21.42±(2.11)

Tabla 3.15.- Porcentajes de ^{99m}Tc libre, valores de la media y desviación típica (s), tomados durante un período de 6 horas para nanoesferas de PLGA 33000 (Lote PLGA9) en el medio de

perfusión (HBK, pH 7,4) y después de haber alcanzado el tiempo de equilibrio (1 hora) en bolsas de microdiálisis.

Porcentajes de ^{99m}Tc libre				
t(h)	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Media(s)
0	14.61	13.13	14.28	14.01±(0.63)
1	12.79	15.13	15.00	14.31±(1.07)
2	15.02	13.02	13.63	13.89±(0.84)
3	15.41	16.83	13.56	15.27±(1.34)
4	12.57	14.69	16.00	14.42±(1.41)
5	13.58	15.07	17.79	15.48±(1.74)
6	15.42	16.44	17.14	16.33±(0.71)

Tabla 3.16.- Porcentajes de ^{99m}Tc libre, valores de la media y desviación típica (s) , tomados durante un período de 6 horas para nanoesferas de PEG-PLGA 25000 (Lote PEG-PLGA7) en el medio de perfusión (HBK, pH 7,4) y después de haber alcanzado el tiempo de equilibrio (1 hora) en bolsas de microdiálisis.

Porcentajes de ^{99m}Tc libre				
t(h)	Muestra1	Muestra2	Muestra3	Media(s)
0	17.71	18.92	17.14	17.92±(0.74)
1	18.99	17.28	20.77	19.01±(1.43)
2	19.37	20.09	17.48	18.98±(1.10)
3	17.74	19.47	17.91	18.37±(0.78)
4	18.34	17.01	20.10	18.48±(1.27)
5	19.54	18.10	20.14	19.26±(0.86)
6	20.10	19.21	21.20	20.17±(0.81)

Tabla 3.17.- Porcentajes de ^{99m}Tc libre, valores de la media y desviación típica (s) , tomados durante un período de 6 horas para nanoesferas de mPEG-PLGA 27000 (Lote PEG-PLGA5) en el medio de perfusión (HBK, pH 7,4) y después de haber alcanzado el tiempo de equilibrio (1 hora) en bolsas de microdiálisis.

El tiempo 0 horas corresponde al tiempo de equilibrio, es decir el porcentaje de radiactividad correspondiente al exceso de ^{99m}Tc y como se observa, solamente un 2 % aproximadamente se cede a lo largo de las 6 horas que duró el experimento.

Por tanto, el único inconveniente que presenta el marcaje con ^{99m}Tc es que se produce un aumento de tamaño, pero aún así las nanoesferas presentan un tamaño

adecuado para este tipo de estudio, ya que el tamaño es menor que las 0.45 μm requeridos para disoluciones clarificantes (USP XXIII).

3.8.2.- ESTABILIDAD DE GLÓBULOS ROJOS MARCADOS CON ^{51}Cr Y $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Los glóbulos rojos (GR) son el marcador ideal del espacio vascular, ya ha sido empleado por varios autores para la caracterización del espacio vascular hepático (*Roberts y Rowland, 1986a*), por otro lado, también hay estudios sobre GR como vehículos de fármacos (*Jordán y col., 1997*). En este trabajo se han empleado los GR como sistema de control ya que su espacio natural es la sangre.

Una vez efectuados los marcajes de los GR con ^{51}Cr para estudios in situ y con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ para los estudios de biodistribución en animal completo, y realizados los lavados por centrifugación a 3000 rpm se procedió al estudio de la estabilidad de los mismos. El estudio de estabilidad se realizó durante 6 horas para diferentes lotes. A cada hora se centrifugó la muestra y se extrajo el sobrenadante, reponiendo el volumen extraído con una solución salina (NaCl 0.9%). Posteriormente, una alícuota de 100 μl para ambos sistemas, se midieron en el contador gamma durante 30 segundos en las ventanas de contajes definidas para cada radionúclido (Tablas 3.18 y 3.19), como se puede apreciar el marcaje resultó muy estable durante las 6 horas en que se realizó el estudio.

Tiempo (h)	Actividad (cpm)		
	GR-11	GR-12	GR-13
0	156231	125369	137856
1	155789	124563	138652
2	155962	125987	137688
3	156321	125033	136987
4	155123	124877	137001
5	156325	124563	136589
6	155987	124632	136652
Media(Sd)	155963 \pm (391)	125003 \pm (485)	137346 \pm (695)

Tabla 3.18.- Medidas de la actividad en cuentas por minuto (cpm) de 100 μl de GR- ^{51}Cr durante 6 horas una vez que se eliminó por centrifugación (3000rpm) el exceso de ^{51}Cr , la media y la desviación típica (s).

T (h)	Actividad (cpm)			Media(s)
	Muestra1	Muestra2	Muestra3	
0	797787	822323	801521	807210±(10794)
1	859169	801421	799214	819935±(27757)
2	836325	779253	822213	812597±(24271)
3	799719	811523	788177	799806±(9531)
4	821523	790231	769231	793661±(21486)
5	812752	803239	790119	802037±(9279)
6	777842	809111	799875	795609±(13117)

Tabla 3.19.- Datos correspondientes a las actividades (cpm) corregidas por la ley de desintegración radiactiva, la media y desviación típica (s) de 50 μ L de glóbulos rojos marcados con ^{99m}Tc para el lote GR-Tc1 una vez que se eliminó por centrifugación (3000rpm) el exceso de ^{99m}Tc .

Además se hizo un frotis para ver la morfología que presentaban los hematiés, dando como resultado que prácticamente no se produce lisis una vez transcurrido el tiempo de estabilidad del marcaje.

Capítulo 4

PERFUSIÓN

4.- ENSAYOS DE PERFUSIÓN

4.1.- DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO (TÉCNICA DE PERFUSIÓN)

Se utilizaron ratas Wistar (200-300g), las cuales fueron anestesiadas con pentobarbital (Normon) 400 mg/kg por vía intraperitoneal (Maguire y col., 1984). El procedimiento quirúrgico utilizado fue el seguido por Ross (1972), el cual se ilustra en la figura 4.1. Para la canulación de la vena porta hepática se utilizó una cánula (i.d 1.7mm) y una cánula (Luer fitting size 8F6) para la canulación de la vena cava.

Una vez canulado el hígado se conectó a una bomba peristáltica (Modelo Masterflex® L/S) a un flujo de circulación de 4.2 ml/min., siendo la presión de entrada al hígado de 7-15 mm Hg. El líquido de perfusión (Kreb Henseleit Buffer (KBS) y albúmina bovina (Merck) al 2.5 % en peso), se mantuvo a una temperatura de 37-40 °C, pH 7.4 y gasificado con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂).

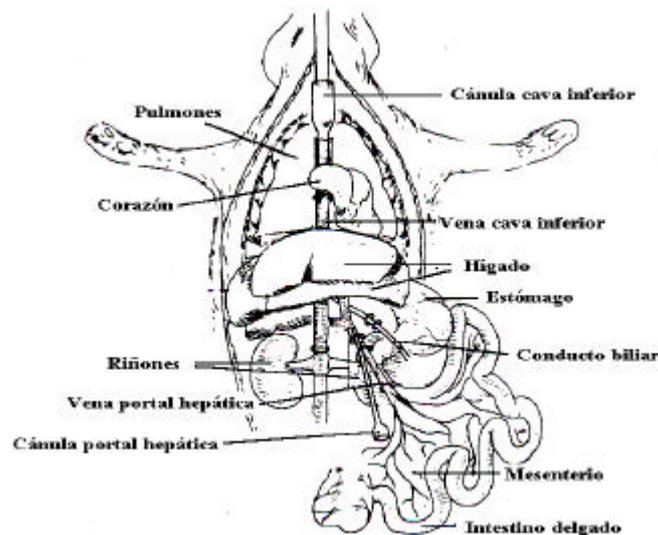


Figura 4.1.- Procedimiento quirúrgico para la preparación del hígado en la perfusión in situ (Maguire y col., 1984).

Etapas seguidas en la perfusión

- Lavado del hígado durante 10 minutos una vez finalizada la canulación.

- Inyección de 100 μl de glóbulos rojos marcados con ^{51}Cr a través de un inyector manual de dos posiciones y loop 100 μl (Modelo Vigi, Valco Instruments Co. Inc.). La actividad inyectada fue de $1.57 \cdot 10^5 \pm 2.49 \cdot 10^4$ cpm ($2.62 \cdot 10^3 \pm 4.14 \cdot 10^2$ Bq).

- Lavado del hígado durante 15 min.

- Inyección de 100 μl de nanoesferas marcadas con $^{99\text{m}}\text{Tc}$. La actividad inyectada fue de $4.14 \cdot 10^7 \pm 1.06 \cdot 10^7$ cpm ($6.90 \cdot 10^5 \pm 1.78 \cdot 10^5$ Bq).

Simultáneamente a la inyección se acciona el colector de fracciones (construido por Diego Molina en nuestro Laboratorio) y mediante un programa (elaborado por el Laboratorio de Electrónica de la Universidad de La Laguna) se recogen muestras a la salida del hígado durante 3 minutos a intervalos de 3 segundos, para los glóbulos rojos y durante 11 minutos a intervalos variables (0-123 segundos se recogieron cada 3 segundos y desde 123-663 segundos se colectaron cada 30 segundos), para las nanoesferas.

Al finalizar el experimento, el hígado fue extirpado, pesado y medida la actividad asociada al mismo de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ en su correspondiente ventana de contaje (energías comprendidas entre 100-200 KeV), ya que éste emite un único fotón γ (100%) en 140 Kev. Pasadas 24 horas se procedió a medir la actividad de GR- ^{51}Cr que quedaba en el hígado en su ventana de contaje (energías comprendidas entre 240-400 KeV), ya que emite fotones γ (9%) con energías de 320 Kev. Muestras de 100 μl tomadas de cada uno de los viales del colector de fracciones fueron medidas en el contador gamma y determinándose las diferentes curvas de distribución a la salida del hígado.

En la figura 4.2, mostramos el equipamiento utilizado para poder desarrollar los experimentos in situ.

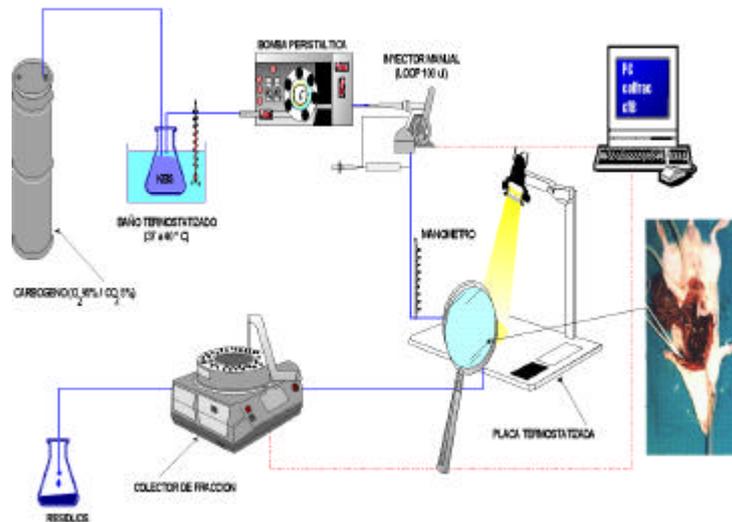


Figura 4.2.- Esquema del procedimiento y equipamiento de la perfusión hepática in situ.

4.2.- ANÁLISIS DE DATOS MEDIANTE EL MÉTODO DE LOS MOMENTOS

4.2.1.- NORMALIZACIÓN DE LAS CURVAS DE ACTIVIDAD - TIEMPO

La normalización de las curvas de actividad – tiempo persigue dos objetivos: comparar las curvas normalizadas con la de los modelos estándar a efectos de identificación, y comparar curvas de trazadores dotados de distinta actividad.

En el primer caso la curva de actividad – tiempo se transforma en una curva (τ, c^*) en la que tanto la abscisa como la ordenada son adimensionales. El cálculo de las nuevas variables se realiza mediante las ecuaciones

$$\hat{t} = \frac{Q}{V} t$$

4.1

$$z = \frac{a}{a_0}$$

4.2

donde Q el flujo que atraviesa el sistema ($\text{l}^3 \cdot \text{s}^{-1}$), V el volumen del sistema (l^3), y a_0 la actividad que resultaría de la distribución uniforme e instantánea de la dosis de trazador administrada, I_0 , en el sistema; es decir,

$$a_0 = \frac{I_0}{V} \quad 4.3$$

Si el sistema no capta el trazador, a_0 e I_0 pueden calcularse a partir de la curva de trazador a la salida del sistema mediante las ecuaciones

$$I_0 = Q \int_0^{\infty} a(t) \cdot dt \quad 4.4$$

$$a_0 = \frac{Q}{V} \int_0^{\infty} a(t) \cdot dt \quad 4.5$$

El área de la curva normalizada (τ, z) es igual a 1, pero los dos primeros momentos (ver más adelante) dependen de las características de la distribución del trazador en el sistema.

El segundo método para normalizar las curvas de actividad – tiempo afecta exclusivamente a la actividad, la cual se normaliza de acuerdo con la ecuación,

$$a^* = \frac{Q}{I_0} a \quad 4.6$$

siendo las unidades de a^* l^{-1} . Los cuadros 4.1 y 4.2 recogen las funciones Mathematica® utilizadas para la normalización de las curvas por los dos métodos descritos. En ambos casos se incluye en la lista de argumentos (ver cuadros 4.1 y 4.2) la variable `vsample`. Ello es debido a que la recogida de muestra es “en copa”, analizándose una muestra alícuota de la muestra obtenida en cada intervalo de tiempo.

```
NormalizedCurve[data_, vsample_] :=
  Module[
    {a, t, v, c0},
    {a, t, v} = MomentAnalysis[data, vsample];
```

```
c0 = a / t;
Map[{ #[1]/t , #[2]/(vsample c0)} &, data ]
```

Cuadro 4.1.- Función para la normalización de la curva de actividad tiempo obtenida por colección de fracciones.

```
FrecuencyCurve[data_List, vsample_, flow_, dose_List] :=
  Module[
    {fcout = {}, tint, ndat, nexper},
    tint = Drop[0.5 (Join[{0.}, Transpose[data][[1]] ])+
      RotateLeft[Join[{0.}, Transpose[data][[1]] ] ],
      {-1}];
    {ndat, nexper} = Dimensions[data];
    nexper = nexper - 1;
    Do[AppendTo[fcout,
      Transpose[{tint,
        flow Transpose[data][[i+1]] /
        (dose[[i]] vsample)}] ],
      {i, 1, nexper}];
    fcout]
```

Cuadro 4.2.- Función para la normalización de la curva de actividad tiempo obtenida por colección de fracciones.

4.2.2.- TASA DE EXTRACCIÓN Y MOMENTOS DEL TIEMPO DE RESIDENCIA HEPÁTICO

El modelo que describe la curva de trazador a la salida del hígado puede expresarse en función de la integral de convolución de las funciones correspondientes a la velocidad de entrada al hígado y la función de ponderación de este. Sea $F(t)$ la primera de ellas, y $G(t)$ la función de ponderación del hígado, es decir, la curva de actividad a la salida cuando la función de entrada es igual a una dosis unitaria multiplicada por la función δ de Dirá. La respuesta del hígado viene dada por la ecuación:

$$H(t) = \int_0^t F(\tau) \cdot G(t-\tau) \cdot d\tau \quad 4.7$$

La transformada de Laplace de esta expresión es:

$$h(s) = f(s) \cdot g(s) \tag{4.8}$$

donde $h(s)$, $f(s)$ y $g(s)$ denotan las respectivas transformadas de Laplace de las funciones $H(t)$, $F(t)$ y $G(t)$ respectivamente. Sean N y R los subíndices utilizados para las nanoesferas y los hematíes respectivamente; las funciones a la salida del hígado pueden expresarse por las ecuaciones:

$$\begin{aligned} h_N(s) &= f_N(s) \cdot g_N(s) \\ h_R(s) &= f_R(s) \cdot g_R(s) \end{aligned} \tag{4.9 a y b}$$

y por lo tanto,

$$h_N(s) = \frac{g_N(s)}{g_R(s)} \cdot h_R(s) \tag{4.10}$$

El cociente $g_N(s)/g_R(s)$ define una nueva función que corresponde al proceso de salida fuera de los sinusoides hepáticos de las nanoesferas, y su captación por las células de Kupffer. Sea $\Psi(s)$ dicho cociente; la ecuación anterior puede entonces expresarse en la forma

$$h_N(s) = \Psi(s) \cdot h_R(s) \tag{4.11}$$

y por lo tanto,

$$\bar{t}_N = \Delta \bar{t}_N + \bar{t}_R \tag{4.12}$$

siendo \bar{t}_N y \bar{t}_R los tiempos medios de residencia externa de las nanoesferas y de los hematíes respectivamente, y $\Delta \bar{t}_N$ el incremento de tiempo medio de la nanoesferas debido a los procesos de extravasación y captación de las nanoesferas por las células de Kupffer.

4.2.2.1.- CÁLCULO DE LOS MOMENTOS ESTADÍSTICOS

Los dos parámetros más utilizados para describir la curva de un trazador son el tiempo medio de residencia, μ , y la varianza del tiempo de residencia, σ^2 . Si la respuesta del sistema a un impulso es continua, y descrita por la función $a(t)$, el tiempo medio y la varianza vienen dados por las expresiones

$$\mu = \frac{\int_0^{\infty} t \cdot a(t) \cdot dt}{\int_0^{\infty} a(t) \cdot dt} \tag{4.13}$$

$$\sigma^2 = \frac{\int_0^{\infty} (t-\mu)^2 \cdot a(t) \cdot dt}{\int_0^{\infty} a(t) \cdot dt} \tag{4.14}$$

o bien,

$$\sigma^2 = \frac{\int_0^{\infty} t^2 \cdot a(t) \cdot dt}{\int_0^{\infty} a(t) \cdot dt} - \mu^2 \tag{4.15}$$

Para el cálculo del tiempo medio y de la varianza se utilizan expresiones derivadas de la integración mediante la regla trapezoidal, debiéndose contemplar dos situaciones. Si los datos corresponden a medidas instantáneas del trazador a la salida del sistema, usaremos las fórmulas siguientes:

$$\mu = \frac{\sum_{i=1}^{n-1} (t_i + t_{i+1}) \cdot (a_i + a_{i+1}) \cdot (t_{i+1} - t_i)}{2 \cdot \sum_{i=1}^{n-1} (a_i + a_{i+1}) \cdot (t_{i+1} - t_i)} \tag{4.16}$$

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n-1} (t_i + t_{i+1})^2 \cdot (a_i + a_{i+1}) \cdot (t_{i+1} - t_i)}{4 \cdot \sum_{i=1}^{n-1} (a_i + a_{i+1}) \cdot (t_{i+1} - t_i)} - \mu^2 \tag{4.17}$$

mientras que si la toma de muestras se lleva a cabo en copa, utilizaremos las siguientes ecuaciones:

$$\mu = \frac{\sum_{i=1}^n t_i \cdot a_i \cdot \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n a_i \cdot \Delta t_i} \quad 4.18$$

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^n t_i^2 \cdot a_i \cdot \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n a_i \cdot \Delta t_i} - \mu^2 \quad 4.19$$

donde t_i es el punto medio del intervalo Δt_i . (Levenspiel, 1979).

En el cuadro 4.3 se muestra la función `MomentAnalysis` para el cálculo de los momentos cuando los datos se refieren a curvas continuas de actividad – tiempo a la salida del órgano o sistema; obsérvese que esta función tiene dos argumentos: la lista de datos (`data`), formada por pares de observaciones tiempo – actividad, $\{ \{t_1, a_1\}, \{t_2, a_2\}, \dots \}$, y el volumen de la muestra que se mide en el contador (`vsample`). Si la lista de datos se refieren a actividades o a concentraciones, debemos hacer `vsample = 1`. El cuadro 4.4 recoge la función utilizada para los cálculos de los momentos para datos obtenidos mediante la colección de fracciones (ecuaciones 4.18 y 4.19); nótese que los argumentos son los mismos que el caso anterior.

```

MomentAnalysis[data_, vsample_] :=
  Module[{t, tm, dt, co, area, tmean,
    var},
    t = Flatten[{0, Transpose[data][[1]]}];
    tm = Drop[0.5 (t + RotateLeft[t]), -1];
    dt = Drop[RotateLeft[t] - t, -1];
    co = Transpose[data][[2]]/vsample;
    area = Apply[Plus, co dt];
    tmean = Apply[Plus, tm co dt]/area;
    var = Apply[Plus, tm tm co dt]/area -
      tmean tmean;
    {area, tmean, var}
  ]

```

Cuadro 4.3.- Función para el cálculo de los momentos.

```

DiscreteMomentAnalysis[data_, vsample_] :=
  Module[{t, tm, dt, co, area, tmean,
    var},
    t = Flatten[{0, Transpose[data][[1]]}];
    tm = Drop[0.5 (t + RotateLeft[t]), -1];
    dt = Drop[RotateLeft[t] - t, -1];
    co = Transpose[data][[2]]/vsample;
    area = Apply[Plus, co dt];
    tmean = Apply[Plus, tm co dt]/area;
    var = Apply[Plus, tm tm co dt]/area -
      tmean tmean;
    {area, tmean, var}
  ]

```

Cuadro 4.4.- Función para el cálculo de los momentos para datos obtenidos por colección de fracciones.

4.2.3.- RESULTADOS EXPERIMENTALES

Los resultados experimentales obtenidos a la salida del inyector y a la salida del hígado in situ utilizando los tres sistemas de nanopartículas, se expresan en las tablas que aparecen al final del capítulo (tablas 4.18 - 4.21 y 4.22- 4.33 respectivamente), en dichas tablas mostramos los datos de las actividades (cpm) de las nanoesferas de PLGA, PEG-PLGA y mPEG-PLGA-^{99m}Tc y GR-^{99m}Tc mediante un colector de fracciones de tiempo ajustable. El fondo fue restado a cada una de las actividades.

4.2.3.1.- RESULTADOS DE LA CAPTACIÓN HEPÁTICA EN LA PERFUSIÓN PARA LOS TRES SISTEMAS POLIMÉRICOS Y LOS GLÓBULOS ROJOS

Una vez que se realizaron las perfusiones con ⁵¹Cr-GR y con ^{99m}Tc-nanoesferas de cada uno de los copolímeros en estudio, se extrajo el hígado y se midió en el contador Packard Autogamma en la ventana del ^{99m}Tc y al segundo día se midió en la ventana del ⁵¹Cr. Con los resultados obtenidos se pudieron realizar las tablas 4.1, 4.2 y 4.3 las cuales muestran los porcentajes de captación de GR y nanoesferas en el hígado para cada uno de los sistemas.

Nanoesferas de PLGA					
Lote		Peso hígado	Æ medio(nm)	% Capt GR	% Capt nano
GR-1	PLGA-2	9.39	166	2.20	12.2
GR-1	PLGA-2	12.8	166	3.66	14.3
GR-2	PLGA-3	9.39	257	5.15	15.2
GR-2	PLGA-3	11.0	257	4.82	17.3
GR-3	PLGA-4	11.7	230	4.49	14.7
GR-3	PLGA-4	11.8	230	5.55	13.5
GR-4	PLGA-5	12.5	176	5.50	12.5
GR-4	PLGA-5	10.6	176	3.50	14.4

Tabla 4.1.- Porcentajes de actividades captadas por el hígado una vez realizada las perfusiones de $^{51}\text{Cr-GR}$. y nanoesferas de $^{99\text{m}}\text{Tc -PLGA}$ para cada uno de los lotes indicados. En la tabla se recogen el peso del hígado, el diámetro medio de las nanopartículas antes de perfundir (\emptyset medio (nm)), el porcentaje de captación de glóbulos rojos (% Capt GR) y el porcentaje de captación de nanoesferas de PLGA (% Capt nano).

Nanoesferas de PEG-PLGA					
Lote		Peso hígado	Æ medio(nm)	% Capt GR	% Capt nano
GR-5	PEG-PLGA-2	12.6	168	2.93	5.03
GR-5	PEG-PLGA-2	10.9	168	2.79	7.50
GR-5	PEG-PLGA-2	10.7	168	3.69	9.01
GR-6	PEG-PLGA-3	10.6	138	5.05	10.9
GR-6	PEG-PLGA-3	10.5	138	4.58	9.52
GR-7	PEG-PLGA-4	10.8	262	5.95	8.82
GR-7	PEG-PLGA-4	12.7	262	5.71	8.96
GR-7	PEG-PLGA-4	10.6	262	4.95	8.11
GR-8	PEG-PLGA-5	10.8	211	4.29	5.37
GR-8	PEG-PLGA-5	10.5	211	3.44	4.41

Tabla 4.2.- Porcentajes de actividades captadas por el hígado una vez realizada las perfusiones de $^{51}\text{Cr-GR}$. y nanoesferas de $^{99\text{m}}\text{Tc -PEG-PLGA}$ para cada uno de los lotes indicados. En la tabla se recogen el peso del hígado, el diámetro medio de las nanopartículas antes de perfundir (\emptyset medio (nm)), el porcentaje de captación de glóbulos rojos (% Capt GR) y el porcentaje de captación de nanoesferas de PEG-PLGA (% Capt nano).

Nanoesferas de mPEG-PLGA						
	Lote	Peso hígado	Æ medio(nm)	% Capt GR	% Capt nano	
	GR-9	mPEG-PLGA-2	10.6	148	5.61	8.35
	GR-9	mPEG-PLGA-2	11.1	148	4.41	8.64
	GR-9	mPEG-PLGA-2	11.3	148	5.22	7.51
	GR-9	mPEG-PLGA-2	9.20	148	3.76	6.35
	GR-10	mPEG-PLGA-3	13.9	207	5.96	7.56
	GR-10	mPEG-PLGA-3	13.6	207	4.78	8.28
	GR-10	mPEG-PLGA-3	13.9	207	4.62	5.53
	GR-10	mPEG-PLGA-3	12.6	207	3.20	8.11

Tabla 4.3.- Porcentajes de actividades captadas por el hígado una vez realizada las perfusiones de $^{51}\text{Cr-GR}$. y nanoesferas de $^{99\text{m}}\text{Tc-mPEG-PLGA}$ para cada uno de los lotes indicados. En la tabla se recogen el peso del hígado, el diámetro medio de las nanopartículas antes de perfundir (\varnothing medio (nm)), el porcentaje de captación de glóbulos rojos (% Capt GR) y el porcentaje de captación de nanoesferas de mPEG-PLGA (% Capt nano).

4.2.3.2.- TASA DE EXTRACCIÓN

La tabla 4.4 recoge los valores medios y desviación típica de las tasas de extracción y valores medios ajustados para los distintos tipos de nanoesferas con respecto a los hematíes de rata, que como indicamos anteriormente, hemos utilizado como referencia. La figura 4.3 muestra los valores de tasa de extracción obtenidos para los tres tipos de nanoesferas estudiados en función de la tasa de extracción obtenidas para los hematíes de rata en el mismo experimento. Tal como indicamos en su momento, el empleo de los hematíes de rata en los ensayos de perfusión tiene un doble objetivo: por un lado, servir de covariable y así reducir la variabilidad del ensayo; en segundo lugar, entendemos que actualmente no se ha desarrollado un sistema que mejore la los hematíes, de forma que pueden utilizarse para marcar el óptimo buscado.

grupo	medias	Desviación típica	Medias ajust.
PLGA	14.3	1.60	14.4
PEG – PLGA	7.76	2.15	7.74
mPEG - PLGA	7.54	1.08	7.45

Tabla 4.4.- Valores medios y desviación típica de las tasas de extracción y valores medios ajustados para los distintos tipos de nanoesferas.

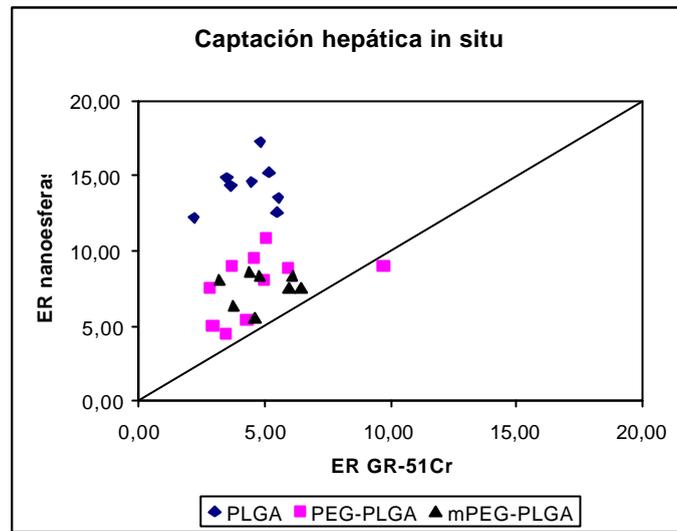


Figura 4.3.- Tasa de extracción (ER) de los tres tipos de nanoesferas estudiados en función de la tasa de extracción de los ^{51}Cr – hematíes.

Del examen de la figura 4.3 podemos deducir que existe una notable diferencia entre los tres tipos de nanoesferas, siendo la tasa de extracción (ER) superior para las nanoesferas de PLGA que para las de PEG-PLGA y mPEG-PLGA; así mismo, es destacable que en ningún caso los valores de ER sean del mismo orden que los de los ^{51}Cr – hematíes. La tabla 4.5 muestra el resultado del ANCOVA utilizando como covariable la tasa de extracción de los ^{51}Cr – hematíes, y la tabla 4.4, como indicamos anteriormente, muestra los valores medios y los valores medios ajustados, que prácticamente coinciden al haber sido aceptada la hipótesis nula de la pendiente de la covariable. La hipótesis de igualdad de tasas de extracción entre los tres tipos de nanoesferas se rechazó para $\alpha = 0.05$; sin embargo, y tal como acabamos de indicar, la hipótesis dependiente de la covariable igual cero no fue rechazada, aunque el valor de la probabilidad (P) es notablemente bajo. Podemos concluir por lo tanto que las nanoesferas de PLGA presentan tasas de extracción superiores a las de PEG – PLGA y mPEG – PLGA, pero que en ningún caso se alcanzan los valores de la tasa de extracción de los ^{51}Cr – hematíes.

	S.C	G.L.	M.S.	F	P
grupos	244.8	2	122.4	41.47	0.000
residual	67.89	23	2.952		
regresión	8.760	1	8.760	3.259	0.085
error	59.13	22	2.688		
total	312.7	25			

Tabla 4.5.- Análisis de la covarianza de las tasas de extracción (ANCOVA) una vez finalizado el experimento.

4.2.3.3.- TIEMPO MEDIO

La figura 4.4 muestran los valores de incremento del tiempo medio de las nanoesferas ($\Delta \bar{t}_N$), es decir, de los tiempos medios del proceso de transferencia parcialmente reversible de las nanoesferas fuera del espacio vascular. La tabla 4.6 recoge los valores de los tiempos medios y desviaciones típicas del tiempo medio de residencia obtenidos para las nanoesferas de los tres polímeros y los hematíes de rata y la tabla 4.7 muestra los resultados del análisis de la varianza de los tiempos medios de residencia de las tres nanoesferas, donde la hipótesis nula de diferencia igual a cero se rechaza para $\alpha = 0.05$.

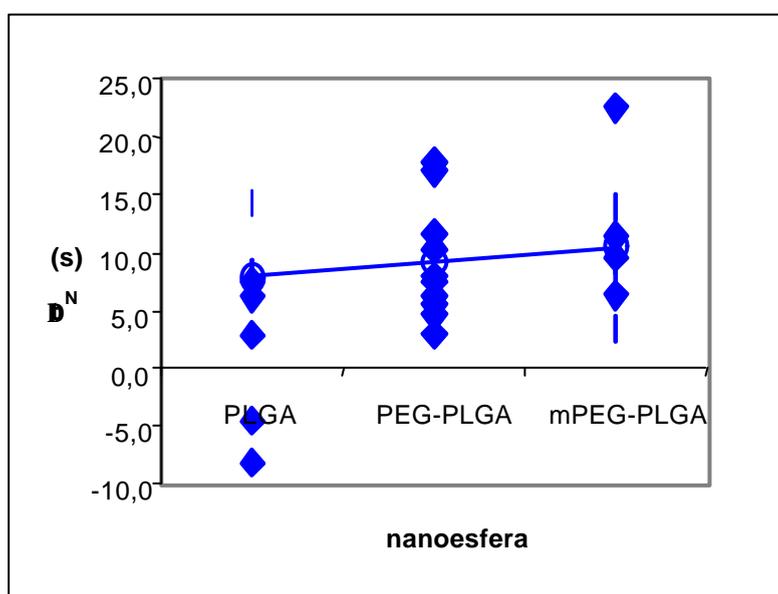


Figura 4.4.- Tiempos medios de transferencia intrahepática para las nanoesferas.

		Hígado (g)	Æ medio(nm)	TMR GR	TMR nano	$\Delta\bar{t}_N$ (s)
GR-1	PLGA-2	9.39	166	59.7	55.1	-4.6
GR-1	PLGA-2	12.8	166	54.6	46.5	-8.1
GR-2	PLGA-3	9.39	257	49.0	63.3	14.3
GR-2	PLGA-3	11.0	257	50.5	53.4	2.9
GR-3	PLGA-4	11.7	230	48.3	56.6	8.3
GR-3	PLGA-4	11.8	230	47.0	53.1	6.1
GR-4	PLGA-5	12.5	176	41.0	49.3	8.3
GR-4	PLGA-5	10.6	176	40.5	48.0	7.5
GR-5	PEG-PLGA-2	12.6	168	39.8	50.1	11.2
GR-5	PEG-PLGA-2	10.9	168	36.0	47.6	11.6
GR-5	PEG-PLGA-2	10.7	168	35.5	52.5	17.0
GR-6	PEG-PLGA-3	10.6	138	38.5	56.2	17.7
GR-6	PEG-PLGA-3	10.5	138	48.8	56.7	7.9
GR-7	PEG-PLGA-4	10.8	262	40.3	46.5	6.2
GR-7	PEG-PLGA-4	12.7	262	39.1	42.1	3.0
GR-7	PEG-PLGA-4	10.6	262	40.7	48.2	7.5
GR-8	PEG-PLGA-5	10.8	211	43.0	48.4	5.4
GR-8	PEG-PLGA-5	10.5	211	43.5	48.1	4.6
GR-9	mPEG-PLGA-2	10.6	148	38.6	42.1	3.5
GR-9	mPEG-PLGA-2	11.1	148	36.3	45.6	9.3
GR-9	mPEG-PLGA-2	11.3	148	39.2	45.5	6.3
GR-9	mPEG-PLGA-2	9.20	148	34.7	42.6	7.9
GR-10	mPEG-PLGA-3	13.9	207	39.0	48.6	9.6
GR-10	mPEG-PLGA-3	13.6	207	35.0	48.9	13.9
GR-10	mPEG-PLGA-3	13.9	207	34.2	45.5	11.3
GR-10	mPEG-PLGA-3	12.6	207	32.9	55.4	22.5
Sistemas		Media(s)				
PLGA		53.2±5.40				
PEG-PLGA		49.6±4.45				
mPEG-PLGA		46.8±4.25				
GR		41.8±6.70				

Tabla 4.6.- Resultados de los tiempo medio de residencia (TMR) de cada uno de los sistemas y el incremento de tiempo medio de las nanoesferas ($\Delta\bar{t}_N$).

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Or. Variación	S. C.	G. L.	C. M.	F	p
Entre grupos	206.4	2	103.2	4.674	0.020
Dentro de los grupos	507.9	23	22.08		
Total	714.3	25			

Tabla 4.7.- Resultados de ANOVA (tiempo medio de las nanoesferas ($\Delta\bar{t}_N$)) obtenidos para los tres tipos de nanoesferas.

En dos experimento con PLGA se obtuvieron valores de $\Delta\bar{t}_N$ negativos, que por no haber encontrado una explicación satisfactoria, han sido eliminados de análisis ulteriores. Los valores medios de $\Delta\bar{t}_N$ fueron 7,9 s, 9,1 s y 10,5 s para el PLGA, PEG – PLGA y mPEG – PLGA respectivamente, la hipótesis nula de diferencias igual a cero no se rechazó para $\alpha = 0.05$ (Tabla 4.9)

Origen de las variaciones	S.C	G.L.	M.S.	F	P
Entre grupos	24.04	2	12.02	0.617	0.549
Dentro de los grupos	409.0	21	19.48		
Total	433.1	23			

Tabla 4.9.- ANOVA de los tiempos medios de transferencia intrahepática ($\Delta\bar{t}_N$).

Por otro lado, no hemos encontrado ninguna correlación entre la tasa de extracción de nanoesferas y los tiempos de transferencia intrahepáticos, por lo que la explicación más plausible de estos datos es que la mayor tasa de extracción de las nanoesferas de PLGA es debida a que son retenidos de forma irreversible en mayor proporción que las nanoesferas de PEG – PLGA y mPEG – PLGA. La confirmación de esta hipótesis requiere un análisis cinético de las curvas de actividad – tiempo, que se expone a continuación.

4.3.- MODELO CINÉTICO DE CAPTACIÓN HEPÁTICA IN SITU

Para poder determinar el modelo fue necesario realizar un experimento el cual consistía en determinar la señal a la entrada del hígado para cada uno de los sistemas poliméricos y GR, por lo que se suministró una dosis al inyector y se recogieron las muestras a la entrada del hígado en el colector. Tabla 4.12 - 4.15.

Antes de comenzar los experimentos de perfusión hepática, se realizó un experimento con el objetivo de determinar la capacidad de captación del hígado en dosis repetidas. Se inyectaron dos dosis de ^{99m}Tc -nanoesferas ($20 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) a la misma rata, respetando el período de lavado entre dosis, aportando los siguientes resultados (tabla

4.9).

Lote	% en Hígado			Media(s)
	M1	M2	M3	
PLGA-1	35.3	37.6	38.8	37.2±1.45
PEG-PLGA-1	22.2	24.3	21.2	22.6±1.29
mPEG-PLGA-1	21.3	22.4	19.9	21.2±1.02

Tabla 4.9.- Determinación por triplicado del porcentaje de nanoesferas captadas por el hígado, la media y la desviación típica (s), después de la administración de dos inyecciones de 100 μ l de una suspensión de nanoesferas marcadas con ^{99m}Tc .

A la vista de los resultados, podemos concluir que el hígado es capaz de captar nanoesferas una vez introducida la segunda dosis y por estas razones el porcentaje de captación es aproximadamente el doble de lo que capta cuando se introduce una sola dosis, lo cual indica que el sistema se capta de forma lineal.

4.3.1.- CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA DE INYECCIÓN

El modelo teórico utilizado es una variante del modelo de dispersión axial abierto. La ecuación que rige este modelo, asumiendo que la dispersión tiene lugar a lo largo de la dirección del eje z, y para el caso de un tubo cilíndrico es:

$$\frac{\partial c}{\partial t} + v_z \frac{\partial c}{\partial z} = D \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} + \psi \quad 4.20$$

donde c es la concentración de trazador, t el tiempo, y ψ la fuente, que en el caso de un impulso unitario es igual a:

$$\psi = I_0 \cdot \delta(z - z_0) \cdot \delta(t) \frac{1}{\pi \cdot R^2} \quad 4.21$$

donde I_0 es la cantidad o actividad de trazador inyectado, z_0 la posición de la entrada, R el radio del cilindro y δ la función delta de Dirac. Para la resolución del modelo hemos de introducir las siguientes variables normalizadas:

$$\tau = \frac{v_z}{L} t = \frac{Q}{V} t \quad 4.22$$

$$P = \frac{v_z \cdot L}{D} \quad 4.23$$

$$a^* = \frac{a}{a_0} \quad 4.24$$

siendo a_0 la actividad de trazador que se obtendría si toda la dosis se distribuyera de forma uniformemente en el volumen V del sistema, es decir,

$$a_0 = \frac{I}{V} \quad 4.25$$

La solución del modelo es:

$$c^*(\tau) = \frac{1}{2} \left(\frac{P}{\pi \cdot \tau} \right)^{1/2} e^{-\frac{p(1-\tau)^2}{4\tau}} \quad 4.26$$

Este modelo reducido tiene por tiempo medio y varianza del tiempo de residencia:

$$\mu = 1 + \frac{2}{P} \quad 4.27$$

$$\sigma^2 = \frac{2}{P} + \frac{8}{P^2} \quad 4.28$$

A partir de la ecuación 4.26 podemos obtener la solución del modelo en función del tiempo, dosis inyectada, volumen del sistema y flujo; sustituyendo las ecuaciones 4.22 y 4.24 en 4.26 obtenemos:

$$c(t) = \frac{1}{2} \frac{a_0}{V} \left(\frac{V \cdot P}{\pi \cdot Q \cdot t} \right)^{1/2} e^{-\frac{pV(1-Q \cdot t/V)^2}{4Q \cdot t}} \quad 4.29$$

4.3.1.1.- SIMULACIÓN DEL MODELO DE DISPERSIÓN

Al abordar el desarrollo de funciones adecuadas para la simulación y análisis de este modelo utilizando el programa Mathematica[®], hemos de considerar dos puntos:

- Las funciones 4.26 y 4.29 se encuentran indeterminadas para $\tau = 0$ y $t = 0$ respectivamente; siendo la solución de la indeterminación $c_{(0)}^* = 0$ y $c_{(0)} = 0$.
- Con el fin de facilitar su empleo como argumento de otras funciones, las funciones definidas deben tener el atributo Listable.

Los cuadros 4.5 y 4.6 muestran las funciones Mathematica[®] empleadas en el análisis de los datos (Meadez, 1990).

```
DispModRed[t_NumberQ, p_] := 0. /; t <= 0;
DispModRed[t_NumberQ, p_] := 0.5 Sqrt[p/N[Pi]/t] Exp[- p (1 - t)^2 /4.0 /
DispModRed[l_List, arg___] := Map[f[#, arg] &, l];
```

Cuadro 4.4.- Código para el modelo de dispersión reducido (ecuación 4.26)

```
DispMod[t_NumberQ, v_, q_, p_, x0_] := 0. /; t <= 0;
DispMod[t_NumberQ, v_, q_, p_, x0_] := 0.5 / (x0/v) Sqrt[(v p) / (N[Pi] q t)]*
Exp[- (p v (1 - q t/v)^2) / (4. q t)];
DispMod[z_List, arg___] := Map[fdisp[#, arg] &, z];
```

Cuadro 4.5.- Código para el modelo de dispersión (ecuación 4.29)

Los resultados obtenidos en el ajuste de los datos experimentales, mostraron un desplazamiento sistemático de la curva ajustada de los datos experimentales, lo que puede deberse a dos circunstancias. Primero, la función que define la fuente, Ψ , asume que el trazador está homogéneamente repartido en una sección cilíndrica de espesor δz , mientras que en el sistema de inyección utilizado el trazador se encuentra disperso en una sección cilíndrica de longitud finita, e igual a la longitud del "loop" del inyector; segundo, las condiciones experimentales a la entrada y a la salida no son en sentido estricto abiertas, sino cerradas.

Para paliar este problema, y dado que nuestro objetivo es disponer de una función que describa de la mejor forma posible la entrada del trazador en el hígado, se introdujo en la ecuación 4.26 un nuevo parámetro, τ_0 , que permite que la curva se desplace y así lograr un mejor ajuste, quedando dicha ecuación en la forma,

$$c^*(\tau) = \frac{1}{2} \left(\frac{P}{\pi \cdot \tau} \right)^{1/2} e^{-\frac{P(\tau_0 - \tau)^2}{4\tau}} \quad 4.30$$

4.3.1.2.- ESTIMACIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL MODELO DE DISPERSIÓN

El procedimiento seguido es el ajuste de los datos normalizados a la función 4.31 utilizando el método de los mínimos cuadrados, y la función Mathematica® de regresión no lineal `NonlinearRegress[]`. Una vez obtenidos los parámetros del modelo reducido, μ y P , la función original que define la curva de actividad – tiempo a la salida del inyector se calcula multiplicando los valores de actividad normalizada a la salida del inyector por A_0 (ec. 4.29), (figura 4.5.) y transformado el tiempo normalizado en tiempo real (ec. 4.30), (figura 4.6). El cuadro 4.6 muestra el procedimiento seguido en el análisis de uno de los experimentos.

```
In[2]:=
(* activar módulos *)
```

```
Needs["NumericalMath`ListIntegrate`"]
Needs["Graphics`Graphics`"]
Needs["Statistics`NonlinearFit`"]
In[34]:=
```

```
(* lectura de datos *)
```

```
inline = OpenRead["c:/aad/nano/ent_mpeg.txt"];
Do[Read[inline, String], {i, 4}];
```

```
(* lectura de las actividades inyectadas *)
```

```
{acuno, acdos} = Read[inline, {Number, Number}];
Do[Read[inline, String], {i, 2}];
```

```
(* lectura de las curvas de actividad - tiempo *)
```

```

(* a la salida del inyector *)

datos = ReadList[inline, {Number, Number, Number}];
Close[inline];

(* definición del modelo para el inyector *)

funred = 0.5 Sqrt[p/N[Pi]/t] Exp[-p (tao - t)^2/4./t];

(* cálculo de las curvas normalizadas *)
(* actividad expresada en 10^6 cpm *)

casouno = Transpose[{Transpose[datos][[1]],
                    Transpose[datos][[2]]/1000000.0}];
casodos = Transpose[{Transpose[datos][[1]],
                    Transpose[datos][[3]]/1000000.0}];

(* análisis del primer ensayo *)

normcasouno = NormalizedCurve[casouno, 0.06];

modelnorm = NonlinearRegress[
  Select[normcasouno, (#[[1]] <= 2.5 &)],
  funred, t,
  {{p, 18.}, {tao, 0.8}},
  ShowProgress -> True]

From In[34]:=
Iteration:1 ChiSquared:3.38682 Parameters:{18., 0.8}
Iteration:2 ChiSquared:1.19678 Parameters:{20.9635, 1.02062}
Iteration:3 ChiSquared:0.648233 Parameters:{26.6757, 0.979498}
Iteration:4 ChiSquared:0.462794 Parameters:{31.3603, 0.967324}
Iteration:5 ChiSquared:0.404234 Parameters:{34.2866, 0.961403}
Iteration:6 ChiSquared:0.387138 Parameters:{35.831, 0.958229}
Iteration:7 ChiSquared:0.383463 Parameters:{36.3291, 0.957136}
Iteration:8 ChiSquared:0.38302 Parameters:{36.3986, 0.956979}
Iteration:9 ChiSquared:0.382975 Parameters:{36.4059, 0.956963}
Iteration:10 ChiSquared:0.38297 Parameters:{36.4066, 0.956961}
Iteration:11 ChiSquared:0.38297 Parameters:{36.4067, 0.956961}
Iteration:12 ChiSquared:0.38297 Parameters:{36.4067, 0.956961}
Out[55]=
{BestFitParameters -> {p -> 36.4067, tao -> 0.956961},

ParameterCITable -> Estimate Asymptotic SE CI ,
  p 36.4067 3.49262 {29.1212, 43.6922}

  tao 0.956961 0.0132069 {0.929412, 0.98451}

```


Cálculo del tiempo medio y de $I(0)$ (ec. 4.30), y de la función correspondiente a los datos normalizados

```

In[70]:=
{tpamedio = MomentAnalysis[casouno, 0.06][[2]] ,
czero = ListIntegrate[casouno]/tpamedio}
Out[70]=
{9.11243, 1.97782}
In[72]:=
modelo = czero funred /. modelnorm[[1,2]] /. t -> t/tpamedio
Out[72]=
      1
      10.1622 Sqrt[-]
      t
-----
      2
(82.9383 (0.956961 - 0.10974 t) )/t
E
In[78]:=
Plot[modelo, {t, 0, 30},
      PlotRange -> {{0, 30}, {0, 4}},
      AxesOrigin -> {0, 0},
      Epilog -> Map[{PointSize[0.0175], Point[#]} &, casouno] ]
    
```

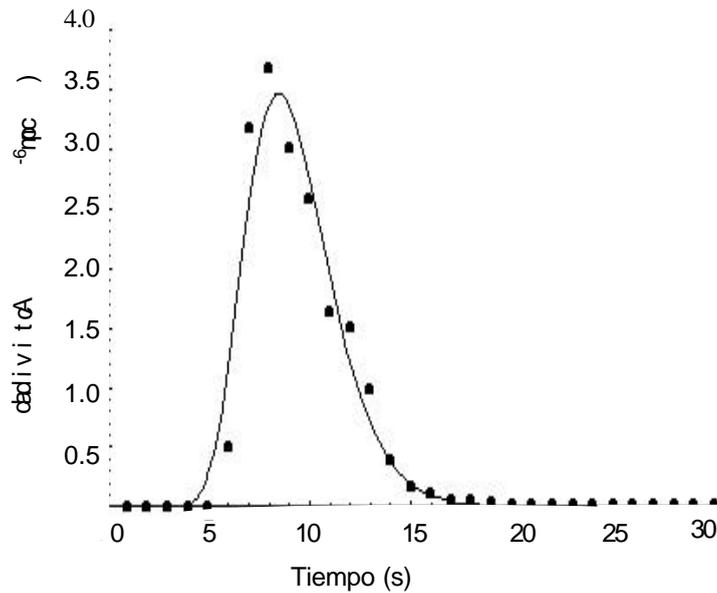


Figura 4.6.- Curva de actividad – tiempo a la salida del inyector se calcula transformando el tiempo normalizado en tiempo real (ec. 4.30)

Cuadro 4.6.- Procedimiento seguido en el ajuste de la curva de salida de uno de los experimentos

4.3.1.3.- RESULTADOS

La tabla 4.10 resume los resultados obtenidos en el ajuste de las curvas de actividad – tiempo a la salida del inyector.

Muestra	n	$I_0 \times 10^6$ cpm	P ± L. C 95%	t_0 ± L. C 95%	S_{scres}^2	r_{P,t_0}	V_{iny} ml
PLGA	1	28.5	33.4 27.4 – 39.4	0.860 0.836 – 0.885	$1.57 \cdot 10^{-2}$	-0.051	0.603
	2	26.0	34.6 29.6 – 39.7	0.872 0.852 – 0.892	$1.10 \cdot 10^{-2}$	-0.050	0.626
	3	26.1	32.2 26.9 – 37.6	0.866 0.843 – 0.888	$1.31 \cdot 10^{-2}$	-0.053	0.613
PEG-PLGA	1	16.3	26.2 19.8 - 32.6	0.834 0.806 – 0.880	$2.97 \cdot 10^{-2}$	- 0.058	0.726
	2	13.8	32.0 24.1 – 39.8	0.870 0.836 – 0.905	$2.92 \cdot 10^{-2}$	- 0.052	0.648
mPEG-PLGA	1	21.0	36.4 29.1 – 43.7	0.957 0.929 – 0.984	$1.91 \cdot 10^{-2}$	- 0.019	0.665
	2	18.7	31.1 25.0 – 37.2	0.881 0.853 – 0.909	$1.90 \cdot 10^{-2}$	- 0.019	0.698
$^{51}\text{Cr-GR}^{(1)}$	1	68.4	30.5 21.4 – 39.7	0.788 0.747 – 0.828	$5.20 \cdot 10^{-2}$	-0.055	0.733
	2	80.1	35.6 27.9 – 43.3	0.810 0.782 – 0.837	$2.62 \cdot 10^{-2}$	- 0.051	0.670
	3	79.4	41.2 32.3 – 50.0	0.802 0.776 – 0.827	$2.80 \cdot 10^{-2}$	- 0.048	0.663
	4	88.4	28.0 22.4 – 33.6	0.807 0.778 – 0.835	$2.04 \cdot 10^{-2}$	- 0.057	0.683

$^{1}I_0 \times 10^{-3}$

Tabla 4.10.- Resultados obtenidos del ajuste de las curvas de actividad tiempo – a la salida del inyector.

En la tabla 4.11 se muestran los valores medios y la desviación típica de los parámetros de las nanoesferas y los GR a la salida del inyector obteniéndose comportamientos muy similares entre sí.

	P	Media(s)	
		t_0	$V_{inv}(ml)$
Nano-PLGA	33.4±1.2	0.866±6.0·10 ⁻³	0.614±1.2·10 ⁻²
Nano-PEG-PLGA	29.1±4.1	0.852±2.5·10 ⁻²	0.687±5.5·10 ⁻²
Nano-mPEG-PLGA	33.8±3.8	0.919±5.4·10 ⁻²	0.631±2.5·10 ⁻²
GR	33.8±5.9	0.802±9.7·10 ⁻³	0.687±3.2·10 ⁻²

Tabla 4.11.- Media y desviación típica (s) de los parámetros P, t_0 y V

4.4 MODELO DE DISPOSICIÓN HEPÁTICA

Los modelos de perfusión desarrollados para interpretar las curvas de perfusión *in situ* se basan en el propuesto por *Boisvieux y Steimer (1979)* y *Ogawara y col. (1998)* para el estudio de la captación hepática de coloides. Este modelo consta de tres compartimentos que corresponden a otras tantas regiones hepáticas: el espacio vascular más el espacio de Disse, el sistema de captación de coloides localizado en la superficie de las células de Kupffer, y el interior de las células de Kupffer. El modelo propuesto por *Boiesvieux* asume que el segundo compartimento es saturable; nosotros no hemos observado tal saturación en los ensayos *in situ*, y además, por convenir a la hora de analizar los datos, hemos desarrollado ambos modelos, que denominaremos en lo sucesivo modelo hepático lineal y modelo hepático saturable respectivamente.

La principal dificultad a la hora de modelizar los ensayos de captación *in situ* estriba en definir la función de entrada al hígado. Tal como se expone en el apartado Caracterización del sistema de inyección (4.3.1), el modelo que mejor se adecua para interpretar la curva a la salida del inyector es el modelo de dispersión. Esta función de entrada impide, aún en el caso del modelo lineal, obtener las ecuaciones del modelo, y por lo tanto, un procedimiento gráfico para calcular las estimadas iniciales de los parámetros del modelo. Por otro lado, una vez que el fluido de perfusión abandona el hígado, recorre

710 mm a través del tubo que llega al colector, dando lugar a un nuevo proceso de dispersión.

En términos matemáticos, la función respuesta del sistema experimental, sistema de inyección, hígado y sistema de recogida de muestras, puede expresarse mediante la convolución de las funciones respectivas:

$$R(t) = F_1(t) \cdot H(t) \cdot F_2(t)$$

4.31

donde $F_1(t)$, $H(t)$ y $F_2(t)$ denotan las funciones de ponderación del sistema de inyección, hígado y sistema de recolección respectivamente, y $R(t)$ la función respuesta del sistema global. Si el sistema de inyección se conecta directamente al tubo colector, la respuesta del sistema vendrá dada por la ecuación

$$R_{\text{sis}}(t) = F_1(t) \cdot F_2(t) \tag{4.32}$$

Por lado, la convolución es conmutativa, por lo que de las dos ecuaciones anteriores podemos deducir que

$$R(t) = R_{\text{sis}}(t) \cdot H(t) \tag{4.33}$$

El modelo empleado consta de tres compartimentos y se representa en la figura 3.7.

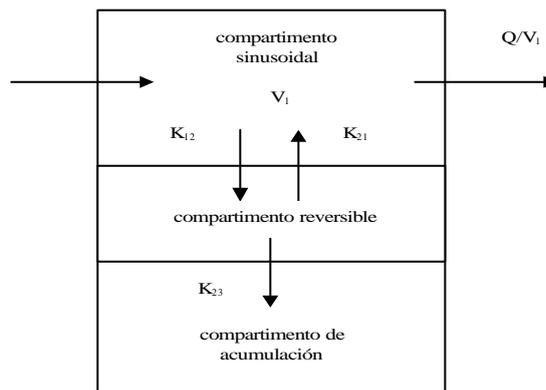


Figura 4.7.- Esquema del modelo de tres compartimentos propuesto para la disposición hepática de las nanoesferas estudiadas

El sistema de ecuaciones diferenciales que rigen el modelo propuesto es el siguiente:

$$\left. \begin{aligned} \frac{dx_1}{dt} &= -(k_{10} + k_{12}) \cdot x_1 + k_{21} \cdot x_2 + I(t) \\ \frac{dx_2}{dt} &= k_{12} \cdot x_1 - (k_{21} + k_{23}) \cdot x_2 \\ \frac{dx_3}{dt} &= k_{23} \cdot x_2 \end{aligned} \right\}$$

4.34

donde $I(t)$ es la función de entrada en el compartimento 1. Sea $I(t) = \delta(t - 0)$, es decir un impulso unitario a $t = 0$, y

$$k_{11} = k_{10} + k_{12}$$

4.35

$$k_{22} = k_{21} + k_{23}$$

$$4.36 \quad \gamma_2 = k_{12} \cdot k_{21} \tag{4.37}$$

La transformada de Laplace del sistema 1 es

$$\left. \begin{aligned} s \cdot x_1(s) - 1 &= -k_{11} \cdot x_1(s) + k_{21} \cdot x_2(s) \\ s \cdot x_2(s) &= k_{12} \cdot x_1(s) - k_{22} \cdot x_2(s) \\ s \cdot x_3(s) &= k_{23} \cdot x_2(s) \end{aligned} \right\} \tag{4.38}$$

Debido a que el compartimento 3 está conectado solo con el compartimento 2 y de forma irreversible, la resolución del sistema debe hacerse en dos fases; resolver el sistema formado por las dos primeras ecuaciones 4.38, y posteriormente resolver la tercera. El determinante del sistema formado por las dos primeras ecuaciones es a su vez

$$D(s) = \begin{vmatrix} s+k_{11} & -k_{21} \\ -k_{12} & s+k_{22} \end{vmatrix} = (s+k_{11}) \cdot (s+k_{22}) - \mathbf{g}_2 = (s+\mathbf{I}_1) \cdot (s+\mathbf{I}_2) \tag{4.39}$$

donde λ_1 y λ_2 son las soluciones de $D(s) = 0$, que como puede demostrarse, son siempre reales negativos; en lo sucesivo asumiremos que $|\lambda_1| > |\lambda_2|$. Las soluciones son por lo tanto,

$$x_1(s) = \frac{s + k_{22}}{(s + \lambda_1) \cdot (s + \lambda_2)} \quad 4.40$$

$$x_2(s) = \frac{k_{12}}{(s + \lambda_1) \cdot (s + \lambda_2)} \quad 4.41$$

Calculando las antitransformadas obtenemos finalmente,

$$x_1 = \frac{1}{(\lambda_1 - \lambda_2)} \left((\lambda_1 - k_{22}) \cdot e^{-\lambda_1 \cdot t} + (k_{22} - \lambda_2) \cdot e^{-\lambda_2 \cdot t} \right) \quad 4.42$$

$$x_2 = \frac{k_{12}}{\lambda_1 - \lambda_2} \left(e^{-\lambda_2 \cdot t} - e^{-\lambda_1 \cdot t} \right) \quad 4.43$$

Por otro lado,

$$x_3(s) = k_{23} \frac{x_2(s)}{s}$$

y resolviendo:

$$x_3 = \frac{k_{12} \cdot k_{23}}{\lambda_1 - \lambda_2} \left(\frac{\lambda_1 - \lambda_2}{\lambda_1 \cdot \lambda_2} + \frac{e^{-\lambda_1 t}}{\lambda_1} - \frac{e^{-\lambda_2 t}}{\lambda_2} \right) \quad 4.44$$

4.4.1.- IDENTIFICABILIDAD DEL MODELO Y ESTIMACIÓN DE LOS PARÁMETROS

Por definición, la concentración de trazador en el interior de un compartimento es homogénea, y por lo tanto, la concentración del mismo a la salida del hígado viene dada por la expresión:

$$c = \frac{1}{V_1} \frac{1}{(\lambda_1 - \lambda_2)} \left((\lambda_1 - k_{22}) \cdot e^{-\lambda_1 t} + (k_{22} - \lambda_2) \cdot e^{-\lambda_2 t} \right) \quad 4.45$$

A partir de esta ecuación deducimos que los parámetros directamente estimables son λ_1 , λ_2 , k_{22} y V_1 . Para la estimación de los parámetros individuales hemos de hacer uso

de las siguientes consideraciones. Dado que en el interior de cada compartimento se asume una mezcla perfecta,

$$k_{10} = \frac{Q}{V_1}$$

4.46

por lo que k_{10} es directamente estimable a partir de V_1 . A partir de las ecuaciones 4.34-4.37 se deduce además:

$$\left. \begin{aligned} k_{11} &= I_1 + I_2 - k_{22} \\ \mathbf{g}_2 &= k_{11} \cdot k_{22} - I_1 \cdot I_2 \\ k_{12} &= k_{11} - k_{10} \\ k_{21} &= \frac{\mathbf{g}_2}{k_{12}} \\ k_{23} &= k_{22} - k_{21} \end{aligned} \right\} \quad 4.47$$

Podemos por lo tanto concluir que el modelo es unívocamente identificable a partir de las concentraciones de trazador a la salida.

4.4.2.- MOMENTOS ESTADÍSTICOS

Los dos primeros momentos a la salida del sistema, área bajo la curva (ABC) y tiempo medio de residencia externo, \bar{t} , se definen como:

$$ABC = \int_0^{\infty} c(t) \cdot dt$$

4.48

$$\bar{t} = \frac{\int_0^{\infty} t \cdot c(t) \cdot dt}{\int_0^{\infty} c(t) \cdot dt} \quad 4.49$$

Por otro lado es fácil comprobar que

$$ABC = \lim_{s \rightarrow 0} c(s) = \lim_{s \rightarrow 0} \frac{X_0}{V_1} \frac{s + k_{22}}{(s + I_1) \cdot (s + I_2)} = \frac{X_0}{V_1} \frac{k_{22}}{I_1 \cdot I_2} \quad 4.50$$

$$\int_0^{\infty} t \cdot c(t) \cdot dt = - \lim_{s \rightarrow 0} \frac{dc(s)}{ds} = \frac{X_0}{V_1} \frac{k_{22}}{I_1 \cdot I_2} \left(\frac{1}{I_1} + \frac{1}{I_2} - 1 \right) \quad 4.51$$

$$\bar{t} = \frac{I_1 + I_2}{I_1 \cdot I_2} \frac{1}{k_{22}} \quad 4.52$$

4.4.3.- INTERPRETACIÓN DE LAS CURVAS EXPERIMENTALES

Tal como apuntamos al principio de este capítulo, la principal dificultad en la interpretación y estimación de los parámetros del modelo estriba en definir adecuadamente una función de entrada $I(t)$ para resolver el sistema de ecuaciones diferenciales 4.34. La solución que adoptamos finalmente se basa en los siguientes puntos.

1. Definir $R_{\text{sis}}(t)$ (ver ecuación 4.32) mediante una función de interpolación basada en el *splin* cúbico; este método está disponible en el programa Mathematica[®] mediante la función `Interpolation[]`.
2. Obtener la curva teórica a la salida del sistema mediante la convolución numérica de $R_{\text{sis}}(t)$ y la función de disposición hepática.

4.4.3.1.- CONVOLUCIÓN NUMÉRICA

La convolución de las funciones $F(t)$ y $G(t)$ viene dada por la integral

$$F(t) \cdot G(t) = \int_0^t F(\mathbf{t}) \cdot G(t - \mathbf{t}) \cdot d\mathbf{t} \quad 4.53$$

Sean F_0, F_1, \dots, F_{n-1} , y G_0, G_1, \dots, G_{n-1} , n valores de ambas funciones para los valores de tiempo $0, h, 2 \cdot h, \dots, (n-1) \cdot h$, donde h es el incremento de tiempo entre dos puntos sucesivos. La resolución numérica de la integral anterior, utilizando la regla de Simpson, puede expresarse en la forma:

$$F(t) \cdot F(t) = h \left(\frac{1}{2} (F_0 \cdot G_{n-1} + F_{n-1} \cdot G_0) + \sum_{j=1}^{n-2} F_j \cdot G_{n-1-j} \right) \quad 4.54$$

El cuadro 4.7 muestra la función Mathematica[®] desarrollada para implementar este procedimiento. Obsérvese que los dos primeros argumentos corresponden a las expresiones simbólicas de las funciones F(t) y G(t), y el tercero el nombre de la variable sobre la que se desea llevar a cabo la integración; el cuarto argumento es el valor de t. El último argumento determina el número de puntos utilizados, de forma que es posible controlar en todo momento la precisión con que se obtiene la integral.

4.4.3.2.- FUNCIÓN DE ENTRADA DEL SISTEMA

El cuadro 4.7 muestra el código Mathematica[®] utilizado para definir la función de entrada del sistema de inyección. La única particularidad reseñable es la extrapolación de los datos experimentales para evitar la truncación de la función de entrada. Obsérvese que como en todos los experimentos, las unidades de actividad son cpm·10⁻⁶, y de actividad por unidad de volumen cpm·10⁻⁶/ml.

```
NumericalConvolution[fone_, ftwo_,
x_, xf_, stage_Integer] :=
Module[
{n, xt, hx,
s1 = {}, s2 = {}, e1 = {}, e2 = {}},
n = 2^(stage-1) + 1;
hx = xf/n;
xt = Table[z, {z, 0, xf, hx}];
s1 = fone /. x -> Take[xt, {2, -2}];
s2 = ftwo /. x -> xf - Take[xt, {2, -2}];
e1 = 0.5 fone /. x -> Drop[xt, {2, -2}];
e2 = 0.5 ftwo /. x -> xf - Drop[xt, {2, -2}];
hx (Apply[Plus, e1 e2] + Apply[Plus, s1 s2])]
```

Cuadro 4.7.- Código Mathematica[®] para la convolución numérica de dos funciones.

```

(* datos del experimento *)
flujo = 0.07;      (* flujo en ml/s *)
vmuestra = 0.1;   (* volumen de muestra, ml *)
inline = OpenRead["c:/archivo/AAD/nano/sistema.txt"];
datos = ReadList[inline, {Number, Number}];
Close[inline];
(*      cálculo de las actividades normalizados
dosis expresada en 10^6 cpm;
actividad expresada en 10^6 cpm /ml *)
act = Transpose[{Transpose[datos][[1]],
  Transpose[datos][[2]] / (vmuestra 1000000.)}];
(* cálculo de la dosis inyectada, x 10^-6 cpm *)
dosis = flujo ListIntegrate[act];
(* funcion de entrada del sistema, definida para
una dosis igual a 1 *)
(* extrapolación hasta 600 s *)
cola = Take[act, {-15, -1}];
cola = Transpose[{Transpose[cola][[1]],
  Log[ Transpose[cola][[2]] ] }];
fc = Fit[cola, {1, x}, x];
predcola = Table[{x, Exp[fc]}, {x, 200, 600, 20}];
(* para visualizar los datos utilizados para definir fsys
ejecutar:
LinearLogListPlot[Join[act, predcola] ]; *)
fsys[t_] = flujo / dosis Interpolation[Join[act, predcola] ][t];

```

Cuadro 4.8.- Código Mathematica® para la definición de la función de transferencia del sistema.

```
ghepa[t_, V1_, L1_, L2_, k22_] := ((L1 - k22) Exp[- L1 t] +(k22 - L22) Exp[- L2  
t])/(V1 (L1 - L2))
```

Cuadro 4.9.- Código Mathematica® para el modelo hepático de tres compartimentos.

4.4.4.- RESULTADOS DE LA PERFUSIÓN HEPÁTICA

La tabla 4.12 muestra los parámetros identificables y estimables a partir de las curvas de actividad – tiempo a la salida del compartimento vascular (V_1 , λ_1 , λ_2 y k_{22}), estimados para cada experimento, junto con los dos parámetros identificables pero no estimables (k_{11} y γ_2), calculados a partir de aquellos. Los valores medios y desviaciones típicas se recogen en la tabla 4.13, y las matrices de correlación entre experimentos en las tablas 4.14 a la 4.16. En general, los ajustes fueron muy satisfactorio (ver figuras 4.7-4.9).

Nanoesfera	fichero	V. ₁ (ml)	I. ₁ (s ⁻¹)	I. ₂ (s ⁻¹)	k. ₂₂ (s ⁻¹)	k. ₁₁ (s ⁻¹)	g. ₂ (s ⁻²)
PLGA	nano1.txt	0.50	0.120	0.0010	0.00105	0.1200	5.95E-06
PLGA	nano1.txt	0.50	0.160	0.0005	0.00054	0.1600	6.38E-06
PLGA	nano2.txt	0.90	0.070	0.0110	0.01200	0.0690	5.80E-05
PLGA	nano2.txt	0.90	0.080	0.0020	0.00210	0.0799	7.79E-06
PLGA	nano5.txt	0.70	0.100	0.0060	0.00620	0.0998	1.88E-05
PLGA	nano5.txt	0.70	0.100	0.0060	0.00620	0.0998	1.88E-05
PLGA	nano7.txt	0.70	0.110	0.0045	0.00480	0.1097	3.16E-05
PLGA	nano7.txt	0.50	0.130	0.0040	0.00420	0.1298	2.52E-05
PEG-PLGA	nano3.txt	0.50	0.110	0.0060	0.00620	0.1098	2.08E-05
PEG-PLGA	nano3.txt	0.50	0.120	0.0060	0.00620	0.1198	2.28E-05
PEG-PLGA	nano3.txt	0.50	0.120	0.0037	0.00385	0.1199	1.74E-05
PEG-PLGA	nano4.txt	0.80	0.080	0.0040	0.00410	0.0799	7.59E-06
PEG-PLGA	nano4.txt	0.80	0.080	0.0050	0.00550	0.0795	3.73E-05
PEG-PLGA	nano6.txt	0.50	0.120	0.0060	0.00615	0.1199	1.71E-05
PEG-PLGA	nano6.txt	0.50	0.140	0.0055	0.00565	0.1399	2.02E-05
PEG-PLGA	nano6.txt	0.40	0.170	0.0080	0.00870	0.1693	1.13E-04
PEG-PLGA	nano9.txt	0.50	0.140	0.0040	0.00420	0.1398	2.72E-05
PEG-PLGA	nano9.txt	0.50	0.130	0.0050	0.00515	0.1299	1.87E-05
mPEG-PLGA	nano10.txt	0.50	0.170	0.0060	0.00625	0.1698	4.09E-05
mPEG-PLGA	nano10.txt	0.50	0.170	0.0030	0.00315	0.1699	2.50E-05
mPEG-PLGA	nano10.txt	0.45	0.170	0.0030	0.00310	0.1699	1.67E-05
mPEG-PLGA	nano10.txt	0.40	0.170	0.0045	0.00460	0.1699	1.65E-05
mPEG-PLGA	nano11.txt	0.40	0.150	0.0045	0.00465	0.1499	2.18E-05
mPEG-PLGA	nano11.txt	0.40	0.150	0.0045	0.00465	0.1499	2.18E-05
mPEG-PLGA	nano11.txt	0.33	0.180	0.0050	0.00510	0.1799	1.75E-05
mPEG-PLGA	nano11.txt	0.50	0.100	0.0045	0.00460	0.0999	9.54E-06

Tabla 4.12.- Estimadas individuales de los parámetros identificables del modelo propuesto para cada experimento.

	Parámetros	$V_{.1}(\text{ml})$	$l_{.1}(\text{s}^{-1})$	$l_{.2}(\text{s}^{-1})$	$k_{.22}(\text{s}^{-1})$	$k_{.11}(\text{s}^{-1})$	$g_{.2}(\text{s}^{-2})$
PLGA	Media	0.733	0.09833	0.00558	0.00592	0.09800	2.67E-05
	Desv. típica	0.151	0.0214	0.00304	0.00334	0.02156	0.00002
PEG-PLGA	Media	0.550	0.1210	0.00532	0.00557	0.12075	3.02E-05
	Desv. típica	0.135	0.0273	0.00129	0.00142	0.02720	0.00003
mPEG-PLGA	Media	0.435	0.1575	0.00438	0.00451	0.15736	2.12E-05
	Desv. típica	0.0628	0.0255	0.00099	0.00102	0.02549	0.00001

Tabla 4.13.- La media y la desviación típica de los parámetros identificables para cada tipo de nanoesferas estudiadas.

		PLGA					
	$V_{.1}(\text{ml})$	$l_{.1}(\text{s}^{-1})$	$l_{.2}(\text{s}^{-1})$	$k_{.22}(\text{s}^{-1})$	$k_{.11}(\text{s}^{-1})$	$g_{.2}(\text{s}^{-2})$	
$V_{.1}(\text{ml})$	1.000						
$l_{.1}(\text{s}^{-1})$	-0.974	1.000					
$l_{.2}(\text{s}^{-1})$	0.299	-0.459	1.000				
$k_{.22}$	0.316	-0.472	0.999	1.000			
$k_{.11}$	-0.972	1.000	-0.469	-0.483	1.000		
$g_{.2}(\text{s}^{-2})$	0.215	-0.303	0.869	0.885	-0.315	1.000	

Tabla 4.14.- Correlación entre los parámetros estimados empleando el modelo propuesto para las nanoesferas de PLGA.

PEG-PLGA						
	$V_{.1}(\text{ml})$	$l_{.1}(\text{s}^{-1})$	$l_{.2}(\text{s}^{-1})$	$k_{.22}(\text{s}^{-1})$	$k_{.11}(\text{s}^{-1})$	$g_{.2}(\text{s}^{-2})$
$V_{.1}(\text{ml})$	1.000					
$l_{.1}(\text{s}^{-1})$	-0.888	1.000				
$l_{.2}(\text{s}^{-1})$	-0.484	0.528	1.000			
$k_{.22}(\text{s}^{-1})$	-0.448	0.522	0.995	1.000		
$k_{.11}(\text{s}^{-1})$	-0.889	1.000	0.525	0.518	1.000	
$g_{.2}(\text{s}^{-2})$	-0.353	0.607	0.734	0.791	0.602	1.000

Tabla 4.15.- Correlación entre los parámetros estimados empleando el modelo propuesto para las nanoesferas de PEG-PLGA.

mPEG-PLGA						
	$V_{.1}(\text{ml})$	$l_{.1}(\text{s}^{-1})$	$l_{.2}(\text{s}^{-1})$	$k_{.22}(\text{s}^{-1})$	$k_{.11}(\text{s}^{-1})$	$g_{.2}(\text{s}^{-2})$
$V_{.1}(\text{ml})$	1.000					
$l_{.1}(\text{s}^{-1})$	-0.375	1.000				
$l_{.2}(\text{s}^{-1})$	-0.172	-0.042	1.000			
$k_{.22}$	-0.146	-0.032	0.999	1.000		
$k_{.11}$	-0.376	1.000	-0.043	-0.033	1.000	
$g_{.2}(\text{s}^{-2})$	0.300	0.460	0.450	0.486	0.458	1.000

Tabla 4.16.- Correlación entre los parámetros estimados empleando el modelo propuesto para las nanoesferas de mPEG-PLGA.

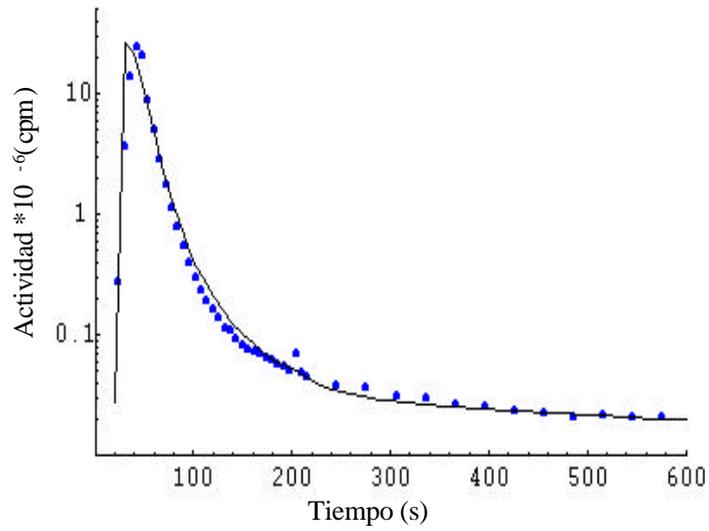


Figura 4.7.- Datos experimentales ajustados al modelo propuesto para las nanoesferas de PLGA.

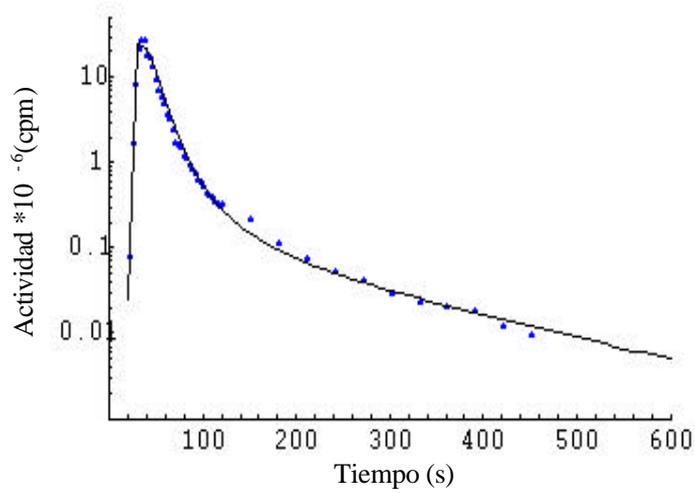


Figura 4.8.- Datos experimentales ajustados al modelo propuesto para las nanoesferas de PEG-PLGA.

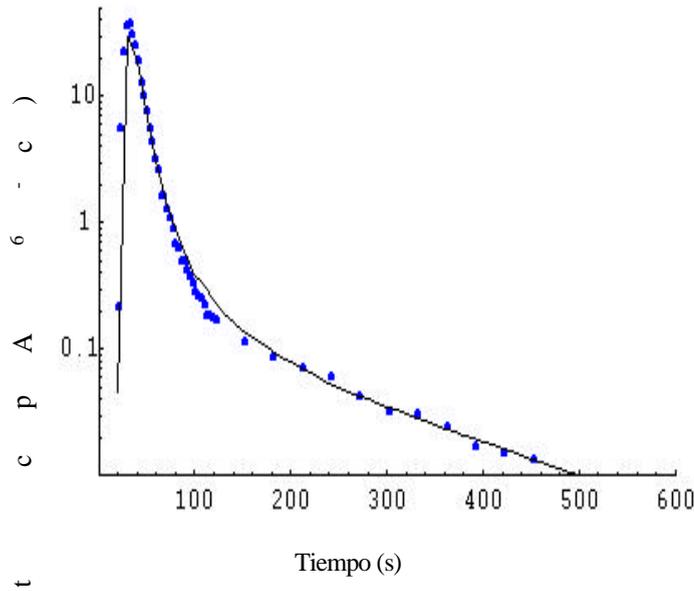


Figura 4.9.- Datos experimentales ajustados al modelo propuesto para las nanoesferas de mPEG-PLGA.

La identificabilidad completa del modelo depende, tal como expusimos anteriormente, de la posibilidad, al menos teórica, de la estimación de k_{10} a partir del flujo del líquido de perfusión y del volumen del compartimento sinusoidal. Sin embargo, al aplicar este criterio nos encontramos que en algunos de los experimentos, el valor así estimado es superior a k_{11} . Esta contradicción puede ser debida a los siguientes motivos. Primero, es fácilmente demostrable que $\lambda_1 > k_{22} > \lambda_2$; sin embargo, en todos los experimentos, la diferencia entre k_{22} y λ_2 es muy pequeña, entre 10^{-3} y 10^{-4} s^{-1} , debido al paso rápido del compartimento 1 al 2, lo que se traduce en un coeficiente de correlación elevado (ver tablas 4.14-4.16) y en un aumento del error de estimación. Segundo, que el compartimento 1 no se comporte como un tanque de mezcla perfecta, y la concentración a la salida sea en realidad menor que la concentración media en el compartimento 1.

Respecto a los parámetros identificables, es significativa la reducción del volumen del espacio sinusoidal tanto del PEG – PLGA como del mPEG – PLGA respecto del PLGA, así como un aumento de λ_1 , observación que no obstante debemos matizar debido a que el coeficiente de correlación entre ambos parámetros se encuentra próximo a -1 tanto para el PLGA como para el PEG – PLGA.

Otra vía alternativa para el análisis de los resultados es utilizar los tiempos medios de residencia. Tal como demostramos en el apartado dedicado al modelo teórico, tanto el área bajo la curva de actividad –tiempo normalizada (asumiendo $X_0 = 1.0$) como el tiempo medio de residencia pueden calcularse a partir de las combinaciones de parámetros estimables. Las medias y desviaciones típicas de los valores se muestran en la tabla 4.17; la figura 4.10 muestra los valores individuales para cada tipo de nanoesferas junto con los valores medios.

Nanoesfera	Parámetros	ABC	TMR (s)	$1/k_{22}(s)$
PLGA	Valor medio	15.24	21.9	170.5
	Desv. típica	1.262	7.7	58.7
PEG – PLGA	Valor medio	16.52	16.9	189.4
	Desv. típica	1.237	5.5	45.1
mPEG – PLGA	Valor medio	15.65	14.2	232.6
	Desv. típica	2.869	3.80	57.2

Tabla 4.17.- Valores medios y desviaciones típicas de Area bajo la curva (ABC), tiempo medio de residencia (TMR) e inversa de la constante de velocidad de pérdida del compartimento 2 ($1/k_{22}$), calculadas a partir de los parámetros estimables del modelo.

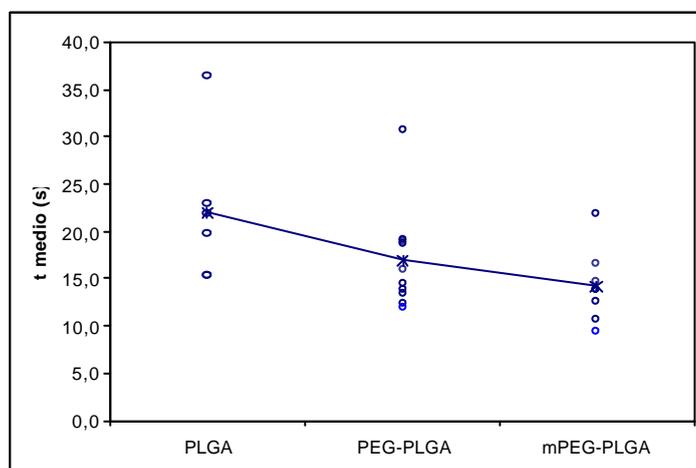


Figura 4.10.-Tiempo medio de residencia calculado a partir de los parámetros estimados para las nanoesferas.

Es de destacar la notable reducción en el tiempo medio de residencia del PEG – PLGA, y especialmente del mPEG – PLGA, respecto del PLGA, sin que se hayan modificado las áreas normalizadas. Por otro lado, y según vimos en el apartado dedicado a los momentos estadístico, el tiempo medio de residencia puede descomponerse en dos términos, $(\lambda_1 + \lambda_2)/(\lambda_1 \cdot \lambda_2)$ y $1/k_{22}$. Este último es el tiempo medio del compartimento 2 de fijación reversible; la media y desviación típica de los valores calculados se encuentran así mismo en la tabla 4.17, excluyendo el experimento PLGA2-b, debido al valor enormemente alto obtenido (476,2 s). Obsérvese los valores medios de $1/k_{22}$ se ordenan de la misma forma que el tiempo medio de transferencia intrahepático (PLGA < PEG – PLGA < mPEG – PLGA), mientras que los tiempos medios de residencia globales y las tasas de extracción se ordenan en orden inverso (PLGA > PEG – PLGA > mPEG – PLGA). Estos datos nos permiten concluir lo siguiente:

Primero, el menor tiempo de residencia de las nanoesferas preparadas a partir de los polímeros derivados del PEG se debe fundamentalmente a una reducción del tiempo medio en el espacio sinusoidal.

Segundo, el tiempo medio de residencia en el compartimento de fijación reversible es mayor para las nanoesferas elaboradas con los polímeros derivados del PEG. Al no aumentar la tasa de extracción, hemos de aceptar que el proceso de paso al compartimento 3 de acumulación está parcialmente limitado por la presencia del PEG.

ANEXO

1.- CURVAS DE LAS NANOPARTÍCULAS Y GR A LA SALIDA DEL INYECTOR

t(s)	Actividad cpm		
	nano-PLGA1	nano-PLGA2	nano-PLGA3
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	543575	118515	434795
6	4938927	3171149	4150555
7	4877983	4651909	4160399
8	4064469	4064915	4010835
9	2541855	2781693	2532307
10	2060041	2168745	2068747
11	1251541	1295041	1453277
12	898127	928701	1024615
13	723605	752369	83967
14	473791	443485	439575
15	450705	401217	406575
16	319391	304647	302325
17	227459	220259	223269
18	194573	196969	201755
19	125445	155747	128197
20	111923	106515	116511
21	78231	105511	112475
22	76211	84431	75591
23	74043	52907	74027
24	59997	45011	65075
25	53807	43787	48979
23	36845	27423	41741
27	34365	27223	40411
28	26729	24003	36967
29	23353	21759	25797
30	13791	16597	20543
31	14623	15237	14503
32	15979	13737	13131
33	11865	18039	11179
34	13261	10685	12456
35	8351	10183	15433
36	9487	11471	7879
37	9875	8562	9197
38	9677	7568	10255
39	6817	8563	8155
40	7521	6859	8423
41	0	0	0

Tabla 4.18.- Actividades (cpm) medidas a la entrada del hígado tras la inyección de 100 μ l de una suspensión de nanoesferas de ^{99m}Tc -PLGA (nano-PLGA).

t(s)	Actividad (cpm)	
	nano-PEG-PLGA1	nano-PEG-PLGA2
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	69965	17393
6	741153	1204461
7	2002757	2547049
8	2557599	2100577
9	1959031	1419301
10	1322335	1268273
11	915185	718519
12	889921	632145
13	707035	426737
14	642405	298149
15	385939	306259
16	341807	174913
17	304825	132089
18	200919	99593
19	182567	62081
20	113919	52157
21	123759	48695
22	75571	46723
23	64979	36815
24	84463	27903
25	52499	28825
26	42895	17901
27	39825	17111
28	34449	15652
29	25501	13125
30	25091	12003
31	11997	11587
32	15499	10779
33	9652	5877
34	7061	6359
35	10875	8779
36	8143	6227
37	11161	4385
38	10236	3871
39	9649	5698
40	8563	2661
41	3256	2569
42	0	0

Tabla 4.19.- Actividades (cpm) medidas a la entrada del hígado tras la inyección de 100 μ l de una suspensión de nanoesferas de ^{99m}Tc -PEG-PLGA (nano-PEG-PLGA).

t(s)	Actividad (cpm)	
	nano-mPEG-PLGA1	nano-mPEG-PLGA2
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	5779	2999
6	498555	972315
7	3166303	2907053
8	3668739	2867163
9	3006677	2328065
10	2584319	1819009
11	1625549	1346435
12	1492325	948021
13	980309	611285
14	392383	560147
15	155783	331951
16	108691	247855
17	54453	209763
18	47933	169937
19	34941	144417
20	24705	80335
21	21663	82189
22	18515	63541
23	16325	59363
24	15147	34679
25	13111	37817
26	9171	24963
27	10747	21125
28	9157	24687
29	8569	14945
30	8331	14937
31	9211	21363
32	6087	12663
33	4777	12173
34	3757	9951
35	3693	9929
36	3087	7345
37	3281	10399
38	2533	8491
39	4785	5309
40	3327	5493
41	0	0
42	0	0

Tabla 4.20- Actividades (cpm) medidas a la entrada del hígado tras la inyección de 100 μ l de una suspensión de nanoesferas de ^{99m}Tc -mPEG-PLGA (nano-mPEG-PLGA).

t(s)	Actividad (cpm)			
	GR1	GR2	GR3	GR4
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	896
6	3362	9576	9852	10790
7	13864	15078	15814	14622
8	8644	11282	11560	11502
9	6900	8614	7618	8028
10	5124	5038	4776	6852
11	4178	3568	3556	5366
12	3196	2914	2672	3392
13	2300	2368	1720	2756
14	1536	1418	1500	1804
15	1280	1146	1338	1782
16	1208	928	1125	1316
17	1006	792	852	964
18	856	728	640	865
19	624	626	578	638
20	574	526	524	568
21	563	470	482	542
22	512	460	408	460
23	460	414	300	378
24	346	376	362	400
25	360	332	404	404
26	388	262	292	266
27	310	264	252	182
28	288	274	230	304
29	250	252	274	214
30	304	232	216	216
31	252	206	253	280
32	198	268	200	228
33	200	186	145	192
34	186	0	0	188
35	0	0	0	164
36	0	0	0	0
37	0	0	0	0

Tabla 4.21- Actividades (cpm) medidas a la entrada del hígado tras la inyección de 100 μ l de una suspensión de $^{51}\text{Cr-GR}$.

2.- CURVAS DE LAS NANOPARTÍCULAS Y GR A LA SALIDA DEL HÍGADO

t(s)	<u>Rata1</u>		<u>Rata2</u>	
	Actividad (cpm)		Actividad (cpm)	
	nano-PLGA	GR	nano-PLGA	GR
0-15	0	0	0	0
18	0	150	0	224
21	-	436	-	1042
24	27449	1842	101263	2426
27	-	3066	-	3630
30	370675	3578	669323	4212
33	-	3622	-	4272
36	1370675	3240	1046962	3918
39	-	2968	-	3806
42	2407951	2632	2156241	3276
45	-	2392	-	2656
48	2115935	2014	1856321	2532
51	-	1742	-	2040
54	898063	1654	789652	1794
57	-	1390	-	1530
60	498659	1178	321547	1372
63	-	1186	-	1190
66	290187	1066	137413	1074
69	-	992	-	1036
72	177733	980	88779	866
75	-	942	-	768
78	113167	858	62503	738
81	-	810	-	734
84	78127	710	47147	646
87	-	758	-	630
90	54529	548	34977	532
93	-	600	-	606
96	39105	423	33941	486
99	-	198	-	321
102	29701	203	19745	230
105	-	0	-	0
108	23727	0	13463	0
111	-	0	-	0
114	19115	0	12931	0
117	-	0	-	0
120	16427	0	12581	0
123	-	0	-	0
153	14045	0	10071	0
183	11335	0	8997	0
213	10903	0	8359	0
243	9383	0	7513	0
273	8263	0	6633	0
303	7573	0	5209	0
333	7305	0	3881	0
363	5463	0	3641	0
393	6231	0	3449	0
423	4215	0	3481	0
453-663	0	0	0	0

Tabla 4.22.- Actividades (cpm) medidas a la salida del hígado perfundido tras la inyección de 100 μ l de una suspensión de $^{51}\text{Cr-GR}$ y de 100 μ l de una suspensión de nanoesferas de $^{99\text{m}}\text{Tc-PLGA}$ (nano-PLGA) después del correspondiente lavado del hígado. Lotes PLGA-2 y GR-1. Las fracciones desde el tiempo 0 hasta los 123 segundos se recogieron cada 6 segundos y a partir de ese tiempo hasta los 663 segundos se recogieron cada 30 segundos. Para los GR, las fracciones se recogieron siempre cada 3 segundos.

t(s)	Rata1		Rata2	
	Actividad (cpm)		Actividad (cpm)	
	nano-PLGA	GR	nano-PLGA	GR
0-15	0	0	0	0
18	0	0	0	622
21	-	563	-	1838
24	2979	1010	0	3766
27	-	2956	-	4632
30	27293	4056	9632	5074
33	-	4610	-	5028
36	47263	4750	98546	4156
39	-	4228	-	3044
42	102693	3566	109143	3246
45	-	2778	-	2510
48	96321	2376	95631	2408
51	-	2400	-	2150
54	65841	1936	75652	1650
57	-	1066	-	1608
60	60405	1596	46540	1390
63	-	1482	-	1282
66	46981	1210	28910	1162
69	-	1112	-	1046
72	35681	950	9856	826
75	-	940	-	926
78	29777	808	8521	844
81	-	720	-	734
84	18561	660	7800	660
87	-	422	-	630
90	14952	508	6952	626
93	-	416	-	542
96	13990	296	6423	518
99	-	159	-	452
102	11352	0	5820	325
105	-	0	-	189
108	10457	0	4963	0
111	-	0	-	0
114	7490	0	3562	0
117	-	0	-	0
120	6392	0	3001	0
123	-	0	-	0
153	5914	0	1569	0
183	5032	0	1004	0
213	4578	0	965	0
243	5236	0	900	0
273	3495	0	856	0
303	3033	0	800	0
333	2753	0	789	0
363	1932	0	695	0
393	1006	0	473	0
423	963	0	459	0
453-663	0	0	0	0

Tabla 4.23.- Actividades (cpm) medidas a la salida del hígado perfundido tras la inyección de 100 μ l de una suspensión de $^{51}\text{Cr-GR}$ y de 100 μ l de una suspensión de nanoesferas de $^{99\text{m}}\text{Tc-PLGA}$ (nano-PLGA) después del correspondiente lavado del hígado. Lotes PLGA-3 y GR-1. Las fracciones desde el tiempo 0 hasta los 123 segundos se recogieron cada 6 segundos y a partir de ese tiempo hasta los 663 segundos se recogieron cada 30 segundos. Para los GR, las fracciones se recogieron siempre cada 3 segundos.

t(s)	Rata1		Rata2	
	Actividad (cpm)		Actividad (cpm)	
	nano-PLGA	GR	nano-PLGA	GR
0-15	0	0	0	0
18	0	590	0	0
21	0	1558	0	486
24	4237	3386	2637	1340
27	26347	4538	30381	2000
30	242853	6286	400407	3242
33	557553	5042	872341	3524
36	831411	4862	1911241	4838
39	945799	4634	2046839	5006
42	1478181	4538	1428317	6542
45	1531021	4488	1402725	4462
48	2870599	3036	1280405	4374
51	1467197	2930	1048267	3174
54	1399355	2710	844445	2536
57	1279511	2396	688681	2228
60	1164135	1352	576959	2390
63	801185	1584	486895	1976
66	691091	1622	409145	1580
69	379381	1432	349121	1128
72	348467	1122	299425	1023
75	305357	906	258335	989
78	245967	932	221533	853
81	220889	704	173299	789
84	158977	678	152945	542
87	132531	704	143555	674
90	124317	568	125405	594
93	74391	474	116093	410
96	39357	574	106155	765
99	38101	370	93898	660
102	38083	384	96875	315
105	33237	338	55291	298
108	29985	260	28555	189
111	24799	189	19707	0
114	21693	0	16551	0
117	17721	0	16079	0
120	16283	0	14311	0
123	15632	0	11777	0
153	10023	0	9345	0
183	9874	0	4941	0
213	9563	0	6955	0
243	7512	0	5632	0
273	4222	0	6523	0
303	3256	0	3256	0
333	2985	0	1563	0
363	2000	0	1000	0
393	1985	0	0	0
423	885	0	0	0
453-663	0	0	0	0

Tabla 4.24.- Actividades (cpm) medidas a la salida del hígado perfundido tras la inyección de 100 μ l de una suspensión de $^{51}\text{Cr-GR}$ y de 100 μ l de una suspensión de nanoesferas de $^{99\text{m}}\text{Tc-PLGA}$ (nano-PLGA) después del correspondiente lavado del hígado. Lotes PLGA-4 y GR-2. Las fracciones desde el tiempo 0 hasta los 123 segundos se recogieron cada 3 segundos y a partir de ese tiempo hasta los 663 segundos se recogieron cada 30 segundos. Para los GR, las fracciones se recogieron siempre cada 3 segundos.

t(s)	Rata1 Actividad (cpm)		Rata2 Actividad (cpm)	
	nano-PLGA	GR	nano-PLGA	GR
0-15	0	0	0	0
18	0	858	0	228
21	2659	2946	0	1294
24	147143	7541	15787	6712
27	890663	12657	265069	15623
30	1594401	11562	1287615	14900
33	1806277	10523	1979329	10032
36	1494015	8954	2004053	9664
39	1411075	7896	1923139	6019
42	1080365	6564	1516803	5848
45	787391	4792	1226671	4236
48	665477	4972	915941	2726
51	504041	3354	705987	2726
54	392981	2946	537091	3430
57	311493	2114	265463	1672
60	235689	1798	247875	1304
63	197621	1378	197991	1274
66	161489	1328	183983	1082
69	128477	1178	149085	612
72	110643	1036	134741	844
75	88933	962	108621	536
78	81083	730	85433	626
81	58701	666	72457	484
84	57173	658	64019	334
87	52615	634	45779	494
90	49605	482	42313	308
93	48425	522	38993	282
96	39469	448	34967	414
99	33047	418	30235	290
102	29273	390	28403	334
105	27027	185	24757	246
108	25291	0	22143	0
111	21965	0	19735	0
114	24723	0	18375	0
117	22515	0	17643	0
120	18073	0	15739	0
123	16943	0	12743	0
153	10713	0	9527	0
183	7997	0	7677	0
213	7457	0	5695	0
243	5991	0	5347	0
273	5531	0	4621	0
303	4779	0	4037	0
333	3713	0	2861	0
363	2677	0	2213	0
393	2307	0	1855	0
423	1747	0	1597	0
453-663	0	0	0	0

Tabla 4.25.- Actividades (cpm) medidas a la salida del hígado perfundido tras la inyección de 100 μ l de una suspensión de $^{51}\text{Cr-GR}$ y de 100 μ l de una suspensión de nanoesferas de $^{99\text{m}}\text{Tc-PLGA}$ (nano-PLGA) después del correspondiente lavado del hígado. Lotes PLGA-5 y GR-3. Las fracciones desde el tiempo 0 hasta los 123 segundos se recogieron cada 3 segundos y a partir de ese tiempo hasta los 663 segundos se recogieron cada 30 segundos. Para los GR, las fracciones se recogieron siempre cada 3 segundos.

t(s)	Rata1		Rata2		Rata3	
	Actividad (cpm)		Actividad (cpm)		Actividad (cpm)	
	nano-PEG-PLGA	GR	nano-PEG-PLGA	GR	nano-PEG-PLGA	GR
0-15	0	0	0	0	0	0
18	0	394	0	540	0	494
21	0	1846	5549	1214	0	3150
24	7649	4976	38053	4766	3125	8772
27	163855	8088	372443	8400	94705	11562
30	798877	9306	1176183	9652	569427	11206
33	2032017	9964	1693645	7826	1360821	9208
36	2592901	8306	1949769	7040	1812955	6186
39	2615827	6740	1836979	6016	1811685	5884
42	1706155	5460	1592901	5170	1667435	3186
45	1693001	4538	1183285	3622	1262253	3210
48	1297161	3462	909821	2868	1085739	2470
51	937189	2750	620975	2286	884459	1896
54	678021	2290	576111	1846	661469	1382
57	555399	1844	417913	1468	519509	1264
60	475839	1322	339463	1158	399449	910
63	351561	1098	275263	798	255421	772
66	311751	1036	217117	776	227627	692
69	233291	840	177309	716	201889	472
72	164415	758	137459	560	163115	536
75	157127	656	117481	434	111393	366
78	145159	530	105447	418	98467	428
81	117089	516	85661	398	83227	394
84	109199	512	78541	370	76127	352
87	90615	416	65361	320	70513	266
90	80815	398	57053	290	61761	248
93	71393	368	54635	254	55789	162
96	61283	244	49995	174	51383	0
99	58173	348	43343	0	43877	0
102	49715	290	37455	0	37697	0
105	43565	286	35321	0	30893	0
108	39375	242	31485	0	32703	0
111	37809	260	26103	0	30243	0
114	33825	238	27391	0	28539	0
117	31509	210	23703	0	25153	0
120	30297	192	23117	0	25975	0
123	31509	212	16237	0	17629	0
153	20845	170	9453	0	9327	0
183	11243	0	5951	0	6283	0
213	7531	0	4243	0	4655	0
243	5231	0	3357	0	3969	0
273	4071	0	2529	0	3613	0
303	2883	0	2015	0	3173	0
333	2271	0	1797	0	2643	0
363	2003	0	1587	0	2253	0
393	1759	0	1985	0	2091	0
423	1189	0	885	0	1665	0
453	913	0	0	0	986	0
483-663	0	0	0	0	0	0

Tabla 4.26.- Actividades (cpm) medidas a la salida del hígado perfundido tras la inyección de 100 μ l de una suspensión de $^{51}\text{Cr-GR}$ y de 100 μ l de una suspensión de nanoesferas de $^{99\text{m}}\text{Tc-PEG-PLGA}$ (nano-PEG-PLGA) después del correspondiente lavado del hígado. Lotes PEG-PLGA-2 y GR-4.

Las fracciones desde el tiempo 0 hasta los 123 segundos se recogieron cada 3 segundos y a partir de ese tiempo hasta los 663 segundos se recogieron cada 30 segundos. Para los GR, las fracciones se recogieron siempre cada 3 segundos.

t(s)	<u>Rata1</u> Actividad (cpm)		<u>Rata2</u> Actividad (cpm)	
	nano-PEG-PLGA	GR	nano-PEG-PLGA	GR
0-15	0	0	0	0
18	0	126	0	116
21	0	2406	0	282
27	4087	4268	15663	948
30	148995	10662	74993	1652
33	761899	8524	214301	4182
36	1429751	7142	489681	5838
39	1661067	6166	701765	8224
42	1441559	4926	1036221	8438
45	1137897	3484	1250835	7848
48	968113	2966	1367179	7240
51	890143	2270	1348845	6164
54	744075	1934	1308275	4328
57	642431	1584	1211675	4474
60	539563	1030	1116133	3766
63	430163	1056	929735	3098
66	389181	918	705951	2180
69	351869	626	576355	2506
72	314779	466	409216	1542
75	264873	522	337256	1728
78	228575	422	285814	1300
81	207281	400	250361	970
84	195977	346	220311	840
87	171559	338	198253	852
90	163893	310	156230	658
93	156649	228	123654	746
96	143047	158	100321	466
99	120785	0	88159	396
102	119645	0	73215	195
105	108271	0	52361	0
108	110119	0	23654	0
111	74197	0	20357	0
114	44199	0	12365	0
117	24435	0	9563	0
120	17827	0	7512	0
123	8393	0	4222	0
153	5953	0	3256	0
183	2549	0	2985	0
213	3801	0	2000	0
243	3265	0	1985	0
273	3003	0	885	0
303	2563	0	901	0
333	2930	0	758	0
363	2000	0	0	0
393	1563	0	0	0
423	1000	0	0	0
453-663	0	0	0	0

Tabla 4.27.- Actividades (cpm) medidas a la salida del hígado perfundido tras la inyección de 100 μ l de una suspensión de $^{51}\text{Cr-GR}$ y de 100 μ l de una suspensión de nanoesferas de $^{99\text{m}}\text{Tc-PEG-PLGA}$ (nano-PEG-PLGA) después del correspondiente lavado del hígado. Lotes PEG-PLGA-3 y GR-5.

Las fracciones desde el tiempo 0 hasta los 123 segundos se recogieron cada 3 segundos y a partir de ese tiempo hasta los 663 segundos se recogieron cada 30 segundos. Para los GR, las fracciones se recogieron siempre cada 3 segundos.

t(s)	Rata1		Rata2		Rata3	
	Actividad (cpm)		Actividad (cpm)		Actividad (cpm)	
	nano-PEG-PLGA	GR	nano-PEG-PLGA	GR	nano-PEG-PLGA	GR
0-15	0	0	0	0	0	0
18	0	822	0	540	0	474
21	253	3508	95005	2222	0	3030
24	13365	6702	816849	5764	3125	8090
27	447263	9956	2262933	8440	94705	8608
30	2041669	10258	2924997	6256	569427	7924
33	3204029	7388	2734179	5718	1360821	7112
36	3128195	7298	2594109	4328	1812955	6024
39	3025493	5706	2256637	3286	1811685	4984
42	2545335	4608	1562321	2452	1667435	4218
45	1714743	4434	1143641	2108	1262253	3374
48	1456281	2578	733061	1726	1085739	3050
51	1112455	2994	564719	1822	884459	2150
54	845213	2170	469241	928	661469	1852
57	629889	1908	392563	888	519509	1140
60	405149	1524	381581	770	399449	1134
63	287331	1242	242757	776	255421	936
66	263353	1164	192697	646	227627	866
69	242727	854	142073	670	201889	722
72	198627	788	109299	554	163115	696
75	129505	798	104081	554	111393	512
78	85879	600	85757	424	98467	440
81	119957	524	82187	408	83227	432
84	92693	498	68879	384	76127	396
87	67647	230	70247	366	70513	370
90	88889	238	53163	270	61761	350
93	85869	165	53783	276	55789	300
96	75397	0	50573	198	51383	260
99	71883	0	43705	0	43877	0
102	58869	0	38859	0	37697	0
105	50985	0	32351	0	30893	0
108	42835	0	35557	0	32703	0
111	38553	0	24861	0	30243	0
114	28687	0	31767	0	28539	0
117	31681	0	32083	0	25153	0
120	25201	0	24749	0	25975	0
123	16241	0	14667	0	17629	0
153	14255	0	9973	0	9327	0
183	8393	0	6479	0	6283	0
213	6421	0	6153	0	4655	0
243	5133	0	4823	0	3969	0
273	4699	0	4115	0	3613	0
303	3297	0	3097	0	3173	0
333	2401	0	2171	0	2643	0
363	2137	0	1481	0	2253	0
393	1809	0	1433	0	2091	0
423	1999	0	1002	0	1665	0
453	913	0	901	0	1477	0
483	669	0	0	0	1257	0
513-	0	0	0	0	0	0

Tabla 4.28.- Actividades (cpm) medidas a la salida del hígado perfundido tras la inyección de 100 μ l de una suspensión de $^{51}\text{Cr-GR}$ y de 100 μ l de una suspensión de nanoesferas de $^{99\text{m}}\text{Tc-PEG-PLGA}$ (nano-PEG-PLGA) después del correspondiente lavado del hígado. Lotes PEG-PLGA-4 y GR-6.

Las fracciones desde el tiempo 0 hasta los 123 segundos se recogieron cada 3 segundos y a partir de ese tiempo hasta los 663 segundos se recogieron cada 30 segundos. Para los GR, las fracciones se recogieron siempre cada 3 segundos.

t(s)	Rata1 Actividad (cpm)		Rata2 Actividad (cpm)	
	nano-PEG-PLGA	GR	nano-PEG-PLGA	GR
0-15	0	0	0	0
18	0	0	0	138
21	3007	324	53661	1068
24	116695	1674	586415	4210
27	1017367	5166	1828775	8740
30	2929393	9048	2658941	8926
33	4293558	12820	4003658	13338
36	4103945	12808	3562148	12722
39	3185717	8678	3125489	11816
42	2917923	5960	2896541	7190
45	2740791	5914	2154789	6898
48	1928145	5764	1965412	5050
51	1381725	3574	1622043	3230
54	934715	2568	1364781	3952
57	637391	1830	1096789	2442
60	496163	2264	837539	2412
63	366077	1058	702555	1432
66	289703	1112	557117	1774
69	213375	1264	467429	964
72	166939	838	381763	1398
75	149555	814	328269	714
78	132523	730	271373	1020
81	104417	556	230561	708
84	94857	520	201427	606
87	82919	504	173247	658
90	71485	300	156795	524
93	60351	422	134001	412
96	59287	262	123539	590
99	52255	222	111289	328
102	47115	0	93385	232
105	45161	0	80111	0
108	45339	0	76849	0
111	39875	0	66639	0
114	37901	0	61219	0
117	34177	0	57369	0
120	33445	0	41525	0
123	27105	0	21975	0
153	19201	0	16733	0
183	14605	0	12619	0
213	12239	0	9267	0
243	10545	0	7561	0
273	10221	0	6733	0
303	8125	0	5547	0
333	5527	0	4615	0
363	4621	0	3373	0
393	3801	0	2829	0
423	4087	0	2253	0
453	2999	0	1861	0
483	2871	0	1867	0
513	1500	0	0	0
543-663	0	0	0	0

Tabla 4.29.- Actividades (cpm) medidas a la salida del hígado perfundido tras la inyección de 100 µl de una suspensión de ⁵¹Cr-GR y de 100 µl de una suspensión de nanoesferas de ^{99m}Tc-PEG-PLGA (nano-PEG-PLGA) después del correspondiente lavado del hígado. Lotes PEG-PLGA-5 y GR-7.

Las fracciones desde el tiempo 0 hasta los 123 segundos se recogieron cada 3 segundos y a partir de ese tiempo hasta los 663 segundos se recogieron cada 30 segundos. Para los GR, las fracciones se recogieron siempre cada 3 segundos.

t(s)	Rata1 Actividad (cpm)		Rata2 Actividad (cpm)	
	nano-mPEG-PLGA	GR	nano-mPEG-PLGA	GR
0-15	0	0	0	0
18	896	1692	0	552
21	21299	4576	923	2082
24	545165	6440	64223	5016
27	2183579	6232	1053823	8534
30	3561679	6204	2916383	6984
33	3678141	3664	3109403	5698
36	3106975	2408	3646887	4896
39	2465971	2828	2783709	3152
42	1876309	2006	2406383	2350
45	1261571	1978	1404885	1188
48	1003623	1392	1254761	1128
51	759329	1644	888421	848
54	558053	1126	542229	490
57	436379	1082	376031	458
60	321987	534	325507	446
63	266179	474	299079	374
66	164099	572	169171	354
69	161541	454	159879	310
72	126313	308	134809	264
75	109353	304	125653	280
78	90593	320	55075	242
81	68149	286	53527	176
84	63395	276	46019	126
87	49791	252	44799	146
90	48925	274	40827	184
93	42275	280	35555	0
96	37931	226	28777	0
99	32695	222	26377	0
102	28333	184	23013	0
105	26153	164	22149	0
108	25045	120	19721	0
111	22425	0	18223	0
114	18575	0	17601	0
117	18441	0	16637	0
120	17273	0	15501	0
123	16801	0	11747	0
153	11499	0	11345	0
183	8731	0	10083	0
213	7015	0	9063	0
243	5983	0	9495	0
273	4247	0	6813	0
303	3203	0	5649	0
333	3059	0	4715	0
363	2441	0	4861	0
393	1723	0	3469	0
423	1491	0	2683	0
453	1343	0	1455	0
483-663	0	0	0	0

Tabla 4.30.- Actividades (cpm) medidas a la salida del hígado perfundido tras la inyección de 100 μ l de una suspensión de ^{51}Cr - GR y de 100 μ l de una suspensión de nanoesferas de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -mPEG-PLGA (nano-mPEG-PLGA) después del correspondiente lavado del hígado para las ratas 1 y 2. Lotes mPEG-PLGA-2 y GR-8.

Las fracciones desde el tiempo 0 hasta los 123 segundos se recogieron cada 3 segundos y a partir de ese tiempo hasta los 663 segundos se recogieron cada 30 segundos. Para los GR, las fracciones se recogieron siempre cada 3 segundos.

t(s)	Rata3 Actividad (cpm)		Rata4 Actividad (cpm)	
	nano-mPEG-PLGA	GR	nano-mPEG-PLGA	GR
0-15	0	0	0	0
18	0	820	0	1070
21	353	1950	15259	4082
24	21353	4744	264039	8036
27	200177	5123	891491	7366
30	1895129	6900	1562957	6742
33	3752307	6002	3379031	4558
36	3301861	5658	2562999	3234
39	3006081	4965	2187113	2448
42	2278201	3654	1465179	1868
45	1888399	2436	1397459	1435
48	863527	2004	1003215	1314
51	495815	1676	766379	944
54	717225	1259	611261	560
57	497327	989	394045	538
60	361191	932	277731	444
63	351225	845	165035	392
66	173865	565	147177	324
69	134375	421	126217	232
72	117687	369	100583	252
75	118279	265	82791	180
78	91645	256	69455	196
81	65019	200	64339	194
84	53749	189	48551	196
87	46627	168	46479	108
90	39193	184	41241	110
93	37267	0	41939	0
96	32101	0	32387	0
99	30449	0	34465	0
102	26943	0	24519	0
105	20559	0	21897	0
108	20395	0	19565	0
111	18507	0	15079	0
114	17535	0	16131	0
117	15579	0	14061	0
120	15327	0	14643	0
123	13735	0	9695	0
153	8463	0	6187	0
183	6935	0	3031	0
213	6177	0	4333	0
243	4915	0	3727	0
273	4295	0	2849	0
303	3953	0	2425	0
333	3973	0	1895	0
363	2455	0	1331	0
393	1867	0	1193	0
423	1356	0	965	0
473-663	0	0	0	0

Tabla 4.31.- Actividades (cpm) medidas a la salida del hígado perfundido tras la inyección de 100 µl de una suspensión de ⁵¹Cr- GR y de 100 µl de una suspensión de nanoesferas de ^{99m}Tc-mPEG-PLGA (nano-mPEG-PLGA) después del correspondiente lavado del hígado para las ratas 3 y 4. Lotes mPEG-PLGA-2 y GR-8.

Las fracciones desde el tiempo 0 hasta los 123 segundos se recogieron cada 3 segundos y a partir de ese tiempo hasta los 663 segundos se recogieron cada 30 segundos. Para los GR, las fracciones se recogieron siempre cada 3 segundos.

t(s)	Rata1 Actividad (cpm)		Rata2 Actividad (cpm)	
	nano-mPEG-PLGA	GR	nano-mPEG-PLGA	GR
0-15	0	0	0	0
18	0	456	0	760
21	411	1002	1647	1569
24	21535	4658	83249	5589
27	269293	9854	324893	8398
30	881173	8120	647123	7589
33	2077035	7256	2904665	6236
36	3255401	6002	2365456	5106
39	2984771	5698	1712217	4836
42	2029321	3965	1060539	4002
45	1828479	3012	747889	2691
48	1265795	2365	663781	1995
51	723677	1896	564877	1252
54	610735	1023	448597	1168
57	294121	988	361053	776
60	332247	756	283543	653
63	243665	534	238489	530
66	223667	432	204887	438
69	162437	364	170521	332
72	137195	316	146359	324
75	113679	342	107383	290
78	91513	330	107001	218
81	78169	306	84631	278
84	87853	326	81561	268
87	63709	268	69219	194
90	52823	228	64135	174
93	46559	248	54293	0
96	47543	0	50315	0
99	33097	0	45307	0
102	30883	0	40609	0
105	25295	0	36591	0
108	22805	0	34637	0
111	23685	0	31063	0
114	20489	0	29121	0
117	24369	0	28209	0
120	16361	0	115473	0
123	12751	0	12641	0
153	11111	0	10649	0
183	9183	0	9447	0
213	7807	0	6619	0
243	6211	0	5191	0
273	7805	0	3735	0
303	5047	0	2895	0
333	3165	0	2513	0
363	4201	0	1925	0
393	1729	0	1868	0
423	1393	0	1341	0
453	1343	0	0	0
483	1151	0	0	0
513-663	0	0	0	0

Tabla 4.32.- Actividades (cpm) medidas a la salida del hígado perfundido tras la inyección de 100 µl de una suspensión de ⁵¹Cr- GR y de 100 µl de una suspensión de nanoesferas de ^{99m}Tc-

mPEG-PLGA (nano-mPEG-PLGA) después del correspondiente lavado del hígado para las ratas 1 y 2. Lotes mPEG-PLGA-3 y GR-9.

Las fracciones desde el tiempo 0 hasta los 123 segundos se recogieron cada 3 segundos y a partir de ese tiempo hasta los 663 segundos se recogieron cada 30 segundos. Para los GR, las fracciones se recogieron siempre cada 3 segundos.

t(s)	Rata3 Actividad (cpm)		Rata4 Actividad (cpm)	
	nano-mPEG-PLGA	GR	nano-mPEG-PLGA	GR
0-16	0	0	0	0
18	0	278	0	365
21	17325	3654	583	5003
24	167831	6985	2215	8896
27	466651	7965	33367	7896
30	600391	7000	182899	6598
33	729411	5968	483571	5692
36	2821453	5236	1986547	4998
39	2321456	4856	1798541	4123
42	1896541	3965	1240771	3002
45	1236544	3001	1216995	2236
48	1098745	2659	1136697	1567
51	847541	1985	1015931	1325
54	658792	896	860573	996
57	498742	712	797795	856
60	236547	556	638815	745
63	166975	507	588233	523
66	130359	422	500329	489
69	95389	276	399333	400
72	88111	312	558291	369
75	61285	276	297799	256
78	53811	232	244965	199
81	47895	214	200455	210
84	44857	200	178313	0
87	39247	0	149273	0
90	24729	0	120039	0
93	31647	0	102861	0
96	28527	0	78936	0
99	26089	0	70419	0
102	22665	0	69467	0
105	19575	0	60783	0
108	17329	0	54179	0
111	16205	0	47103	0
114	14639	0	43251	0
117	12839	0	32993	0
120	12113	0	21983	0
123	11437	0	13013	0
153	10717	0	9167	0
183	10043	0	7971	0
213	6803	0	6031	0
243	3767	0	5007	0
273	1965	0	3873	0
303	1407	0	2715	0
333	1256	0	2101	0
363	1009	0	1587	0
393	987	0	1237	0
423	900	0	1050	0
453-663	0	0	0	0

Tabla 4.33.- Actividades (cpm) medidas a la salida del hígado perfundido tras la inyección de 100 μ l de una suspensión de ^{51}Cr -GR y de 100 μ l de una suspensión de nanoesferas de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -mPEG-PLGA (nano-mPEG-PLGA) después del correspondiente lavado del hígado para las ratas 3 y 4. Lotes mPEG-PLGA-3 y Gr-9.

Las fracciones desde el tiempo 0 hasta los 123 segundos se recogieron cada 3 segundos y a partir de ese tiempo hasta los 663 segundos se recogieron cada 30 segundos. Para los GR, las fracciones se recogieron siempre cada 3 segundos.

Capítulo 5
BIODISTRIBUCIÓN

5.- ESTUDIOS IN VIVO (BIODISTRIBUCIÓN)

5.1.- DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

El estudio se llevó a cabo administrando nanoesferas de PLGA, PEG-PLGA y mPEG-PLGA marcadas con ^{99m}Tc y glóbulos rojos marcados con ^{99m}Tc como control.

Una vez anestesiadas las ratas, utilizamos el método quirúrgico de *Harms y Ojeda (1974)* para inyectar en la vena jugular 100 μl de una suspensión de nanoesferas con una actividad aproximada de $4.14 \cdot 10^7 \pm 1.07 \cdot 10^7$ cpm ($6.90 \cdot 10^5 \pm 1.78 \cdot 10^4$ Bq) o una suspensión de glóbulos rojos con una actividad de $1.36 \cdot 10^7 \pm 2.37 \cdot 10^6$ cpm ($2.26 \cdot 10^5 \pm 3.94 \cdot 10^4$ Bq). Una vez inyectada la suspensión, 4 ratas fueron sacrificadas a tiempos preestablecidos (5, 10, 20, 40 y 60 minutos). Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción cardíaca y a continuación se extirparon los principales órganos y se pesaron. Por último se midió la actividad asociada a cada uno de los órganos, dichas actividades están corregidas por la ecuación de desintegración radiactiva ilustrada anteriormente. Según *Troster y Kreuter (1992)*, para determinar el porcentaje captado en médula ósea se considera que este es el 3 % del peso corporal y para la masa muscular el 15 %. Para la actividad en sangre se midieron 100 μl y los cálculos se realizaron considerando que el total de sangre corresponde a un 7.5 % del peso corporal (*Moghimi y col. 1993; Dunn y col. 1994a*).

5.2.- RESULTADOS EXPERIMENTALES

Las tablas 5.1 a 5.4 recogen las actividades medidas en cada órgano o tejido expresadas como porcentaje de la actividad inyectada, y fueron obtenidos a diferentes tiempos (5, 10, 20, 40 y 60 min.) y se realizaron por cuadruplicados (las tablas con los datos originales se encuentran al final del capítulo, tablas 5.7-5.10). Las figuras 5.1-5.9 representan la biodistribución de cada uno de los sistemas en los diferentes órganos y tejidos durante una hora.

GR - % CAPTACIÓN - VALORES MEDIOS					
Tiempo (min)	SANGRE	HÍGADO	RIÑÓN	PULMÓN	MÚSCULO
0	100.0(0.0)	0.00(0.0)	0.00(0.0)	0.00(0.0)	0.00(0.0)
5	94.2(3.4)	4.43(0.2)	2.59(1.1)	1.83(0.4)	2.26(0.5)
10	87.1(5.0)	4.95(0.4)	3.02(0.8)	1.62(0.8)	2.04(0.9)
20	84.1(1.8)	4.89(0.5)	3.30(0.4)	1.68(0.5)	2.22(0.4)
40	88.5(3.2)	5.08(0.7)	3.37(0.4)	1.67(0.8)	2.01(0.4)
60	85.4(3.3)	5.80(0.9)	3.28(0.5)	1.69(0.5)	2.59(0.5)
Areas	5259	292	185	96.8	126
Tiempo (min)	CORAZÓN	BAZO	TIROIDE	HUESO	TOTAL
0	0.00(0.0)	0.00(0.0)	0.00(0.0)	0.00(0.0)	100(0.0)
5	0.74(0.2)	0.85(0.2)	0.03(0.0)	1.40(0.4)	108(2.6)
10	0.52(0.1)	1.01(0.1)	0.02(0.0)	0.93(0.2)	101(6.7)
20	0.55(0.1)	1.12(0.1)	0.02(0.0)	0.84(0.5)	98.7(2.5)
40	0.42(0.1)	1.09(0.2)	0.02(0.0)	0.94(0.4)	103(3.3)
60	0.39(0.0)	1.15(0.1)	0.02(0.0)	0.76(0.1)	101(3.7)
Areas	28.1	61.9	1.05	52.9	

Tabla 5.1.- Valores medios y desviación típica (s) de las actividades medidas en cada órgano o tejido expresadas como porcentaje de la actividad inyectada de GR.

PLGA - % CAPTACIÓN - VALORES MEDIOS					
Tiempo (min)	SANGRE	HÍGADO	RIÑÓN	PULMÓN	MÚSCULO
0	100.0(0.0)	0.00(0.0)	0.00(0.0)	0.00(0.0)	0.00(0.0)
5	12.1(1.1)	74.4(2.4)	2.17(0.5)	1.67(0.4)	3.22(0.7)
10	9.86(0.8)	78.7(2.3)	1.60(0.3)	1.12(0.4)	2.39(1.1)
20	8.74(2.5)	79.1(3.7)	2.28(0.7)	1.23(0.4)	2.93(0.9)
40	9.45(0.9)	74.8(3.1)	4.34(1.1)	0.80(0.1)	3.09(0.2)
60	5.68(2.3)	74.7(1.8)	3.77(1.2)	1.18(0.4)	2.91(1.4)
Areas	762	4392	181	63.1	169
Tiempo (min)	CORAZÓN	BAZO	TIROIDE	HUESO	TOTAL
0	0.00(0.0)	0.00(0.0)	0.00(0.0)	0.00(0.0)	100(0.0)
5	0.33(0.0)	1.41(0.4)	0.05(0.0)	2.80(0.3)	98.1(1.2)
10	0.30(0.1)	1.80(0.3)	0.08(0.0)	2.65(0.3)	98.5((1.5)
20	0.25(0.1)	1.98(0.4)	0.06(0.0)	3.67(1.3)	100(1.4)
40	0.20(0.0)	1.58(0.3)	0.04(0.0)	3.48(1.7)	97.8(2.9)
60	0.14(0.0)	2.09(0.7)	0.03(0.0)	3.54(0.8)	94.1(3.1)
Areas	13.0	103	2.72	194	

Tabla 5.2.- Valores medios y desviación típica (s) de las actividades medidas en cada órgano o tejido expresadas como porcentaje de la actividad inyectada de nanoesferas de PLGA.

PEG-PLGA - % CAPTACIÓN - VALORES MEDIOS					
Tiempo (min)	SANGRE	HÍGADO	RIÑÓN	PULMÓN	MÚSCULO
0	100.0(0.0)	0.00(0.0)	0.00(0.0)	0.00(0.0)	0.00(0.0)
5	34.4(3.7)	51.5(2.9)	3.75(0.8)	1.13(0.2)	4.15(1.1)
10	21.4(1.7)	50.5(5.5)	3.47(1.2)	1.05(0.2)	5.91(1.1)
20	18.3(1.2)	51.9(2.4)	3.24(1.3)	0.76(0.3)	4.31(2.0)
40	13.9(1.5)	51.8(2.0)	3.65(0.7)	0.72(0.3)	5.11(1.0)
60	10.5(1.1)	53.0(1.9)	4.85(0.9)	0.64(0.2)	3.82(0.6)
Areas	1240	2979	214	45.8	270
Tiempo (min)	CORAZÓN	BAZO	TIROIDE	HUESO	TOTAL
0	0.00(0.0)	0.00(0.0)	0.00(0.0)	0.00(0.0)	100(0.0)
5	0.67(0.2)	1.01(0.1)	0.05(0.0)	5.47(2.8)	102(2.2)
10	0.55(0.1)	1.05(0.2)	0.04(0.0)	5.74(2.8)	89.7(1.6)
20	0.32(0.1)	1.02(0.1)	0.04(0.0)	6.00(2.0)	85.9(3.7)
40	0.30(0.1)	0.89(0.3)	0.03(0.0)	6.87(1.8)	83.2(4.2)
60	0.20(0.0)	1.08(0.2)	0.04(0.0)	7.37(2.2)	81.5(4.5)
Areas	20.2	56.9	2.12	371	

Tabla 5.3.- Valores medios y desviación típica (s) de las actividades medidas en cada órgano o tejido expresadas como porcentaje de la actividad inyectada de nanoesferas de PEG-PLGA.

mPEG - PLGA % CAPTACION - VALORES MEDIOS					
Tiempo (min)	SANGRE	HÍGADO	RIÑÓN	PULMÓN	MÚSCULO
0	100.0(0.0)	0.00(0.0)	0.00(0.0)	0.00(0.0)	0.00(0.0)
5	38.1(1.8)	47.5(3.8)	3.74(1.3)	1.12(0.2)	5.88(0.5)
10	26.2(3.9)	47.5(1.8)	2.81(0.6)	0.76(0.1)	5.07(1.1)
20	16.0(1.1)	52.6(3.8)	3.35(0.6)	0.62(0.1)	4.40(0.7)
40	15.7(1.6)	49.7(2.8)	4.70(0.3)	0.56(0.1)	3.78(0.4)
60	13.0(1.5)	48.8(1.4)	5.08(1.1)	0.58(0.1)	4.36(1.1)
Areas	1320	2864	234	37.6	253
Tiempo (min)	CORAZÓN	BAZO	TIROIDE	HUESO	TOTAL
0	0.00(0.0)	0.00(0.0)	0.00(0.0)	0.00(0.0)	100(0.0)
5	0.78(0.2)	0.60(0.1)	0.09(0.0)	3.72(1.6)	102(2.4)
10	0.37(0.1)	0.46(0.0)	0.08(0.0)	4.98(0.9)	88.2(4.9)
20	0.25(0.1)	0.54(0.1)	0.05(0.0)	6.64(1.9)	84.4(1.8)
40	0.23(0.0)	0.45(0.0)	0.04(0.0)	5.58(1.2)	80.8(2.7)
60	0.27(0.1)	0.48(0.1)	0.04(0.0)	7.05(0.3)	79.6(4.3)
Areas	17.7	28.3	2.99	338	

Tabla 5.4.- Valores medios y desviación típica (s) de las actividades medidas en cada órgano o tejido expresadas como porcentaje de la actividad inyectada de nanoesferas de mPEG-PLGA.

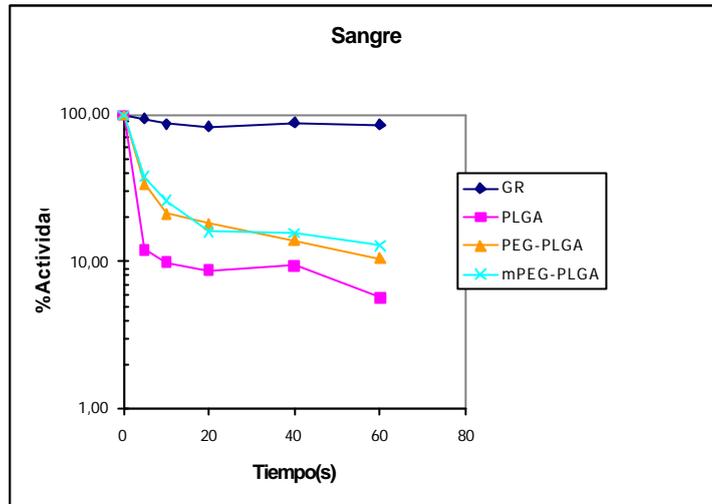


Figura 5.1.- Representación de los porcentajes de actividad en función del tiempo para cada uno de los sistemas en Sangre.

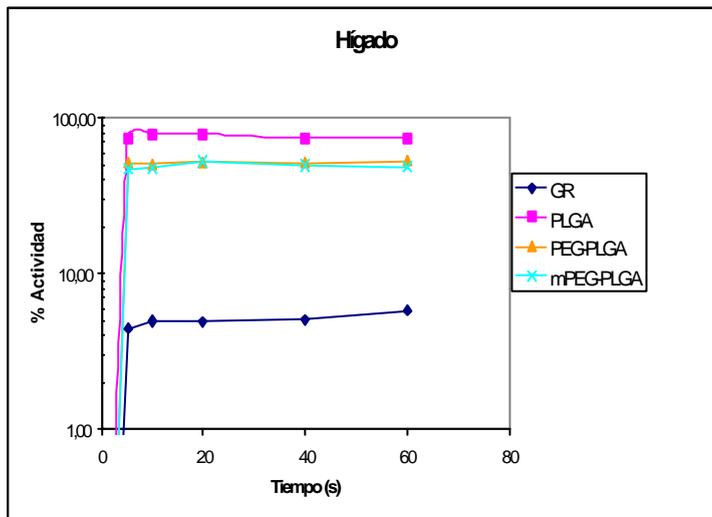


Figura 5.2.- Representación de los porcentajes de actividad en función del tiempo para cada uno de los sistemas en Hígado.

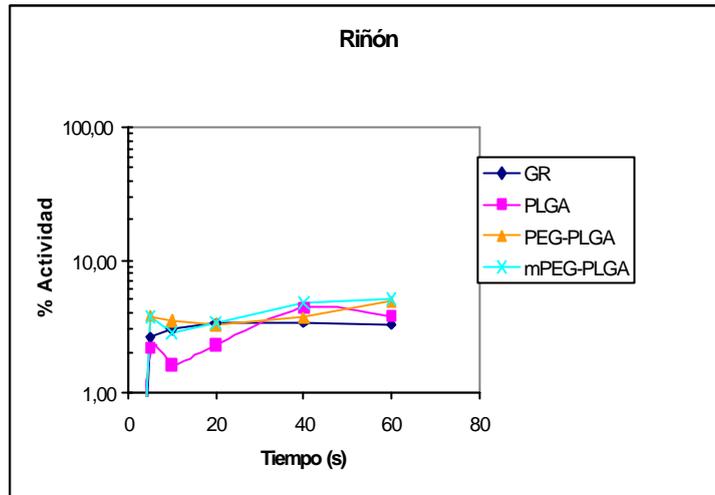


Figura 5.3.- Representación de los porcentajes de actividad en función del tiempo para cada uno de los sistemas en Riñón.

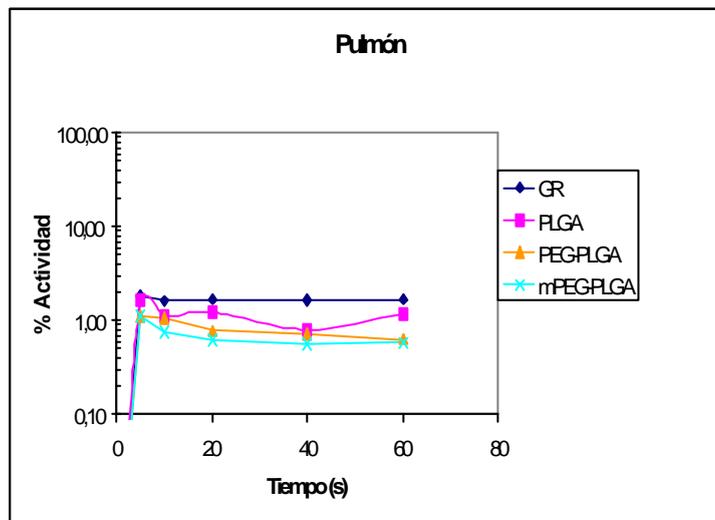


Figura 5.4.- Representación de los porcentajes de actividad en función del tiempo para cada uno de los sistemas en Pulmón.

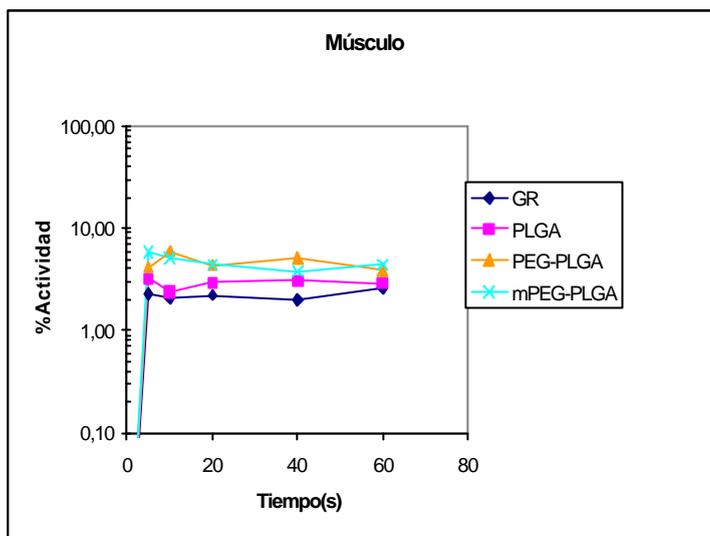


Figura 5.5.- Representación de los porcentajes de actividad en función del tiempo para cada uno de los sistemas en Músculo.

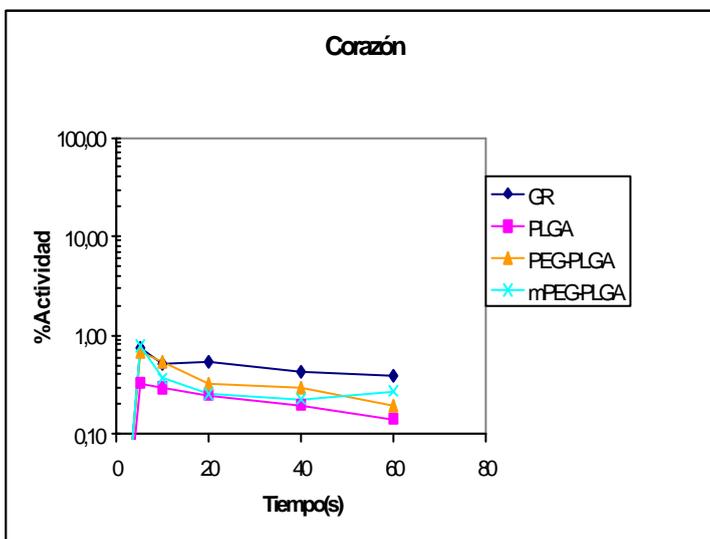


Figura 5.6.- Representación de los porcentajes de actividad en función del tiempo para cada uno de los sistemas en Corazón.

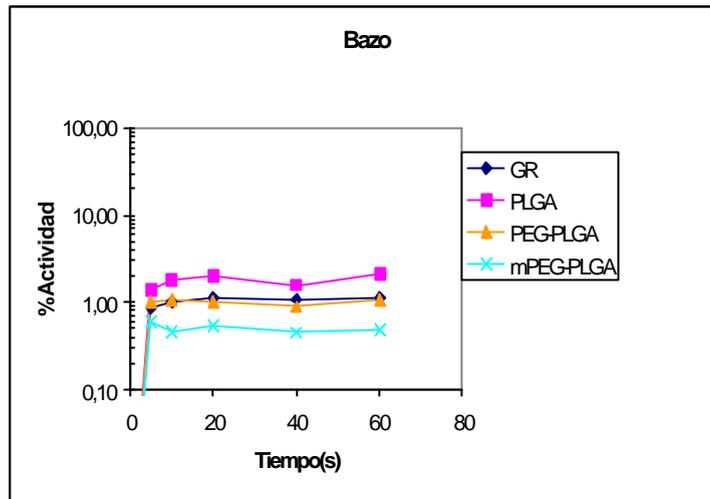


Figura 5.7.- Representación de los porcentajes de actividad en función del tiempo para cada uno de los sistemas en Bazo.

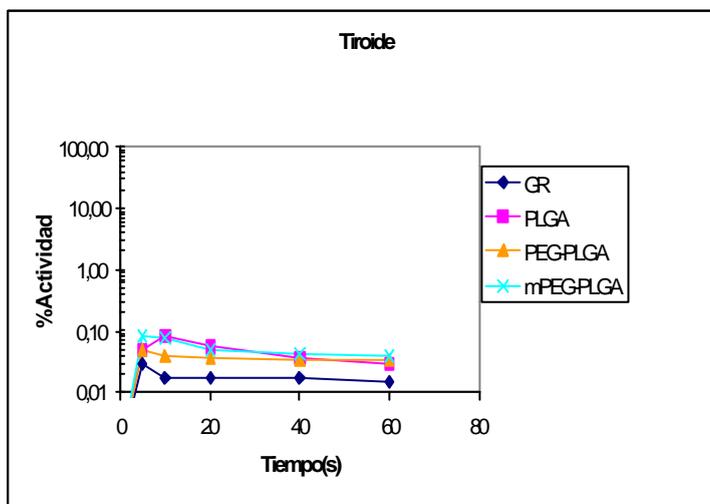


Figura 5.8.- Representación de los porcentajes de actividad en función del tiempo para cada uno de los sistemas en Tiroides.

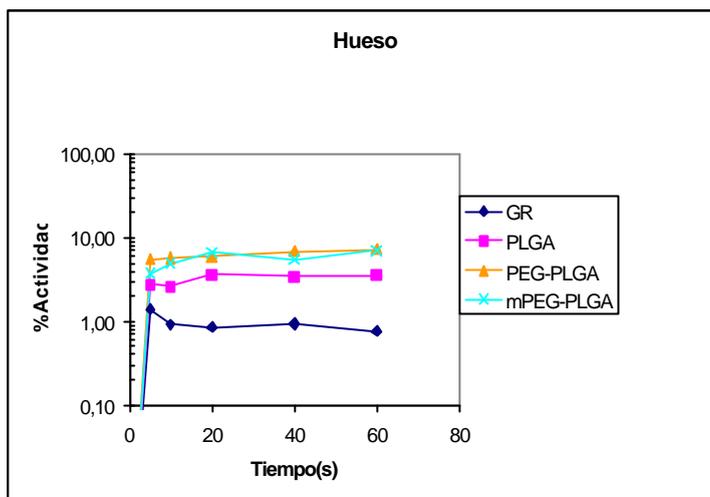


Figura 5.9.- Representación de los porcentajes de actividad en función del tiempo para cada uno de los sistemas en Hueso.

El primer análisis de las características de la biodistribución de las nanoesferas en relación con los hematíes lo hemos realizado a través de las áreas de las curvas de %actividad – tiempo, y que se muestran en la figura 5.10.

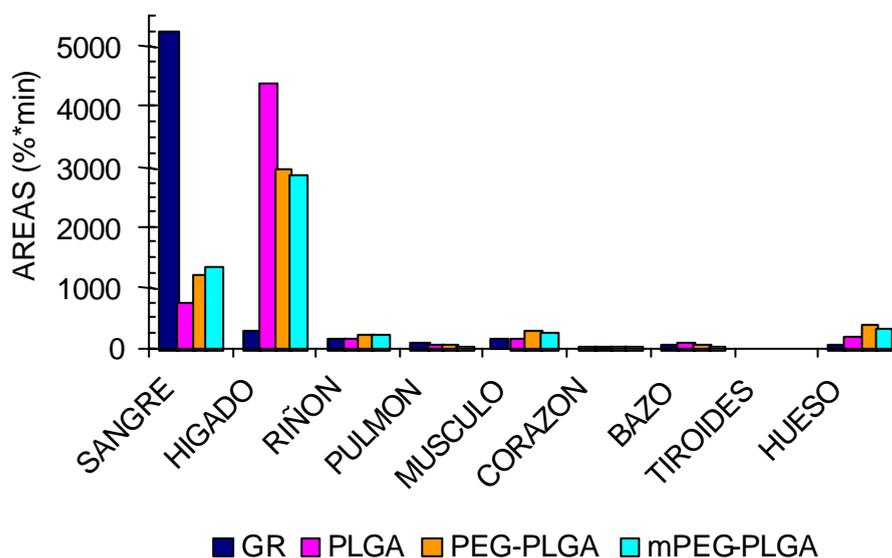


Figura 5.10.- Areas correspondientes a las curvas de porcentaje de actividad inyectada frente al tiempo en el intervalo 0 – 60 minutos.

Tal como era de esperar, los hematíes se mantuvieron en una gran proporción en el compartimento hemático; las áreas correspondientes a los demás compartimentos reflejan en gran medida el subcompartimento vascular de cada uno de ellos. Por el contrario, las nanoesferas se distribuyeron con rapidez hacia el compartimento hepático. Las nanoesferas elaboradas con los copolímeros a base de PEG, PEG-PLGA y mPEG-PLGA, mostraron una reducción de la captación hepática, sin que las captaciones en otros tejidos se vieran afectadas significativamente. En este sentido, podemos afirmar, en consonancia con los resultados obtenidos inicialmente por *Greff y col, 1995*, que las cadenas de PEG en el copolímero reduce substancialmente la opsonización de las nanoesferas, si bien las diferencias observadas entre el compartimento de las nanoesferas de PEG-PLGA y mPEG-PLGA son marginales.

5.3.- ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO

El estudio detallado de la biodistribución de los hematíes y de las nanoesferas se realizó mediante el modelo compartimental lineal mostrado en la figura 5.11. Tal como puede observarse, el modelo consta de un compartimento central, que corresponde a la sangre (compartimento1), y cinco compartimentos periféricos: hígado (2 y 7), riñón (3), pulmón (4), tejido muscular (5) y un pool (6) formado por la suma de las actividades medidas en corazón, bazo, tiroides y hueso. Decidimos formar este pool porque el elevado número de compartimentos en relación con el número de puntos experimentales impide la convergencia del método de estimación de los parámetros. El compartimento hepático está formado por su parte por dos subcompartimentos, el correspondiente al espacio accesible de forma reversible, que podemos identificar con el espacio vascular, el espacio de Disse y probablemente los receptores de membrana de las células de Kupffer, y el espacio accesible de forma irreversible, que corresponde al interior de las células de Kupffer. Salvo en el caso de los hematíes, que como expondremos más adelante presentaron un comportamiento típico de los modelos cerrados, ha sido necesario incluir además un proceso de eliminación a partir del compartimento central hemático.

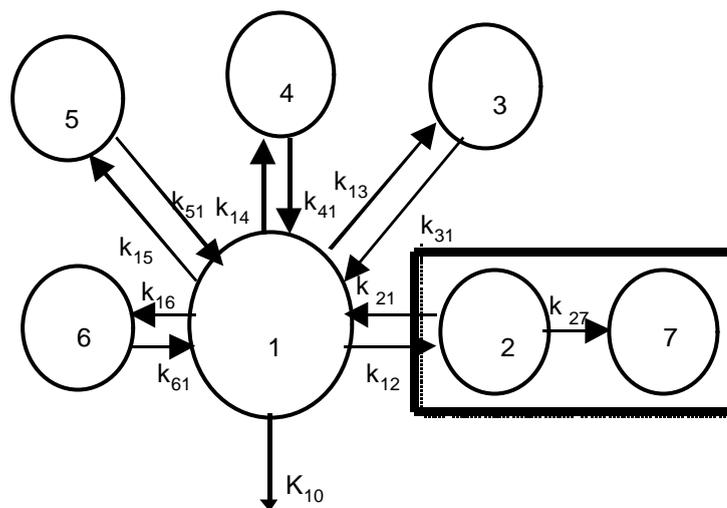


Figura 5.11.- Modelo compartimental utilizado en la interpretación de los ensayos de biodistribución.

El sistema de ecuaciones diferenciales que rige el modelo puede expresarse, en su forma matricial, de la siguiente manera,

$$\frac{dx}{dt} = K \cdot x \tag{5.1}$$

donde x es el vector correspondiente a las actividades en los distintos compartimentos, ordenados de la siguiente forma: sangre, hígado accesible de forma reversible, riñón, pulmón, músculo, otros e hígado accesible de forma irreversible. La matriz K de constantes de velocidad de transferencia entre compartimentos, es igual a:

$$K = \begin{pmatrix} -k_{11} & k_{21} & k_{31} & k_{41} & k_{51} & k_{61} & 0 \\ k_{12} & -k_{21} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ k_{13} & 0 & -k_{31} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ k_{14} & 0 & 0 & -k_{41} & 0 & 0 & 0 \\ k_{15} & 0 & 0 & 0 & -k_{51} & 0 & 0 \\ k_{16} & 0 & 0 & 0 & 0 & -k_{61} & 0 \\ 0 & k_{27} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \tag{5.2}$$

donde k_{ij} es la constante de velocidad de transferencia, donde el componente i es el órgano o tejido saliente y j es el órgano o tejido entrante y además

$$k_{11} = \sum_{\substack{i=0 \\ i \neq 1}}^{i=6} k_{1i} \quad 5.3$$

Para la resolución del modelo hemos utilizado la función de integración numérica de ecuaciones diferenciales `NDSolve[]` del programa Mathematica, que combina el método predictor – corrector de Adams y el método de Gear (Coombes y col., 1995). La función `NDSolve[]` tiene por argumentos el conjunto de ecuaciones diferenciales que define el modelo junto con las condiciones iniciales, el conjunto de soluciones deseadas, y el intervalo de tiempo para el que se desea la solución. Esta función devuelve un conjunto de funciones de interpolación, una para cada uno de los compartimentos resueltos. El cuadro siguiente muestra la forma en que hemos codificado el modelo.

```

fitredmod = NDSolve[
{x1'[t] == - ksum1 x1[t] + k21 x2[t] +
  k31 x3[t] + k41 x4[t] + k51 x5[t] + k61 x6[t],
x2'[t] == k12 x1[t] - (k21 + k210) x2[t],
x3'[t] == k13 x1[t] - k31 x3[t],
x4'[t] == k14 x1[t] - k41 x4[t],
x5'[t] == k15 x1[t] - k51 x5[t],
x6'[t] == k16 x1[t] - k61 x6[t],
x7'[t] == k27 x2[t],
x1[0] == 100,
x2[0] == 0.,
x3[0] == 0.,
x4[0] == 0.,
x5[0] == 0.,
x6[0] == 0.,
x7[0] == 0.},
{x1[t], x2[t], x3[t], x4[t], x5[t],
x6[t], x7[t]},
{t, 0, 60}];

```

Cuadro 5.1.- Código de Mathematica® utilizado para la integración numérica del modelo recogido en las ecuaciones 5.1 y 5.2.

5.3.1.- ESTIMACIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL MODELO

La estimación de los parámetros del modelo se llevó a cabo mediante el método de los mínimos cuadrados, utilizando la función de minimización FindMinimum[]. Para ello desarrollamos una función objetivo que nos devuelve la suma de los cuadrados de los residuales que se recoge en la tabla 5.6; la forma en que se utiliza la función FindMinimum[] se muestra en el cuadro 5.2.

```

RedFunObj[datos_, k10_, k12_, k21_, k210_, k13_, k31_,
          k14_, k41_, k15_, k51_, k16_, k61_, x0_] :=
Module[

{tcod, ypred, modelo, funo, fdos, ftres, fcuatro,
  fcinco, fseis, fdiez, t, c,
  zmod, sce, ksum1},

ypred = {};
tcod = Transpose[Take[Transpose[datos], {1,2}]];
yobs = Transpose[datos][[3]];

ksum1 = k10+k12+k13+k14+k15+k16;
modelo = NDSolve[
{x1'[t] == - ksum1 x1[t] + k21 x2[t] +
k31 x3[t] + k41 x4[t] + k51 x5[t] + k61 x6[t],
x2'[t] == k12 x1[t] - (k21 + k210) x2[t],
x3'[t] == k13 x1[t] - k31 x3[t],
x4'[t] == k14 x1[t] - k41 x4[t],
x5'[t] == k15 x1[t] - k51 x5[t],
x6'[t] == k16 x1[t] - k61 x6[t],
x10'[t] == k210 x2[t],
x1[0] == x0,
x2[0] == 0.,
x3[0] == 0.,
x4[0] == 0.,
x5[0] == 0.,
x6[0] == 0.,
x10[0] == 0.},
{x1[t], x2[t], x3[t], x4[t], x5[t],
x6[t], x10[t]},
{t, 0, 60}];

funo = x1[t] /. modelo[[1,1]];
fdos = x2[t] /. modelo[[1,2]];
ftres = x3[t] /. modelo[[1,3]];
fcuatro = x4[t] /. modelo[[1,4]];

```

```

fcinco = x5[t] /. modelo[[1,5]];
fseis = x6[t] /. modelo[[1,6]];
fdiez = x10[t] /. modelo[[1,7]];

AppendTo[ypred, funo /. t -> Transpose[
  Select[tcod, (#[[2]] == 1 &)]][[1]] ];

AppendTo[ypred, {fdos /. t -> Transpose[
  Select[tcod, (#[[2]] == 2 &)]][[1]]} +
{fdiez /. t -> Transpose[
  Select[tcod, (#[[2]] == 2 &)]][[1]]} ];

AppendTo[ypred, ftres /. t -> Transpose[
  Select[tcod, (#[[2]] == 3 &)]][[1]] ];

AppendTo[ypred, fcuatro /. t -> Transpose[
  Select[tcod, (#[[2]] == 4 &)]][[1]] ];

AppendTo[ypred, fcinco /. t -> Transpose[
  Select[tcod, (#[[2]] == 5 &)]][[1]] ];
AppendTo[ypred, fseis /. t -> Transpose[
  Select[tcod, (#[[2]] == 6 &)]][[1]] ];

ypred = Flatten[ypred];

Apply[Plus, (yobs - ypred)^2 ]

```

Cuadro 5.2.- Elaboración en el Mathematica® de la función FindMinimun para la estimación de los parámetros del modelo mediante el método de mínimos cuadrados.

5.4.- RESULTADOS DEL ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO

Los resultados obtenidos se han resumido en la tabla 5.5, donde se recogen las estimadas de los parámetros del modelo expresadas en min^{-1} ; las figuras 5.12 - 5.15 muestran los datos experimentales junto con las curvas ajustadas.

	s.c.r.	Vascular k_{10}	Hígado k_{12}, k_{21}, k_{27}	Riñón k_{13}, k_{31}	Pulmón k_{14}, k_{41}	Tejido muscular k_{15}, k_{51}	Pool k_{16}, k_{61}
Tc-Gr	28.68	0.0	0.00988 0.163 0.0	0.00548 0.150	0.00253 0.144	0.00337 0.136	0.00487 0.178
PLGA	16.03	0.00854	0.604 0.0730 0.00283	0.00927 0.00793	0.1125 1.010	0.0772 0.349	0.0312 0.0431
PEG-PLGA	28.82	0.0174	0.252 0.126 0.0170	0.0101 0.0332	0.00310 0.0532	0.0179 0.0613	0.0244 0.0447
mPEG-PLGA	56.25	0.0189	0.187 0.0874 0.0104	0.00865 0.0363	0.00278 0.0706	0.0206 0.0872	0.0170 0.0363

Tabla 5.5.- Estimadas de los parámetros del modelo compartimental reducido. Los valores de las constantes de velocidad están expresados en min^{-1} .

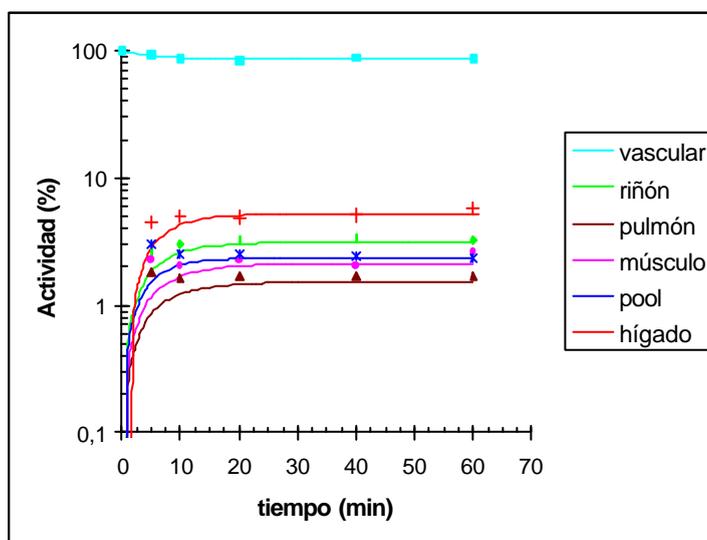


Figura 5.12.- Curvas de actividad – tiempo de los datos experimentales y las ajustadas para los GR.

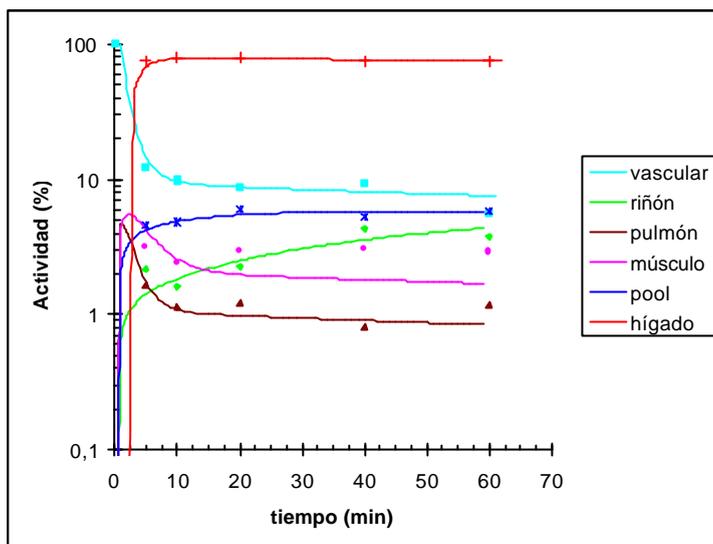


Figura 5.13.- Curvas de actividad – tiempo de los datos experimentales y las ajustadas para las nanoesferas de PLGA.

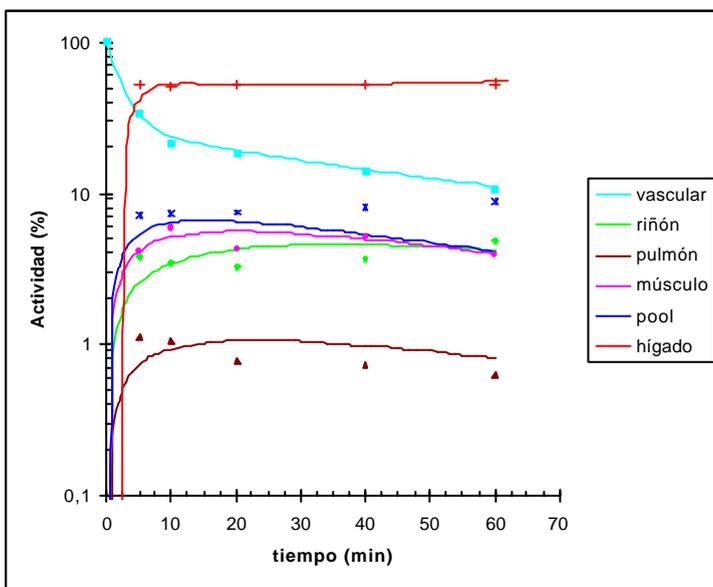


Figura 5.14.- Curvas de actividad – tiempo de los datos experimentales y las ajustadas para las nanoesferas de PEG-PLGA.

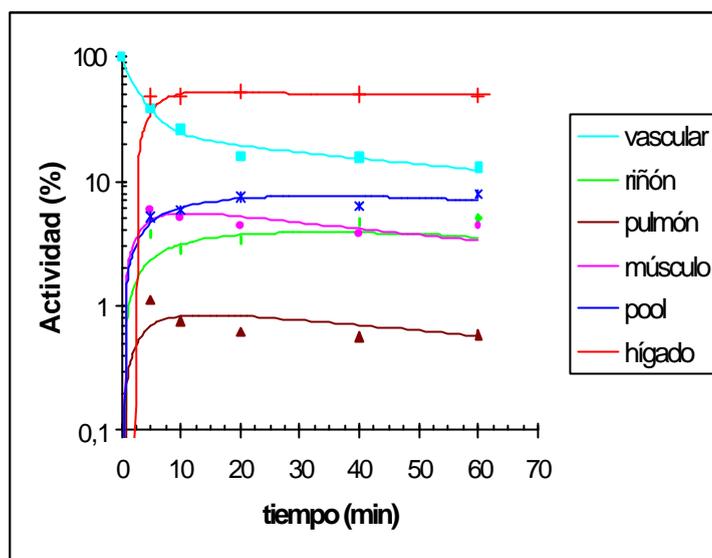


Figura 5.15.- Curvas de actividad – tiempo de los datos experimentales y las ajustadas para las nanoesferas de mPEG-PLGA.

El análisis de las curvas de actividad – tiempo correspondiente a los hematíes marcados con ^{99m}Tc ($^{99m}\text{Tc-GR}$) se realizó mediante un modelo mamilar cerrado sin compartimentos de acumulación, es decir, fijando $k_{10} = k_{17} = 0$. Esta decisión se tomó al comprobar que las curvas de actividad – tiempo (figura 5.12) muestra el comportamiento típico de este tipo de modelos, caracterizado por una fase de equilibrio real entre los distintos compartimentos, es decir, con curvas de actividad – tiempo paralelas y pendiente igual a cero.

Como puede observarse en la tabla 5.5, la diferencia más relevante entre los comportamientos farmacocinéticos de los $^{99m}\text{Tc-GR}$ y las nanoesferas se centran en el compartimento hepático. La constante de velocidad de transferencia del compartimento vascular al hepático reversible, k_{12} , es 19 veces mayor para las nanoesferas de mPEG – PLGA que para los hematíes marcados, y 61 veces mayor para las nanoesferas de PLGA. Por otro lado, la presencia de las cadenas hidrofílicas del PEG reducen notablemente el valor de este parámetro, hasta algo menos de la mitad para las nanoesferas PEG – PLGA, y alrededor de un tercio para las nanoesferas de mPEG – PLGA.

Otra diferencia en el compartimento de las nanoesferas radica en el parámetro k_{10} . Este parámetro incluye los procesos de eliminación que pudiera haber, distintos de la eliminación renal y hepática, más la transferencia hacia tejidos no analizados (sistema digestivo, sistema nerviosos central). Obsérvese como el valor estimado para k_{10} es similar para las nanoesferas de PEG – PLGA y mPEG – PLGA, y aproximadamente la mitad de dicho valor para las de PLGA. Un análisis más detallados de las consecuencias de estas diferencias requeriría completar el ensayo de biodistribución incluyendo los tejidos y órganos no muestreados en este estudio.

Tal como indicamos anteriormente, no fue posible estimar los volúmenes de distribución vasculares debido a que no pudimos cuantificar adecuadamente la actividad inyectada. No obstante, es posible tener una idea bastante aproximada si consideramos los volúmenes de distribución en el equilibrio, relativos al volumen del compartimento vascular. Una vez alcanzado el equilibrio de distribución, la actividad será idéntica para los compartimentos vasculares de cada órgano y tejido, de forma que para el compartimento j podemos escribir,

$$k_{1j} \cdot V_1 \cdot a_{eq} = k_{j1} \cdot V_j \cdot a_{eq} \tag{5.4}$$

y por lo tanto,

$$V_j = V_1 \frac{k_{1j}}{K_{j1}} \tag{5.5}$$

La tabla 5.6 muestra los cocientes k_{1j}/k_{j1} para los compartimentos analizados, que representan los cocientes de volúmenes relativos de distribución. La mayor diferencia se centra nuevamente en el compartimento hepático, y en menor medida para los demás compartimentos.

	Hígado	Riñón	Pulmón	Tejido Muscular	Pool
Tc – GR	0.0606	0.0365	0.0176	0.0248	0.0274
PLGA	8.27	1.17	0.111	0.221	0.724
PEG – PLGA	2.00	0.304	0.058	0.292	0.546
mPEG – PLGA	2.14	0.238	0.039	0.236	0.468

Tabla 5.6. Volúmenes de distribución aparentes en el equilibrio.

ANEXO

Rata	t (min)	Lote	Peso(g)	Hígado	Sangre	Hueso	Riñón	Tiroides
1	5	GR-Tc2	220	4.33	95.7	1.63	1.52	0.02
2	5	GR-Tc2	238	4.25	96.3	1.89	1.73	0.06
3	5	GR-Tc3	205	4.46	95.6	1.08	3.28	0.02
4	5	GR-Tc3	251	4.69	89.0	0.99	3.83	0.02
5	10	GR-Tc2	243	4.90	87.2	0.58	2.75	0.02
6	10	GR-Tc2	249	4.91	84.1	1.07	2.12	0.01
7	10	GR-Tc3	270	5.51	94.1	1.08	3.86	0.02
8	10	GR-Tc3	236	4.48	83.0	0.98	3.36	0.02
9	20	GR-Tc2	220	4.61	82.2	0.59	3.07	0.01
10	20	GR-Tc2	240	5.70	83.6	0.47	3.83	0.02
11	20	GR-Tc3	230	4.60	86.5	0.80	2.82	0.02
12	20	GR-Tc3	228	4.65	84.1	1.50	3.49	0.02
13	40	GR-Tc2	237	5.20	85.0	0.43	3.80	0.01
14	40	GR-Tc2	248	6.01	88.6	1.34	3.55	0.01
15	40	GR-Tc3	255	4.72	92.8	0.97	3.06	0.02
16	40	GR-Tc3	270	4.40	87.6	1.00	3.07	0.03
17	60	GR-Tc2	223	6.36	83.3	0.66	3.85	0.01
18	60	GR-Tc2	229	6.78	88.6	0.64	3.40	0.01
19	60	GR-Tc3	269	5.17	81.8	0.96	3.17	0.02
20	60	GR-Tc3	232	4.89	87.8	0.78	2.68	0.02
Rata	t (min)	Lote	Peso(g)	Músculo	Corazón	Bazo	Pulmón	Total
1	5	GR-Tc2	220	1.76	0.76	0.65	1.42	108
2	5	GR-Tc2	238	1.86	0.76	0.98	1.64	109
3	5	GR-Tc3	205	2.91	0.91	0.80	1.92	111
4	5	GR-Tc3	251	2.50	0.53	0.95	2.35	105
5	10	GR-Tc2	243	2.07	0.70	1.03	1.00	100
6	10	GR-Tc2	249	0.83	0.45	0.94	0.81	95.2
7	10	GR-Tc3	270	2.12	0.39	1.17	2.49	111
8	10	GR-Tc3	236	3.14	0.53	0.91	2.16	98.6
9	20	GR-Tc2	220	1.83	0.65	1.00	1.13	95.1
10	20	GR-Tc2	240	2.80	0.61	1.18	1.37	99.6
11	20	GR-Tc3	230	1.92	0.47	1.16	2.12	100.4
12	20	GR-Tc3	228	2.34	0.45	1.15	2.11	99.8
13	40	GR-Tc2	237	2.21	0.33	1.02	0.98	99.0
14	40	GR-Tc2	248	1.44	0.41	1.33	1.13	104
15	40	GR-Tc3	255	2.15	0.53	0.85	1.87	107
16	40	GR-Tc3	270	2.24	0.42	1.16	2.69	103
17	60	GR-Tc2	223	2.81	0.33	1.11	1.07	99.5
18	60	GR-Tc2	229	3.00	0.39	1.16	1.53	105
19	60	GR-Tc3	269	1.82	0.45	1.33	2.22	96.9
20	60	GR-Tc3	232	2.74	0.38	0.98	1.95	102.2

Tabla 5.7.- Biodistribución de $^{99m}\text{Tc-GR}$ en el animal entero después de haber sido anestesiado. En la tabla se recoge el número de ratas estudiadas, los tiempos, el peso del animal entero, los porcentajes acumulados en cada órgano (relación entre la actividad inicial inyectada y la actividad multiplicada por cien) y el porcentaje total (suma de todos los porcentajes de los órganos).

Rata	t (min)	Lote	Æ (nm)	Peso(g)	Hígado	Sangre	Hueso	Riñón	Tiroide
1	5	PLGA-8	147	234	76.2	11.4	2.71	1.72	0.06
2	5	PLGA-6	207	220	76.4	11.2	2.62	1.85	0.08
3	5	PLGA-11	129	242	73.6	12.2	2.55	2.42	0.02
4	5	PLGA-11	129	251	71.3	13.7	3.30	2.69	0.03
5	10	PLGA-6	207	242	75.4	10.0	2.87	1.75	0.12
6	10	PLGA-7	106	249	80.7	9.29	2.62	1.69	0.10
7	10	PLGA-7	106	256	79.7	9.15	2.83	1.12	0.04
8	10	PLGA-7	106	259	78.9	11.0	2.28	1.84	0.06
9	20	PLGA-7	106	240	82.6	7.18	2.91	1.73	0.06
10	20	PLGA-7	106	237	81.9	6.07	2.73	1.71	0.05
11	20	PLGA-11	129	253	75.5	11.5	5.51	2.72	0.02
12	20	PLGA-11	129	232	76.4	10.2	3.55	2.95	0.09
13	40	PLGA-11	129	239	70.6	8.89	5.60	3.67	0.02
14	40	PLGA-11	129	226	77.2	9.41	4.07	3.11	0.02
15	40	PLGA-11	129	233	74.3	8.71	2.18	5.42	0.04
16	40	PLGA-11	129	203	77.2	10.8	2.07	5.15	0.07
17	60	PLGA-8	147	255	77.1	3.78	2.44	2.58	0.04
18	60	PLGA-8	147	228	75.0	3.79	3.43	3.01	0.04
19	60	PLGA-11	129	258	73.3	8.49	4.07	5.27	0.02
20	60	PLGA-11	129	207	73.5	6.67	4.21	4.22	0.02

Rata	t (min)	Lote	Æ (nm)	Peso(g)	Músculo	Corazón	Bazo	Pulmón	Total
1	5	PLGA-8	147	234	2.32	0.32	1.71	1.11	97.6
2	5	PLGA-6	207	220	3.80	0.30	1.72	1.91	99.9
3	5	PLGA-11	129	242	3.63	0.35	1.00	1.70	97.5
4	5	PLGA-11	129	251	3.07	0.34	1.20	1.95	97.6
5	10	PLGA-6	207	242	3.84	0.38	1.63	1.27	97.3
6	10	PLGA-7	106	249	2.74	0.27	1.57	1.6	101
7	10	PLGA-7	106	256	1.57	0.23	2.18	0.91	97.7
8	10	PLGA-7	106	259	1.39	0.30	1.80	0.71	98.3
9	20	PLGA-7	106	240	2.26	0.20	2.23	1.64	101
10	20	PLGA-7	106	237	2.02	0.15	2.33	1.56	98.5
11	20	PLGA-11	129	253	3.84	0.28	1.45	0.91	102
12	20	PLGA-11	129	232	3.61	0.37	1.89	0.81	99.9
13	40	PLGA-11	129	239	3.34	0.17	1.20	0.98	94.5
14	40	PLGA-11	129	226	3.13	0.17	1.68	0.77	99.6
15	40	PLGA-11	129	233	3.08	0.27	1.65	0.78	96.4
16	40	PLGA-11	129	203	2.80	0.18	1.78	0.68	101
17	60	PLGA-8	147	255	1.35	0.09	2.83	1.35	91.6
18	60	PLGA-8	147	228	2.15	0.13	2.57	1.68	91.8
19	60	PLGA-11	129	258	4.54	0.16	1.50	0.94	98.3
20	60	PLGA-11	129	207	3.61	0.19	1.45	0.76	94.6

Tabla 5.8.- Biodistribución de ^{99m}Tc - nanoesferas de PLGA 33000 en el animal entero después de haber sido anestesiado. En la tabla se recoge el número de ratas estudiadas, los tiempos, el diámetro medio de las nanoesferas antes de ser inyectadas (\varnothing medio(nm)), el peso del animal entero, los porcentajes acumulados en cada órgano (relación entre la actividad inicial inyectada y la actividad multiplicada por cien) y el porcentaje total (suma de todos los porcentajes de los órganos).

t (min)	Lote	Æ (nm)	Peso(g)	Hígado	Sangre	Hueso	Riñón	Tiroide	
1	5	PEG-PLGA-6	104	220	54.5	35.1	3.22	3.46	0.05
2	5	PEG-PLGA-6	104	288	53.3	39.1	2.93	3.05	0.04
3	5	PEG-PLGA-9	115	209	50.0	30.3	7.61	3.58	0.06
4	5	PEG-PLGA-9	115	233	48.2	32.9	8.13	4.92	0.05
5	10	PEG-PLGA-6	104	222	55.5	23.7	3.17	2.23	0.04
6	10	PEG-PLGA-6	104	217	54.9	19.6	3.56	2.83	0.04
7	10	PEG-PLGA-9	115	221	45.5	21.4	7.64	3.70	0.04
8	10	PEG-PLGA-9	115	220	46.0	20.9	8.57	5.10	0.04
9	20	PEG-PLGA-6	104	225	53.4	17.1	4.14	2.34	0.03
10	20	PEG-PLGA-6	104	252	54.5	18.2	4.49	2.52	0.03
11	20	PEG-PLGA-9	115	211	50.3	20.0	7.20	2.90	0.04
12	20	PEG-PLGA-9	115	208	49.4	17.8	8.17	5.19	0.05
13	40	PEG-PLGA-6	104	198	50.3	13.2	6.06	3.00	0.02
14	40	PEG-PLGA-6	104	207	54.5	12.4	4.77	3.21	0.04
15	40	PEG-PLGA-9	115	211	50.4	14.2	8.54	3.97	0.04
16	40	PEG-PLGA-9	115	203	51.8	15.9	8.11	4.42	0.03
17	60	PEG-PLGA-6	104	227	53.2	9.71	4.66	4.20	0.03
18	60	PEG-PLGA-6	104	195	54.8	9.53	6.42	4.16	0.05
19	60	PEG-PLGA-9	115	210	53.5	11.4	9.50	6.09	0.03
20	60	PEG-PLGA-9	115	202	50.3	11.5	8.90	4.95	0.03

Rata	t (min)	Lote	Æ (nm)	Peso(g)	Músculo	Corazón	Bazo	Pulmón	Total
1	5	PEG-PLGA-6	104	220	3.13	0.84	0.83	1.02	102
2	5	PEG-PLGA-6	104	288	4.14	0.73	1.03	0.86	105
3	5	PEG-PLGA-9	115	209	5.61	0.65	1.13	1.44	100.4
4	5	PEG-PLGA-9	115	233	3.71	0.47	1.06	1.19	100.6
5	10	PEG-PLGA-6	104	222	4.57	0.59	1.25	0.84	91.9
6	10	PEG-PLGA-6	104	217	5.48	0.74	0.95	1.08	89.2
7	10	PEG-PLGA-9	115	221	6.97	0.42	1.13	1.24	88.0
8	10	PEG-PLGA-9	115	220	6.6	0.44	0.88	1.04	89.6
9	20	PEG-PLGA-6	104	225	2.71	0.26	1.09	0.52	81.6
10	20	PEG-PLGA-6	104	252	2.41	0.38	0.92	0.49	83.9
11	20	PEG-PLGA-9	115	211	5.98	0.34	1.15	0.97	88.9
12	20	PEG-PLGA-9	115	208	6.14	0.31	0.92	1.12	89.1
13	40	PEG-PLGA-6	104	198	5.16	0.23	0.83	0.43	79.2
14	40	PEG-PLGA-6	104	207	4.37	0.35	0.65	0.51	80.8
15	40	PEG-PLGA-9	115	211	4.35	0.28	1.32	1.06	84.2
16	40	PEG-PLGA-9	115	203	6.56	0.32	0.77	0.87	88.8
17	60	PEG-PLGA-6	104	227	2.90	0.16	1.03	0.47	76.4
18	60	PEG-PLGA-6	104	195	4.23	0.18	0.93	0.45	80.8
19	60	PEG-PLGA-9	115	210	4.21	0.25	1.38	0.91	87.3
20	60	PEG-PLGA-9	115	202	3.92	0.19	0.99	0.71	81.5

Tabla 5.9.- Biodistribución de ^{99m}Tc- nanoesferas de PEG-PLGA 25000 en el animal entero después de haber sido anestesiado. En la tabla se recoge el número de ratas estudiadas, los tiempos, el diámetro medio de las nanoesferas antes de ser inyectadas (∅ medio(nm)), el peso del animal entero, los porcentajes acumulados en cada órgano (relación entre la actividad inicial inyectada y la actividad multiplicada por cien) y el porcentaje total (suma de todos los porcentajes de los órganos).

Rata	t (min)	Lote	Æ (nm)	Peso(g)	Hígado	Sangre	Hueso	Riñón	Tiroide
1	5	mPEG-PLGA-4	156	219	49.9	40.3	2.88	2.81	0.13
2	5	mPEG-PLGA-4	156	212	51.3	38.1	2.32	2.45	0.12
3	5	mPEG-PLGA-6	190	237	45.6	37.9	3.65	4.77	0.05
4	5	mPEG-PLGA-6	190	227	43.2	36.0	6.04	4.93	0.04
5	10	mPEG-PLGA-4	156	191	47.9	24.4	4.32	2.55	0.13
6	10	mPEG-PLGA-4	156	218	48.1	22.2	4.22	2.60	0.08
7	10	mPEG-PLGA-6	190	243	44.9	27.0	6.01	3.73	0.05
8	10	mPEG-PLGA-6	190	220	49.2	31.2	5.35	2.36	0.04
9	20	mPEG-PLGA-4	156	196	53.3	16.5	4.95	3.01	0.08
10	20	mPEG-PLGA-4	156	206	56.9	17.2	5.15	2.83	0.04
11	20	mPEG-PLGA-6	190	215	52.3	14.6	7.70	3.41	0.04
12	20	mPEG-PLGA-6	190	224	47.7	15.6	8.75	4.17	0.04
13	40	mPEG-PLGA-4	156	204	50.7	14.3	4.92	4.72	0.04
14	40	mPEG-PLGA-4	156	208	48.9	15.8	6.49	4.45	0.05
15	40	mPEG-PLGA-6	190	251	46.3	17.9	4.17	4.53	0.04
16	40	mPEG-PLGA-6	190	207	53.0	14.8	6.75	5.09	0.04
17	60	mPEG-PLGA-4	156	229	47.6	11.6	6.83	4.14	0.06
18	60	mPEG-PLGA-4	156	207	50.1	11.8	7.03	4.07	0.05
19	60	mPEG-PLGA-6	190	239	47.5	14.0	6.85	6.08	0.02
20	60	mPEG-PLGA-6	190	227	49.9	14.5	7.47	6.02	0.03

Rata	t (min)	Lote	Æ (nm)	Peso(g)	Múscul	Corazón	Bazo	Pulmón	Total
1	5	mPEG-PLGA-4	156	219	5.55	0.92	0.57	1.46	105
2	5	mPEG-PLGA-4	156	212	5.30	0.94	0.56	1.08	102
3	5	mPEG-PLGA-6	190	237	6.18	0.67	0.71	0.92	100
4	5	mPEG-PLGA-6	190	227	6.49	0.58	0.54	1.02	98.8
5	10	mPEG-PLGA-4	156	191	5.08	0.32	0.45	0.76	85.9
6	10	mPEG-PLGA-4	156	218	4.21	0.33	0.39	0.71	82.8
7	10	mPEG-PLGA-6	190	243	6.58	0.48	0.50	0.92	90.2
8	10	mPEG-PLGA-6	190	220	4.39	0.33	0.49	0.63	94.0
9	20	mPEG-PLGA-4	156	196	4.19	0.23	0.47	0.59	83.3
10	20	mPEG-PLGA-4	156	206	3.66	0.17	0.54	0.57	87.1
11	20	mPEG-PLGA-6	190	215	4.42	0.29	0.61	0.62	84.0
12	20	mPEG-PLGA-6	190	224	5.32	0.32	0.55	0.71	83.2
13	40	mPEG-PLGA-4	156	204	3.94	0.23	0.39	0.68	79.9
14	40	mPEG-PLGA-4	156	208	3.28	0.16	0.47	0.59	80.2
15	40	mPEG-PLGA-6	190	251	4.18	0.26	0.44	0.54	78.4
16	40	mPEG-PLGA-6	190	207	3.72	0.26	0.49	0.43	84.6
17	60	mPEG-PLGA-4	156	229	3.91	0.17	0.50	0.60	75.4
18	60	mPEG-PLGA-4	156	207	3.77	0.28	0.33	0.64	78.1
19	60	mPEG-PLGA-6	190	239	3.71	0.29	0.48	0.52	79.4
20	60	mPEG-PLGA-6	190	227	6.04	0.35	0.62	0.57	85.5

Tabla 5.10.- Biodistribución de ^{99m}Tc -nanoesferas de mPEG-PLGA 27000 en el animal entero después de haber sido anestesiado. En la tabla se recoge el número de ratas estudiadas, los tiempos, el diámetro media de las nanoesferas antes de ser inyectadas (\varnothing medio(nm)), el peso del animal entero, los porcentajes acumulados en cada órgano (relación entre la actividad inicial inyectada y la actividad multiplicada por cien) y el porcentaje total (suma de todos los porcentajes de los órganos).

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

1. Se optimizó un sistema para la elaboración de nanoesferas. La forma de las mismas se verificó mediante perfilometría, y su tamaño, comprendido entre 200 y 400 nm, por perfilometría y por espectroscopía de correlación fotónica.
2. Se verificó mediante XPS la presencia del tensoactivo utilizado en la superficie de las nanoesferas. El tensoactivo y los agentes utilizados no inhibieron por completo la agregación provocada por la liofilización.
3. Las relaciones de áreas de las curvas de actividad – tiempo entre 0 y 60 minutos respecto a las de los hematíes fueron 15:1, 10:1 y 9,8:1 para las nanoesferas de PLGA, PEG-PLGA y mPEG-PLGA, lo que supone una notable captación hepática de estos sistemas.
4. La evaluación farmacocinética de los ensayos de biodistribución, llevada a cabo mediante un modelo compartimental lineal de siete compartimentos, nos permite concluir:
 - a. La principal diferencia radica en la constante de velocidad de transferencia entre el compartimentos hemático y el hepático reversible; los valores estimados para esta constante de velocidad (s^{-1}), fueron 0,0099, 0,60, 0,25 y 0,19 para los hematíes y para las nanoesferas de PLGA, PEG-PLGA y mPEG-PLGA respectivamente.
 - b. Los volúmenes de distribución hepático en el equilibrio estimados, relativos al volumen vascular (ml), fueron 0,060, 8,27, 2,00 y 2,14 para los hematíes y para las nanoesferas de PLGA, PEG – PLGA y mPEG – PLGA respectivamente, lo que evidencia la gran capacidad de captación de estos sistemas por el hígado, especialmente para las nanoesferas de PLGA.
5. Se propone un modelo experimental para el estudio in situ de la captación hepática. La evaluación de los resultados nos permite concluir:
 - a. Las tasas de extracción de las nanoesferas fueron, en su conjunto, superiores a las de los hematíes, siendo estadísticamente significativas la diferencia de

promedios entre las nanoesferas de PLGA y de PEG – PLGA y mPEG – PLGA; las diferencias entre estos dos grupos fueron no significativas.

- b. Los tiempos medios de transferencia intrahepática medidos a la salida del hígado se ordenaron en la forma mPEG – PLGA > PEG – PLGA > PLGA, si bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

6.

- a. Se propone un modelo teórico para evaluar los ensayos de captación in situ basado en la convolución numérica de la función característica del sistema experimental con un modelo de dos compartimentos que describe la distribución hepática de las nanoesferas.
- b. Los tiempos medios de residencia intrahepático medidos directamente, así como los estimados con el modelo propuesto se ordenaron en la forma mPEG-PLGA > PEG-PLGA > PLGA, orden inverso al observado para los tiempos de residencia globales, por lo que concluimos:

Primero: El menor tiempo de residencia de las nanoesferas preparadas a partir de los polímeros derivados del PEG se deben fundamentalmente a una reducción del tiempo medio en el espacio sinusoidal.

Segundo: El tiempo medio de residencia en el copolímero de fijación reversible, es mayor para las nanoesferas elaboradas con los polímeros derivados del PEG. Al no aumentar la tasa de extracción, hemos de aceptar que el proceso de paso al compartimento 3 de acumulación está parcialmente limitado por la presencia de PEG.

Bibliografia

- Abuchowski, A., Van Es, T., Palzuk, N. and Davis, F.** (1977) Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. *J Biol. Chem.* 252, 3578-3581.
- Ahmad, A.B. Bennett, P.N., Rowland, M.** (1983) Model of hepatic drug clearance: Discrimination between the "Well-Stirred" and "Parallel-Tube" models. *J. Pharm. Pharmacol.* 35, 219-244.
- Allen, T.M.** (1994) The use of glycolipids and hydrophilic polymers in avoiding rapid uptake of liposomes by the mononuclear phagocyte system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 13, 285-309.
- Alonso, M.J., Cohen, S., Park, T.G., Gupta, R.K., Siber, G.R., Langer, R.** (1993) Determinant of release rate of tetanus vaccine from polyester microspheres. *Pharmaceut. Res.* 10, 945-953.
- Artusson, P., Sjöholm, Y.** (1986) Effect of opsonins on the macrophage uptake of polyacrylstarch microparticles. *Int. J. Pharm.* 32, 165-170.
- Bass, L.** (1980) Flow dependence of first-order uptake of substances by heterogeneously perfused organs. *J. Theor. Biol.* 86, 365-376.
- Bass, L.** (1983) Models hepatic elimination. *J. Pharm. Sci.* 72, 1229.
- Bass, L., Keiding, S., Winkler, K., Tygstrup, N.** (1976) Enzymatic elimination of substrates flowing through the intact liver. *J. Theor. Biol.* 61, 393-409.
- Bass, L., Robinson, P.J., Bracken, A. J.** (1978) Hepatic elimination of flow substances: The distributed model. *J. Theor. Biol.* 72, 161-184.
- Bazile, D.V., Proud'Homme, C., Bassoullet, M.T., Marlard, M., Spenlehauer, G., Veillard, M.** (1995) Stealth Me.PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system. *J Pharm. Sci.* 4, 493-498.

Bazile, D.V., Verrechia, T., Bassoulet, M.-T., Marlard, M., Spenlehauer, G., Veillard, M. (1993) Ultradispersedpolymer system with rate and time control. *Yakuzaigaku* 53, 10-13.

Bergström, K., Österbeg, E., Holmberg, K., Hoffman, A.S., Shuman, T.P., Kozlowski, A., Harris, M. (1994) Effects of branching and molecular weight of surface-bound poly(ethylene oxide) on protein rejection. *J. Biomater. Sci.-Polymer Edn.* 6, 123-132.
biodistribution. *Pharmacol. Res.* 11, 1016-1022.

Blume, G., Cevc, G. (1990) Liposomes for the sustained drug release in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 1029, 91-97.

Blume, G., Cevc, G. (1993) Molecular mechanism of the lipid vesicle longevity in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 1146, 157-168.

Blunk, T., Hochstrasser, D.F., Sanchez, J.C., Müller, B.V., Müller, R.H. (1993) Colloidal carriers for intravenous drug targeting-Determination of plasma protein adsorption patterns on surface-modified latex particles by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis.* 14, 1382-1387.

Boisvieux, J.F., Steimer, J.L. (1979) A non-linear mathematical model for the in vivo determination of kupffer cells number and rate of phagocytosis of radiocolloids in rats. *Int. J. Bio-Medical Computing* 10, 331-340.

Borchard, G., Kreuter, J. (1993) Interaction of serum components with poly(methyl methacrylate) nanoparticles and the resulting body distribution after intravenous injection in rats. *J. Drug Target.* 1, 15-19.

Chonn, A., Semple, S.C., Cullis, P.R. (1991) Separation of large unilamellar liposomes from blood components by a spin column procedure: towards identifying plasma proteins which mediate liposome clearance in vivo. *Biochim. Biophys. Acta.* 1070, 215-222.

Chonn, A., Semple, S.C., Cullis, P.R. (1992) Association of blood proteins with large unilamellar liposomes in vivo: relation to circulation lifetimes. *J. Biol. Chem.* 267, 18759-18765.

Chouly, C., Pouliquen, D., Lucet, I., Jeune, J.J., Jallet, P. (1996) Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *J Microencapsul.* 3, 245-255.

Chuang H.Y.K., Mohammad S., Mason R., Mason R.G. (1980) Interaction of human α -thrombin with artificial surfaces and reactivity of adsorbed α -thrombin. *J. Biomed. Mater. Res.* 14, 467-476.

Collin-Gold, L.C., Lyons R.T., Bartholow, L.C. (1990) Parenteral emulsions for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 5, 189-208.

Coombes, K. R., Hunt, B. R., Lipsman, R. L., Osborn, J. E. y Garrett, J. Stuck. (1995) *Differential Equations with Mathematica™*. John Wiley & Sons, N.Y.

Covreur, P. (1988) Polyalkylcyanocrylates as colloidal drug carriers. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 5, 1-120.

Delgado, C., Francis, G.E., Fisher, D. (1992) The uses and properties of PEG-linked proteins. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 9, 249-304.

Desai, N., Hubbell, J. (1992) Surface physical interpenetrating networks of poly(ethylene terephthalate) and poly(ethylene oxide) with biomedical applications. *Macromolecules* 25, 226-232.

Diaz, R.V. (1993) Microesferas de Poliláctico marcadas con ^{99m}Tc . Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Universidad de La Laguna.

Dorta, M.J., Munguia, O., Llabrés, M. (1993) Effects of polymerization variables on PLGA properties: molecular weight, composition and chain structure. *Int. J. Pharm.*, 100, 9-14.

Dreborg, S., Akerblom, E.B. (1990) Immuno-therapy with monomethoxypolyethylene glycol modified allergens. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 6, 315-365.

Dunn, S., Brindley, A., Davis, S., Davies, M., Illum, L. (1994a) Polystyrene - poly(ethylene glycol) (PS-PEG2000) particles as model systems for site specific drug delivery. 2. The effect of PEG surface density on in vitro cell interaction and in vivo

Dunn, S.E., Stolnick, S., Garnett, M.C., Davies, M.C., Coombes, A.G.A., Taylor, D.C., Irving, M.P., Purkiss, S.C., Tadros, Th.F., Davis, S.S., Illum, L. (1994b) Biodistribution studies investigating poly(lactide-co-glycolide) nanospheres surface modified by novel biodegradable copolymers., *Proc. Int. Symp. Controll. Release Bioact. Mater., Controll. Release Soc.* 21, 210-211.

Forker, E.L., Luxon, B. (1978) Hepatic transport kinetics and plasma disappearance curves: Distributed model. *Am. J. Physiol.* 235, E648-E660.

Forker, E.L., Luxon, B.A. (1982) Hepatic transport kinetics: effect of an anatomic and metabolic heterogeneity on estimates of the average transfer coefficients. *Am. J. Physiol.* 243, G532-G540.

Forker, E.L., Luxon, B.A. (1983) Albumin binding and hepatic uptake: the importance of model selection. *J Pharm. Sci.* 72, 1232-1233.

Furitsu, H., Ogawara, K., Fujita, T., Yamashita, F., Takakura, Y., Sezaki, H., Hashida, M. (1997) Pharmacokinetic analysis of scavenger receptor-mediated uptake of anionized proteins in the isolated perfused rat liver. *Int. J. Pharm.* 151, 15-26.

Gilding, D.K., Reed, A.M. (1979) Biodegradable polymers for use in surgery polyglycolic/poly(lactic acid) homo and copolymers: 1. *Polymers* 20, 1459-1464.

Gopal, B.S. (1979) Miscellaneous compounds of clinical interest. Characteristic of specific radiopharmaceuticals. (Chap.7). In: Fundamentals of Nuclear Pharmacy. Ed: Springer-Verlag. New York. 95-115.

Goresky, C.A. (1963) A linear method for determining liver sinusoidal and extravascular volumes. Am. J. Physiol. 204, 626-640.

Goresky, C.A., Goldsmith, H.L. (1973) Capillary-tissue exchange kinetics: Diffusional interactions between adjacent capillaries. Adv. Exp. Biol. Med. 37B, 773-781.

Greenway, C.V., Stark, R.D. (1971) Hepatic vascular beds. Physiol. Rev. 51, 23-65.

Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M.T., Trubetskoy, V., Milshteyn, A., Sinkule, J., Torchilin, V., Langer R. (1993) Biodegradable PEG-coated stealth nanospheres. Proc. Int. Symp. Controll. Release Bioact. Mater., Controll. Release Soc. 20, 131-132.

Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M.T., Trubetskoy, V., Torchilin, V., Langer, R. (1994) Biodegradable long-circulating nanospheres. Science 263, 1600-1603.

Gref, R., Domb, A., Quellec, P., Blunk, T., Müller, R.H., Verbavatz, J.M., Langer, R. (1995) The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilised nanospheres. Adv. Drug Deliv. Rev. 16, 215-233.

Guy, R.H., Hadgraft, J. (1983) Physicochemical interpretation of the pharmacokinetics of percutaneous absorption. J. Pharmacokin. Biopharm. 11, 189-203.

Guyton, A.C., Hall, J.E. (1996) El hígado como un órgano. (Cap 70) En: Tratado de fisiología médica. Novena edición. Edición Mc Graw-Hill, Interamericana de España, Madrid, 961-967

- Han, D. Jeong, S., Ahn, D., Kim, Y., Min, B.** (1993) Preparation and surface properties of POE-sulfonate grafted polyurethanes for enhanced blood compatibility. *J. Biomater. Sci.-Polymer Edn.* 4, 579-589.
- Harms, P.G., Ojeda, S.R.** (1974) A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. *J. App. Physiol.* 36, 391-392.
- Harper, G.R., Davis, M.C., Davis, S.S., Tadros, T.F., Taylor, D.C. Irving, M.P., Waters, J.A.** (1991) Steric stabilisation of microspheres with grafted polyethylene oxide reduces phagocytosis by rat Kupffer cells in vitro. *Biomaterials* 12, 695-609.
- Harris, J.** (1985) Laboratory synthesis of polyethyleneglycol derivatives. *J. Macromol. Sci.-Rev. Macromol. Chem. Phys.* C25, 325-373.
- Illum, L. Davis, S.S.** (1983) Effect of the nonionic surfactant poloxamer 338 on the fate and deposition of polystyrene microspheres following intravenous administration. *J Pharm. Sci.* 72, 1086-1089.
- Illum, L., Davis, S.S.** (1987) Targeting of colloidal particles to the bone marrow. *Life Sci.* 40, 1553-1560.
- Illum, L., Davis, S.S.** (1984) The organ uptake of intravenously administered colloidal particles can be altered using nonionic surfactant (poloxamer 338). *FEBS Lett.* 167, 79-82.
- Illum, L., Davis, S.S., Müller, R.H., Mak, E., West, P.** (1987a) The organ distribution and circulation time of intravenously injected colloidal carriers sterically stabilised with a block copolymer-Polaxamine 908. *Life Sci.* 40, 367-374.
- Illum, L., Jacobsen, L.O., Müller, R.H. Mak, E., Davis, S.S.** (1987b) Surface characteristics and the interaction of colloidal particles with mouse peritoneal macrophages. *Biomaterials* 8, 113-117.

Jamshaid, M., Farr, S.J., Kearney, P., Kellaway, I.W. (1988) Poloxamer sorption on liposomes: comparison with polystyrene latex and influence on solute efflux. *Int. J. Pharm.* 48, 125-131.

Jeon, S.I. and Andrade, J.D. (1991) Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide. II. Effect of protein size. *J. Colloid Interf. Sci.* 142, 159-166.

Jeon, S.I., Lee, J. H., Andrade, J.D., De Gennes, P.G. (1991) Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide. I. Simplified theory. *J. Colloid Interf. Sci.* 142, 149-158.

Jones, D.B., Morgan, D.J., Mihaly, G.W., Webster, L.K., Smallwood, R.A. (1984) Discrimination between venous equilibrium and sinusoidal models of hepatic drug elimination in isolated perfused rat liver by perturbation of propranolol protein binding. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 229, 522-526.

Jordan, J. A., Alvarez, F.J., Murciano, J.C., Lotero, L.A., Herráez, A., Tejedor, M.C., Luque, J., DeLoach, J.R., Díez, J.C. (1997) Influence of chemical modification on "in vivo" and "in vitro" mouse carrier erythrocyte survival and recognition. In: *Erythrocytes as Drug Carriers in Medicine*, (U. Sprandel, J.L. Way, eds.), Plenum Press, New York, 109-118.

Juliano, R.L. (1983) Interactions of proteins and drugs with liposomes. In: *Liposomes*, (M. Ostro, ed.), Marcel Dekker, New York, 53-86.

Juliano, R.L. (1988) Factors affecting the clearance kinetics and tissue distribution of liposomes, microspheres and emulsions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2, 31-54.

Juliano, R.L., Layton, D. (1980) Liposomes as a drug delivery system. In: *Drug Delivery System* (Juliano, R.L., ed.) Oxford University Press, New York, 189-236.

Kataoka, K. Kwon, G.S., Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y. (1993) Block copolymer micelles as vehicles for drug delivery. *J. Contoll. Release* 24, 119-132.

Katre, N.V. (1993) The conjugation of proteins with polyethylene glycol and other polymers: Altering properties of proteins to enhance their therapeutic potential. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 10, 91-114.

Kayes, J.B., Rawlins, D.A. (1979) Adsorption characteristics of certain polyoxyethylene-polyoxypropylene block copolymers on polystyrene latex. *Coll. Polym. Sci.* 257, 622-629.

Keiding, S., Chiarantini, E. (1978). Effect of sinusoidal perfusion on galactose elimination in perfused rat liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 205, 465-470.

Keiding, S., Steiness, E. (1984) Flow dependence of propranolol elimination in perfused rat liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 230, 474-477.

Khaw, B.-A., Strauss, W., Cahill, S., Soule, H., Edington, T., Cooney, J. (1984) Sequential imaging of Indium-111 labelled monoclonal antibody in human mammary tumours hosted in nude mice. *J. Nucl. Med.* 25, 592-603.

Kishida, A., Mishima, K., Corretge, E., Konishi, H., Ikada, Y. (1992) Interactions of poly(ethylene glycol)-grafted cellulose membranes with proteins and platelets. *Biomaterials* 13, 113-118.

Klibanov, A.L., Maruyama, K., Torchilin, V.P., Huang, L. (1990) Amphiphilic poly(ethylene glycols) effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett.* 268, 235-237.

Koo, A.I., Liang, I.Y.S., Cheng, K.K. (1975) The terminal hepatic microcirculation in the rat. *Q. J. Exp. Physiol.* 60, 261-266.

Krause, H.J., Schwartz, A., Rohdewald, P. (1985) Polylactic acid nanoparticles, a colloidal drug delivery system for lipophilic drugs. *Int. J. Pharm.* 27, 145-155.

- Kreuter, J.** (1983) Evaluation of nanoparticles as Drug-Delivery Systems III: Materials, Stability, Toxicity, Possibilities of targeting, and use. *Pharm. Acta Helv.* 9-10, 242-250.
- Le Ray, A.M., Vert, M., Gautier, J.C., Benot, J.P.** (1994) End-Chain Radiolabeling and in vitro stability studies of radiolabeled poly(hydroxy acid) nanoparticles. *J. Pharm. Sciences* 83, 845-851.
- Leroux, J.C., Gravel, P., Balant, L., Volet, B., Anner, B.M., Alleman, E., Doelker, E., Gurny, R.** (1994) Internalization of poly(D,L-lactide acid) nanoparticles by isolated human leukocytes and analysis of plasma proteins adsorbed onto the particles. *J. Biomed. Mater. Res.* 28, 471-481.
- Leroux, J.C., Jeaghere, F.D., Anner, B., Doelker, E., Gurny, R.** (1995) An investigation on the role of plasma and serum opsonins on the internalization of biodegradable poly(D,L-Lactic acid) nanoparticles by human monocytes. *Life Sci.* 7, 695-703.
- Levenspiel, O.** (1972) *Chemical reaction Engineering*, Wiley, New York, pp. 253-315.
- Levenspiel, O.** (1979) *The Chemical Reactor Omnibook*. OSU Book Stores, Corvallis, OR.
- Magenheim, B., Benita, S.** (1991) Nanoparticle characterisation: A comprehensive physiochemical approach. *J. Pharm. Sciences.* 4, 221-241.
- Maguire, T.A., Swanton, J.G., Temple, D.J., Fairweather, I.** (1984) An assessment of the suitability of a modified technique of in situ rat-liver perfusion for the study of certain hepatic drug -drug interactions. *J. Pharmacol.* 12, 265-283.
- Mallol, J.** (1989) Síntesis de moléculas marcadas. (Cap 3) En: *Radiofarmacia. Trazadores radioactivos de uso clínico*. Edición Mc Graw-Hill, Interamericana de España, Madrid, 29-35.
- Meadez, R.E.** (1990) *Programing in Mathematica*. Addison-Wesley, redwood City, CA.

Miller, D.L., Zanolli, C.S., Gumucio, J.J. (1979) Quantitative morphology of the sinusoids of the hepatic acinus: Quantiment analysis of rat liver. *Gastroenterology* 76, 965-969.

Moghimi, S., Muir, I., Illum, L., Davis, S., Kolb-Bachofen, V. (1993) Coating particles with a block copolymer (polaxamine 908) suppresses opsonisation but permits the activity of dysopsonins in the serum. *Biochim. Biophys. Acta* 1179, 157-165.

Moghimi, S.M., Hedeman, H., Muir, I.S., Illum, L., Davis, S.S. (1993) An investigation of the filtration capacity and the fate of large filtered sterically-stabilized microspheres in rat spleen. *Biochim. Biophys. Acta* 1157, 233-240.

Moghimi, S.M., Porter, C.J.H., Illum, L., Davis, S.S. (1991a) The effect of polaxamer-407 on liposome stability and targeting to bone marrow: comparison with polystyrene microspheres. *Int. J. Pharm.* 68, 121-126.

Moghimi, S.M., Porter, C.J.H., Muir, I.S., Illum, L., Davis, S.S., (1991b) Non phagocytic uptake of intravenously injected micropsheres in rat spleen: influence of particle size and hydrophilic coating. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 861-866.

Morgan, D.J. (1983) Models of hepatic elimination: A response. *J. Pharm. Sci.* 72, 1230.

Mori, A., Klibanov, A.L., Torchilin, V.P., Huang, L. (1991) Influence of steric barrier activity of amphipathic poly(ethyleneglycol) and ganglioside GM₁ on the circulation time of liposomes and on the target binding of immunoliposomes in vivo. *FEBS Lett.* 284, 263-266.

Müller B.G., Kissel, T. (1993) Camouflage nanospheres: a new approach to bypassing phagocytic blood clearance by surface modified particulate carriers. *Pharm. Pharmacol. Lett.* 3, 67-70.

Nelder, J.A., Mead, R. (1964) A simplex method for function minimization. *Compute J.* 7, 308-313.

Nishikawa, M., Miyazaki, C., Yamashita, F., Takakura, Y., Hashida, M. (1995) Galactosylated proteins are recognized by liver according to the surface density of galactose moieties. *Am. Physiol.* 268, G849-G856.

Nishikawa, M., Ohtsubo, Y., Ohno, J., Fujita, T., Koyama, Y., Yamashita, F., Hashida, M., Sezaki, H. (1992) Pharmacokinetics of receptor-mediated hepatic uptake of glycosylated albumin in mice. *Int. J. Pharm.* 85, 75-85.

Nishikawa, M., Opanasopit, P., Shiraishi, D., Takakura, Y., Hashida, M. (1998) Pharmacokinetic analysis of mannose receptor-mediated hepatic targeting of proteins: Capacity-limited hepatic uptake and saturable binding in plasma. *Proc. Int. Symp. Controll. Release Bioact. Mater., Controll. Release Soc.*, 25, 506-507.

Norman, M.E., Williams, P., Illum, L. (1992) Human serum albumin as a probe for surface conditioning (opsonization) of block copolymer-coated microspheres. *Biomaterials* 13, 841-849.

Norman, M.E., Williams, P., Illum, L. (1993) The adsorption of plasma and serum proteins to block copolymer coated microspheres. *Biomaterials* 14, 193-202.

Ogawara, K., Nishikawa, M., Takakura, Y., Hashida, M. (1998) Pharmacokinetic analysis of hepatic uptake of galactosylated bovine serum albumin in a perfused rat liver. *Int. J. Pharm.*

Pain, D., Das, P.K., Ghosh, P.C., Bachhawat, B.K. (1984) Increased circulatory half-life of liposomes after conjugation with dextran. *J. Biosci.* 6, 811-816.

Pang, K.S., Rowland, M. (1977a) Hepatic clearance of drugs. I. Theoretical considerations of a "Well-Stirred" model and a "Parallel Tube" model. Influence of hepatic blood flow, plasma and blood cell binding, and the hepatocellular enzymatic activity on hepatic drug clearance. *J. Pharmacokin. Biopharm.* 5, 625-653.

Pang, K.S., Rowland, M. (1977b) Hepatic clearance of drugs. II. Experimental evidence for acceptance of the "Well-Stirred" model over the "Parallel Tube" model using lidocaine in the perfused rat liver in situ preparation. *J. Pharmacokin. Biopharm.* 5, 655-680.

Pang, K.S., Rowland, M. (1977c) Hepatic clearance of drugs. III. Additional experimental evidence supporting the "Well-Stirred" model, using metabolite (MEGX) generated from evidence supporting blood flow rates and linear conditions in the perfused liver in situ preparation. *J. Pharmacokin. Biopharm.* 5, 681-699.

Pang, S.N.J. (1993) Final report on the safety assessment of polyethylene glycols (PEGs)-6, -8, -32, -75, -150, -14M, -20M. *J. Am. Coll. Toxicol.* 12, 429-456.

Patel, H. (1992) Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. *Crit. Rev. Ther. Drug Carriers Syst.* 9, 39-90.

Peracchia, M.T., Gref, R., Minamitake, Y., Domb, A., Langer, R. (1994) PEG-coated nanospheres for intravenous drug delivery and targeting. *Proc. Int. Symp. Controll. Release Bioact. Mater., Controll. Release Soc.* 21, 513-514.

Porter, C.J.H., Moghimi, S.M., Illum, L. L., Davis, S.S. (1992) The polyethylene/polypropylene block copolymer Poloxamer-407 selectively redirects intravenously injected microspheres to sinusoidal endothelial cells of rabbit bone marrow. *FEBS Lett.* 305, 62-66.

Prankerd R. J., Stella, V. P. (1990) The use of oil-in-water emulsions as a vehicle for parenteral drug administration. *J. Parenter. Sci. Technol.* 44, 139-149.

Prime, K., Whitesides, G. (1993) Adsorption of proteins onto surfaces containing end-attached oligo(ethylene oxide) -a model system using self-assembled monolayers. *J Am. Chem. Soc.* 115, 10714-10721.

Roberts, M.S., Donaldson, J.D. Rowland, M. (1988) Models of hepatic elimination: Comparison of stochastic models to describe residence time distributions and to predict the influence of drug distribution, enzyme heterogeneity, and systemic recycling on hepatic elimination. *J. Pharmacokin. Biopharm.* 16, 41-83.

Roberts, M.S., Donaldson, J.D., Jackett, D. (1989) Availability predictions by hepatic elimination models for Michaelis-Menten kinetics. *J. Pharmacokin. Biopharm.* 17, 687-719.

Roberts, M.S., Rowland, M. (1985) Hepatic elimination-dispersion model. *J. Pharm. Sci.* 74, 585-587.

Roberts, M.S., Rowland, M. (1986a) A dispersion model hepatic elimination: 1. Formulation of the model and bolus considerations. *J. Pharmacokin. Biopharm.* 14, 227-260.

Roberts, M.S., Rowland, M. (1986b) A dispersion model hepatic elimination: 2. Steady-state considerations. Influence of blood flow, protein binding and hepatocellular enzymatic activity. *J. Pharmacokin. Biopharm.* 14, 261-288.

Roberts, M.S., Rowland, M. (1986c) A dispersion model hepatic elimination: 3. Application to metabolite formation and elimination kinetics. *J. Pharmacokin. Biopharm.* 14, 289-308.

Roberts, M.S., Rowland, M. (1986d) Correlation between in-vitro microsomal enzyme activity and whole organ hepatic elimination kinetics; analysis with dispersion model. *J. Pharm. Pharmacol.* 38, 117-181.

Ross, B. D. (1972) *Perfusion techniques in biochemistry.* Oxford: Clarendon Press, 90-130.

Rowland, M., Bener, L.Z., Graham, G. G. (1973) Clearance concepts in pharmacokinetics. *J. Pharmacokin. Biopharm.* 1, 123-136.

Rowland, M., Leitch, D., Fleiming, G., Smith, B. (1984) Protein binding and hepatic clearance: Discrimination between models of hepatic clearance with diazepam, a drug of high intrinsic clearance, in the isolated perfused rat liver preparation. *J. Pharmacokin. Biopharm.* 12, 129-147.

Rowland, M., Leitch, D., Fleming, G., Smith, B. (1984) Protein binding and hepatic clearance: Discrimination between models of hepatic clearance with diazepam, a drug of high intrinsic clearance, in the isolated perfused rat liver preparation. *J. Pharmacokin. Biopharm.* 12, 129-147.

Sanchez, A., Gupta, R.K., Alonso, M.J., Siber, G.R., Langer, R. (1996) Pulsed controlled-release system for potencial use in vaccine delivery. *J. Pharm. Sciences.* Vol. 85, 6, 547-552.

Sawhney, A., Pathak, C., Hubbell, J. (1993) Interfacial photopolymerization of poly(ethylene glycol)-based hydrogels upon alginate poly(L-lysine) microcapsules for enhanced biocompatibility. *Biomaterials* 14, 1008-1016.

Scherphof, G., Roerdink, E., Waite, M., Parks, J. (1978) Desintegration of phosphatidylcholine liposomes in plasma as a result of interaction with high-density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 542, 296-307.

Seah, M.P. (1990): in 'Practical Surface Analysis by Auger and X-Ray Photoelectron Spectroscopy' D. Briggs and M.P. Seah, Eds., Appendix 2, Wiley, Chichester.

Senior, J., Delgado, C., Fisher, D., Tilcock, C., Gregoriadis, G. (1991) Influence of surface hydrophyllicity of liposomes on their interaction with plasma proteins and clearance from the circulation: studies with poly(etyleneglycol)-coated vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1062, 77-82.

- Shäfer, V., Briesent, H.V., Rubsamen-Waigmann, H., Steffan, A.M., Royer, C., Kreuter, J.** (1994) Phagocytosis and degradation of human serum albumin microparticles and nanoparticles in human macrophages. *J. Microencapsul.* 3, 261-269.
- Shah, S., Zhu, K., Pitt, C.** (1994) Poly-DL-lactic acid: polyethylene glycol block copolymers. The influence of polyethylene glycol on the degradation of poly-DL-lactic acid. *J Biomater. Sci. Polymer Edn.* 5, 412-431.
- Shakesheff, K.M., Evora, C., Soriano, I., Langer, R.** (1997) The adsorption of Poly(vinyl alcohol) to biodegradable microparticles studied by X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS). *J. of Colloid and Interface Science* 185, 538-547.
- Singh, M., Singh, A., Talwar, G. P.** (1991) Controlled delivery of diphtheria toxoid using biodegradable Poly(D,L-Lactide) microcapsules. *Pharmaceut. Res.* 8 958-961.
- Smith, T.D., Richards, P.** (1976) Simple kit for preparation of Tc-99m-labeled red blood cells. *J. Nucl. Med.* 17, 126-134.
- Soderquist, M. E., Walton A.G.** (1980) Structural changes in proteins adsorbed on polymer surfaces. *J. Colloid Interf. Sci.* 75, 386-397.
- Stolnik, S., Dunn, S.E., Garnett, M.C., Davies, M.C., Coombes, G.A., Taylor, D.C., Irving, M.P., Purkiss, S.C., Tadros, T.F., Davis, S.S., Illum, L.** (1994) Surface modification of Poly(lactide-co-glycolide) Nanospheres by biodegradable Poly(lactide)-Poly(ethylene glycol) copolymers. *Pharm. Res.* 11, 1800-1808.
- Swift, P.** (1982) Adventitious carbon – the panacea for energy referencing? *Surf. Interface Anal.* ,4, 47.
- Szabó Z., Vosberg, H., Sondhaus C.A., Feinendegen L.E.** (1983) Model identification and estimation of organ-function parameters using radioactive tracers and the impulse-response function. *European J. Nuclear Medicine* 11, 265-274.

- Tabata, Y., Ikada, Y.** (1988) Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage. *Biomaterials* 9, 356-362.
- Tan, J., Butterfield, D., Voycheck, C., Caldwell, K., K., Li, J.** (1993) Surface modification of nanoparticles by PEO/PPO block copolymers to minimize the interactions with blood components and prolong blood circulation in rats. *Biomaterials*, 14, 823-833.
- Torchilin, V.P. y Papisov, M.I.** (1994) Hypothesis: why do polyethylene glycol-coated liposomes circulate so long? *J. Liposome Res.* 4, 725-739.
- Torchilin, V.P., Klibanov, A.L., Huang, L., O'Donnell, S., Nossiff, N.D., Khaw, B.A.** (1992) Targeted accumulation of polyethylene glycol-coated immunoliposomes in infarcted rabbit myocardium. *FASEB J.* 6, 2716-2719.
- Torchilin, V.P., Milstein, A.M., Shtilman, M.I** (1994) Liposome protection in vivo with synthetic polymers other than poly(ethylene glycol). In: *Proc 21th Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater. Controlled Release Society, Washington, DC*, 604-605.
- Torchilin, V.P., Omelyanenko, V.G., Parisov, M.I., Bogdanov, A.A. Trubetsky, V.S., Herron, J.N., Gentry, C.A.** (1994) Poly(ethylene glycol) on the liposome surface: On the mechanism of polymer-coated liposome longevity. *Biochim Biophys. Acta* 1195, 11-20.
- Torchilin, V.P., Trubetsky, V.S.** (1995) Which polymers can make nanoparticles drug carries long circulating? *Adv. Drug Deliv. Rev.* 16, 141-155.
- Torchilin, V.P.; Papisov, M.I.** (1994). Hypothesis: why do polyethylene glycol-coated liposomes circulate so long? *J. Liposome Res.* 4, 725-739.
- Tröster, S.D, Kreuter, J.** (1992) Influence of the surface properties of low contact angle of low contact angle surfactants on the body distribution of ¹⁴C-poly(methyl metacrylate) nanoparticles. *J. Microencapsul.* 9, 19-28.

Tröster, S.D., Kreuter, J. (1988) Contact angles of surfactants with a potential to alter the body distribution of colloidal drug carriers on poly(methylmetacrylate) surfaces. *Int. J. Pharm.* 45, 91-100.

US Pharmacopeia XXIII, US Pharmacopeial Convention (1995). Inc. Rockville, MD, 1816.

Verdun, C., Covreur, P., Vranckx, H. Lenaerts, V., Rolland, M. (1986) Development of a nanoparticle controlled-release formulation for human use. *J. Control Release*. 3, 205-210.

Verrecchia, T., Spenlehauer, G., Bazile, D.V., Murry-Brelief, A., Archimbaud, Y., Veillard, M. (1995) Non-stealth (poly(lactic acid/ albumin)) and stealth (poly(lactic acid-polyethylene glycol)) nanoparticles as injectable drug carriers. *J. Control Release* 36, 49-61.

Vittaz, M., Bazile, D., Spenlehauer, G., Varrecchia, T., Villard, M., Puisieux, F., Labarre, D. (1996) Effect of PEO surface density on long circulating PLA-PEO nanoparticles with very low complement activators. *Biomaterials*. 16, 1575-1581.

Wilkinson, G.R., Shand, D.G. (1975) Commentary. A physiological approach to hepatic drug clearance. *Clin. Pharmacol. Ther.* 18, 377-390.

Winkler, K., Keiding, S., Tygstrup, N. (1973) Clearance as a quantitative measure of liver function. In Paumgartner, P., Presig, R. (Eds.), *The liver: Quantitative aspects of structure and functions*, Karger, Basel, 144-155.

Winkler, K., Bass, L., Keiding, S., Tygstrup, N. (1974) The effect of hepatic perfusion on assessment of kinetic constants. In Lundquist, F., Tygstrup, N. (Eds.), *Alfred Benson Symposium VI: Regulation of hepatic metabolism*, Munkgaard, Copenhagen, 797-807.

Wolfram, 1996

Woodle, M.C., Lasic, D.D. (1992) Sterically stabilized liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1113, 171-199.

Woodle, M.C., Newman, M.S., Martin, F.J. (1992) Liposome leakage and blood circulation: comparison of adsorbed block copolymers with covalent attachment of PEG. *Int. J. Pharm.* 88, 327-334.

Woodley, J.F. (1986) Liposomes for oral administration of drugs. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 28, 1-18.

Yamaguchi, K., Anderson, J.M. (1993) In vivo biocompatibility studies of medisorb 65/36 DL-Lactide/glycolide copolymer microspheres. *J. Control Release* 24, 81-93.

Yamaoka, T., Tabata, Y., Ikada, Y. (1994) Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration in mice. *J. Pharm. Sci.* 83, 601-606.

Yasui, H., Yamaoka, K., Nakagawa, T. (1995) New hepatocellular diffusion model for analysis of hepatobiliary transport processes of drugs. *J. Pharmacokin. Biopharm.* 23, 183-203.

Zalipsky, S. (1995) Chemistry of polyethylene glycol conjugates with biologically active molecules. *Adv. Drug Deliv.* 16, 157-182.

Zalipsky, S., Lee, C. (1992) Use of functionalized polyethylene glycols for modification of polypeptides. In: J.M. Harris (De.), *Poly(Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*. Plenum Press, New York, 347-370.