

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA



**LIBERACIÓN DE CURCUMINA A PARTIR DE
NANOPARTÍCULAS ÁCIDO RESISTENTE PARA EL
TRATAMIENTO DE CÁNCER DE COLON.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

Jocelyn Marcela Alcalá Zacarías

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Aracely Serrano Medina

TIJUANA, B.C., MÉXICO

Junio, 2021

HOJA DE APROBACIÓN

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a todos los profesores participes en cada una de las diferentes etapas de mis estudios, por su paciencia al compartir sus valiosos conocimientos y alentarme a seguirme preparándome para ser mejor profesionalista y ser humano. En especial a mis primeros grandes maestros de la vida, aquellos que me moldearon en lo que soy, a mis queridos padres.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Martha y Eduardo por apoyarme en cada etapa de mi vida, estar conmigo dándome su incondicional amor y saber guiar mi camino para convertirme en la persona que soy ahora.

A mis hermanas, Cindy y Brenda, por su complicidad, por compartir su energía, entusiasmo y felicidad conmigo.

A Enrique, por apoyarme en todo lo que le ha sido posible durante el desarrollo de este proyecto, por su honestidad, compañerismo, amistad, por cada momento compartido y su gran amor.

A la Dra. Aracely Serrano, por apoyarme en el camino de la maestría, por su dedicación al escuchar mis presentaciones, leer mi trabajo para mejorarlo cada vez más y su inmenso compromiso durante todo el proyecto.

Al Dr. José Manuel Cornejo Bravo, por su apoyo en el análisis de datos obtenidos e interpretación y por compartir su valioso conocimiento.

Al Dr. Horacio Almanza, por ver en mi persona potencial, motivarme al realizar estudios de posgrado y a seguir aprendiendo cada día de mi vida algo nuevo.

A mi comité de tesis, Dr. José Manuel Cornejo Bravo y Dra. Ana Laura Martínez, agradezco sus revisiones, observaciones y comentarios para mejorar el desarrollo de esta investigación.

Al M.C.S. Efraín Armenta Rojas, por su apoyo en la realización del análisis FT-IR de nanopartículas CAM10, CUR y NP-CUR.

A la Dra. Kenia Palomino, por todo su apoyo en la realización del ensayo de citotoxicidad en células HeLa.

A mi amiga y compañera Mayte por aventurarse conmigo en esta travesía, por su ayuda para nutrir este trabajo y su incondicional amistad.

A mis compañeros de maestría Fabricio, Marisol, Yunuew, Karla, Lizbeth, Sugei y Mariscal, por compartir sus conocimientos y habilidades.

A los demás compañeros de laboratorio, en especial a Alondra y Paola quienes escucharon nuestras inquietudes y nos apoyaron en el desarrollo de diferentes etapas experimentales.

A la Facultad de Ciencias Químicas e Ingenierías y la Facultad de Medicina y Psicología, por formarme como profesional y proporcionarme las instalaciones y recursos para llevar a cabo este estudio.

A CONACYT por la beca proporcionada durante la maestría.

A todos aquellos que me ofrecieron su apoyo para la realización de este proyecto, muchas gracias.

INDICE

RESUMEN	17
CAPÍTULO I INTRODUCCION	18
1.1 Antecedentes.....	18
1.2. Justificación.....	21
1.3. Objetivo general.....	23
1.4. Objetivos específicos.....	23
CAPÍTULO II TEORÍA GENERAL	24
CÁNCER	24
EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER MUNDIAL	24
EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER EN MÉXICO	25
GENERALIDADES DEL CÁNCER	27
MECANISMOS GENÉTICOS Y EPIGENÉTICOS	28
MECANISMOS MOLECULARES DE DEFENSA.	29
ETAPAS DE LA CARCINOGENESIS Y ACCIÓN DE LOS CARCINÓGENOS.	30
EL CICLO CELULAR Y LA DIVISIÓN CELULAR.	32
TUMORES	34
CLASIFICACIÓN GENERAL DEL CÁNCER.	35
TRATAMIENTOS PARA EL CÁNCER.	37
CIRUGÍA	37
RADIOTERAPIA	38
QUIMIOTERAPIA	38
OTROS TRATAMIENTOS	38
EVOLUCIÓN DEL TRATAMIENTO ONCOLÓGICO EN MÉXICO.	41
TIPOS DE CÁNCERES.	42
GENERALIDADES DE CÁNCER DE COLÓN.	42
CAUSAS Y FACTORES DE RIESGO.	43
DETECCIÓN Y DIAGNÓSTICO	45
TIPOS DE CÁNCER DE COLON Y RECTO.	47
TRATAMIENTOS	51
EPIDEMIOLOGÍA MUNDIAL.	58

EPIDEMIOLOGÍA EN MÉXICO	59
TERAPIA CON CURCUMINA.....	59
NANOFORMULACIONES DE CURCUMINA EN EL CÁNCER COLORRECTAL.....	62
NANOMEDICINA.....	63
NANOGELES pH RESPONSIVOS.....	65
POLIMERIZACIÓN POR RADICALES LIBRES.....	66
POLIMERIZACIÓN EN EMULSIÓN.....	67
SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS.....	69
CAPÍTULO III PARTE EXPERIMENTAL	71
PURIFICACIÓN DE EGDMA.....	75
SÍNTESIS DE NANOGELES MEDIANTE EL MÉTODO DE POLIMERIZACIÓN.....	75
EN EMULSIÓN.....	75
TECNICAS DE CARACTERIZACIÓN PARA LOS NANOGELES SINTETIZADOS.....	76
a) Dispersión de Luz Dinámica (DLS)	76
b) Potencial Z	76
LIOFILIZACIÓN Y RECONSTITUCIÓN DE LOS NANOGELES.....	77
a) Liofilización	77
b) Reconstitución	77
CARGADO DE LOS NANOGELES CON CURCUMINA.....	78
Se determinó la eficiencia de cargado y la capacidad de cargado mediante la ecuación 1 y ecuación 2:.....	78
ENSAYO DE CITOTOXICIDAD DE LOS NANOGELES CARGADOS CON CUR.....	80
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	83
SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS NANOGELES SINTETIZADOS.....	83
LIOFILIZACIÓN Y RECONSTITUCIÓN DE LOS NANOGELES.....	91
CARGADO DE LOS NANOGELES CON CURCUMINA.....	94
ANÁLISIS FT-IR.....	96
CINÉTICAS DE LIBERACIÓN <i>IN VITRO</i> DE CURCUMINA.....	97
CITOTOXICIDAD DE LOS NANOGELES CARGADOS CON CUR.....	106
CAPITULO V	111
CONCLUSIONES	111
BIBLIOGRAFÍA	113
ANEXOS	121

ANEXO A. DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO POR INTENSIDAD	122
ANEXO B. CURVA DE CALIBRACION DE CURCUMINA	125
ANEXO C. BARRIDOS.....	129
ANEXO D. CARGADO CON CURCUMINA	130
ANEXO E. CINÉTICAS DE LIBERACIÓN.....	132
Fraciones liberadas a los diferentes pH.	138
ANEXO F. VIABILIDAD CELULAR.....	139

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

CC	cáncer de colon
CUR	curcumina
MTT	ensayo de reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
CUR-CS-PEC-NPs	CUR en un sistema de nanopartículas de quitosano-pectinato
C_{max}	concentración máxima
ABC	área bajo la curva
EGDMA	dimetilacrilato de etilenglicol
DVA	3,9-Divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecano
BAC	N,N'-bis(acriloil) cistamina
FDAC	O-O' fluoresceína diacrilato
DEAEM	<i>N,N</i> -(Dietilamino)etil metacrilato
PEGMA	poli(etileno glicol) metil eter metacrilato
pH	potencial de hidrógeno
mM	milimolar
h	horas
CI₅₀	concentración inhibidora media
µg	microgramos
mL	mililitros
mg	miligramos
kg	kilogramos
PCAM	poli(-carboxialquil metacrilamidas)

CAM10	ácido 11-metacriloylamido undecanoico
DBS	dodecilbenceno sulfonato
DLS	dispersión de luz dinámica
IARC	Agencia Internacional de Investigación en Cáncer de la Organización Mundial de la Salud
CCR	cáncer colonrectal
CSC	conteo sanguíneo completo
CEA	antígeno carcinoembrionario
Rx	radiografía
TAC	tomografía axial computarizada
PET	tomografía de emisión de positrones
anti-EGFR	contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico
anti-VEGF A	contra el factor de crecimiento endotelial vascular A
TKI	inhibidores tirosina cinasa
VI	vía intravenosa
VO	vía oral
IP	intraperitoneal
APS	persulfato de amonio
PBS	buffer de fosfatos
SFB	Suero fetal bovino
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
DMSO	dimetilsulfóxido
FT-IR	espectrometría infrarroja
STEM	microscopía electrónica de barrido de transmisión.

NP-CUR	nanopartículas cargadas con curcumina.
NF-κB	activación del factor nuclear κB
TNF	factor de necrosis tumoral
AP-1	proteína activada-1
Egr-1	crecimiento epidérmico-1
COX-2	ciclooxigenasa 2
MMP	metaloproteinasa de matriz
EGFR	receptor del factor de crecimiento epidérmico
FDA	Administración de Drogas y Alimentos
W/O	agua en aceite
O/W	aceite en agua
nm	nanómetros
D.E.	desviación estándar
PDI	índice de polidispersión
D. h.	diámetro hidrodinámico
mV	milivoltios
CCF	capacidad de carga del fármaco
ECF	eficacia de carga del fármaco
MFng	masa del fármaco en los nanogeles
Mng	masa de los nanogeles
MF	masa del fármaco
ABS	absorbancia
FL	fracción liberada

CUR/ ALG-GANP nanopartículas de Alginato de sodio - Goma arábica cargadas con curcumina

SCNP nanopartículas de curcumina encapsuladas en sílice

CSCNP quitosano con nanopartículas de curcumina coencapsuladas en sílice

CM-SF-NP nanopartículas de curcumina-fibroína de seda

SF-NP nanopartículas de fibroína de seda

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Grupos de tratamiento en estudio para la determinación de citotoxicidad en cultivo de células HeLa.

Tabla 2. Tamaños obtenidos en las 3 síntesis de nanogeles, promedio, desviación estándar y PDI.

Tabla 3. Potencial Z obtenido en las 3 síntesis de nanogeles, promedio y desviación estándar.

Tabla 4. Tamaños al reconstituir en las 3 síntesis de nanogeles, promedio y desviación estándar.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principales causas de mortalidad en México, 1950-2014. Instituto Nacional de Geografía y Estadística.

Figura 2: Célula sana y célula tumoral.

Figura 3. Ciclo celular y sus diferentes fases.

Figura 4. Fase M. Epitelio del intestino de una rata donde se produce una alta proliferación celular.

Figura 5. Anatomía del colon.

Figura 6. Pólipo de colon y cáncer de colon.

Figura 7. Cáncer colorrectal al microscopio óptico.

Figura 8. Nanoformulaciones de curcumina utilizadas en cáncer colorrectal encontradas en la literatura.

Figura 9. Nanogeles CAM10 1%/EGDMA 5%/DBS 1%/APS 2% obtenidos por polimerización en emulsión.

Figura 10. Tamaño de los nanogeles CAM10 1%/EGDMA 5%/DBS 1%/APS 2% sintetizados a diferentes pH

Figura 11. Potencial Z de los nanogeles a diferentes pH.

Figura 12. Imágenes STEM de los nanogeles.

Figura 13. Distribución de tamaños de los nanogeles a 25°C en agua.

Figura 14. Nanogeles liofilizados.

Figura 15. Nanogeles reconstituidos.

Figura 16. Tamaños de los nanogeles después de ser reconstituidos.

Figura 17. Nanogeles cargados con curcumina.

Figura 18. Espectros FT-IR de nanopartículas CAM10, CUR y NP-CUR.

Figura 19. Cinética de liberación de los NG-CUR a pH 1.2 en 36 horas.

Figura 20. Cinética de liberación de los NG-CUR a pH 1.2 en 12 horas.

Figura 21. Cinética de liberación de los NG-CUR a pH 1.2 en 2 horas.

Figura 22. Cinética de liberación de los NG-CUR a pH 6.8 en 36 horas.

Figura 23. Cinética de liberación de los NG-CUR a pH 6.8 en 12 horas.

Figura 24. Cinética de liberación de los NG-CUR a pH 7.4 en 36 horas.

Figura 25. Cinética de liberación de los NG-CUR a pH 7.4 en 12 horas.

Figura 26. Cinética de liberación de los NG-CUR a pH 1.2, 6.8 y 7.4 en 36 horas.

Figura 27. Cinética de liberación de los NG-CUR a pH 1.2, 6.8 y 7.4 en 12 horas.

Figura 28. Viabilidad celular en cultivo de células HeLa tratado con CUR.

Figura 29. Viabilidad celular en cultivo de células HeLa tratado con NG-CUR.

Figura 30. Viabilidad celular en cultivo de células HeLa tratado con NG.

Figura 31. Viabilidad celular en cultivo de células HeLa comparativo CUR y NG-CUR.

VITA Y ÁREA DE ESTUDIO

Jocelyn Marcela Alcalá Zacarías, nació en Guadalajara, Jalisco, México, el 23 de octubre de 1995. Hija del Sr. Eduardo Alcalá Guía y la Sra. Martha Zacarías Barajas. Terminó sus estudios de nivel medio superior en la Preparatoria Federal Lázaro Cárdenas recibiendo su título de técnico en trabajo social.

En 2014 entra a la carrera de Químico Farmacobiólogo en la facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería en la Universidad Autónoma de Baja California, campus Tijuana; durante sus estudios participo en el L Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas presentando el trabajo “Diseño de página web de fármacos utilizados en enfermedades del SNC y sus RAM’s” llevado a cabo en Tequila en septiembre de 2017, también hizo una participación con ponencia oral en el 5to Encuentro Estatal de Jóvenes Investigadores de BC 2017 del trabajo “Estandarización de un método para la detección de micobacterias usando el gen IS6110 en pacientes del Hospital General de Tijuana”; participo en el viaje de prácticas a San Quintín del 2018-1 en el área de análisis clínicos. Egreso de licenciatura en 2018.

En 2019 se le otorga el reconocimiento como profesional autorizado ante SENASICA/SADER.

Contacto: alcala.jocelyn@uabc.edu.mx

Áreas de estudio: nanomedicina; farmacología; oncología.

RESUMEN

El cáncer de colon es la tercera forma de cáncer más prevalente y la segunda mayor incidencia de muerte. Debido al gran número de casos y que los tratamientos disponibles son muy agresivos para el paciente, se han explorado nuevas alternativas de tratamiento, como la curcumina, especia nativa de la India que se suele utilizar como colorante o aditivo alimentario y tiene una gran historia curativa, donde destaca su potencial anticancerígeno. A pesar de los muchos beneficios que se han encontrado en la curcumina, su aplicación clínica es limitada debido a su baja solubilidad en agua, mala absorción oral y rápido metabolismo y degradación en medio ácido. Por este motivo, en este estudio se sintetizaron nanogeles CAM10 1%/EGDMA 5%/DBS 1%/APS 2% mediante polimerización en emulsión. Los nanogeles se caracterizaron mediante DLS, potencial Z, imágenes STEM, se evaluó su estabilidad, fueron cargados con curcumina, para hacer la determinación de la cinética de liberación y efectuar estudios de citotoxicidad *in vitro*. Se observó que los nanogeles tienen un pequeño tamaño (<100 nm), a pH 6, 7, 8 y 9 muestran monodispersión con un PDI <0.2, son estructuras esféricas y ovaladas, tienen una carga superficial negativa, responden a los cambios de pH, la eficiencia de cargado es del 99% y la capacidad de carga es del 20%, en las cinéticas de liberación se confirma la mejoría en la solubilidad de la CUR al estar en la nanoformulación y los NG-CUR son capaces de liberar su contenido en ambientes que tienen pH colónico. En los estudios de actividad citotóxica se emplearon cultivos de células HeLa, en los que se confirmó el potencial citotóxico de la CUR. Se determinó la sensibilidad de la nanoformulación a cambios de pH y demostró que pueden ofrecer un sistema de liberación sostenida de CUR en condiciones semejantes a las de colon.

CAPÍTULO I INTRODUCCION

1.1 Antecedentes

El cáncer de colón (CC) representa la tercera neoplasia maligna más prevalente en todo el mundo, después de cáncer de pulmón y cáncer de mama, con la segunda mayor incidencia de muerte, después de cáncer de pulmón (Flores, 2020), por lo que es de suma importancia el desarrollo de nuevas opciones para su prevención y tratamiento en cualquiera de sus etapas. Por otra parte, la curcumina (CUR), un pigmento amarillo de la cúrcuma; ha demostrado en diversos estudios su actividad antioxidante, antiinflamatoria y anticancerígena, al ser capaz de regular múltiples vías de señalización (Wu et al., 2020). A través de varios estudios *in vivo* e *in vitro* se ha demostrado su actividad anticancerígena en cáncer de CC (Selvam et al., 2019). Desafortunadamente, su aplicación contra el cáncer es limitada debido a la baja solubilidad en agua, mala absorción en el tracto gastrointestinal, el metabolismo rápido y su degradación en medio ácido. Para superar las limitaciones de biodisponibilidad de la CUR se ha trabajado en nanoformulaciones que mejoran su absorción y la focalización de sus efectos celulares. Una buena formulación debería mostrar mayor actividad anticancerígena en comparación con la CUR libre y, al mismo tiempo efectos secundarios mínimos (Wong et al., 2019).

Una de las nanoformulaciones utilizadas y con buenos resultados son las nanopartículas. En estudios previos Prajakta y colaboradores trabajaron con el polímero Eudragit S100, ya que el polímero se disuelve a pH colónico; obtuvieron nanopartículas esféricas, homogéneas y nanométricas con una eficiencia de

encapsulación del 72%, después del liofilizado mostraron una carga superficial negativa, un contenido de fármaco de > 99% y la presencia de la CUR en forma amorfa que puede resultar en una posible absorción mejorada; mediante el ensayo de reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) se demostró una inhibición casi al doble de las células cancerosas por las nanopartículas, en comparación con la CUR sola, a las concentraciones probadas (Prajakta et al., 2009).

Por su parte, Alkhader y equipo encapsularon CUR en un sistema de nanopartículas de quitosano-pectinato (CUR-CS-PEC-NPs) para su liberación en el colon, probaron las nanoformulaciones en células de CC HT-29, las cuales absorbieron las CUR-CS-PEC-NP, observándose una reducción significativa en la propagación de las células cancerosas, demostrando también que el efecto antiproliferativo de la CUR encapsulada fue similar al de la CUR libre en dosis equivalentes, es decir, el proceso de encapsulación no impidió la actividad anticancerígena de la CUR. La biodisponibilidad oral, concentración máxima (C_{max}) y el área bajo la curva (ABC) de CUR en CUR-CS-PEC-NPs se incrementó significativamente en 4 veces después de 6 horas de tratamiento en comparación con la CUR libre. Además, la depuración de CUR en los CUR-CS-PEC-NP fue menor en comparación con la CUR libre; concluyendo la posible aplicación de los CUR-CS-PEC-NP en la administración oral de CUR en el tratamiento de CC (Alkhader et al., 2018).

En el estudio realizado por Manzanares-Guevara, Licea y colaboradores, sintetizaron nanogeles poliméricos inteligentes con CUR capaces de responder cambios en la temperatura, pH o entorno redox, según el reticulante utilizado en la síntesis. Los reticulantes utilizados fueron dimetilacrilato de etilenglicol (EGDMA), 3,9-Divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecano (DVA), N,N'-bis(acrilóil) cistamina (BAC) y O-O' fluoresceína diacrilato (FDAC), dando propiedades significativas en las diferentes síntesis: EGDMA produce nanogeles muy estables hasta 18 meses a temperatura ambiente, los cuales se hinchan en ambientes levemente ácidos y entregan la CUR dentro de las líneas celulares de CC; DVA produce nanogeles ácido degradables (pH 6), capaces de entregar CUR y degradarse concomitantemente dentro de las células; BAC produce nanogeles que muestran un comportamiento de degradación dependientes de la concentración de ácido y de glutatión, con un 100% de degradación en presencia de glutatión 3 mM en 0.5 h, de igual manera, entregan CUR y se degradan concomitantemente dentro de las células y FDAC produce nanogeles fluorescentes, que son capaces de rastrearse dentro de las células mediante microscopía de fluorescencia. Se hizo el cargado con CUR, mostrando la liberación de CUR a un pH de 5 para nanogeles reticulados con EGDMA y DVA, y, en el caso de nanogeles reticulados con BAC, la liberación más rápida a pH 5. En sus estudios de viabilidad celular en la línea celular de CC humano (HCT-116) en contacto con nanogeles cargados con CUR mostró que el CI_{50} se redujo de 5 a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cuando se cargó CUR dentro de DVA cruzado y enlazados, así como en nanogeles BAC cruzados y enlazados. Los estudios en ratones demostraron que los nanogeles vacíos de PDEAEM-núcleo-PEG-caparazón con EGDMA reticulado y reticulado con BAC no eran tóxicos hasta

concentraciones de 40 mg/kg. Los autores llegaron a la conclusión de que las nanopartículas PDEAEM-núcleo-PEG-caparazón reticulados con DVA o BAC y cargadas de CUR, tienen un potencial excelente para la terapia de CC (Manzanares-Guevara et al., 2020).

Finalmente, cabe mencionar el estudio de Magaña, Cornejo y su equipo de trabajo; el cual se centra en la formación de complejo insolubles en agua, que funcionan para la liberación sostenida de fármacos catiónicos a pH 6.8, con una liberación más rápida en pH 7.4; dichos materiales tienen el potencial de ser utilizados como sistemas de administración oral controlada. Se sintetizaron los diferentes polímeros poli(-carboxialquil metacrilamidas) (PCAM); PCAM5, PCAM7 y PCAM10, sus resultados demuestran la obtención de polielectrolitos hidrófobos con comportamiento de solución-precipitación sensible al pH y son buenos candidatos para la liberación sostenida en intestinos, el complejo formado con PCAM10, presentan características de liberación adecuadas para un sistema de liberación de fármacos específico para el colon (Magaña et al., 2017).

1.2. Justificación

El CC es uno de los cánceres con mayor incidencia y mortalidad en el mundo (Flores, 2020), por lo que es relevante encontrar nuevos y mejores tratamientos; dado que con los que se cuentan en la actualidad se presentan inconvenientes; por su parte la cirugía puede tener complicaciones durante o después de la cirugía como lo es la presencia de coágulos, infecciones, sangrado e incluso pueden presentarse problemas de cicatrización, además de que los pacientes no tienen la capacidad de

ingerir alimentos durante algunos días después de la operación; el otro tratamiento altamente empleado es la quimioterapia, que resulta ser muy tóxico y presentar múltiples reacciones adversas en los individuos, al tener un efecto sistémico, y la capacidad de alterar tanto el funcionamiento de las células sanas como las enfermas; en esta búsqueda se han explorado el uso de CUR, un componente natural de la cúrcuma, que ha demostrado poseer varios efectos positivos para la salud, entre ellos, su efecto anticancerígeno. Existen diversos estudios que demuestran su capacidad de regular múltiples vías de señalización celular, cruciales en el desarrollo y la progresión del cáncer, pero su aplicación clínica es nula debido a la pobre biodisponibilidad que presenta. Dicho problema puede superarse con el desarrollo de nanoformulaciones de CUR. Estos sistemas de administración basados en nanotecnología se emplean ampliamente para mejorar la administración de fármacos poco solubles en agua, además el sistema confiere características especiales como una mejor absorción celular *in situ* (Wong et al., 2019). En este proyecto se logró la obtención de nanogeles mediante la polimerización por emulsión, para la liberación de CUR en una línea celular de CC, a través del empleo de materiales sensibles al pH, estos vehículos acarreadores son prometedores para el diseño de una futura terapia segura, eficaz y con mínimos efectos tóxicos.

1.3. Objetivo general

Obtener nanopartículas cargadas con curcumina sensibles a cambios en el pH para su evaluación como tratamiento en cáncer de colon en cultivos celulares.

1.4. Objetivos específicos

- Sintetizar nanogeles de ácido 11-metacrilolamido undecanoico (CAM10) entrecruzados con EGDMA mediante polimerización en emulsión con dodecibenceno sulfonato (DBS).
- Caracterizar los nanogeles sintetizados en su diámetro hidrodinámico mediante dispersión de luz dinámica (DLS), potencial zeta y microscopía electrónica de barrido de transmisión (STEM).
- Evaluar la respuesta de los nanogeles sintetizados al pH, así como su estabilidad al proceso de liofilización y reconstitución.
- Realizar el cargado de curcumina a los nanogeles sintetizados y cuantificar su eficiencia de carga.
- Determinar la cinética de liberación de curcumina mediante ensayos *in vitro*.
- Realizar ensayos de viabilidad celular en cultivos celulares de cáncer.

CAPÍTULO II TEORÍA GENERAL

CÁNCER

EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER MUNDIAL

El cáncer se posiciona como la segunda causa de muerte en el mundo; solamente en el 2015, ocasionó 8,8 millones de defunciones, una de cada seis en el mundo; de estas el 70% registrados en países de ingresos medios y bajos (OMS, 2019). Las estimaciones muestran un incremento en la mortandad a nivel mundial por neoplasias del 45%, en un lapso de tiempo mayor a dos décadas, considerando desde 2007 hasta 2030, pasando de los 8 a 11.5 millones de muertes (Reynoso-Noverón y Torres-Domínguez, 2017). Parte de este aumento se comprueba con los datos proporcionados por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer de la Organización Mundial de la Salud (IARC) en 2020, año donde 10 millones de pacientes oncológicos fallecieron debido a la enfermedad, haciéndonos ver que dichas estimaciones pueden quedarse cortas con base al rápido y constante aumento de casos. Por otra parte, la patología genera un gran impacto económico, el costo total atribuible al cáncer en 2010 ascendió a 1,16 billones de dólares; cabe destacar que en más del 90% de los países de ingresos altos, los pacientes oncológicos reciben tratamiento, mientras que este porcentaje disminuye al 30% en los países de ingresos bajos (OMS, 2019).

EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER EN MÉXICO

En América Latina, la segunda causa de muerte es el cáncer. En 2018 la incidencia fue de 3.8 millones de casos y la mortalidad llegó a 1.4 millones (OPS, 2020). En México la situación no es muy diferente, el cáncer se ha encontrado entre las 10 principales causas de muerte desde 1960 (Figura 1), para ser más precisos, el sexto motivo en 1960 y 1970; para 1980 se convirtió en el quinto puesto; de 1990 hasta 2004 ascendió a la segunda posición, en 2014, descendió al tercer lugar, representando así el 12.2% de las defunciones, solamente por debajo de las enfermedades cardíacas que posee un 19.2% y la diabetes mellitus con un 14.8%.

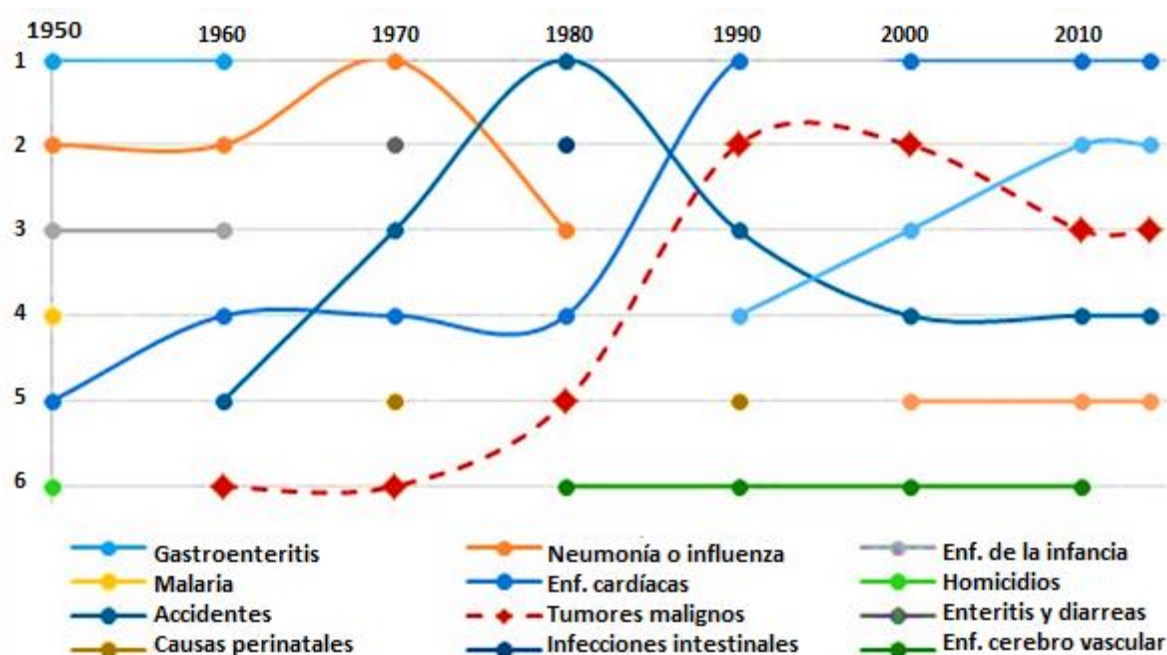


Figura 1. Principales causas de mortalidad en México, 1950-2014. Instituto Nacional de Geografía y Estadística (INEGI, 2015).

El 43.7% de las defunciones se presentaron en la población en edad productiva (15-64 años) y el 56.3% en la población adulta mayor (65 años o más).

Así mismo, en mujeres fue mayor la mortalidad por neoplasias con el 13.97%, en comparación con el 10.74% de los hombres. Los tumores que más afectan a los hombres son: próstata, tráquea bronquios y pulmón y estómago, representando 36.1% de las muertes, en las mujeres los fallecimientos se atribuyen a mama y cervicouterino con un 25.7%.

Comparando las tasas de mortalidad de México y el resto mundo, las tasas en nuestro país son más bajas; considerando a toda la población, solo 70 por cada 100 mil habitantes mueren debido a esta causa, situándose como una de las tasas más bajas en América. No obstante, se prevé un incremento de mortalidad por neoplasias en los próximos años, debido principalmente al estilo de vida del mexicano, pudiendo llegar a tasas mayores de 200 por 100 mil habitantes, como las que se observan en Europa.

En México, con los datos reportado en 2013, se observa que en los estados del norte del país, Chihuahua, Sonora, Nuevo León, tienen las tasas de mortalidad más altas del país debidas a neoplasias, por encima de 75 por 100 mil habitantes, junto con la Ciudad de México y Veracruz, 77.16 y 76.04 por 100,000 habitantes respectivamente; en contraparte, los estados de Tlaxcala, Guerrero y Estado de México, tienen la menor tasa de mortalidad debida al cáncer, ≤ 54 por 100 mil habitantes (Reynoso-Noverón y Torres-Domínguez, 2017).

GENERALIDADES DEL CÁNCER

Se utiliza el término genérico cáncer para referirse al amplio conjunto de enfermedades caracterizadas por el desarrollo de células anormales y que puede afectar cualquier parte del organismo; también se les nombra tumores o neoplasias malignos (Figura 2). La característica particular del cáncer es la rápida multiplicación y diseminación de las células anormales, con la capacidad de invadir tejidos u órganos adyacentes, proceso conocido como metástasis y al cual se le atribuye ser la principal causa de muerte por cáncer (OMS, 2019).

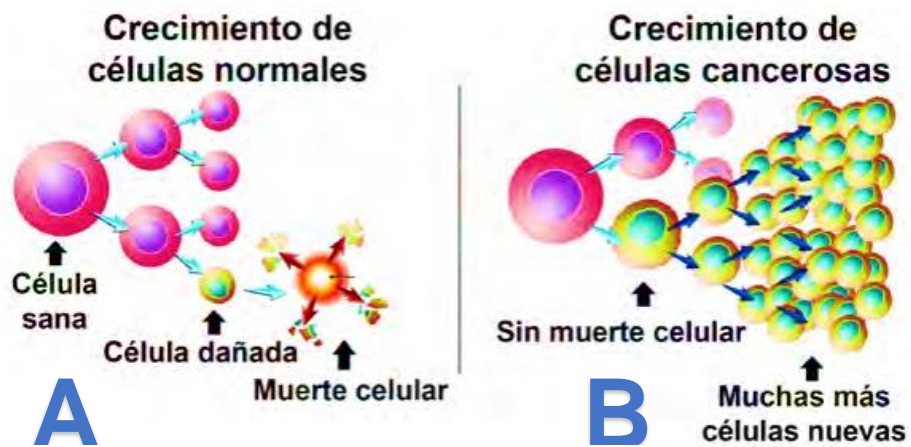


Figura 2: Célula sana y célula tumoral. **A.** Las células normales se dividen de forma programada y controlada. Si llegan a desarrollar alguna mutación o alteración irreparable, activan su propio programa de muerte, la apoptosis. **B.** Las células cancerosas presentan mutaciones que no les fue posible reparar y tampoco son capaces de inducir su apoptosis, convirtiéndose en células inmortalizadas. (Nucleus Medical Media, 2016).

MECANISMOS GENÉTICOS Y EPIGENÉTICOS

Se requiere más de una mutación en varios genes para que una célula normal se convierta en una célula neoplásica, estas mutaciones ocurren a través de mucho tiempo. La célula cancerígena es de origen monoclonal, una vez alterada, se salta el control celular normal y continua su proliferación descontrolada, que a su vez puede hacer cambios similares en las células vecinas.

Las mutaciones genéticas, a su vez, conducen a productos modificados que codificarían para el gen normal, dando origen en la vía de la carcinogénesis a:

- Cánceres heredables por mutaciones en uno o ambos alelos de las células germinales. Por análisis citogenéticos ha sido posible individualizar algunos genes, demostrando de este modo que las mutaciones son por predisposición familiar. La mutación de algunos genes conduce a consecuencias metabólicas, que pueden llevar a una ruta hacia la carcinogénesis.
- Cánceres esporádicos. Las alteraciones genéticas surgen como resultado a la exposición a mutágenos ambientales, como lo son los virus, radiaciones o sustancias químicas, algunos ejemplos son: fumar predispone al desarrollo de cáncer de pulmón y de vejiga; la aflatoxina al desarrollo de cáncer de hígado; las aminas aromáticas a cáncer de vejiga y el benceno en el inicio de las leucemias.

Cabe mencionar que los genes se pueden alterar mediante dos mecanismos:

1. Genético, existen alteraciones estructurales del genoma por cambios en los propios genes o en sus bases, como lo son las mutaciones, deleciones o translocaciones.

2. Epigenético, alteración en las enzimas o sustratos de estas por acciones moleculares; un ejemplo de esto es la metilación de las bases, este mecanismo que compromete a los dos alelos y la hipometilación, conducen a la mayor expresión de los genes, por tanto, una mayor cantidad de metiltransferasa que inhibe la metilación, conduce a una mayor expresión de oncogenes. Dicha enzima se encuentra elevada en tejidos tumorales.

Las tres enzimas con un rol importante en la susceptibilidad al cáncer son: citocromo p 450 mono-oxigenasa; glutatión-transferasa y acetil-transferasa (Porrás, 2010).

MECANISMOS MOLECULARES DE DEFENSA.

La exposición a diversos factores puede dañar algún gen, de alguna célula, sin embargo, se cuenta con mecanismos de defensa, de los cuales depende una replicación normal celular.

- Muerte celular programada, “apoptosis”. Proceso que se lleva a cabo mediante la permeabilización mitocondrial y la activación de caspasas. Las características clave son la condensación de la cromatina, la fragmentación del ADN y la eliminación por los fagocitos (Porrás, 2010).

- Acortamiento fisiológico de los telómeros. Los telómeros son secuencias específicas de ADN no codificante que se encuentran en los extremos de los cromosomas, impiden la pérdida y alteraciones espontáneas en las secuencias de ADN, al mismo tiempo que son marcadores del envejecimiento celular. Teóricamente, en el telómero se encuentra a las proteínas reparadoras del genoma (BRCA1-BRCA2, complejo RAD 50 y otros) para estabilizar su propia estructura (Marti y Echeverría, 2017; Porras, 2010).

La telomerasa, una enzima reparadora de los telómeros mediante la adición de secuencias de las bases TTAGGG, repone a los telómeros y ha sido encontrado en mayor concentración en tejidos neoplásicos, células germinales y algunas hematopoyéticas, llevándolas a la inmortalidad celular. Esta enzima, en las células neoplásicas sobreexpresa la unidad proteica TERT (Porras, 2010).

ETAPAS DE LA CARCINOGENESIS Y ACCIÓN DE LOS CARCINÓGENOS.

Los carcinógenos (sustancias o combinación de sustancias que inducen el cáncer o aumentan su incidencia) pueden actuar en una o en las tres etapas de la carcinogénesis:

Etapas 1: la iniciación. Ocurre a nivel del genoma y las alteraciones pueden darse en los tumores benignos y malignos, los agentes causantes pueden ser químicos (tienen como blanco al nitrógeno de la guanina -alquilantes, aminas aromáticas, nitrosaminas y grasas poliinsaturadas, produciendo mutaciones

irreversibles; la aflatoxina, oncogénica para los hepatocitos; compuestos policlorados, genotóxicos que se encuentran en insecticidas, plaguicidas, productos de manufactura eléctricos y plásticos), físicos (las radiaciones dañinas, exposición a los rayos solares en forma persistente o por emanaciones de radón de los suelos; de modo que se ionizan las bases, se suprime el gen de la proteína p53, que puede estimular citoquinas como la IL-1 y 6, factores de crecimiento que favorecen la formación de radicales libres y permiten que se presente alguna lesión en el gen que codifica para el complejo mayor de histocompatibilidad) o virales (capaces de introducir sus propias oncoproteínas al genoma de la célula huésped, como es el caso del VPH, Epstein Bar y las hepatitis B y C).

Etapa 2: la promoción. De igual manera ocurre a nivel genómico con alteraciones presentes en tumores benignos y malignos. Esta representa la etapa de crecimiento tisular conjunto a la formación del tumor, los factores de crecimiento (péptidos que se producen en una célula y migran al espacio intercelular, ejerciendo sus acciones en células vecinas, actúan como facilitadores de la mitosis incorporando en fase S a algunas células en fase G₀ o G₁ prolongada) y receptores a los factores de crecimiento (compuestos de glucoproteínas que se unen a los factores de crecimiento y transmiten los mensajes proliferativos) son partícipes, así también la angiogénesis y degradación de las matrices extracelulares.

Etapas 3: la progresión. Solo se presenta en la transformación maligna, implica la capacidad de invadir tejidos cercanos o lejanos, por parte de la célula tumoral maligna, esa capacidad también está codificada en los genes de esta, con modificaciones estructurales y funcionales. A diferencia de las células normales que se encuentran ancladas y controlan su propia división al entrar en contacto con las células vecinas; además son incapaces de atravesar la membrana basal que las separa del tejido conjuntivo sub basal; tampoco poseen la capacidad de introducirse a capilares sanguíneos o linfáticos, a excepción de los linfocitos (Martín de Civetta, 2011).

EL CICLO CELULAR Y LA DIVISIÓN CELULAR.

Entendemos por ciclo celular a la secuencia de acontecimientos que tiene lugar a lo largo de la vida de una célula, va desde que surge como una nueva célula, pasando por su etapa de crecimiento y desarrollo, hasta su propia división o muerte. En eucariotas se divide en dos etapas diferentes (Figura 3); la interfase, etapa inicial de larga duración que tiene 3 fases llamadas G_1 , S y G_2 y una etapa final corta con una sola fase denominada fase M (Alvarez Martinez, 2016).

Fase G_1 . Es la primera y más larga etapa por la que pasa la célula, en esta se produce el crecimiento celular hasta que alcanza un tamaño óptimo. Hay un sistema molecular en este paso, denominado punto de control, el cual impide a la célula pasar a la siguiente etapa si no cumple con todas las características necesarias para avanzar en el ciclo.

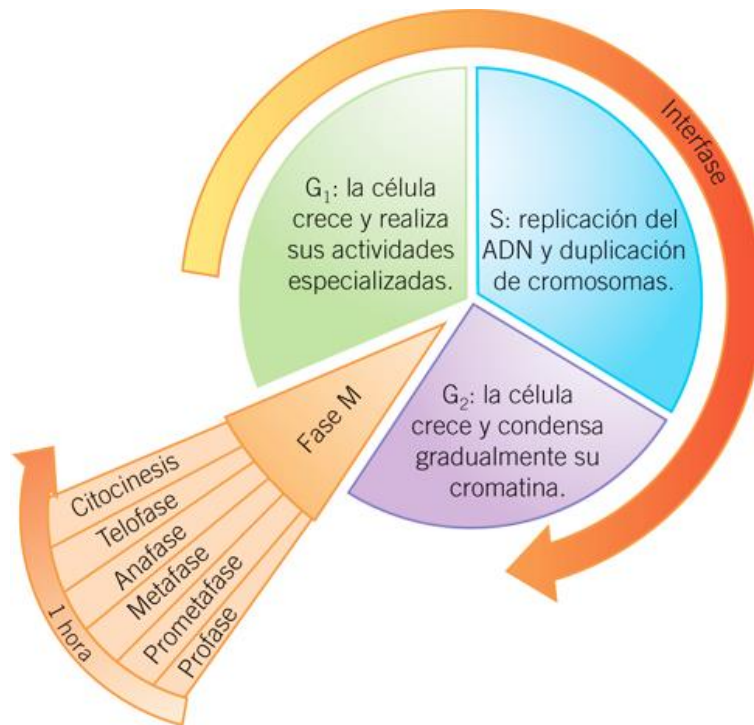


Figura 3. Ciclo celular y sus diferentes fases (Álvarez, 2016).

Fase S o de síntesis. Se lleva a cabo la duplicación de ADN, acción compleja debido a la gran longitud del ADN. La replicación debe de cumplir dos condiciones: solo se réplica una vez y comete la mínima cantidad de errores.

Fase G₂. Segunda etapa de crecimiento, es más breve que la G₁, además se sintetizan los productos necesarios para la siguiente etapa.

Fase M, mitosis. La más compleja y conlleva un mayor reordenamiento de los componentes celulares, pues se separan todos los componentes celulares en dos partes para formar dos células nuevas. En este mecanismo se reparten los cromosomas, de modo que se forman los dos núcleos de las células hijas. A su vez

esta fase se divide en varias etapas: profase, metafase, anafase y telofase (Figura 4), en las que el ADN se compacta, forma a los cromosomas, éstos se organizan y segregan, y al final se descondensan para formar los núcleos de las células hijas. Al terminar esta fase, en general, se tiene dos células hijas independientes e iguales a la progenitora (Vigo, 2019).

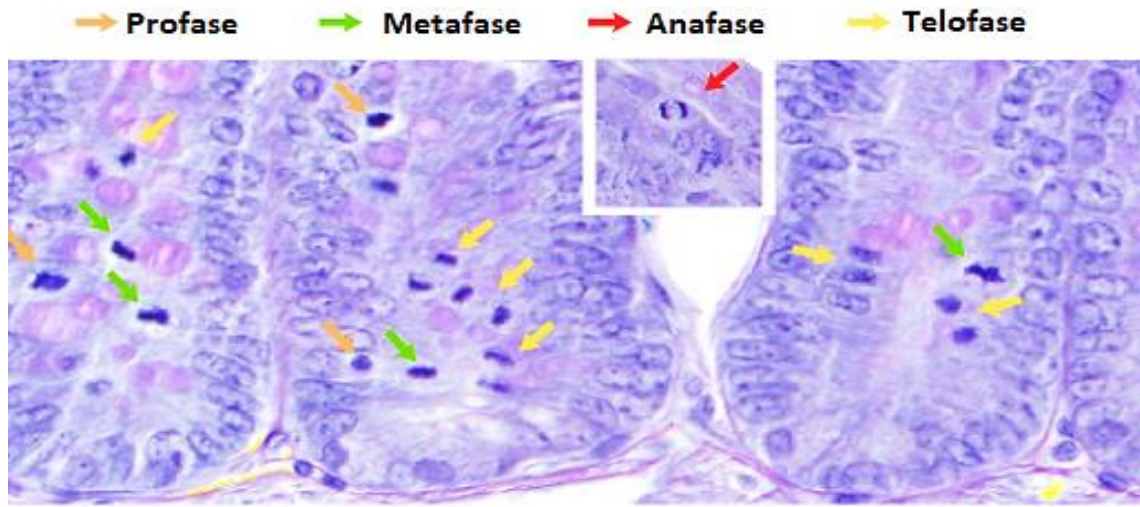


Figura 4. Fase M. Epitelio del intestino de una rata donde se produce una alta proliferación celular (Vigo, 2019).

TUMORES

Cuando las células anormales continúan dividiéndose sin interrupción alguna, pueden formar masas, a las que conocemos como tumores (Instituto Nacional de la Salud, 2019) o neoplasias, su expansión puede destruir y sustituir a los tejidos normales (Puente y Velasco, 2017). Muchos cánceres forman tumores sólidos, es decir, masas de tejido. Otros cánceres de sangre, como las leucemias, por lo general no forman tumores sólidos (Instituto Nacional de la Salud, 2019). Existen dos tipos de tumores:

1. **Tumores cancerosos malignos:** son aquellos que se pueden extender a los tejidos cercanos. Al crecer estos tumores, pueden desprender algunas células cancerosas y moverse a otro sitio distante del cuerpo por medio de circulación sanguínea o el sistema linfático, formando nuevos tumores lejos del original.
2. **Tumores benignos:** son los que no se extienden a tejidos cercanos y no los invaden, pero, pueden ser tan grandes que tendrán que extirparse, después de esto, no vuelven a crecer (Instituto Nacional de la Salud, 2019).

CLASIFICACIÓN GENERAL DEL CÁNCER.

El tipo de cáncer es definido, en general, por el tejido u órgano afectado inicialmente. Algunas de las categorías de cánceres que inician en tipos de células específicas son:

- **Carcinoma:** cáncer que surge a partir de células epiteliales. Estas células son capaces de tapizar la superficie de glándulas, órganos o estructuras corporales. Son los tipos de cáncer más comunes, representan más del 80% del total de cánceres (próstata, mama, pulmón, colon, páncreas y estómago, entre otros) (Instituto Nacional de la Salud 2019; Puente; Velasco, 2017).
- **Sarcoma:** cánceres que se originan a partir del tejido conectivo, del cual derivan los cartílagos, músculos y huesos (Puente y Velasco, 2017). Los tipos más comunes son el leiomiomasarcoma, el sarcoma de Kaposi, el histiocitoma fibroso maligno, el liposarcoma y el dermatofibrosarcoma protuberante.

- **Leucemia:** cáncer que inicia en la médula ósea, estos cánceres no forman tumores sólidos, en su lugar, un gran número de glóbulos blancos anormales, se acumulan en sangre y médula ósea, desplazando a los glóbulos blancos normales. Las alteraciones en estas células pueden ocasionar anemia, infecciones y alteraciones de la coagulación. Hay cuatro tipos comunes de leucemia; se agrupan de acuerdo con la rapidez con la que evolucionan (aguda o crónica) y el tipo de glóbulo en donde empieza el cáncer (linfoblástico o mieloide) (Instituto Nacional de la Salud 2019; Puente y Velasco, 2017).
- **Linfoma:** cáncer que se desarrolla a partir del tejido y órganos linfáticos. Es una acumulación de linfocitos anormales en los ganglios linfáticos y en los vasos linfáticos, así como otros órganos del cuerpo. Hay dos principales tipos de linfomas; Linfoma de Hodgkin (Linfocitos anormales que se llaman células de Reed-Sternberg, estas células se forman, en general, de células B); Linfoma no Hodgkin (en estos cánceres hay un crecimiento rápido y se pueden formar de células B o de células T).
- **Mieloma múltiple:** cáncer que se presenta en las células plasmáticas. Las células plasmáticas anormales se acumulan en médula ósea y forman tumores en los huesos de todo el cuerpo.
- **Melanoma:** cáncer que empieza en las células precursoras de melanocitos, células especializadas en producir melanina (pigmento que da color a la piel). La mayoría se forman en la piel, pero pueden presentarse en otros tejidos pigmentados, como los ojos (Instituto Nacional de la Salud, 2019).

TRATAMIENTOS PARA EL CÁNCER.

Los tratamientos del cáncer son multidisciplinarios (Asociación Española Contra el Cáncer, 2018), entre distintos profesionales certificados en oncología y cirujanos, dermatólogos, neumólogos, ginecólogos, etc. (De la Garza Salazar, 2014) se hacen combinaciones para aumentar las posibilidades de supervivencia. En las terapias para pacientes oncológicos se siguen protocolos empleados de manera generalizada en todos los hospitales (Asociación Española Contra el Cáncer, 2018), los cuales recogen las indicaciones o limitaciones del tratamiento en función de diversos factores:

- **Según el tumor:** tipo de tumor, localización, tamaño y afectación de los ganglios o de otros órganos.
- **Según el paciente:** edad, estado de salud, otras enfermedades.

A continuación, se mencionan los principales tratamientos aplicados en la clínica:

CIRUGÍA

Suele emplearse para determinados tumores, está indicada en los cánceres que no han presentado metástasis. Se considera preventiva (se extirpan lesiones), diagnóstica (biopsia para analizarla al microscopio), de estadiaje (conocer la extensión del tumor), curativa (extirpar el tumor con tejido sano de alrededor), paliativa (disminuir los síntomas de alguna complicación tumoral) y reparadora (restaurar la función y/o apariencia de un órgano tras la cirugía curativa).

RADIOTERAPIA

Con base en cómo se administre la radiación la radioterapia es de dos tipos:

- **Externa:** unos equipos generan la radiación (aceleradores lineales) y la administración de esta es desde el exterior, no contactan con el paciente. Al iniciar el tratamiento se tiene una planificación en la que es especificada la zona de tratamiento, la dosis total, número de sesiones y postura más conveniente. Por lo general, las sesiones son administradas 5 días a la semana con un descanso de 2 días. No es doloroso.
- **Interna:** la administración de radiación es a través de isótopos con distintas formas, que se introducen en el paciente, muy próximos o en contacto con el tumor. Se administra algún anestésico para colocar el implante. Cuando se finaliza el tratamiento se extraen los isótopos.

QUIMIOTERAPIA

Su meta es destruir a las células tumorales a través de una gran variedad de fármacos. Se administra en forma de ciclos, por vía oral o intravenosa. Un ciclo se refiere a la administración de fármacos en uno o varios días, seguido de un descanso que puede ser de 1 a 4 semanas.

OTROS TRATAMIENTOS

Hay disponible otras terapias que se emplean con menor frecuencia. Suelen estar indicados en tumores o circunstancias muy concretas.

- **Hormonoterapia:** se emplea en tumores que crecen vía estimulación de alguna hormona, es decir, cánceres hormono-dependientes; los más representativos son el de mama y el de próstata. Consiste en el empleo de determinadas hormonas para disminuir o detener el crecimiento del tumor.
- **Inmunoterapia:** consiste en utilizar el sistema inmunológico para destruir células tumorales. Esto se consigue mediante la estimulación del propio sistema inmune o bien introduciendo en el organismo anticuerpos, capaces de controlar la enfermedad.
- **Radioterapia intraoperatoria:** se administra radiación durante la cirugía en la zona de tumoral. Suele emplearse en el tratamiento de tumores abdominales. De esta manera se reduce la dosis de radiación en los tejidos normales.
- **Radioterapia estereotáxica:** se administran altas dosis de radiación en zonas muy pequeñas y precisas. Se emplea en el tratamiento de tumores cerebrales muy pequeños (Asociación Española Contra el Cáncer, 2018). Se puede realizar de tres maneras; la más común usa un acelerador lineal para administrar radiación de alta energía de fotones contra el tumor. El bisturí gamma emplea cobalto 60 para administrar la radiación. Finalmente se emplean haces de partículas de carga pesada (De la Garza-Salazar, 2014).
- **Crioterapia:** se destruye el tumor por frío, haciendo uso de nitrógeno líquido. Por lo general se emplea en el tratamiento de algunos tumores en fases localizadas o en lesiones premalignas.

- **Cirugía micrográfica de Mohs o cirugía microscópicamente controlada:** permite extirpar el cáncer de piel en capas delgadas, una a la vez, hasta que todas las células de una capa parecen ser células normales al ser examinadas con un microscopio.
- **Trasplante de médula ósea:** Se utiliza principalmente en el tratamiento de algunas leucemias, linfomas y mielomas. Se busca sustituir la médula ósea afectada por células madre provenientes de una médula ósea sana. Se realiza inyectando las células madre al torrente sanguíneo a través de un catéter venoso central, como si se tratase de una transfusión. Las células madre viajan en el torrente sanguíneo y finalmente llegan a los sitios correspondientes, existen tres clases de trasplantes de médula ósea:
 1. **El autotrasplante.** Auto significa uno mismo (también se llama trasplante de rescate). En este procedimiento, las células madre son tomadas del paciente antes de dar inicio al tratamiento de radioterapia o quimioterapia, las células obtenidas se almacenan por criopreservación para después de realizar y concluir los tratamientos previos, las células madre se colocan de nuevo en el paciente, de modo que se devuelven células normales.
 2. **El alotrasplante.** “Alo” significa “otro”. Las células madre se obtienen de una persona sana a la que se llama donante, con la que debe haber compatibilidad, un hermano habitualmente tiene la mayor probabilidad de ser un buen donante (Asociación Española Contra el Cáncer, 2018).
 3. **Trasplante de células madre hematopoyéticas del cordón umbilical.** Se lleva a cabo siempre y cuando se cuente con el recurso debidamente

preservado. Esta terapia es un recurso terapéutico después del uso mieloablativo con quimioterapia o radioterapia (o ambas) para destruir a las células neoplásicas, ya que secundariamente al tratamiento la médula ósea se destruye. Las células madre trasplantadas permiten el crecimiento y repoblación.

- **Cirugía robótica.** La más empleada es la del Sistema Robótico da Vinci que proporciona una imagen en 3D de la operación, su sistema electrónico permite al cirujano realizar movimientos de alta precisión, es decir, que el tejido maligno se puede quitar con eficacia y facilidad (Garza-Salazar y Juárez-Sanchez, 2014)

EVOLUCIÓN DEL TRATAMIENTO ONCOLÓGICO EN MÉXICO.

Desde la década de los sesenta las personas empezaron a conocer más de la enfermedad y la importancia que tiene la prevención, detección temprana, indispensable para el tratamiento oportuno. También se ha avanzado en tecnología e infraestructura; las cirugías se han disminuido en tamaño y se han vuelto más conservadoras. Los medicamentos mencionados a continuación son los disponibles y de uso en el país:

- Imatinib empleado principalmente en leucemias
- Everolimus y trastuzumab en mujeres con cáncer de mama
- Rituximab usado en linfoma
- Afatinib y erbitux prescrito para cáncer de pulmón
- Cetuximab utilizado en casos de cáncer de colon

- Sorafenib y sunitinib para pacientes con cáncer de riñón
- Crizotinib y gefitinib y para cáncer de pulmón
- Regorafenib y bevacizumab y prescrito en caso de cáncer de colon.

Cada uno de estos medicamentos son específicos y actúan sobre los receptores membranales de las células cancerígenas (De la Garza Salazar, 2014).

TIPOS DE CÁNCERES.

Actualmente se conocen cientos de tipos diferentes de cáncer, para fines de este estudio, nos enfocaremos en CC.

GENERALIDADES DE CÁNCER DE COLÓN.

Entendemos por CC, también llamado cáncer colonrectal (CCR), como el crecimiento incontrolado de las células del colon y/o el recto. Los tumores de CCR pueden surgir en una o todas las capas: mucosa, muscular y serosa. El adenocarcinoma se origina en las glándulas. El adenocarcinoma es el más frecuente de los CC, con un 90% de incidencia. Los **linfomas**, los **sarcomas** y los **melanomas** son infrecuentes (Flores, 2020).

El colon y recto son la parte final del tracto digestivo. Son órganos alargados, en forma de tubo y huecos. El colon comunica el intestino delgado con el recto, se encuentra muy cerca de otros órganos abdominales como el hígado, el estómago y el bazo. El recto está cercano a los órganos próstata, vejiga, útero y ovarios. En cuanto a su estructura anatómica, en el colon se pueden identificar diferentes

partes: colon derecho o ascendente, colon transverso, colon izquierdo o descendente y sigma (Figura 5). Su función es compactar las heces, mediante la extracción de agua, evitando la pérdida de líquidos por la evacuación. El recto funciona como almacén de la materia fecal y evita la incontinencia de heces. Puede vivirse sin colon y sin recto. En estos casos, el ritmo intestinal y las características de las deposiciones cambian.

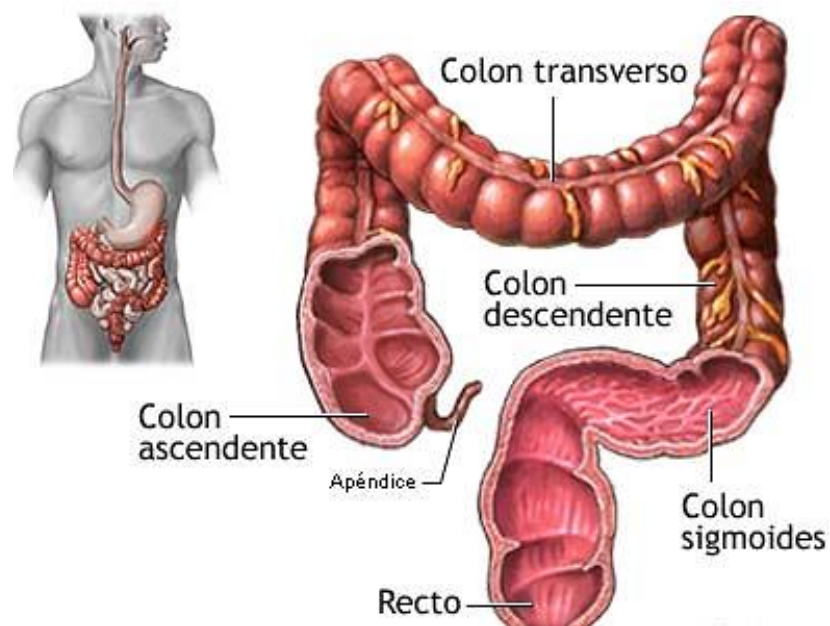


Figura 5. Anatomía del colon (ADAM, 2020)

CAUSAS Y FACTORES DE RIESGO.

Las causas exactas del CC se desconocen en la mayoría de los casos, aunque se sabe que existen algunos factores de riesgo que favorecen su aparición. Los factores de riesgo para desarrollar CC son varios y no se excluyen entre sí:

1. La dieta: se observa una mayor predisposición en aquellos individuos con dietas ricas en grasas, y con escaso consumo de verduras y frutas.

2. Condiciones o enfermedades predisponentes: Existe una serie de enfermedades, benignas o premalignas, que aumentan el riesgo de padecer CC.

Las más destacadas son:

- Pólipos en el colon y/o recto:

-Los pólipos son un agrupamiento de células en el revestimiento del colon. Existen pólipos no neoplásicos y neoplásicos; la mayoría de ellos son inofensivos al inicio, pero algunos pueden llegar a convertirse en CC con el transcurso del tiempo.

- Cuando se trata de pólipos neoplásicos, hay que poner especial atención al tamaño, cuando mayor sea, mayor riesgo de desarrollar un tumor maligno.

- Enfermedades intestinales inflamatorias: principalmente se incrementa el riesgo de CC en pacientes con enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa.

3. CC previo: Haber tenido CC previamente aumenta el riesgo de que reaparezca un segundo tumor.

4. Factores familiares o genéticos: en el 25% de pacientes se presentan un componente familiar y en menos del 10% tiene un efecto hereditario.

- Factores familiares: La incidencia es mayor en aquellas personas con uno o varios familiares diagnosticados de CC.

- Factores genéticos: Algunos síndromes genéticos aumentan el riesgo de desarrollar CC (American Cancer Society, 2021).

DETECCIÓN Y DIAGNÓSTICO.

Diagnóstico precoz: se realizan diferentes pruebas (en CC, se busca la presencia de sangre oculta en heces o colonoscopia) para el diagnóstico en una etapa inicial en individuos asintomáticos. Actualmente el método de cribado para la población general, recomendado por las autoridades sanitarias y que se ha establecido en el territorio nacional de forma progresiva es la detección de sangre oculta en heces, prueba que se comienza a realizar en pacientes mayores a los 50 años de edad.

Diagnóstico: Para diagnosticar CC se realizan una historia clínica, una exploración física, una analítica de sangre, unas pruebas radiológicas y, la mayoría de las veces, una colonoscopia.

1. Historia clínica y exploración física: Como en cualquier enfermedad, habitualmente la historia clínica y la exploración física son las primeras acciones realizadas por el personal de salud que atienden el caso.

2. Analítica: Un conteo sanguíneo completo (CSC) aportará información sobre si existe anemia y una química sanguínea proporciona información sobre el funcionamiento de órganos como el hígado y riñón.

3. Marcadores tumorales: Determinaciones que miden el nivel de algunas proteínas en sangre. El antígeno carcinoembrionario (CEA) y el CA 19.9 son los más empleados. Son análisis de orientación, pero no diagnósticos, dado que:

- Los marcadores tumorales pueden estar en niveles normales en pacientes con cáncer (no todos los cánceres presentan una elevación de marcadores).
- Los marcadores tumorales pueden estar elevados y no existir un cáncer (elevación de marcadores por causas benignas o no tumorales), no son

utilizados para el diagnóstico de CC, sino hasta que el paciente es diagnosticado con CC para el seguimiento de la enfermedad en los casos en los que el oncólogo así lo indique.

4. Colonoscopia: consiste en introducir un endoscopio que tiene una luz al final y que permite visualizar el interior del colon y recto. Tiene una pinza en su extremo interno con la que se pueden tomar muestras de biopsias, incluso puede reseca pólipos si son pequeños.

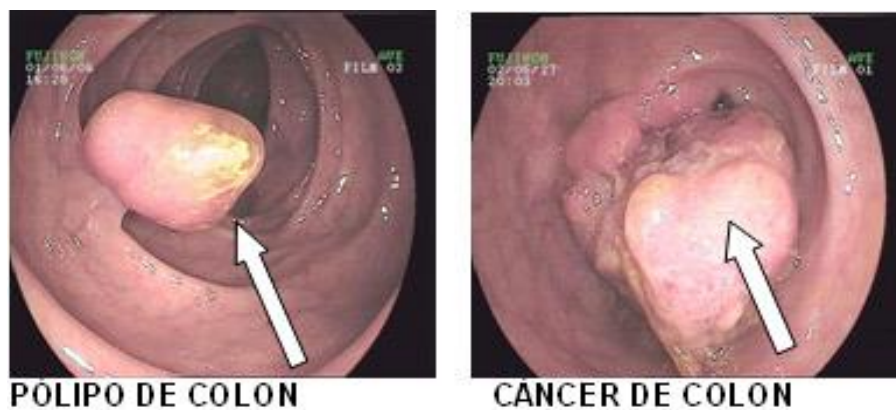


Figura 6. Pólipo de colon y cáncer de colon (SEOM,2020).

5. Exploraciones radiológicas: Para diagnosticar CC o determinar su nivel de extensión por el cuerpo, se pueden realizar diferentes exploraciones radiológicas.

- Radiografía (Rx) de tórax: Es empleada con frecuencia.
- Rx simple de abdomen: aporta información sobre si hay o no obstrucción intestinal.
- Enema opaco: se administra contraste de bario por vía anal. Este contraste deja ver el interior del colon y recto. Con esta técnica es posible detectar lesiones.

- Ecografía abdominal o abdominopélvica: Se basa en ultrasonidos.
- Escáner o tomografía axial computarizada (TAC) de tórax.
- TAC abdominal-pélvico: prueba radiológica que ofrece datos sobre el CC: su extensión local, si existen metástasis en el hígado, si hay ascitis, etc.
- Resonancia abdominal: Es una técnica diferente al TAC, suele hacerse cuando existen hallazgos en el escáner como exploración complementaria.

6. Otras exploraciones: Existen otras pruebas complementarias:

- Ecografía endoscópica: se emplea un endoscopio con transmisor de ultrasonidos para realizar una ecografía. Útil en la clasificación de CC.
- Tomografía de emisión de positrones (PET): prueba de Medicina Nuclear, en la que se inyecta un líquido marcado y se mide la emisión de las partículas positrones. Da una visión global del cuerpo.
- Gammagrafía ósea: estudia si el cáncer se ha extendido a los huesos (sólo se realiza si el paciente tiene síntomas óseos).
- Laparoscopia: se introduce un endoscopio en la cavidad abdominal, a través de orificios realizados por un cirujano en la pared abdominal, para comprobar si el tumor se ha extendido más allá del colon. Se realiza cuando el resto de exploraciones no son concluyentes (Macuralla, Élez, Capdevilla, Tabernero, 2011).

TIPOS DE CÁNCER DE COLON Y RECTO.

Para llegar al diagnóstico definitivo de CC se requiere confirmación con biopsia que suele proceder de la colonoscopia o de alguna lesión metastásica si la

enfermedad está extendida. Al estudiarse al microscopio, con un 90% de frecuencia el adenocarcinoma es el tipo histológico más común, el 10% restante lo tiene el adenocarcinoma coloide. Una vez conocido que nos encontramos ante un CC se requieren estudios adicionales que nos van a aportar información útil para el tratamiento de la enfermedad.

- Análisis de proteínas reparadoras de ADN mediante inmunohistoquímica, se valora si el cáncer está relacionado con algún componente hereditario y puede determinar si el paciente se beneficia de un determinado tipo de tratamiento.

- En presencia de metástasis a distancia, es importante conocer el estado mutacional de unos genes en el tumor primario o en alguna de las metástasis. Los genes de mayor relevancia son los de la familia RAS (BRAF, NRAS y KRAS). Cuando RAS está nativo, se ha demostrado que el cetuximab y el panitumumab, anticuerpos anti-EGFR pueden ser activos. Si RAS se encuentra mutado, dichos anticuerpos no funcionan. Si BRAF tiene mutaciones, no hay buena respuesta a los anticuerpos anti-EGFR.

Los tipos histológicos carcinoma epidermoide, sarcoma, melanoma o linfoma, no son frecuentes.

Actualmente se realizan avances en la clasificación molecular de CC para tratar a cada tumor de forma personalizada, se sabe que las características moleculares son diferentes si el tumor primario se ubica en colon derecho o en el izquierdo (Mercade, Élez, Capdevilla, Tabernero, 2011).

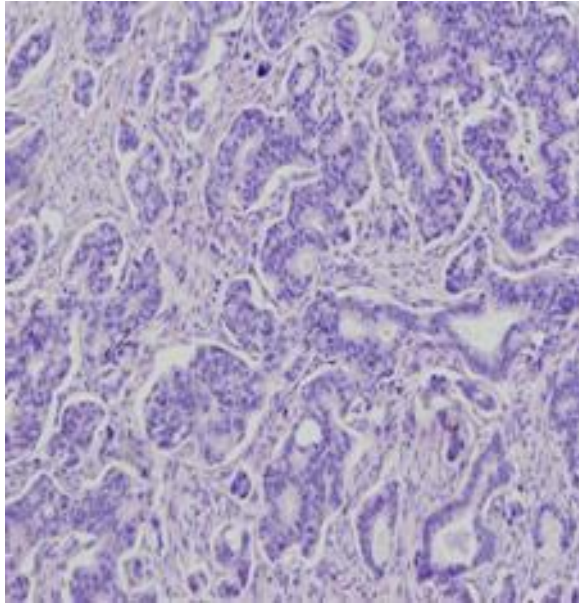


Figura 7. Cáncer de colon al microscopio óptico.

Estadios de CC

El CC posee varios patrones de crecimiento, que pueden ocurrir de forma concomitante y no se excluyen entre sí. De forma general, el CC inicia con una extensión local, pasa por infiltración linfática y finalmente por diseminación hematológica. La siembra peritoneal por células cancerígenas es otra forma de progresión tumoral.

1. Extensión local: El cáncer puede desarrollarse en todas las direcciones, de arriba o hacia abajo, en el interior o exterior del colon. Puede aumentar o disminuir la luz intestinal causando una obstrucción o perforación.

2. Infiltración linfática: En nuestros organismos poseemos estructuras nodulares, llamadas ganglios linfáticos, que se distribuyen por todo el organismo y son la protección que tenemos ante las infecciones. Las células tumorales tienen la

capacidad de emigrar desde el sitio de origen (tumor primario) y desplazarse por los vasos linfáticos y llegar a ganglios linfáticos.

3. Diseminación hematológica: Cuando las células cancerígenas alcanzan el torrente sanguíneo, son capaces de trasladarse en este y llegar a órganos distantes donde se depositan y pueden iniciar el desarrollo de nuevos tumores. Este proceso se denomina metástasis. El CC se disemina con mayor frecuencia por vía hematológica en hígado, pulmones y huesos.

4. Siembra peritoneal: Las células cancerígenas tienen la capacidad de desprenderse del tumor y depositarse en la superficie de otros órganos abdominales y pélvicos, como el intestino delgado u ovarios, produciendo nuevos sitios tumorales (Instituto Nacional del Cáncer, 2020).

Clasificación por estadios

Los cánceres se clasifican por etapas o estadios. En esta clasificación se agrupan a pacientes con cáncer en el mismo estadio, ya que el pronóstico y tratamiento que requerirán son parecidos.

La clasificación más utilizada es TNM: T (Tumor), N (ganglios=Nodes en inglés) y M (Metástasis). En base a T, N y M se determinan los estadios.

Estadio 0 o carcinoma *in situ*: etapa inicial del CC. Se encuentra en la parte superficial de la mucosa y no infiltra otras capas de colon o recto, no invade ganglios ni hay metástasis.

Estadio I: Después del estadio 0, es el de mejor pronóstico.

Estadio II y Estadio III: Son etapas intermedias. El estadio II es de mejor pronóstico que III, en estadio II no hay infiltración ganglionar y en estadio III sí.

Estadio IV: etapa más avanzada. Existe metástasis y el pronóstico no es bueno.

La supervivencia en pacientes con cáncer está relacionada directamente con estos estadios, más del 95% de probabilidad de sobrevivir si el paciente se encuentra en el estadio 0; este porcentaje va disminuyendo medida que el estadio es mayor. El estadio IV tiene el menor porcentaje de supervivencia, aunque con el abordaje multidisciplinario cada vez más pacientes con estadio IV llegan a remisión (Instituto Nacional del Cáncer, 2020).

TRATAMIENTOS

La elección del tratamiento más adecuado para un paciente tiene en cuenta diferentes factores:

- Factores dependientes del paciente: edad, estado general, situación nutricional, otras enfermedades concomitantes y la decisión del propio paciente a recibir los tratamientos propuestos.
- Factores dependientes del tumor: zona del colon donde se localiza el cáncer, estadio del CC, estado de los genes RAS en CC metastáticos, y el tipo de tumor.
- Factores dependientes del tratamiento: cirugía requerida, tolerancia y respuesta a la quimioterapia o radioterapia, estado mutacional de RAS para anticuerpos monoclonales anti-EGFR.

Los principales tratamientos para CC son cirugía, quimioterapia (incluyendo los inhibidores de tirosina quinasa y los anticuerpos monoclonales) y radioterapia, aunque, en algunos pacientes, el tratamiento es exclusivamente paliativo o endoscópico (colocación de prótesis o extirpación de pólipos).

Algunas veces se requiere de otros tratamientos sobre la enfermedad metastásica, principalmente hepático. En múltiples ocasiones, la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia se combinan, para obtener mejores resultados, pero no siempre es así. Para aumentar las posibilidades de alcanzar la remisión, el tratamiento requiere un enfoque multidisciplinar entre cirujanos, oncólogos médicos y oncólogos radioterápicos, entre otros (Macuralla, Élez, Capdevilla, Tabernero, 2011).

CIRUGÍA

La cirugía es el tratamiento en el que se extirpan tejidos enfermos, solucionan obstrucciones, realizan lavados, drenan abscesos, colocación de prótesis, entre otros. Desde el punto de vista de la posibilidad de extirpar completamente el tumor, los cánceres se clasifican en:

- Tumores locales.
- Tumores extendidos a nivel regional (el cáncer se extiende a las estructuras vecinas).
- Metástasis (el cáncer se extiende a órganos distantes como el hígado o el pulmón). En ocasiones las metástasis hepáticas o pulmonares se pueden

extirpar, pero no siempre es así. Depende del número de metástasis, el tamaño, y localización.

Las cirugías en cáncer pueden tener dos objetivos:

- Curativo: se efectúa buscando eliminar todo el cáncer.
- Paliativo: se realiza para intentar mejorar los síntomas que produce el tumor, pero no se puede extirpar toda la enfermedad porque ya está muy extendida.

La cirugía se realiza sobre el tumor primario que incluye la extirpación completa de la zona del colon afectada por el tumor y los ganglios circundantes. Existen diferentes técnicas que dependen de la localización tumoral. Cabe mencionar que las cirugías también se llegan a realizar en tumores metástasis (Macuralla, Élez, Capdevilla, Tabernero, 2011).

QUIMIOTERAPIA Y FÁRMACOS BIOLÓGICOS

La quimioterapia consiste en la administración de medicamentos con actividad antitumoral (oxaliplatino, irinotecan, 5-fluorouracilo, capecitabina, UFT, utefos, TAS-102, raltitrexed), denominados quimioterápicos o citostáticos y ejercen su efecto sobre las células, su función es alterada y favorecen su destrucción. No todos los pacientes con CC deben recibir quimioterapia y en otros casos puede estar contraindicada.

Los fármacos biológicos para CC avanzado, son anticuerpos monoclonales y la proteína de fusión recombinante. Cetuximab, panitumumab, aflibercept y bevacizumab son fármacos biológicos administrados VI con actividad dirigida contra factores de crecimiento:

- Cetuximab y panitumumab: anticuerpos monoclonales anti-EGFR (contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico) útiles en pacientes RAS no mutado
- Bevacizumab: anticuerpo anti-VEGF A (contra el factor de crecimiento endotelial vascular A).
- Aflibercept: proteínas de fusión recombinante con diana VEGF-A, VEGF-B y el factor de crecimiento placentario.

Los inhibidores tirosina cinasa (TKI), fármacos dirigidos contra dianas celulares, administrados por vía oral. De ellos, el regorafenib es el único TKI que tiene actividad en CC metastático refractario a terapias estándares.

Las principales vías de administración para quimioterapia son IV, vía oral (VO) e intraperitoneal (IP). En muchas ocasiones la administración de 5-fluorouracilo se realiza mediante un infusor para que el tratamiento vaya pasando de forma continua, la mayoría de los casos en 48 h, de modo que el paciente lo recibe en su domicilio. La quimioterapia no se administra por completo en una sola vez, porque sería demasiado tóxica para el organismo entero. Por esa razón, se divide en ciclos. Los anticuerpos monoclonales y aflibercept es administrado por IV en ciclos. La quimioterapia y anticuerpos monoclonales suelen combinarse entre sí.

El regorafenib se administra por VO, generalmente en monoterapia. La quimioterapia puede estar indicada:

- Como tratamiento adyuvante a la cirugía.
- Enfermedad metastásica con intención de reducir el tamaño y número de tumores y valorar la extirpación quirúrgica de las mismas.
- Controlar el crecimiento del tumoral y disminuir los síntomas que produce la enfermedad.

La quimioterapia adyuvante (postoperatoria) se acompaña, en CC estadio II y III, de radioterapia para aumentar su eficacia. Indicada en pacientes en estadio III.

La quimioterapia no siempre muestra eficacia y la enfermedad continúa avanzando, aunque el paciente la reciba, ya que las células tumorales son capaces de crear mecanismos de farmaco-resistencia. Cuando esto sucede se cambia a otro tipo de combinación de quimioterapia con o sin anticuerpos monoclonales. Los quimioterapéuticos combinados con fármacos biológicos se indican en cáncer metastásico.

Los citostáticos que tienen actividad en CC son varios. Los principales fármacos aprobados y empleados son las fluoropirimidinas como 5-Fluorouracilo, utefos, capecitabina y UFT); cetuximab, irinotecan, oxaliplatino, raltitrexed, panitumumab, bevacizumab, el aflibercept y regorafenib. Además, otros fármacos han demostrado en ensayos clínicos su actividad antitumoral como ramucirumab actuando en el receptor 2 del VEGF.

La toxicidad de la quimioterapia, los anticuerpos monoclonales, el aflibercept y el regorafenib se da porque no tienen un efecto único sobre las células cancerígenas, pues no son fármacos inteligentes que dirigen su acción contra dichas células; sino que atacan de igual manera a las células anormales y normales. El problema de toxicidad depende de varios factores como lo son los fármacos administrados, las dosis, sus combinaciones, los regímenes de administración y el estado del paciente.

En general, la quimioterapia puede producir anemia, trombopenia, neutropenia, disminución del apetito, náuseas y vómitos, diarrea, cansancio, fiebre. Existen efectos secundarios característicos de cada fármaco, como oxaliplatino y su toxicidad neurológica; las fluoropirimidinas tienen toxicidad cardíaca; hipertensión arterial de bevacizumab; o la toxicidad cutánea de panitumumab y cetuximab. Algunos de estos fármacos, pero no todos, producen alopecia (Macuralla, Élez, Capdevilla, Taberner, 2011).

RADIOTERAPIA

La radioterapia es el tratamiento con radiaciones ionizantes. La radioterapia trata un área específica del cuerpo, por lo que es considerada como un tratamiento local de igual manera que la cirugía; a diferencia de la quimioterapia que se considera un tratamiento sistémico.

El paciente se recuesta sobre una camilla y tiene que permanecer inmóvil para tratar únicamente el campo afectado, las sesiones duran unos minutos, es diaria y es indolora.

La radioterapia está indicada como tratamiento complementario a la cirugía o paliativo para controlar el dolor y demás síntomas, la administración en esta situación, se suele administrar sola sin quimioterapia. No todos los pacientes con CC reciben radioterapia ya que en algunos casos puede estar contraindicada. Si el tumor está localizado no es necesaria la radioterapia ni antes ni después de la cirugía. En pacientes con CC en estadio II y III se administra antes o después de la cirugía como tratamiento complementario para reducir el riesgo de recaídas. En muchos pacientes se administra de manera concomitante a la quimioterapia para incrementar la eficacia del tratamiento.

La radioterapia tiene como objetivo tratar únicamente el tumor con un margen de seguridad, pero los tejidos sanos y cercanos inevitablemente reciben parte de las radiaciones. Sus efectos adversos se deben a esta acción sobre los tejidos normales. La dosis de radioterapia total a administrar depende de la tolerancia en los tejidos sanos (Macuralla, Élez, Capdevilla, Tabernero, 2011).

EPIDEMIOLOGÍA MUNDIAL.

El CC es el tercer cáncer más común en el mundo, después del cáncer de pulmón y de mama. El CC predomina en personas mayores, la edad media de presentación es 70-71 años y la mayoría de los pacientes tienen más de 50 años en el momento del diagnóstico. Afecta la vida de mujeres y hombres por igual.

Representa el tumor con mayor frecuencia de diagnóstico en España en el año 2019 en ambos sexos (44.937 casos incidentes), siendo el segundo en hombres y mujeres, después de próstata y mama, respectivamente (Flores, 2020).

Mientras que, en Estados Unidos es el tercer tipo más frecuente de cáncer que se diagnostica cada año en los hombres y las mujeres. Se estimó que para 2020 se diagnosticarían 147,950 casos de CC en adultos en los Estados Unidos. Las cifras incluyen 104,610 casos incidentes de CC (52,340 hombres y 52,270 mujeres) y 43,340 casos incidentes de cáncer de recto (25,960 hombres y 17,380 mujeres); las muertes estimadas serían de 53,200 (28,630 hombres y 24,570 mujeres) a causa de CCR, es la segunda causa de muerte por cáncer para los adultos en los Estados Unidos. Es la tercera causa de mortalidad por cáncer en ambos sexos.

La tasa de supervivencia general para CC a 5 años es del 63% si el cáncer está localizado, la tasa de supervivencia es del 90% si el cáncer se ha diseminado a tejidos u órganos cercanos o los ganglios linfáticos regionales, la tasa de supervivencia a 5 años es del 71%, pero si ha diseminado a partes distantes del

cuerpo, la tasa de supervivencia a 5 años disminuye a 15% (American Society of Clinical Oncology, 2020).

La mortalidad de CC cambia de forma rápida en comparación con otros tumores debido a los cambios en el estilo de vida y dieta.

EPIDEMIOLOGÍA EN MÉXICO.

En la región de América Latina, el CCR ocupa el cuarto lugar entre las causas de defunción por enfermedades tumorales. Cada año, se registran alrededor de 240,000 casos incidentes, de los cuales unos 96,000 pacientes fallecen. En Estados Unidos y Canadá se encuentran registrados una cantidad mayor de casos, pero en proporción a América Latina en estos países desarrollados la mortalidad es menor a causa de CCR (OPS, 2020).

En México, el CC ocupa el tercer lugar en incidencia y el primer lugar de mortalidad cáncer. En base a los registros de la IARC; de los 14,900 incidentes en 2018, murieron aproximadamente el 48% de los pacientes (PMfarma, 2020).

TERAPIA CON CURCUMINA.

La CUR (1,7-bis- (4-hidroxi-3-metoxifenil) -hepta-1,6-dieno-3,5-diona), un polifenol lipofílico es el componente activo de *C. longa* (cúrcuma), una especia nativa de la India, en los países asiáticos, tiene una larga historia de uso contra muchas dolencias humanas y afecciones de la piel, como el acné y la psoriasis; también se sabe sobre su funcionamiento como anticancerígeno, antibiótico y

antiinflamatorio (Kotha y Luthria, 2019). Su uso común es como agente colorante y un aditivo alimentario. Es un compuesto cristalino de aspecto amarillo anaranjado brillante, que contribuye a su uso como colorante. Los productos comerciales de CUR contienen una mezcla de curcuminoides, que incluyen ~77% de CUR, 17% de demetoxicurcumina y 3% de bis-demetoxicurcumina. Se ha demostrado que los curcuminoides tienen diferentes potencias para suprimir la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B) inducido por el factor de necrosis tumoral (TNF). Lo más probable es que esto se deba a las diferencias en el número de grupos metoxi que se encuentran en la posición orto del anillo de fenilo. A 25 μ M, se ha demostrado que la CUR es la más potente entre los tres curcuminoides, seguida de la demetoxicurcumina y la bis-demetoxicurcumina en concentraciones equivalentes.

CUR, solo o en combinación, muestra actividades quimiopreventivas y anticancerígenas con usos reportados contra varios cánceres, incluidos el CCR, el pancreático, el de mama, cánceres de próstata, pulmón, y oral. CUR ejerce sus efectos regulando a la baja múltiples vías de señalización celular, que incluyen NF- κ B, STAT3, proteína activada-1 (AP-1) y respuesta en la proteína de crecimiento epidérmico-1 (Egr-1), que son cruciales en el desarrollo y progresión de cáncer. Estos factores de transcripción suelen estar regulados positivamente en la mayoría de los cánceres para ayudar en la proliferación celular, la angiogénesis y la formación de tumores. La regulación a la baja de las vías de NF- κ B modula la expresión de una variedad de genes como la ciclina D1, Bcl-2, Bcl-xL, ciclooxigenasa 2 (COX-2), metaloproteinasa de matriz (MMP) -9, promoviendo así la detención del ciclo celular, suprimir la proliferación celular e inducir la

apoptosis. CUR también modula tanto AP-1 como STAT3 en la proliferación celular de células cancerosas. La regulación a la baja de AP-1 y STAT3 da como resultado un retraso del crecimiento de las células cancerosas. El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un objetivo crucial en el tratamiento del cáncer, ya que se puede encontrar en muchos tumores sólidos, incluido el CCR. La regulación a la baja de EGFR se asocia con la inhibición del crecimiento, la invasión y la metástasis de las células cancerosas. Se encontró que CUR suprime la expresión de EGFR, mediada por la reducción de la actividad de Egr-1 en las células de cáncer de colon Caco2 y HT29, inhibiendo el crecimiento de las células de cáncer de colon. Además, CUR también podría promover la apoptosis a través de la regulación positiva del gen supresor de tumores p53, causando la muerte celular en la fase G2. El efecto corriente abajo de la activación de p53 conduce a un efecto neto de apoptosis en las células de carcinoma de colon a través de la regulación negativa de los genes anti-apoptóticos Bcl-2 / Bcl-xL y la regulación positiva de los genes proapoptóticos Bax. A pesar de tener las propiedades anticancerígenas antes mencionadas, su escasa biodisponibilidad oral sigue siendo el principal inconveniente, lo que limita su potencial clínico. Como resultado, estos problemas han llevado al desarrollo de nanoformulaciones CUR en la búsqueda de mejorar la administración de CUR para un mejor resultado terapéutico (Wong et al., 2019).

NANOFORMULACIONES DE CURCUMINA EN EL CÁNCER COLORRECTAL.

A lo largo de los años se ha explorado varias nanoformulaciones para mejorar la administración de CUR a los sitios del tumor. Las nanoformulaciones se utilizan principalmente para mejorar la solubilidad en agua y para proporcionar un sistema de suministro más estable para CUR. Idealmente, la nanoformulación de CUR para el cáncer debería tener una actividad anticancerígena mejorada en comparación con la CUR libre, al mismo tiempo que no es tóxica para las células normales. Las nanoformulaciones de CUR para CCR que se han informado en la literatura incluyen liposomas, micelas, nanopartículas poliméricas, nanocápsulas poliméricas, nanogeles, ciclodextrina, nanopartículas de lípidos sólidos, fitosomas y nanopartículas de oro (Figura 8) (Wong et al., 2019).

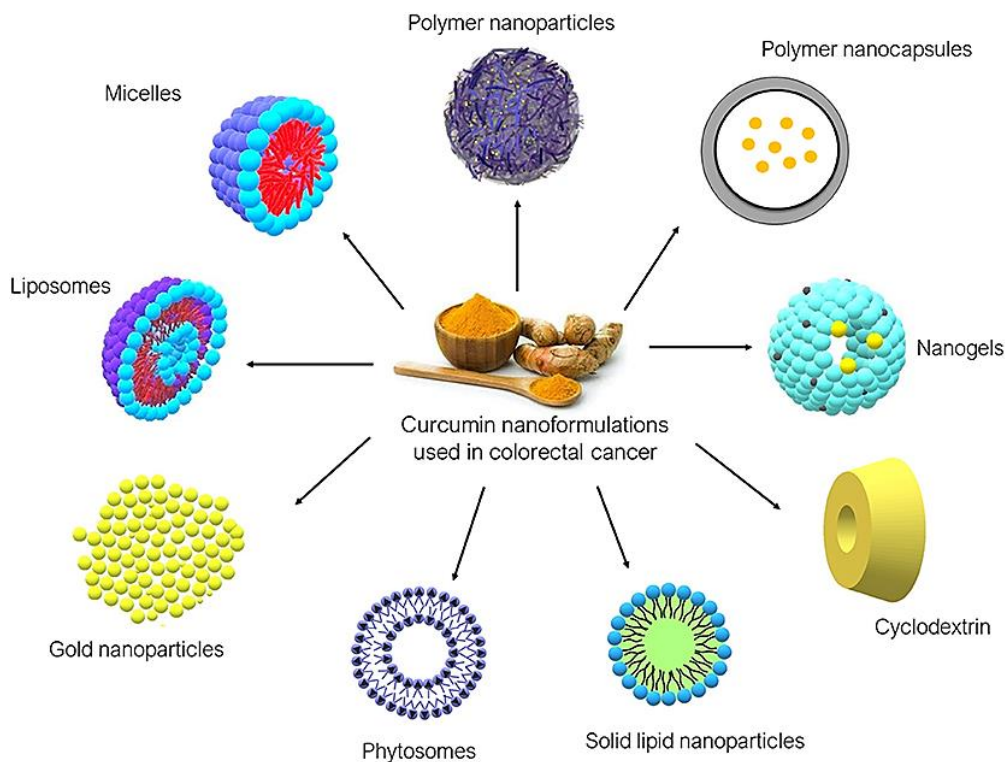


Figura 8. Nanoformulaciones de curcumina utilizadas en cáncer colonrectal encontradas en la literatura.

NANOMEDICINA

El prefijo 'nano' se refiere a un prefijo griego que significa 'enano' (algo muy pequeño) y representa una mil millonésima parte de un metro (10^{-9} m). Por lo que, la nanociencia es el estudio de estructuras y moléculas a escalas de nanómetros que oscilan entre 1 y 100 nm. El término de nanomedicina se utiliza a partir de 1991, cuando Drexler, Peterson y Pergamit publicaron el libro titulado "Unbounding the Future: the Nanotechnology Revolution" en el que utilizan los términos "nanobots" o "ensambladores" para los nano procesos en aplicaciones de la medicina, de donde surge el término "nanomedicina" (Bayda et al., 2020).

La nanomedicina tiene como fin utilizar las propiedades y características físicas de los nanomateriales para diagnosticar y tratar las enfermedades a nivel molecular. En la actualidad se diseñan nanomateriales para ayudar al transporte de agentes diagnósticos o terapéuticos a través de barreras biológicas; para acceder a las moléculas; mediar interacciones moleculares; y para detectar cambios moleculares de una manera sensible y de alto rendimiento. Dichos nanomateriales tienen una alta proporción de área de superficie a volumen, así como propiedades ópticas, electrónicas, magnéticas y biológicas sintonizables, y pueden diseñarse para tener diferentes tamaños, formas, composiciones químicas y características químicas de la superficie y estructuras huecas o sólidas. Estas propiedades se están incorporando a las nuevas generaciones de vehículos de administración de fármacos, agentes de contraste y dispositivos de diagnóstico, algunos de los cuales se encuentran actualmente en investigación clínica y algunos otros han sido

aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) para uso en humanos (Betty Y.S. et al., 2010).

La investigación de la nanomedicina en la administración dirigida de medicamentos se centra en la terapéutica nanomedicinal basada en oncología, ya que reciben alrededor de dos tercios de la atención de la investigación. Estas investigaciones tienen como objetivo mejorar el índice terapéutico de los fármacos contra el cáncer modificando su farmacocinética y distribución tisular para mejorar la administración al sitio de acción es bien conocido y también se ha demostrado clínicamente. Diseñada para aprovechar el efecto mejorado de permeabilidad y retención, la doxorubicina liposomal (Doxil™/Caelyx™) fue la primera nanomedicina anticancerosa aprobada por la FDA en 1995. La aprobación de nuevas nanomedicinas se ha basado principalmente en mejorar el beneficio terapéutico aumentando la seguridad (Hare et al., 2017).

Las publicaciones en el área farmacéutica y en nanomedicina incrementaron notablemente después del 2002, esto demostró el interés en los nanogeles como biomateriales para aplicación en el área farmacéutica. La nanomedicina agrupa tres áreas principales: el nano-diagnóstico, la liberación controlada de fármacos (nanoterapia) y la medicina regenerativa.

La liberación de fármacos cargados en microgeles / nanogeles puede realizarse por difusión, desplazamiento por iones presentes en el medio ambiente o degradación de microgel / nanogel.

El uso de microgel y nanogel como dispositivos de administración de medicamentos brinda algunas oportunidades en comparación con otros sistemas:

- El tamaño de partícula influye en la capacidad de penetración de los tejidos por vías paracelulares o transcelulares; Los nanogeles pueden llegar incluso a los vasos capilares más pequeños.
- La liberación controlada en el área objetivo-desencadenada por estímulos ambientales localizados, en lugar de la administración sistémica del agente activo, puede mejorar la eficiencia terapéutica y reducir los efectos adversos fuera del objetivo (Vihola et al., 2005).

NANOGELES pH RESPONSIVOS

Existen hidrogeles de tamaño en nanómetros denominados nanogeles capaces de regular la liberación de fármacos en respuesta a estímulos externos de naturaleza física, química y biológica. Esta nanoestructura ofrece muchas características avanzadas como sistema de administración de fármacos, incluyendo simplicidad de formulación, estabilidad excepcional de la dispersión y almacenamiento en forma liofilizada para su posterior dispersión en medios acuosos. El diseño de nanogeles poliméricos con nuevas propiedades representa un campo de constante interés para la industria farmacéutica y biomédica.

Los nanogeles estímulo-sensibles han sido denominados materiales "inteligentes" porque, ante alteraciones sutiles del medio ambiente, como lo es el cambio de pH, responden cambiando su grado de hinchamiento, para posteriormente liberar el cargado (Guerrero, 2014).

Este tipo de nanogeles resulta muy útil en la investigación oncológica, dada la notable diferencia entre el pH del plasma de pH 7.4 y el microambiente del tumor con pH 6.5 se puede aprovechar como un disparador interno para liberar los fármacos (Cuggino et al., 2016).

POLIMERIZACIÓN POR RADICALES LIBRES

La polimerización por radicales libres es una reacción en cadena, la cual consta de tres etapas: iniciación, propagación y terminación.

1. **Iniciación.** La etapa de iniciación consiste en dos reacciones secuenciales. La primera es la generación de radicales libres, los cuales pueden ser formados mediante diferentes tipos de reacciones. Como ejemplo se puede presentar la generación de radicales mediante una disociación homolítica de un compuesto (iniciador), que da como resultado dos fragmentos en el que cada uno tiene un electrón no apareado. La segunda reacción es la adición del radical libre a una molécula de monómero (M) para producir el radical polimérico de tamaño 1. El iniciador de la polimerización por radicales libres es un ion que, cuando se incorpora a la cadena oligomérica creciente, hace que esta molécula tenga actividad superficial, o bien el sustrato para la polimerización son oligómeros insaturados que llevan grupos ionizados en uno o dos extremos (Guerrero, 2014).

2. Propagación. La cual consiste en la adición sucesiva de monómero. Cada adición transforma al radical en otro radical, pero con un tamaño mayor por una unidad (radical polimérico).

3. Terminación. La tercera etapa de la reacción por radicales libres es la terminación del crecimiento de las cadenas. Existen varias formas de terminación del crecimiento de cadena (transferencia a monómero, a iniciador, etc.) pero la forma más común de terminación es cuando se encuentran dos radicales poliméricos. Esta reacción bimolecular de terminación puede seguir dos caminos:
 - a) Terminación por combinación, la cual da como resultado la formación de un polímero con un tamaño igual a la suma de las unidades monoméricas de que constaba cada radical.
 - b) Terminación por desproporción que da como resultado dos moléculas de polímero, una saturada y otra insaturada (Arrighi, 2007).

POLIMERIZACIÓN EN EMULSIÓN.

Este es un tipo de polimerización radical que por lo general comienza con una emulsión incorporando agua, monómero y un tenso-activo o surfactante (Todo en polimeros, 2017).

La emulsión es un sistema heterogéneo que tiene dos fases líquidas inmiscibles. Existen los tensoactivos que son utilizados para estabilizar la emulsión. Las reacciones de polimerización que forman nanogeles se pueden realizar en

emulsiones agua-aceite (W/O) o aceite-agua (O/W). Los métodos W/O, conocido como emulsión inversa son los más utilizados para la preparación de nanogeles, estos involucran la polimerización de monómeros hidrofílicos en presencia de agentes reticulantes en gotas de agua que son emulsionadas en una fase hidrófoba continua (Guerrero, 2014).

El iniciador se solubiliza en el medio, pero no en la fase dispersa, bajo estas condiciones, el monómero está presente parcialmente en la mezcla en forma de gotas de con una longitud de 1 a 10 μ m, aunque un porcentaje pequeño del monómero se disuelve también en el medio; y parcialmente en forma de micelas cubiertas de detergente dependiendo de la concentración del tensoactivo. La relación de volumen entre las fases, por lo general es 0.1-0.5 y la polimerización se lleva de 40 a 80°C.

Desde que el iniciador está presente en el medio, el inicio de la polimerización se lleva en el medio (fuera de las gotas y micelas). Los radicales formados en el medio de polimerización son rodeados por el monómero disuelto y moléculas de emulsificante, o son absorbidos por las micelas de monómero recubiertas de detergente. Los detalles de la formación y el crecimiento de las partículas dependen de la mezcla de polimerización.

El principal problema en un sistema de polimerización en emulsión es la contaminación en la superficie por los tensoactivos o detergentes, con un alto grado de dificultad para removerlos, ya que se incorporan sólidamente en el núcleo de las emulsiones (Motokawa, 2005).

SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS.

Los principios activos pueden ingresar al organismo a través de diferentes vías de administración (oral, tópica, respiratoria, rectal, ótica,) y para cada una de las vías será necesario utilizar los vehículos necesarios a través de una forma farmacéutica (comprimidos, soluciones, cremas, supositorios, inyectables, aerosoles, otras), las cuales son más que simples vehículos del principio activo, sino que además constituyen verdaderos sistemas de liberación que permiten alcanzar el efecto farmacológico. Se puede definir una formulación como el conjunto de operaciones dirigidas a crear un sistema físico que contiene un principio activo (o más de uno), usualmente combinado con excipientes, para tener estabilidad física y química, adecuar la liberación y mejorar la biodisponibilidad del principio activo, con el fin de cumplir con los requerimientos de calidad, eficacia terapéutica segura y permitir la elaboración a gran escala.

En los sistemas de liberación convencionales se presentan diferentes problemas, por lo cual siempre se busca la innovación; parte de esta es a través de los nanosistemas, sistemas transportadores de fármacos en los que el vehículo es a escala nanométrica. Se espera que en el transporte de fármacos empleando la nanotecnología el principio activo se encuentre incorporado o conjugado al nanovehículo, de modo que su farmacocinética y biodistribución dejarán de depender de su propia estructura molecular, para ser función de su tamaño, composición, carga y estructura superficial del nanovehículo. En contacto con el sistema biológico, sus propiedades diferenciales además de responder a los fenómenos fisicoquímicos, también lo harán a las propiedades en relación a los

procesos LADME, incluyendo su reconocimiento y captura por mecanismos de pinocitosis y fagocitosis, así como su capacidad para atravesar las diferentes barreras anatómicas.

Cuando se emplean nanotransportadores para la administración de un fármaco, el principio activo puede alcanzar la circulación sistémica en un estado que no es el de fármaco libre. En otras palabras, la liberación del fármaco desde un nanovehículo podría suceder después de su absorción. Es así que, por primera vez en la historia, un vehículo farmacéutico tendría incidencia directa sobre la distribución y eliminación de un principio activo en el organismo. La nanotecnología abre la posibilidad de traslocar el paradigma tradicional de liberación-absorción-distribución por el de absorción-distribución –liberación. Esto explica que un fármaco incorporado a un nanovehículo pueda ver su perfil farmacocinético completamente modificado (Talevi et al., 2016).

La velocidad de liberación del fármaco depende de la solubilidad, su liberación de la superficie del portador, la velocidad de hinchamiento de la matriz por la penetración del agua y de la velocidad de difusión del fármaco en una matriz hinchada y de la velocidad de degradación de la matriz. Por lo que la solubilidad, difusión y la biodegradación de las partículas de la matriz o su velocidad de hinchamiento con agua rigen el proceso de liberación.

CAPÍTULO III PARTE EXPERIMENTAL

REACTIVOS Y SOLUCIONES

- Ácido 11-metacriloilamido undecanoico (CAM10).
- Dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA), como entrecruzante.
- Persulfato de amonio (APS) como iniciador.
- Dodecilbenceno sulfonato sódico (DBS) como tensoactivo.
- Metil hidroquinona para remover el inhibidor del EGDMA.
- Acetato de Uracilo.
- Agua destilada.
- Curcumina (CUR)
- Etanol 96°
- Buffer de fosfatos (PBS) pH 1.2
- PBS pH 6.8
- PBS pH 7.4
- Tween 80
- Medio de cultivo RMPI-1640
- Suero fetal bovino (SFB)
- Antibiótico –Antimicótico (penicilina, estreptomycin y anfotericina B).
- Tripsina al 0.25%
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 0.1%
- Solución MTT
- DMSO al 5 %
- Tampón de solubilización (Triton X-100 al 10%, HCl 0.1 N en isopropanol)

MATERIALES

- Resina removedora de hidroquinona.
- Membrana o tubo de diálisis 14,000 D
- Pinzas para tubo de diálisis
- Gas nitrógeno con manguera de látex
- Soporte universal con pinzas
- Matraz bola
- Parrilla con agitación
- Agitador magnético
- Termómetro
- Espátulas
- Charolas para pesar
- Jeringa para gas
- Tapón de hule
- Vaso de precipitado 1 L
- Probeta graduada de 10 mL
- Probeta graduada de 50 mL
- Probeta graduada de 250 mL
- Matraz volumétrico de 1 L.
- Baño de aceite
- Filtros de 0.75 micras
- Cubetillas para DLS
- Celda de potencial Z
- Celdas para UV-visible

- Viales de vidrio
- Viales de LabConco
- Viales ámbar
- Matraces Erlenmeyer de 125 mL
- Micropipeta de 1 mL
- Puntillas para micropipeta
- Placas de 96 pocillos.
- Frascos para cultivo celular.
- Pipetas de 10 mL desechables

EQUIPOS

1. Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

Equipo ZetaSizer Nano-ZS series, de marca Malvern Instruments, modelo ZEN3500 con láser verde de 532 nm. Para medir el diámetro hidrodinámico (Dh) y potencial Z.

2. Balanza analítica

Pioneer, OHAUS. Necesaria para pesar muestras o reactivos.

3. Potenciómetro

Se utilizó un medidor de pH 430 Corning, para preparar los buffers de diferentes pH.

4. Sistema liofilizador

Se utilizó el equipo Freeze Dry Sistem/Freezone 4.5 Labconco serie 0309095570, 60 ciclos. Para liofilizar las muestras congeladas.

5. Espectrofotómetro

DU 520, General Purpose UV/Vis Spectrophotometer. Beckman Coulter. Se usó para realizar las curvas de calibración y leer la respuesta diferentes pH en las cinéticas de liberación.

6. Baño de temperatura.

VWR. Con temperatura controlada y con velocidad ajustable de oscilación. Se empleó en las cinéticas de liberación.

7. Espectrometría Infrarroja (FT-IR)

Se usó el equipo FT-IR Nicolet™ iS™ 5, 650–4000 cm⁻¹, 16 barridos, para hacer lecturas de espectroscopia infrarrojo de nanopartículas de CAM 10, CUR y nanopartículas cargadas con curcumina (NP-CUR).

8. Microscopía electrónica de barrido de transmisión (STEM)

Microscopio electrónico de barrido de emisiones, modelo JSM7800 F Prime, para la obtención de imágenes de los nanogeles.

9. Refrigerador y congelador.

10. Incubadora con CO₂ al 5%

11. Cámara de seguridad biológica.

12. Microscopio invertido.

13. Lector de placas de 96 pocillos

Thermo Scientific Multiscan FC, las lecturas realizadas se hicieron con el filtro de 620 nm para determinar la viabilidad celular después del ensayo de MTT.

PURIFICACIÓN DE EGDMA

Se corrió 2 mL de entrecruzante por una columna empacada con resina removedora de hidroquinona y 2 mL de metil hidroquinona para remover el inhibidor del EGDMA.

SÍNTESIS DE NANOGELES MEDIANTE EL MÉTODO DE POLIMERIZACIÓN EN EMULSIÓN.

Se utilizó un método de polimerización en emulsión para preparar los nanogeles de CAM10 utilizando EGDMA como entrecruzante.

1. CAM10, el entrecruzante (EGDMA) y el DBS se mezclaron con las cantidades mencionadas a continuación y se disolvieron en 50 mL de agua destilada a temperatura ambiente para formar una solución acuosa al 1% w/v.

REACTIVO	g
CAM10 1% w/w	1 0.5 g
EGDMA 5% mol	0.0183 g, 17.46 uL
APS 2%	0.010 g
DBS	0.05 g

2. Se eliminó el oxígeno disuelto en la mezcla mediante atmósfera de nitrógeno con burbujeó durante 30 min. La mezcla de reactivos se calentó a 75°C en un baño de aceite lubricante y se agito de manera rigurosa y constante.

3. Se añadió una solución acuosa de persulfato de amonio (APS) al 2% al sistema para actuar como un iniciador térmico. Se dejó que la reacción de polimerización continúe durante 4 horas.

4. Las nanopartículas obtenidas se dializaron con agua destilada a temperatura ambiente mediante el uso de una membrana de diálisis (corte de peso molecular = 14.000) por 48 horas con cambio de agua cada 6 horas para purificar el producto.

TECNICAS DE CARACTERIZACIÓN PARA LOS NANOGELES SINTETIZADOS.

a) Dispersión de Luz Dinámica (DLS).

Se utilizó el equipo de Dispersión de Luz Dinámica con la finalidad de caracterizar la formación y el tamaño de los nanogeles en las emulsiones obtenidas. Se diluyeron 100 μ L de muestra aforando a un volumen de 10 mL de agua destilada y filtrada, se procedió a correr la muestra en el equipo a 25°C con medios de diferentes pH, (1.2, 2, 3, 4, 5, 6, 6.8, 7, 7.4, 8 y 9), obteniéndose el % en volumen del diámetro hidrodinámico de las nanopartículas.

b) Potencial Z.

Se utilizó el equipo DLS para analizar el potencial Z con la finalidad de determinar la carga de la superficie de los nanogeles. Se tomaron 100 μ l de las emulsiones previamente purificadas y se diluyeron en 10 mL de buffer de diferentes pH (1.2, 2, 3, 4, 5, 6, 6.8, 7, 7.4, 8 y 9); cada una de las diluciones se colocaron en cubetillas para posteriormente analizar el potencial Z.

c) Imágenes STEM.

Para la obtención de imágenes de los nanogeles se esparció una gota de dispersión de los nanogeles al 4% (4 mg/mL) sobre la superficie de una rejilla de cobre y carbono malla 400. A la rejilla se le adiciono una gota de acetato de uranilo al 2%. La muestra fue secada en horno de vacío a 22 °C durante 24 h. Posterior al secado, la muestra se sujetó a un portamuestras STEM, fueron insertadas en la cámara de muestra, y se observó a 29.5 kV.

LIOFILIZACIÓN Y RECONSTITUCIÓN DE LOS NANOGELES.

Se realizaron estudios de estabilidad al proceso de liofilizado a todos los nanogeles sintetizados, con la finalidad de aplicarlos a la parte experimental de cargado y liberación de fármacos, analizando las modificaciones y/o la estabilidad en su morfología, su estructura y su radio hidrodinámico.

a) Liofilización

Se tomaron los 50 mL de las emulsiones previamente purificadas y caracterizadas, se congelaron en viales de LabConco, posteriormente se colocaron en el liofilizador por 48 horas para obtener las muestras completamente secas. Se obtuvieron las emulsiones liofilizadas y se observaron como un polvo blanco esponjoso.

b) Reconstitución

Para reconstituir el material, en un vial se adicionaron 10 mg del polvo liofilizado en 5 mL de agua destilada y filtrada bajo agitación constante por 24 horas. Obteniendo la emulsión reconstituida, se tomaron 100 µL y se diluyeron en 10 mL de agua. Se realizó la caracterización de las muestras reconstituidas vía DLS de acuerdo al método anteriormente descrito, para observar los cambios de los nanogeles con respecto al proceso de liofilización y reconstitución.

CARGADO DE LOS NANOGELES CON CURCUMINA.

Se determinó la eficiencia de cargado y la capacidad de cargado mediante la ecuación 1 y ecuación 2:

Capacidad de carga del fármaco:

$$CCF = \left(\frac{MFng}{Mng+MFng} \right) * 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Eficacia de carga del fármaco:

$$ECF = \left(\frac{MFng}{MF} \right) * 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Antes de iniciar el cargado de CUR, se realizó previamente una curva de calibración para la obtención de los cálculos.

El primer paso que se realizó para el cargado de lo nanogeles con CUR fue preparar la disolución de los nanogeles (Solución A). En un vial color ámbar con tapadera se disolvieron 40 mg de nanogeles en 19 ml de agua destilada con

agitación constante por 48 horas. Después se preparó la solución alcohólica de curcumina (Solución B), se hizo la mezcla de CUR en un vial color ámbar con tapadera (libre de luz). Se pesaron 10 mg de CUR y se disolvieron en 1 mL de etanol 96°, se tapó de inmediato para evitar se volatizará el etanol. Se agregó la mezcla de curcumina (Solución B) a los nanogeles (Solución A) gota a gota, se dejó 48 horas en agitación sin tapadera para que la mezcla quedara libre de etanol. La mezcla se pasó a un tubo cónico Falcon de 50 mL para centrifugarse a 10,000 rpm durante 1 hora. El sobrenadante obtenido se guardó en el refrigerador y el sedimento amarillo se congelo durante 24 horas. Una vez que se obtuvo el sedimento congelado se liofilizo por 48 h. Se realizó la cuantificación del cargado de los nanogeles colocando en un frasco ámbar 10 mg del liofilizado en 10 mL de etanol, se agito y una vez solubilizado se colocó la mezcla en una cubetilla para leerse en el espectrofotómetro a 427 nm. También se leyó 1 mL del sobrenadante para determinar la capacidad y la eficiencia de cargado con las ecuaciones 1 y 2.

Las curvas de calibración se muestran en el anexo B.

ANÁLISIS FT-IR

Se realizó FT-IR de nanopartículas CAM10, CUR y NP-CUR.

CINÉTICA DE LIBERACIÓN *IN VITRO* DE CURCUMINA.

Para los estudios de liberación controlada, se dispersaron 6 mg del material cargado con CUR en 3 mL de solución tampón (pH 1.2, 6.8 y 7.4) y luego se agregaron a tubos de diálisis WCO de 12 a 14,000 Da. En otro tubo de diálisis se

coloca una solución de referencia con el contenido de CUR cargada en 6 mg de nanopartículas. Cada tubo de diálisis prellenado se introdujo en 30 mL de medio de liberación dentro de un matraz ámbar que contenía una solución de Tween 80 (0.5% v / v) en la solución tampón correspondiente (pH 1.2, 6.8 y 7.4). El matraz se colocó dentro de un baño de agitación que funcionaba a 37°C y una velocidad de agitación de 50 rpm. Se extrajeron alícuotas del medio (1 mL) a los tiempos de 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 8, 12, 24 y 36 horas; se reemplazó el volumen con medio fresco (PBS/Tween 80) cada tiempo de muestreo.

El experimento se realizó por triplicado, la fracción liberada de CUR se calculó a partir de mediciones de UV a 427 nm y luego se cuantificó usando la curva de calibración preparada específicamente para CUR. Para calcular la fracción de fármaco liberado se emplearon las ecuaciones del anexo E.

ENSAYO DE CITOTOXICIDAD DE LOS NANOGELES CARGADOS CON CUR.

La línea celular HeLa, células de adenocarcinoma cervical humano fueron las utilizadas para el estudio.

Las células HeLa se cultivaron a 37 ° C con 5% de CO₂ en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino. Las células se cultivaron hasta un 75-85% de confluencia, se separaron con tripsina al 0.25% y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 0,1% y se utilizaron para el protocolo de ensayo.

Previo a iniciar el estudio, se determinó la viabilidad por el método de exclusión con azul de tripán. Primero se obtuvo el pellet del cultivo celular, este fue resuspendido en 1 mL de medio, de esta mezcla se toman 20 μ L y se le adicionan 20 μ L de azul de tripán; posterior a esto se mezcla bien y se monta 10 μ L en los retículos de la cámara de Neubauer, para finalmente observar en el microscopio, realizando el conteo de los 4 cuadrantes de las esquinas y en el cuadrante del centro y así determinar el número total de células vivas.

La citotoxicidad celular se determinó usando el ensayo *in vitro* de toxicología basado en MTT. Las células HeLa se cultivan por triplicado en una placa de 96 pocillos (1×10^5 células / pocillo) y se incubaron en condiciones de crecimiento estándar durante 24 horas, seguido de la adición de los diferentes grupos de tratamientos mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1. Grupos de tratamiento en estudio para la determinación de citotoxicidad en cultivo de células HeLa.

Grupo	Tratamiento para CUR
Grupo A	CUR libre (5 μ g/mL)
Grupo B	CUR libre (20 μ g/mL)
Grupo C	CUR libre (50 μ g/mL)
Grupo D	CUR libre (100 μ g/mL)
Grupo E	NP-CUR (5 μ g/ml)
Grupo F	NP-CUR (20 μ g/mL)
Grupo G	NP-CUR (50 μ g/mL)
Grupo H	NP-CUR (100 μ g/mL)
Grupo I	Nanogeles (0.5 mg/mL)
Grupo J	Nanogeles (1 mg/mL)

Grupo K	Control positivo (DMSO 5%)
Grupo L	Etanol 5%
Grupo M	Control negativo (Células no tratadas)

En todos los ensayos, se usaron células no tratadas como control negativo (C-) y DMSO al 5% como control muerto positivo (C +), y las células se incubaron durante 24 h. Después del tiempo de tratamiento, se añadió solución de MTT (10 μ L) a las células durante 4 h para formar cristales de formazán mediante deshidrogenasas mitocondriales. Luego, se agregaron 100 μ L de tampón de solubilización a cada pocillo y se incubaron a 37 ° C con 5% de CO₂, durante 18 horas para disolver los cristales de formazán, y se determinó la cantidad de formazán convertido por células viables midiendo la absorbancia a 620 nm en un lector de microplacas de 96 pocillos. Los resultados se normalizaron a células no tratadas (100%) para obtener el porcentaje de viabilidad celular y se expresaron como el promedio \pm error estándar de la media (SEM) de triplicados.

CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El CC hoy en día es una de las enfermedades de mayor incidencia y con una gran tasa de mortalidad en el mundo, por ello es importante buscar alternativas en la prevención y tratamiento de la enfermedad. En el presente trabajo se propuso un sistema de liberación de CUR, mediante la síntesis y cargado de nanopartículas poliméricas inteligentes que responden al cambio de pH, siendo capaces de resistir la degradación pH ácido y liberar su contenido a pH colónico. La nanoformulación mejora las limitaciones de CUR, colorante y aditivo alimenticio que ha sido y sigue siendo estudiada por sus múltiples beneficios a la salud, en especial su uso como agente antitumoral en varios tipos de cáncer; pero su uso no ha sido explotado porque su solubilidad en medio acuoso es muy pobre, por ende, la absorción en el tracto gastrointestinal es reducida. A continuación, se presentan los resultados obtenidos de la encapsulación de CUR en nanopartículas de CAM10.

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS NANOGELES SINTETIZADOS.

En la reacción de síntesis de nanogeles mediante el método polimerización en emulsión se obtuvo una solución blanquecina azulada, opaca y turbia (Figura 9). La coloración obtenida puede ser explicada de dos maneras: la primera tiene que ver con la formulación de los nanogeles, ya que se tiene reportado que los compuestos con sulfatos presentes tienden a presentar una coloración blanquecina (Núñez, 2008); la segunda se debe a la dispersión de luz, las partículas de mayor tamaño son las que reflejan la coloración blanca, y las partículas de menor tamaño suelen verse en tonos azules (Hernandez Paz, 2013). En base a nuestros resultados

la coloración predominante es la blanca, evidenciando el gran tamaño de las partículas debido a la agregación presente, por otra parte, se observa un ligero tono azul, este refleja aquellas nanopartículas no agregadas y por lo tanto de menor tamaño.



Figura 9. Nanogeles CAM10 1%/EGDMA 5%/ DBS 1%/ APS 2% obtenidos por polimerización en emulsión.

Se caracterizaron los nanogeles sintetizados mediante DLS y potencial Z. Los tamaños de los nanogeles varían dependiendo del pH del medio en el que se realizó la medición. Se realizaron 3 síntesis y caracterización de cada una de ellas, en promedio se observó que en pH de 1.2 a 5 los tamaños son superiores a 500 nm, mientras que en los pH de 6 a 9 van de los 65 a 85 nm (Tabla 2); en el anexo A se reportan las distribuciones del tamaño por intensidad. Diversos estudios han demostrado que una partícula de entre 100 y 1000 nm puede entrar en mayor proporción en las células cancerosas en lugar de en las células normales (Kong et al., 2019). El tamaño de partícula es una característica importante dada la influencia

en la bioaccesibilidad de las nanopartículas, es decir, se ha observado que entre más pequeña es una nanoformulación, mejor será la absorción y retención en tumores, partículas con un tamaño inferior a 500 nm pueden atravesar la membrana de las células epiteliales por endocitosis (Hernández, 2015; Prajakta et al., 2009).

Además del tamaño, el índice de polidispersión (PDI) es un parámetro clave empleado para evaluar la estabilidad física de los nanogeles, representa la distribución de los tamaños en suspensión. Se mide desde cero a uno, donde un PDI <0.25 indican una estrecha distribución de tamaños y un valor de PDI >0.5 refieren una amplia distribución de tamaños; con un PDI <0.2 se considera al sistema monodisperso (Bastías Solís, 2008; Díaz Ramos, 2016). En los resultados obtenidos en este trabajo se observa polidispersión a los pH 1.2, 2, 3 y 4, a pH 5 la distribución es estrecha, mientras que observa monodispersión a los pH 6, 7, 8 y 9.

Por otra parte, de los diversos estímulos biológicos conocidos, un cambio en el pH es uno de los más frecuentes y fáciles de utilizar como interruptor biológico. En comparación con el pH neutro que se encuentra en muchos tejidos sanos (pH 7.4), la presencia de células tumorales en el tejido cercano se indica por una disminución del pH (pH 6.5–7.2) (Manzanares-Guevara et al., 2020). En el presente estudio, a pH de 6 a 9 los tamaños de los nanogeles fueron más pequeños que en condiciones ácidas, con lo que podemos inferir que presentan respuesta a los cambios de pH y que la absorción por células tumorales sería factible. El mecanismo de acción de los nanogeles sensibles a pH corresponde al comportamiento de hinchamiento o colapso a causa de la protonación o desprotonación de grupos aniónicos o catiónicos contenidos dentro de la red polimérica (Hajebi et al., 2019).

Existen diversos estudios donde se han desarrollado nanoformulaciones, por ejemplo, las CUR CUR-CS-PEC-NP tiene un tamaño 211.3 ± 2.0 nm (Alkhader et al., 2018); incluso se han usado diferentes reticulantes y los tamaños obtenidos van de los 51 a 162 nm (Manzanares-Guevara et al., 2020), de 97 ± 2.47 nm (Prajakta et al., 2009), las nanopartículas de alginato de sodio - goma arábica cargadas con curcumina (CUR/ ALG-GANP) de 10 ± 0.3 nm a 190 ± 0.1 nm (Hassani et al., 2020), en nanopartículas de curcumina encapsuladas en sílice (SCNP) de 111.0 ± 2.95 nm y quitosano con nanopartículas de curcumina coencapsuladas en sílice (CSCNP) con tamaño medio de partícula de 112.8 ± 3.00 nm (Kong et al., 2019), finalmente cabe mencionar las nanopartículas de curcumina-fibroína de seda (CM-SF-NP) con tamaño de partícula <100 nm (Xie et al., 2017). En cada uno de estos estudios se comprobó tanto la liberación y efecto citotóxico de la CUR en células tumorales, por lo que con los tamaños obtenidos de los nanogeles al ser cercanos y similares a estos nos dan indicios de prometedores resultados. Los tamaños de los nanogeles obtenidos en el presente estudio a diferentes pH se muestran en la Tabla 2 y Figura 10.

Tabla 2. Tamaños obtenidos en las 3 síntesis de nanogeles, promedio, desviación estándar e índice de polidispersión.

pH	Síntesis 1 (nm)	Síntesis 2 (nm)	Síntesis 3 (nm)	Tamaño promedio \pm D.E. (nm)	PDI \pm D.E.
1.2	986.03	1168.00	202.80	785.61 \pm 512.86	0.703 \pm 0.172
2	479.45	1094.00	7517.33	3030.26 \pm 3898.05	0.682 \pm 0.279
3	1146.00	369.47	1454.47	989.98 \pm 559.07	0.725 \pm 0.244
4	995.40	458.70	381.13	611.74 \pm 334.51	0.847 \pm 0.058
5	2010.00	65.99	77.45	717.81 \pm 1119.08	0.229 \pm 0.049
6	62.68	52.04	74.74	63.15 \pm 11.36	0.045 \pm 0.003
7	63.45	73.18	84.88	73.84 \pm 10.73	0.073 \pm 0.019
8	78.07	68.77	108.03	84.96 \pm 20.52	0.047 \pm 0.005
9	73.81	58.09	78.20	70.03 \pm 10.58	0.108 \pm 0.011
AGUA	148.50	78.8	72.59	99.96 \pm 42.15	0.356 \pm 0.080

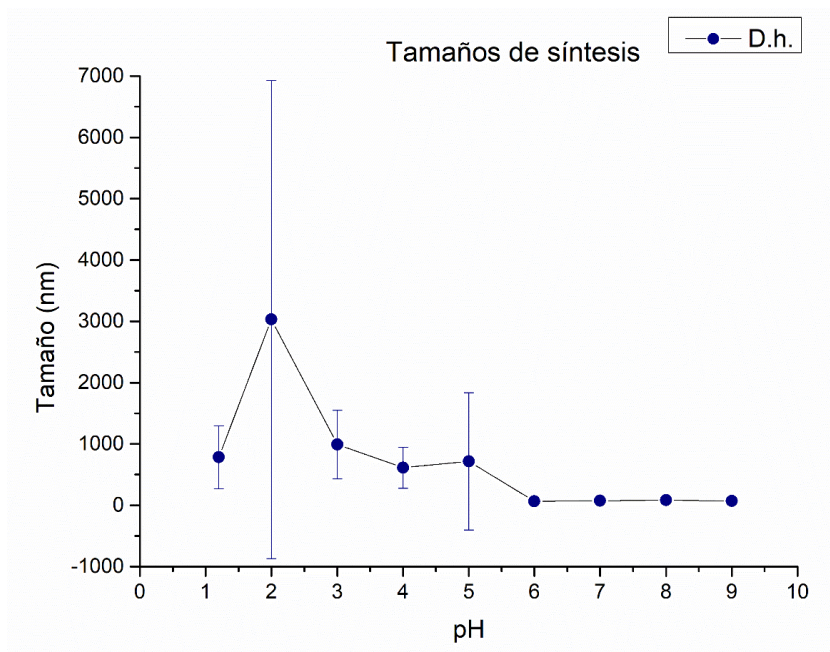


Figura 10. Tamaño de los nanogeles CAM10 1%/EGDMA 5%/DBS 1%/APS 2% sintetizados a diferentes pH.

El potencial Z es indicativo de la carga electrónica en la superficie de las nanopartículas, un parámetro importante que gobierna la estabilidad de la formulación, así como su interacción con las membranas celulares. Entre mayor sea

el valor absoluto del potencial Z, la agregación de nanopartículas se evita, indicativo de una alta carga electrónica en la superficie de la partícula, lo que da lugar a fuertes fuerzas repelentes entre las partículas (Prajakta et al., 2009).

La carga superficial de los nanogeles CAM10 1%/EGDMA 5%/DBS 1%/APS 2% en cualquiera de los pH evaluados fue un valor negativo, es decir, los nanogeles tienen una carga superficial aniónica, cabe mencionar que en los pH 1.2, 2, 3 y 4 la carga es menor en comparación con el resto de los pH, en los que se presenta un potencial Z desde -32 hasta -21 mV, esta característica coincide con lo observado en los tamaños, donde el tamaño es menor al tener un potencial Z mayor, el efecto de repulsión entre las nanopartículas se observa presente con los datos obtenidos. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 3 y Figura 11:

Tabla 3. Potencial Z obtenido en las 3 síntesis de nanogeles, promedio y desviación estándar.

pH	Síntesis 1 (mV)	Síntesis 2 (mV)	Síntesis 3 (mV)	Promedio ± D.E. (mV)
1.2	-2.03	-3.89	-21.7	-9.21 ± 10.86
2	-4.25	-12.3	-17.3	-11.28 ± 6.58
3	-17.2	-6.65	-19.3	-14.38 ± 6.78
4	-18.7	-11	-20.8	-16.83 ± 5.16
5	-32.4	-32.25	-32.9	-32.52 ± 0.34
6	-29.3	-15.2	-32.8	-25.77 ± 9.32
7	-32.8	-16.9	-15	-21.57 ± 9.77
8	-18.5	-16.7	-31.9	-22.37 ± 8.31
9	-24.5	-15	-29.4	-22.97 ± 7.32
AGUA	-18.9	-5.03	-46.7	-23.54 ± 21.22

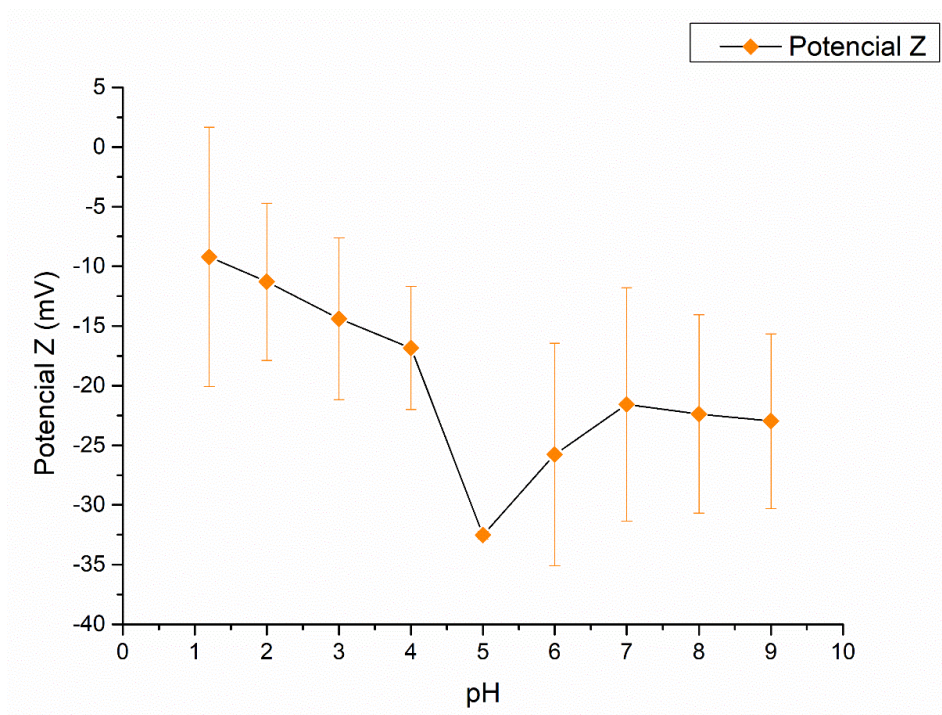


Figura 11. Potencial Z de los nanogeles a diferentes pH.

En los diferentes estudios encontrados en la literatura, al tener composiciones y características diferentes en cada uno de ellos desde las CUR-CS-PEC-NP con un potencial Z de $+23.5 \pm 0.4$ mV (Alkhader et al., 2018), el estudio de Manzanares y colaboradores con diferentes formulaciones todos sus nanogeles mostraron una carga superficial positiva a valores de pH inferiores a 7.4 (Manzanares-Guevara et al., 2020), las nanopartículas de CUR de Prajakta exhibieron una carga superficial negativa de -20.8 ± 4.74 mV (Prajakta et al., 2009) y las CUR / ALG-GANP también son aniónicas con $-15 \pm 0,2$ mV (Hassani et al., 2020); podemos ver que existen las dos variables de nanoformulaciones, con carga positiva y negativa.

Para finalizar la caracterización de los nanogeles sintetizados se hizo uso de la herramienta STEM, en la Figura 12 podemos ver a dos diferentes escalas, 100

nm y 1 μm , la estructura y tamaño, lo que se observa son nanogeles esféricos y algunos otros ovalados, con esta técnica confirmamos las dimensiones nanométricas previamente obtenidas en el DLS, se deja en evidencia la tendencia a la agregación y además la polidispersión de los tamaños. El tono oscuro observado sobre las superficies se atribuye a la acumulación de acetato de uranilo en las nanopartículas cargadas negativamente (Cornejo-Bravo et al. 2021). En la Figura 13 se aprecia la distribución de los tamaños medidos en el DLS, la lectura se realizó en agua a 25°C.

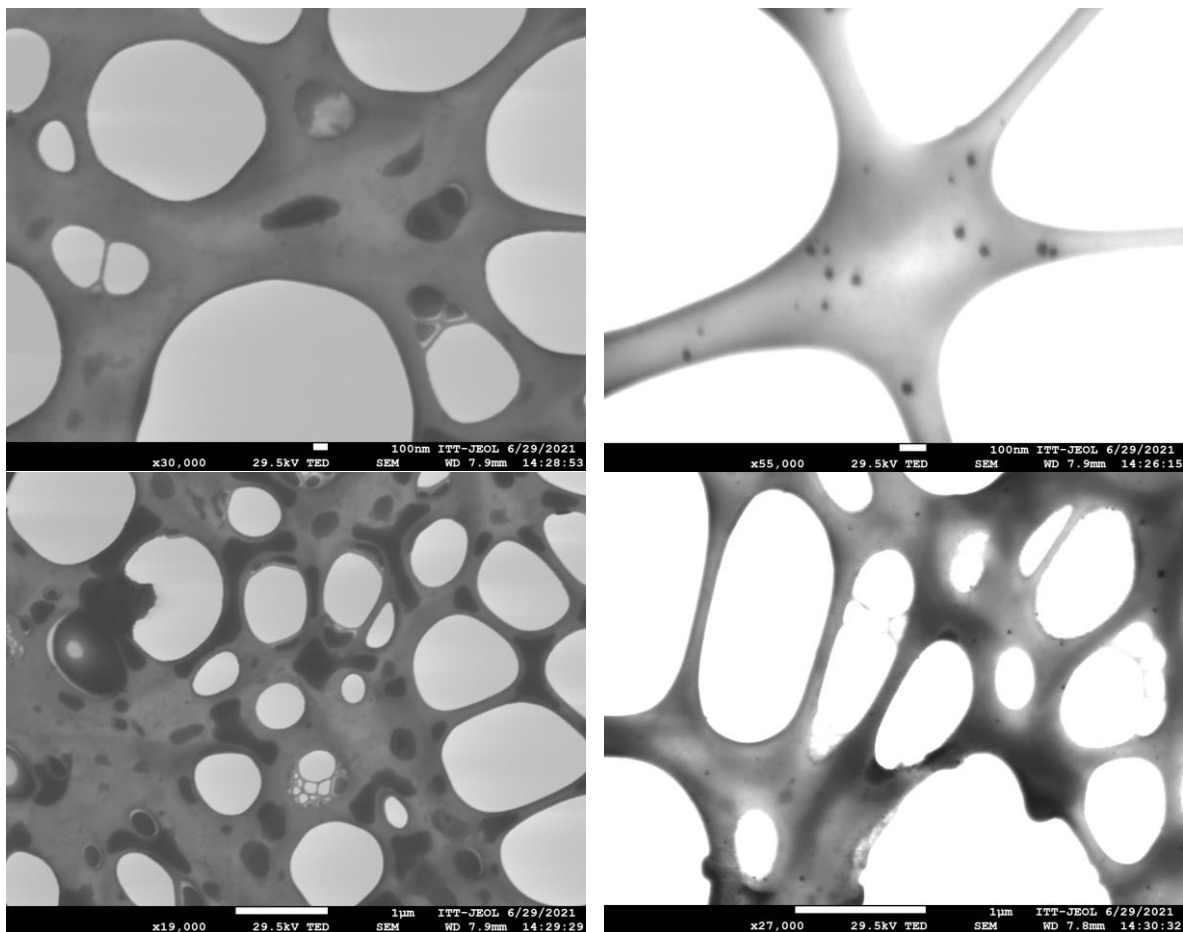


Figura 12. Imágenes STEM de los nanogeles, micrografías a los 100 nm (parte superior) y a 1 μm (parte inferior).

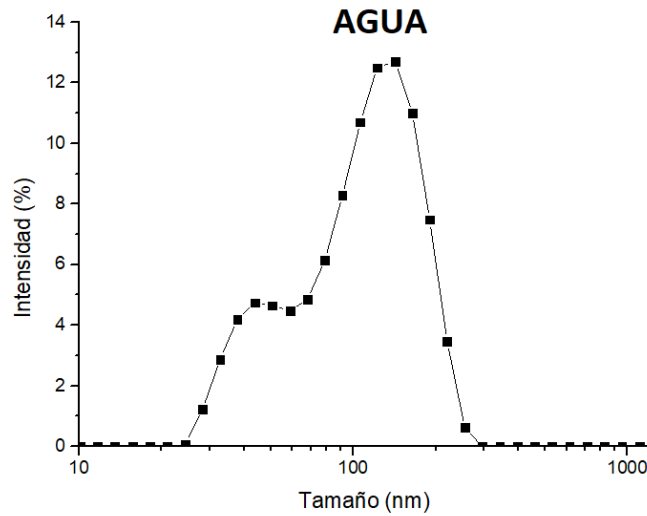


Figura 13. Distribución de tamaños de los nanogeles a 25°C en agua.

LIOFILIZACIÓN Y RECONSTITUCIÓN DE LOS NANOGELES.

El proceso de liofilizado y reconstitución se emplea para evaluar la estabilidad de los nanogeles sintetizados, en el estudio tras el liofilizado de los nanogeles se obtuvo un polvo muy fino, blanco, esponjoso y ligero (Figura 14).

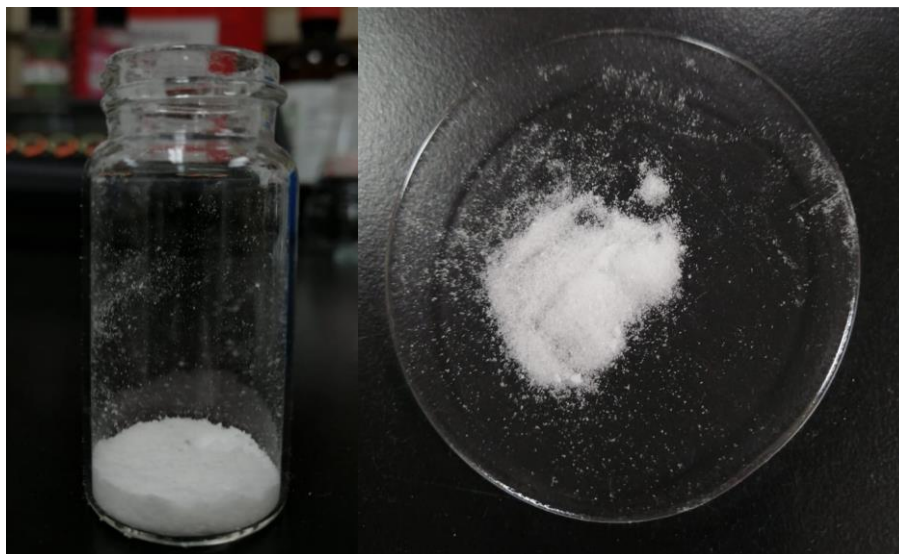


Figura 14. Nanogeles liofilizados.

En seguida se continuo con el reconstituido, la solución obtenida no se encontraba en una sola fase como la que se obtuvo al realizar la síntesis; los nanogeles no se solubilizaron por completo, a pesar que se agito bastante tiempo y se empleo el sonicador de modo complementario (Figura 15).



Figura 15. Nanogeles reconstituidos.

Se realizó la caracterización mediante DLS posterior a la reconstitución y los tamaños obtenidos en los pH del 6 a 9 fueron mayores a los de síntesis, ya que en este punto del estudio los tamaños superan los 100 nm, pero son inferiores a los 1000 nm, cada uno de los tamaños se presentan en la Tabla 4 y Figura 16.

Tabla 4. Tamaños al reconstituir en las 3 síntesis de nanogeles, promedio y desviación estándar.

pH	Síntesis 1 (nm)	Síntesis 2 (nm)	Síntesis 3 (nm)	Tamaño promedio \pm D.E. (nm)
1.2	224	302.9	547.23	358.04 \pm 168.52
2	348	3812.0	2383.67	2181.22 \pm 1740.85
3	347.4	1151.2	1220.40	906.33 \pm 485.29
4	299.7	544.6	1161.67	668.67 \pm 444.17
5	147.2	400.7	2008.00	851.97 \pm 1009.15
6	229.6	874.9	736.10	613.52 \pm 339.65
7	174.9	405.5	196.97	259.11 \pm 127.23
8	132.5	779.8	963.00	625.10 \pm 436.33
9	136.9	667.9	1169.67	658.17 \pm 516.45

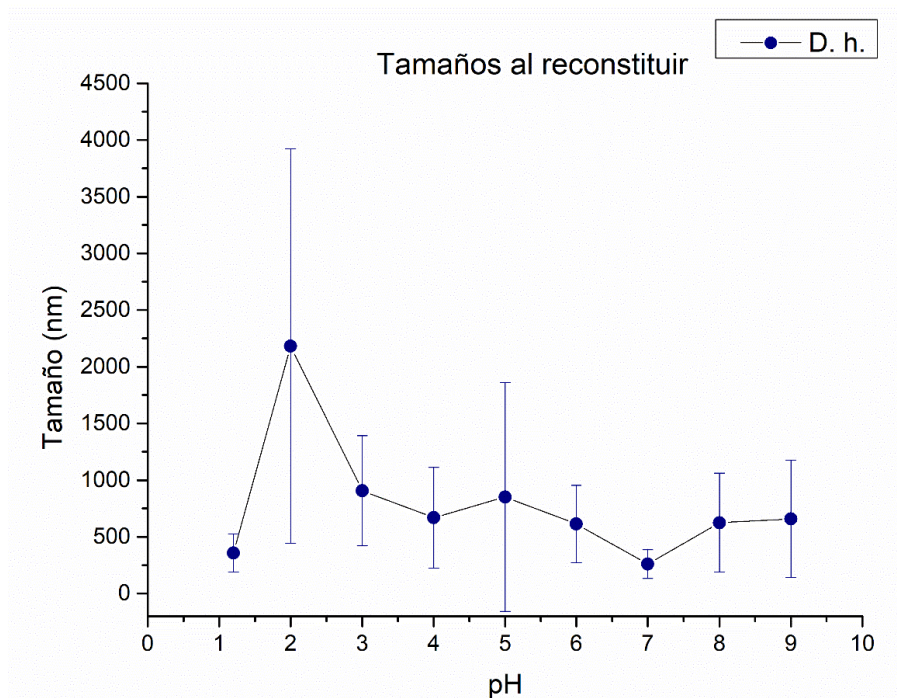


Figura 16. Tamaños de los nanogeles después de ser reconstituidos.

En otros estudios donde se han evaluado nanopartículas de curcumina reconstituidas también se han reportado diámetros medios de partículas mayores. Con base en reportes previos se esperaba que el tamaño de partícula de las

nanopartículas aumentara durante el procedimiento de liofilización debido a la agregación. Para evitar o disminuir el aumento de tamaño tras el liofilizado se pueden añadir crioprotectores que evitan la agregación excesiva y reducen la energía necesaria para la reconstitución. Esto puede deberse a la estabilización de las nanopartículas durante la liofilización, ya sea por impedimento estérico o por las acciones repelentes de la carga electrónica en la superficie de nanopartículas, impartida por los crioprotectores (Prajakta et al., 2009).

CARGADO DE LOS NANOGELES CON CURCUMINA.

Al realizar el cargado de los nanogeles con CUR, se obtuvo un polvo amarillo-naranja muy fino y esponjoso (Figura 17).



Figura 17. Nanogeles cargados con curcumina.

Se determinó la capacidad de carga del fármaco (CCF) y la eficacia de carga del fármaco (ECF). Se obtuvo un 19.96% de capacidad de carga de la CUR y una ECF de 99.73%. Los cálculos desarrollados se muestran en el anexo D.

Los nanogeles exhibieron una alta capacidad de CCF y ECF debido a la interacción iónica de forma catiónica de la CUR con los nanogeles aniónicos (Cuggino et al., 2016), con base en la literatura se espera que las interacciones entre CUR y los nanogeles ocurran a través de enlaces de hidrógeno (Manzanares-Guevara et al., 2020). La ECF corresponde al porcentaje de CUR encapsulada y adsorbida en las nanopartículas, y se determinó midiendo la concentración de CUR libre en el medio de dispersión. La alta ECF observado en las nanopartículas formuladas puede atribuirse a su diámetro de partícula, ya que la eficiencia depende de su tamaño de partícula, cuanto más pequeña es la partícula, mayor es la relación entre el área de la superficie y el volumen lo que da como resultado una mayor posibilidad de pérdida de fármaco por difusión hacia el medio de suspensión (Prajakta et al., 2009).

En comparación con otros estudios donde se elaboró alguna nanoformulación de CUR, la ECF obtenida es mayor; en el caso de CUR-CS-PEC-NP, se obtuvo un 64% (Alkhader et al., 2018), Prajakta y colaboradores lograron un $72.81 \pm 0.13\%$ en sus nanopartículas de CUR (Prajakta et al., 2009) y las nanopartículas de CUR / ALG-GANPs alcanzaron $89 \pm 0.2\%$ (Hassani et al., 2020).

En cuanto la CCF, también se observa una mejoría, Guevara y colaboradores obtuvieron de 6 a 15% en peso dependiendo del reticulante utilizado para la síntesis de nanogel (Manzanares-Guevara et al., 2020).

Como podemos ver, la formulación empleada es adecuada para una alta capacidad y eficiencia de carga de la CUR.

ANÁLISIS FT-IR

Posterior al cargado, se realizó un estudio de espectroscopia, la Figura 18 muestra los espectros FT-IR de NP-CAM 10, CUR y NP-CUR. Las nanopartículas CAM 10 mostraron una banda ancha a 3379 cm^{-1} equivalente al enlace NH de una amina secundaria, las señales en 2923 y 2852 cm^{-1} están relacionados con el estiramiento de CH de un alcano, también una señal distintiva a 1707 cm^{-1} correspondiente a la vibración de grupos carboxílicos no ionizados C=O. Por otro lado, los espectros de CUR mostraron una banda ancha a $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ típica de un grupo –OH; las señales a 1650 cm^{-1} y 1049 cm^{-1} son consistentes con las señales de los enlaces C=O y C-O de los grupos cetona y éter, y la señal a 1530 cm^{-1} está relacionado con los enlaces C-C de un compuesto aromático (Bich et al., 2009; Kamel et al., 2018). Finalmente, los espectros de las NP-CUR mostraron dos bandas a 3506 cm^{-1} y 3379 cm^{-1} de los grupos –OH y –NH, así como las señales a 2923 cm^{-1} y 2852 cm^{-1} correspondientes a los enlaces C-H de un alcano. Las señales a 1706 cm^{-1} y 1508 cm^{-1} se relacionan con el grupo C=O y el grupo aromático C-C; la señal a 1030 cm^{-1} corresponde al enlace C-O.

La presencia de las señales clave de CUR en los espectros de NP-CUR demuestra su presencia en las nanopartículas y el cambio de las señales de enlaces CC aromáticos de 1530 cm^{-1} a 1508 cm^{-1} y CO que se extiende desde 1049 cm^{-1} a 1030 cm^{-1} prueban la interacción entre la CUR y el polímero.

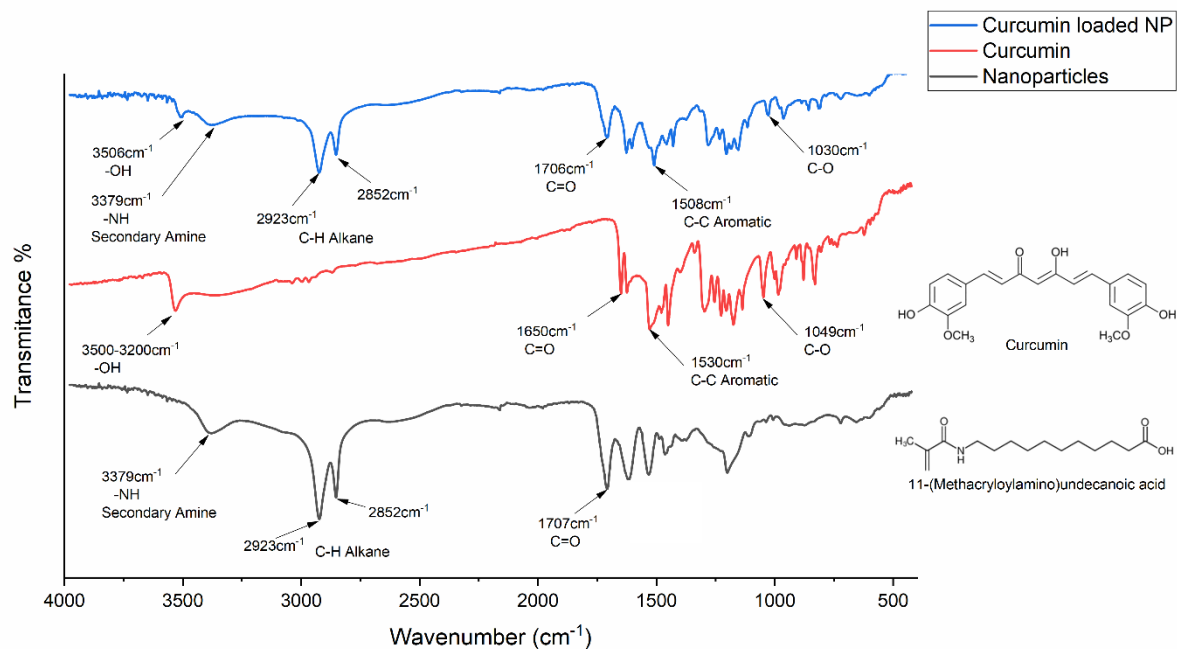


Figura 18. Espectros FT-IR de nanopartículas CAM10, CUR y NP-CUR.

CINÉTICAS DE LIBERACIÓN *IN VITRO* DE CURCUMINA.

Se realizaron 3 cinéticas de liberación durante 36 horas, cada una a diferentes pH, por triplicado con un grupo comparativo y equivalente de CUR libre. Los resultados se muestran como la fracción liberada (FL) de CUR a diferentes tiempos. La primera cinética fue a pH 1.2, en la Figura 19 se observa la cinética durante las 36 horas, la FL a las 24 y 36 horas se incrementa drásticamente, en la Figura 20 se recorta a las 12 horas y finalmente en la Figura 21 se tiene la cinética hasta las 2 horas, que es el tiempo medio de vaciamiento gástrico, como podemos ver los NG-CUR mejoraron la solubilidad y por lo tanto la liberación de CUR, al comparar contra la CUR libre.

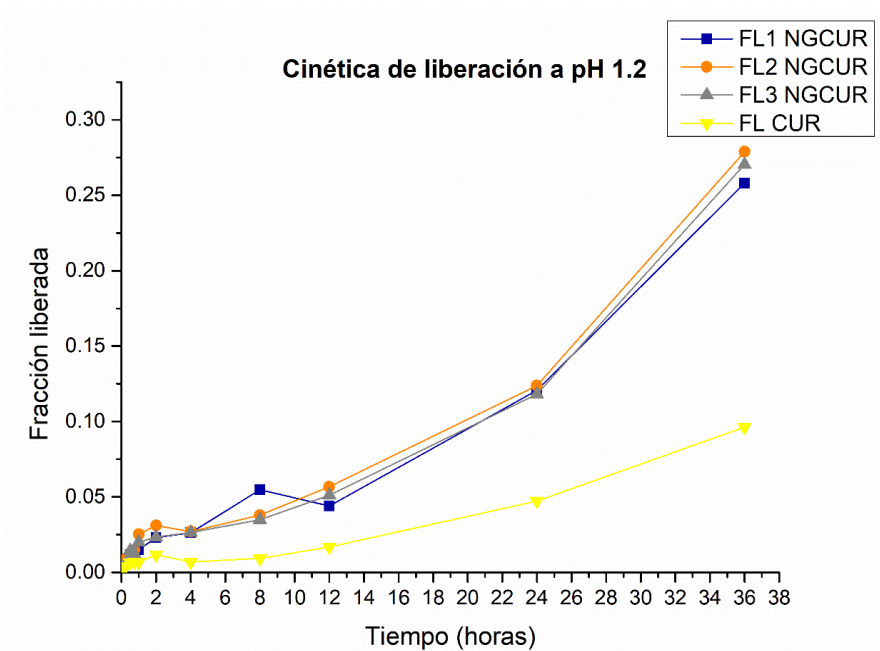


Figura 19. Cinética de liberación de los NG-CUR a pH 1.2 en 36 horas.

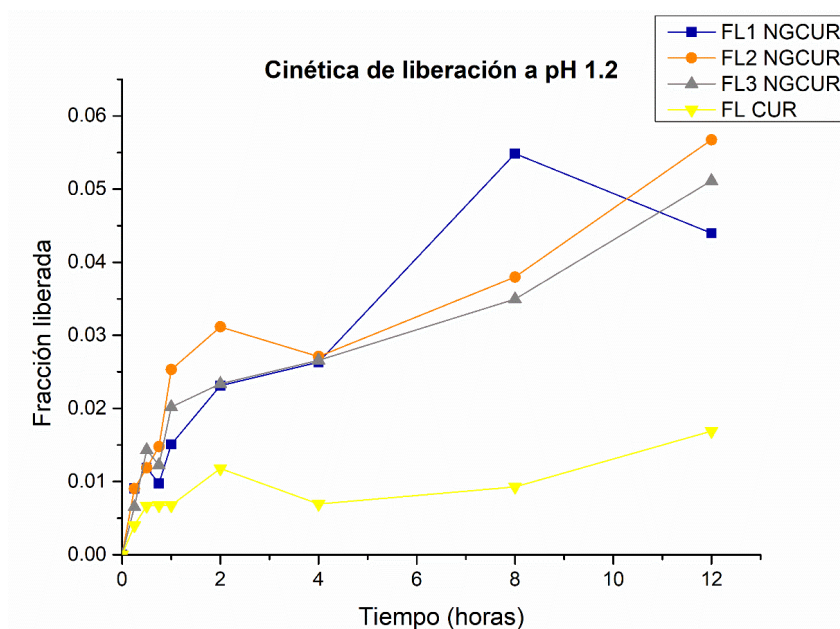


Figura 20. Cinética de liberación de los NG-CUR a pH 1.2 en 12 horas.

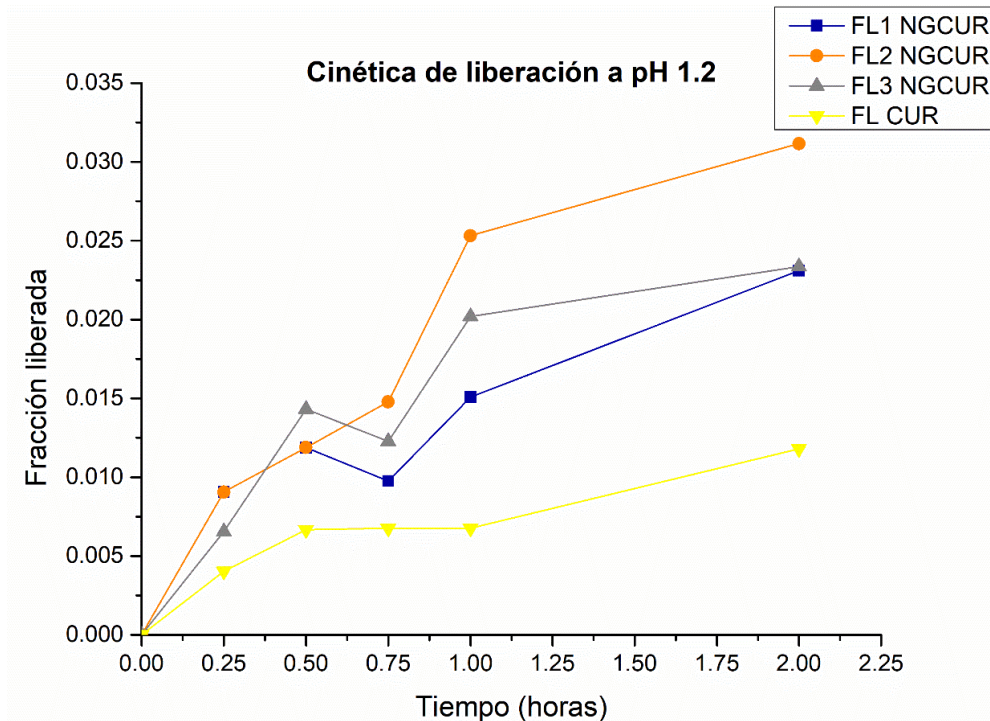


Figura 21. Cinética de liberación de los NG-CUR a pH 1.2 en 2 horas.

La siguiente cinética fue a pH 6.8, en la Figura 22 se presenta la liberación hasta las 36 horas y en la Figura 23 se tiene hasta las 12 horas; de igual manera se observa una liberación aumentada en la nanoformulación.

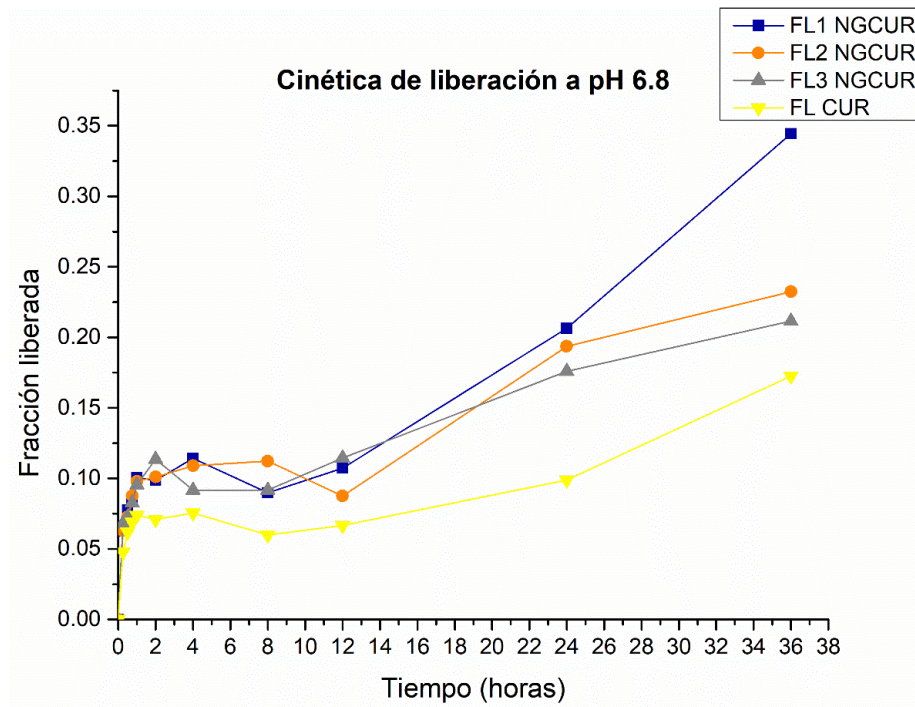


Figura 22. Cinética de liberación de los NG-CUR a pH 6.8 en 36 horas.

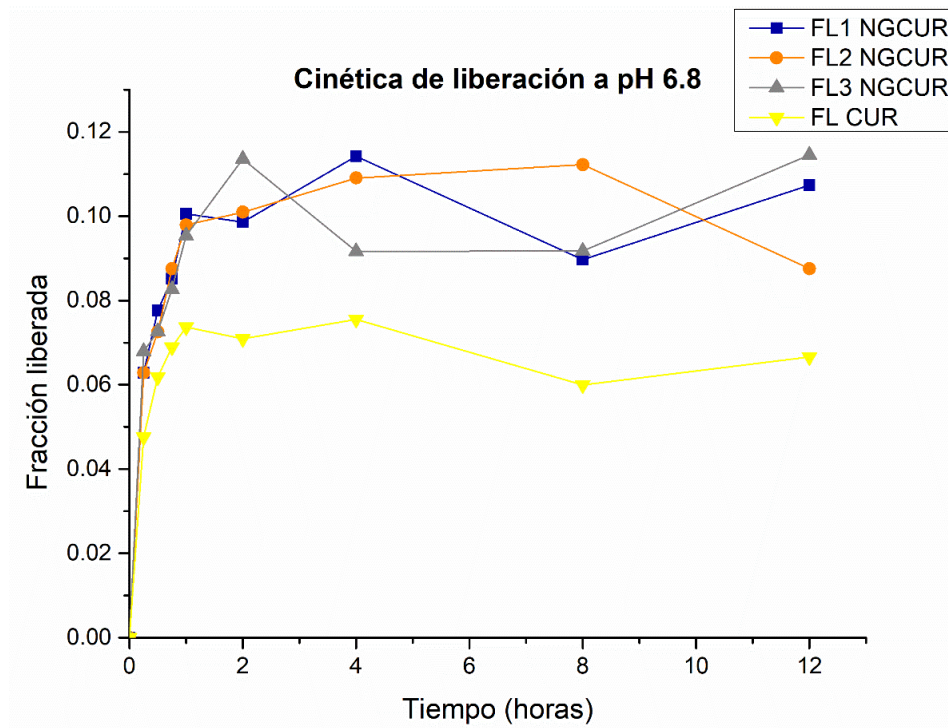


Figura 23. Cinética de liberación de los NG-CUR a pH 6.8 en 12 horas.

Finalmente se realizó una cinética a pH 7.4. En la Figura 24 se muestra la liberación hasta las 36 horas y en la Figura 25 se recorta la liberación hasta las 12 horas. Lo que se visualiza es muy similar a lo mostrado en las cinéticas anteriores, una liberación mayor en la nanoformulación.

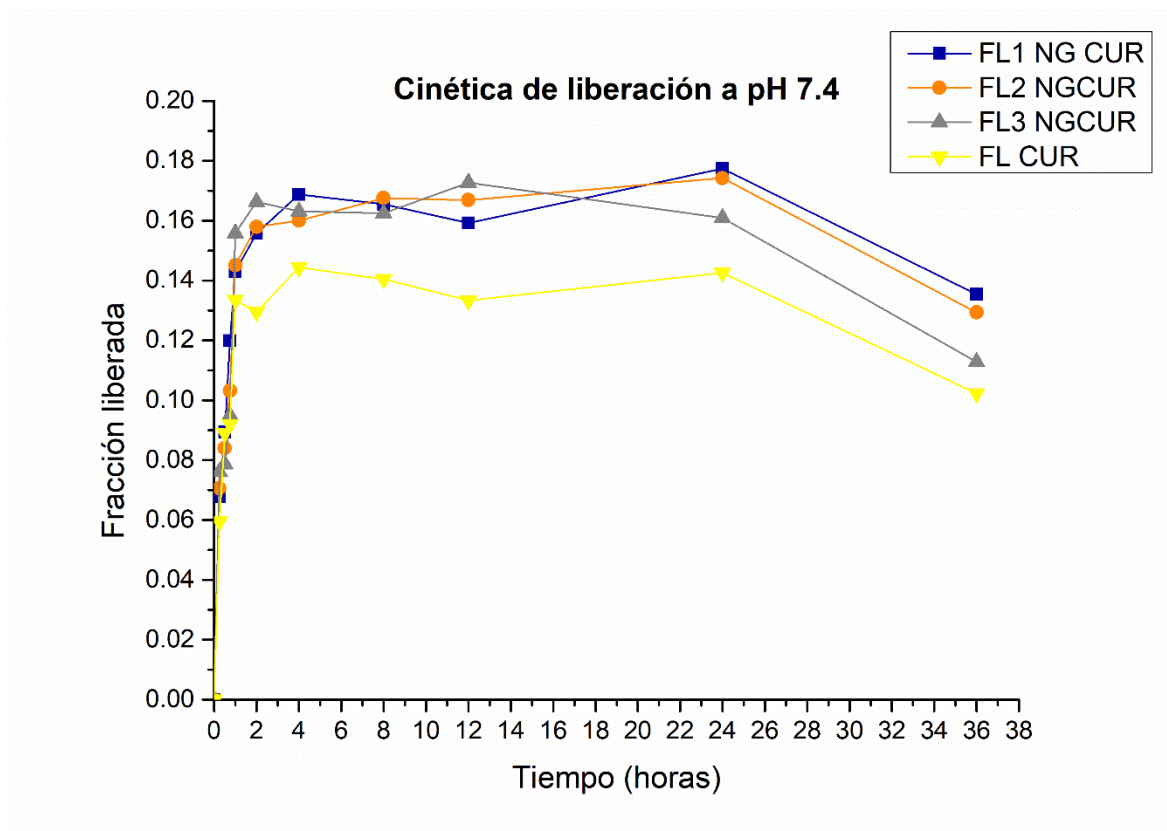


Figura 24. Cinética de liberación de los NG-CUR a pH 7.4 en 36 horas.

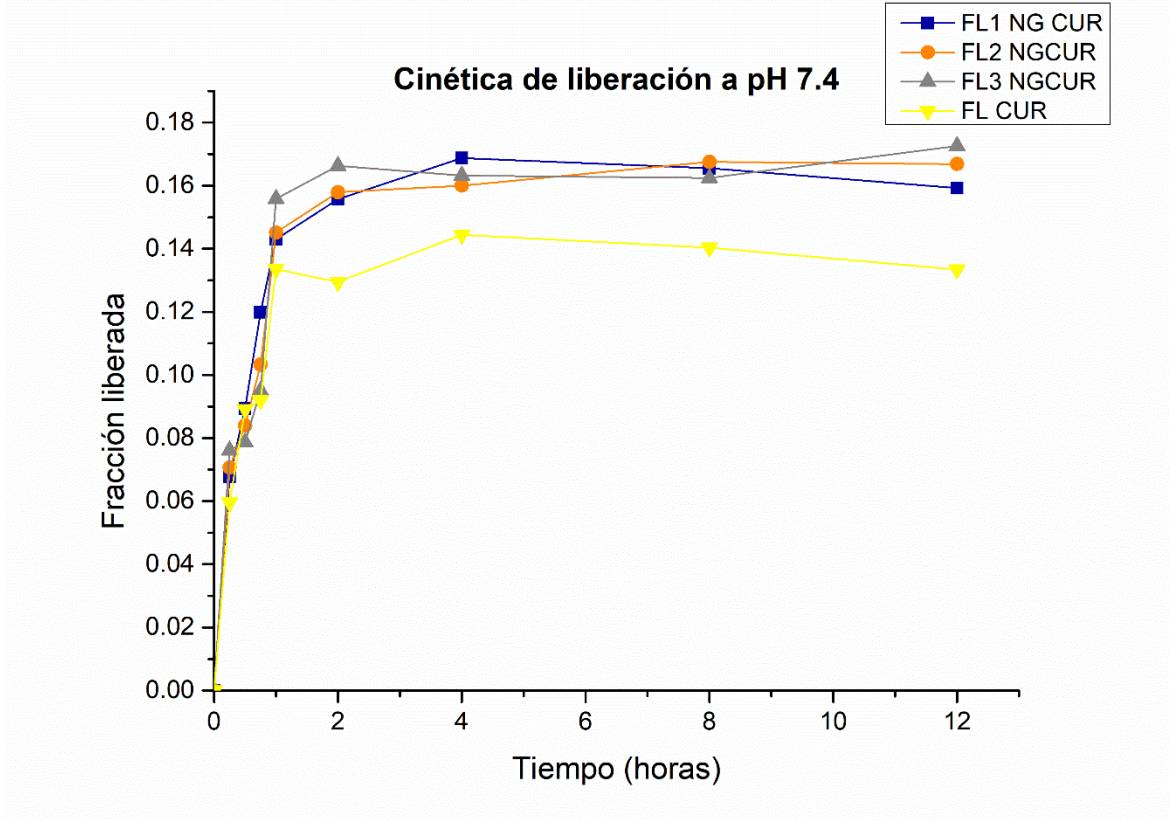


Figura 25. Cinética de liberación de los NG-CUR a pH 7.4 en 12 horas.

Ahora bien, en las Figuras 26 y 27, donde la única diferencia es el tiempo, se muestra la comparación de las 3 cinéticas estudiadas, en la que se logra captar que la menor liberación fue a pH 1.2 y la mayor a 7.4, estos resultados son congruentes con lo esperado, ya que en condiciones ácidas como en el estómago la liberación es menor y se protege la degradación de la CUR, mientras que a pH colónico (4.5-7.5) la liberación observada es mayor. Cabe resaltar que la cinética obtenida considerando desde el tiempo cero hasta las 12 horas, es característica de los sistemas de liberación sostenida, en estos sistemas el fármaco se libera a una velocidad constante, con mínimas fluctuaciones; la liberación de la CUR en el

sistema desarrollado es debido al empuje por el hinchamiento de las nanopartículas (Gómez Ayala, 2007).

Los cálculos desarrollados para determinar las cinéticas se muestran en el anexo E.

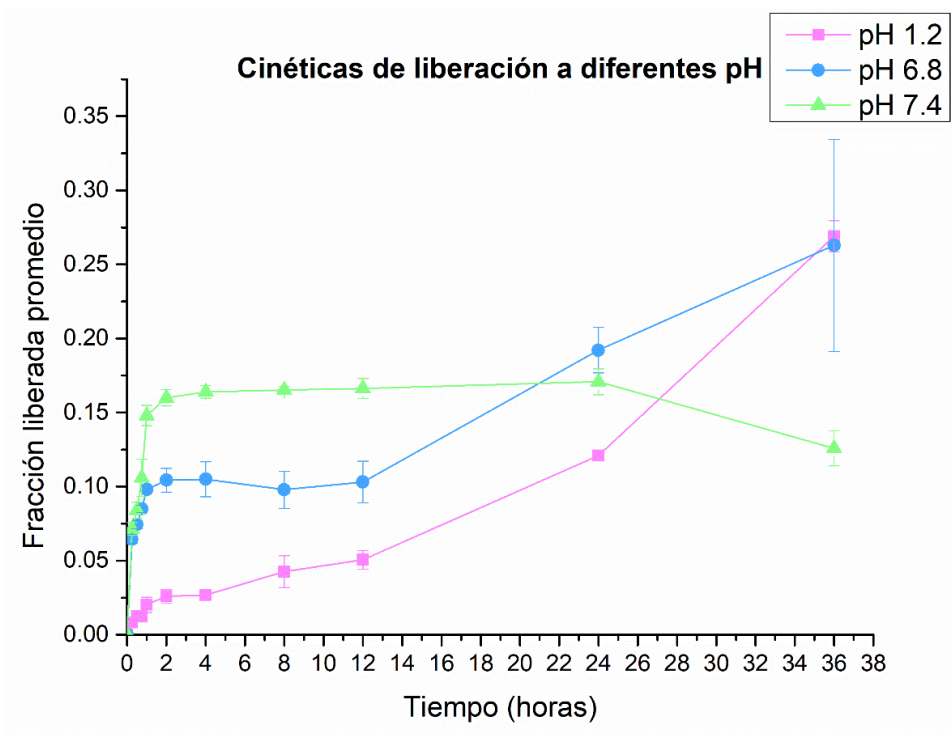


Figura 26. Cinética de liberación de los NG-CUR a pH 1.2, 6.8 y 7.4 en 36 horas.

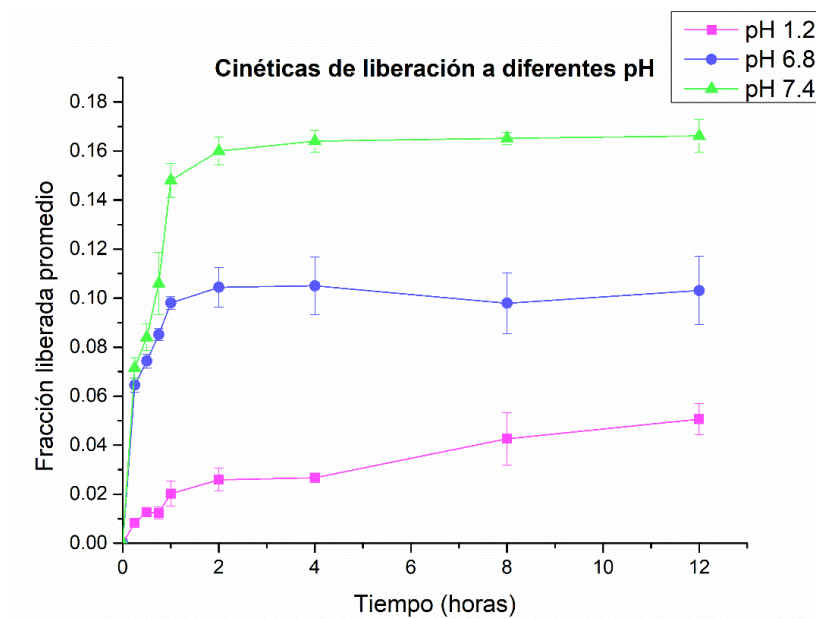


Figura 27. Cinética de liberación de los NG-CUR a pH 1.2, 6.8 y 7.4 en 12 horas.

En este punto del estudio podemos ver la mejora conferida a CUR, ya que esta es poco soluble en agua, una solubilidad acuosa casi nula, pero posee una capacidad lipofílica que le permite la interacción con membranas lipófilas de origen biológico. Varios estudios establecen que la CUR actúa en membranas biológicas, en centros ricos de carbohidratos, gracias al carácter anfipático, aunque preferentemente lipófilo (González-Albadalejo et al., 2015), lo que nos da una noción de porque resulta tan efectiva para el tratamiento de diversas enfermedades, como lo es el cáncer y a su vez una biodisponibilidad reducida.

Cabe mencionar que la CUR tiene dos formas tautoméricas: ceto y enol. En soluciones acuosas a pH neutro y ácido la CUR es prácticamente insoluble; sin embargo, es soluble en disolventes orgánicos como metanol, etanol, acetona y dimetilsulfóxido. Tanto a pH neutro como ácido, la forma ceto es predominante, pero

el tautómero enólico está presente exclusivamente en condiciones alcalinas, que puede ser racionalizado por el enlace de hidrógeno intramolecular en forma enol, por lo que la solubilidad de la CUR en solución acuosa aumenta en condiciones alcalinas (Kotha y Luthria, 2019). Esta información nos ayuda a comprender como a pH 1.2 al paso del tiempo se sigue observando una liberación de CUR, a pH 6.8 sucede algo similar, pero en menor proporción, en ambos pH se alcanza aproximadamente un 25% de liberación a las 36 horas y a pH 7.4 sucede algo muy interesante, en la Figura 26 se observa como la liberación es menor a las 36 horas, lo que se puede explicar por el cambio a la forma enólica, por lo tanto, la solubilidad se incrementa más y se sobresatura el medio, la cinética de liberación empieza a disminuir en los últimos puntos por la posible adherencia de la CUR en las paredes de los matraces.

Existen otros estudios, en los que de igual manera los NG cargados con CUR liberan *in vitro* CUR en mayor medida a pH 7.4 que a pH 1.2, así como se obtuvo en este proyecto, lo que sugiere que estos nanogeles exhiben propiedades sensibles al pH. Estas propiedades sensibles al pH se pueden explicar por el aumento de la repulsión iónica a un pH más alto, provocando el hinchamiento de los nanogeles, permitiendo una mayor liberación de CUR (Wong et al., 2019).

Por otra parte, recordemos que la tasa de liberación de los fármacos encapsulados aumenta en caso de partículas más pequeñas debido a su mayor área de superficie relación de volumen que facilita una fácil liberación de la drogas por erosión superficial y difusión, mientras que las partículas exhiben una fácil

penetración y permeación a través las barreras fisiológicas debido a su menor tamaño (Prajakta et al., 2009).

En estudios similares los nanogeles cargados con CUR, de igual manera se mostró una aceleración de la liberación de curcumina a partir de pH 5, para nanogeles reticulados con EGDMA y DVA y, en el caso de nanogeles reticulados con BAC, la liberación fue incluso más rápido con la adición de GSH 10 mM (Manzanares-Guevara et al., 2020).

CITOTOXICIDAD DE LOS NANOGELES CARGADOS CON CUR.

Existen muchos estudios en los que se ha evaluado el efecto antitumoral de la CUR, se reporta que el principal mecanismo de la CUR sobre las células cancerígenas, es inducir la apoptosis de dichas células (González-Albadalejo et al., 2015) y el ensayo empleado para determinar la viabilidad celular que por lo general se usa es el MTT; a pesar que se ha probado y mostrado actividad en diferentes tipos de cáncer en este caso nos enfocaremos a los estudios de CC.

Se estudió los efectos anticancerígenos de las CUR-CS-PEC-NP contra las células de CCR HT-29, en el cual resultó una reducción significativa en la propagación de las células cancerosas, el efecto antiproliferativo de la CUR encapsulada fue similar al de la curcumina libre en dosis equivalentes, lo que confirma que el proceso de encapsulación no impidió la actividad anticancerígena de CUR (Alkhader et al. 2018). Por su parte, Manzanares-Guevara y colaboradores realizaron el estudio en la línea de CC humano HCT-116, donde se demostró que

el IC₅₀ se redujo de 5 a 1 µg/mL cuando se cargó CUR, dentro de algunas de sus nanoformulaciones las reticuladas con DVA y BAC (Manzanares-Guevara et al., 2020). En CUR/ ALG-GANP se demostró su potencial anticanceroso contra células de cáncer de hígado humano (HepG2) que en cáncer de colon (HT29), cáncer de pulmón (A549). y células de cáncer de mama (MCF7) reduciendo casi un 50% los valores de IC₅₀, las nanopartículas vacías no tenían ningún efecto inhibitor sobre la proliferación de células cancerosas incluso aumentando su concentración, el ensayo indicó que las nanopartículas de CUR eran más eficientes que la CUR libre para inhibir el crecimiento de células cancerosas (Hassani et al., 2020). También la citotoxicidad de SCNP y CSCNP se estudió, empleando 7 líneas celulares de cáncer, donde se observó una toxicidad significativa y la viabilidad celular disminuyó con el aumento de las concentraciones, cabe destacar que la línea celular de carcinoma escamoso cervical humano HeLa fue la más sensible a la CUR (Kong et al., 2019). Finalmente cabe destacar la viabilidad celular de HCT116 en respuesta a CM-SF-NP, SF-NP, 5-Fu y tratamientos de control durante 48 horas, los NP-CM-SF presentaron un potencial anticanceroso superior (~ 94%) en comparación con 5-Fu (~ 83%) y las NP-CM-SF exhibieron un potencial anticanceroso superior a concentraciones < 5 µg/mL (Xie et al., 2017).

En nuestro estudio la viabilidad celular se determinó en cultivo de células HeLa para demostrar el efecto antitumoral de la CUR y NG-CUR. En la Figura 28 se ve reflejada el porcentaje de viabilidad en el cultivo al evaluar CUR libre, en el que se observa la disminución de viabilidad desde los 5 µg/mL y conforme se incrementa la concentración, más disminuye la viabilidad. Pero, al cargar CUR en

los nanogeles sintetizados no sé aprecia que haya un decremento de la viabilidad, por el contrario, parece observarse un incremento (Figura 29).

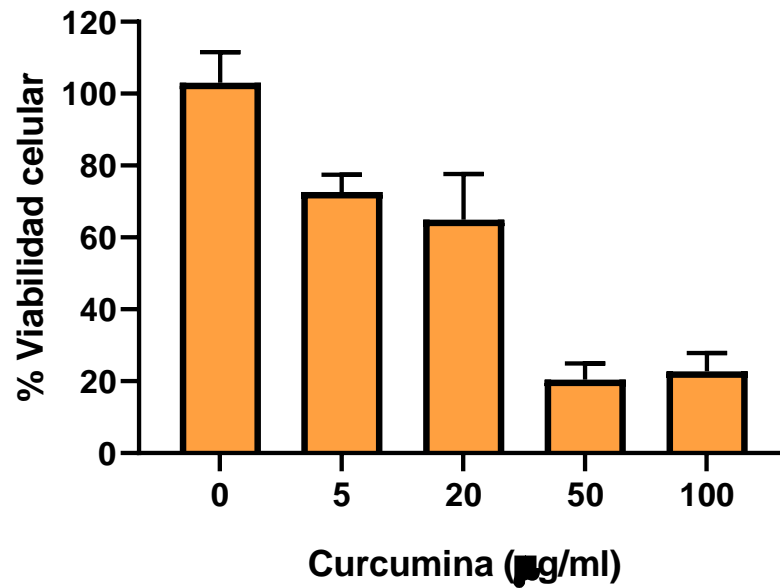


Figura 28. Viabilidad celular en cultivo de células HeLa tratado con CUR.

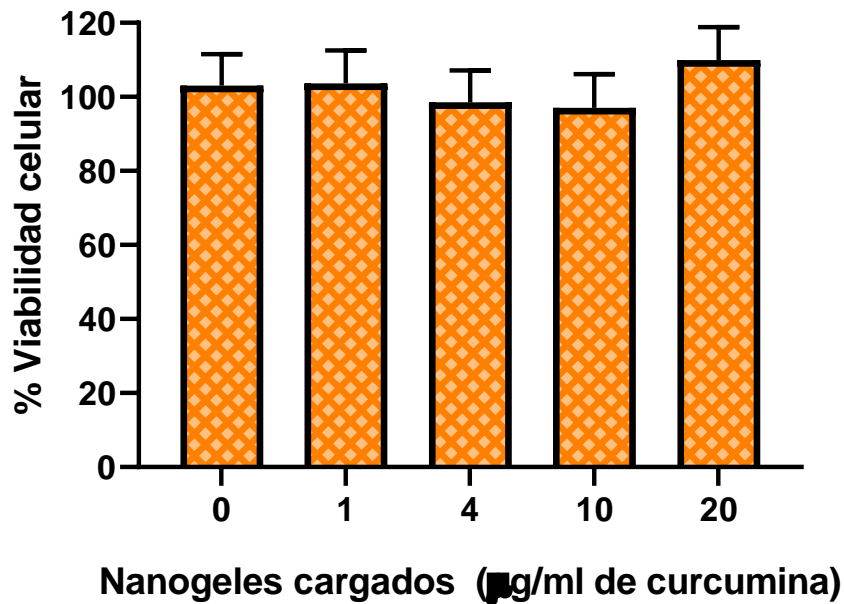


Figura 26. Viabilidad celular en cultivo de células HeLa tratado con NG-CUR.

Para determinar si los nanogeles vacíos, puedan ser tóxicos en las células se incluyó un grupo de células para su evaluación, a concentraciones de 0.5 mg/mL y 1 mg/mL, como puede verse la Figura 30 los nanogeles no presentan un efecto citotóxico. También se trató un grupo de células con etanol al 5%, al ser utilizado para la disolución de CUR; los resultados arrojaron que este no contribuye en la disminución de la viabilidad celular.

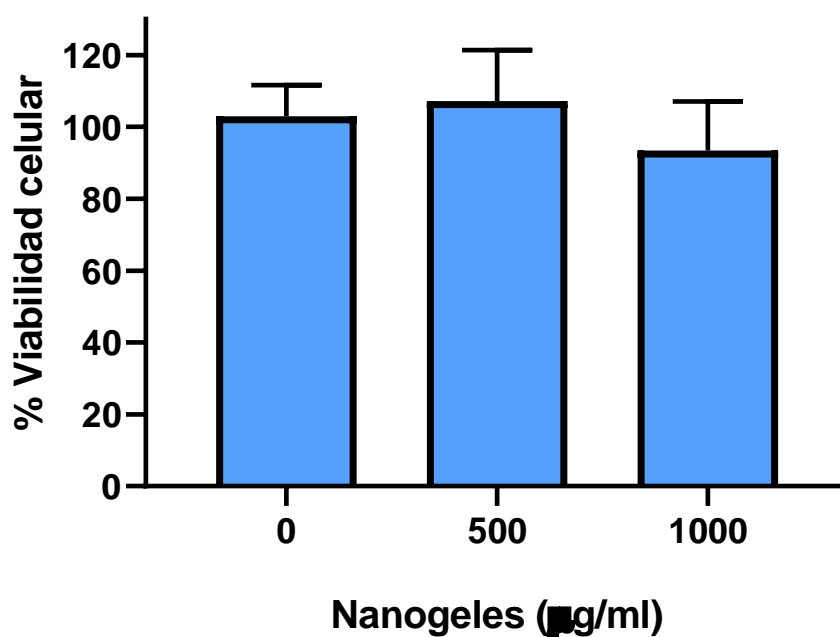


Figura 30. Viabilidad celular en cultivo de células HeLa tratado con NG.

Finalmente, al comparar la viabilidad celular de CUR y NG-CUR en la concentración que es equitativa vemos que no disminuyo con la nanoformulación (Figura 31); con base en los estudios previamente mencionados, podemos inferir que el tiempo de tratamiento juega un rol importante, en nuestro estudio solo se

trató a las células por 24 horas y en otros, el lapso de tiempo es mayor, van desde las 36 hasta las 72 horas.

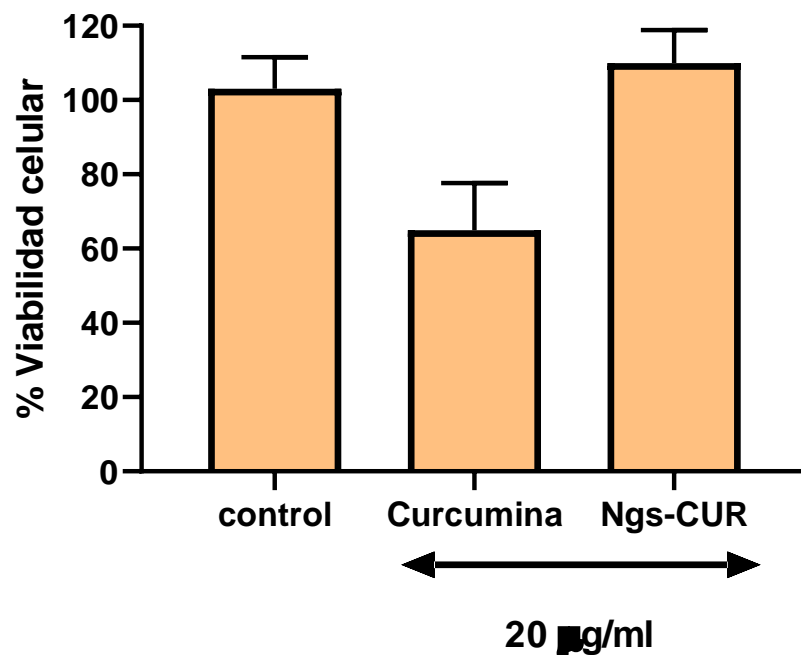


Figura 31. Viabilidad celular en cultivo de células HeLa comparativa CUR y NG-CUR.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

En este trabajo se sintetizaron nanogeles CAM 10 mediante polimerización en emulsión, los cuales a pH neutro-básico tienen un tamaño menor a 100 nm y un PDI <0.2, es decir, hay una monodispersión en el tamaño a estos pH y el potencial Z es más negativo que a pH ácidos, su evaluación a diferentes pH demuestra que responden a cambios en el medio ambiente, como lo es el cambio de pH. En cuanto a la estabilidad, el tamaño de los nanogeles se incrementó después del proceso de liofilizado y reconstitución, en futuros estudios podemos mejorar la estabilidad incluyendo un crioprotector.

El cargado de los nanogeles con CUR tiene una alta eficiencia del 99% y una capacidad de carga aproximada al 20%, lo cual se atribuye al tamaño de partícula y la gran carga superficial negativa.

Se confirmó mediante espectrometría Infrarroja la incorporación de CUR en los nanogeles y mediante las cinéticas de liberación confirmamos que las nanopartículas responden a los cambios de pH, ya que a un pH 1.2 la liberación fue menor y en los pH 6.8 y 7.4 esta es mayor, este comportamiento es el deseado, dado que la nanoformulación puede resistir la degradación en ambientes ácidos, para liberar su contenido a pH colónico.

Por último, se evaluó por MTT la viabilidad celular en cultivos HeLa tratados con CUR, nanogeles vacíos y los cargados con CUR; los nanogeles no son tóxicos para las células, incluso incrementaron su viabilidad, la CUR a concentraciones de 5, 20,

50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ presenta efecto citotóxico, pero una vez cargado en los nanogeles, no se pudo observar una disminución en la viabilidad como con la CUR libre, en base en lo reportado en otros estudios esto puede deberse a que las concentraciones de los NG-CUR no fueron equivalentes a la CUR libre, por lo que solo se pudo hacer una comparación directa en una de las concentraciones, es necesario tener más puntos de comparación para confirmar o descartar la citotoxicidad de los NG-CUR, por otra parte, solo se trataron las células durante 24 horas y en otros estudios publicados este tiempo suele ser mucho mayor.

En general se cumplen los objetivos del estudio y con los resultados obtenidos vemos la nanoformulación desarrollada con potencial para ser mejorada y seguir estudiándose en cultivos celulares de diversos tipos de cáncer, en animales y probar más concentraciones que las aquí estudiadas, para acercarnos a la aplicación clínica de los NG-CUR inteligentes responsivos a los cambios de pH y ofrecer en un futuro más opciones a los pacientes oncológicos, los cuales desafortunadamente suelen recibir tratamientos muy agresivos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alkhader, Enas, Clive J. Roberts, Rozita Rosli, Kah Hay Yuen, Eng Kwong Seow, You Zhuan Lee, and Nashiru Billa. 2018. "Pharmacokinetic and Anti-Colon Cancer Properties of Curcumin-Containing Chitosan-Pectinate Composite Nanoparticles." *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 29(18):2281–98.
- Amelia Marti, Raquel Echeverría, Lydia Morell-Azanza y Ana Ojeda-Rodríguez. 2017. "Telómeros y Calidad de La Dieta." *Nutrición Hospitalaria: Scielo*.
- American Cancer Society. 2021. "Causas, Factores de Riesgo y Prevención." *Sobre El Cáncer*. Retrieved (<https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-colon-o-recto/causas-riesgos-prevencion.html>).
- American Society of Clinical Oncology. 2020. "Cáncer Colorrectal: Estadísticas." *American Society of Clinical Oncology*. Retrieved (<https://www.cancer.net/es/tipos-de-cáncer/cáncer-colorrectal/estadísticas>).
- Arrighi, Cowie; 2007. "Introducción a La Ciencia de Los Polímeros." *Editorial CUCEI*. Retrieved (<https://ecucei.com/polimeros/3-polimerizacion-por-adicion-cadena/3-2-polimerizacion-via-radicales/>).
- Bastías Solís, María Francisca. 2008. "Determinación y Cuantificación de La Eficiencia de Asociación de Azitromicina En Nanopartículas Biopoliméricas." *Universidad Austral de Chile* 3:1–113.
- Bayda, Samer, Muhammad Adeel, Tiziano Tuccinardi, Marco Cordani, and Flavio Rizzolio. 2020. "The History of Nanoscience and Nanotechnology:

From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine.” *Molecules* 25(1):1–15.

Betty Y.S. Kim, M.D., James T. Rutka, M.D., and Warren C. W. Chan. 2010. “Nanomedicine.” *The New England Journal of Medicine* 17(2):121–30.

Bich, Vu Thi, Nguyen Thi Thuy, Nguyen Thanh Binh, Nguyen Thi Mai Huong, Pham Nguyen Dong Yen, and Tran Thanh Luong. 2009. “Structural and Spectral Properties of Curcumin and Metal- Curcumin Complex Derived from Turmeric (*Curcuma Longa*).” *Springer Proceedings in Physics* 127:271–78.

Cornejo-Bravo, Jose M., Claudia D. Becerra, Kenia Palomino, Héctor Magaña, Ignacio Rivero, Eduardo López-Maldonado, and Aracely Serrano-Medina. 2021. “Copolymeric Nano/Microgels of N-Isopropylacrylamide and Carboxyalkyl Methacrylamides: Effect of Methylene Chains and the Ionization State of the Weak Acids on Size and Sensitivity to PH and Temperature.” *Soft Materials* 19(1):89–99.

Cuggino, Julio César, Maria Molina, Stefanie Wedepohl, Cecilia Inés Alvarez Igarzabal, Marcelo Calderón, and Luis Marcelino Gugliotta. 2016. “Responsive Nanogels for Application as Smart Carriers in Endocytic PH-Triggered Drug Delivery Systems.” *European Polymer Journal* 78:14–24.

Díaz Ramos, Dafne Ivette. 2016. “Propiedades Fisicoquímicas y Estabilidad de La Oleorresina de Paprika Micro y Nano Encapsulada.” *Repositorio Universidad Veracruzana* 1–107.

España: Asociación Española contra el cáncer. 2018. “Elección Del Tratamiento.” Retrieved (<https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tratamientos/eleccion-tratamiento>).

Flores, Encarnación González. 2020. “Sociedad Española de Oncología

Médica.” *Cáncer de Colon y Recto* SEOM. Retrieved (<https://seom.org/info-sobre-el-cancer/colon-recto?showall=1>).

Garza-Salazar, Jaime; Juárez-Sánchez, Paula. 2014. *El Cáncer*. Vol. 26. Monterrey: Universidad Autónoma de Nuevo León.

Gómez Ayala, Adela-Emilia. 2007. “Manipulación de Especialidades Farmacéuticas.” *Elsevier* 21(4):44–48.

González-Albadalejo, J., Dionisia Sanz, Rosa M. Claramunt, José Luis Lavandera, Ibon Alkorta, and Jose Elguero. 2015. “Curcumina y Curcuminoides: Química, Estudios Estructurales y Propiedades Biológicas.” *Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia* 81(4):278–310.

Guerrero, Oscar Escalona Rayo; David Quintanar. 2014. “Nanogeles Poliméricos: Una Nueva Alternativa Para La Administración de Fármacos.” *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas* 45(3).

Hajebi, Sakineh, Navid Rabiee, Mojtaba Bagherzadeh, Sepideh Ahmadi, Mohammad Rabiee, Hossein Roghani-Mamaqani, Mohammadreza Tahiri, Lobat Tayebi, and Michael R. Hamblin. 2019. “Stimulus-Responsive Polymeric Nanogels as Smart Drug Delivery Systems.” *Acta Biomaterialia* 92:1–18.

Hare, Jennifer I., Twan Lammers, Marianne B. Ashford, Sanyogitta Puri, Gert Storm, and Simon T. Barry. 2017. “Challenges and Strategies in Anti-Cancer Nanomedicine Development: An Industry Perspective.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 108:25–38.

Hassani, Abdelkader, Syed Mahmood, Hamid Hammad Enezei, Siti Aslina Hussain, Hamad Ali Hamad, Ahmed Faris Aldoghachi, Abdullah Hagar, Abd Almonem Doolaanea, and Wisam Nabeel Ibrahim. 2020.

“Formulation, Characterization and Biological Activity Screening of Sodium Alginate-Gum Arabic Nanoparticles Loaded with Curcumin.” *Molecules* 25(9).

Hernández, Karina. 2015. “Caracterización y Digestión Gastrointestinal de Cápsulas Líquidas de Curcumina (Curcuma Longa L.) (Tesis de Maestría).” 1–18.

Hernandez Paz, Juan Francisco. 2013. “Estudio de Pigmentos Por Medio de Microscopia Electronica.” *UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON* (li):4682.

Instituto nacional de la Salud, Instituto Nacional del Cáncer. 2019. “¿Qué Es El Cáncer?” *GobiernoUsa.Gov*. Retrieved (<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>).

Instituto Nacional del Cáncer. 2020. “El Cáncer.” *Estadios Del Cáncer de Colon*. Retrieved (https://www.cancer.gov/espanol/tipos/colorrectal/paciente/tratamiento-colorrectal-pdq#_112).

Javier Puente; Guillermo de Velasco. 2017. “¿Qué Es El Cáncer y Cómo Se Desarrolla?” *España: Sociedad Española de Oncología Médica*. Retrieved (<https://seom.org/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla>).

Kamel, Nagwa A., Ahmed A. F. Soliman, Nehad N. Rozik, and Salwa L. Abd-Elmessieha. 2018. “Biophysical Investigation of Curcumin Based Nanocomposite for Wound Dressing Application.” *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 8(5):35–44.

Kong, Zwe Ling, Hsiang Ping Kuo, Athira Johnson, Li Cyuan Wu, and Ke Liang B. Chang. 2019. “Curcumin-Loaded Mesoporous Silica

- Nanoparticles Markedly Enhanced Cytotoxicity in Hepatocellular Carcinoma Cells.” *International Journal of Molecular Sciences* 20(12).
- Kotha, Raghavendhar R. and Devanand L. Luthria. 2019. “Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects.” *Molecules* 24(16):1–27.
- De la Garza Salazar, J. 2014. *El Cáncer*. 1st ed. edited by Editores de Textos Mexicanos S.A. de C.V. Monterrey.
- Macuralla-Mercade, Teresa; Élez, Elena; Capdevilla, Jaume; Taberner, Josep. 2011. *Comprender El Cáncer de Colon y Recto*. Barcelona: Amat.
- Magaña, Hector, Jose Manuel Cornejo-Bravo, Ivan Cordova-Guerrero, Kenia Palomino, and Aracely Serrano-Medina. 2017. “PH-Dependent Release of Antihypertensives from Complexes with Poly(Carboxyalkyl Methacrylamides).” *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 39(May):508–15.
- Manzanares-Guevara, Lizbeth A., Angel Licea-Claverie, Irasema Oroz-Parra, Johanna Bernaldez-Sarabia, Fernando Diaz-Castillo, and Alexei F. Licea-Navarro. 2020. “Smart Nanoformulation Based on Stimuli-Responsive Nanogels and Curcumin: Promising Therapy against Colon Cancer.” *ACS Omega*.
- María Teresa Martín de Civetta, Julio Domingo Civetta. 2011. “Carcinogénesis.” *J. Salud Pública de México: Scielo*.
- Motokawa, R. 2005. *Soap Free Emulsion Polymerization and Phase Behavior of Poly(N-Isopropylacrylamide)-Block-Poly(Ethylene Glycol) in Aqueous Media*. Chiba Univ. Japon.
- Núñez, Carlos Eduardo. 2008. “Acerca Del Colores de Sustancias y Soluciones.”

- OMS. 2019. “Cáncer, Datos y Cifras de Cáncer.” Retrieved (<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>).
- OPS. 2020a. “El Cáncer de Colon Es Prevenible y Curable.” OPS. Retrieved (https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5176:2011-el-cancer-colon-prevenible-curable&Itemid=3761&lang=es).
- OPS. 2020b. “Perfiles de País Sobre Cáncer, 2020.” Retrieved (https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=15716:country-cancer-profiles-2020&Itemid=72576&lang=es).
- Oscar Alvarez Martinez. 2016. “El Núcleo Celular. El Ciclo Celular y Las Divisiones Celulares.” *Publicaciones Didácticas*. Retrieved (<https://publicacionesdidacticas.com/hemeroteca/articulo/072054/articulo-pdf>).
- PMfarma. 2020. “Cáncer Colorrectal, El Cáncer Con Más Mortalidad En México.” Retrieved (<http://www.pmfarma.com.mx/noticias/16597-cancer-colorrectal-el-cancer-con-mas-mortalidad-en-mexico.html>).
- Porras, Isabel Almudena. 2010. “Apoptosis: Una Forma Controlada de Muerte Celular.” *SEBBM*. Retrieved (https://www.sebbm.es/web/images/archivos/archivos_tinymce/mayo2010_almudenaporrasisabelmarzo.pdf).
- Prajakta, Dandekar, Jain Ratnesh, Kumar Chandan, Subramanian Suresh, Samuel Grace, Venkatesh Meera, and Patravale Vandana. 2009. “Curcumin Loaded PH-Sensitive Nanoparticles for the Treatment of Colon Cancer.” *Journal of Biomedical Nanotechnology* 5(5):445–55.
- Reynoso-Noverón, Nancy and Juan Alejandro Torres-Domínguez. 2017. “Epidemiología Del Cáncer En México: Carga Global y Proyecciones

2000-2020 Epidemiology of Cancer in México: Global Burden and Projections 2000-2020.” *Revista Latinoamericana de Medicina Conductual* 8(1):9–15.

Selvam, Chelliah, Sakthivel Lakshmana Prabu, Brian C. Jordan, Yasodha Purushothaman, Appavoo Umamaheswari, Maryam Sadat Hosseini Zare, and Ramasamy Thilagavathi. 2019. “Molecular Mechanisms of Curcumin and Its Analogs in Colon Cancer Prevention and Treatment.” *Life Sciences* 239:117–32.

Talevi, Alan, Pablo Quiroga, and María Esperanza. 2016. *Procesos Biofarmacéuticos. Su Relación Con El Diseño de Formas Farmacéuticas y El Éxito de La Farmacoterapia.*

Todo en polimeros. 2017. “Polimerización En Emulsión.” Retrieved (<https://todoenpolimeros.com/2017/06/30/polimerizacion-en-emulsion/>).

Vigo, Universidad de. 2019. “Ciclo Celular.” *Atlas de Histología Vegetal y Animal.* Retrieved (<https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/8-ciclo.php>).

Vihola, H., Laukkanen, A., Valtola, L. 2005. *Biomaterials.*

Wong, Kar En, Siew Ching Ngai, Kok Gan Chan, Learn Han Lee, Bey Hing Goh, and Lay Hong Chuah. 2019. “Curcumin Nanoformulations for Colorectal Cancer: A Review.” *Frontiers in Pharmacology* 10.

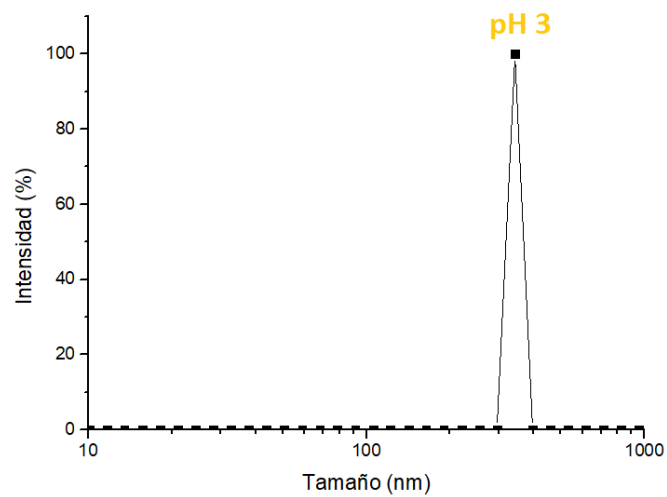
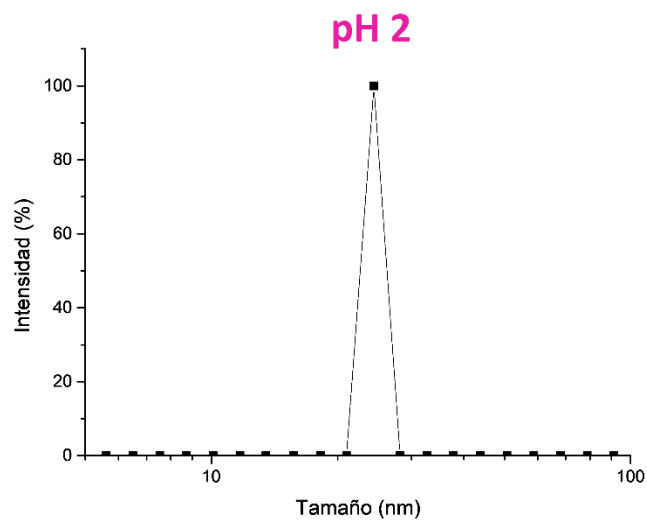
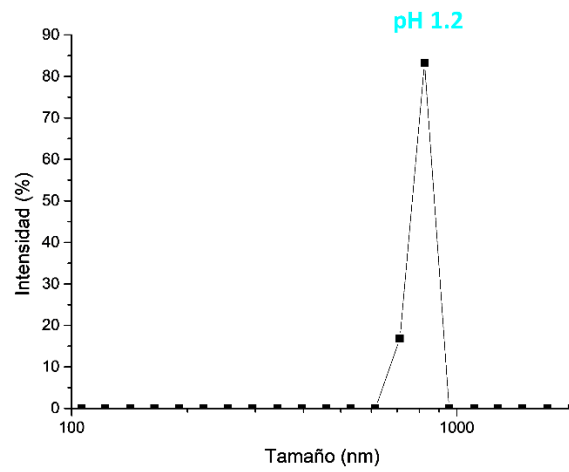
Wu, Renyi, Lujing Wang, Ran Yin, Rasika Hudlikar, Shanyi Li, Hsiao Chen D. Kuo, Rebecca Peter, Davit Sargsyan, Yue Guo, Xia Liu, and Ah Ng T. Kong. 2020. “Epigenetics/Epigenomics and Prevention by Curcumin of Early Stages of Inflammatory-Driven Colon Cancer.” *Molecular Carcinogenesis* 59(2):227–36.

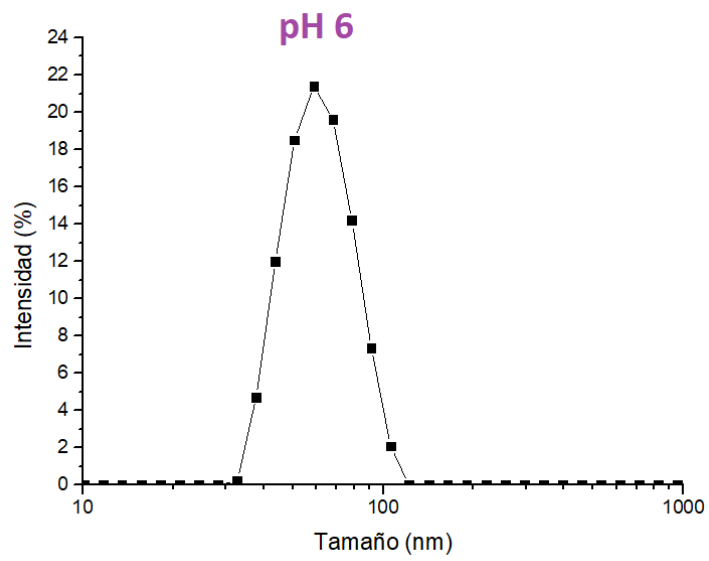
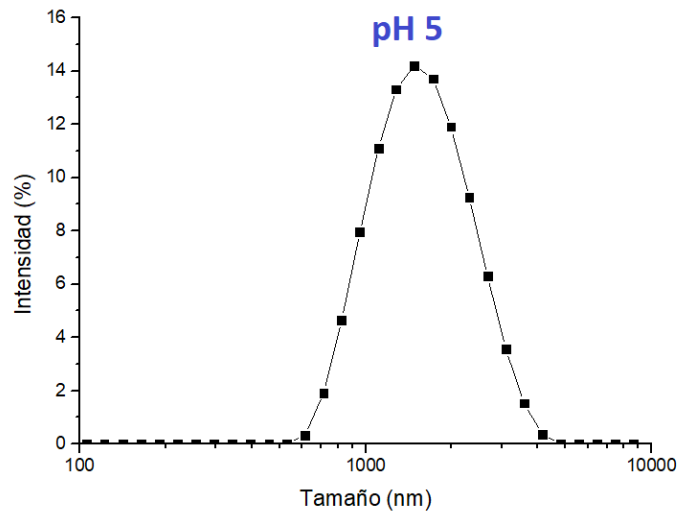
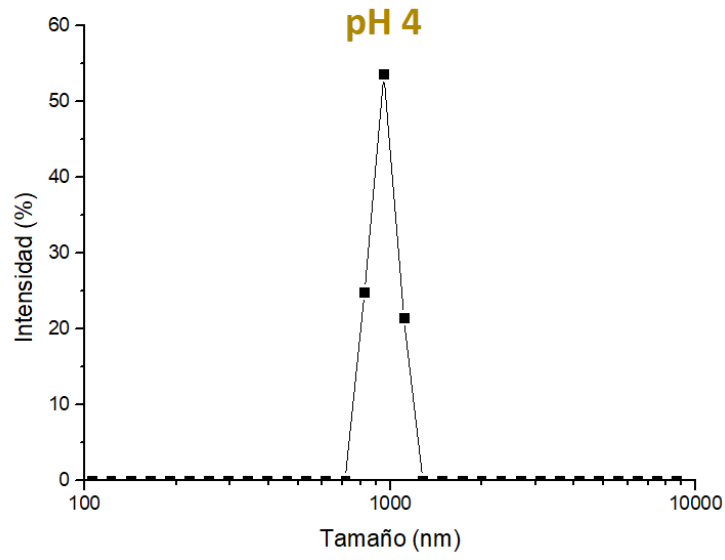
Xie, Maobin, Dejun Fan, Yi Li, Xiaowen He, Xiaoming Chen, Yufeng Chen, Jixiang Zhu, Guibin Xu, Xiaojian Wu, and Ping Lan. 2017. “Supercritical

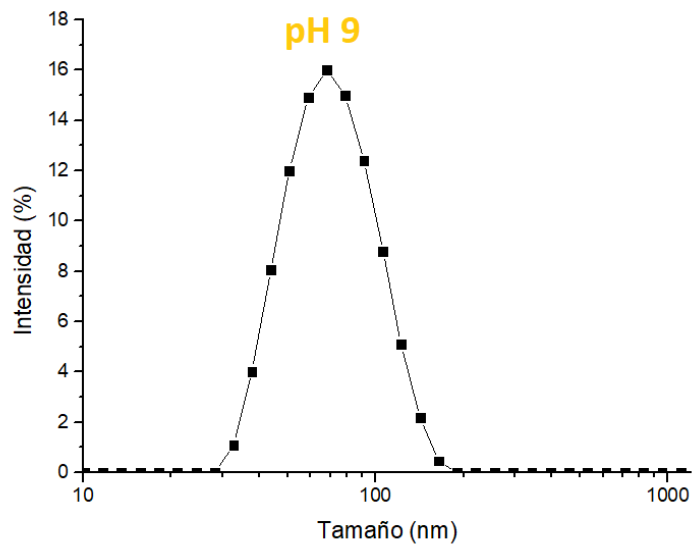
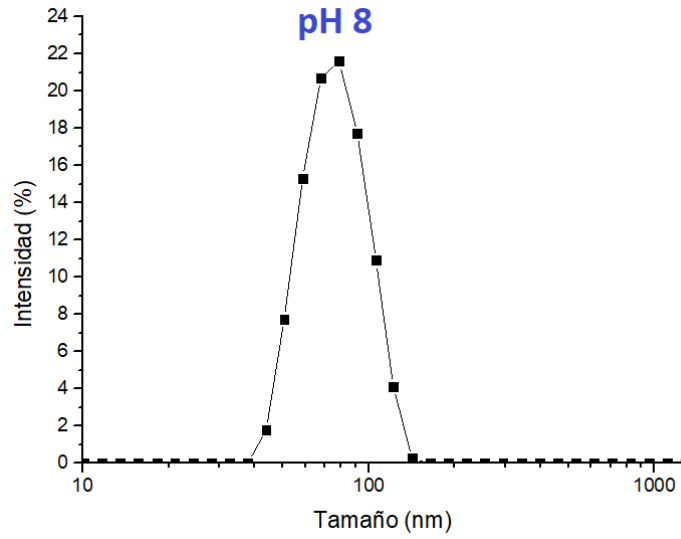
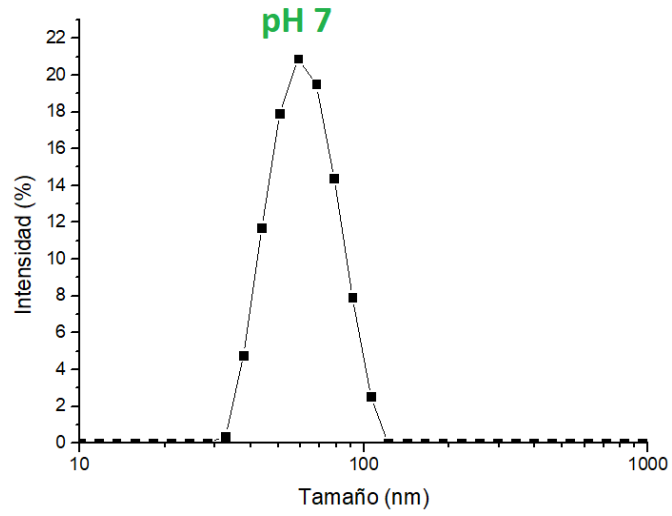
Carbon Dioxide-Developed Silk Fibroin Nanoplatfrom for Smart Colon Cancer Therapy.” *International Journal of Nanomedicine* 12:7751–61.

ANEXOS

ANEXO A. DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO POR INTENSIDAD



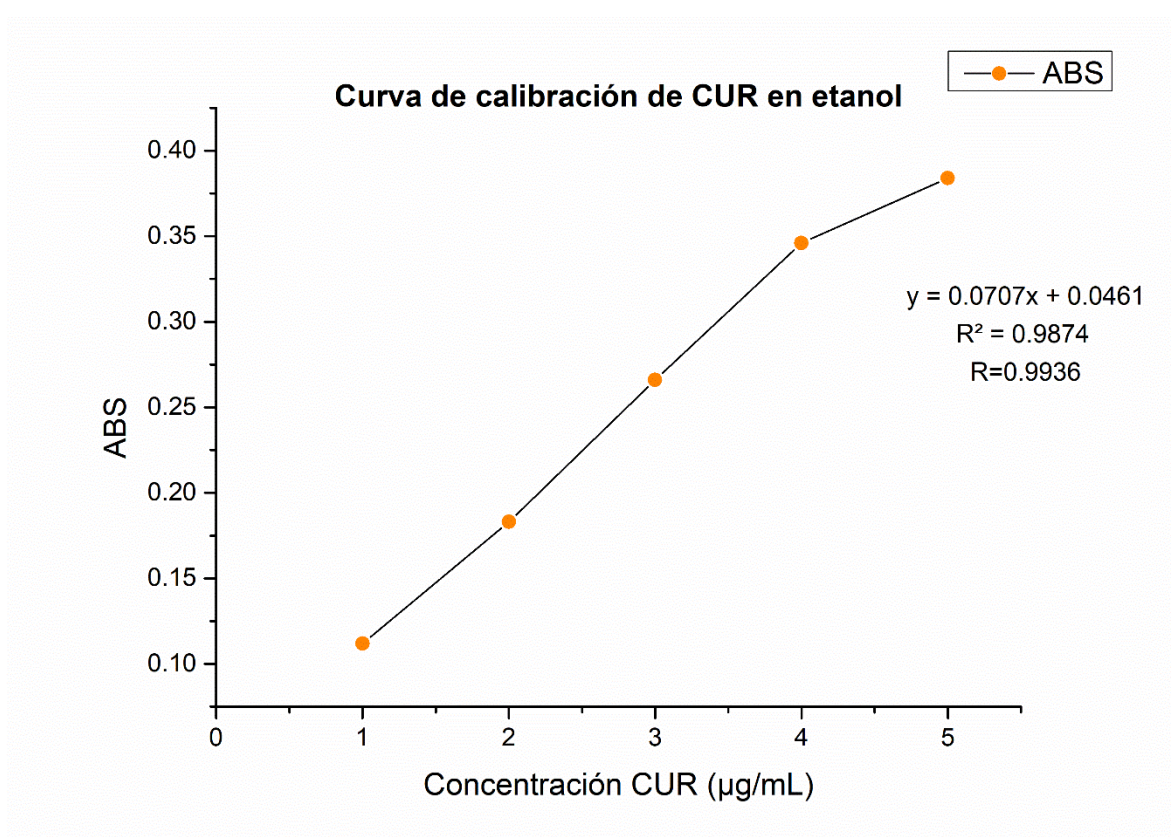




ANEXO B. CURVA DE CALIBRACION DE CURCUMINA

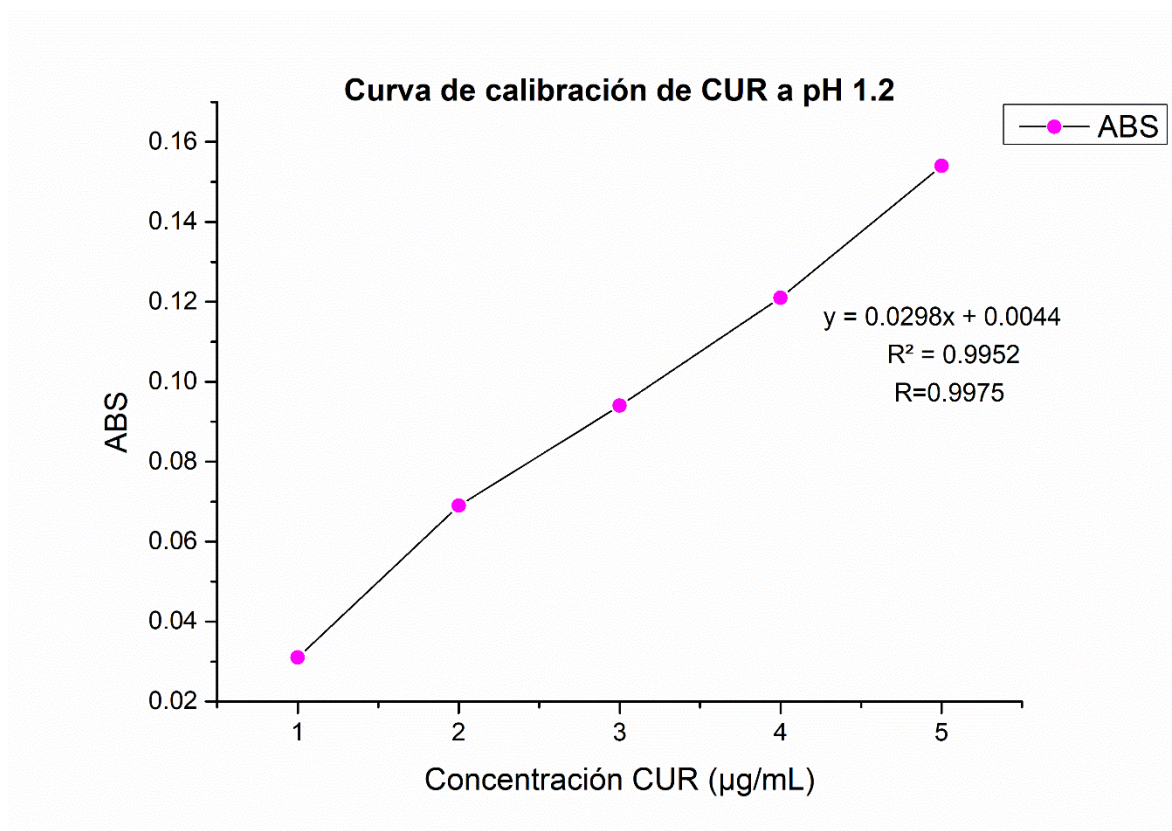
SOLUCION MADRE: 5 mg de curcumina aforado a 10 mL de etanol

		Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	ABS
A	20 μL sln madre/ 10 mL etanol	1	0.112
B	40 μL sln madre/ 10 mL etanol	2	0.183
C	60 μL sln madre/ 10 mL etanol	3	0.266
D	80 μL sln madre/ 10 mL etanol	4	0.346
E	100 μL sln madre/ 10 mL etanol	5	0.384



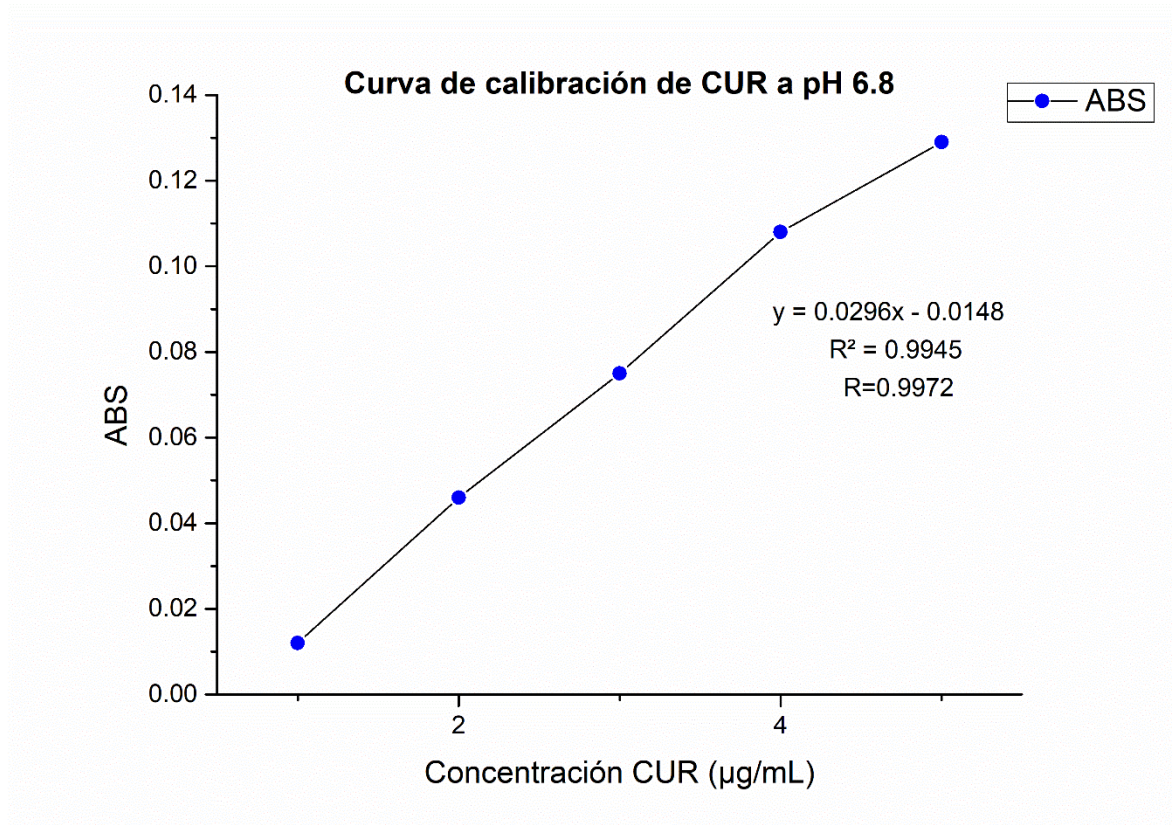
Curva de calibración a pH 1.2

		Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	ABS
A	20 μL sln madre/ 10 mL buffer	1	0.031
B	40 μL sln madre/ 10 mL buffer	2	0.069
C	60 μL sln madre/ 10 mL buffer	3	0.094
D	80 μL sln madre/ 10 mL buffer	4	0.121
E	100 μL sln madre/ 10 mL buffer	5	0.154



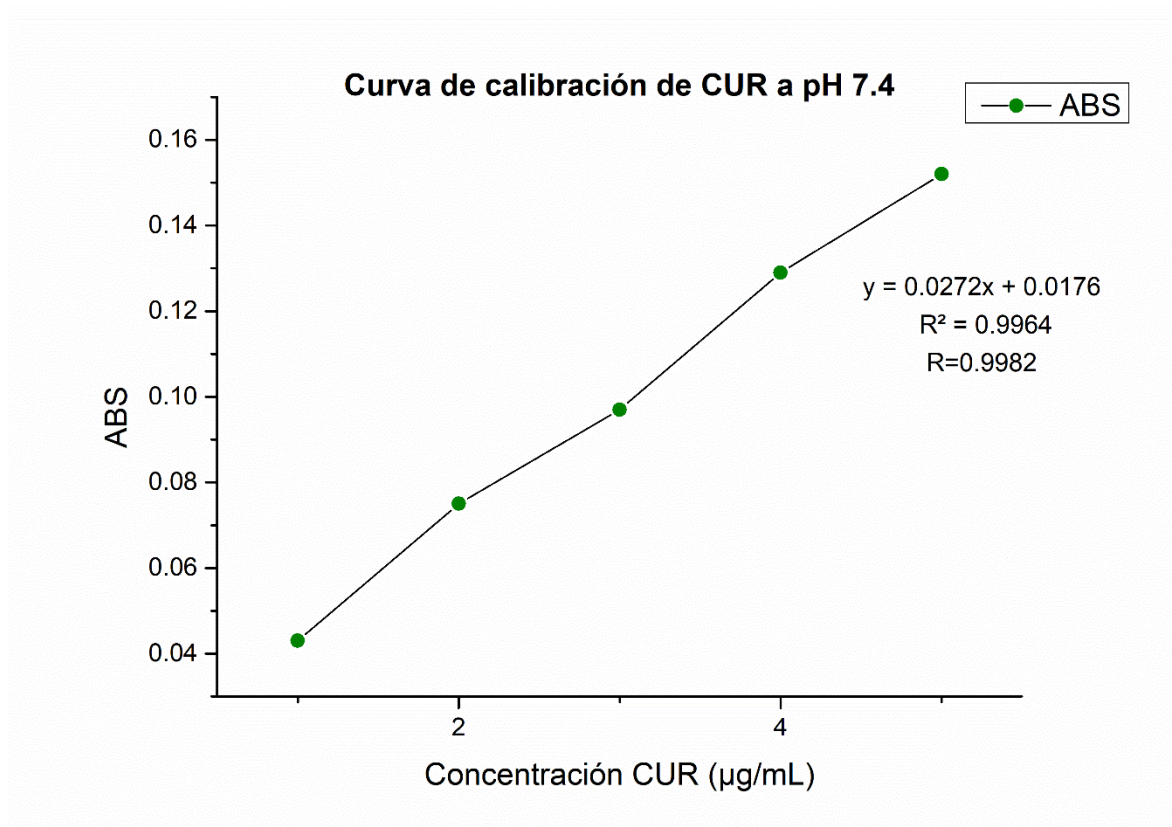
Curva de calibración a pH 6.8

		Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	ABS
A	20 μL sln madre/ 10 mL buffer	1	0.012
B	40 μL sln madre/ 10 mL buffer	2	0.046
C	60 μL sln madre/ 10 mL buffer	3	0.075
D	80 μL sln madre/ 10 mL buffer	4	0.108
E	100 μL sln madre/ 10 mL buffer	5	0.129



Curva de calibración a pH 7.4

		Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	ABS
A	20 μL sln madre/ 10 mL buffer	1	0.043
B	40 μL sln madre/ 10 mL buffer	2	0.075
C	60 μL sln madre/ 10 mL buffer	3	0.097
D	80 μL sln madre/ 10 mL buffer	4	0.129
E	100 μL sln madre/ 10 mL buffer	5	0.152



ANEXO C. BARRIDOS

Al 10% (100 μ L de solución madre de curcumina + 900 μ L del buffer)

	Longitud de onda (nm)	ABSORBANCIAS
pH 1.2 (pico máximo)	433	0.259
pH 1.2	380	0.103
pH 1.2	499	0.064
pH 6.8 (pico máximo)	435	0.317
pH 6.8	498	0.141
pH 7.4 (pico máximo)	434	0.295
pH 7.4	380	0.136
pH 7.4	448	0.280
pH 7.4	498	0.113

Al 20% (200 μ L de solución madre de curcumina + 800 μ L del buffer)

	Longitud de onda (nm)	ABSORBANCIAS
pH 1.2 (pico máximo)	451	1.441
pH 1.2	381	0.814
pH 1.2	502	0.832
pH 6.8 (pico máximo)	451	1.237
pH 6.8	387	0.763
pH 6.8	500	0.543
pH 7.4 (pico máximo)	451	1.075
pH 7.4	383	0.650
pH 7.4	501	0.369

ANEXO D. CARGADO CON CURCUMINA

Datos:

ABS de los sobrenadantes	Nanogeles =2020 µg/mL
0.249	
0.226	
0.130	Curcumina = 505 µg/mL
0.094	
0.163	
0.071	Nanogeles cargados= 503.6153 µg/mL
0.074	
ABS PROMEDIO= 0.144	

Con la ecuación de la recta obtenida en las curvas de calibración obtenemos la cantidad de CUR libre, que no se cargó en los nanogeles:

$$y = 0.0707x + 0.0461$$

$$0.144 = 0.0707x + 0.0461$$

$$x = 1.3847 \text{ µg/mL de CUR libre}$$

Restamos la CUR libre a la CUR total agregada para conocer la cantidad de CUR cargada en los nanogeles:

$$505 \text{ µg/mL} - 1.3847 \text{ µg/mL} = 503.6153 \text{ µg/mL de CUR cargada.}$$

Ahora que se cuentan con todos los datos necesarios se prosigue a sustituir los datos.

Formulas:

Capacidad de carga de fármaco

$$CCF = \left(\frac{MFng}{Mng + MFng} \right) * 100$$

Eficiencia de carga del fármaco

$$ECF = \frac{MFng}{MF} * 100$$

Donde:

MF_{ng} = masa del fármaco en los nanogeles

M_{ng} = Masa de los nanogeles

MF = Masa del fármaco

Sustitución:

$$CCF = \left(\frac{503.6153 \mu\text{g/mL}}{2020 \mu\text{g/mL} + 503.6153 \mu\text{g/mL}} \right) * 100$$

$$ECF = \frac{503.6153 \mu\text{g/mL}}{505 \mu\text{g/mL}} * 100$$

Resultados:

CCF= 19.96 %

EC= 99.73%

ANEXO E. CINÉTICAS DE LIBERACIÓN

○ Liberación a pH 1.2

Ecuación de la recta: $y = 0.0298x + 0.0044$

Intercepto	0.0044
Pendiente	0.0298
Alicuota (mL)	1
Volumen del medio (mL)	30
Muestra (mg)	6
Muestra CUR (ug)	400

Tiempo (horas)	ABS	Concentración (ug/mL)	Alícuota (mL)	Liberación parcial	Liberación total	FL1 NGCUR
0	0.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.25	0.008	0.1208	0.1208	3.6242	3.6242	0.0091
0.5	0.009	0.1544	0.1544	4.6309	4.7517	0.0119
0.75	0.008	0.1208	0.1208	3.6242	3.8993	0.0097
1	0.010	0.1879	0.1879	5.6376	6.0336	0.0151
2	0.013	0.2886	0.2886	8.6577	9.2416	0.0231
4	0.014	0.3221	0.3221	9.6644	10.5369	0.0263
8	0.025	0.6913	0.6913	20.7383	21.9329	0.0548
12	0.020	0.5235	0.5235	15.7047	17.5906	0.0440
24	0.050	1.5302	1.5302	45.9060	48.3154	0.1208
36	0.103	3.3087	3.3087	99.2617	103.2013	0.2580

Tiempo (horas)	ABS	Concentración (ug/mL)	Alícuota (mL)	Liberación parcial	Liberación total	FL2 NGCUR
0	0.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.25	0.008	0.1208	0.1208	3.6242	3.6242	0.0091
0.5	0.009	0.1544	0.1544	4.6309	4.7517	0.0119
0.75	0.010	0.1879	0.1879	5.6376	5.9128	0.0148
1	0.014	0.3221	0.3221	9.6644	10.1275	0.0253
2	0.016	0.3893	0.3893	11.6779	12.4631	0.0312
4	0.014	0.3221	0.3221	9.6644	10.8389	0.0271
8	0.018	0.4564	0.4564	13.6913	15.1879	0.0380
12	0.025	0.6913	0.6913	20.7383	22.6913	0.0567
24	0.051	1.5638	1.5638	46.9128	49.5570	0.1239
36	0.111	3.5772	3.5772	107.3154	111.5235	0.2788

Tiempo (horas)	ABS	Concentración (ug/mL)	Alícuota (mL)	Liberación parcial	Liberación total	FL3 NGCUR
0	0.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.25	0.007	0.0872	0.0872	2.6174	2.6174	0.0065
0.5	0.010	0.1879	0.1879	5.6376	5.7248	0.0143
0.75	0.009	0.1544	0.1544	4.6309	4.9060	0.0123
1	0.012	0.2550	0.2550	7.6510	8.0805	0.0202
2	0.013	0.2886	0.2886	8.6577	9.3423	0.0234
4	0.014	0.3221	0.3221	9.6644	10.6376	0.0266
8	0.017	0.4228	0.4228	12.6846	13.9799	0.0349
12	0.023	0.6242	0.6242	18.7248	20.4430	0.0511
24	0.049	1.4966	1.4966	44.8993	47.2416	0.1181
36	0.108	3.4765	3.4765	104.2953	108.1342	0.2703

Tiempo (horas)	ABS	Concentración (ug/mL)	Alícuota (mL)	Liberación parcial	Liberación total	FL CUR
0	0.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.25	0.006	0.0537	0.0537	1.6107	1.6107	0.0040
0.5	0.007	0.0872	0.0872	2.6174	2.6711	0.0067
0.75	0.007	0.0872	0.0872	2.6174	2.7047	0.0068
1	0.007	0.0872	0.0872	2.6174	2.7047	0.0068
2	0.009	0.1544	0.1544	4.6309	4.7181	0.0118
4	0.007	0.0872	0.0872	2.6174	2.7718	0.0069
8	0.008	0.1208	0.1208	3.6242	3.7114	0.0093
12	0.011	0.2215	0.2215	6.6443	6.7651	0.0169
24	0.023	0.6242	0.6242	18.7248	18.9463	0.0474
36	0.042	1.2617	1.2617	37.8523	38.4765	0.0962

○ **Liberación a pH 6.8**

Ecuación de la recta: $y = 0.0296x - 0.0148$

Intercepto	-0.0148
Pendiente	0.0296
Alicuota (mL)	1
Volumen del medio (mL)	30
Muestra (mg)	6
Muestra CUR (ug)	400

Tiempo (horas)	ABS	Concentración (ug/mL)	Alícuota (mL)	Liberación parcial	Liberación total	FL1 NGCUR
0	0.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.25	0.010	0.8378	0.8378	25.1351	25.1351	0.0628
0.5	0.015	1.0068	1.0068	30.2027	31.0405	0.0776
0.75	0.017	1.0743	1.0743	32.2297	34.0743	0.0852
1	0.022	1.2432	1.2432	37.2973	40.2162	0.1005
2	0.020	1.1757	1.1757	35.2703	39.4324	0.0986
4	0.025	1.3446	1.3446	40.3378	45.6757	0.1142
8	0.014	0.9730	0.9730	29.1892	35.8716	0.0897
12	0.020	1.1757	1.1757	35.2703	42.9257	0.1073
24	0.058	2.4595	2.4595	73.7838	82.6149	0.2065
36	0.110	4.2162	4.2162	126.4865	137.7770	0.3444

Tiempo (horas)	ABS	Concentración (ug/mL)	Alícuota (mL)	Liberación parcial	Liberación total	FL2 NGCUR
0	0.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.25	0.010	0.8378	0.8378	25.1351	25.1351	0.0628
0.5	0.013	0.9392	0.9392	28.1757	29.0135	0.0725
0.75	0.018	1.1081	1.1081	33.2432	35.0203	0.0876
1	0.021	1.2095	1.2095	36.2838	39.1689	0.0979
2	0.021	1.2095	1.2095	36.2838	40.3784	0.1009
4	0.023	1.2770	1.2770	38.3108	43.6149	0.1090
8	0.023	1.2770	1.2770	38.3108	44.8919	0.1122
12	0.012	0.9054	0.9054	27.1622	35.0203	0.0876
24	0.053	2.2905	2.2905	68.7162	77.4797	0.1937
36	0.066	2.7297	2.7297	81.8919	92.9459	0.2324

Tiempo (horas)	ABS	Concentración (ug/mL)	Alícuota (mL)	Liberación parcial	Liberación total	FL3 NGCUR
0	0.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.25	0.012	0.9054	0.9054	27.1622	27.1622	0.0679
0.5	0.013	0.9392	0.9392	28.1757	29.0811	0.0727
0.75	0.016	1.0405	1.0405	31.2162	33.0608	0.0827
1	0.020	1.1757	1.1757	35.2703	38.1554	0.0954
2	0.026	1.3784	1.3784	41.3514	45.4122	0.1135
4	0.016	1.0405	1.0405	31.2162	36.6554	0.0916
8	0.015	1.0068	1.0068	30.2027	36.6824	0.0917
12	0.023	1.2770	1.2770	38.3108	45.7973	0.1145
24	0.046	2.0541	2.0541	61.6216	70.3851	0.1760
36	0.058	2.4595	2.4595	73.7838	84.6014	0.2115

Tiempo (horas)	ABS	Concentración (ug/mL)	Alícuota (mL)	Liberación parcial	Liberación total	FL CUR
0	0.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.25	0.004	0.6351	0.6351	19.0541	19.0541	0.0476
0.5	0.009	0.8041	0.8041	24.1216	24.7568	0.0619
0.75	0.011	0.8716	0.8716	26.1486	27.5878	0.0690
1	0.012	0.9054	0.9054	27.1622	29.4730	0.0737
2	0.010	0.8378	0.8378	25.1351	28.3514	0.0709
4	0.011	0.8716	0.8716	26.1486	30.2027	0.0755
8	0.004	0.6351	0.6351	19.0541	23.9797	0.0599
12	0.006	0.7027	0.7027	21.0811	26.6419	0.0666
24	0.018	1.1081	1.1081	33.2432	39.5068	0.0988
36	0.046	2.0541	2.0541	61.6216	68.9932	0.1725

○ **Liberación a pH 7.4**

Ecuación de la recta: $y = 0.0272x + 0.0176$

Intercepto	0.0176
Pendiente	0.0272
Alicuota (mL)	1
Volumen del medio (mL)	30
Muestra (mg)	6
Muestra CUR (ug)	400

Tiempo (horas)	ABS	Concentración (ug/mL)	Alicuota	Liberación parcial	Liberación total	FL1 NGCUR
0	0.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.25	0.007	0.9044	0.9044	27.1324	27.1324	0.0678
0.5	0.014	1.1618	1.1618	34.8529	35.7574	0.0894
0.75	0.024	1.5294	1.5294	45.8824	47.9485	0.1199
1	0.031	1.7868	1.7868	53.6029	57.1985	0.1430
2	0.034	1.8971	1.8971	56.9118	62.2941	0.1557
4	0.037	2.0074	2.0074	60.2206	67.5000	0.1688
8	0.034	1.8971	1.8971	56.9118	66.1985	0.1655
12	0.030	1.7500	1.7500	52.5000	63.6838	0.1592
24	0.035	1.9338	1.9338	58.0147	70.9485	0.1774
36	0.018	1.3088	1.3088	39.2647	54.1324	0.1353

Tiempo (horas)	ABS	Concentración (ug/mL)	Alicuota	Liberación parcial	Liberación total	FL2 NGCUR
0	0.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.25	0.008	0.9412	0.9412	28.2353	28.2353	0.0706
0.5	0.012	1.0882	1.0882	32.6471	33.5882	0.0840
0.75	0.018	1.3088	1.3088	39.2647	41.2941	0.1032
1	0.032	1.8235	1.8235	54.7059	58.0441	0.1451
2	0.035	1.9338	1.9338	58.0147	63.1765	0.1579
4	0.034	1.8971	1.8971	56.9118	64.0074	0.1600
8	0.035	1.9338	1.9338	58.0147	67.0074	0.1675
12	0.033	1.8603	1.8603	55.8088	66.7353	0.1668
24	0.034	1.8971	1.8971	56.9118	69.6985	0.1742
36	0.016	1.2353	1.2353	37.0588	51.7426	0.1294

Tiempo (horas)	ABS	Concentración (ug/mL)	Alícuota	Liberación parcial	Liberación total	FL3 NGCUR
0	0.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.25	0.010	1.0147	1.0147	30.4412	30.4412	0.0761
0.5	0.010	1.0147	1.0147	30.4412	31.4559	0.0786
0.75	0.015	1.1985	1.1985	35.9559	37.9853	0.0950
1	0.036	1.9706	1.9706	59.1176	62.3456	0.1559
2	0.038	2.0441	2.0441	61.3235	66.5221	0.1663
4	0.035	1.9338	1.9338	58.0147	65.2574	0.1631
8	0.033	1.8603	1.8603	55.8088	64.9853	0.1625
12	0.035	1.9338	1.9338	58.0147	69.0515	0.1726
24	0.029	1.7132	1.7132	51.3971	64.3676	0.1609
36	0.010	1.0147	1.0147	30.4412	45.1250	0.1128

Tiempo (horas)	ABS	Concentración (ug/mL)	Alícuota	Liberación parcial	Liberación total	FL CUR
0	0.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.25	0.004	0.7941	0.7941	23.8235	23.8235	0.0596
0.5	0.014	1.1618	1.1618	34.8529	35.6471	0.0891
0.75	0.014	1.1618	1.1618	34.8529	36.8088	0.0920
1	0.028	1.6765	1.6765	50.2941	53.4118	0.1335
2	0.025	1.5662	1.5662	46.9853	51.7794	0.1294
4	0.029	1.7132	1.7132	51.3971	57.7574	0.1444
8	0.026	1.6029	1.6029	48.0882	56.1618	0.1404
12	0.022	1.4559	1.4559	43.6765	53.3529	0.1334
24	0.024	1.5294	1.5294	45.8824	57.0147	0.1425
36	0.008	0.9412	0.9412	28.2353	40.8971	0.1022

Fracciones liberadas a los diferentes pH.

Tiempo (horas)	Fracciones liberadas a pH 1.2			Fracción liberada promedio	D. E.	Fracciones liberadas a pH 6.8			Fracción liberada promedio	D.E.	Fracciones liberadas a pH 7.4			Fracción liberada promedio	D.E.
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.25	0.0091	0.0091	0.0065	0.0082	0.0015	0.0628	0.0628	0.0679	0.0645	0.0029	0.0678	0.0706	0.0761	0.0715	0.0042
0.5	0.0119	0.0119	0.0143	0.0127	0.0014	0.0776	0.0725	0.0727	0.0743	0.0029	0.0894	0.0840	0.0786	0.0840	0.0054
0.75	0.0097	0.0148	0.0123	0.0123	0.0025	0.0852	0.0876	0.0827	0.0851	0.0024	0.1199	0.1032	0.0950	0.1060	0.0127
1	0.0151	0.0253	0.0202	0.0202	0.0051	0.1005	0.0979	0.0954	0.0980	0.0026	0.1430	0.1451	0.1559	0.1480	0.0069
2	0.0231	0.0312	0.0234	0.0259	0.0046	0.0986	0.1009	0.1135	0.1044	0.0080	0.1557	0.1579	0.1663	0.1600	0.0056
4	0.0263	0.0271	0.0266	0.0267	0.0004	0.1142	0.1090	0.0916	0.1050	0.0118	0.1688	0.1600	0.1631	0.1640	0.0044
8	0.0548	0.0380	0.0349	0.0426	0.0107	0.0897	0.1122	0.0917	0.0979	0.0125	0.1655	0.1675	0.1625	0.1652	0.0025
12	0.0440	0.0567	0.0511	0.0506	0.0064	0.1073	0.0876	0.1145	0.1031	0.0140	0.1592	0.1668	0.1726	0.1662	0.0067
24	0.1208	0.1239	0.1181	0.1209	0.0029	0.2065	0.1937	0.1760	0.1921	0.0154	0.1774	0.1742	0.1609	0.1708	0.0087
36	0.2580	0.2788	0.2703	0.2690	0.0105	0.3444	0.2324	0.2115	0.2628	0.0715	0.1353	0.1294	0.1128	0.1258	0.0117

ANEXO F. VIABILIDAD CELULAR

	CUR 5 µg/mL	CUR 20 µg/mL	CUR 50 µg/mL	CUR 100 µg/mL	NG-CUR 5 µg/mL	NG-CUR 20 µg/mL	NG-CUR 50 µg/mL	NG-CUR 100 µg/mL	NG 0.5 mg/mL	NG 1 mg/mL	C +	Etanol 5%	C-
ABS	0.4952	0.4372	0.1459	0.1507	0.7081	0.6477	0.6816	0.7646	0.7262	0.6472	0.5398	0.7236	0.6825
	0.5043	0.4431	0.1389	0.1602	0.7310	0.7160	0.6896	0.7476	0.7348	0.6290	0.5417	0.7072	0.6975
	0.5022	0.4615	0.1376	0.1586	0.7031	0.6724	0.6357	0.7605	0.7540	0.6555	0.5562	0.7112	0.6870
PROMEDIO	0.5006	0.4473	0.1408	0.1565	0.7141	0.6787	0.6690	0.7576	0.7383	0.6439	0.5459	0.7140	0.6890
D.E.	0.0048	0.0127	0.0045	0.0051	0.0149	0.0346	0.0291	0.0089	0.0142	0.0136	0.0090	0.0086	0.0077

CONCENTRACIONES	PROMEDIO	C-	VIABILIDAD (%)	D.E.	
CUR (µg/mL)	5	0.5006	0.689	72.65	0.0048
	20	0.4473	0.689	64.92	0.0127
	50	0.1408	0.689	20.44	0.0045
	100	0.1565	0.689	22.71	0.0051
NG-CUR (µg/mL)	1	0.7141	0.689	103.64	0.0149
	4	0.6787	0.689	98.51	0.0346
	10	0.6690	0.689	97.09	0.0291
	20	0.7576	0.689	109.95	0.0089
NG (mg/mL)	0.5	0.7383	0.689	107.16	0.0142
	1	0.6439	0.689	93.45	0.0136
C+ (DMSO)	5%	0.5459	0.689	79.23	0.0090
Etanol	5%	0.7140	0.689	103.63	0.0086