

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA
CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**



LIBERACIÓN DE 5-FLUOROURACILO A PARTIR DE NANOGELES SENSIBLES
A pH PARA LA POSIBLE APLICACIÓN EN EL TRATAMIENTO DE CÁNCER DE
COLON

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

MAYTE NUÑO RODRÍGUEZ

DIRECTORA DE TESIS

DRA. ARACELY SERRANO MEDINA

TIJUANA, B.C., MÉXICO

AGOSTO, 2021

HOJA DE APROBACIÓN

DEDICATORA

Dedico este proyecto de investigación a mi familia, principalmente a mis padres, Marcela y Gustavo; así como a mis tatas, María Luisa y Marcelo, que siempre me han apoyado para la continuación de mis estudios. También deseo dedicar este trabajo a mí pareja Miguel, que siempre estuvo ahí para ayudarme en todo lo que necesité durante estos dos años.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo agradecer a mis padres por brindarme todo lo necesario para llegar hasta aquí.

A mis tatas, mis segundos padres, que me apoyaron de todas las formas posibles y me exhortaron a continuar con mis estudios.

A mi novio Miguel, por todo su amor, confianza y tolerancia. Por todos sus mensajes de motivación y apoyo tanto al inicio como al final de este proyecto.

A mi directora de tesis, la Dra. Aracely, por aceptarnos a mi compañera Jocelyn y a mí y por estar al pendiente por el correcto término del proyecto en tiempo y forma y, con toda la actitud.

Al Dr. Manuel Cornejo, por el apoyo dentro de la parte experimental y por compartirnos los conocimientos necesarios para comprender bien el tema de tesis.

A la Dra. Ana Laura Martínez Martínez y al Dr. Genaro Rodríguez Uribe por ser parte de comité de tesis y por los comentarios constructivos y mejoras a mi escrito y a mi experimentación.

A la Dra Kenia Palomino, por apoyarme con todo el experimento de cultivo celular.

A mi amiga y compañera, Jocelyn, por su ayuda para la realización de los experimentos y por su amistad, que fue clave fundamental para mí.

Al Dr. Horacio Almanza, por invitarme y animarme a entrar a la maestría y por ser un excelente maestro.

A mis compañeros de maestría por su apoyo moral.

A CONACYT por la beca otorgada durante los estudios de maestría.

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE

HOJA DE APROBACIÓN	I
DEDICATORA	II
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE	V
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	IX
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE TABLAS	XV
VITA Y ÁREA DE ESTUDIO	XVI
RESUMEN	XVII
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN	- 1 -
I.1. Antecedentes	4
I.3. Justificación	8
I.4. Objetivo general	9
I.5. Objetivos específicos	10
I.6. Hipótesis.....	10
CAPITULO II. TEORÍA GENERAL	11
II.1. Cáncer en la actualidad.....	12
II.2. Generalidades del Cáncer.....	13

II.3. Cáncer de colon	14
II.3.1. Epidemiología a nivel mundial.....	14
II.3.2. Epidemiología en México	15
II.3.3. Cáncer de colon	16
II.3.4. Estadios del cáncer de colon.....	19
II.3.5. Tratamientos para el cáncer de colon	22
II.3.6 Administración de fármacos específica en el colon	25
II.3.6.1 Factores que influyen en la entrega de fármacos específicos para el colon	27
II.3.7. 5-FU	29
II.3.7.1. Características físico-químicas y estabilidad.....	29
II.3.7.2. Mecanismo de acción.....	30
II.3.7.3. Características farmacológicas	33
II.3.7.4. Limitantes del tratamiento convencional con 5-FU	35
II.3.7.5. Nanoformulaciones con 5-FU para cáncer de colon.....	37
II.4. Nanomedicina aplicada al cáncer.....	39
II.4.1. Nanosistemas para liberación de fármacos.....	42
II.4.1.1 Liposomas.	42
II.4.1.2 Dendrímeros.....	43
II.4.1.3 Micelas poliméricas.	44

II.4.1.6 Nanogeles	45
II.5. Nanogeles sensibles a pH.....	48
II.6. Síntesis de nanogeles	51
II.6.1. Polimerización en emulsión.....	51
CAPITULO III. PARTE EXPERIMENTAL.....	55
III.1. Materiales.....	55
III.1.1. Reactivos.....	55
III.1.2. Insumos de laboratorio	55
III.1.3. Equipos	55
III.1.4. Gases	56
III.2. Métodos.....	56
III.2.1. Purificación de etilenglicol dimetacrilato	56
III.2.2. Síntesis de nanogeles	56
III.2.3. Caracterización de los nanogeles	58
III.2.3.1. Diámetro hidrodinámico.....	58
III.2.3.2. Potencial zeta	58
III.2.3.3. Imágenes STEM.....	58
III.2.3.4. Estudio FT-IR	59
III.2.4. Liofilización y reconstitución de los nanogeles.	59
III.2.4.1. Liofilización.....	59

III.2.4.2. Reconstitución.....	59
III.2.5. Cargado de los nanogeles con 5-FU.....	59
III.2.7. Cinética de liberación <i>in vitro</i> de 5-FU.....	60
III.2.8. Ensayo de viabilidad de los nanogeles cargados con 5-FU.....	61
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
IV.1. Síntesis de nanogeles de CAM10 1% entrecruzados con EGDMA 5%	65
IV.2. Caracterización de los nanogeles	66
IV.2.1. Diámetro hidrodinámico	66
IV.2.2. Potencial zeta	67
IV.2.3. Imágenes STEM	69
IV.2.4. Análisis FT-IR	71
IV.3. Liofilización y reconstitución de los nanogeles.....	72
IV.4. Cargado de los nanogeles con 5-FU	75
IV.5. Estudio de liberación <i>in vitro</i> de 5-FU	76
IV.6. Estudio de viabilidad en la línea celular HeLa mediante el método de MTT .	79
CAPITULO V. CONCLUSIONES	84
CAPITULO VI. REFERENCIAS	- 86 -
ANEXOS	- 109 -

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
%p/v	Porcentaje peso/volumen
μl	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrómetro
Kg	Kilogramo
mg	Miligramo
ml	Mililitro
nm	Nanómetro
2MBA	Ácido 2-metacrilóiloxibenzoico
5'-DFUR	5'-desoxi-5-fluorouridina
5-FU	5-fluorouracilo
ABC	Transportadores de casete de unión a ATP
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
APS	Persulfato de amonio
CaCO ₃	Carbonato de calcio
CAM10	Ácido 11-metacrilóilamido undecanóico
CDA	citidina desaminasa
CES	carboxilesterasa
CMC	Concentración micelar crítica
DBS	Dodecilbenceno sulfonato de sodio
DDS	Sistemas de administración de fármacos
DE	Desviación estándar

Dh	Diámetro hidrodinámico
DHFU	Dihidrofluorouracilo
DLS	Dispersión de luz dinámica
DMAEMA	Metacrilato de dimetilaminoetilo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPD	Dihidropirimidina deshidrogenasa
DVA	9-divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro (5.5)-undecano
EGDMA	Etilenglicol dimetacrilato
EPR	Efecto de permeabilidad y retención
FBAL	α -fluoro- β -alanina
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos
FdUDP	Fluorodesoxiuridina difosfato
FdUMP	Fluorodesoxiuridina monofosfato
FdUTP	Fluorodesoxiuridina trifosfato
FT-IR	infrarrojo por transformada de Fourier
FUDP	Fluorouridina difosfato
FUMP	Fluorouridina monofosfato
FUPA	Ácido α -fluoro- β -ureido-propiónico
FUR	Fluorouridina
FUTP	Trifosfato de fluorouridina
IARC	Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
IV	Intravenosa
MAEHA	Ácido metacrílico y acrilato de 2-etilhexilo

MPS	Sistema fagocítico mononuclear
MTT	Bromuro de 3- (4, 5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio
NGs	Nanogeles
NIPAAm	N-isopropilacrilamida
NPs	Nanopartículas
OPRT	Orotato fosforribosil transferasa
O/W	Aceite en agua
O/W/O	Aceite en agua en aceite
PCAM5	Poli-(ácido 6-metacriloilamido hexanóico)
PCAM7	Poli-(ácido 8-metacriloilamido octanóico)
PCAM10	Poli-(ácido 11-metacriloilamido undecanóico)
PDI	Índice de polidispersidad
PEG	Polietilenglicol
PEGMA	Poli(etilenglicol) metacrilato de éter metilo
pH	Potencial de hidrógeno
PRPP	Fosforribosil pirofosfato
RR	Ribonucleótido reductasa
STEM	Microscopía electrónica de transmisión de barrido
TGI	Tracto gastrointestinal
TK	Timidina cinasa
TP	Timidina fosforilasa
TS	Timidilato sintasa
UK	Uridina cinasa
UP	uridina fosforilasa
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

W/O	Agua en aceite
W/O/W	Agua en aceite en agua

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Segmentos que conforman al colon.

Figura 2. Tejidos que conforman al colon.

Figura 3. Pólipos en colon.

Figura 4. Estadios del cáncer de colon.

Figura 5. Estructura química del uracilo y del 5-fluorouracilo.

Figura 6. Mecanismo de acción del 5-fluorouracilo.

Figura 7. Efecto de permeabilidad y retención mejoradas (EPR).

Figura 8. Clasificación de los nanogeles.

Figura 9. Sistema de liberación por hinchamiento activado por sensibilidad al pH.

Figura 10. Estructura del polímero de ácido 11-metacriloilamido undecanóico.

Figura 11. Tipos de emulsiones: aceite en agua (O/W), agua en aceite (W/O), agua en aceite en agua (W/O/W), y aceite en agua en aceite (O/W/O).

Figura 12. Síntesis de nanogeles por polimerización en emulsión.

Figura 13. Nanogeles sintetizados.

Figura 14. Tamaño promedio de los nanogeles a los distintos valores de pH.

Figura 15. Tamaño promedio de los nanogeles sintetizados a los valores de pH de 6.0, 7.0, 8.0 y 9.0.

Figura 16. Potencial zeta a diferentes pH.

Figura 17. Análisis FESEM.

Figura 18. Tamaño promedio de las nanopartículas en agua.

Figura 18. Espectro FT-IR del ácido 11-metacriloilamido undecanóico, 5-fluorouracilo y nanopartículas cargadas con 5-fluorouracilo.

Figura 19. Muestra del liofilizado de los nanogeles sintetizados.

Figura 20. Tamaño promedio de los nanogeles a distintos pH luego del reconstituido.

Figura 21. Tamaño promedio de los nanogeles a los pH 6.0, 7.0, 8.0 y 9.0, luego del reconstituido.

Figura 22. Fracción liberada promedio por triplicado de los nanogeles cargados con 5-FU y de 5-FU libre a los valores de pH 1.2, 6.8 y 7.4.

Figura 23. Fracción liberada promedio del 5-FU libre a los valores de pH 1.2, 6.8 y 7.4.

Figura 24. Evaluación de viabilidad celular del 5-FU libre mediante el ensayo MTT en la línea celular HeLa.

Figura 25. Evaluación de viabilidad celular de los nanogeles cargados mediante el ensayo MTT en la línea celular HeLa.

Figura 26. Evaluación de la citotoxicidad de los nanogeles libres mediante el ensayo MTT en la línea celular HeLa.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Estadios del cáncer de colon.

Tabla 2. Reactivos utilizados para la síntesis de los nanogeles y sus cantidades.

Tabla 3. Capacidad de carga del fármaco (CCF) y eficacia de carga del fármaco (ECF).

VITA Y ÁREA DE ESTUDIO

Mayte Nuño Rodríguez, nació en Tijuana, B.C, México, el 29 de septiembre de 1995. Hija del Sr. Gustavo Nuño León y la Sra. Marcela Rodríguez Barboza.

Terminó sus estudios de nivel medio superior en la Preparatoria Federal Lázaro Cárdenas, recibiendo su título de técnico en trabajo social.

En 2014, entró a la carrera de Químico Farmacobiólogo en la Facultad de Ciencias Químicas e Ingenierías en la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), campus Tijuana. Durante sus estudios se desempeñó en el área de biología molecular y microbiología al trabajar con muestras de esputo para la detección de tuberculosis mediante la prueba de PCR y electroforesis; participó en el 5to encuentro de Jóvenes Investigadores de BC que se efectuó en el años 2017 con la presentación oral del trabajo titulado como “Estandarización de un método para la detección de micobacterias usando el gen IS6110 en pacientes del Hospital General de Tijuana”; también, participó en el viaje de prácticas a San Quintín del 2018-1 en el área de análisis clínicos. Egresó de la licenciatura en 2018.

Áreas de estudio: farmacología y nanomedicina.

Contacto: mnuno@uabc.edu.mx o maytenr29@gmail.com

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue caracterizar los nanogeles sensibles al pH, así como evaluar la liberación de 5-fluorouracilo (5-FU) en condiciones *in vitro* simulando las diferentes condiciones de pH del tracto gastrointestinal. Para esto, primero se sintetizaron los nanogeles mediante el método de polimerización en emulsión utilizando el monómero ácido 11-metacriloilamido undecanóico (CAM10) y el reticulante dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA). Posteriormente, se purificaron y caracterizaron mediante dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial zeta a diferentes valores de pH para determinar su estabilidad. Además, se llevó a cabo un estudio de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier. El 5-FU fue encapsulado mediante una técnica de nanoprecipitación y la cinética de liberación se realizó a los pH de 1.2, 6.8 y 7.4. Finalmente, se realizó un estudio de citotoxicidad mediante el método de MTT en una línea celular de cáncer de cérvix (HeLa). Dentro de los resultados se encontró que los nanogeles presentaban un tamaño promedio de 791.35 ± 560.3 nm, una carga superficial de -19.1 ± 5.73 a pH básicos; un cargado de 14.35% y una eficiencia de encapsulación de 37.60%; los nanogeles mostraron un patrón de liberación sensible a pH con liberación sostenida pero lenta y; una citotoxicidad muy reducida, con porcentajes de viabilidad superiores al 90%. Nuestro estudio demuestra que los nanogeles de CAM10-5-FU son capaces de liberar 5-FU con mayor proporción en un ambiente básico, similar al encontrado en el colon, sin embargo, a pesar de que los nanogeles libres resultaron ser citocompatibles, los nanogeles cargados no fueron tóxicos a las concentraciones utilizadas, por lo que se requieren, para posteriores estudios,

concentraciones más elevadas, por arriba de los 650 $\mu\text{g/ml}$, de acuerdo a la literatura.

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

El cáncer de colon es una causa principal de morbilidad y mortalidad en todo el mundo (Handali et al., 2020). Dentro de sus modalidades de tratamiento, la cirugía se considera la más importante y la única opción curativa para un cáncer localizado pero, para estados avanzados, la administración sistémica de quimioterapia es el enfoque terapéutico más común (Vodenkova et al., 2020; Yuan et al., 2018). Por otro lado, la molécula más importante que se utiliza actualmente para el cáncer de colon como tratamiento quimioterapéutico es el 5-FU, un análogo sintético de pirimidina fluorada administrado por vía intravenosa (IV) debido a su baja biodisponibilidad oral (Blondy et al., 2020). Sin embargo, luego de su administración IV, sus aplicaciones clínicas son limitadas debido a diversas causas, entre ellas, tan solo del 10-15% de las personas con cáncer de colon avanzado responden positivamente al tratamiento; presenta un tiempo de vida media corto (15-20 min) debido al rápido metabolismo; resistencia de las células cancerosas al tratamiento; y; principalmente, efectos secundarios severos, como mielosupresión, dermatitis, cardiotoxicidad y trastornos gastrointestinales, los cuales, se asocian con su alta distribución *in vivo* inespecífica, por lo que se ha informado que tan solo entre el 1-3% de la dosis original de 5-FU contribuye a la citotoxicidad de las células tumorales (Gao et al., 2017; Hosseinifar et al., 2018; Pretel et al., 2017; Tawfik et al., 2017; Yuan et al., 2018). El principal problema, entonces, es el fracaso del tratamiento por la incapacidad del fármaco para actuar particularmente en el sitio objetivo, lo que conduce a una falta de especificidad y a los efectos secundarios graves (Tummala et al., 2015). Por tanto, existe una gran necesidad de encontrar un sistema de administración de medicamentos quimioterapéuticos que sea capaz de liberar al fármaco de forma local en el colon, con el fin de obtener terapias más dirigidas,

eficaces y seguras, con una disminución de los efectos secundarios (Gao et al., 2017; Handali et al., 2018a; Lee et al., 2020). Para esto, se han explorado nuevas estrategias terapéuticas a partir de nanoportadores que mejoren la especificidad de los fármacos hacia las células tumorales al tiempo que se asegura la mínima actividad en los tejidos sanos (Pretel et al, 2017). Además, el desarrollo de sistemas de administración de fármacos (DDS) específicos para colon implica el uso de componentes que interactúan con uno o más aspectos de la fisiología gastrointestinal, un ejemplo es la diferencia en los valores de pH (Amidon et al., 2015). Recientemente, se han investigado los nanogeles (NGs) como portadores de fármacos debido a que podrían cumplir con los requisitos de un buen sistema de administración, gracias a sus propiedades intrínsecas (Cuggino et al., 2016) puesto que no solo protegen al fármaco cargado de su degradación y eliminación, sino que también participan activamente en el proceso de entrega debido a sus características como suavidad, hinchazón y comportamiento de respuesta a estímulos, para lograr una liberación controlada y activada en el sitio objetivo (Soni et al., 2016). Los NGs sensibles a pH son redes de polímeros reticulados fabricados mediante la incorporación de polímeros sensibles al pH o enlaces sensibles en su estructura (Manchun et al., 2014). Por tanto, se ha establecido que la administración de 5-FU directamente en el colon mediante el uso de NGs sensibles a pH podría ser un enfoque prometedor para reducir los efectos secundarios sistémicos y proporcionar una difusión tumoral eficaz (SUN et al., 2015; L. L. Wang et al., 2016). Ahora bien, se están investigando varios polímeros sensibles a pH como portadores de fármacos para la administración específica en el colon, uno de ellos es el CAM10 del cual no se ha encontrado información sobre su uso en NGs como sistema de

administración de 5-FU dirigida a colon, por lo que ésta será la primera investigación realizada con tal polímero.

Este trabajo tiene como objetivo desarrollar un sistema de liberación oral dependiente del pH a base de NGs de CAM10 que encapsula 5-FU el cual, permitirá evaluar la liberación del fármaco anticancerígeno a partir de condiciones *in vitro* que simulan el pH del colon. Esto podría reducir la toxicidad sistémica que es el principal factor limitante en el tratamiento del cáncer de colon y permitiría un incremento de la dosis local comparado con las estrategias de tratamiento existentes.

I.1. Antecedentes

Uno de los nanoportadores más utilizados y con buenos resultados como sistemas de

administración de fármacos en la terapia del cáncer han sido las nanopartículas (NPs) poliméricas debido a sus propiedades únicas: (1) pueden transportar y administrar de manera más efectiva medicamentos que son inestables en fluidos biológicos y que no pueden difundir fácilmente a través de la barrera mucosa; (2) pueden transitar directamente y adherirse a la mucosa, que es el paso previo al proceso de translocación de partículas y (3) las NPs cargadas con fármacos pueden desempeñar un papel a nivel tisular o celular (P. Li et al., 2015). En un estudio se sintetizaron NPs de quitosano cargadas con 5-FU y recubiertas con diferentes proporciones del polímero Eudragit S-100, el cual, se disuelve a pH colónico. Como resultados en general para la relación fármaco: polímero 1:3, se obtuvieron nanopartículas con formas esféricas, con un rango de tamaño de 139

nm, una superficie lisa, valores de índice de polidispersidad (PDI) < 0.2 y un potencial zeta negativo. De igual manera, mostraron una eficiencia de encapsulación del 69%, una carga de fármaco de 28% y una liberación del 82% a las 24 h luego de alcanzar un pH neutro (7.0), esto último atribuido a los grupos carboxilo presentes en Eudragit S-100 que se ionizan en medios neutros a alcalinos; mientras que las NPs sin recubrimiento liberaron el 70% del fármaco en pH ácido, antes de llegar al líquido colónico debido a la degradación del quitosano. Por lo tanto, estas NPs se consideraron como un excelente nanoportador de fármacos para liberación controlada y específica en colón (Tummala et al., 2015). Entonces, como se vio en el artículo anterior, se han desarrollado estrategias para dirigir la liberación del 5-FU directo en el colon, entre ellos, se encuentra la sensibilidad al pH, ya que estos valores varían a lo largo del tracto gastrointestinal (TGI) (Li et al., 2015). Por otro lado, se han investigado los NGs como portadores de fármacos sensibles a pH debido a varias ventajas características, como su facilidad de síntesis, tamaño controlado y funcionalización (Cuggino et al., 2016). En un estudio, se sintetizaron nanogeles copoliméricos de ácido metacrílico y acrilato de 2-etilhexilo (MAEHA) mediante una técnica de copolimerización en microemulsión que fueron cargados con el fármaco 5-FU y, por medio de los resultados obtenidos, se concluyó que este copolímero podría ser un buen sistema de administración de fármacos para el colon, ya que presentó una eficiencia de encapsulación del 80%; un diámetro medio de 150 nm y un PDI de 0.100; mayor citotoxicidad en una línea celular de cáncer de colon (HCT-116) en comparación con el 5-FU libre y, mostró un comportamiento de liberación de fármaco sensible a pH al presentar una cinética de liberación *in vitro* sostenida a pH básico (7.0 y 7.8), similar a la que se encuentra

en la región colónica, y solo poca concentración de fármaco fue liberado en pH ácido (2.0), lo que indicó una buena estabilidad de los nanogeles para una liberación controlada (Ashwanikumar et al., 2012).

En otro artículo, sintetizaron nano/microgeles sensibles a la temperatura y al pH utilizando N-isopropilacrilamida (NIPAAm) como material sensible a la temperatura y ácido 2-metacrilóiloxibenzoico (2MBA) como molécula anfifílica sensible al pH. Estos dos monómeros se incorporaron dentro de NPs con una capa exterior formada por poli(etilenglicol) metacrilato de éter metilo (PEGMA), que actúa como estabilizador durante la polimerización y, fueron entrecruzados con etilenglicol dimetacrilato (EGDMA) o 9-divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro (5.5)-undecano (DVA). Se utilizó una concentración de los monómeros al 1%p/v ya que presentaba una dispersión blanca, y a 2%p/v resultó en la formación de un precipitado y, un iniciador al 2%mol. Primero, se sintetizaron nano/microgeles con diferentes proporciones de NIPAAm: PEGMA (70:30%p) y obtuvieron distribuciones de tamaño monomodales y un PDI de 0.14 a 0.18. También, evaluaron el efecto de la concentración con cada entrecruzante en el tamaño y la distribución de estos nano/microgeles; con EGDMA se encontró que a medida que incrementaba su concentración, también incrementaba el diámetro hidrodinámico (D_h) debido a su carácter hidrofílico, se hincha y permite una mayor entrada de monómeros durante su polimerización, mientras que con DVA, se observó lo contrario ya que no se hincha y no crecían tanto las partículas. A concentraciones superiores de 5%mol (10%mol) de EGDMA y DVA, se formaba un precipitado que indicaba la presencia de macrogeles, mientras que a concentraciones menores (1%mol) no eran estables al proceso de

recuperación, por lo que se optó por utilizar la concentración de 5%mol para ambos entrecruzantes. Luego de la incorporación de monómero 2MBA a los nano/microgeles de NIPAAm, se midió el potencial z a diferentes valores de pH y se observó que este valor disminuía a medida que aumentaba el pH, sobre todo al utilizar DVA por la mayor densidad de carga, ya que los nanogeles eran más pequeños y presentaban una mayor área externa. También se evaluó el efecto de la temperatura y el tamaño mediante DLS a diferentes pH y se encontró que el tamaño de los nano/microgeles aumentaba a medida que incrementaba el pH. Se realizaron estudios de estabilidad en donde se encontró que los nano/microgeles que contenían 2MBA reticulados con 5%mol de EGDMA o DVA producen distribuciones monomodales después de la reconstitución lo que indicó que son estables luego del proceso de recuperación. Algo importante que se evaluó también fue el uso de DVA, puesto que se trata de una molécula lábil a ácido, por lo que nano/microgeles reticulados con ese entrecruzante se almacenaron por diferentes periodos de tiempo a pH de 5.5, encontrando posteriormente distribuciones de tamaño muy variadas, por lo que podría ser utilizado para administración de fármacos antitumorales debido a que el pH extracelular de los tumores sólidos es significativamente más ácido que el de los tejidos normales. Se concluyó entonces que los diferentes tamaños obtenidos podrían ser utilizados para distintas aplicaciones de administración de fármacos; como el uso de NGs reticulados con EGDMA para administrar fármacos en hígado o bazo y el uso de nanogeles reticulados con DVA para administración al corazón, riñones y estómago (Serrano-Medina et al., 2012).

Finalmente, en un artículo se formaron complejos con fármacos catiónicos (labetalol, propranolol y diltiazem) y polielectrolitos con diferentes longitudes de cadena lateral, poli-(ácido 6-metacriloilamido hexanóico) (PCAM5), poli-(ácido 8-metacriloilamido octanóico) (PCAM7) y poli-(ácido 11-metacriloilamido undecanóico) (PCAM10) con los que se realizaron cinéticas de liberación de los fármacos a diferentes pHs (1.2, 6.8 y 7.4) y, en general, se obtuvo que conforme se incrementó el pH, se incrementaba la liberación; sin embargo, PCAM10 presentó una menor cinética de liberación debido a su mayor hidrofobicidad, aunque, la liberación de diltiazem fue superior al 70% en pH 1.2 debido a la alta solubilidad del medicamento. Se concluyó que estos polímeros son polielectrolitos hidrofóbicos que forman sales iónicas insolubles en agua cuando se conjugan con fármacos catiónicos y que presentan una cinética de liberación dependiente del tamaño de su cadena lateral, del pH del medio y de las propiedades fisicoquímicas del fármaco que se quiera utilizar, por lo que podrían ser buenos candidatos para una liberación sostenida en el intestino (Magaña et al., 2017). Cabe mencionar, que en este artículo no se sintetizaron NGs; sin embargo, aporta información importante sobre el monómero CAM10 utilizado en esta investigación.

I.3. Justificación

Como ya se ha mencionado anteriormente, es importante encontrar nuevas formas de administrar el fármaco 5-FU para lograr una liberación más localizada para el tratamiento del cáncer de colon, una de las alternativas planteadas puede ser a través de la síntesis de nanogeles; en este trabajo proponemos la nanoformulación de NGs sintetizados con el monómero CAM10 para evaluar la

liberación de 5-FU a diferentes valores de pH y su citotoxicidad en una línea celular de cáncer. Esta investigación se realizará con el fin de conocer si estos nanogeles, en específico, son capaces de liberar al 5-FU en un ambiente con pH similar al que se encuentra en el colon. La importancia de esta investigación radica en que el 5-FU, que es el tratamiento quimioterapéutico convencional del cáncer de colon, provoca muchos efectos tóxicos al distribuirse por todo el organismo luego de una administración intravenosa, además de otras limitantes. Además de que la administración por vía oral no es utilizada por la biodisponibilidad errática. Por tal razón, utilizar sistemas de administración de fármacos, tal como los NGs sensibles a estímulos, podrían evitar estas limitantes al liberar su contenido en el sitio objetivo, mejorando la eficacia terapéutica mejorada y disminuyendo efectos secundarios. Con ayuda de esta investigación se logrará recabar datos en beneficio del funcionamiento de este tipo de nanoformulaciones y su posterior uso o aplicación *in vivo* para que, en un futuro, pueda ser utilizada como un nuevo sistema de administración de fármacos en el que se disminuyan los efectos secundarios y mejore la eficacia del tratamiento anticancerígeno con 5-FU en los pacientes con cáncer de colon, al tratarse de una terapia más dirigida.

I.4. Objetivo general

Evaluar la liberación de 5-FU a diferentes valores de pH *in vitro* y en una línea celular de cáncer a partir de nanogeles de CAM10 1%/EGDMA 5%.

I.5. Objetivos específicos

1. Sintetizar nanogeles de ácido 11-matacriloilamido undecanóico, entrecruzados con etilenglicol dimetacrilato mediante polimerización en emulsión con dodecilbensulfonato de sodio.
2. Caracterizar los nanogeles sintetizados en base a su tamaño, carga superficial, morfología superficial y estructura, mediante dispersión de luz dinámica, potencial zeta, microscopia electrónica de transmisión de barrido (STEM) y espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), respectivamente.
3. Evaluar la respuesta de los nanogeles sintetizados al pH, así como su estabilidad al proceso de liofilización y reconstitución.
4. Realizar el cargado de 5-FU a los nanogeles CAM10 1%/EGDMA 5% para cuantificar su eficiencia de carga.
5. Determinar la cinética de liberación de 5-FU a diferentes valores de pH mediante un modelo de simulación gastrointestinal *in vitro*.
6. Medir la citotoxicidad de la liberación de 5-FU de los nanogeles por el método de MTT y compararla con 5-FU libre en una línea celular de cáncer.

I.6. Hipótesis

Los nanogeles responderán a variaciones de pH del medio liberando 5-FU en mayor medida a pH alcalino en un modelo de simulación de pH gastrointestinal *in vitro* y, se observará mayor citotoxicidad en cultivos celulares de cáncer comparada con la producida por el 5-FU libre.

CAPITULO II. TEORÍA GENERAL

II.1. Cáncer en la actualidad

En la actualidad, el cáncer se encuentra posicionado como la segunda causa de muerte en todo el mundo; tan solo en el año 2018 ocurrieron cerca de 9.6 millones de muertes, de las cuales, aproximadamente el 70% se suelen registrar en países con ingresos medios y bajos (WHO, 2018) y; 18.1 millones fueron el número de casos nuevos (National Cancer Institute, 2020). Se espera que para el año 2040, tanto el número de casos nuevos como el número de muertes, incrementen hasta en un 60-70% (Arem & Lofffield, 2018). La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) indica que el incremento en la incidencia se debe al aumento de la población en edad avanzada y a la disminución de la mortalidad a temprana edad por enfermedades infecciosas, o de otro tipo (Siegel et al., 2018). Cabe mencionar que las muertes por cáncer se deben principalmente a los diagnósticos tardíos, ya que, a diferencia de los países con ingresos altos en donde cerca del 90% de los pacientes oncológicos reciben un tratamiento, en los países con ingresos bajos tan solo alrededor del 30% lo reciben; estos tratamientos pueden ir desde cirugía, radioterapia o quimioterapia, dependiendo que tan avanzado se encuentre el tumor (WHO, 2018). Los principales cánceres que presentaron una mayor tasa de incidencia en todo el mundo en el año 2018 fueron mama (46.3/100,000), próstata (29.3/100,000), pulmón (22.5/100,000), colorrectal (19.7/100,000), cérvix (13.1/100,000) y estómago (11.1/100,000). Por otro lado, los cánceres con mayores tasas de mortalidad fueron pulmón (18.6/100,000), mama (13.0/100,000), colorrectal (8.9/100,000), hígado (8.5/100,000), estómago (8.2/100,000) y próstata (7.6/100,000) (GLOBOCAN, 2018).

II.2. Generalidades del Cáncer

El cáncer, es un término general utilizado para referirse a un conjunto de enfermedades que se encuentran relacionadas entre sí, es decir, presentan ciertas similitudes, sin embargo; su epidemiología, las causas, los diagnósticos y los tratamientos variarán de una persona a otra, así como su forma de crecimiento y propagación. Estas enfermedades pueden aparecer en cualquier zona del cuerpo, y, presentan una característica en común que le dará inicio a la enfermedad: la división descontrolada de una célula (National Cancer Institute, 2015). Es aquí donde se habla de un término conocido como carcinogénesis el cual, se refiere al proceso en el que las células se transforman de normales a células malignas. El cáncer es de origen clonal, es decir, comienza cuando una sola célula sana escapa del control de crecimiento, proliferación y muerte, llevándola a una división descontrolada y anormal que dará lugar a miles de células también alteradas y, con el paso del tiempo, a la formación de una lesión precancerosa que, posteriormente, llevará a un tumor. Todo esto se debe a que las células cancerosas, a diferencia de las células normales, son anaplásicas (menos diferenciadas), lo que significa que son muy diferentes de las células de las que proceden y pueden llegar a una falta de especialización o de función celular, por lo que siguen dividiéndose sin detenerse, se vuelven insensibles a señales anti-proliferativas por lo que continúan creciendo y proliferan con rapidez. Además, no responden a señales que indican que deben morir cuando envejecen o se dañan después de un número de divisiones, proceso al cual se le conoce como apoptosis. De igual manera, muestran una pérdida de inhibición por contacto y desarrollan movilidad y desplazamiento, cosa que les permite invadir tejidos locales y diseminarse hacia otras partes del

cuerpo (metástasis). Esto último, representa el 85% de la mortalidad causada por esta enfermedad (Herrera & Granados, 2013). Las células cancerosas también tienen la capacidad de influir en las células normales que las rodean, a esta zona se le conoce como “microambiente”. Por ejemplo, pueden inducir la angiogénesis local, un proceso en el que se forman nuevos vasos sanguíneos que se encargaran de proveer a los tumores los nutrimentos y el oxígeno necesario para que crezcan (National Cancer Institute, 2015).

II.3. Cáncer de colon

II.3.1. Epidemiología a nivel mundial

El cáncer de colon representa la tercera causa de mortalidad por cáncer tan solo después del cáncer de pulmón y del cáncer de mama (Rawla et al., 2019) y, el cuarto lugar como el más diagnosticado en todo el mundo, con una incidencia creciente entre los adultos menores de 50 años aunque, más del 90% de los diagnosticados presentan una edad mayor a los 50 años (Ji et al., 2018; Rawla et al., 2019). Tan solo en el año 2018 se registraron cerca de 1.8 millones de casos nuevos y cerca de 880.000 muertes, lo que resultó en aproximadamente 1 de cada 6 muertes (Wong et al., 2019); se prevé que la incidencia del cáncer de colon en todo el mundo aumente a 2.5 millones de casos nuevos en 2035 (Dekker et al., 2019; Macrae et al., 2020). Los países desarrollados tienen la mayor incidencia, mientras que los países de América del Sur y China tienen una incidencia más baja (Cappell, 2008). Esta variación se atribuye principalmente al estilo de vida occidentalizado que siguen estos países y que abarca la obesidad, el sedentarismo, una dieta alta en calorías, rica en carnes rojas, grasas y con poca ingesta de fibra,

lo que se ha relacionado con un mayor riesgo de desarrollo de cáncer de colon; así como también el tabaquismo (al propagar los carcinógenos desde la circulación y el tracto gastrointestinal hasta la mucosa colorrectal) y el consumo de alcohol (al inhibir la síntesis de folatos) son considerados factores de riesgo que incrementan la carcinogénesis en el colon (Marley & Nan, 2016). Además, el sexo, la edad, historia previa de cáncer de colon, colitis ulcerativa, factores genéticos, la dieta y obesidad son algunos de otros factores de riesgo (Y. S.R. Krishnaiah et al., 2002).

II.3.2. Epidemiología en México

En México, el cáncer ocupa la segunda causa de muerte, luego de las enfermedades cardiovasculares (Mohar-Betancourt et al., 2017). Por otro lado, el cáncer de colon se encuentra posicionado como el tercer cáncer más frecuente en México con 14.900 casos nuevos registrados en el 2018 y ocupa el sexto lugar por mortalidad (GLOBOCAN, 2020). A pesar de la alta prevalencia de síndrome metabólico y obesidad, las tasas de incidencia de cáncer de colon se encuentran entre las más bajas del mundo probablemente debido al hecho de que la dieta mexicana se consideraba típicamente más rica en fibra, frutas y verduras, sin embargo, datos recientes han mostrado una tendencia al alza en la incidencia de cáncer de colon tanto en hombres como en mujeres debido a la occidentalización de las dietas (Robles et al., 2019). Sobre todo en los estados del norte, ya que Baja California, Baja California Sur y Sonora, tuvieron la mayor incidencia y mortalidad por cáncer de colon entre los años 2000 y 2012 (Sánchez-Barriga, 2017), que, a pesar de los ingresos más altos, tienen una dieta más pobre (baja en fibra, mayor consumo de carne y grasas nocivas) y un estilo de vida que pone en riesgo de

desarrollar cáncer de colon. Por el contrario, la población de los estados del sur tiene ingresos más bajos, lo que afecta el consumo de carne y fibra. En los últimos 25 años se ha demostrado un aumento en la frecuencia de cáncer de colon; más del 80% de los pacientes son diagnosticados en estadios avanzados de la enfermedad (García-Osogobio et al., 2015) y, desafortunadamente, los tratamientos no son uniformes, por lo que los pacientes pueden recibir un tratamiento de primera línea o muy deficiente; además, pueden retardarse hasta 6 meses debido a la burocracia y la sobrecarga de trabajo por las instituciones; el tiempo de espera para una cirugía es de 5 semanas, para radioterapia 2 meses y quimioterapia 2 semanas, esto hablando del sector público, ya que en el sector privado se puede ser diagnosticado y tratado en tan solo una semana. Asimismo, en los centros oncológicos y hospitales de atención terciaria se cuenta con cirujanos capacitados y procedimientos de radioterapia estándar; sin embargo, el acceso a la quimioterapia y a los nuevos agentes, puede ser limitado (Verastegui & Mohar, 2009).

II.3.3. Cáncer de colon

El colon, también llamado como intestino grueso, es el último tramo del TGI. Presenta una longitud de aproximadamente 1.5 metros, tiene 5 a 8 centímetros de diámetro, su luz está revestida de moco y, se extiende desde el ciego hasta el ano (Amidon et al., 2015). El colon se subdivide en 3 segmentos bien diferenciados: colon ascendente, transversal y descendente (figura 1), cada uno con una fisiología única y diferente (Arévalo-Pérez et al., 2020). La primera porción del colon se sitúa en la parte inferior derecha del abdomen, donde desemboca el intestino delgado y

se llama ciego. Desde ahí, el colon asciende hasta llegar a la zona del hígado (colon ascendente) y atraviesa el abdomen (colon transverso). El colon se dirige posteriormente abajo (colon descendente), hasta llegar a una zona denominada sigma, que desemboca en el recto y, finalmente, en el ano, que se abre al exterior por el esfínter anal, a través del cual se eliminan las heces. El colon ascendente y el transverso (colon derecho, proximal) se encargan de absorber agua y electrolitos (Na^+) mientras que se secretan k^+ y HCO_3^- , por otro lado, el colon descendente y el recto (colon izquierdo, distal) almacenan la materia fecal hasta su expulsión por el ano (Eguino Villegas, et al., 2002).



Figura 1. Segmentos que conforman al colon.

Tanto el colon como el recto están constituidos por varias capas de tejido, la más interna es la mucosa, la cual, presenta tres capas: epitelio, lamina propia y mucosa muscular, después, la mucosa es rodeada por la submucosa (capa de tejido conectivo). Más externamente se sitúa la capa muscular, (su contracción logra el avance del contenido del tubo digestivo) que a su vez está recubierta por la serosa

(capa más externa del colon) (figura 2) (Anita et al., 2019). En la mucosa hay células epiteliales especializadas llamadas células caliciformes que recubren la capa conectiva de la lámina propia del colon y se encargan de producir y secretar moco el cual, se compone de glicoproteína de mucina que le da su estructura y adhesividad, así como agua, sales inorgánicas y lípidos. Es en estas células en donde se produce con mayor frecuencia los tumores malignos (Arévalo-Pérez et al., 2020; Eguino Villegas, et al., 2002).



Figura 2. Tejidos que conforman al colon.

El primer paso en la carcinogénesis es el desarrollo de tipos específicos de pólipos en la mucosa colónica (figura 3); los dos tipos más comunes son hiperplásico y adenomatoso (Cappell, 2008). El cáncer colorrectal casi siempre crece como una masa polipoide (en el ciego y en el colon ascendente) o como lesiones anulares que causan obstrucción (colon distal) (Maspes et al., 2021). Un pólipo puede existir durante años en la mucosa del colon o del recto y, con el paso

del tiempo y debido a la proliferación de células, crecer, volverse más vascularizado y, evolucionar a un tumor maligno del cual las células cancerosas se diseminan a sitios metastásicos a través de los sistemas linfático y circulatorio (Eguino Villegas, et al., 2002). Cabe mencionar que los pólipos adenomatosos son responsables de hasta el 96% de los cánceres colorrectales, aunque, no todos los pólipos evolucionan a cáncer invasivo (Wong et al., 2019).

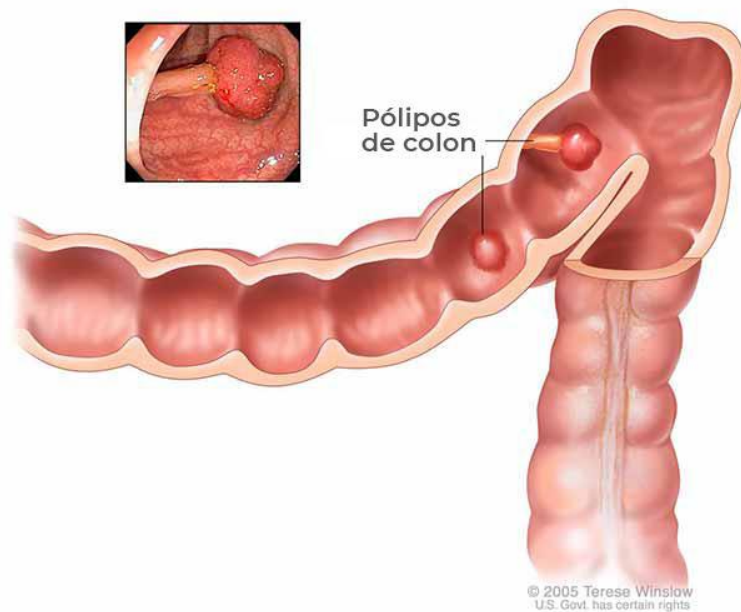


Figura 3. Pólipos en colon.

II.3.4. Estadios del cáncer de colon

El cáncer de colon se detecta mediante endoscopia, precedido de anemia por deficiencia de hierro en hombres mayores y en mujeres post-menopáusicas mediante hemograma completo. Los principales síntomas son sangre oculta en heces, cambios en los hábitos intestinales y calambres (Maspes et al., 2021).

En la tabla 1 se presentan los estadios que se presentan en el cáncer de colon, una breve descripción de cada uno de ellos y, los tratamientos que se utilizan

para cada etapa. En la figura 4, se muestra una representación esquemática de cada etapa.

Tabla 1. Estadios del cáncer de colon (PDQ Adult Treatment Editorial Board, 2002).

Descripción		Tratamiento recomendado
0 (carcinoma de colon in situ)	Se encuentran células anormales solo en la mucosa que, pueden volverse cancerosas y diseminarse al tejido normal cercano.	Escisión local o polipectomía simple. Resección y anastomosis (cuando el tumor es muy grande).
I	El cáncer se ha diseminado desde la mucosa hasta la submucosa.	Resección y anastomosis. Tasa de supervivencia del 90% (Gulbake et al., 2016).
II <i>IIA</i>	El cáncer ha crecido y se ha diseminado a través de la capa muscular. No se ha diseminado a los tejidos o ganglios linfáticos cercanos.	Buen pronóstico luego de resección y anastomosis. Como quimioterapia adyuvante se suele utilizar capecitabina, 5-FU o una combinación de 5-FU/oxaliplatino.
<i>IIB</i>	El cáncer se ha diseminado a través de la serosa, pero no a los órganos cercanos. No se ha diseminado a los tejidos o ganglios linfáticos cercanos ni a otra parte.	Tasa de supervivencia del 80% (Gulbake et al., 2016).
<i>IIC</i>	El cáncer se ha diseminado a través de la serosa y ha invadido estructuras cercanas. No se ha diseminado a ganglios linfáticos cercanos ni a ninguna otra parte.	
III <i>IIIA</i>	El cáncer ha crecido a través del revestimiento interno o en las capas musculares del intestino. Se ha diseminado hacia 1 a 3 ganglios linfáticos, o hacia un ganglio del tumor en tejidos que rodean el colon o el recto, pero no se ha diseminado hacia otras partes del cuerpo.	Resección y anastomosis con quimioterapia adyuvante con el uso de 5-FU-oxaliplatino. Tasa de supervivencia del 30-60% (Gulbake et al., 2016).
<i>IIIB</i>	El cáncer ha crecido a través de la pared intestinal o en los órganos circundantes y en 1 a 3 ganglios linfáticos, o hacia un ganglio del tumor en tejidos que rodean el colon o el recto que no parecen ser ganglios linfáticos. No se ha diseminado a otras partes del cuerpo.	
<i>IIIC</i>	Independientemente de la profundidad con que se extendió el cáncer de colon, se ha diseminado a 4 o más ganglios linfáticos, pero no a otras partes distantes del cuerpo.	

IV <i>IVA</i>	El cáncer se ha diseminado a una sola parte distante del cuerpo, como el hígado o los pulmones.	Escisión local; resección, con anastomosis o sin esta; cirugía para extirpar partes de otros órganos donde se diseminó el cáncer; quimioterapia neoadyuvante o adyuvante, el régimen estándar para el cáncer de colon avanzado consiste en oxaliplatino, doxorubicina o irinotecan en combinación con 5-FU/leucovorina. También se suele utilizar bevacizumab. Ablación por radiofrecuencia o criocirugía para pacientes que no se pueden someter a cirugía. Tasa de supervivencia del 3% (Gulbake et al., 2016).
<i>IVB</i>	El cáncer se ha diseminado a más de una parte del cuerpo.	
<i>IVC</i>	El cáncer se ha diseminado al peritoneo. También se pudo haber diseminado a otros lugares u órganos.	

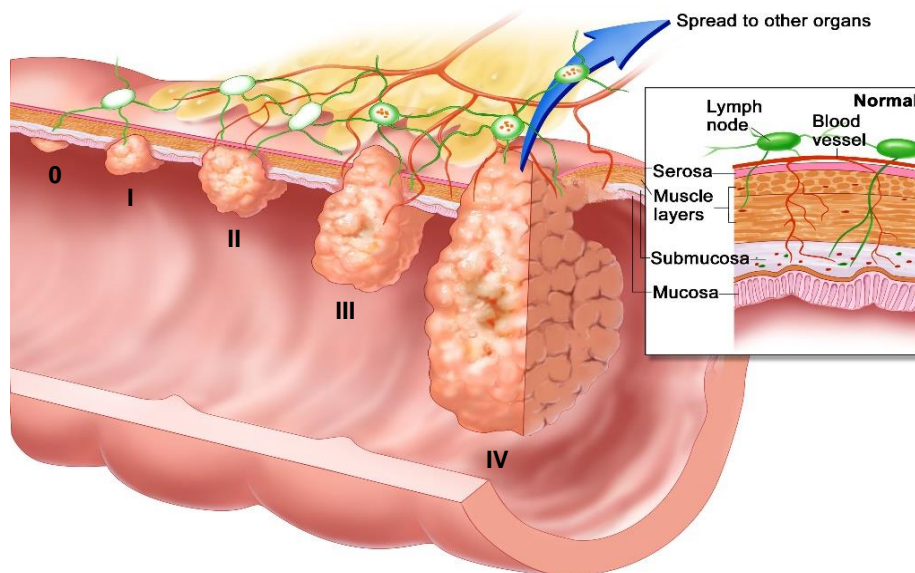


Figura 4. Estadios del cáncer de colon.

En el estadio II, generalmente se presenta un buen pronóstico y supervivencia (se estima que la supervivencia general a 5 años es del 80%) luego de la cirugía (Wu, 2018). La relación riesgo-beneficio sobre la quimioterapia adyuvante para cada paciente debe considerarse y se debe basar en el beneficio absoluto más que en las reducciones del riesgo relativo (Sánchez Gudín, 2019). Esto debido a que se ha documentado que arriba del 40% de los pacientes que reciben quimioterapia adyuvante basada en 5-FU seguido de la resección del estadio II y III de cáncer de colon experimentan recurrencia o mueren dentro de los 8 años de seguimiento, aunque, en el estadio III si se suele recomendar con mayor frecuencia la quimioterapia adyuvante luego de la resección del tumor. Por otro lado, en el caso de una enfermedad metastásica (estadio IV), se prefiere el uso de agentes dirigidos para inhibir la angiogénesis, como anticuerpos monoclonales; tal como el bevacizumab (Vodenkova et al., 2020).

II.3.5. Tratamientos para el cáncer de colon

Las terapias para cáncer de colon más utilizadas incluyen la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia (Gao et al., 2017; Tummala et al., 2015). El tratamiento seleccionado va a depender de la localización, el tamaño y la extensión de la propagación del tumor, así como de la situación de salud en la que se encuentre el paciente (Anitha et al., 2016). Además, dependiendo del estadio del cáncer que se presente, se pueden combinar dos o incluso tres tipos de tratamientos al mismo tiempo o uno antes o después de otro (Krishnaiah et al., 2002). Se considera como único tratamiento curativo a la cirugía, especialmente para las

etapas iniciales del tumor (Blondy et al., 2020). La radioterapia realizada antes o después de la operación, reduce la recurrencia pélvica pero no parece prolongar la supervivencia, por eso, no es efectivo como tratamiento primario para cáncer de colon (Maspes et al., 2021). Por otro lado, la quimioterapia es considerada la estrategia terapéutica neoadyuvante o adyuvante principal para el cáncer de colon antes o después de la cirugía en estadios más avanzados, no obstante, el impacto en el pronóstico de la enfermedad no se considera muy significativo debido a que los medicamentos quimioterapéuticos no diferencian entre células cancerosas y células normales (Tawfik et al., 2017) lo que provoca una gran variedad de efectos secundarios graves, tales como neutropenia, fatiga, diarrea, náuseas, vómitos, anemia, hepatotoxicidad, entre muchos otros; de hecho, estos efectos en los tejidos y órganos sanos son una de las principales razones de la alta tasa de mortalidad de los pacientes con cáncer (Senapati et al., 2018). Además, la dosis sistémica máxima necesaria y permitida se ve limitada por la distribución inespecífica de los fármacos, dando como resultado concentraciones inadecuadas en el sitio tumoral, por lo que se necesitan terapias más dirigidas (Banerjee et al., 2017).

Son muchos los agentes anticancerígenos que se han estudiado y desarrollado a lo largo de varios años (Tawfik et al., 2017), la mayoría de ellos se administra mediante infusión intravenosa y, generalmente, se requiere que los pacientes sean hospitalizados, lo que, además, llega a conducir a un cumplimiento deficiente del tratamiento (Chivere et al., 2020). Debido a esto, la quimioterapia oral ha atraído más la atención de los investigadores ya que evita la incomodidad de las inyecciones y se puede realizar en el hogar, lo que mejoraría la cooperación y la calidad de vida de las personas con cáncer de colon, entre algunas otras ventajas,

como una mayor exposición de los fármacos antitumorales a las células cancerígenas, lo que podría incrementar la eficacia del medicamento y disminuir los efectos citotóxicos sistémicos (Pangeni et al., 2016).

La Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) ha aprobado varios agentes quimioterapéuticos para tratar el cáncer de colon, entre ellos se incluyen 5-FU, avastatina, bevacizumab, irinotecan, capecitabina y oxaliplatino, para ser utilizados solos o en combinación (Sharma et al., 2017; R. Wang et al., 2019). Los 3 agentes quimioterapéuticos utilizados para tratar un estadio temprano del cáncer de colon son el 5-FU, capecitabina y oxaliplatino (Wu, 2018). También es muy utilizada la leucovorina como potenciador del efecto de los medicamentos citotóxicos, como el 5-FU que se ha utilizado en terapia adyuvante por un periodo de 6 meses (Guler & Ovey, 2018; Wu, 2018). El oxaliplatino también es utilizado ya que mejora la eficacia de esta combinación en pacientes con metástasis (André et al., 2004). El bevacizumab, por otro lado, es un anticuerpo monoclonal que también ha sido aprobado por la FDA para utilizarse como tratamiento en cáncer de colon metastatizado, este se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o a su receptor, evitando la promoción de la angiogénesis en el tumor, también se encuentran disponibles el ramucirumab y el aflibercept. Por otro lado, la capecitabina es un pro-fármaco administrado por vía oral que se absorbe a través de la pared gastrointestinal en forma intacta y, subsecuentemente, es convertido en 5'-desoxi-5-fluorouridina (5'-DFUR) por las enzimas carboxilesterasa (CES) y citidina desaminasa (CDA) en el hígado y, después, 5'-DFUR es transformada en 5-FU por timidina fosforilasa (TP) y/o uridina fosforilasa (UP), TP tiene una alta concentración en mucho tejidos tumorales; la

capecitabina puede utilizarse tanto en terapia adyuvante así como en un estadio de metástasis, sin embargo, sus ventajas son contradictorias ya que en algunos estudios clínicos con pacientes con cáncer de colon en estadio III se ha revelado que la monoterapia con capecitabina ha presentado una baja incidencia de efectos secundarios tóxicos en comparación con la monoterapia de 5-FU/leucovorina, mientras que en otros varios estudios se ha encontrado que la capecitabina presenta una toxicidad similar a la del 5-FU (Vodenkova et al., 2020; Wu, 2018). Para mejorar la eficacia en pacientes con metástasis en hígado se suele administrar la quimioterapia mediante infusión directamente en la arteria hepática o vena porta pero, este tratamiento resulta ser muy tóxico, caro y no conduce a una prolongación de la supervivencia (Maspes et al., 2021).

II.3.6 Administración de fármacos específica en el colon

Un DDS de liberación controlada administra el fármaco de forma local o sistémica a una velocidad predeterminada durante un periodo de tiempo específico (Nokhodchi et al., 2012). La liberación de fármacos directa al colon se ha convertido en un área importante de investigación en los últimos años debido a las grandes ventajas que aporta en el tratamiento de varias enfermedades como las infecciones colorrectales, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn y, cáncer colorrectal que, podrían ser tratadas localmente, evitando posibles efectos adversos (Arévalo-Pérez et al., 2020). La liberación de fármacos en el colon puede ser lograda por la vía rectal u oral, sin embargo, la primera no es ampliamente utilizada debido a la dificultad de llegar a sitios específicos del colon, es decir, generalmente se confina al colon descendente, además, se considera incómoda

para las personas, y suele reservarse como una ruta alternativa en situaciones paliativas y/o emergencias (Arévalo-Pérez et al., 2020; Watts et al., 1992). Por ende, es preferida la ruta oral debido a la amplia aceptación por parte de las personas, no es invasiva, es simple, menos costosa, fácil de diseñar y eficaz (Arévalo-Pérez et al., 2020). No obstante, presenta algunos desafíos que se deben tomar en cuenta al momento de seleccionar el sistema de administración a utilizar.

El objetivo de un DDS dirigido es proporcionar una concentración de fármaco deseada en el cuerpo mediante la administración de una cantidad terapéutica de fármaco a un sitio objetivo (Anita et al., 2019). Los fármacos que están destinados a ser incorporados en un sistema de administración específico para el colon, deben de cumplir con uno o más de los siguientes criterios físico-químicos/terapéuticos; primero, deben exhibir efectos locales en el colon que puedan ser utilizados para tratar enfermedades; segundo, estos fármacos deben demostrar una absorción subóptima en el TGI superior; los demás criterios incluyen una alta degradación del fármaco en el estómago por el ácido del medio ambiente o enzimas, o un alto riesgo de metabolismo de primer paso. También se debe tomar en cuenta el tipo de DDS, los factores que pudieran influir en el tiempo de tránsito del TGI y el grado de interacción entre el fármaco y el TGI (Amidon et al., 2015). La eficacia de un DDS específico para el tratamiento de cáncer de colon depende de la velocidad y el grado de absorción del fármaco que ha llegado al colon, esto es esencial para proveer una liberación de agentes quimioterapéuticos regional y sistémica para tratar estadios II, III y IV de cáncer colorrectal después de cirugía (Krishnaiah & Khan, 2012). La absorción de

fármacos desde el colon tiene lugar por la vía transcelular o paracelular (Anita et al., 2019).

II.3.6.1 Factores que influyen en la entrega de fármacos específicos para el colon

Uno de los principales desafíos para un sistema de administración específico para el colon por vía oral es que debe de atravesar todo el tubo digestivo hasta alcanzar el sitio objetivo; por tanto, varios factores pueden influir en el desarrollo de un DDS específico para colon y la biodisponibilidad colónica de los fármacos, algunos de estos factores se comentan a continuación. La fisiología y las propiedades físicas del colon difieren entre sus diferentes subdivisiones, así como con el TGI superior; uno de estos factores que afecta el suministro de fármacos al colon son las variaciones de pH; el rango de pH del colon va de 5.25 – 7.7, aproximadamente (Amidon et al., 2015; Arévalo-Pérez et al., 2020; Cheng et al., 2019) y es principalmente afectado por la comida (Cheng et al., 2019). Los rangos de pH más bajos se encuentran en el colon ascendente en donde existen una gran cantidad de microorganismos que se encargan de fermentar carbohidratos para generar ácidos grasos cortos y conforme se avanza hacia el colon transversal y el colon descendente, estos ácidos grasos son absorbidos, promoviendo la secreción de H_2CO_3 y volviendo el ambiente más alcalino (Arévalo-Pérez et al., 2020). Otro factor importante es la viscosidad del contenido luminal del colon, ya que este absorbe una gran cantidad de agua (90% aprox.) el contenido se solidifica e incrementa la presión intraluminal, volviendo el sitio más viscoso a medida que transita desde el colon ascendente hacia el colon descendente, lo que puede

obstaculizar la difusión y absorción de fármacos (Prasanth et al., 2012). Debido a esto, se considera que la administración al colon ascendente es importante ya que es más probable que los fármacos sean absorbidos en ese sitio (Watts et al., 1992). Por otro lado, un punto importante que facilita la absorción de varios medicamentos a través de la mucosa colónica es el tiempo de tránsito, el colon presenta un tiempo de retención largo, de 50 a 70 h (hasta 5 días), esta lentitud del tránsito permite que el fármaco permanezca en contacto con la mucosa durante un periodo más largo que en el intestino delgado (2.5 – 3 h), lo que compensa el área de superficie mucho más bajo además de que mejora la biodisponibilidad de los fármacos, sin embargo, puede verse afectado por varias enfermedades y/o por la ingesta de alimentos (Amidon et al., 2015; Prasanth et al., 2012).

En el caso del 5-FU, si se liberara directamente en el TGI, el riesgo de experimentar efectos tóxicos digestivos sería elevado (Rodríguez et al., 2003), además, presenta una biodisponibilidad muy errática debido a que luego de su administración por vía oral, la absorción intestinal es rápida, y los niveles máximos en sangre se alcanzan entre 15 y 60 minutos después de la ingestión, pero, se observa mucha variabilidad individual debido al metabolismo de primer paso en el hígado (Shishu et al., 2007). También, es degradado por enzimas presentes en el estómago y en el intestino delgado (Philip & Philip, 2010). Sin embargo, el 5-FU se clasifica de acuerdo a la guía del sistema de clasificación biofarmacéutica (BCS) como clase I, lo que indica que es muy soluble y muy permeable, por lo que exhibe una buena absorción desde el colon (Krishnaiah & Khan, 2012).

II.3.7. 5-FU

El 5-FU es la fluoropirimidina más estudiada y conocida; sintetizada por primera vez por Heidelberger en el año de 1957; es considerado como uno de los primeros ejemplos de diseño racional de fármacos ya que se basó en la sustitución de un átomo de hidrógeno por un átomo de flúor en la molécula de uracilo lo cual, conlleva a un cambio en las propiedades fisicoquímicas y farmacológicas. Esto fue descubierto luego de observar que algunos derivados de ácidos nucleicos presentaban actividad antitumoral, un ejemplo de ello fue en un reporte en donde se encontró que se incorporaba más uracilo a ADN en tejido tumoral de rata en comparación con el tejido sano; además, también se observó que algunos resultados de estudios preliminares de derivados sintéticos del uracilo mostraban actividad antitumoral (Melgarejo Diaz, 2015).

II.3.7.1. Características físico-químicas y estabilidad

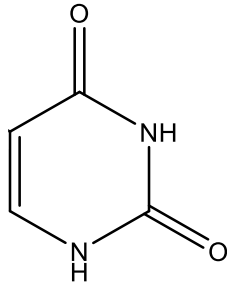
El 5-FU, es nombrado de acuerdo a la nomenclatura de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) como 5-fluoropirimidina-2,4-diona; presenta una masa molecular de 130.077 g/mol; es descrito como un polvo cristalino blanco ligeramente soluble en agua (1 g se disuelve en 80 mL) y apenas soluble en etanol 96% (1 g se disuelve en 170 mL). Su solubilidad se ve incrementada con el aumento del pH debido a la formación de sales, pero es menos estable, por lo que el fármaco es más estable a pH ácido pero, su solubilidad es más reducida; además, posee dos sitios potenciales de desprotonación, en los nitrógenos amida N1 y N3 (Wielińska et al., 2019). El 5-FU presenta un pKa 1 de 7.93 y pka 2 de 8.05 (ácido débil) (Hansova et al., 2011; Villarreal-Gómez et al., 2018). Esto significa que el 5-

FU está, en gran medida, desprotonado a pH fisiológico e intracelular. La forma ionizada influye en su movilidad en los fluidos corporales así como en el paso a través de las membranas celulares (Wielińska et al., 2019). El 5-FU es de naturaleza hidrofílica, sensible a la luz, inflamable e incompatible con oxidantes y bases fuertes; su temperatura de fusión está entre los 282-286°C con descomposición y formación de vapores de fluoruros y óxidos de nitrógeno altamente tóxicos (Hansova et al., 2011). Tiene una baja lipofilicidad.

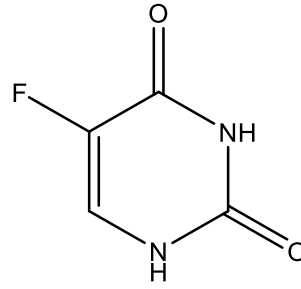
II.3.7.2. Mecanismo de acción

El 5-FU es un compuesto orgánico aromático heterocíclico que presenta una estructura análoga a la pirimidina natural uracilo, con un átomo estable de flúor en la posición C-5 en lugar de un hidrógeno del anillo uracilo (figura 5) (Handali et al., 2018b; Zhang et al., 2008). Por tal razón, el 5-FU penetra fácilmente la célula utilizando el mismo mecanismo que el uracilo, a través de un sistema de transporte facilitado mediado por un transportador (Mohd-zahid et al., 2020) Aunque se ha demostrado que el 5-FU puede transportarse pasivamente a través de la ruta paracelular y transcelular en monocapas de células cancerígenas y, puede cruzar rápidamente la barrera hematoencefálica por difusión pasiva; es importante mencionar que los efectos antitumorales son producidos después de su interacción con azúcares fosforilados a través de reacciones catalizadas enzimáticamente y su subsecuente conversión a metabolitos activos (Vodenkova et al., 2020). Su mecanismo de acción inicia con la conversión intracelular del 5-FU en varios metabolitos activos: fluorouridina trifosfato (FUTP), fluorodesoxiuridina trifosfato (FdUTP) y fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP) (figura 6). El mecanismo

principal de activación de 5-FU es la conversión a fluorouridina monofosfato (FUMP) por orotato fosforribosil transferasa (OPRT) con fosforribosil pirofosfato (PRPP) como cofactor, o indirectamente a través de fluorouridina (FUR) a través de la acción secuencial de uridina fosforilasa (UP) y uridina cinasa (UK). A continuación, FUMP se fosforila a fluorouridina difosfato (FUDP), que puede fosforilarse aún más al metabolito activo FUTP o convertirse en fluorodesoxiuridina difosfato (FdUDP) por la ribonucleótido reductasa (RR). A su vez, FdUDP puede fosforilarse para generar metabolitos activos FdUTP y FdUMP, respectivamente. Existe una vía de activación alternativa que implica la conversión catalizada por timidina fosforilasa (TP) de 5-FU en fluorodesoxiuridina (FUDR), que luego es fosforilada por timidina cinasa (TK) a FdUMP. Todos estos metabolitos interfieren con el metabolismo de los nucleósidos y pueden incorporarse erróneamente al ARN y al ADN en lugar de uracilo o timina, lo que provoca acumulación de 5-FU en el genoma, seguido de citotoxicidad y muerte celular (Longley et al., 2003; Zhang et al., 2008). Sin embargo, el 5-FU ejerce sus efectos anticancerígenos principalmente a través de la formación de un complejo estable entre FdUMP y la enzima timidilato sintasa (TS), una enzima esencial para catalizar la biosíntesis de timina. Por otro lado, la enzima encargada del catabolismo del 5-FU es la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD), la cual convierte al 5-FU en dihidrofluorouracilo (DHFU), conduciendo finalmente a la formación de ácido α -fluoro- β -ureido-propiónico (FUPA) y α -fluoro- β -alanina (FBAL), que serán subsecuentemente excretados a través de los riñones (Longley et al., 2003; Vodenkova et al., 2020).



Uracilo



5-FU

Figura 5. Estructura química del uracilo y del 5-fluorouracilo.

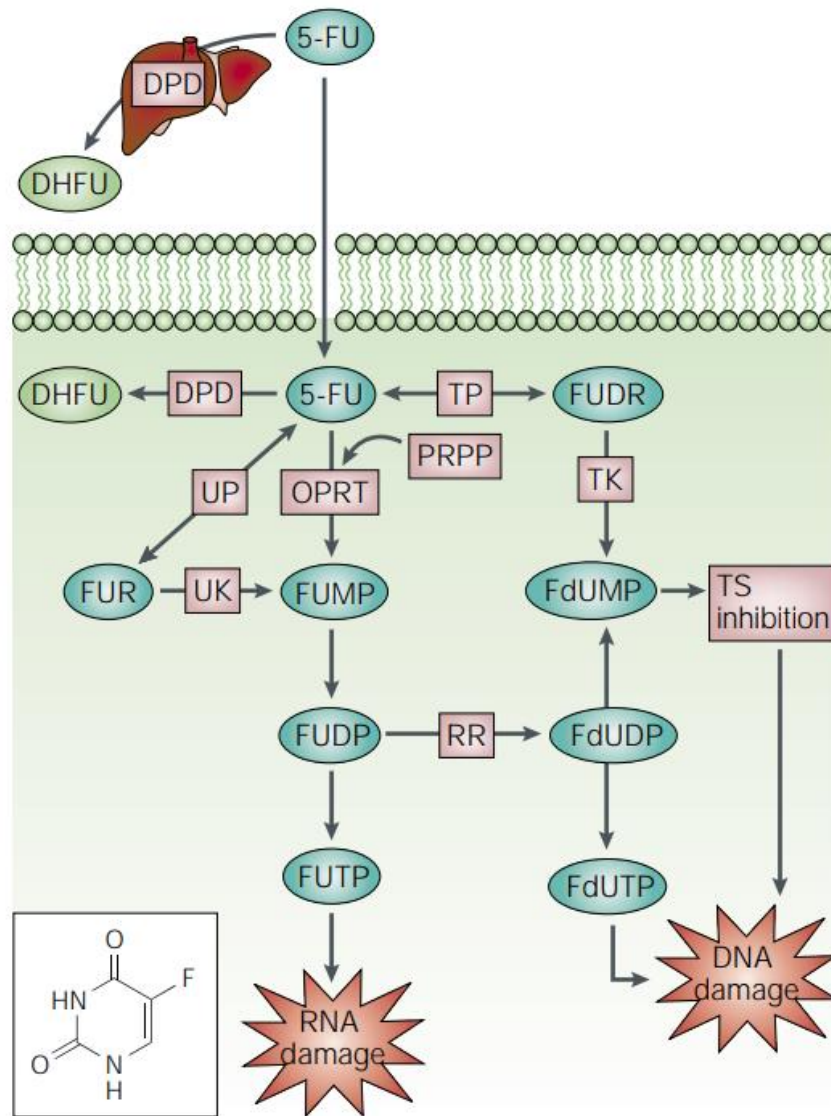


Figura 6. Mecanismo de acción del 5-fluorouracilo; FdUDP (fluorodesoxiuridina difosfato); RR (ribonucleótido reductasa); FUTP (fluorouridina trifosfato); FdUTP (fluorodesoxiuridina trifosfato); FdUMP (fluorodesoxiuridina monofosfato); TK (timidina cinasa); FUDR (fluorodesoxiuridina); TP (timidina fosforilasa); OPRT (orotato fosforribosil ansferasa); PRPP (fosforribosil pirofosfato); FUMP (fluorouridina monofosfato); FUR (fluorouridina); UP (uridina fosforilasa); UK (uridina cinasa); FUDP (fluorouridina difosfato); TS (timidilato sintasa); DPD (dihidropirimidina deshidrogenasa); DHFU (dihidrofluorouracilo); RNA (ácido ribonucleico); DNA (ácido desoxirribonucleico); 5-FU (5-fluorouracilo) (Longley et al., 2003).

II.3.7.3. Características farmacológicas

El 5-FU es un fármaco antineoplásico que se utiliza en el tratamiento tópico (en forma de soluciones, cremas o geles con 0.5% de concentración de 5-FU) o sistémico (intravenosa, intraarterial e intraperitoneal) de varias enfermedades, empleado desde 1957 (Paruvathanahalli et al., 2016; Sahu et al., 2019). Posee un amplio espectro para varios tipos de neoplasias malignas, entre ellas, se encuentran los cánceres de piel (melanoma), mama, hígado, páncreas, colon (Diasio & Harris, 1989) y de cabeza y cuello; además, puede ser administrado solo o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos (Fata et al., 1999). Para incrementar su eficacia, se suele combinar frecuentemente con oxaliplatino o irinotecan, sin embargo, la toxicidad se ve incrementada (Vodenkova et al., 2020). Como tratamiento para el cáncer de colon es considerado uno de los fármacos más eficaces (Wang et al., 2018). Se administra por vía IV en forma de solución de fármaco libre (Arias, 2008). La dosis recomendada de 5-FU para pacientes de riesgo medio que padecen cáncer de colon con buen estado nutricional y adecuada función hematopoyética es de 12 mg/kg IV una vez al día durante 4 días consecutivos para

un tratamiento exitoso que debe de ser constante para mantener la concentración sérica terapéutica; si no se observa toxicidad, se administran 6 mg/kg IV en los días 6, 8, 10 y 12 (Krishnaiah et al., 2002; Sharma et al., 2017; Tummala et al., 2015). La terapia de mantenimiento es continuar con administración IV (10-15 mg/kg por semana como dosis única) repitiendo el primer ciclo cada 30 días después del último ciclo anterior de tratamiento o, cuando los signos tóxicos resultantes del ciclo inicial de tratamiento hayan remitido, esto puede requerir de 9 a 45 ciclos de terapia durante 12 a 60 meses. La dosis IV diaria de 5-FU se fija en 500 mg/m² basada en el área de superficie del cuerpo humano, entonces, la dosis de 5-FU a ser administrada específicamente en el colon (superficie media= 0.15 m²) sería de 75 mg, sin embargo, en algunos estudios se suele utilizar concentraciones de 50 mg debido a la elevada toxicidad del 5-FU en la mucosa intestinal (Krishnaiah et al., 2002).

Durante los últimos 60 años, a pesar de las muchas ventajas del 5-FU, las aplicaciones clínicas se han visto muy limitadas debido a varias ineficacias conocidas (Zhang et al., 2008).

El 5-FU se ha administrado intra-arterialmente mediante infusión en la vena hepática. En estas condiciones, el 19-50% de la dosis experimenta un metabolismo de primer paso. También se puede administrar por vía intraperitoneal, en donde el fármaco es absorbido primariamente a través de la circulación portal, pasando a través del hígado antes de alcanzar la circulación sistémica (Díaz-Cuadra, 2016).

II.3.7.4. Limitantes del tratamiento convencional con 5-FU

El fármaco 5-FU es llevado a través de la circulación hacia todos los órganos principales del cuerpo, reduciendo la concentración efectiva en el tejido objetivo y, por tanto, provocando efectos secundarios graves al actuar en células sanas (Hosseinfar et al., 2018), sobre todo en aquellas de rápida división como las células del TGI y las células de la médula ósea, causando diarrea, náuseas, vómitos, mucositis y mielosupresión (principalmente linfopenia y plaquetopenia) respectivamente, así como también estomatitis, manifestaciones cutáneas como síndrome mano-pie (dermatitis), neurotoxicidad y cardiotoxicidad (Tawfik et al., 2017; Vodenkova et al., 2020). Aproximadamente el 85% del 5-FU es metabolizado (catabolizado) rápidamente en varios metabolitos inactivos por la enzima DPD expresada principalmente en el hígado, en el intestino, en la circulación sanguínea, entre otros tejidos, lo que resulta en una vida media muy corta (10-20 minutos) y en la necesidad de dosis más altas para el logro del efecto terapéutico (Handali et al., 2018b); además, cuando el 5-FU es administrado por infusión, cerca del 15 al 20% del fármaco se elimina directamente en la orina, por lo que se ha informado que tan solo entre el 1-3% de la dosis original de 5-FU contribuye a la citotoxicidad de células tumorales y normales de rápida proliferación (Mohd-zahid et al., 2020). Esto se comprueba ya que cuando el 5-FU es administrado intravenosamente en inyección de bolo único a un rango de dosis de 600-900 mg/m², todo el 5-FU administrado es eliminado de la circulación y de la médula ósea dentro de las primeras 2 horas luego de la administración (Vodenkova et al., 2020). Además, en soluciones inyectables, a partir de la degradación del 5-FU en medios básicos, se producen compuestos cardiotóxicos (Villarreal-Gómez et al., 2018).

De igual manera, se es bien conocida la quimiorresistencia a este fármaco que podría deberse a diversas causas, incluida la alteración en la entrada y salida del fármaco que hace referencia a los mecanismos celulares de la quimiorresistencia basados en el transporte en donde los fármacos son expulsados de las células cancerosas a través de varias proteínas transportadoras de membrana, lo que lleva a la disminución de la disponibilidad de los medicamentos y al fracaso en la terapia, uno de los transportadores más sobreexpresados y observados en la resistencia de células cancerígenas son los transportadores de casete de unión a ATP (ABC); también se encuentra su inactivación y; factores intrínsecos (heterogeneidad intratumoral) y extrínsecos (pH, hipoxia, interacciones de señalización paracrina con el estroma y otras células tumorales) que cambian, incrementan o disminuyen la expresión génica del objetivo. Uno de los principales mecanismos de resistencia hacia el 5-FU es la expresión elevada de TS; debido a esto, la respuesta global para cáncer de colon avanzado cuando se usa el 5-FU por si solo es de tan solo 10-15%, mientras que en combinación con otros fármacos antitumorales, la tasa de respuesta simplemente mejora un 40-50% (Pretel et al., 2017; Vodenkova et al., 2020; Zhang et al., 2008). También, presenta una biodisponibilidad variable cuando se administra por vía oral debido al metabolismo en el TGI y a su baja permeabilidad de la membrana intestinal; su valor de log P es de -0,89, lo que limita el uso de formulaciones orales para la dosificación a largo plazo, por lo que se han propuesto varios enfoques a partir del uso de la nanotecnología para el logro de un sistema de administración oral del fármaco en tamaño nanométrico, ya que se evitaría la incomodidad de las inyecciones luego de la hospitalización, se podría realizar en el hogar, lo que podría mejorar la

cooperación y la calidad de vida del paciente (Pangeni et al., 2016). Además, la terapia con 5-FU mejoraría y se reduciría su toxicidad si se lograra la acumulación del fármaco en la región del tumor y se prolongara la exposición de las células a este agente (Villarreal-Gómez et al., 2018). La administración oral del 5-FU reduce la dosis de liberación del fármaco en el colon debido a la liberación, absorción y metabolismo en el estómago e intestino delgado (Hosseinifar et al., 2018).

II.3.7.5. Nanoformulaciones con 5-FU para cáncer de colon

Hoy en día, algunas tecnologías de administración de fármacos específicas para el colon se han desarrollado con el fin de explotar las características fisiológicas del TGI de tal manera que este sistema de administración se active y libere el fármaco hasta que se encuentre dentro de la región colónica, llevando una terapia más dirigida que reduciría los efectos secundarios además de que, extendería la biodisponibilidad de los fármacos (Banerjee et al., 2017; Wong et al., 2011). Debido a lo anteriormente mencionado, la eficacia del 5-FU contra el cáncer de colon podría mejorarse a través de la nanotecnología; se han desarrollado varios estudios en los que se ha encapsulado el 5-FU en un nanoacarreador (como NPs) con el fin de mejorar la especificidad hacia las células tumorales y, al mismo tiempo, reducir la citotoxicidad por la ausencia de exposición no selectiva hacia células sanas, evitar la acción de la DPD (por lo que incrementaría su tiempo en la circulación) y, facilitar la acumulación del fármaco en el sitio del tumor para una exposición prolongada de las células tumorales (Pretel et al., 2017; Udofot et al., 2016). Se considera que, para que un sistema de administración de 5-FU sea eficiente y exitoso, debe poseer las siguientes características (Jaferian et al., 2016):

- a) Estabilidad física.
- b) Tamaño pequeño (<1 μm).
- c) Resistente a la degradación.
- d) Sin problemas de almacenamiento y sin fugas del medicamento.
- e) Liberación controlable.
- f) Biodegradabilidad.

Para el tratamiento del cáncer de colon, con frecuencia son utilizados polímeros sintéticos dentro de la formulación de las NPs cargadas con 5-FU (Arias, 2008; Pretel et al., 2017). Algunos de los nanoacarreadores desarrollados como estrategias para liberación de 5-FU en cáncer son los siguientes (Jaferian et al., 2016):

- a) Partículas poliméricas biodegradables.
- b) Hidrogeles y nanogeles.
- c) Sistemas vesiculares: liposomas y niosomas.
- d) Sistemas de liberación de fármacos magnéticos.
- e) Lipoproteínas.
- f) Metales
- g) Resinas de intercambio iónico.

Debido a variaciones en el tiempo de tránsito a través de colon, una terapia con tabletas puede ser incompleta o insuficiente, debido a la poca degradación de la matriz. Además de que la diarrea es uno de los principales efectos secundarios graves, esto, puede volver al tratamiento oral con 5-FU insuficiente. La reducción del tamaño del sistema acarreador podría ser una opción que evite tales problemas

desde que se ha observado una retención gastrointestinal dependiente del tamaño (Lamprecht et al., 2003).

II.4. Nanomedicina aplicada al cáncer

La nanotecnología es definida como la ciencia del diseño, síntesis, caracterización y aplicación de materiales y dispositivos cuyo tamaño oscila entre 1 y 100 nm (Calero, 2015). Ha sido aplicada al campo de la medicina, desarrollando una nueva disciplina conocida como nanomedicina, la cual, ha aportado una gran cantidad de avances en donde se incluyen, como las más prometedoras, el diagnóstico *in vitro*, la imagen *in vivo*, biomateriales, técnicas de terapia, la ingeniería de tejidos, y la administración de medicamentos (Chaturvedi et al., 2018; Shi et al., 2010). Debido a esto, la nanotecnología ha presentado un rápido crecimiento, sobre todo, en el área de administración de medicamentos dirigidos a un cáncer, utilizado como una estrategia para mejorar los desafíos que se han observado dentro de la terapia quimioterapéutica oncológica (Ehdaie, 2007; Jabir et al., 2012; Meel et al., 2019). Para esto, se han desarrollado nanoacarreadores utilizados como sistemas de administración de fármacos que ofrecen varias ventajas con respecto a la administración convencional de los fármacos quimioterapéuticos, entre algunas de ellas, podemos encontrar una mejora en la estabilidad de los fármacos al evitar su degradación; minimización de los efectos adversos; mejora de la eficacia terapéutica; una alta capacidad de carga de fármacos hidrófilos e hidrófobos (Jabir et al., 2012; Shi et al., 2010) y una liberación controlada (Patra et al., 2018). También, pueden superar la resistencia a los medicamentos, ya que

pueden pasar por alto la bomba de eflujo de la glicoproteína P, uno de los principales mecanismos de resistencia a los medicamentos, lo que conduce a una mayor acumulación intracelular (Wang et al., 2009). Además, su tamaño nanométrico incrementa su acumulación en el sitio objetivo mediante distintas estrategias de orientación al sitio, ya sea activas (conjugación de moléculas de superficie específicas para ciertos receptores o antígenos sobreexpresados en los tumores) o pasivas (Suhail et al., 2019; Sun et al., 2015). Dentro de la orientación pasiva se incluye la mejora en el efecto de permeabilidad y retención (EPR) lo cual provoca una alta acumulación en el tumor (figura 7) (Wang et al., 2012). EPR es un fenómeno que ocurre en tumores sólidos (Villarreal-Gómez et al., 2018). La vasculatura alrededor de las células cancerosas está mal formada, con paredes débiles, debido a la rápida proliferación de células endoteliales, lo que conduce a grandes espacios o poros entre las células, con tamaños que oscilan entre 380 y 780 nm, esto permite una mayor permeabilidad vascular, a diferencia de la que se presenta en las uniones de vasos normales con tamaños de 5 a 10 nm (Brigger et al., 2012; Chacko et al., 2012; Wang et al., 2012). Además, el tumor presenta vasos linfáticos deteriorados, lo que permite que las NPs se acumulen preferentemente en esos sitios y presenten tiempos de retención más prolongados lo que da como resultado concentraciones más altas que en el plasma o en otros tejidos, por lo que las NPs pueden lograr una focalización pasiva en los tumores a través del efecto EPR (Wang et al., 2012). Debe tenerse en cuenta que la acumulación de nanomedicina en los tumores debe ir seguida de la liberación de la carga útil para lograr beneficios terapéuticos (Meel et al., 2019). Las vías de transporte macromolecular a través del tumor pueden ocurrir a partir de espacios abiertos (uniones interendoteliales y canales transendoteliales),

organelos vacuolares vesiculares y, fenestraciones (Brigger et al., 2012). En la administración de medicamentos contra el cáncer en particular, los investigadores buscan constantemente NPs con un Dh menor de entre 10-200 nm para capitalizar el efecto mejorado de permeación y retención (Zhong et al., 2018). Sin embargo, otros artículos mencionan que el tamaño preferido de los nanomateriales para una liberación efectiva del fármaco debe estar en el rango de 350 – 800 nm y, que este será permeable a través de los tejidos con cáncer en lugar de los tejidos sanos (Banerjee et al., 2017).

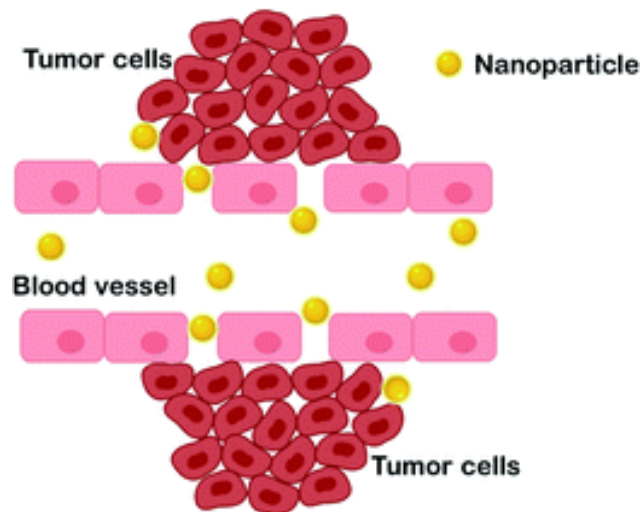


Figura 7. El efecto de permeabilidad y retención mejoradas (EPR) (Mohd-zahid et al., 2020).

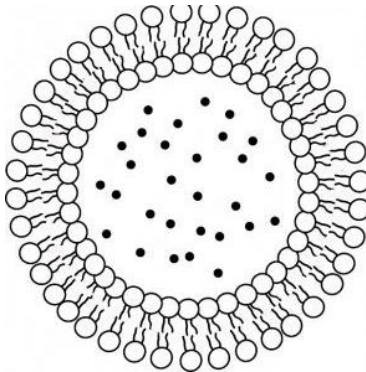
Se han desarrollado nanoacarreadores para oncología gastrointestinal, entre ellos se incluyen nanohilos, puntos cuánticos, nanoconchas, dendrímeros de NPs

de oro, nanotubos de carbono, NPs paramagnéticas, liposomas y nanogeles (Sun et al., 2015).

II.4.1. Nanosistemas para liberación de fármacos

A lo largo de los años se han desarrollado varias nuevas plataformas para liberación de fármacos en la escala nanométrica; entre ellas, se encuentran los liposomas, micelas, las nanopartículas poliméricas, dendrímeros, nanopartículas metálicas y nanopartículas moleculares dirigidas (Wang et al., 2012). A continuación, se comentan brevemente algunos.

II.4.1.1 Liposomas. Los liposomas fueron los primeros acarreadores para la

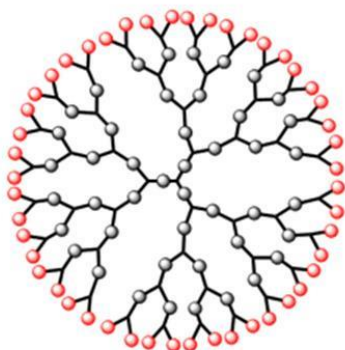


entrega de fármacos aprobados por la FDA para su uso en humanos (Banerjee et al., 2017) Son muy utilizados dentro de la industria farmacéutica y cosmética para el transporte de varias moléculas y, se encuentran entre los sistemas de transporte más estudiados para la

administración de fármacos (Patra et al., 2018). La doxorubicina fue el primer fármaco basado en nanotecnología con liposomas para el tratamiento de cáncer de ovario, sarcoma de Kaposi y mieloma múltiple (Villarreal-Gómez et al., 2018). Los liposomas son vesículas de forma esférica compuestas principalmente por fosfolípidos naturales o sintéticos dentro del rango de tamaño de 50 a 450 nm que presentan una estructura de membrana análoga a las membranas celulares (Wang et al., 2012), por lo que son biocompatibles y biodegradables; además, debido a su pequeño tamaño y recubrimiento de superficie, pueden penetrar la vasculatura

comprometida y con fugas de los tumores mediante el efecto EPR, crucial para la terapia contra el cáncer (Villarreal-Gómez et al., 2018). Sin embargo, presentan algunos inconvenientes, entre ellos, son difíciles de preparar y no pueden ser almacenados por tiempos prolongados debido a una baja estabilidad inherente (Wadhwa et al., 2019). A pesar de lo anterior, se ha demostrado que estabilizan los compuestos terapéuticos, mejoran su biodistribución, son capaces de cargar fármacos en compartimento acuoso o incrustarlos en la bicapa lipídica (Markman et al., 2013).

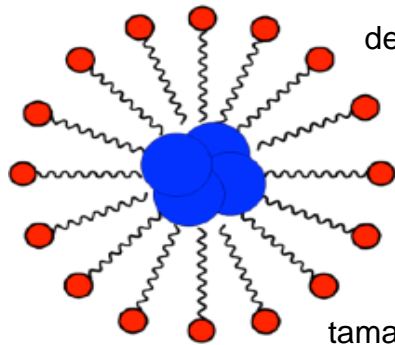
II.4.1.2 Dendrimeros. Los dendrimeros son estructuras monodispersas, bien



definidas y tridimensionales. Presentan una estructura globular bien definida de polímeros de múltiples ramificaciones que se caracterizan por un núcleo central, repeticiones de ramas unidas y una capa externa de grupos funcionales multivalentes que,

pueden interactuar electrostáticamente con moléculas polares cargadas o, pueden encapsular moléculas no polares en sus cavidades hidrófobas internas (Markman et al., 2013). Pueden ser sintetizados mediante dos rutas: la primera comienza a formarse desde el núcleo y luego se extiende hacia afuera y, la segunda es convergente, es decir, comienza desde el exterior del dendrimeros (Patra et al., 2018).

II.4.1.3 Micelas poliméricas. Las micelas poliméricas son nanoestructuras hechas

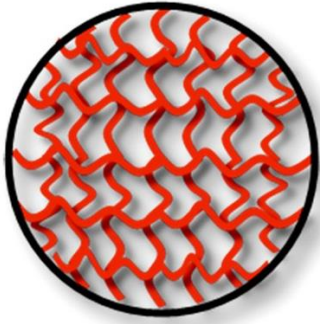


de copolímeros de bloque anfifílico que se juntan por sí mismos para formar una estructura con una capa hidrófoba interior y una capa hidrófila exterior en agua (Villarreal-Gómez et al., 2018). Las micelas tienen un tamaño inferior a 100 nm y se sintetizan mediante dos

enfoques: el primero es a partir de una disolución directa conveniente basada en disolvente del polímero seguida de un proceso de diálisis o, el segundo que es por precipitación de un bloque mediante la adición de un disolvente (Patra et al., 2018). Pueden ser utilizadas para solubilizar sustancias hidrófobas y; la capa exterior permite una mayor prolongación de tiempo en la circulación (Villarreal-Gómez et al., 2018).

Dentro de esta clasificación también se encuentran los nanogeles, los cuales, se consideran unos de los sistemas de administración de fármacos más prometedores y más importantes (Khoee & Asadi, 2016) ya que presentan muchas ventajas para la administración de fármacos en comparación con las nanopartículas poliméricas convencionales, tales como alto contenido de agua y área de superficie, biocompatibilidad superior, naturaleza blanda y un alto cargado de fármacos (García & Cuggino, 2018a).

II.4.1.6 Nanogeles (NGs)



Los NGs son hidrogeles (García & Cuggino, 2018b), limitados a un tamaño en la escala nanométrica (Li et al., 2017); en otras palabras, son redes que presentan una estructura tridimensional y se encuentran entrecruzadas física o químicamente por polímeros compuestos de cadenas hidrófilas o anfifílicas, por lo que también se les llama como nanogeles poliméricos reticulados (Suhail et al., 2019). Cuando los NGs son encapsulados por métodos químicos, el fármaco es covalentemente enlazado al acarreador y necesariamente requiere de una respuesta química que escinda el enlace entre el acarreador y el fármaco. Sin embargo, si el fármaco es encapsulado a través de interacciones físicas, el vehículo liberará el fármaco en respuesta a cambios físicos en la estructura del vehículo, tal como hinchamiento, el cual puede ser incrementado por temperatura, pH, etc. Se han encontrado aplicaciones para los NGs en varios campos como diagnóstico y bioingeniería pero, se considera que su mayor impacto ha sido en el área de administración de fármacos debido a que presenta varias características ideales, las cuales, se mencionan a continuación (Chacko et al., 2012). Primero, se pueden componer de una gran variedad de polímeros, ya sean naturales, sintéticos, o una combinación de ambos; dentro de los polímeros naturales se encuentran, por ejemplo, el colágeno, la gelatina, la albúmina, algunos polisacáridos como el quitosano y el ácido hialurónico; por otro lado, en el caso de los polímeros sintéticos, se pueden utilizar polimetacrilatos y poliácridatos (García & Cuggino, 2018b). Segundo, presentan distintas propiedades

que los diferencian de los demás nanomateriales, entre ellas, se caracterizan principalmente por su gran capacidad para absorber grandes cantidades de agua (o de cualquier disolvente compatible termodinámicamente) debido a la presencia de grupos funcionales hidrófilos, tal como lo son los grupos -OH, -COOH, -CONH-, -CONH₂- y -SO₃H (Neamtu et al., 2017). Esta propiedad, provoca que los nanogeles se hinchen e incrementen su volumen pero sin disolverse, volviéndolos flexibles, suaves (García & Hernández, 2016) y; permitiéndoles la capacidad de que distintas moléculas difundan dentro (carga del fármaco) y fuera (liberación del fármaco) de las cadenas poliméricas hinchadas (Li et al., 2017). Pueden encapsular más de una sustancia activa con diferentes propiedades en un mismo nanogel, lo cual, es una capacidad menos común en otro tipo de nanopartículas como micelas, liposomas, dendrímeros (Neamtu et al., 2017). La porosidad de las redes entrecruzadas de los nanogeles les provee de un reservorio ideal para la carga de medicamentos y también los protege de una posible degradación (Rao et al., 2013) ya que las enzimas no pueden penetrar en las nanopartículas (Li et al., 2017). Se ha reportado que los nanogeles con carga superficial exhiben mejores propiedades de internalización en las membranas celulares que aquellas que son neutras. Otra característica importante es que tienen una buena biocompatibilidad, como resultado de su alto contenido de agua (Li et al., 2017), por lo que no producen toxicidad en el cuerpo humano y; son biodegradables, esto debido a que muchos de ellos se componen, en mayor medida, de polímeros naturales por lo que pueden eliminarse fácilmente sin acumularse (Kesharwani et al., 2019). También, poseen una alta estabilidad (Zhang et al., 2016). El tamaño de los nanogeles puede ser ajustable y se considera que son especialmente importantes para la liberación de

fármacos anticancerígenos debido a que pueden presentar tamaños entre los 5 a 1000 nm, tamaños ideales para la entrega intracelular de fármacos (García & Cuggino, 2018a; Zou et al., 2019), El tamaño debe ser lo suficientemente grande para que no haya fugas a través de capilares sanos y lo suficientemente pequeño para escapar del sistema de fagocitos mononucleares, se recomiendan tamaños entre 10 y 100 (menor a 200 nm) que provocan que se acumulen preferentemente en los sitios del tumor a través de un efecto mejorado de permeabilidad y retención al tener la capacidad de atravesar de forma pasiva los vasos sanguíneos de los tumores que son anormalmente grandes en comparación con los tejidos sanos (Nie, 2010) y; evitan que sean percibidos por el sistema de fagocitos mononucleares (Khoee & Asadi, 2016) y, de esta manera, realizar la liberación intracelular del fármaco; cabe mencionar que, se recomienda un índice de polidispersidad (PDI) menor a 0.2, lo cual, indica una monodispersidad en las formulaciones terapéuticas (García & Cuggino, 2018b). En cada uno de estos casos, el nanogel supera una deficiencia previa en la biodistribución, permitiendo la acumulación y una mayor entrega de carga útil cargada o encapsulada en el sitio deseado (Zhong et al., 2018). Los nanogeles se clasifican principalmente en dos categorías (figura 8) de acuerdo a su estructura reticulante y a sus componentes sensibles a estímulos presentes en el ambiente (Molina et al., 2015). Su estructura general se ve afectada por el grado de reticulación entre las cadenas de monómeros que, puede ajustarse dependiendo de la cantidad y del tipo de reticulante que se utilice al momento de su síntesis (Hajebi et al., 2019). Además, como un ideal sistema de administración de fármacos, los NGs tienen una excelente capacidad de carga de fármacos, hidrofiliidad, una alta estabilidad, consistencia biológica (suave) y, responden a una gran variedad de

estímulos, tanto internos (como fuerza iónica, temperatura y pH) como externos (ultrasonido, electricidad, fuerzas magnéticas) que le permiten liberar de manera controlada los compuestos activos (Zhang et al., 2016). Otro punto importante sobre los nanogeles es que son internalizados en las células a partir de un proceso de endocitosis mediada por un mecanismo de moléculas transmembranales (Villarreal-Gómez et al., 2018).

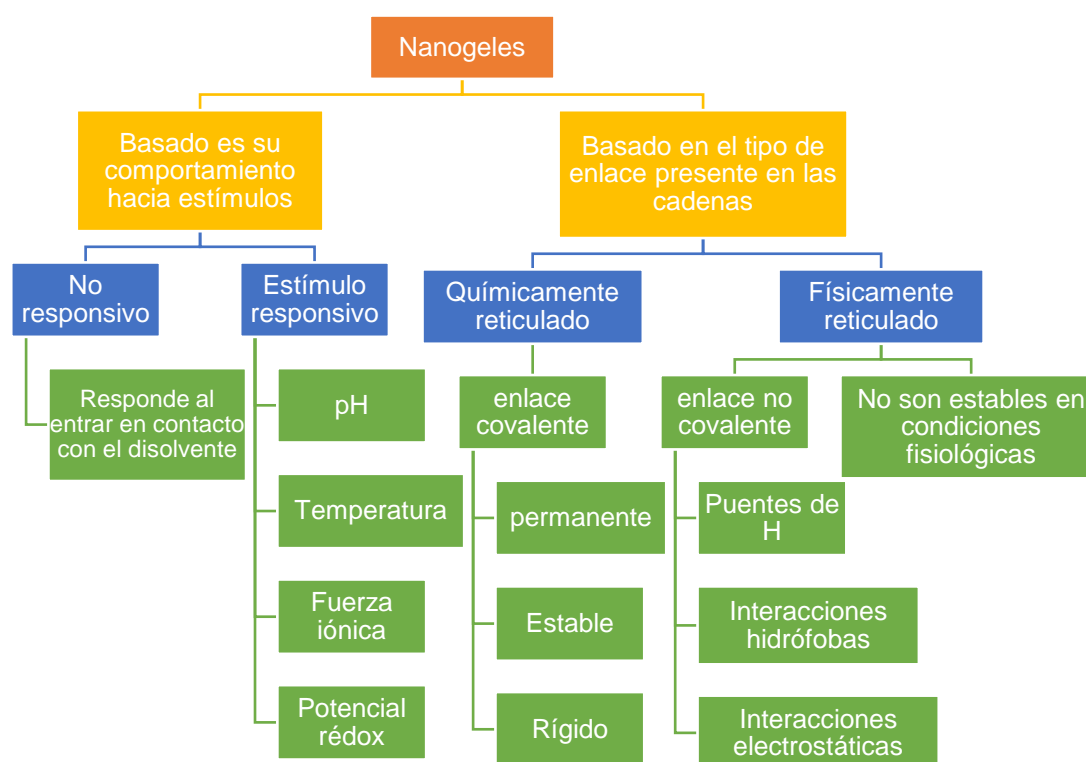


Figura 8. Clasificación de los nanogeles (Kesharwani et al., 2019).

II.5. Nanogeles sensibles a pH

El término sensible al medio, también conocido como material “inteligente”, hace referencia a materiales poliméricos que responden a distintos cambios en el entorno externo con un cambio en su estructura (Hajebi et al., 2019). Los NGs a

base de polímeros inteligentes, entonces, pueden responder a diversos estímulos que incluyen, por ejemplo, temperatura y pH (Molina et al., 2015). La sensibilidad al pH se puede conseguir al utilizar durante su síntesis monómeros poseedores de grupos funcionales ionizables (ácidos o bases débiles), de tal modo que, cuando el pH se aproxima al pKa del monómero iónico incorporado por polimerización en las cadenas reticuladas, provoque el aumento del volumen del nanogel debido a su hinchamiento, lo que conllevará a un incremento del tamaño de los poros de la red polimérica, facilitando la salida de las moléculas que estaban en su interior hacia el exterior del nanogel o, en caso contrario, se evite la salida de las moléculas del nanogel debido al encogimiento (figura 9) (Hernández-Olmos, 2014; Neamtu et al., 2017; Vicario-de-la-Torre & Forcada, 2017). Los NGs aniónicos incluyen grupos de ácido carboxílico o ácido sulfónico; si el pKa del polímero es menor que el pH del medio ambiente, el polímero se encontrará mayormente ionizado y la estructura iónica conducirá a una mayor repulsión electrostática dentro de la red que llevará a un hinchamiento general (Hajebi et al., 2019). Estos cambios conformacionales llevarán a la liberación del fármaco encapsulado (García & Cuggino, 2018b). Este punto es clave para la terapia contra el cáncer con NGs (Zhang et al., 2016) ya que se ha demostrado que el ambiente extracelular del tumor es ácido, usualmente se encuentra un valor de pH de alrededor de 6.5-7.0 (Hajebi et al., 2019), mientras que el ambiente intracelular va de neutro a alcalino (Wielińska et al., 2019) por lo que la liberación del fármaco de los NGs inteligentes dentro del tejido o dentro de la célula diana ocurrirá rápidamente (Soni et al., 2016).

En el caso del cáncer de colon, los fármacos son encapsulados con polímeros sensibles a pH que pueden resistir el ambiente ácido del estómago y liberan los fármacos de una manera controlada en un ambiente con pH neutro cercano al pH del colon con el fin de potenciar la eficacia terapéutica y reducir o evitar los efectos adversos (Banerjee et al., 2017).

El polímero PCAM10 (figura 10) propuesto presenta un grupo COOH ionizable que, se espera que tenga un comportamiento de hinchamiento sensible a pH básico para que libere su contenido en la región colónica.

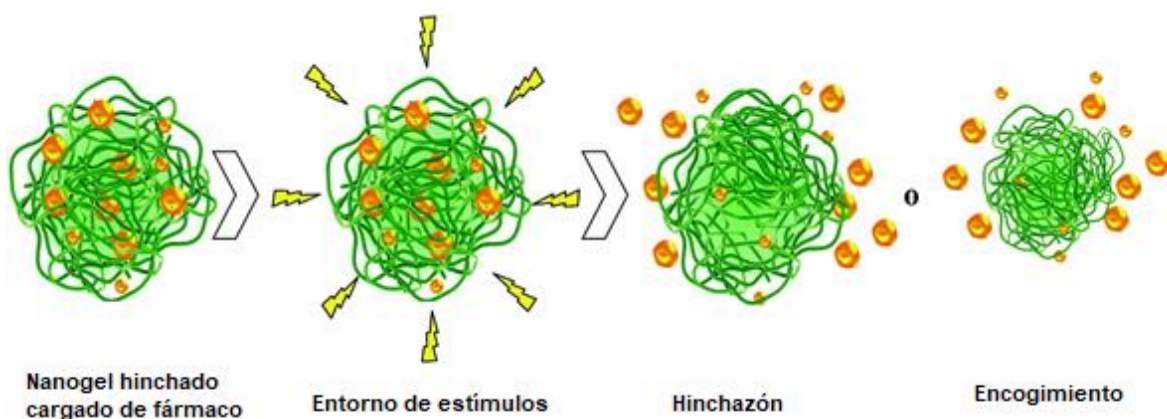


Figura 9. Sistema de liberación por hinchamiento activado por sensibilidad al pH (Neamtu et al., 2017).

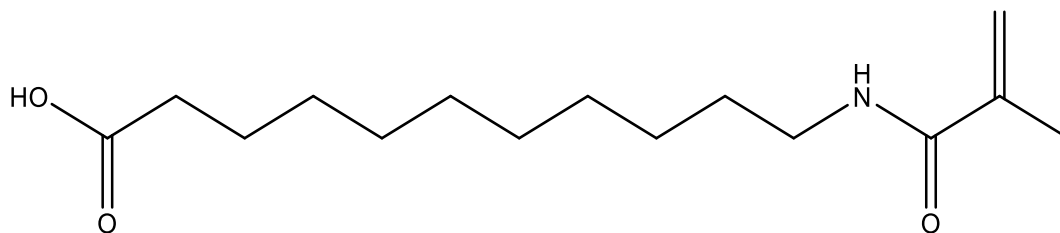


Figura 10. Estructura del polímero ácido 11-metacrililamido undecanoico.

II.6. Síntesis de nanogeles

Los nanogeles pueden ser sintetizados a través de varios métodos, incluyendo miniemulsión inversa, nanoprecipitación y a partir de polimerizaciones por dispersión (García & Cuggino, 2018b). También se utiliza el método de polimerización en emulsión inversa, en donde se utilizan monómeros hidrofílicos, como acrilamida, ácido acrílico y ácido metacrílico que son emulsificados en una fase continua y polimerizados (Jenjob et al., 2019). El método a utilizar en este trabajo será el método de polimerización en emulsión.

II.6.1. Polimerización en emulsión

Las emulsiones son mezclas de dos o más líquidos inmiscibles en los que uno o más líquidos son dispersos en otro líquido; las emulsiones como agua en aceite (W/O), aceite en agua (O/W), aceite en agua en aceite (O/W/O) y agua en aceite en agua (W/O/W) son muy utilizadas en distintas aplicaciones farmacológicas (figura 11) (Jenjob et al., 2019).

La polimerización en emulsión es el principal proceso de polimerización heterogénea para producir nanopartículas poliméricas. En un proceso directo, que se trata de emulsiones de aceite en agua, los monómeros hidrofóbicos son emulsificados en una fase continua acuosa, seguido de la polimerización (Jenjob et al., 2019). También se añaden un entrecruzante (agente de reticulación (Hajebi et al., 2019)), un iniciador de polimerización y un surfactante, este último, provee estabilización electrostática, estérica o electro-estérica al sistema coloidal y evita la coagulación durante la polimerización (Kesharwani et al., 2019). Este método provee de partículas de polímero submicrónicas, típicamente con un tamaño

promedio entre 50 y 500 nm (Jenjob et al., 2019) el cual, se puede ajustar dependiendo de la cantidad de entrecruzante (Li et al., 2017). Una partícula típica contiene de 1 a 10,000 macromoléculas y cada macromolécula está compuesta de 100 a 10⁶ unidades monoméricas (Jenjob et al., 2019). Una desventaja que presenta este método es que se debe de eliminar al final el surfactante y los monómeros que hayan quedado sin reaccionar (Hajebi et al., 2019).

El proceso inicia con la emulsión del monómero hidrofóbico en solución acuosa con un entrecruzante; al mezclar, el monómero se dispersa en gotitas de 10 μm de diámetro. Estas gotitas junto con el entrecruzante se estabilizan al adicionar surfactante que, al exceder la concentración micelar crítica (CMC), forman agregados esféricos con un diámetro de 2 - 10 nm conteniendo de 50-100 moléculas de surfactante que se hinchan al comenzar a absorber moléculas vecinas de monómero. Los surfactantes aumentan el número de partículas y disminuyen su tamaño (Lovell & Schork, 2020). El proceso de reticulación se lleva a cabo en tres ubicaciones de los nanogeles, incluido el centro de las micelas, la superficie y el área entre la superficie y el centro y, se logra mediante métodos físicos o químicos, tal y como ya se mencionó anteriormente (Hajebi et al., 2019). Al aplicar un iniciador soluble en agua (por ejemplo, persulfato de amonio (APS)) inicia la propagación de radicales libres por descomposición térmica en el disolvente y entra en la micela, donde comienza la polimerización del monómero (El-hoshoudy, 2018). Durante la polimerización, gotas de monómero continúan entrando desde la fase acuosa hacia el interior de la micela incrementando su tamaño hasta que se agotan los monómeros, con el fin de continuar la reacción hasta que un segundo radical entre y termine la reacción de polimerización. Una representación esquemática de lo que

ocurre dentro del proceso de polimerización en emulsión se muestra en la figura 12. Las micelas hinchadas con monómero desaparecen ya sea por la absorción de radicales para convertirse en partículas, o por la migración de su surfactante hacia las partículas que crecen (Hernández-Olmos, 2014).



Figura 11. Tipos de emulsiones: aceite en agua (O/W), agua en aceite (W/O), agua en aceite en agua (W/O/W), y aceite en agua en aceite (O/W/O) (Jenjob et al., 2019).

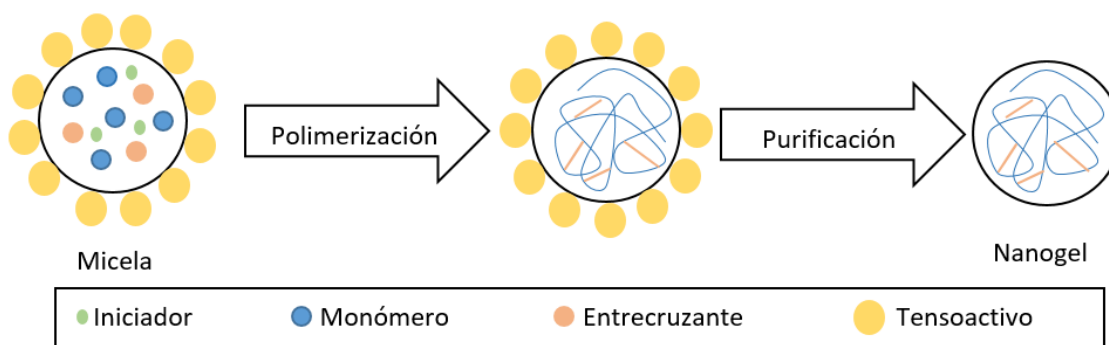


Figura 12. Síntesis de nanogeles por polimerización en emulsión (Khoee & Asadi, 2016).

CAPITULO III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1. Materiales

III.1.1. Reactivos

Ácido 11-metacriloilamino undecanóico (CAM10), etilenglicol dimetacrilato (EGDMA) (Sigma-Aldrich), persulfato de amonio (APS), dodecibenceno sulfonato de sodio (DBS) (Sigma-Aldrich), 5-fluorouracilo (5-FU) (99% TLC, Sigma-Sldrich), bromuro de 3- (4, 5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT), dimetilsulfóxido (DMSO) al 5%, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 0.1%, resina removedora de hidroquinona, buffers de 1.2, 2, 3, 4, 5, 6, 6.8, 7, 7.4, 8 y 9; carbonato de calcio (CaCO₃) al 1%, agua destilada, alcohol etílico de 96°, medio de cultivo RMPI-1640, suero fetal bovino (SFB), tripsina al 0.25%.

III.1.2. Insumos de laboratorio

Membrana o tubo de diálisis de 12-14.000 D, pinzas de diálisis, gas nitrógeno con manguera, soporte universal con pinzas, matraz bola, parrillas con agitación, agitador magnético, termómetro, balanza analítica, charolas para pesar, jeringas para gas, tapón de hule, vasos de precipitados de 10 y 100 ml, probeta de 100 ml, baño de aceite, viales color ámbar, pipetas transfer, papel parafilm, matraces volumétricos de 10 ml, espátulas, tubos cónicos Falcon de 50 ml, micropipetas de 20 µl, 100 µl y 1000 µl, cubetillas para DLS, celdas de potencial Z, celdas para UV-visible, viales labconco.

III.1.3. Equipos

Dispersión de luz dinámica (DLS) Zetasizer Nano-Zs series, de marca Malvern Instruments, modelos ZEN3500 con láser verde de 532 nm; potenciómetro,

se utilizó un medidor de pH 430 Corning, para preparar los buffers de diferentes pH; espectrofotómetro ultravioleta-visible, UV-VS spectrophotometer Beckman Coulter DU520 con un dual cell peltrier accesory; sistema liofilizador equipo Freeze Dry Sistem/Freezone 4.5 Labconco serie 0309095570, 60 cyclos; ultrasonido (Branson 5510); ultracentrífuga modelo VWR Clinical 50 (Beckman coulter); balanza analítica (Pioneer, OHAUS) para pesar muestras o reactivos; espectrofotómetro de infrarrojo con transformada de Fourier de la marca Pekín Elmer, modelo 1600 series FT-IR: número de barridos: 8, de 4000 a 450 cm^{-1} , resolución 4, intervalo de 2.0 cm^{-1} ; baño de control de temperaturas de la marca VWR International Shel Lab modelo 1217 y; equipo de microscopio electrónico de barrido de emisión de campo, modelo JSM7800 F Prime.

III.1.4. Gases

Nitrógeno grado alta pureza (UHP), de INFRA S.A. de C.V.

III.2 Métodos

III.2.1 Purificación de etilenglicol dimetacrilato: Se corrió 2 ml de EGDMA por una columna empacada con resina removedora de hidroquinona y 2 ml de metil hidroquinona para remover el inhibidor de EGDMA y se dejó en refrigeración para posteriores estudios.

III.2.2 Síntesis de nanogeles: Los nanogeles fueron sintetizados por el método de polimerización en emulsión (Jung et al., 2009). El monómero fue CAM10, EGDMA fue utilizado como entrecruzante, DBS como tensoactivo y APS fue el iniciador de la reacción de polimerización. Para iniciar con la síntesis, CAM10, DBS y EGDMA se mezclaron utilizando las cantidades presentadas en la tabla 2,

en un matraz de 100 ml conteniendo 50 ml de agua destilada, en agitación constante y a temperatura ambiente, formando una solución acuosa al 1% p/v. En caso de que no se disolviera por completo la emulsión, se procedió a aplicar calor.

Tabla 2. Reactivos utilizados para la síntesis de los nanogeles y sus cantidades.

Reactivos	Cantidad (g, mmol)
CAM10 1% p/p	0.5 g (37.12 mmol)
EGDMA 5% mol	0.0183 g o 17.46 μ L (1.85 mmol)
DBS	0.05 g
APS 2% mol	0.010 g (0.74 mmol)

A continuación, la mezcla de reacción se vertió dentro de un matraz bola de 100 ml (recipiente de reacción) que, enseguida se le colocó un tapón de hule y, se burbujeó con gas nitrógeno durante 30 minutos para eliminar el oxígeno. Posteriormente, el recipiente de reacción se colocó dentro de un baño de aceite a 80°C y se dejó en agitación vigorosa y constante por al menos 30 minutos. Después, se añadió una solución acuosa de APS al 2% que actuó como iniciador térmico para dar inicio a la reacción de polimerización que se mantuvo por un periodo de 4 horas. Los nanogeles obtenidos fueron dializados con agua destilada a temperatura ambiente mediante el uso de membranas de diálisis por 48 h, con cambios de agua cada 6 h, esto con el propósito de purificar el producto. Cabe mencionar que, para asegurar la purificación, se utilizó una solución de CaCO₃ al 1% con el fin de verificar la ausencia de detergente a partir de la precipitación del CaCO₃ en agua.

III.2.3 Caracterización de los nanogeles

III.2.3.1. Diámetro hidrodinámico: 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. Para esto, se diluyeron 100 μ l de muestra aforando a un volumen de 10 ml de agua destilada y filtrada. Posteriormente, se tomaron 15 μ l de la mezcla anterior aforando a 1.5 ml con medios de diferentes pHs (1.2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9) y se procedió a correr la muestra en el equipo a 25°C por triplicado; obteniendo así, el % en volumen del diámetro hidrodinámico de los nanogeles.

III.2.3.2. Potencial zeta: El potencial z se analizó con la finalidad de determinar la carga de la superficie de los nanogeles. Se tomaron 15 μ l de las emulsiones previamente purificadas y se diluyeron en 1.5 ml de buffer de diferentes pHs (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 colocarlas dentro del equipo DLS y obtener los resultados para analizar el potencial z.

III.2.3.3. Imágenes STEM: Se adquirieron imágenes de microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM) de los nanogeles con un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo. Para ello, esparcimos una gota de dispersión de nanogeles (0.4% en peso) sobre la superficie de una rejilla de cobre y carbono de malla 400. Se añadió una gota de acetato de uranilo (2% en peso) a la rejilla de cobre de carbono. Las muestras se secaron en horno de vacío a 22°C durante 24 h. Las muestras se sujetaron a un portamuestras STEM, se insertaron en la cámara de muestras y se observaron a 25 kV.

III.2.3.4. Estudio FT-IR: se realizó espectroscopía FT-IR a las nanopartículas libres, a las nanopartículas cargadas con 5-FU y al 5-FU.

III.2.4 Liofilización y reconstitución de los nanogeles: Se realizaron estudios de estabilidad al proceso de liofilizado de 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.

III.2.4.1. Liofilización: Se tomaron los 50 ml de las emulsiones previamente purificadas y caracterizadas, se congelaron en viales cónicos y, posteriormente, se colocaron en el liofilizador con viales labconco durante dos días para obtener las muestras completamente secas.

III.2.4.2. Reconstitución: Para reconstituir el material, en un vial se adicionaron 10 mg del polvo liofilizado en 5 ml de agua destilada bajo agitación constante por 24 horas. Obteniendo la emulsión reconstituida, de la cual, se tomaron 15 μ l y se diluyeron en 1.5 ml de cada buffer. 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 y, para investigar si presentaban un comportamiento sensible al pH.

III.2.5. Cargado de los nanogeles con 5-FU: Para el cargado de 5-FU, previamente se hizo una curva de calibración con la que se obtuvieron los cálculos. Para el cargado de los nanogeles con 5-FU primero se preparó la disolución de los nanogeles (Solución A). En un vial con tapadera se disolvieron 100 mg de nanogeles en 20 ml de buffer de fosfatos pH 7.4 con agitación constante durante

48 h. El siguiente paso fue preparar la solución acuosa de 5-FU (Solución B) en un vial, para la cual, se pesaron 30 mg de 5-FU y se disolvieron con 10 ml de buffer de fosfatos pH 7.4 con agitación constante durante 24 a 48 h. Pasado el tiempo, la solución B se agregó a la solución A gota a gota y se dejó en agitación por 48 h. La mezcla se colocó en un tubo cónico Falcon de 50 ml y se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 h. El sobrenadante obtenido fue guardado en el congelador convencional y el sedimento se congeló durante 48 h. Una vez que se obtuvo el sedimento congelado se procedió a liofilizarlo por 48 h. Finalmente, se realizó la cuantificación del cargado de los nanogeles colocando en un frasco con tapadera 10 mg del liofilizado en 10 ml de etanol, se agitó vigorosamente y, luego de 48 h, se filtró con una membrana de 0.22 μm , se tomó 1 ml y se colocó en una cubetilla para leerse en el espectrofotómetro a 275 nm. También, se procedió a leer 1 ml del sobrenadante para determinar la capacidad y la eficiencia de cargados con las ecuaciones 1 y 2 que se encuentran en anexo 1 y; utilizando la curva que se encuentra en el anexo 2.

III.2.7. Cinética de liberación *in vitro* de 5-FU: Para los estudios de liberación controlada, se dispersaron 5 mg de nanopartículas cargadas en 10 ml de solución tampón pH 7.4 y luego se agregaron a un tubo de diálisis, este paso se realizó por triplicado. Por otro lado, en otro tubo de diálisis se colocó una solución de referencia con el contenido de fármaco cargado en 5 mg de nanopartículas (0.7 mg). Cada tubo de diálisis prellenado y fijado en cada extremo por pinzas de diálisis se introdujo en 50 ml de medio de liberación dentro de un matraz que contenía la solución tampón correspondiente (pH 1.2, 6.8 Y 7.4). El matraz se colocó dentro de un baño de agitación que funcionó a 37°C con una velocidad de agitación de 50

rpm. Los tubos de diálisis permitieron la difusión de 5-FU en el medio de liberación mientras retuvieron las NPs. 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 h; se reemplazó el volumen con medio fresco en cada tiempo de muestreo. La fracción liberada de 5-FU se calculó a partir de mediciones de UV a 275 nm y luego se cuantificó usando la curva de calibración previamente preparada específicamente para 5-FU. Para calcular la fracción liberada del fármaco se utilizaron las curvas de los anexos 3, 4 y 5. Los resultados promedio de las medidas por triplicado se reportaron junto con la desviación estándar.

III.2.8. Ensayo de viabilidad celular de los nanogeles cargados con 5-FU: La viabilidad celular se determinó utilizando el ensayo de toxicología *in vitro* basado en MTT. Este es un método simple en el que el MTT es captado y reducido por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble de color morado, formazán. La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular; además, permite obtener información acerca de la citotoxicidad del compuesto que se evalúa. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán generado en el proceso (Puértolas Soto L., 2015). La metodología seguida se describe a continuación: Las células cancerígenas de cérvix, HeLa, se cultivaron en una placa de 96 pocillos (10×10^4 células / pocillo) y se incubaron en condiciones de crecimiento estándar durante 24 horas seguido de la adición de los diferentes grupos de tratamiento:

Grupo	Tratamiento para 5-FU
GRUPO A1-3	5-FU libre(5µg/ml)
GRUPO B1-3	5-FU libre (20µg/ml)
GRUPO C1-3	5-FU libre (50µg/ml)
GRUPO D1-3	5-FU libre (100µg/ml)
GRUPO E1-3	Nanogeles cargados(5µg/ml)
GRUPO F1-3	Nanogeles cargados(20µg/ml)
GRUPO G1-3	Nanogeles cargados (50µg/ml)
GRUPO H1-3	Nanogeles cargados (100µg/ml)
GRUPO A4-6	Sln de nanogeles (0.5mg/ml)
GRUPO B4-6	Sln de nanogeles (1mg/ml)
GRUPO C4-6	Control positivo (muerte) DMSO 5%
GRUPO D4-6	Control negativo células no tratadas, solo con medio

Se utilizó como concentración inicial para las diluciones, 1mg en 1.5 ml (0.6 mg/ml) de 5-FU y 1.5 mg en 1.5 ml (1 mg/ml) de nanogeles libres y nanogeles cargados. En todos los ensayos, las células no tratadas fueron utilizadas como control negativo (C-) y 5% de DMSO se añadió como control positivo de muerte celular (C+). Las células fueron incubadas por 24 h. Luego del tiempo de tratamiento, se añadió una solución de MTT (10 µL) a las células por 4 h para que formaran cristales de formazán por las deshidrogenasas mitocondriales. Luego, 100 µL de buffer de solubilización (10% Triton X-100, 0.1 N HCl in isopropanol) fue

añadido a cada pocillo e incubado a 37 °C con 5% CO₂ por 18 h para disolver los cristales de formazán, y la cantidad de formazán convertida por las células viables fue determinada mediante absorbancia a 620 nm en un lector de microplacas de 96 pocillos. Los resultados se normalizan a células no tratadas (100%) y se expresaron como el promedio ± error estándar de la media de triplicados para obtener el porcentaje de viabilidad celular calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\%Viabilidad\ celular = (Abs_{\text{promedio de muestra}} / Abs_{\text{promedio control}}) \times 100$$

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. Síntesis de nanogeles de CAM10 1% entrecruzados con EGDMA 5%

Se obtuvieron nanogeles dentro de una dispersión acuosa azul-blancuecina, con el método de polimerización en emulsión (figura 13), utilizando el monómero CAM10 como material sensible al pH y EGDMA como entrecruzante. El proceso de polimerización inició con una solución transparente y después, la mezcla de reacción se volvió turbia debido a la insolubilidad de los componentes de las nanopartículas, de igual manera como ocurrió con Jung et al., 2009.

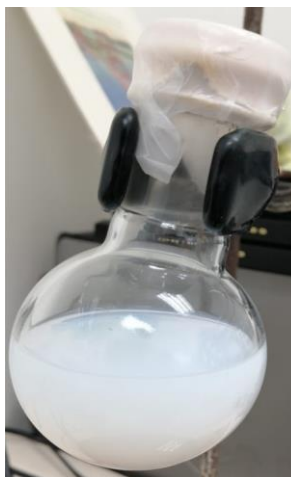


Figura 13. Nanogeles sintetizados.

Esta coloración de la dispersión obtenida se debe al efecto Tyndall, este es un tipo de dispersión de luz que toma lugar en soluciones coloidales que contienen tamaños de partículas menores que la longitud de onda de luz visible (400 a 760 nm). Algunos investigadores lo utilizan para evaluar cualitativamente la agregación a nivel nanométrico (Xiao et al., 2019), por lo que, de acuerdo a nuestros resultados, observamos que existía cierto grado de agregación o nuestras nanopartículas presentaban un tamaño grande.

IV.2. Caracterización de los nanogeles

IV.2.1. Diámetro hidrodinámico

A los nanogeles sintetizados se les realizaron pruebas de caracterización. Una de ellas fue medir el efecto del tamaño del diámetro hidrodinámico a diferentes valores de pH. Por un lado, se encontró que, a pH ácidos, de 1.2, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0, el diámetro hidrodinámico era muy grande (≥ 1000 nm aprox.); se considera que esto fue debido a que los nanogeles se encontraban en un estado colapsado por la ausencia de cargas, lo que llevo a uniones hidrofóbicas resultantes, provocando que los nanogeles se precipitaran o aglomeraran, obteniendo tamaños grandes. Por otro lado, a pH ligeramente ácido, neutro y básico, de 6.0, 7.0, 7,4, 8 y 9, se obtuvieron diámetros hidrodinámicos pequeños (≤ 100 nm), lo cual, podría deberse a que el polímero, al encontrarse a un pH muy cercano o por encima de su pKa, se desprotona, incrementando el carácter hidrofílico del polímero, además, la repulsión electrostática y la presión osmótica generada dentro del nanogel debido a los contraiones atrapados provoca el hinchamiento y, por tanto, evita que los nanogeles se agreguen, por lo que se encontraran separados y presentarán un tamaño más pequeño. En la figura 14 se presenta el tamaño promedio obtenido en cada pH, en donde se puede observar que los tamaños de los pH 6 a 9 estuvieron entre los 60 y 90 nm (figura 15). Estos tamaños son buenos tomando en cuenta que previamente se ha reportado la síntesis de nanogeles para su uso en cáncer de colon con un diámetro medio de 150 nm (Ashwanikumar et al., 2012), similar a los diámetros que se obtuvieron en este trabajo. En el anexo 6 se presentan los datos obtenidos.

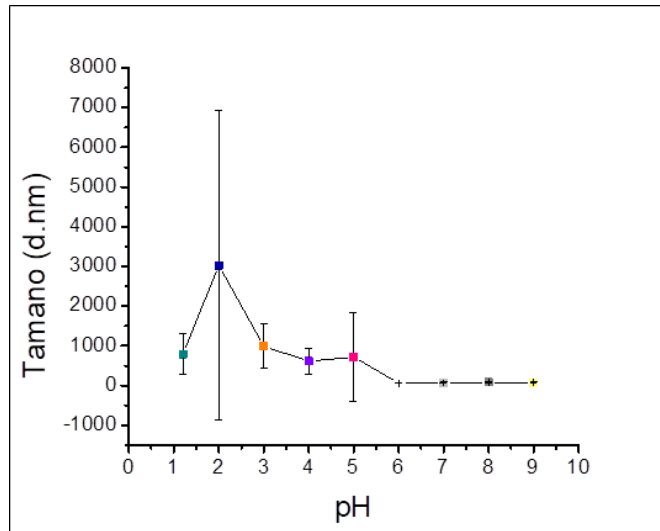


Figura 14. Tamaño promedio de los nanogeles sintetizados a distintos valores de pH (promedio \pm D.E., n=3).

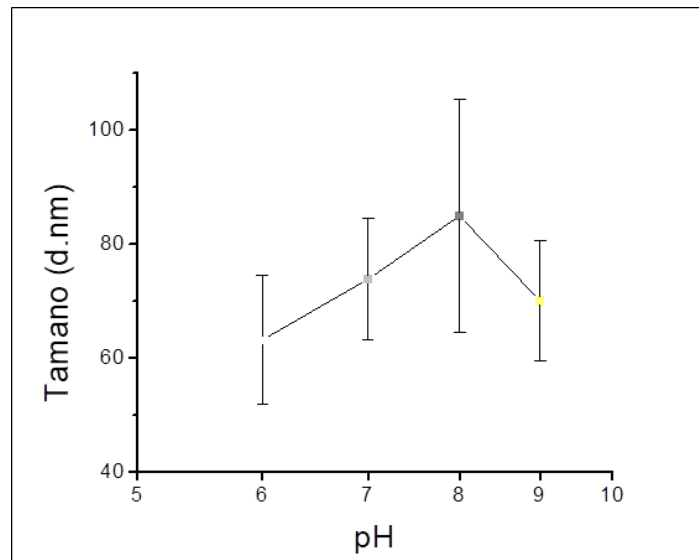


Figura 15. Tamaño promedio de los nanogeles sintetizados a los valores de pH de 6.0, 7.0, 8.0 y 9.0 (promedio \pm D.E., n=3).

IV.2.2. Potencial zeta

Los nanogeles también fueron caracterizados a partir de su potencial zeta a diferentes valores de pH (figura 16). La medición del potencial zeta permitió

determinar las cargas eléctricas presentes en la superficie de las nanopartículas, en donde se observa que el potencial zeta disminuyó a medida que incrementaba el pH, lo que demuestra la ionización del PCAM10. Se menciona en diversos artículos que la existencia de los grupos $-OH$ dentro del polímero es el factor clave para la capacidad de respuesta al pH de las nanopartículas (Sahu et al., 2017), tal y como es el caso de nuestro polímero. Por otro lado, el pKa reportado para este monómero es de 7.0 (Magaña et al., 2017). El cual, es importante conocer debido a que se encontró que a partir del pH 6.0, se obtuvo una carga superficial de $-25.8 \text{ mV} \pm 9.32$, considerada como la mayor carga negativa, es decir, donde se considera que las nanopartículas son más estables debido a la mayor repulsión de las cargas, lo cual es ideal ya que a ese pH es en donde nuestro polímero comienza a incrementar su ionización debido a que se acerca a su pKa. Además, el valor del potencial zeta revela que la naturaleza aniónica de PCAM10 exhibe una buena estabilidad ya que, de acuerdo a Sahu et al. 2017, el valor de los potenciales zeta que caen en el rango de ± 30 a $\pm 60 \text{ mV}$ se consideran dentro del margen de dispersión estable para las nanoformulaciones, por lo que nuestras nanopartículas, al encontrarse cerca de tal rango, son estables en el rango de pH deseado. Se debe tomar en cuenta que en soluciones acuosas como agua o buffers, las nanopartículas son uniformemente dispersadas y estabilizadas debido a las fuerzas repulsivas entre las nanopartículas originadas de los grupos de carga, incluyendo grupos carboxílicos (Jung et al., 2009). Sin embargo, debido a la alta hidrofobicidad del PCAM10, los nanogeles sintetizados no se dispersaban por completo en agua. En el anexo 7 se presentan los datos de potencial zeta obtenidos.

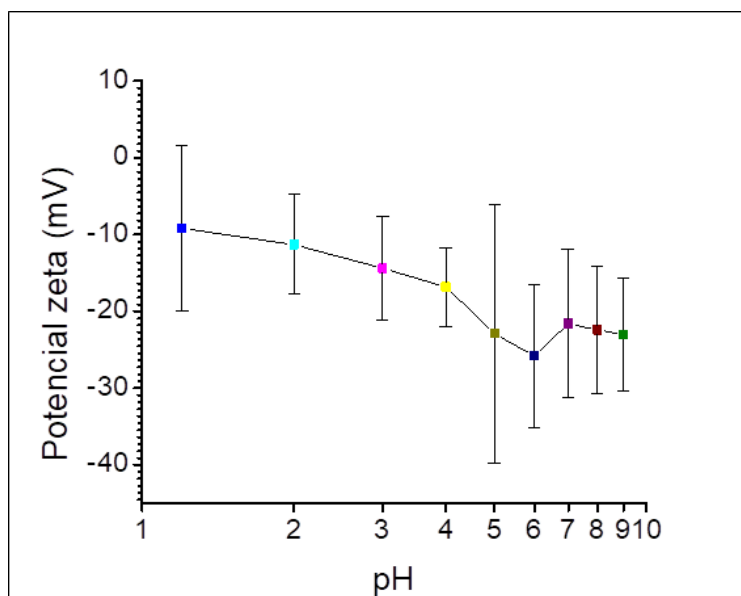


Figura 16. Potencial zeta a diferentes valores de pH (promedio \pm D.E., n=3).

IV.2.3. Imágenes STEM

Los estudios morfológicos de los nanogeles se caracterizaron por un análisis STEM. En la figura 17 se muestra el resultado obtenido en donde se encontró que los nanogeles presentaron una morfología con estructura esférica y cilíndrica; por otro lado, la formación de agregados es evidente, sin embargo, aquellas que no se encontraban agregadas mostraban una homogeneidad en la distribución del tamaño de 100 nm aproximadamente. Resultado similar al encontrado en agua, aproximadamente (figura 18). Las nanopartículas presentaron una superficie color negro debido a la acumulación de acetato de uranilo en las nanopartículas cargadas negativamente, similar a lo que se observó previamente en otro estudio (Cornejo-Bravo et al., 2021).

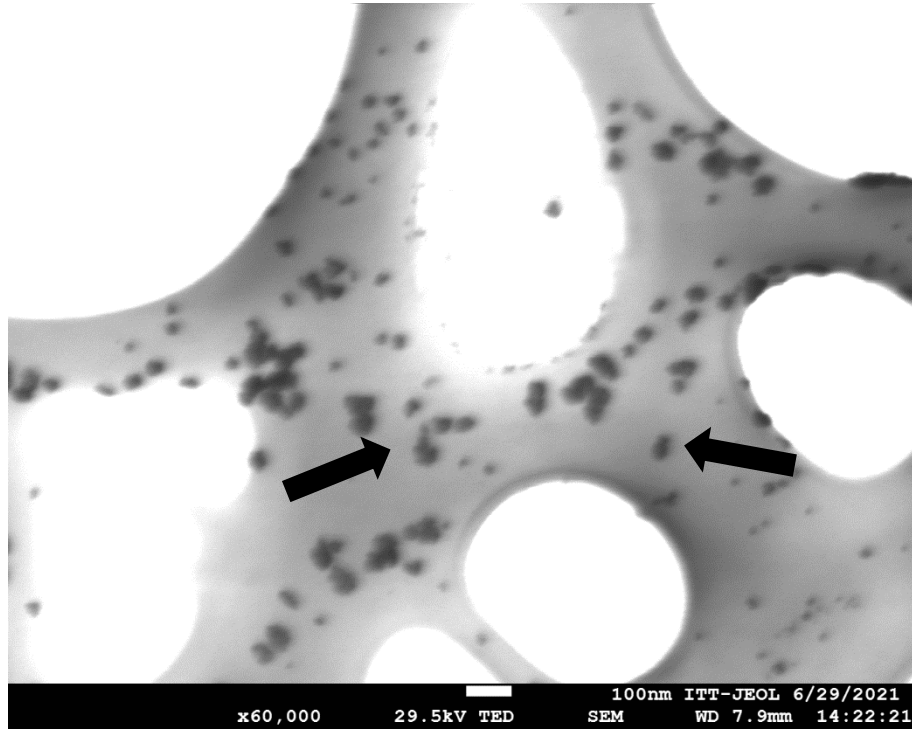


Figura 17. Análisis STEM. Las flechas indican cuales son las nanopartículas.

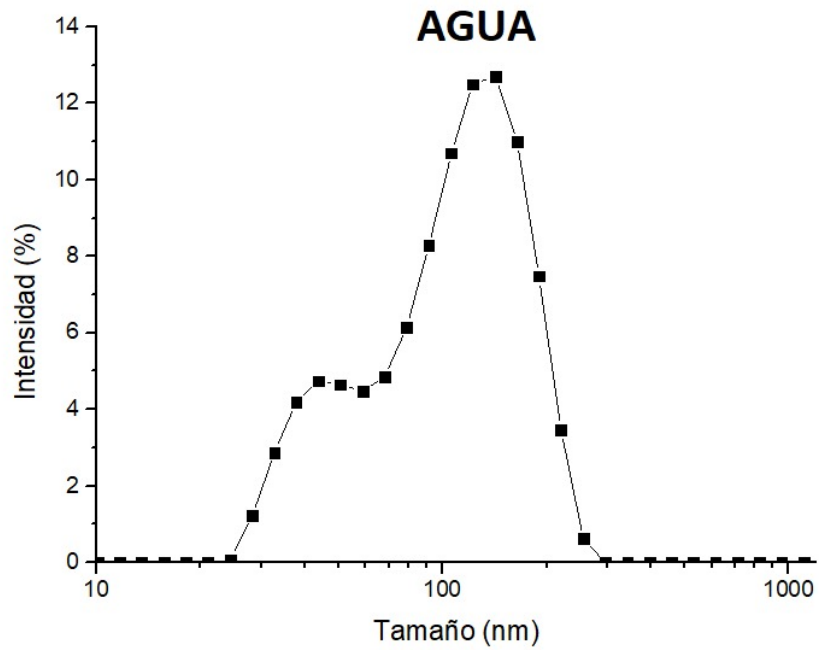


Figura 18. Tamaño promedio de las nanopartículas en agua.

IV.2.4. Análisis FT-IR

La figura 19 muestra el espectro FT-IR del ácido 11-metacrililamido undecanóico, 5-fluorouracilo y nanopartículas cargadas con 5-fluorouracilo. Las nanopartículas muestran una banda amplia a 3379 cm^{-1} equivalente al estiramiento N-H de una amina secundaria. Los picos a 2923 y 2852 cm^{-1} están relacionados al estiramiento C-H de un alcano, también un pico distintivo a 1707 cm^{-1} correspondiente a la vibración de grupos carboxílicos C=O no ionizados y, se encontró un pico a 1616 cm^{-1} de la vibración C=C. Los picos principales para 5-FU son una banda amplia de 3350 a 2750 cm^{-1} que está relacionado con la vibración de estiramiento N-H, un pico distintivo a 1648 cm^{-1} que muestra la vibración de estiramiento de C=O y un pico a 1244 cm^{-1} que coincide con el estiramiento del enlace C-F. Las bandas en la región de la huella dactilar se deben a las vibraciones del anillo de pirimidina sustituido (994 - 550 cm^{-1}). Con respecto a los espectros de las nanopartículas cargadas con 5-FU, Se encontró la banda correspondiente a la vibración de estiramiento de N-H a 3379 cm^{-1} , los picos a 2923 cm^{-1} y 2852 cm^{-1} corresponden al estiramiento del enlace C-H de un alcano y los picos a 1710 cm^{-1} y 1616 cm^{-1} se relacionan al grupo C=O y al enlace C=C. Finalmente el pico de estiramiento de C-F fue encontrado a 1244 cm^{-1} . Estos hallazgos prueban la presencia de 5-FU en las nanopartículas, así como la interacción entre el polímero y el fármaco cuando el pico C=O se desplazó de 1707 cm^{-1} y 1648 cm^{-1} a 1710 cm^{-1} .

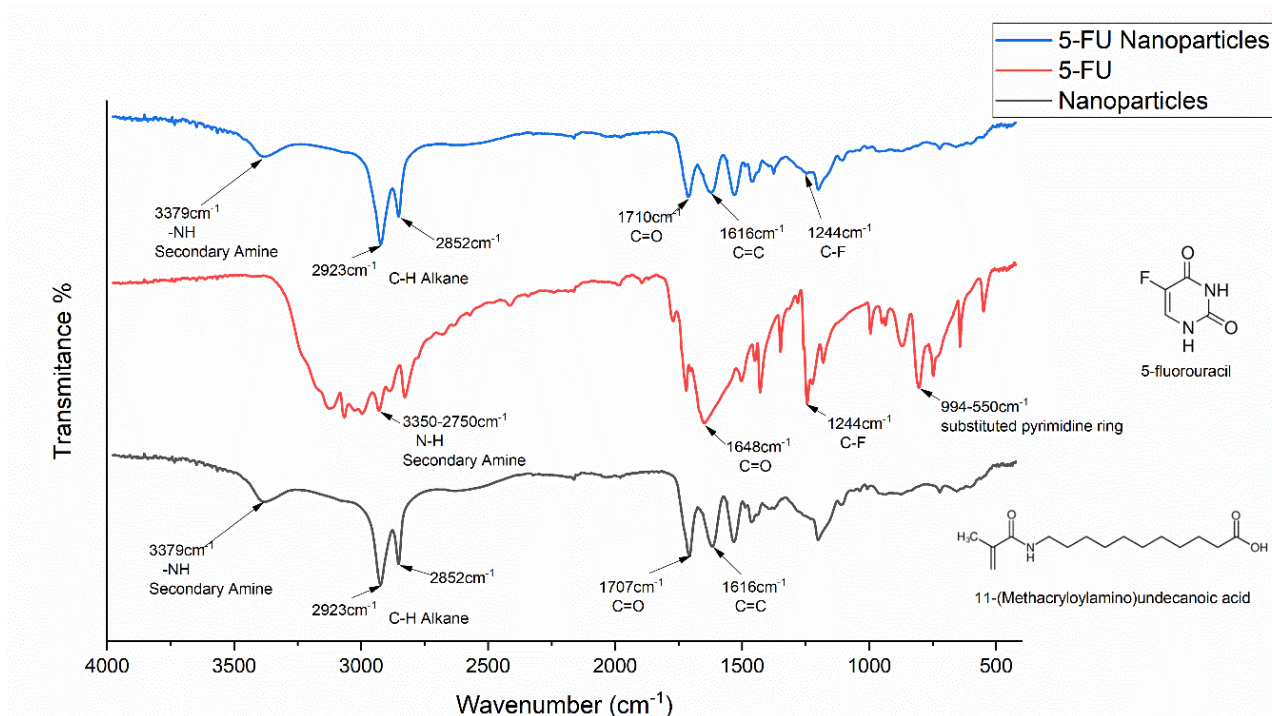


Figura 19. Espectro FT-IR del ácido 11-metacriloilamido undecanoico, 5-fluorouracilo y nanopartículas cargadas con 5-fluorouracilo.

IV.3. Liofilización y reconstitución de los nanogeles

Se procedió a realizar el estudio de estabilidad del material mediante liofilización y reconstitución. El liofilizado resultó ser un polvo blanquecino, sólido, esponjoso y fino (figura 20).



Figura 20. Muestra del liofilizado de los nanogeles sintetizados.

Para la reconstitución de los nanogeles, se volvió a medir el diámetro hidrodinámico a diferentes valores de pH con el fin de verificar su estabilidad luego del liofilizado, estos resultados se encuentran promediados en la figura 21 en donde se observa que los diámetros hidrodinámicos incrementaron en tamaño a diferencia de los diámetros hidrodinámicos obtenidos en la síntesis, lo cual, se podría deber precisamente a que luego del proceso de liofilización, de acuerdo a varios autores, las nanopartículas pueden llegar a presentar cambios en sus características, tal como este caso en el que ocurrió un aumento de tamaño en medio tampón, después de la liofilización debido a que suele generar tensiones en las NPs durante los pasos de congelación y secado (Azizi et al., 2010), de hecho, se sabe que durante la congelación de una muestra se produce una separación de fases en hielo y en una solución criocentrada, esta última solución se compone de NPs y otros componentes de la formulación como tensoactivos libres, amortiguadores y fármacos descargados. Esta alta concentración de partículas puede inducir agregación y, en algunos casos, fusión irreversible de NPs; además de que la cristalización del hielo puede ejercer una tensión mecánica sobre las NPs

conduciendo a su desestabilización. Por tal razón, se recomienda agregar protectores dentro de la suspensión de NPs antes de congelar con el fin de proteger estos sistemas, uno de los más comúnmente utilizados es el manitol (Abdelwahed et al., 2006). En este caso, los tamaños de los nanogeles en un rango de pH de 6.0 a 9.0 fueron de los 250 a 660 nm (figura 22). Estos tamaños se consideran adecuados y efectivos aun para un sistema de administración de fármacos debido a que en la literatura se menciona que, generalmente, se prefiere que el tamaño de los nanomateriales se encuentre en un rango de ~350–800 nm ya que estos tamaños serán más permeables a través de tejidos cancerosos en lugar de tejidos sanos (Banerjee et al., 2017). En el anexo 6 se presentan los datos obtenidos.

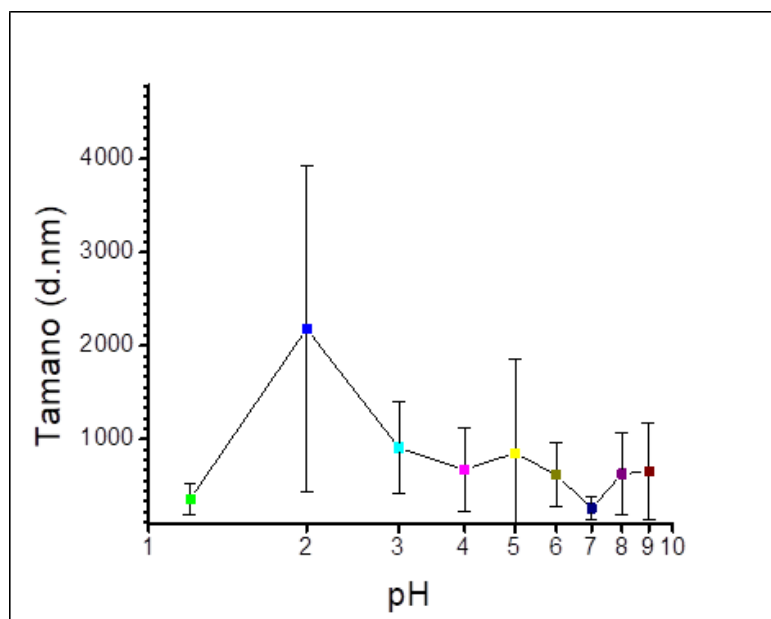


Figura 21. Tamaño promedio de los nanogeles a distintos pH luego del reconstituido (promedio \pm D.E., n=3).

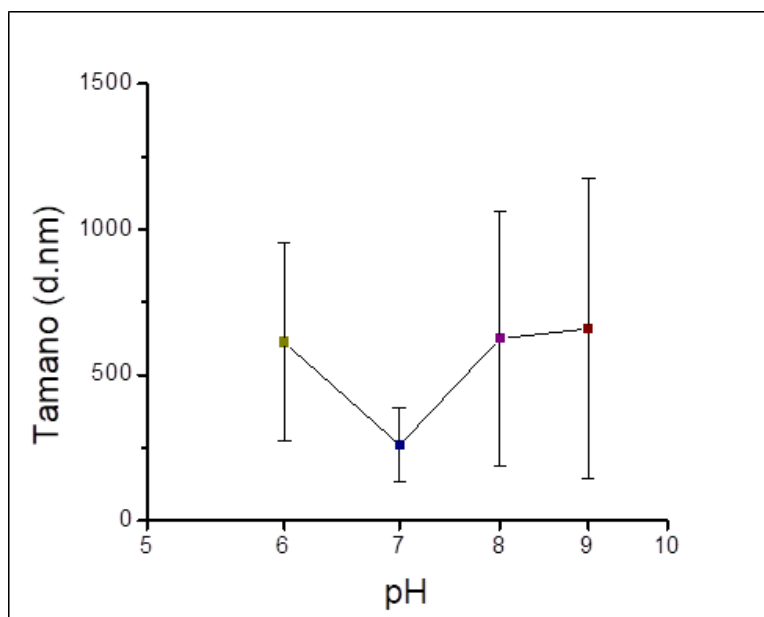


Figura 22. Tamaño promedio de los nanogeles a los pH 6.0, 7.0, 8.0 y 9.0, luego del reconstituido (promedio \pm D.E., n=3).

IV.4. Cargado de los nanogeles con 5-FU

Los experimentos de cargado con 5-FU en los nanogeles se realizaron de acuerdo al método de equilibrio. Con base en lo reportado por Ashwanikumar et., 2012 y, Zhu et al., 2013, los grupos carboxílicos presentes en las cadenas del polímero pueden formar enlaces de hidrógeno con los grupos amida en las moléculas de 5-FU para conformar complejos intermoleculares, por tanto, esta podría ser la forma en la que se forman nuestros complejos polímero-fármaco. En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos de acuerdo a la curva de calibración obtenida por UV-VIS (anexo 2) y a los cálculos utilizados en el anexo 1 para obtener la capacidad de carga del fármaco (CCF) y la eficiencia de carga del fármaco (EFC).

Tabla 3. Capacidad de carga del fármaco (CCF) y eficacia de carga del fármaco (ECF).

CCF (%)	ECF (%)
14.34	37.58

La encapsulación de un sistema de administración se informa muy comúnmente en términos de su porcentaje de CCF, es decir, el porcentaje en peso del fármaco cargado por unidad de peso del vehículo de administración. Para la mayoría de los acarreadores de administración de fármacos, se sugiere que el valor razonable para un CCF se encuentra entre 5 y 25%. Normalmente, las altas capacidades de carga informadas están en el rango del 10 al 60% (Chacko et al., 2012). Por otro lado, con respecto a la ECF, Sahu et al, 2017 menciona que una ECF cerca del 40% indica una carga de fármaco decente. Por tales razones, el CCF y la EFC obtenidos en esta investigación se consideran buenos.

IV.5. Estudio de liberación *in vitro* de 5-FU

Los experimentos para la liberación del 5-FU incorporado a los nanogeles se realizaron variando el pH del medio de liberación, con la finalidad de analizar la aplicación de los nanogeles en la liberación controlada y sostenida de los fármacos en condiciones fisiológicas similares a las encontradas en el TGI. Para cuantificar la cantidad de fármaco liberado con respecto a su absorbancia, se utilizaron las curvas de calibración mostradas en los anexos 3, 4 y 5 para cada pH. Por otro lado, para

obtener la fracción liberada con respecto al tiempo, se utilizaron los cálculos mostrados en los anexos 8, 9 y 10. El estudio de liberación in vitro de los nanogeles de CAM10 se realizó mediante el uso de bolsas de diálisis conteniendo buffers a pH 1.2, 6.8 y 7.4, junto la muestra, a 37°C. El patrón de liberación de nuestra nanoformulación a los diferentes pH se muestra en la figura 23 en donde en pH ácido, se liberó una baja concentración de fármaco, aproximadamente menos del 10% en 24 h. Por otro lado, a los pH de 6.8 y 7.4 se observó una liberación de 20% a las 2h y 30% a las 4 h respectivamente, con una liberación sostenida a lo largo del tiempo en el caso del pH 7.4. También se observa que, en el caso de la liberación a pH 6.8, inicia muy similar a la liberación en pH 7.4, sin embargo, a partir de las 2 h hay una disminución de la liberación. Además, la liberación de 5-FU libre fue mayor con respecto a la liberación del 5-FU cargado en los nanogeles, lo cual podría deberse a que el polímero utilizado al ser muy hidrofóbico, se ioniza, pero no se hincha lo suficiente como para liberar suficiente fármaco. Sin embargo, debido a que el 5-FU es un ácido débil (anión), existe cierta repulsión con los grupos ácidos del nanogel. Por tales motivos, se demostró que la liberación del fármaco de los nanogeles aumenta a medida que se incrementa el valor de pH, pero de una forma lenta y sostenida. Un caso similar se observó también en lo reportado por Ashwanikumar et al, 2012, en donde la liberación de 5-FU a partir de nanogeles a base de metacrilatos incrementaba conforme aumentaba el pH, mostrando a pH básico (7.8) un patrón de liberación sostenida a lo largo del tiempo y, llegando a una liberación de hasta el 90% a las 15 h, esta liberación controlada del fármaco de la matriz polimérica se atribuyó en gran medida a la hidrofilia y versatilidad de los nanogeles. Nuestros nanogeles siguen este modelo de liberación sostenida.

En la figura 24 se presenta la fracción liberada del 5-FU libre a los diferentes valores de pH. De acuerdo con un reporte previo, el 5-FU a pH ácido (6.0) fue liberado de hidrogeles en un 90.9% luego de 15 días de incubación, mientras que solo el 58.9% fue liberado a pH fisiológico (pH 7.4), esto podría atribuirse a la protonación a pH ácido de los grupos amino presentes en el 5-FU. Esto no presenta un problema en nuestro caso probablemente debido a la alta hidrofobicidad del polímero utilizado (Wu et al., 2016).

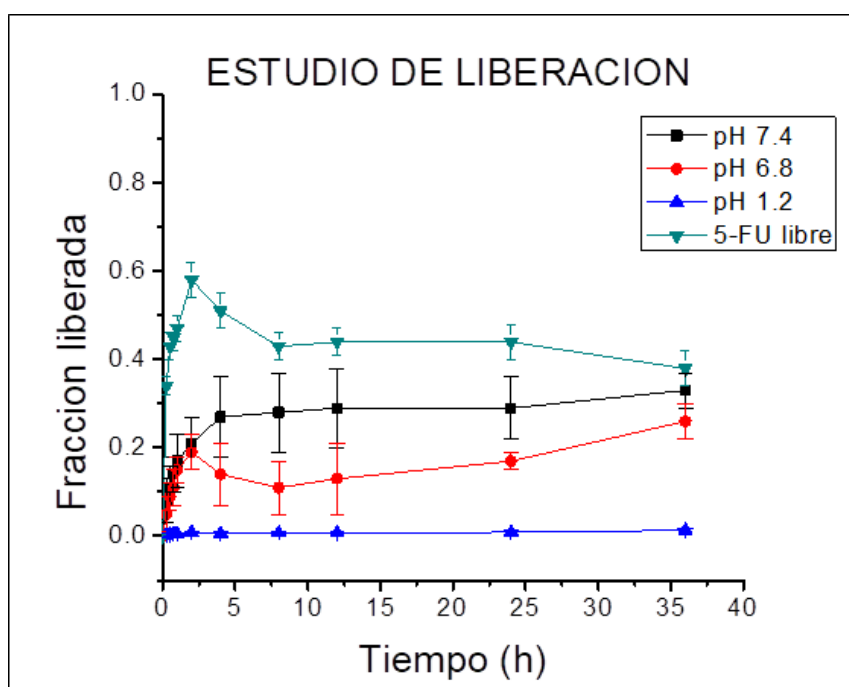


Figura 23. Fracción liberada *in vitro* de los nanogeles cargados con 5-FU y de 5-FU libre a los valores de pH 1.2, 6.8 y 7.4 (promedio \pm D.E., n=3).

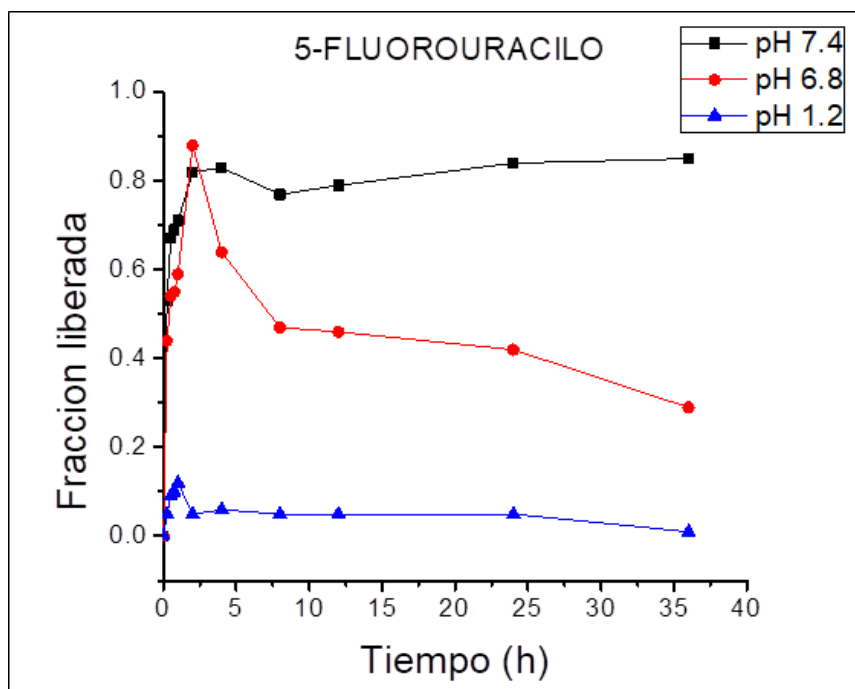


Figura 24. Fracción liberada promedio del 5-FU libre a los valores de pH 1.2, 6.8 y 7.4 (promedio \pm D.E., n=3).

IV.6. Estudio de viabilidad en la línea celular HeLa mediante el método de MTT

El perfil de viabilidad celular reveló que el 5-FU libre, los nanogeles cargados con 5-FU y los nanogeles libres, son citocompatibles a todas las concentraciones empleadas en el ensayo de MTT ya que todas las células se encontraron con una viabilidad mayor al 90% a las 24 h (figura 25-27). Las concentraciones utilizadas se presentan en el anexo 11. En el caso de los nanogeles libres (figura 27), se muestra una baja toxicidad hacia las células de cérvix, HeLa. Por otro lado, la baja toxicidad en el caso del 5-FU libre (figura 25) podría deberse a que las concentraciones utilizadas fueron muy pequeñas como para provocar muerte celular, esto se puede corroborar con base en lo reportado

por Sahu et al, 2017, en el que utilizaron concentraciones de 200 a 1000 $\mu\text{g/ml}$ de 5-FU con las que se observó que las células empleadas HaCaT (queratinocitos humanos inmortalizados) presentaron una viabilidad del 50% a la máxima concentración (1000 $\mu\text{g/ml}$) pero, al aplicar estas concentraciones a una línea celular de melanoma, se encontró una citotoxicidad mayor por parte del 5-FU. Además, de acuerdo a Wu et al, 2016, se realizó un estudio de citotoxicidad en donde se evaluó el porcentaje de viabilidad en las líneas celulares C26 (células de carcinoma de ratón), utilizando concentraciones de 5-FU que iban de los 8×10^{-8} hasta 80 $\mu\text{g/ml}$ y, se observó en los resultados que a partir de las concentraciones de 0.8 a 80 $\mu\text{g/ml}$ se obtuvieron porcentajes de viabilidad de 20 a 50%, por lo que si existió una muerte celular considerable a concentraciones similares a las utilizadas en este estudio. Sin embargo, en otro estudio se aplicaron concentraciones de 50 y 100 μM (650 y 13.050 μg , respectivamente) a la línea celular HeLa para evaluar la citotoxicidad, dentro de los resultados se encontró que el porcentaje de viabilidad fue de 65% para la concentración de 50 μM y 39% para la concentración de 100 μM (Benito-Miguel et al., 2015). Por lo tanto, es importante tomar en cuenta que el grado de citotoxicidad dependerá de la línea celular a utilizar, si se trata de una línea cancerígena o sana y, de las concentraciones seleccionadas. De acuerdo con este último artículo, podríamos inferir, ya que se utiliza la misma línea celular empleada en esta investigación, que las concentraciones utilizadas en el experimento de viabilidad celular fueron muy bajas como para producir citotoxicidad en la línea celular HeLa.

Por otro lado, también se observó que el 5-FU libre fue ligeramente más citotóxico en comparación con los nanogeles cargados (figura 26) para lo cual, se

tienen dos especulaciones, la primera se podría deber a que se utilizó la misma cantidad de nanogeles cargados que la utilizada con el 5-FU libre, sin tomar en cuenta la cantidad de 5-FU dentro de los nanogeles, razón por la cual, la concentración de 5-FU resultó ser mucho menor a la utilizada con el 5-FU libre. La segunda razón se podría deber a que el 5-FU es más tóxico al ser empleado de manera libre a diferencia de que si se encuentra encapsulado, sin embargo, se tendrían que realizar nuevos estudios con las concentraciones de fármaco dentro de nanogeles equivalentes a las del fármaco libre para poder comprobar esta idea, ya que en varios estudios en los que se encapsuló 5-FU dentro de nanogeles se observó mayor citotoxicidad con los nanogeles que con el fármaco libre, tal como lo reportó Ashwanikumar et al, 2012.

Es importantes tomar en cuenta que esta baja citotoxicidad por parte de los nanogeles cargados también se podría deber a la lenta liberación observada en el estudio anterior, otro motivo por el cual deberían repetirse algunos de los estudios aquí realizados.

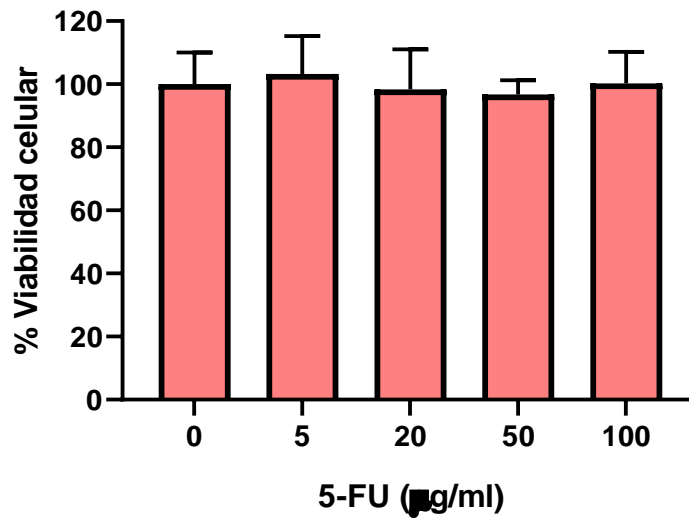


Figura 25. Evaluación de viabilidad celular del 5-FU libre mediante el ensayo MTT en la línea celular HeLa (promedio \pm D.E., n=3).

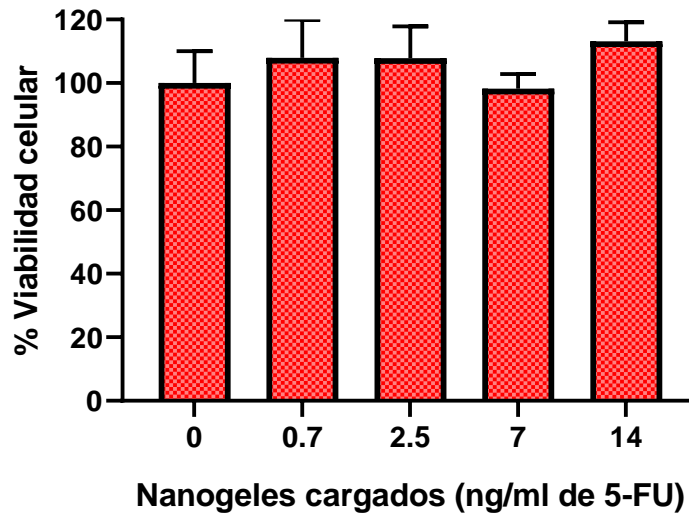


Figura 26. Evaluación de viabilidad celular de los nanogeles cargados de 5-FU mediante el ensayo MTT en la línea celular HeLa (promedio \pm D.E., n=3).

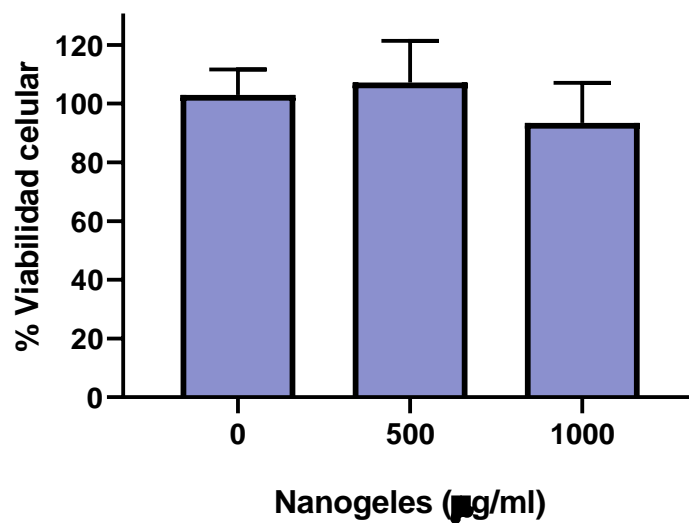


Figura 27. Evaluación de la citotoxicidad de los nanogeles libres mediante el ensayo MTT en la línea celular HeLa (promedio \pm D.E., n=3).

CAPITULO V. CONCLUSIONES

El tratamiento del cáncer de colon con 5-FU se asocia con una alta toxicidad, un alto metabolismo y baja biodisponibilidad. Por lo tanto, la terapia con 5-FU a menudo es ineficiente para el tratamiento del cáncer de colon. En este estudio desarrollamos NGs que fueron cargados con el fármaco 5-FU para superar estas limitaciones.

Los NGs sintetizados poseen tamaños dentro del rango óptimo para su uso como DDS, sin embargo, para mejorar su estabilidad luego del proceso de liofilización sería deseable utilizar un crioprotector. Además, mostraron una liberación muy lenta pero sostenida e incrementada a medida que el pH se elevaba por lo que, si demostraron ser sensibles a pH y podrían ser empleados para favorecer la liberación del fármaco directo en el colon en estudios *in vivo*. Además, se podrían utilizar para probar la liberación de otro tipo de fármacos o compuestos, debido a que también presentan un porcentaje de carga y eficiencia muy bueno.

A pesar de que no resultaron ser tóxicos para las células HeLa a las concentraciones utilizadas en este estudio, se debe de tomar en cuenta el incremento y la equivalencia de las concentraciones para obtener mejores resultados de citotoxicidad y poder evidenciar de mejor manera la posible citotoxicidad mayor por parte de los nanogeles cargados en comparación con el 5-FU libre, ya que no se realizó la conversión debida para tener dentro de los nanogeles la misma cantidad de 5-FU libre utilizada, asimismo, podrían ser probados en líneas celulares de cáncer de colon para conocer si las nuevas concentraciones utilizadas resultan ser más tóxicas en comparación con las células que se utilizaron en este estudio.

CAPITULO VI. REFERENCIAS

- Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., & Fessi, H. (2006). Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(15), 1688–1713.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.017>
- Amidon, S., Brown, J. E., & Dave, V. S. (2015). Colon-Targeted Oral Drug Delivery Systems: Design Trends and Approaches. *AAPS PharmSciTech*, 16(4), 731–741. <https://doi.org/10.1208/s12249-015-0350-9>
- André, T., Boni, C., Mounedji-Boudiaf, L., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., Topham, C., Zaninelli, M., Clingan, P., Bridgewater, J., Tabah-Fisch, I., & De Gramont, A. (2004). Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *New England Journal of Medicine*, 350(23), 2343–2351. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032709>
- Anita, Singh, A., & Ankit, D. (2019). A review on colon targeted drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(01), 47–56. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10\(1\).47-56](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(1).47-56)
- Anitha, A., Maya, S., Sivaram, A. J., Mony, U., & Jayakumar, R. (2016). Combinatorial nanomedicines for colon cancer therapy. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 8(1), 151–159.
<https://doi.org/10.1002/wnan.1353>
- Arem, H., & Lofffield, E. (2018). Cancer Epidemiology: A Survey of Modifiable Risk Factors for Prevention and Survivorship. *American Journal of Lifestyle Medicine*, 12(3), 200–210. <https://doi.org/10.1177/1559827617700600>

- Arévalo-Pérez, R., Maderuelo, C., & Lanao, J. M. (2020). Recent advances in colon drug delivery systems. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 327, pp. 703–724). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.09.026>
- Arias, J. L. (2008). Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery systems. *Molecules*, *13*(10), 2340–2369. <https://doi.org/10.3390/molecules13102340>
- Ashwanikumar, N., Asok Kumar, N., Asha Nair, S., Vinod Kumar, G., Kumar Chemical Biology, V., & Gandhi, R. (2012). Methacrylic-based nanogels for the pH-sensitive delivery of 5-Fluorouracil in the colon. *International Journal of Nanomedicine*, *7*, 5769–5779. <https://doi.org/10.2147/IJN.S31201>
- Azizi, E., Namazi, A., Haririan, I., Fouladdel, S., Khoshayand, M. R., Shotorbani, P. Y., Nomani, A., & Gazori, T. (2010). Release profile and stability evaluation of optimized chitosan/alginate nanoparticles as EGFR antisense vector. *International Journal of Nanomedicine*, *5*(1), 455–461. <https://doi.org/10.2147/ijn.s9551>
- Banerjee, A., Pathak, S., Subramaniam, V. D., Dharanivasan, G., Murugesan, R., & Verma, R. S. (2017). Strategies for targeted drug delivery in treatment of colon cancer: current trends and future perspectives. In *Drug Discovery Today* (Vol. 22, Issue 8, pp. 1224–1232). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.05.006>
- Benito-Miguel, M., Blanco, M. D., & Gómez, C. (2015). Assessment of sequential combination of 5-fluorouracil-loaded-chitosan-nanoparticles and ALA-

photodynamic therapy on HeLa cell line. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 12(3), 466–475. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.05.001>

Blondy, S., David, V., Verdier, M., Mathonnet, M., Perraud, A., & Christou, N. (2020). 5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: From classical pathways to promising processes. *Cancer Science*, 111(9), 3142–3154. <https://doi.org/10.1111/cas.14532>

Brigger, I., Dubernet, C., & Couvreur, P. (2012). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(SUPPL.), 24–36. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.006>

Calero, M. C. (2015). *Caracterización de nanopartículas magnéticas en cultivos celulares para sus aplicaciones biomédicas* *cellular studies of magnetic nanoparticles for biomedical applications*.

Cappell, M. S. (2008). Pathophysiology, Clinical Presentation, and Management of Colon Cancer. In *Gastroenterology Clinics of North America* (Vol. 37, Issue 1, pp. 1–24). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2007.12.002>

Chacko, R. T., Ventura, J., Zhuang, J., & Thayumanavan, S. (2012). Polymer nanogels: A versatile nanoscopic drug delivery platform. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(9), 836–851. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.02.002>

Chaturvedi, V. K., Singh, A., Singh, V. K., & Singh, M. P. (2018). Cancer Nanotechnology: A New Revolution for Cancer Diagnosis and Therapy. *Current Drug Metabolism*, 20(6), 416–429. <https://doi.org/10.2174/1389200219666180918111528>

- Cheng, H., Huang, S., & Huang, G. (2019). Design and application of oral colon administration system. In *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* (Vol. 34, Issue 1, pp. 1590–1596). Taylor and Francis Ltd.
<https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1655406>
- Chivere, V. T., Kondiah, P. P. D., Choonara, Y. E., & Pillay, V. (2020). Nanotechnology-based biopolymeric oral delivery platforms for advanced cancer treatment. *Cancers*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/cancers12020522>
- Cornejo-Bravo, J. M., Becerra, C. D., Palomino, K., Magaña, H., Rivero, I., López-Maldonado, E., & Serrano-Medina, A. (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.
<https://doi.org/10.1080/1539445X.2020.1769130>
- Cuggino, J. C., Molina, M., Wedepohl, S., Igarzabal, C. I. A., Calderón, M., & Gugliotta, L. M. (2016). Responsive nanogels for application as smart carriers in endocytic pH-triggered drug delivery systems. *European Polymer Journal*, 78, 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.02.022>
- Dekker, E., Tanis, P. J., Vleugels, J. L. A., Kasi, P. M., & Wallace, M. B. (2019). Colorectal cancer. *The Lancet*, 394(10207), 1467–1480.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32319-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32319-0)
- Diasio, R. B., & Harris, B. E. (1989). Clinical Pharmacology of 5-Fluorouracil. In *Clinical Pharmacokinetics* (Vol. 16, Issue 4, pp. 215–237). Clin

Pharmacokinet. <https://doi.org/10.2165/00003088-198916040-00002>

Díaz-Cuadra, E. M. (2016). *Toxicidad aguda por 5-fluorouracilo durante el periodo de Abril a Diciembre del año 2016 en el Hospital Escuela Dr. Roberto Calderón Gutiérrez*. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua.

Eguino Villegas, Ana. Fernández Crespo, Ana Isabel. Fernández Sanchez, Belén. García Alvarez, Graciela. Pascual Fernández, C. (2002). Cáncer colorrectal Guía práctica. *Aecc*, 12, 9–18.

Ehdaie, B. (2007). Application of nanotechnology in cancer research: Review of progress in the National Cancer Institute's alliance for nanotechnology. *International Journal of Biological Sciences*, 3(2), 108–110. <https://doi.org/10.7150/ijbs.3.108>

El-hoshoudy, A. N. M. B. (2018). Emulsion Polymerization Mechanism. In *Recent Research in Polymerization*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72143>

Fata, F., Ron, I. G., Kemeny, N., O'Reilly, E., Klimstra, D., & Kelsen, D. P. (1999). 5-Fluorouracil-induced small bowel toxicity in patients with colorectal carcinoma. *Cancer*, 86(7), 1129–1134. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19991001\)86:7<1129::AID-CNCR5>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19991001)86:7<1129::AID-CNCR5>3.0.CO;2-4)

Gao, Y., Xiao, X., Zhang, C., Yu, W., Guo, W., Zhang, Z., Li, Z., Feng, X., Hao, J., Zhang, K., Xiao, B., Chen, M., Huang, W., Xiong, S., Wu, X., & Deng, W. (2017). Melatonin synergizes the chemotherapeutic effect of 5-fluorouracil in colon cancer by suppressing PI3K/AKT and NF- κ B/iNOS signaling pathways. In *Journal of Pineal Research* (Vol. 62, Issue 2).

<https://doi.org/10.1111/jpi.12380>

García-Osogobio, S., Téllez-Ávila, F. I., Méndez, N., & Uribe-Esquivel, M. (2015).

Results of the first program of colorectal cancer screening in Mexico.

Endoscopia, 27(2), 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.endomx.2015.06.001>

García, J. F., & Hernández, C. F. (2016). Utilización de hidrogeles como

liberadores de fármacos. *Convención Científica de Ingeniería y Arquitectura*,

February 2017, 1–12. <https://www.researchgate.net/publication/311680954>

García, M. C., & Cuggino, J. C. (2018a). Stimulus-responsive nanogels for drug

delivery. In *Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery*

Applications: Volume 1: Types and Triggers. Elsevier Ltd.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101997-9.00016-3>

García, M. C., & Cuggino, J. C. (2018b). Stimulus-responsive nanogels for drug

delivery. In *Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery*

Applications: Volume 1: Types and Triggers. Elsevier Ltd.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101997-9.00016-3>

GLOBOCAN. (2018). *Cancer today*. International Agency for Research on Cancer

of the World Health Organization. [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2018&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&)

multi-

[bars?v=2018&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&p](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2018&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&)

[opulations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2018&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&)

[0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&n](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2018&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&)

[b_items=10&](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2018&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&)

GLOBOCAN. (2020). *Mexico: Globocan 2018*. International Agency for Research on Cancer-World Health Organization.

<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-factsheets.pdf>

Gulbake, A., Jain, A., Jain, A., Jain, A., & Jain, S. K. (2016). Insight to drug delivery aspects for colorectal cancer. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 22, Issue 2, pp. 582–599). Baishideng Publishing Group Co.

<https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i2.582>

Guler, Y., & Ovey, I. S. (2018). Synergic and comparative effect of 5-fluorouracil and leucovorin on breast and colon cancer cells through TRPM2 channels. *Bratislava Medical Journal*, 119(11), 692–700.

https://doi.org/10.4149/BLL_2018_124

Hajebi, S., Rabiee, N., Bagherzadeh, M., Ahmadi, S., Rabiee, M., Roghani-Mamaqani, H., Tahriri, M., Tayebi, L., & Hamblin, M. R. (2019). Stimulus-responsive polymeric nanogels as smart drug delivery systems. In *Acta Biomaterialia* (Vol. 92, pp. 1–18). Acta Materialia Inc.

<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.018>

Handali, S., Moghimipour, E., Rezaei, M., Ramezani, Z., & Dorkoosh, F. A. (2020). PHBV/PLGA nanoparticles for enhanced delivery of 5-fluorouracil as promising treatment of colon cancer. *Pharmaceutical Development and Technology*, 25(2), 206–218. <https://doi.org/10.1080/10837450.2019.1684945>

Handali, S., Moghimipour, E., Rezaei, M., Ramezani, Z., Kouchak, M., Amini, M.,

Angali, K. A., Saremy, S., & Dorkoosh, F. A. (2018a). A novel 5-Fluorouracil targeted delivery to colon cancer using folic acid conjugated liposomes.

Biomedicine and Pharmacotherapy, 108(July), 1259–1273.

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.128>

Handali, S., Moghimipour, E., Rezaei, M., Ramezani, Z., Kouchak, M., Amini, M.,

Angali, K. A., Saremy, S., & Dorkoosh, F. A. (2018b). A novel 5-Fluorouracil targeted delivery to colon cancer using folic acid conjugated liposomes.

Biomedicine and Pharmacotherapy, 108, 1259–1273.

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.128>

Hansova, B., Synek, S., & Opatrilova, R. (2011). 5-Fluorouracil – Characteristics and Analytical Determination. *Current Pharmaceutical Analysis*, 7(1), 1–11.

<https://doi.org/10.2174/157341211794708767>

Hernández-Olmos, S. L. (2014). Nanopartículas copoliméricas inteligentes (pH – y T – sensibles) y sus aplicaciones en biomedicina. *Tesis*, 1–4.

<http://www.mufm.fr/sites/mufm.univ->

[toulouse.fr/files/evenement/symposium/ponencias/saira_l._hernandez.pdf](http://www.mufm.fr/sites/mufm.univ-toulouse.fr/files/evenement/symposium/ponencias/saira_l._hernandez.pdf)

Herrera, A., & Granados, M. (2013). *Manual de oncología* (5ta ed.).

Procedimientos médicos quirúrgicos.

Hosseinfar, T., Sheybani, S., Abdouss, M., Hassani Najafabadi, S. A., & Shafiee

Ardestani, M. (2018). Pressure responsive nanogel base on Alginate-

Cyclodextrin with enhanced apoptosis mechanism for colon cancer delivery.

Journal of Biomedical Materials Research - Part A, 106(2), 349–359.

<https://doi.org/10.1002/jbm.a.36242>

Jabir, N. R., Tabrez, S., Ashraf, G. M., Shakil, S., Damanhour, G. A., & Kamal, M.

A. (2012). Nanotechnology-based approaches in anticancer research.

International Journal of Nanomedicine, 7, 4391–4408.

<https://doi.org/10.2147/IJN.S33838>

Jaferian, S., Negahdari, B., & Eatemadi, A. (2016). Colon cancer targeting using

conjugates biomaterial 5- fl uouracil. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, 84,

780–788. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.004>

Jenjob, R., Phakkeeree, T., Seidi, F., Theerasilp, M., & Crespy, D. (2019).

Emulsion Techniques for the Production of Pharmacological Nanoparticles.

Macromolecular Bioscience, 19(6), 1900063.

<https://doi.org/10.1002/mabi.201900063>

Ji, X., Peng, Q., & Wang, M. (2018). Anti-colon-cancer effects of polysaccharides:

A mini-review of the mechanisms. *International Journal of Biological*

Macromolecules, 114(2017), 1127–1133.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.186>

Jung, H., Jang, M. K., Nan, J. W., & Kim, Y. B. (2009). Synthesis and

characterization of thermosensitive nanoparticles based on PNIPAAm core

and chitosan shell structure. *Macromolecular Research*, 17(4), 265–270.

<https://doi.org/10.1007/BF03218690>

Kesharwani, D., Mishra, S., Paul, S. Das, Paliwal, R., & Satapathy, T. (2019). The

Functional Nanogel : An Exalted Carrier System. *Journal of Drug Delivery &*

Therapeutics, 9, 570–582.

Khoei, S., & Asadi, H. (2016). Nanogels. Chemical Approaches to Preparation. In *Handbook of Encapsulation and Controlled Release* (1ra edició, pp. 1271–1299).

Krishnaiah, Y. S.R., Satyanarayana, V., Dinesh Kumar, B., & Karthikeyan, R. S. (2002). In vitro drug release studies on guar gum-based colon targeted oral drug delivery systems of 5-fluorouracil. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16(3), 185–192. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(02\)00081-7](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(02)00081-7)

Krishnaiah, Yellela S.R., & Khan, M. A. (2012). Strategies of targeting oral drug delivery systems to the colon and their potential use for the treatment of colorectal cancer. In *Pharmaceutical Development and Technology* (Vol. 17, Issue 5, pp. 521–540). <https://doi.org/10.3109/10837450.2012.696268>

Lamprecht, A., Yamamoto, H., Takeuchi, H., & Kawashima, Y. (2003). Microsphere design for the colonic delivery of 5-fluorouracil. *Journal of Controlled Release*, 90(3), 313–322. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(03\)00195-0](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(03)00195-0)

Lee, S. H., Bajracharya, R., Min, J. Y., Han, J. W., Park, B. J., & Han, H. K. (2020). Strategic approaches for colon targeted drug delivery: An overview of recent advancements. *Pharmaceutics*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12010068>

Li, D., van Nostrum, C. F., Mastrobattista, E., Vermonden, T., & Hennink, W. E. (2017). Nanogels for intracellular delivery of biotherapeutics. *Journal of Controlled Release*, 259, 16–28. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.12.020>

- Li, P., Yang, Z., Wang, Y., Peng, Z., Li, S., Kong, L., & Wang, Q. (2015).
Microencapsulation of coupled folate and chitosan nanoparticles for targeted
delivery of combination drugs to colon. *Journal of Microencapsulation*, 32(1),
40–45. <https://doi.org/10.3109/02652048.2014.944947>
- Li, X., Tsibouklis, J., Weng, T., Zhang, B., Yin, G., Feng, G., Cui, Y., Savina, I. N.,
Mikhailovska, L. I., Sandeman, S. R., Howel, C. A., & Mikhailovsky, S. V.
(2017). Nano carriers for drug transport across the blood–brain barrier. *Journal
of Drug Targeting*, 25(1), 17–28.
<https://doi.org/10.1080/1061186X.2016.1184272>
- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil:
Mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, 3(5),
330–338. <https://doi.org/10.1038/nrc1074>
- Lovell, P. A., & Schork, F. J. (2020). Fundamentals of Emulsion Polymerization.
Biomacromolecules. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00769>
- Macrae, F. A., Goldberg, R. M., Seres, D., & Savarese, D. M. (2020, July 6).
Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and protective factors.
UpToDate. <https://www.uptodate.com/contents/colorectal-cancer-epidemiology-risk-factors-and-protective-factors>
- Madhusudana Rao, K., Mallikarjuna, B., Krishna Rao, K. S. V., Siraj, S., Chowdoji
Rao, K., & Subha, M. C. S. (2013). Novel thermo/pH sensitive nanogels
composed from poly(N-vinylcaprolactam) for controlled release of an
anticancer drug. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 891–897.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.09.009>

Magaña, H., Cornejo-Bravo, J. M., Cordova-Guerrero, I., Palomino, K., & Serrano-Medina, A. (2017). pH-dependent release of antihypertensives from complexes with poly(carboxyalkyl methacrylamides). *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 39(October), 508–515.

<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.05.008>

Manchun, S., Cheewatanakornkool, K., Dass, C. R., & Sriamornsak, P. (2014). Novel pH-responsive dextrin nanogels for doxorubicin delivery to cancer cells with reduced cytotoxicity to cardiomyocytes and stem cells. *Carbohydrate Polymers*, 114, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.002>

Markman, J. L., Rekechenetskiy, A., Holler, E., & Ljubimova, J. Y. (2013). Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance ☆, ☆☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(13–14), 1866–1879.

<https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.09.019>

Marley, A. R., & Nan, H. (2016). Epidemiology of colorectal cancer. In *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics* (Vol. 7, Issue 3, pp. 105–114). E-Century Publishing Corporation.

<https://doi.org/10.3109/9781420016307-2>

Maspes, A., Pizzetti, F., Rossetti, A., Makvandi, P., Sitia, G., & Rossi, F. (2021). *Advances in Bio-Based Polymers for Colorectal Cancer Treatment: Hydrogels and Nanoplatfoms*. 7(6). <https://doi.org/10.3390/gels7010006>

Meel, R. Van Der, Sulheim, E., Shi, Y., Kiessling, F., & Mulder, W. J. M. (2019).

Smart cancer nanomedicine. *Nature Nanotechnology*, 14(November), 1007–1017. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0567-y>

Melgarejo Diaz, M. (2015). *Sistemas peguillados para administración de fármacos. Aplicación a cáncer colorrectal y enfermedad de Fabry*.
<http://www.tdx.cat/handle/10803/347214>

Mohar-Betancourt, A., Reynoso-Noverón, N., Armas-Texta, D., Gutiérrez-Delgado, C., & Torres-Domínguez, J. A. (2017). Cancer Trends in Mexico: Essential Data for the Creation and Follow-Up of Public Policies. *Journal of Global Oncology*, 3(6), 740–748. <https://doi.org/10.1200/JGO.2016.007476>

Mohd-zahid, M. H., Mohamud, R., & Che, A. (2020). *RSC Advances Colorectal cancer stem cells : a review of targeted drug delivery by gold nanoparticles*. 973–985. <https://doi.org/10.1039/c9ra08192e>

Molina, M., Asadian-Birjand, M., Balach, J., Bergueiro, J., Miceli, E., & Calderó, M. (2015). Stimuli-responsive nanogel composites and their application in nanomedicine. *Chem. Soc. Rev*, 44, 6161. <https://doi.org/10.1039/c5cs00199d>

National Cancer Institute. (2015). *What is cancer*. NIH.
<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>

National Cancer Institute. (2020, September 25). *Cancer Statistics*.
<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>

Neamtu, I., Rusu, A. G., Diaconu, A., Elena, L., Aurica, N., & Chiriac, P. (2017). *Drug Delivery Basic concepts and recent advances in nanogels as carriers for medical applications*. <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1276232>

- Neamtu, I., Rusu, A. G., Diaconu, A., Nita, L. E., & Chiriac, A. P. (2017). Basic concepts and recent advances in nanogels as carriers for medical applications. In *Drug Delivery* (Vol. 24, Issue 1, pp. 539–557). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1276232>
- Nie, S. (2010). *Understanding and overcoming major barriers in cancer nanomedicine Opsonization & phagocytosis*. 5(4), 523–528. <https://doi.org/10.2217/nnm.10.23.Understanding>
- Nokhodchi, A., Raja, S., Patel, P., & Asare-Addo, K. (2012). The Role of Oral Controlled Release Matrix Tablets in Drug Delivery Systems. *BioImpacts*, 2(4), 175–187. <https://doi.org/10.5681/bi.2012.027>
- Pangeni, R., Won Choi, S., Jeon, O.-C., Byun, Y., & Park, J. W. (2016). Multiple nanoemulsion system for an oral combinational delivery of oxaliplatin and 5-fluorouracil : preparation and in vivo evaluation. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 6379–6399.
- Paruvathanahalli, Rajinikanth, S., & Jestin, C. (2016). *Development and evaluation of nanostructured lipid carrier-based hydrogel for topical delivery of 5-fluorouracil*. 5067–5077.
- Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Vangelie, E., Campos, R., Rodriguez, P., Susana, L., Torres, A., Armando, L., Torres, D., & Grillo, R. (2018). Nano based drug delivery systems : recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, 1–33. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>

- PDQ Adult Treatment Editorial Board. (2002). Gastrointestinal Stromal Tumors Treatment (PDQ®): Patient Version. In *PDQ Cancer Information Summaries*. National Cancer Institute (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26389367>
- Philip, A. K., & Philip, B. (2010). Colon targeted drug delivery systems: A review on primary and novel approaches. *Oman Medical Journal*, *25*(2), 70–78. <https://doi.org/10.5001/omj.2010.24>
- Prasanth, V. V., Jayaprakash, R., & Mathew, S. T. (2012). Colon specific drug delivery systems: A review on various pharmaceutical approaches. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *2*(1), 163–169.
- Pretel, E., Arias, J. L., Cabeza, L., Melguizo, C., Prados, J., Mallandrich, M., Suñer, J., & Clares, B. (2017). Development of biomedical 5-fluorouracil nanoplateforms for colon cancer chemotherapy: Influence of process and formulation parameters. *International Journal of Pharmaceutics*, *530*(1–2), 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.07.055>
- Puértoloas Soto L. (2015). Ensayo de compuestos de oro en células cancerígenas. *Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza*.
- Rawla, P., Sunkara, T., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors. In *Przegląd Gastroenterologiczny* (Vol. 14, Issue 2, pp. 89–103). Termedia Publishing House Ltd. <https://doi.org/10.5114/pg.2018.81072>
- Robles, A., Bashashati, M., Contreras, A., Chávez, L. O., Cerro-Rondón, A. Del, Cu, C., McAlice, M., & Deoker, A. (2019). Colorectal Cancer in Hispanics

Living Near the U.S.-Mexico Border. *Revista de Investigacion Clinica; Organo Del Hospital de Enfermedades de La Nutricion*, 71(5), 306–310.

<https://doi.org/10.24875/RIC.19003026>

Rodríguez, J. C., De, B., Fernández, L. N., Garmendia, J. M. A., Lastra Aras, E., Castaño, A. G., Barrio Gil-Fournier, A., & García Girón, C. (2003). *FARMACIA HOSPITALARIA* (Vol. 27).

Sahu, P., Kashaw, S. K., Jain, S., Sau, S., & Iyer, A. K. (2017). Assessment of penetration potential of pH responsive double walled biodegradable nanogels coated with eucalyptus oil for the controlled delivery of 5-fluorouracil: In vitro and ex vivo studies. *Journal of Controlled Release*, 253, 122–136.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.023>

Sahu, P., Kashaw, S. K., Sau, S., Kushwah, V., Jain, S., Agrawal, R. K., & Iyer, A. K. (2019). pH Responsive 5-Fluorouracil Loaded Biocompatible Nanogels For Topical Chemotherapy of Aggressive Melanoma. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 174, 232–245. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.018>

Sánchez-Barriga, J. J. (2017). Mortality trends and risk of dying from colorectal cancer in the seven socioeconomic regions of Mexico, 2000-2012. *Revista de Gastroenterología de México (English Edition)*, 82(3), 217–225.

<https://doi.org/10.1016/j.rgm xen.2017.03.010>

Sánchez Gudín, J. (2019). *Seguridad y calidad de vida en pacientes con cáncer colorrectar no metastásico: 5-fluorouracilo frente a capecitabina.*

Senapati, S., Mahanta, A. K., Kumar, S., & Maiti, P. (2018). Controlled drug

delivery vehicles for cancer treatment and their performance. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 3, Issue 1, pp. 1–19). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-017-0004-3>

Serrano-Medina, A., Cornejo-Bravo, J. M., & Licea-Claverie, A. (2012). Synthesis of pH and temperature sensitive, core-shell nano/microgels, by one pot, soap-free emulsion polymerization. *Journal of Colloid and Interface Science*, 369(1), 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.12.045>

Sharma, A., Kaur, A., Jain, U. K., Chandra, R., & Madan, J. (2017). Stealth recombinant human serum albumin nanoparticles conjugating 5-fluorouracil augmented drug delivery and cytotoxicity in human colon cancer, HT-29 cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 155, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.04.020>

Shi, J., Votruba, A. R., Farokhzad, O. C., & Langer, R. (2010). Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: From discovery to applications. *Nano Letters*, 10(9), 3223–3230. <https://doi.org/10.1021/nl102184c>

Shishu, Gupta, N., & Aggarwal, N. (2007). Stomach-specific drug delivery of 5-fluorouracil using floating alginate beads. *AAPS PharmSciTech*, 8(2), E143–E149. <https://doi.org/10.1208/pt0802048>

Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21442>

Soni, K. S., Desale, S. S., & Bronich, T. K. (2016). Nanogels: An overview of properties, biomedical applications and obstacles to clinical translation.

Journal of Controlled Release, 240, 109–126.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.11.009>

Suhail, M., Rosenholm, J. M., Minhas, M. U., Badshah, S. F., Naeem, A., Khan, K. U., & Fahad, M. (2019). Nanogels as drug-delivery systems: A comprehensive overview. In *Therapeutic Delivery* (Vol. 10, Issue 11, pp. 697–717). Future Medicine Ltd. <https://doi.org/10.4155/tde-2019-0010>

Sun, B., Fang, Y., Li, Z., Chen, Z., & Xiang, J. (2015). Advances in the application of nanotechnology in the diagnosis and treatment of gastrointestinal tumors. *Molecular and Clinical Oncology*, 3(2), 274–280.

<https://doi.org/10.3892/mco.2014.470>

Tawfik, E., Ahamed, M., Almalik, A., Alfaqeeh, M., & Alshamsan, A. (2017).

Prolonged exposure of colon cancer cells to 5-fluorouracil nanoparticles improves its anticancer activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(2), 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.05.010>

Tummala, S., Satish Kumar, M. N., & Prakash, A. (2015). Formulation and characterization of 5-Fluorouracil enteric coated nanoparticles for sustained and localized release in treating colorectal cancer. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(3), 308–314. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2014.11.010>

Udofot, O., Affram, K., Smith, T., Tshabe, B., Krishnan, S., Sachdeva, M., & Agyare, E. (2016). Pharmacokinetic, biodistribution and therapeutic efficacy of 5-fluorouracil-loaded pH-sensitive PEGylated liposomal nanoparticles in HCT-116 tumor bearing mouse. *Journal of Nature and Science*, 2(1).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27200415>

Verastegui, E., & Mohar, A. (2009). Colorectal cancer in Mexico: Should a middle income country invest in screening or in treatment? *European Journal of Health Economics*, 10(SUPPL. 1), 107–114. <https://doi.org/10.1007/s10198-009-0190-1>

Vicario-de-la-Torre, M., & Forcada, J. (2017). The Potential of Stimuli-Responsive Nanogels in Drug and Active Molecule Delivery for Targeted Therapy. *Gels*, 3(2), 16. <https://doi.org/10.3390/gels3020016>

Villarreal-Gómez, L. J., Serrano-Medina, A., José Torres-Martínez, E., Lizeth Perez-González, G., & Manuel Cornejo-Bravo, J. (2018). Polymeric advanced delivery systems for antineoplastic drugs: Doxorubicin and 5-fluorouracil. In *E-Polymers* (Vol. 18, Issue 4, pp. 359–372). European Polymer Federation. <https://doi.org/10.1515/epoly-2017-0202>

Vodenkova, S., Buchler, T., Cervena, K., Veskrnova, V., Vodicka, P., & Vymetalkova, V. (2020). 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 206, p. 107447). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107447>

Wadhwa, S., Garg, V., Gulati, M., Kapoor, B., Singh, S. K., & Mittal, N. (2019). Nanovesicles for Nanomedicine: Theory and Practices. *Pharmaceutical Nanotechnology: Basic Protocols, Methods in Molecular Biology*, 2000, 1–17.

Wang, A. Z., Langer, R., & Farokhzad, O. C. (2012). Nanoparticle delivery of

cancer drugs. *Annual Review of Medicine*, 63, 185–198.

<https://doi.org/10.1146/annurev-med-040210-162544>

Wang, C., Yang, S., Gao, L., Wang, L., & Cao, L. (2018). Carboxymethyl pachyman (CMP) reduces intestinal mucositis and regulates the intestinal microflora in 5-fluorouracil-treated CT26 tumour-bearing mice. *Food and Function*, 9(5), 2695–2704. <https://doi.org/10.1039/c7fo01886j>

Wang, L. L., Huang, S., Guo, H. H., Han, Y. X., Zheng, W. S., & Jiang, J. D. (2016). In situ delivery of thermosensitive gel-mediated 5-fluorouracil microemulsion for the treatment of colorectal cancer. *Drug Design, Development and Therapy*, 10, 2855–2867. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S111351>

Wang, R., Huang, J., Chen, J., Yang, M., Wang, H., Qiao, H., Chen, Z., Hu, L., Di, L., & Li, J. (2019). Enhanced anti-colon cancer efficacy of 5-fluorouracil by epigallocatechin-3-gallate co-loaded in wheat germ agglutinin-conjugated nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 21, 102068. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102068>

Wang, X., Wang, Y., Chen, Z. G., & Shin, D. M. (2009). Advances of Cancer Therapy by Nanotechnology. *Cancer Research and Treatment*, 41(1), 1. <https://doi.org/10.4143/crt.2009.41.1.1>

Watts, P. J., Barrow, L., Steed, K. P., Wilson, C. G., Spiller, R. C., Melia, C. D., & Davies, M. C. (1992). The transit rate of different-sized model dosage forms through the human colon and the effects of a lactulose-induced catharsis.

International Journal of Pharmaceutics, 87(1–3), 215–221.

[https://doi.org/10.1016/0378-5173\(92\)90245-W](https://doi.org/10.1016/0378-5173(92)90245-W)

WHO. (2018). *Cancer*. World Health Organization. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

Wielińska, J., Nowacki, A., & Liberek, B. (2019). 5-fluorouracil-complete insight into its neutral and ionised forms. *Molecules*, 24(20).

<https://doi.org/10.3390/molecules24203683>

Wong, K. E., Ngai, S. C., Chan, K.-G., Lee, L.-H., Goh, B.-H., & Chuah, L.-H.

(2019). Curcumin Nanoformulations for Colorectal Cancer: A Review.

Frontiers in Pharmacology, 10, 152. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00152>

Wong, T. W., Colombo, G., & Sonvico, F. (2011). Pectin matrix as oral drug delivery vehicle for colon cancer treatment. *AAPS PharmSciTech*, 12(1), 201–214. <https://doi.org/10.1208/s12249-010-9564-z>

Wu, C. (2018). Systemic Therapy for Colon Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 27(2), 235–242. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2017.11.001>

Wu, X., He, C., Wu, Y., & Chen, X. (2016). Synergistic therapeutic effects of Schiff's base cross-linked injectable hydrogels for local co-delivery of metformin and 5-fluorouracil in a mouse colon carcinoma model. *Biomaterials*, 75, 148–162. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.016>

Xiao, W., Deng, Z., Huang, J., Huang, Z., Zhuang, M., Yuan, Y., Nie, J., & Zhang, Y. (2019). Highly Sensitive Colorimetric Detection of a Variety of Analytes via the Tyndall Effect. *Analytical Chemistry*, 91(23), 15114–15122.

<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03824>

- Yuan, L., Zhang, S., Li, H., Yang, F., Mushtaq, N., Ullah, S., Shi, Y., An, C., & Xu, J. (2018). The influence of gut microbiota dysbiosis to the efficacy of 5-Fluorouracil treatment on colorectal cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *108*, 184–193. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.165>
- Zhang, H., Zhai, Y., Wang, J., & Zhai, G. (2016). New progress and prospects: The application of nanogel in drug delivery. In *Materials Science and Engineering C* (Vol. 60, pp. 560–568). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.11.041>
- Zhang, N., Yin, Y., Xu, S. J., & Chen, W. S. (2008). 5-Fluorouracil: Mechanisms of resistance and reversal strategies. In *Molecules* (Vol. 13, Issue 8, pp. 1551–1569). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).
<https://doi.org/10.3390/molecules13081551>
- Zhong, J. X., Clegg, J. R., Ander, E. W., & Peppas, N. A. (2018). Tunable poly(methacrylic acid-co-acrylamide) nanoparticles through inverse emulsion polymerization. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, *106*(6), 1677–1686. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36371>
- Zou, Y., Li, D., Shen, M., & Shi, X. (2019). Polyethylenimine-Based Nanogels for Biomedical Applications. *Macromolecular Bioscience*, *19*(11), 1900272.
<https://doi.org/10.1002/mabi.201900272>

ANEXOS

- 109 -

ANEXO 1. Cálculos para obtener el porcentaje de carga y la eficiencia.

Capacidad de carga del fármaco:

$$CCF = \frac{MF_{ng}}{M_{ng} + MF_{ng}} \times 100$$

Eficacia de carga del fármaco:

$$ECF = \frac{MF_{ng}}{MF} \times 100$$

Dónde:

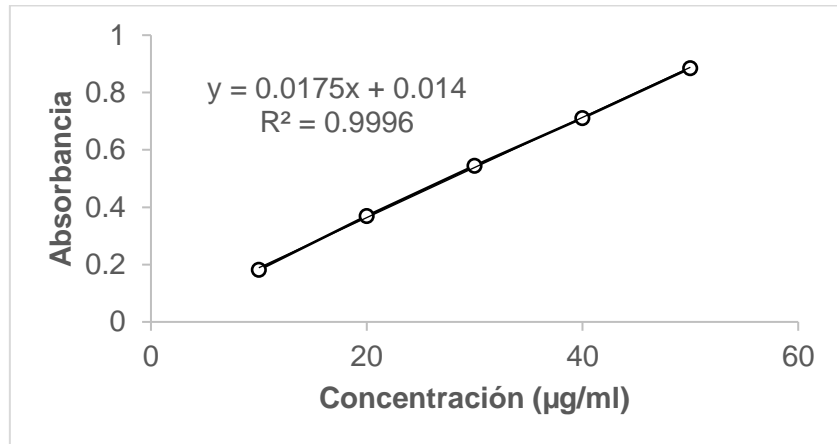
MF_{ng}= masa del fármaco en los nanogeles

M_{ng}= masa de los nanogeles

MF= masa del fármaco

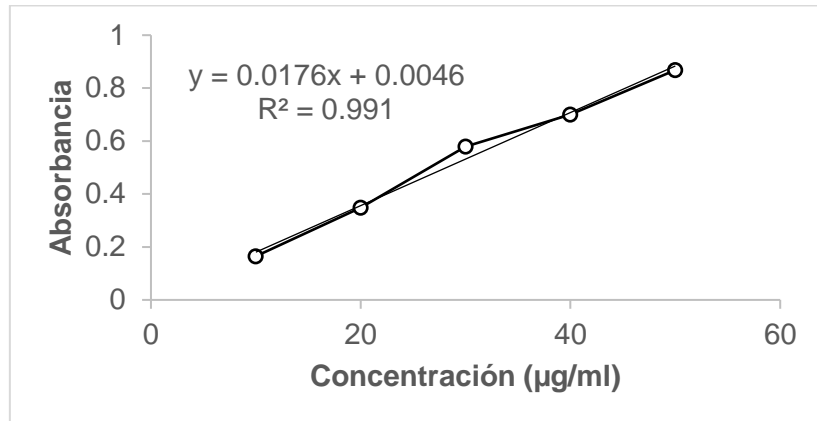
ANEXO 2. Curva de calibración para el cargado y la liberación de 5-fluorouracilo con etanol por UV-VIS.

$\mu\text{g/ml}$	Absorbancia
10	0.182
20	0.369
30	0.545
40	0.711
50	0.885



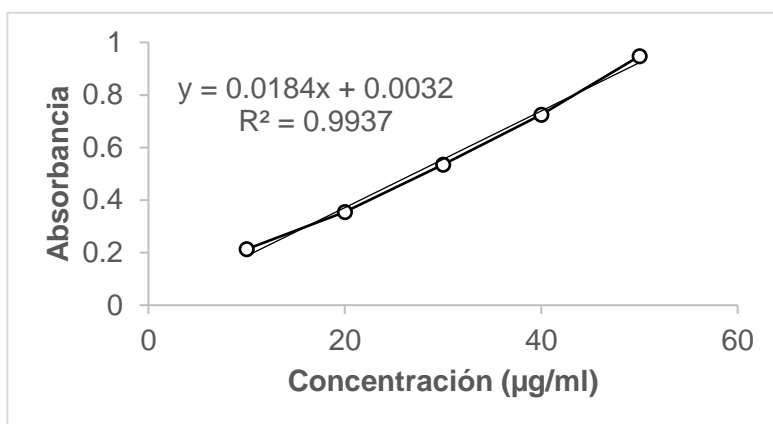
ANEXO 3. Curva de calibración para el cargado y la liberación de 5-fluorouracilo a pH 7.4 por UV-VIS.

$\mu\text{g/ml}$	Absorbancia
10	0.165
20	0.348
30	0.579
40	0.700
50	0.868



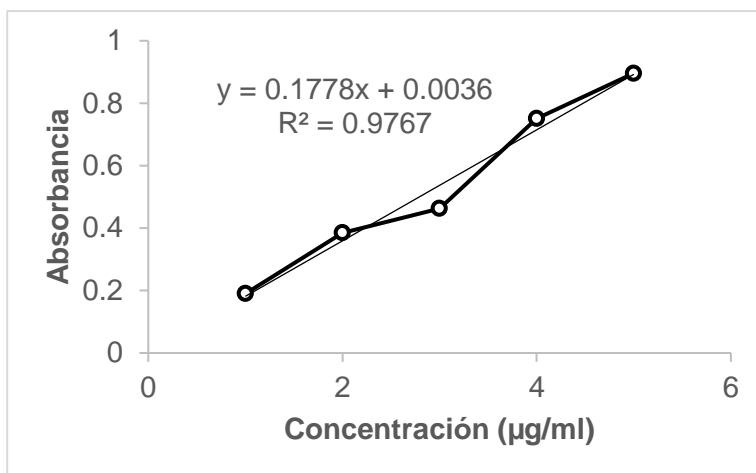
ANEXO 4. Curva de calibración para la liberación de 5-fluorouracilo a pH 6.8 por UV-VIS.

$\mu\text{g/ml}$	Absorbancia
10	0.213
20	0.355
30	0.535
40	0.725
50	0.948



ANEXO 5. Curva de calibración para la liberación de 5-fluorouracilo a pH 1.2 por UV-VIS.

$\mu\text{g/ml}$	Absorbancia
10	0.190
20	0.385
30	0.463
40	0.751
50	0.896



ANEXO 6. Tablas de los tamaños a diferentes valores de pH de la síntesis y de la reconstitución de los NGs.

pH	Síntesis 1 (nm)	Síntesis 2 (nm)	Síntesis 3 (nm)	Promedio Dh (nm)	PDI
1.2	986.03	1168.00	202.80	785.61 ± 512.86	0.70
2	479.45	1094.00	7517.33	3030.26 ± 3898.05	0.68
3	1146.00	369.47	1454.47	989.98 ± 559.07	0.73
4	995.40	458.70	381.13	611.74 ± 334.51	0.85
5	2010.00	65.99	77.45	717.81 ± 1119.08	0.23
6	62.68	52.04	74.74	63.15 ± 11.36	0.05
7	63.45	73.18	84.88	73.84 ± 10.73	0.07
8	78.07	68.77	108.03	84.96 ± 20.52	0.05
9	73.81	58.09	78.20	70.03 ± 10.58	0.11
AGUA	148.50	78.8	72.59	99.96 ± 42.15	0.36

<i>pH</i>	Reconstitución 1 (nm)	Reconstitución 2 (nm)	Reconstitución 3 (nm)	Promedio Dh (nm)
1.2	224	302.9	547.23	358.04 ± 168.52
2	348	3812.0	2383.67	2181.22 ± 1740.85
3	347.4	1151.2	1220.40	906.33 ± 485.29
4	299.7	544.6	1161.67	668.67 ± 444.17
5	147.2	400.7	2008.00	851.97 ± 1009.15
6	229.6	874.9	736.10	613.52 ± 339.65
7	174.9	405.5	196.97	259.11 ± 127.23
8	132.5	779.8	963.00	625.10 ± 436.33
9	136.9	667.9	1169.67	658.17 ± 516.45

ANEXO 7. Tabla de potencial zeta de los NGs.

<i>pH</i>	1ra síntesis (mV)	2da síntesis (mV)	3ra síntesis (mV)	Promedio (mV)
1.2	-2.03	-3.89	-21.7	-9.2 ± 10.8
2	-4.25	-12.3	-17.3	-11.3 ± 6.5
3	-17.2	-6.65	-19.3	-14.4 ± 6.7
4	-18.7	-11	-20.8	-16.8 ± 5.1
5	-32.4	-3.25	-32.9	-22.9 ± 16.9
6	-29.3	-15.2	-32.8	-25.8 ± 9.3
7	-32.8	-16.9	-15	-21.6 ± 9.7
8	-18.5	-16.7	-31.9	-22.4 ± 8.3
9	-24.5	-15	-29.4	-23.0 ± 7.3
<i>Agua</i>	-18.9	-5.03	-46.7	-23.5 ± 21.2

ANEXO 8. Análisis para cuantificar la liberación del 5-FU libre y de 5-FU de los nanogeles a pH 1.2.

FÁRMACO PURO (5-FU)

Tiempo (h)	Absorbancia	Concentración (µg/ml)	alícuota	Liberado parcial (µg)	Liberado total (µg)	Fracción liberada
0	0	0	0	0	0	0
0.25	0.162	1	1	36	36	0.051
0.5	0.131	1	1	60	61	0.087
0.75	0.218	1	1	68	70	0.100
1	0.246	2	2	80	83	0.119
2	0.287	1	1	32	37	0.053
4	0.118	1	1	36	41	0.059
8	0.13	1	1	29	35	0.050
12	0.107	1	1	29	36	0.051
24	0.106	1	1	30	37	0.053
36	0.109	0	0	1	7	0.010

NANOGELES CARGADOS (nano+5-FU)

Tiempo (h)	Absorbancia	Concentración (µg/ml)	alícuota	Liberado parcial (µg)	Liberado total (µg)	Fracción liberada
0	0	0	0	0	0	0
0.25	0.005	0.01	0.01	0.39	0.39	0.001
0.5	0.007	0.02	0.02	0.96	0.96	0.001
0.75	0.012	0.05	0.05	2.36	2.39	0.003
1	0.017	0.08	0.08	3.77	3.84	0.005
2	0.024	0.11	0.11	5.74	5.89	0.008
4	0.014	0.06	0.06	2.92	3.19	0.005
8	0.01	0.04	0.04	1.80	2.12	0.003
12	0.013	0.05	0.05	2.64	3.00	0.004
24	0.013	0.05	0.05	2.64	3.06	0.004
36	0.036	0.18	0.18	9.11	9.58	0.014

Tiempo (h)	Absorbancia	Concentración (µg/ml)	alícuota	Liberado parcial (µg)	Liberado total (µg)	Fracción liberada
0	0	0	0	0	0	0
0.25	0.019	0.09	0.09	4.33	4.33	0.006
0.5	0.022	0.10	0.10	5.17	5.26	0.008
0.75	0.028	0.14	0.14	6.86	7.05	0.010
1	0.021	0.10	0.10	4.89	5.22	0.007
2	0.02	0.09	0.09	4.61	5.04	0.007
4	0.005	0.01	0.01	0.39	0.91	0.001
8	0.013	0.05	0.05	2.64	3.17	0.005
12	0.014	0.06	0.06	2.92	3.50	0.005
24	0.02	0.09	0.09	4.61	5.25	0.007
36	0.023	0.11	0.11	5.46	6.18	0.009

Tiempo (h)	Absorbancia	Concentración (µg/ml)	alícuota	Liberado parcial (ug)	Liberado total (ug)	Fracción liberada
0	0	0	0	0	0	0
0.25	0.003	0.00	0.00	0.17	0.17	0.000
0.5	0.011	0.04	0.04	2.08	2.08	0.003
0.75	0.017	0.08	0.08	3.77	3.81	0.005
1	0.019	0.09	0.09	4.33	4.44	0.006
2	0.029	0.14	0.14	7.14	7.34	0.010
4	0.03	0.15	0.15	7.42	7.77	0.011
8	0.034	0.17	0.17	8.55	9.04	0.013
12	0.033	0.17	0.17	8.27	8.93	0.013
24	0.04	0.20	0.20	10.24	11.06	0.016
36	0.042	0.22	0.22	10.80	11.83	0.017

ANEXO 9. Análisis para cuantificar la liberación del 5-FU libre y de 5-FU de los nanogeles a pH 6.8.

FÁRMACO PURO (5-FU)

Tiempo (h)	Absorbancia	Concentración (µg/ml)	alícuota	Liberado parcial (µg)	Liberado total (µg)	Fracción liberada
0	0	0	0	0	0	0
0.25	0.117	6.18	6.18	309.24	309.24	0.44
0.5	0.139	7.38	7.38	369.02	375.21	0.54
0.75	0.139	7.38	7.38	369.02	382.59	0.55
1	0.148	7.87	7.87	393.48	414.42	0.59
2	0.219	11.73	11.73	586.41	615.23	0.88
4	0.15	7.98	7.98	398.91	439.46	0.63
8	0.104	5.48	5.48	273.91	322.43	0.46
12	0.1	5.26	5.26	263.04	317.04	0.45
24	0.088	4.61	4.61	230.43	289.70	0.41
36	0.053	2.71	2.71	135.33	199.20	0.28

NANOGELES CARGADOS (nano+5-FU)

Tiempo (h)	Absorbancia	Concentración (µg/ml)	alícuota	Liberado parcial (µg)	Liberado total (µg)	Fracción liberada
0	0	0	0	0	0	0
0.25	0.008	0.26	0.26	13.04	13.04	0.02
0.5	0.021	0.97	0.97	48.37	48.63	0.07
0.75	0.032	1.57	1.57	78.26	79.49	0.11
1	0.046	2.33	2.33	116.30	119.10	0.17
2	0.064	3.30	3.30	165.22	170.34	0.24
4	0.015	0.64	0.64	32.07	40.49	0.06
8	0.013	0.53	0.53	26.63	35.70	0.05
12	0.01	0.37	0.37	18.48	28.08	0.04
24	0.041	2.05	2.05	102.72	112.68	0.16
36	0.078	4.07	4.07	203.26	215.28	0.31

Tiempo (h)	Absorbancia	Concentración (µg/ml)	alícuota	Liberado parcial (µg)	Liberado total (µg)	Fracción liberada
0	0	0	0	0	0	0
0.25	0.03	1.46	1.46	72.83	72.83	0.10
0.5	0.034	1.67	1.67	83.70	85.15	0.12
0.75	0.04	2.00	2.00	100.00	103.13	0.15
1	0.045	2.27	2.27	113.59	118.72	0.17
2	0.046	2.33	2.33	116.30	123.71	0.18
4	0.048	2.43	2.43	121.74	131.47	0.19
8	0.028	1.35	1.35	67.39	79.55	0.11
12	0.045	2.27	2.27	113.59	127.10	0.18
24	0.038	1.89	1.89	94.57	110.35	0.16
36	0.057	2.92	2.92	146.20	163.87	0.23

Tiempo (h)	Absorbancia	Concentración (µg/ml)	alícuota	Liberado parcial (µg)	Liberado total (µg)	Fracción liberada
0	0	0	0	0	0	0
0.25	0.014	0.59	0.59	29.35	29.35	0.04
0.5	0.021	0.97	0.97	48.37	48.96	0.07
0.75	0.022	1.02	1.02	51.09	52.64	0.08
1	0.031	1.51	1.51	75.54	78.12	0.11
2	0.043	2.16	2.16	108.15	112.24	0.16
4	0.046	2.33	2.33	116.30	122.55	0.18
8	0.045	2.27	2.27	113.59	122.16	0.17
12	0.046	2.33	2.33	116.30	127.15	0.18
24	0.047	2.38	2.38	119.02	132.20	0.19
36	0.06	3.09	3.09	154.35	169.90	0.24

ANEXO 10. Análisis para cuantificar la liberación del 5-FU libre y de 5-FU de los nanogeles a pH 7.4.

FÁRMACO PURO (5-FU)

Tiempo (h)	Absorbancia	Concentración (µg/ml)	alícuota	Liberado parcial (µg)	Liberado total (µg)	Fracción liberada
0	0	0	0	0	0	0
0.25	0.135	7.41	7.41	370.45	370.45	0.53
0.5	0.166	9.17	9.17	458.52	465.93	0.67
0.75	0.17	9.40	9.40	469.89	486.47	0.69
1	0.17	9.40	9.40	469.89	495.86	0.71
2	0.193	10.70	10.70	535.23	570.60	0.82
4	0.192	10.65	10.65	532.39	578.47	0.83
8	0.174	9.63	9.63	481.25	537.98	0.77
12	0.177	9.80	9.80	489.77	556.13	0.79
24	0.186	10.31	10.31	515.34	591.49	0.84
36	0.184	10.19	10.19	509.66	596.11	0.85

NANOGELES CARGADOS (nano+5-FU)

Tiempo	Absorbancia	Concentración (µg/ml)	alícuota	Liberado parcial	Liberado total	Fracción liberada
0	0	0	0	0	0	0
0.25	0.035	1.73	1.73	86.36	86.36	0.12
0.5	0.045	2.30	2.30	114.77	116.50	0.17
0.75	0.048	2.47	2.47	123.30	127.32	0.18
1	0.059	3.09	3.09	154.55	161.03	0.23
2	0.04	2.01	2.01	100.57	110.15	0.16
4	0.042	2.13	2.13	106.25	117.84	0.17
8	0.043	2.18	2.18	109.09	122.81	0.18
12	0.045	2.30	2.30	114.77	130.67	0.19
24	0.056	2.92	2.92	146.02	164.22	0.23
36	0.069	3.66	3.66	182.95	204.07	0.29

Tiempo	Absorbancia	Concentración (µg/ml)	alícuota	Liberado parcial	Liberado total	Fracción liberada
0	0	0	0	0	0	0
0.028	0.028	1.33	1.33	66.48	66.48	0.09
0.031	0.031	1.50	1.50	75.00	76.33	0.11
0.032	0.032	1.56	1.56	77.84	80.67	0.12

0.032	0.032	1.73	1.73	86.36	90.75	0.13
0.035	0.035	3.66	3.66	182.95	189.07	0.27
0.069	0.069	4.17	4.17	208.52	218.30	0.31
0.078	0.078	4.23	4.23	211.36	225.31	0.32
0.079	0.079	4.63	4.63	231.25	249.42	0.36
0.086	0.086	4.68	4.68	234.09	256.89	0.37
0.087	0.087	4.68	4.68	234.09	261.57	0.37

Tiempo	Absorbancia	Concentración (µg/ml)	alícuota	Liberado parcial	Liberado total	Fracción liberada
0	0	0	0	0	0	0
0.25	0.012	0.42	0.42	21.02	21.02	0.03
0.5	0.02	0.88	0.88	43.75	44.17	0.06
0.75	0.036	1.78	1.78	89.20	90.50	0.13
1	0.038	1.90	1.90	94.89	97.97	0.14
2	0.05	2.58	2.58	128.98	133.95	0.19
4	0.082	4.40	4.40	219.89	227.44	0.32
8	0.082	4.40	4.40	219.89	231.84	0.33
12	0.079	4.23	4.23	211.36	227.72	0.33
24	0.063	3.32	3.32	165.91	186.49	0.27
36	0.075	4.00	4.00	200.00	223.90	0.32

ANEXO 11. Cálculos y tabla de concentraciones utilizadas en el estudio de viabilidad celular.

Los cálculos se tomaron en cuenta utilizando 0.5 ml de medio para tener medio suficiente para cubrir los 3 pocillos de cada triplicado. Para los nanogeles libres y los cargados se utilizaron las siguientes ecuaciones:

Nano+5-FU y nanogeles libres: Se tomó 1.5 mg y se mezcló con 1.5 ml de medio DMEM (1 mg/ml).

$$5 \mu\text{g/ ml} = \frac{\left(\frac{100 \mu\text{g}}{\text{ml}}\right)(0.5 \text{ ml})}{1000 \mu\text{g}} = 0.0025 \text{ ml}$$

$$20 \mu\text{g/ ml} = \frac{\left(\frac{20 \mu\text{g}}{\text{ml}}\right)(0.5 \text{ ml})}{1000 \mu\text{g}} = 0.01 \text{ ml}$$

$$50 \mu\text{g/ ml} = \frac{\left(\frac{50 \mu\text{g}}{\text{ml}}\right)(0.5 \text{ ml})}{1000 \mu\text{g}} = 0.025 \text{ ml}$$

$$100 \mu\text{g/ ml} = \frac{\left(\frac{100 \mu\text{g}}{\text{ml}}\right)(0.5 \text{ ml})}{1000 \mu\text{g}} = 0.05 \text{ ml}$$

En el caso del 5-FU, debido a que se preparó una solución de menor concentración, se utilizaron las siguientes ecuaciones:

5-FU: Se tomó 1 mg y se mezcló con 1.5 ml de medio DMEM (0.6 mg/ml).

$$5 \mu\text{g/ ml} = \frac{\left(\frac{100 \mu\text{g}}{\text{ml}}\right)(0.5 \text{ ml})}{600 \mu\text{g}} = 0.0041 \text{ ml}$$

$$20 \mu\text{g/ ml} = \frac{\left(\frac{20 \mu\text{g}}{\text{ml}}\right)(0.5 \text{ ml})}{600 \mu\text{g}} = 0.016 \text{ ml}$$

$$50 \mu\text{g/ ml} = \frac{\left(\frac{50 \mu\text{g}}{\text{ml}}\right)(0.5 \text{ ml})}{600 \mu\text{g}} = 0.041 \text{ ml}$$

$$100 \mu\text{g}/\text{ml} = \frac{(100 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}})(0.5 \text{ ml})}{600 \mu\text{g}} = 0.083 \text{ ml}$$

5-FU libre y nano+5-FU Concentración ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Concentración de 5-FU dentro de nanogeles ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	5-FU libre (μl tomado)	Nanogeles cargados con 5-FU (μl tomado)	5-FU Medio tomado (μl)	Nanogeles cargados con 5-FU Medio tomado (μl)
5	0.7	4.1	2.5	495.8	497.5
20	2.5	16.6	10	483.4	490
50	7	41.6	25	458.4	475
100	14	83.3	50	416.7	450