

Martín Prieto Fraga

Desarrollo de sistemas híbridos
para la liberación bajo demanda
de fármacos y su aplicación en el
tratamiento del dolor

Director/es

Arruebo Gordo, Manuel

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Tesis Doctoral

DESARROLLO DE SISTEMAS HÍBRIDOS PARA LA
LIBERACIÓN BAJO DEMANDA DE FÁRMACOS Y
SU APLICACIÓN EN EL TRATAMIENTO DEL
DOLOR

Autor

Martín Prieto Fraga

Director/es

Arruebo Gordo, Manuel

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Ingeniería Biomédica

2022



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

DESARROLLO DE SISTEMAS HÍBRIDOS PARA LA LIBERACIÓN BAJO DEMANDA DE FÁRMACOS Y SU APLICACIÓN EN EL TRATAMIENTO DEL DOLOR

Autor

Martín Prieto Fraga

Director

Dr. Manuel Arruebo Gordo

Instituto Universitario de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A)

Programa de Doctorado en Ingeniería Biomédica

2022

Repositorio de la Universidad de Zaragoza – Zagan
<http://zagan.unizar.es>

Contenido

Agradecimientos	1
Resumen y objetivos	4
Capítulo I: Introducción	8
1. Introducción general.....	9
1.1. Nanocomposites termosensibles para liberación controlada de fármacos.....	9
1.2. El dolor y su tratamiento.....	13
1.3. Tratamiento del dolor mediante el uso de nanomateriales	20
Capítulo II: Síntesis y caracterización de polímeros con respuesta termo-mecánica basados en MEO₂MA-co-OEGMA₅₀₀	30
1. Introducción	31
2. Resumen y objetivos.....	37
3. Métodos y materiales	38
3.1. Síntesis de materiales	38
3.2. Caracterización.....	41
4. Resultados y discusión	46

4.1. Síntesis del copolímero de OEGMA ₅₀₀ y MEO ₂ MA	46
4.2. Comparación frente a ATRP.	52
4.3. Evaluación in vitro de la citocompatibilidad	57
5. Conclusiones	59
Capítulo III: Síntesis y caracterización de nanomateriales híbridos con respuesta opto-mecánica basados en P(MEO₂MA-co-OEGMA₅₀₀)	61
1. Introducción	62
2. Resumen y objetivos	65
3. Métodos y materiales	66
3.1. Síntesis de materiales	66
3.2. Caracterización	70
4. Resultados y discusión	79
4.1. Síntesis y caracterización de los materiales	79
4.2. Carga y liberación de bupivacaína	85
4.3. Biocompatibilidad de los materiales	88
5. Conclusiones	96
Capítulo IV: Síntesis y caracterización de nanogeles de P(MEO₂MA-co-OEGMA) cargados con Bupivacaína cristalizada	98
1. Introducción	99

2. Resumen y objetivos.....	102
3. Métodos y materiales	103
3.1. Síntesis de materiales	103
3.2. Caracterización.....	105
4. Resultados y discusión	113
4.1. Caracterización de los nanogeles termosensibles de P(MEO2MA-co-OEGMA).....	113
4.2. Caracterización de los nanogeles cargados con nanocristales de bupivacaína.	116
4.3. Biocompatibilidad de los materiales.....	123
5. Conclusiones.....	128
Capítulo V: Aplicación en liberación controlada de fármacos para el tratamiento del dolor crónico	129
1. Introducción	130
2. Resumen	135
3. Métodos y materiales	136
3.1. Evaluación <i>in vivo</i> de los materiales.....	136
3.2. Procedimiento experimental.....	137
4. Resultados y discusión	146
4.1. Evaluación de los materiales desarrollados en el capítulo III	146

4.2. Evaluación de los materiales desarrollados en el capítulo IV	159
5. Conclusiones	164
Capítulo VI: Conclusiones generales	165
1. Conclusiones generales	166
Anexo I: Artículos científicos publicados	171
Anexo II: Bibliografía	175

Agradecimientos

Tengo demasiada gente a la que agradecer algo como para que puedan caber todos en unos pocos párrafos, por lo que me gustaría empezar dando las gracias a todos los que durante estos años habéis compartido conmigo un poco de vuestro tiempo. Ya fuese dedicando horas (y mucha paciencia) a intentar explicarme algún concepto químico o compartiendo unas cervezas en una terraza, a todos vosotros, GRACIAS.

Y aunque con este párrafo podría incluíros a todos, algunos os habéis ganado a pulso aparecer con nombres y apellidos.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a todos los que me acompañasteis durante estos años en el laboratorio. Gracias Leyre, Ana, Iván, Ane, Marimar, Fernando, Marta, Quique, Hakan, Maciej, Diego, María o Magda por haberme hecho sentir como en casa.

También me gustaría dar las gracias a los doctores del grupo NFP porque, aunque no he compartido tantas horas de laboratorio con vosotros, siempre habéis tenido la puerta abierta y me habéis ayudado cuando lo he necesitado. Gracias José Luís, Nuria, Gema, Reyes, Pili y Jesús.

Algunos de vosotros no sólo me habéis acompañado en el laboratorio, sino que habéis dedicado gran parte de vuestro

tiempo y esfuerzo en ayudarme a sacar adelante mis experimentos, artículos y tesis. Muchas gracias Víctor, Teresa, Gracia, Vanesa, Laura, Silvia, Isabel, Sara, Cristina y Guillermo. Os debo mucho.

También tengo que dar las gracias a todos los que, a través de colaboraciones, me han ayudado a pesar de estar a cientos de kilómetros. De vosotros he aprendido mucho. Muchas gracias Nuria, Pachi, Clara y Raúl. También a todos los técnicos que han compartido conmigo su tiempo y sabiduría. Gracias Íñigo, Carlos y Teo.

Y no me olvido de ti Maricarmen, es sólo que te mereces un sitio aparte por sufrirme dentro y fuera del laboratorio. Gracias por tu ayuda, tu apoyo, tu confianza y, sobre todo, tu amistad.

Aunque tengo mucho que agradecer a las personas que han compartido conmigo tiempo dentro del laboratorio, tengo aún más que agradecer a todos los que estaban fuera. Especialmente a mis padres, a mi hermano y Vanesa. Muchas gracias por estar siempre ahí, por vuestro apoyo y confianza. Os quiero.

Finalmente tengo que dar las gracias a mi director de tesis, no sólo por darme esta oportunidad, sino por su apoyo, ánimos y paciencia. Muchas gracias por todo Manuel.

Resumen y objetivos

El trabajo expuesto en la presente tesis doctoral ha sido desarrollado en el Grupo de Películas y Partículas Nanoestructuradas (NFP), miembro del Instituto de Nanociencia de Aragón (INA) y financiado por proyecto de investigación: NANOHEDONISM “Photo-triggered On-demand Drug Delivery System for Chronic Pain” (ERC-2013-CoG-614715) financiado por la Comisión Europea dentro de su programa IDEAS, ERC Consolidator Grant.

El objetivo fundamental del presente trabajo consistió en el desarrollo de un sistema de liberación controlada de anestésicos locales para el tratamiento del dolor crónico. Este sistema debía permitir controlar la dosis suministrada proporcionando dos perfiles de liberación simultáneos: una liberación sostenida para tratar el dolor basal y una liberación a demanda para tratar los picos de dolor. Es por esto por lo que se planteó el uso de sistemas híbridos compuestos por nanogeles termosensibles cargados con bupivacaína, combinados con nanopartículas plasmónicas. Las nanopartículas plasmónicas pueden ser activadas mediante luz, generando un incremento local de temperatura suficiente para activar los nanogeles termosensibles y provocar un aumento de liberación respecto de la liberación basal de estos. Por este motivo se combinaron nanogeles con una temperatura crítica de solubilidad inferior (LCST) ligeramente superior a la temperatura biológica y con nanopartículas plasmónicas con absorbancia en el infrarrojo

cercano. La LCST superior a la biológica permite que los nanogeles no colapsen al introducirlos en el organismo, mientras que el uso de luz en el infrarrojo cercano asegura una baja absorbancia de los tejidos permitiendo una mayor penetración.

La presente memoria de tesis doctoral se estructura en 6 capítulos:

Capítulo 1: Consiste en la parte introductoria en la que se presentan los conceptos generales de los materiales tratados en este trabajo, así como una presentación de la problemática del dolor crónico y una revisión sobre tratamientos basados en nanomateriales.

Capítulo 2: En este capítulo se presenta un procedimiento de síntesis de P(MEO₂MA-co-OEGMA₅₀₀) mediante fotopolimerización tipo ATRP, así como la caracterización completa del polímero obtenido. El objetivo de desarrollar este nuevo procedimiento aplicado al P(MEO₂MA-co-OEGMA₅₀₀) es conseguir un método de polimerización radicalaria controlada con baja sensibilidad al oxígeno y al agua y que necesite de cantidades mínimas de catalizador, para su aplicación en la producción de nanogeles biocompatibles mediante polimerización radicalaria controlada en miniemulsión inversa.

Capítulo 3: En este capítulo se presenta el primer sistema de liberación propuesto, formado por nanogeles de P(MEO₂MA-co-OEGMA₅₀₀) cargados con hidrocloreto de bupivacaína y decorados con nanopartículas huecas de oro. Además, se caracterizan físico-químicamente, se estudian sus perfiles de liberación sostenida y bajo demanda y se evalúa su biocompatibilidad.

Capítulo 4: En este capítulo se presenta el segundo sistema propuesto, basado en nanocristales de bupivacaína encapsulados en nanopartículas de P(MEO₂MA-co-OEGMA₅₀₀). Se explican los procedimientos sintéticos de la nanocrystalización del fármaco y su posterior encapsulación y se realiza una caracterización físico-química, se analiza su perfil de liberación y se estudia su biocompatibilidad.

Capítulo 5: En este capítulo se exponen los resultados del estudio *in vivo* de los sistemas de liberación controlada propuestos en los capítulos 3 y 4, realizado tras la administración en el entorno del nervio ciático.

Capítulo 6: En este último capítulo se exponen las conclusiones generales alcanzadas durante la realización del presente trabajo.

Capítulo I: **Introducción**

1. Introducción general

1.1. Nanocomposites termosensibles para liberación controlada de fármacos

Los nanogeles, también llamados nanopartículas de hidrogel o nanohidrogeles son partículas de hidrogel con tamaños por debajo de 1000 nm. Los hidrogeles, al igual que los nanogeles, consisten en estructuras tridimensionales constituidas por redes entrecruzadas de un polímero hidrófilo. Su principal característica es la capacidad de absorber grandes cantidades de agua manteniendo una estructura bien definida. Se trata de materiales con una gran presencia en medicina¹, especialmente en los campos de la ingeniería de tejidos² y el suministro de fármacos³, gracias a propiedades como su alto contenido en agua, su elevada superficie específica, biocompatibilidad y buena estabilidad. De entre todos los tipos de nanogeles, los que más atención han captado en los últimos años son aquellos capaces de responder a un estímulo variando propiedades como su volumen, contenido de agua, índice de refracción o grado de hidrofiliidad⁴. Los estímulos capaces de activar este tipo de nanogeles pueden ser muy variados, siendo los más habituales el pH y la temperatura. Nanogeles de quitosano y pluronic F-127 activados por cambios de pH se han usado con éxito para el suministro de bleomicina⁵, mientras que nanogeles de PNIPAAm cargados con cisplatino y activados

por pH han mostrado resultados prometedores en el tratamiento de tumores⁶. Distintos nanogeles sensibles a pH se han usado con éxito en aplicaciones como tratamiento de tumores⁷⁻⁹ o terapia génica¹⁰. Del mismo modo, distintos nanogeles termosensibles basados en PNIPAAm han sido usados, por ejemplo, en el tratamiento de tumores^{9,11,12} o afecciones dérmicas¹³. Aunque, en menor medida, también se han propuesto nanogeles sensibles a otro tipo de estímulos químicos o mecánicos menos comunes como presencia de glucosa¹⁴, de glutatióna^{8,15,16} o presión¹⁷.

Los nanogeles termosensibles son aquellos formados por un polímero termosensible, es decir, aquellos polímeros capaces de cambiar su solubilidad en función de la temperatura. Estos polímeros se caracterizan por presentar una temperatura crítica de solubilidad inferior (LCST) o superior (UCST). Los polímeros con LCST son solubles a temperaturas inferiores a esta e hidrófobos a temperaturas superiores, mientras que los polímeros que presentan UCST son insolubles por debajo de esta y de vuelven hidrófilos a temperaturas superiores. Debido a lo complejo de obtener polímeros con UCST en el rango fisiológico¹⁸, la mayoría propuestas de polímeros termosensibles se centran en aquellos que presentan LCST. La mayoría de trabajos sobre polímeros termosensibles con UCST están basados en polímeros zwitteriónicos¹⁸⁻²⁰. En lo que respecta a polímeros termosensibles con LCST, el más ampliamente

estudiado es la poli(N-isopropil acrilamida). Este interés se debe principalmente a que presenta LCST en el rango fisiológico fácilmente ajustable y es fácil de sintetizar y funcionalizar²¹. Aunque durante mucho tiempo se consideró la PNIPAAm como el *gold estándar* de los polímeros termosensibles²² para aplicaciones médicas, existe cierta polémica acerca de su biocompatibilidad. Mientras que se ha determinado que el polímero presenta buena biocompatibilidad, algunos de sus monómeros presentan una elevada toxicidad incluso en dosis bajas²³⁻²⁵. Los inconvenientes que esto provoca a la hora de sintetizar el material y de su purificación, así como las dudas sobre los efectos de la degradación del polímero a largo plazo, han llevado en los últimos a proponer nuevos polímeros termosensibles como alternativa la PNIPAAm. La alternativa más prometedora ha sido los copolímeros de oligo(etilenglicol metacrilato) (POEGMA)²². Al igual que la PNIPAAm, se puede sintetizar y funcionalizar fácilmente, su LCST se puede ajustar dentro del rango fisiológico y además, ni el polímero ni sus monómeros presentan toxicidad²⁶.

La principal ventaja de los nanogeles termosensibles en liberación controlada de fármacos es la posibilidad de activarlos mediante un estímulo térmico, consiguiendo de esta forma un control temporal de la dosis. Sin embargo, aplicar este estímulo de forma controlada en el interior del paciente y de manera no invasiva presenta serias dificultades. Es por esto, que en los

últimos años se han propuesto múltiples nanocomposites formados por la conjugación de nanogeles y otras nanopartículas capaces de generar calentamiento local a partir de otro estímulo.

Uno de los sistemas híbridos más prometedores se basa en la combinación de nanogeles termosensibles con nanopartículas plasmónicas con absorbancia en el infrarrojo cercano²⁷. Al interaccionar la luz con los plasmones de superficie del metal, estos entran en resonancia liberando energía en forma de calor²⁸, que a su vez provoca el colapso de los nanogeles termosensibles. Por ejemplo, nanogeles de PNIPAAm cargados con doxorrubicina y conjugados con nanorods de plata-oro²⁹, nanorods de oro^{30,31} o nanoclusters de oro³¹ han demostrado resultados prometedores como terapia combinada de hipertermia y quimioterapia.

Otra estrategia frecuente es la combinación de nanogeles termosensibles con nanopartículas magnéticas capaces de generar calor ante un campo magnético alterna de alta frecuencia³². Siguiendo un planteamiento similar al anterior, se ha propuesto la combinación de nanogeles de PNIPAAm³³⁻³⁵ y POEGMA³⁶ con nanopartículas magnéticas como terapia combinada de hipertermia con quimiofármacos en el tratamiento de tumores.

1.2. El dolor y su tratamiento

1.2.1. Definición y tipos de dolor

Según la Asociación para el Estudio del Dolor, este se define como “Una sensación y experiencia emocional desagradable asociada a un daño real o potencial de un tejidos³⁷. Según esta definición, el dolor es una experiencia subjetiva interpretada por cada individuo en base a sus propias experiencias vitales relacionadas con el daño. Esto provoca que exista una gran variabilidad en la percepción del dolor, dependiente de factores culturales, ambientales, étnicos, o fisiológicos. Esta gran variabilidad en la sensibilidad al dolor entre individuos dificulta la práctica clínica debido a que puede complicar el diagnóstico y llevar a un tratamiento inadecuado, lo que supone un gran problema de salud pública³⁸.

Es por esto por lo que, desde el punto de vista clínico, conviene emplear algún sistema de clasificación del dolor que sirva para guiar de forma objetiva hacia un correcto diagnóstico y tratamiento del paciente. En general esta clasificación se puede realizar en función de múltiples características:

- Localización anatómica: huesos, músculos tendones, articulaciones o vísceras.
- Fisiología del dolor: nociceptivo, neuropático o inflamatorio.

- Duración: agudo, crónico o irruptivo.
- Intensidad: suave, moderado o severo.
- Etiología: maligno o no maligno.

En la gestión clínica del dolor, la clasificación más habitual se realiza en base a las características fisiopatológicas, planteando aproximaciones diferentes en función de si el dolor es de origen nociceptivo, neuropático o inflamatorio.

Se denomina dolor nociceptivo a aquel que tiene su origen en la estimulación de unos receptores específicos del dolor denominados nociceptores. Estos receptores sirven de alerta temprana ante un potencial daño, sirviendo de protección ante el contacto con un elemento dañino³⁹. Se trata, por ejemplo, del estímulo percibido ante el contacto con una superficie caliente o un objeto punzante. El dolor nociceptivo puede ser consecuencia tanto de un daño superficial como profundo, por lo cual se divide en somático (superficial o profundo) o visceral, en función de la ubicación de los nociceptores estimulados. El dolor nociceptivo somático es un dolor bien definido y claramente localizado que suele aparecer con el movimiento de una zona concreta del cuerpo, mientras que el dolor nociceptivo visceral es un dolor difuso y difícilmente localizable, generalmente constante aun en reposo y asociado a un daño en los órganos internos.

Mientras que el dolor nociceptivo puede aparecer tanto antes como después de producirse el daño de los tejidos, el dolor inflamatorio aparece como consecuencia de la activación del sistema inmune una vez el daño se ha producido. La activación del sistema inmune produce una respuesta inflamatoria en la zona dañada como parte del proceso de cura con el fin de eliminar posibles patógenos, limpiar el tejido dañado y restaurar la homeostasis de la zona dañada. Una consecuencia de esta respuesta es la hipersensibilización temporal de la zona dañada y los tejidos circundantes. Esta hipersensibilización implica que estímulos no dañinos que habitualmente no producen respuesta nociceptiva, puedan causar dolor. El dolor inflamatorio es una respuesta natural, protectora, adaptativa y beneficiosa al proteger la zona ante nuevos daños durante el proceso de cura. Generalmente desaparece una vez ha finalizado el proceso de cura del tejido, sin embargo, en ciertas circunstancias fisiopatológicas, la respuesta inflamatoria puede prolongarse meses o años con el respectivo dolor asociado⁴⁰.

El dolor neuropático es aquel asociado a una lesión o enfermedad del sistema somatosensorial⁴¹. El dolor neuropático puede calificarse en dolor neuropático central o periférico, en función de en qué parte del sistema nervioso tiene su origen. Generalmente se describe como un dolor punzante o una sensación local de quemazón y generalmente se asocia a otros síntomas como alodinia o hiperalgesia.

1.2.2. Prevalencia, costes y problemas asociados al dolor

El dolor es un problema con una alta prevalencia a nivel mundial. Un estudio llevado a cabo en Europa y publicado en 2006 estima que afecta a unos 100 millones de europeos. Otro análisis basado en diferentes estudios a nivel mundial reveló que el 37 % por ciento de los encuestados en países del primer mundo y el 41 % de los encuestados en países en vías de desarrollo habría sufrido algún tipo de dolor crónico en los 12 meses anteriores⁴². Encuestas realizadas en EEUU mostraron cifras similares, donde el 34.5 % de los encuestados habrían sufrido dolor crónico en los 6 meses previos a la consulta⁴³. Estas cifras muestran la realidad de un problema que puede estar afectando a más de un tercio de la población mundial. A pesar de la variabilidad de incidencia entre países, existen una serie de factores de prevalencia comunes. Por ejemplo, la incidencia del dolor crónico es mayor en mujeres que en hombres y aumenta con la edad. Aunque la causa de la diferencia de prevalencia en función del sexo aún no ha sido determinada, puede estar ligada tanto a factores biológicos como psicosociales⁴⁴.

Esta alta prevalencia tiene importantes implicaciones personales, sociales y económicas. A nivel personal, además del sufrimiento derivado, supone un factor limitante para el desarrollo de una vida normal debido al amplio abanico de efectos secundarios de los tratamientos analgésicos.

A nivel social, en algunos países como EEUU, las sobredosis de fármacos provocaron más de 60000 muertes sólo en 2016⁴⁵, siendo catalogado este hecho como epidemia⁴⁶. Además el efecto de adicción y tolerancia, unido a las restricciones en el acceso a los fármacos opioides, provoca que muchos pacientes accedan a dichos fármacos a través del mercado negro o incluso comiencen a consumir drogas opioides ilegales⁴⁷. Otro fenómeno, frecuentemente obviado, es la alta prevalencia de depresión y ansiedad en pacientes de dolor crónico prolongado^{48,49}, una comorbilidad que refuerza la incapacitación de los pacientes que la sufren y condiciona el desarrollo de una vida familiar y social adecuada⁵⁰.

El dolor crónico tiene un elevado impacto económico en costes laborales y sanitarios. Se trata de la causa más frecuente de incapacidad laboral temporal, así como uno de los principales motivos de incapacidad laboral permanente⁵¹. Esto, unido al importante gasto para los sistemas públicos de salud, supone que el coste anual asociado al dolor crónico supere al asociado a enfermedades cardiovasculares, cáncer o diabetes⁵². Se estima que tan sólo en EEUU este coste supone entre 560 y 635 billones de dólares anuales. En Europa las estimaciones varían considerablemente de un país a otro debido a la especificidad de los estudios, enfocados a un subgrupo específico de patologías. Por ejemplo, se estima que el coste asociado al dolor crónico en Irlanda supera los 5.34 billones de euros anuales⁵³,

mientras que el dolor de espalda supone un impacto anual de 1.18 billones de euros en Bélgica⁵⁴, 1.86 billones de euros en Suecia⁵⁵ o 48.9 billones de euros en Alemania⁵⁶.

1.2.3. Tratamientos actuales para tratar el dolor

El objetivo de los tratamientos del dolor es reducir la sensibilización y amplificación del dolor, así como recuperar los umbrales normales del dolor. Para ello se emplean de forma individual o combinada fármacos antiinflamatorios no esteroideos, anestésicos locales, fármacos antiepilépticos, antidepressivos, agentes tópicos, relajantes musculares y opiodes⁵⁷. Además, la combinación de terapias farmacológicas con otras no farmacológicas, como la gestión del dolor, la fisioterapia o terapia psicológica, pueden ayudar a reducir los problemas asociados al dolor como la ansiedad, angustia o miedo al ayudar al paciente a autogestionar el dolor⁵⁸.

El principal problema asociado a los tratamientos actuales deriva de los efectos adversos asociados a las dosis de los tratamientos, especialmente en aquellos prolongados en el tiempo, así como en la falta de efectividad en varios tipos de patologías⁵⁹. Por ejemplo, los fármacos antiinflamatorios, uno de los grupos de fármacos más usados, se asocia con graves desórdenes del tracto gastrointestinal como úlceras o sangrados, así como a infartos, ictus o infecciones^{60,61}. Algunos fármacos

anestésicos locales como la bupivacaína se asocian a cardiotoxicidad y neurotoxicidad⁶², además de proporcionar un efecto corto en el tiempo. Los tratamientos con opioides generan problemas gastrointestinales, dermatológicos y neurológicos⁶³, además de continuar siendo los fármacos más controvertidos debido a la pérdida de efectividad con el uso y a la posibilidad de adicción de algunos tratamientos. Los múltiples efectos secundarios de estos tratamientos afectan negativamente a la calidad de vida los pacientes, lo que provoca que un gran porcentaje de ellos abandone o interrumpa los tratamientos.

Con el fin de mejorar la efectividad de los tratamientos basados en opioides y de reducir sus efectos secundarios asociados en la población de edad avanzada, se han propuesto diversas estrategias, como la combinación de dosis reducidas, rotación de fármacos, rutas de administración alternativas y tratamiento de los efectos adversos⁶⁴.

Por todo esto, los tratamientos actuales presentan severas limitaciones, lo que provoca que una gran parte de los pacientes de dolor crónico reciban tratamientos inadecuados. Esto hace que el desarrollo de nuevos tratamientos para tratar el dolor crónico se haya convertido en una prioridad médica.

1.3. Tratamiento del dolor mediante el uso de nanomateriales

Algunas de las estrategias más prometedoras para el tratamiento del dolor están basadas en el uso de nanomateriales como vectores para el suministro controlado de fármacos antiinflamatorios, anestésicos u opioides. Su elevada capacidad de carga unido a la posibilidad de producir liberaciones prolongadas manteniendo una concentración local de fármaco constante, hacen que presenten un gran potencial frente a las rutas de administración tradicionales.

Entre todos los tipos de nanomateriales los basados en materiales orgánicos son los más extensamente estudiados, debido a sus grandes ventajas en el campo de la liberación controlada de fármacos. Estas ventajas incluyen la biodisponibilidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad, así como la capacidad de encapsular moléculas de forma relativamente simple. Algunas de las formulaciones más habituales incluyen liposomas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas sólidas lipídicas, dendrímeros o micelas.

Uno de los nanomateriales más estudiado en aplicaciones para el tratamiento del dolor crónico son los liposomas. Se trata de vesículas esféricas formadas por al menos una bicapa de fosfolípidos y que han sido ampliamente usados como plataformas de liberación de fármacos⁶⁵. Distintos

anestésicos locales encapsulados en liposomas han mostrado un incremento importante de la intensidad y la duración del efecto anestésico respecto a la administración libre de estos fármacos⁶⁶. Por ejemplo, la administración de prolicaína encapsulada ha mostrado un incremento significativo de la duración del bloqueo del nervio infraorbital en ratas⁶⁷, además de mantenerse estable a procesos de esterilización y no presentar toxicidad local ni respuesta inflamatoria⁶⁸. También la ropivacaína liposomal ha mostrado resultados prometedores, prolongando la duración e intensidad del bloque del nervio ciático en ratones y del nervio infraorbital en ratas⁶⁹, sin mostrar la citotoxicidad asociada a la ropivacaína libre, lo que añade a las ventajas de las formulaciones liposomales el efecto de protector celular. Del mismo modo, la administración oral de liposomas cargados con mepivacaína no ha mostrado mayor respuesta inflamatoria que la producida por controles salinos⁷⁰. Estos estudios sugieren que la encapsulación de anestésicos locales en nanopartículas liposomales mejora su biodisponibilidad y reduce la toxicidad local del tratamiento respecto a la administración libre.

La administración de antiinflamatorios no esteroideos encapsulados en liposomas también ha mostrado resultados prometedores. Ratas y ratones tratados con diclofenaco encapsulado en liposomas han mostrado una menor respuesta nociceptiva, una reducción del dolor inflamatorio y una mayor tolerancia a la hiperalgesia provocada por estímulos mecánicos

y térmicos, 30 minutos después de la administración⁷¹. Algunos estudios han mostrado también valores elevados de carga en dos tipos de liposomas bioadhesivos basados en colágeno y ácido hialurónico, obteniendo dosis de hasta 13 mg por mL de fármaco. Estas formulaciones han mostrado buenos resultados como sistemas de liberación controlada, así como un aumento de la retención local debido a su capacidad de bioadhesión selectiva⁷², además de un incremento del efecto antiinflamatorio en modelos de artritis en ratas⁷³.

La encapsulación de fármacos opioides en liposomas también ha sido ampliamente investigada con el objetivo de reducir sus efectos secundarios, así como para prolongar su efecto. La oximorfona encapsulada en liposomas administrada de forma subcutánea, ha mostrado su efectividad a la hora de evitar la hiperalgesia térmica por tiempos prolongados tanto en modelos de rata con dolor neuropático⁷⁴ como con dolor crónico por compresión nerviosa⁷⁵.

En los últimos años, el estudio de liposomas en el tratamiento del dolor crónico se ha centrado en el desarrollo de sistemas activables mediante estímulos externos, con el fin de mejorar el control de la dosis, permitiendo ajustar la intensidad y duración. La tetrodotoxina encapsulada en liposomas fotoactivables ha permitido un control temporal del bloqueo del nervio ciático mediante la aplicación de luz infrarroja⁷⁶. Del

mismo modo, la conjugación de nanorods de oro y liposomas termosensibles han permitido controlar el bloqueo del nervio ciático mediante la aplicación de luz infrarroja⁷⁷. En ambos casos se observó una baja toxicidad y respuesta inflamatoria.

Los etosomas son un nuevo tipo de nanopartículas vesiculares que han sido propuestas como sistema de liberación de fármacos no invasivo⁷⁸⁻⁸⁰. Se trata de vesículas unilamelares o multilamelares compuestas por fosfolípidos, etanol y agua. Suponen una alternativa prometedora a los liposomas ya los etosomas tienen la capacidad de permear con mayor facilidad el estrato corneo. Los etosomas han sido estudiados como plataforma de liberación de anestésicos locales para aplicaciones transdérmicas. Algunos de los anestésicos locales que se han encapsulado con éxito en etosomas incluyen ropivacaína⁷⁸, lidocaína^{79,81} o benzocaína⁸². Del mismo modo, se han propuesto formulaciones basadas en etosomas para el suministro de fármacos antiinflamatorios no esteroideos, como ketoprofeno, diclofenaco sódico^{80,83} o aceclofenaco⁸⁴. En este último caso se demostró que los etosomas ofrecen una mayor densidad de vesículas, mayor capacidad de carga y mayor deformabilidad que otras vesículas elásticas basadas en membrana. Además, se han planteado múltiples sistemas basados en etosomas en forma de gel, con el fin de facilitar su aplicación tópica^{85,86}.

Además de nanopartículas vesiculares, también se han propuesto otros tipos de nanopartículas lipídicas. Las nanopartículas sólidas lipídicas, formadas por una matriz lipídica sólida, se han mostrado como una potencial solución para la encapsulación eficiente de fármacos hidrófobos⁸⁷⁻⁸⁹. Entre sus principales ventajas destacan su baja toxicidad, buena estabilidad física, bajo coste, síntesis libre de disolventes orgánicos y fácilmente escalable o capacidad para ser esterilizadas. Las nanopartículas sólidas lipídicas se han empleado para la encapsulación de anestésicos locales, fármacos antiinflamatorios o fármacos opiáceos. Nanopartículas sólidas lipídicas cargadas con lidocaína han mostrado proporcionar una mayor duración del efecto anestésico que la lidocaína libre gracias a su perfil de liberación sostenida^{87,90}. Del mismo modo se ha demostrado que la encapsulación de benzocaína en nanopartículas sólidas lipídicas aumenta la intensidad y duración del efecto anestésico respecto a la aplicada de forma libre⁹¹. Entre los antiinflamatorios no esteroideos que se han conseguido encapsular con éxito en nanopartículas sólidas lipídicas se encuentran indometacina, naproxeno o piroxicam. La indometacina encapsulada en nanopartículas sólidas lipídicas ha mostrado una mayor biodisponibilidad, retención y permeación corneal para aplicaciones oculares, respecto al fármaco libre⁹². Nanopartículas sólidas lipídicas cargadas con naproxeno mostraron también una mejor retención y un mayor

efecto antiinflamatorio al aplicarse de forma tópica sobre la piel⁹³. Otro ejemplo es la administración intraarticular de nanopartículas sólidas lipídicas cargadas con colecoxib, que demostró proporcionar una liberación sostenida de fármaco unido a una mayor retención articular⁹⁴. Entre los opioides encapsulados en nanopartículas sólidas lipídicas destaca la buprenorfina, que demostró un efecto antinociceptivo más prolongado, así como una menor toxicidad respecto a su forma libre.

Junto con las nanopartículas lipídicas, sistemas basados en nanopartículas poliméricas han arrojado resultados prometedores en el tratamiento del dolor. El uso de polímeros biodegradables como el PLA, PLGA o PCL se han usado ampliamente en sistemas de liberación sostenida de anestésicos locales para el tratamiento de dolor. Algunos ejemplos son bupivacaína, ropivacaína o benzocaína encapsulados en PLGA⁹⁵⁻⁹⁷, lidocaína encapsulada en nanoesferas de PCL⁹⁸ y benzocaína cargada en nanopartículas de PLA o PCL⁹⁹. Varios estudios se han centrado en el uso de este tipo de sistemas para conseguir el bloqueo nervioso del nervio ciático, mostrando un incremento significativo de la duración e intensidad del efecto analgésico^{98,100,101}. Del mismo modo, se han propuesto múltiples sistemas de suministro de antiinflamatorios no esteroideos basados en nanopartículas poliméricas como piroxicam cargado en nanopartículas de PLGA y Eudragit® RL¹⁰², diclofenaco

sódico cargado en nanopartículas de Eudragit® L100 y Eudragit® L100-PLGA¹⁰³ o de quitosano¹⁰⁴ o colecoxib cargado en nanopartículas de PCA, PLA o PLGA¹⁰⁵. Se han propuesto también algunos sistemas basados en polímeros con respuesta a estímulos como plataformas para el suministro bajo demanda de antiinflamatorios no esteroideos¹⁰⁶. Por ejemplo, nanopartículas de PNIPAAm cargadas con indometacina¹⁰⁷ o nanopartículas de polipirrol cargadas con piroxicam¹⁰⁸ se han usado con éxito para liberar el fármaco mediante un estímulo térmico o de pH. En lo que respecta a los opioides, se han propuesto múltiples sistemas basados en nanopartículas poliméricas, con el objetivo de proteger el fármaco y suministrarlo de forma localizada minimizando los efectos secundarios. Por ejemplo, nanopartículas de PLGA cargadas con loperamida^{109,110} o tramadol¹¹¹ han mostrado resultados prometedores favoreciendo el suministro a través de la barrera hematoencefálica mediante la el uso de diferentes ligandos.

Entre los distintos nanomateriales poliméricos, los nanogeles han mostrado un gran potencial como sistemas de liberación controlada gracias a propiedades como una elevada capacidad de carga, buena estabilidad termodinámica, baja viscosidad, tamaño ajustable facilidad de preparación y baja toxicidad^{112,113}. Algunos estudios han mostrado el potencial de estos materiales en aplicaciones de liberación durante periodos de tiempo prolongados. Por ejemplo, nanogeles de polipirrol

cargados con piroxicam y dispersos en un hidrogel de alginato de calcio, han alcanzado una liberación sostenida del fármaco durante 21 días¹⁰⁸. Los nanogeles sensibles a estímulos han mostrado un gran potencial en aplicaciones de liberación inteligente o bajo demanda¹¹⁴. Algunos sistemas basados en polímeros sensibles a estímulos se han aplicado con éxito en el tratamiento del dolor. Por ejemplo, nanogeles de PNIPAAm se han usado con éxito en la liberación de bupivacaína en entornos con pH fisiológico¹¹⁵.

Las micelas han mostrado también un gran potencial como estrategia para suministrar fármacos hidrófobos. Se trata de nanopartículas formadas por moléculas anfifílicas capaces de autoensamblarse una vez superada la concentración crítica micelar, formando partículas con un núcleo hidrófobo y una capa exterior hidrófila. Esta estructura permite encapsular moléculas hidrófobas obteniendo un sistema de liberación final hidrófilo. Distintas formulaciones micelares de anestésicos locales o fármacos antiinflamatorios no esteroideos se han aplicado con éxito. Formulaciones micelares de mezclas de lidocaína y prilocaína han mostrado ser efectivas en el tratamiento local del dolor^{116,117}. Asimismo, hidrogeles binarios de poloxamer cargados con ropivacaína han mostrado una liberación sostenida que prolonga el efecto analgésico respecto a dosis equivalentes del fármaco libre¹¹⁸. Otro estudio ha mostrado una mejor solubilización del propofol encapsulado en

micelas de mPEG-PLA/Solutol® HS15, respecto del fármaco libre. El uso de micelas para el suministro de fármacos antiinflamatorios no esteroideos también se ha planteado como una alternativa prometedora para mejorar la solubilidad y vida media de estos fármacos en sangre. El aceclofenaco encapsulado en micelas de Pluronic L81 y P123 mostró una alta eficiencia de carga y un perfil de liberación sostenida¹¹⁹, mientras que micelas de PEO-poly(β -bencil L-aspartato) cargadas con indometacina mostraron la capacidad de ajustar el perfil de liberación en función del pH del entorno¹²⁰. Al igual que en caso de los polímeros, también se han planteado soluciones micelares sensibles a estímulos. Por ejemplo, ibuprofeno cargado en micelas con un núcleo de PLA y una carcasa de PEG y PNIPAAm, ha mostrado la posibilidad de controlar la velocidad de difusión del fármaco en función de la combinación PEG/PNIPAAm empleada¹²¹.

Finalmente, y aunque en menor medida que las nanopartículas poliméricas, también se ha planteado el uso de nanopartículas inorgánicas como vectores para el suministro y liberación de fármacos en el tratamiento del dolor. Algunos de los sistemas más usados se basan en nanopartículas de sílica mesoporosa. Algunos antiinflamatorios no esteroideos como ketoprofeno, piroxicam, ibuprofeno o indometacina, encapsulados en nanopartículas de MCM-41 y SBA-15, han mostrado una mayor biodisponibilidad y un mejor perfil

farmacocinético respecto a sus equivalentes sin encapsular, gracias a la mejor solubilidad del sistema¹²²⁻¹²⁶.

Capítulo II: **Síntesis y caracterización
de polímeros con respuesta termo-
mecánica basados en MEO₂MA-co-
OEGMA₅₀₀**

1. Introducción

El interés por los polímeros que presentan temperatura crítica inferior de solubilidad (LCST) ha aumentado en las últimas décadas, desde la publicación del comportamiento del poli (isopropil acrilamida) (PNIPAAm) a finales de la década de los 60¹²⁷. Este tipo de polímeros son completamente solubles en agua por debajo de su LCST, mientras que una vez superada ésta, se vuelven insolubles, precipitando en una nueva fase. Esta transición es reversible y está acompañada por un cambio en la conformación de la cadena de polímero conocida como transición helicoidal-globular¹²⁸⁻¹³⁰. A temperaturas inferiores a su LCST, las cadenas poliméricas se encuentran en una conformación helicoidal, mientras que una vez alcanzada su LCST los enlaces con el solvente se rompen provocando un colapso de las cadenas que pasan a adquirir una conformación globular. Es por esto que este tipo de materiales han captado la atención en aplicaciones biomédicas, especialmente en el campo de la liberación controlada de fármacos¹³¹⁻¹³⁸. La capacidad de proporcionar una respuesta mecánica ante un estímulo térmico abre la puerta al desarrollo de nuevos sistemas de liberación controlada no invasivos¹³⁹⁻¹⁴¹. De todos los polímeros termosensibles desarrollados, el más extensamente estudiado ha sido el Poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm). Esto se debe principalmente a que presenta una rápida transición a 32 °C, su LCST es independiente del peso molecular y la concentración

y esta puede ser fácilmente ajustada dentro del rango biológico, además de presentar una buena biocompatibilidad¹⁴²⁻¹⁴⁵. A pesar de esto, el PNIPAAm presenta ciertas desventajas como histéresis en su transición de fase y que la presencia de monómeros sin reaccionar en el material final puede causar toxicidad^{24,146}. Además, se ha observado que, en polímeros de cadena corta, los grupos funcionales terminales ejercen una gran influencia en el comportamiento térmico^{147,148}. Esto ha provocado que nuevos polímeros desarrollados en los últimos tiempos hayan ido reemplazando al PNIPAAm para aplicaciones de liberación controlada de fármacos¹⁴⁹, siendo los más prometedores los basados en copolímeros de oligo (etilenglicol) metacrilato (OEGMA)²². Al igual que el PNIPAAm, los copolímeros de OEGMA presentan una excelente solubilidad por debajo de la LCST. Esta se ve influenciada por la arquitectura del polímero¹⁵⁰, el contenido hidrófobo¹⁵¹ y su peso molecular¹⁵². Además, su LCST puede ser ajustada de forma precisa entre 28 °C y 90 °C (Tabla 1), variando la proporción de dietilenglicol metil éter metacrilato (MEO₂MA) y oligo etilenglicol metil éter metacrilato (OEGMA)¹⁵³.

% OEGMA	% MEO ₂ MA	LCST
100	0	90
30	70	59
20	80	49
15	85	44
10	90	39
8	92	37
5	95	32
0	100	28

Tabla 1: LCST del copolímero P(MEO₂MA-co-OEGMA) en función de la proporción de comonómeros¹⁵³.

Asimismo, presentan una excelente biocompatibilidad y propiedades biorrepelentes que evitan la adsorción de proteínas y la bioadhesión celular¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. Esta última propiedad es una ventaja especialmente relevante respecto al PNIPAAm, donde la presencia de grupos amida en la estructura puede formar puentes de hidrógeno con otras poliamidas como las proteínas¹⁵⁷.

Diversos copolímeros de OEGMA han sido sintetizados con éxito en los últimos años empleando métodos de polimerización radicalaria, como polimerización radicalaria controlada por transferencia de átomo (ATRP)¹⁵⁸⁻¹⁶² o polimerización radicalica por adición, fragmentación y transferencia reversible (RAFT)¹⁶³⁻¹⁶⁵.

Aunque estos métodos han demostrado buenos resultados y un gran control sobre la polimerización, presentan

ciertas desventajas, algunas especialmente relevantes para su uso en aplicaciones biomédicas.

La polimerización mediante ATRP implica el uso de importantes cantidades de catalizadores de cobre, los cuales exhiben una elevada citotoxicidad¹⁶⁶. Esto requiere de exhaustivas etapas de purificación de los polímeros que incrementan el coste económico y medioambiental. Además, las reacciones de polimerización mediante ATRP son sensibles al agua y al oxígeno y requieren de altas temperaturas y largos tiempos de polimerización¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Esta sensibilidad al agua y oxígeno es especialmente relevante a la hora de preparar nanopartículas o nanogeles mediante polimerización en sistemas dispersos, donde se requiere la presencia de una fase acuosa^{170,171}.

Del mismo modo, la polimerización mediante RAFT presenta también algunos inconvenientes. La preparación de agentes RAFT implica múltiples pasos de síntesis y purificación de agentes orgánicos¹⁷², además de que dichos agentes se degradan con el tiempo produciendo compuestos de azufre que pueden ser problemáticos en determinadas aplicaciones¹⁷³.

Por estos motivos, es interesante el desarrollo de nuevos métodos sintéticos sencillos y eficientes que permitan obtener arquitecturas de polímero bien definidas con cantidades mínimas de catalizador y baja sensibilidad al agua y oxígeno.

Una alternativa prometedora es la polimerización ATRP empleando iniciadores para la continua regeneración del activador (ICAR ATRP). La polimerización mediante ICAR ATRP permite usar concentraciones de catalizador inferiores a 50 ppm¹⁷⁴ y ha sido empleada con éxito en la síntesis de copolímeros basados en OEGMA¹⁷⁵. En este caso ha demostrado un buen control sobre el peso molecular y una baja polidispersidad, pero con tasas de polimerización lentas.

Otra estrategia que ha ganado peso en los últimos años es la fotopolimerización tipo ATRP, un método versátil y eficiente que permite obtener polímeros bien definidos a partir de un amplio rango de monómeros, como metacrilatos, estirenos o vinilpirrolidonas¹⁷⁶⁻¹⁸¹.

Fors y Hawker publicaron en 2012 la síntesis de polimetil metacrilato (PMMA) empleando un novedoso método de polimerización radicalica basada en complejos organometálicos de iridio fotosensibles¹⁸². Este nuevo método sintético demostró tener una elevada tolerancia a múltiples monómeros empleando cantidades muy bajas de catalizador. Además, a diferencia de otros métodos basados en ATRP que requieren sintetizar ligandos específicos¹⁸³, todos los reactivos pueden ser adquiridos comercialmente, el procedimiento es simple, se puede realizar a temperatura ambiente y no presenta sensibilidad ni al agua ni al oxígeno.

Por todo esto, la fotopolimerización tipo ATRP se presenta como un candidato ideal para la síntesis de copolímeros basados en OEGMA para aplicaciones médicas, así como para su potencial aplicación en reacciones de polimerización en sistemas dispersos.

2. Resumen y objetivos

En este capítulo se presenta un procedimiento de síntesis de P(MEO2MA-co-OEGMA₅₀₀) mediante fotopolimerización tipo ATRP, empleando una adaptación del procedimiento sintético publicado previamente por Fors y Hawker para el PMMA¹⁸². El objetivo de esta adaptación es conseguir un método de polimerización radicalaria controlada que sea potencialmente aplicable a la producción de nanogeles basados en OEGMA mediante polimerización controlada en sistemas dispersos. Se trata de una etapa previa para el desarrollo de plataformas de liberación bajo demanda de fármacos anestésicos contra el dolor que permitan una activación remota.

El objetivo de este capítulo es validar dicha adaptación mediante la caracterización completa del polímero obtenido, así como a través de la comparación con su equivalente producido por ATRP siguiendo el procedimiento descrito por Lutz y Hoth¹⁵³. Para ello se analizó su estructura, peso molecular, índice de polidispersidad, LCST, tasa de conversión y velocidad de reacción. Con el objetivo de confirmar su potencial aplicación biomédica, finalmente se estudió su citocompatibilidad mediante un estudio de viabilidad celular.

3. Métodos y materiales

3.1. Síntesis de materiales

Los reactivos dietilenglicol metileter metacrilato (95%) (MEO₂MA), oligoetilenglicol metileter metacrilato (Mn. 500 g/mol) (OEGMA), 2,2' bipyridil (98%) (bipy), metil 2-bromopropionato (98%) (MBP), tris[2-fenilpiridinato-C²,N] iridio(III) (99%) (Ir(ppy)₃), etanol seco (0,02% agua) y cloruro de cobre (I) (97%) (CuCl) se usaron cómo se recibieron.

Todos los reactivos fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (Madrid, España), a excepción del etanol anhidro que fue adquirido a Panreac Química S.A. (Barcelona, España).

3.1.1. Síntesis de P(MEO₂MA-co-OEGMA) mediante polimerización radicalica controlada por transferencia de átomo (ATRP)

La síntesis del copolímero aleatorio MEO₂MA-co-OEGMA₅₀₀ (POEGMA) mediante ATRP se realizó empleando como catalizador el complejo organometálico cu/bipy según el protocolo publicado por Lutz y Hoth¹⁵³. Todo el proceso se llevó a cabo en atmósfera inerte de argón empleando línea y matraces schlenk. En primer lugar, se eliminaron las especies oxidadas del CuCl mediante múltiples lavados con ácido acético glacial. Para ello se añadieron 0.1 mmol de CuCl y 5 mL de ácido acético glacial en un matraz

schlenk de 25 mL desoxigenado con argón, se mezcló durante unos minutos mediante agitación magnética para favorecer la disolución de las especies oxidadas y se dejó precipitar el CuCl durante 15 minutos. A continuación, se eliminó con cuidado el sobrenadante mediante una cánula y presión de argón y se repitió el proceso cuatro veces más. Para eliminar el ácido acético restante se repitió el mismo procedimiento de lavado otras cinco veces, pero empleando etanol seco. Finalmente, el CuCl se secó mediante vacío en el mismo matraz. A continuación, se formó el complejo organometálico Cu/bipy añadiendo 0.2 mmol de bipy disueltos en 2 mL de etanol seco al matraz con CuCl. La reacción se produjo de forma instantánea dando lugar a una disolución homogénea, sin precipitados y de tono marrón. En un segundo matraz schlenk de 25 mL se añadieron 8,8 mmol de MEO₂MA, 1,2 mmol de OEGMA₅₀₀ y 8 mL de etanol seco. Tras desoxigenar el matraz mediante ciclos de argón/vacío, se puso en agitación magnética y se calentó a 60 °C en un baño de aceite. Una vez alcanzados los 60 °C, se trasvasó la disolución de catalizador al matraz con los monómeros mediante una cánula y presión de argón y se inyectaron 0,1 mmol del iniciador MBP, iniciando así la reacción de polimerización. Transcurridas 24 h, se detuvo la reacción permitiendo la entrada de aire y oxidando el catalizador, que pasó a tener un tono verde claro, indicativo de la formación de los óxidos de cobre.

El copolímero obtenido se purificó en dos etapas. En una primera se eliminó el catalizador mediante filtración a través de una columna de sílica gel (60-120 mesh) empleando etanol absoluto como eluyente y dando como resultado una solución transparente. En una segunda eliminaron los monómeros que no reaccionaron mediante diálisis en membrana (14 kDa de tamaño de corte) y frente a una mezcla de agua y etanol en proporción 1:1 en volumen durante al menos 72 h. Finalmente se eliminó el etanol del producto obtenido mediante evaporación rotativa a 65 °C y la solución acuosa resultante se liofilizó (Telstar Lyoquest, AZBIL TELSTAR S.L.U., Barcelona, España). El copolímero final purificado se almacenó a 4 °C hasta su uso.

3.1.2. Síntesis de P(MEO₂MA-co-OEGMA) mediante fotopolimerización radicalica (FPR)

La síntesis del copolímero aleatorio MEO₂MA-co-OEGMA₅₀₀ mediante FPR se realizó según un procedimiento sintético nuevo basado en el descrito para el PMMA en la comunicación de Fors y Hawker¹⁸².

En primer lugar, se añadieron a un matraz schlenk de 25 mL 8,8 mmol de MEO₂MA, 1,2 mmol de OEGMA₅₀₀, $2,5 \times 10^{-4}$ mmol de Ir(ppy)₃, 0,1 mmol de MBP y 10 mL de etanol absoluto. La mezcla se puso en agitación hasta la completa disolución de todos los reactivos. A continuación, se selló el

matraz y se irradió con luz UV (365 nm) empleando dos fuentes de luz LED (LED Engin modelo LZ4-04UV00) con un flujo radiante total de 6.6 W, durante 24 h. El copolímero obtenido se purificó mediante diálisis en membrana (14 kDa de tamaño de corte) y frente a una mezcla de agua y etanol en proporción 1:1 en volumen durante al menos 72 h. Finalmente se eliminó el etanol del producto obtenido mediante evaporación rotativa a 65 °C y la solución acuosa resultante se liofilizó (Telstar Lyoquest, AZBIL TELSTAR S.L.U., Barcelona, España). El copolímero final se almacenó a 4 °C hasta su uso.

3.2. Caracterización

3.2.1. Temperatura crítica de solubilidad (LCST)

La temperatura crítica de solubilidad de los copolímeros obtenidos se determinó analizando la transmitancia óptica de los materiales a diferentes temperaturas. Para ello, se calentó lentamente bajo agitación una disolución acuosa (3 mg/mL) a temperatura ambiente hasta alcanzar 60 °C. Entre 30 °C y 55 °C se midió a cada grado de incremento, la transmitancia a 670 nm empleando un espectrofotómetro UV-Vis (Varian Cary 50, Agilent Technologies, Santa Clara, EEUU) equipado con una sonda óptica de inmersión. Se tomó como valor de LCST la temperatura en la que el valor de transmitancia caía al 50%.

3.2.2. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

La estructura de los copolímeros obtenidos se analizó mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (^1H RMN), empleando un espectrómetro Bruker AV-400 (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Alemania) operado a 400 MHz. Todas las muestras fueron medidas empleando cloroformo deuterado como solvente.

3.2.3. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

El análisis mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier se llevó a cabo en un espectrómetro Vertex 70 FTIR (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Alemania) equipado con un detector piroeléctrico de sulfato de triglicina deuterado (DTGS) y con un muestreador de reflectancia total atenuada (ATR) de diamante (modelo Golden Gate®, Specac Ltd., Orpington, Reino Unido)

3.2.4. Cromatografía por permeación en gel (GPC)

La cromatografía por permeación en gel se realizó empleando un módulo Alliance e2695 (Waters Corp., Milford EEUU) equipado con dos columnas de 500 y 10^4 Mw de tamaño de corte (Waters Corp., Milford EEUU) y un detector evaporativo de dispersión de luz modelo 2424 (Waters Corp., Milford EEUU). La calibración se realizó mediante patrones de

polimetilmetacrilato (PMMA) y se empleó tetrahidrofurano como eluyente.

3.2.5. Viabilidad celular¹

Los estudios de viabilidad celular se realizaron sobre cuatro líneas celulares: fibroblastos dérmicos humanos (Lonza, Bélgica), células madre mesenquimales de ratón (mMSCs, cedidas por la doctora Pilar Martín Duque), células de glioblastoma humano (U251MG, cedidas por la doctora Pilar Martín Duque) y macrófagos humanos diferenciados a partir de células monocíticas de leucemia aguda THP1 (American Type Culture Collection, US) según el método publicado previamente por Gracia Mendoza et al.¹⁸⁴.

Los fibroblastos dérmicos humanos y las células U251MG se cultivaron en DMEM (Biowest, Francia) suplementado con L-glutamina (Biowest, Francia) (2 mM), suero fetal bovino (FBS) (Gibco, UK) (10 %) y penicilina-

¹ *Los procedimientos experimentales descritos en este apartado fueron realizados por las doctoras Vanesa Andreu y Gracia Mendoza.*

estreptomicina-anfotericina B (Biowest, Francia) (1 %), a 37 °C bajo atmósfera humedecida al 5 % de CO₂.

Las células THP1 se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco, UK) suplementado con FBS (10 %), aminoácidos no esenciales (Biowest, Francia) (1 %), piruvato sódico (Biowest, Francia) (100 mM), búfer HEPES (Biowest, Francia) (10 mM), 2-mercaptoetanol (Gibco, UK) (0.05 mM) y penicilina-estreptomicina-anfotericina B (1 %), a 37 °C bajo atmósfera humectada al 5 % de CO₂. Posteriormente, las células THP1 se diferenciaron en macrófagos cultivándolas en medio RPMI 1640 suplementado con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (Sigma-Aldrich, Alemania) (1 µM) durante 72 h. Una vez diferenciadas, se cultivaron de nuevo en medio RPMI 1640 suplementado de L-Glutamina (2 mM), FBS (10 %), 2-mercaptoetanol (50 mM), búfer HEPES (1 %), aminoácidos no esenciales (1%), piruvato sódico (100 mM) and penicilina-estreptomicina-anfotericina B (1 %), a 37 °C bajo atmósfera humectada al 5 % de CO₂.

Las mMSCs se cultivaron en DMEM-F12 (Biowest, Francia) suplementado con suero fetal bovino (10 %), L-glutamina (2 mM) y penicilina-estreptomicina-anfotericina B (1 %) a 37 °C bajo atmósfera humectada al 5 % de CO₂ y condiciones de hipoxia (3 % de O₂).

Los materiales obtenidos se incubaron con las células en un rango de concentraciones entre 0.025 mg/mL y 0.4 mg/mL durante 24 h bajo condiciones de cultivo estándar. Tras la incubación, las células se lavaron empleando tampón fosfato salino Dulbecco (DPBS) (Biowest, Francia) y se incubaron durante 4 h en medio completo de cultivo con un 10 % de reactivo *CellQuantity-Blue*.

La citotoxicidad se evaluó mediante ensayo fluorométrico empleando el kit comercial *Blue Cell Viability Assay* (ABNOVA, Taiwan) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se empleó un lector de placas multimodal *Synergy HT* (Agilent, EEUU) con una longitud de onda de excitación de 530 nm y de lectura de 590 nm.

4. Resultados y discusión

4.1. Síntesis del copolímero de OEGMA₅₀₀ y MEO₂MA

La síntesis de P(MEO₂MA-co-OEGMA₅₀₀) se realizó mediante una adaptación de un método descrito previamente para el PMMA¹⁸². Este método de polimerización radicalaria controlada emplea un compuesto organometálico de iridio como catalizador. El mecanismo propuesto por Fors y Hawker se describe en la Figura 1. Al irradiar con luz ultravioleta el Ir(ppy)₃, éste pasa a un estado excitado, reaccionando con el iniciador y produciendo el primer radical que inicia la polimerización. Como consecuencia el iridio se oxida a Ir^{IV}, que puede reaccionar con un radical para regenerar el Ir^{III} mientras que las especies inactivas reaccionan con un bromo terminal. El ciclo se reinicia en presencia de luz con la reacción del Ir(ppy)₃ y las cadenas de polímero inactivas para generar un nuevo radical y la posterior adición de un monómero, produciendo así la propagación de la cadena^{182,185}.

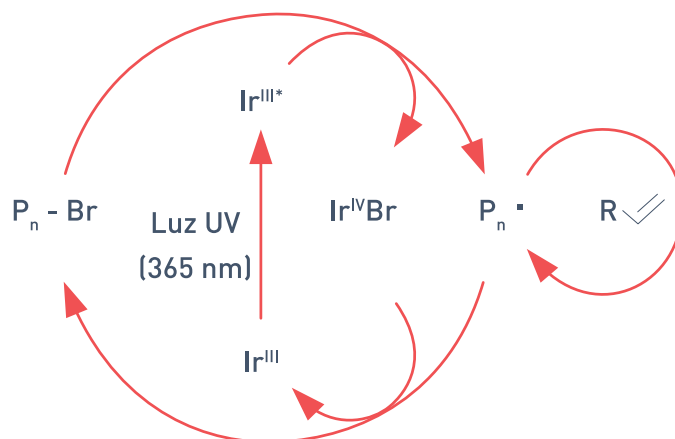


Figura 1: Mecanismo de polimerización mediada por $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ propuesto por Fors y Hawker.

A modo comparativo, se sintetizó también el $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA-co-OEGMA}_{500})$ mediante ATRP siguiendo el procedimiento descrito por Lutz y Hotz¹⁵³. La polimerización radicalaria controlada por transferencia de átomo es un método de polimerización robusto y ampliamente conocido desde hace tiempo¹⁸⁶, además de haber sido usado con éxito en la síntesis de copolímeros de MEO_2MA y OEGMA ^{22,26,187,188}.

El método de fotopolimerización radicalica (FPR) presenta múltiples ventajas frente al ATRP y sus derivados: Se trata de un método sencillo en un paso, todos los reactivos pueden adquirirse comercialmente y estos no requieren de preparación previa. La reacción se puede realizar a temperatura

ambiente y no es sensible a agua u oxígeno. Requiere cantidades muy bajas de catalizador (25 ppm), ya que este se regenera durante la reacción en presencia de luz, y la purificación es sencilla. Además, la reacción puede activarse y desactivarse fácilmente mediante luz.

Con el fin de confirmar que el material resultante de la síntesis mediante FPR se correspondía al copolímero P(MEO₂MA-co-OEGMA₅₀₀) se analizó mediante FTIR y RMN ¹H.

El espectro FTIR (Figura 2) mostró una banda característica a 2880 cm⁻¹ atribuida al enlace C-H. El pico a 1720 cm⁻¹ se corresponde a los grupos C=O mientras que la banda centrada a 1109 cm⁻¹ corresponde a los grupos C-O-C.^{189,190}

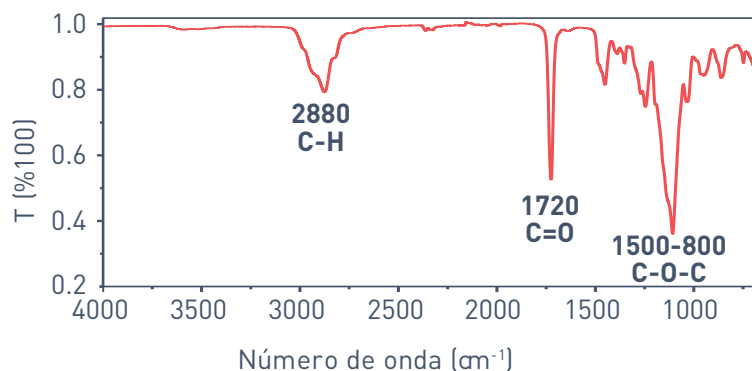


Figura 2: Espectroscopía FTIR del P(MEO₂MA-co-OEGMA₅₀₀) sintetizado mediante FPR.

El análisis del polímero obtenido mediante RMN ^1H (Figura 3) confirmó la estructura del copolímero P(MEO₂MA-co-OEGMA₅₀₀). Se observaron las resonancias características a 4.1 ppm (CH₂-CH₂-O), a 3.5-3.7 ppm (-CH₂-O-), a 3.4 ppm (-OCH₃), a 1.7-2 ppm (-CH₂C(CH₃)) y a 0.7-1.1 ppm (-CH₂C(CH₃)). Estas señales se corresponden a las descritas anteriormente en bibliografía¹⁹¹.

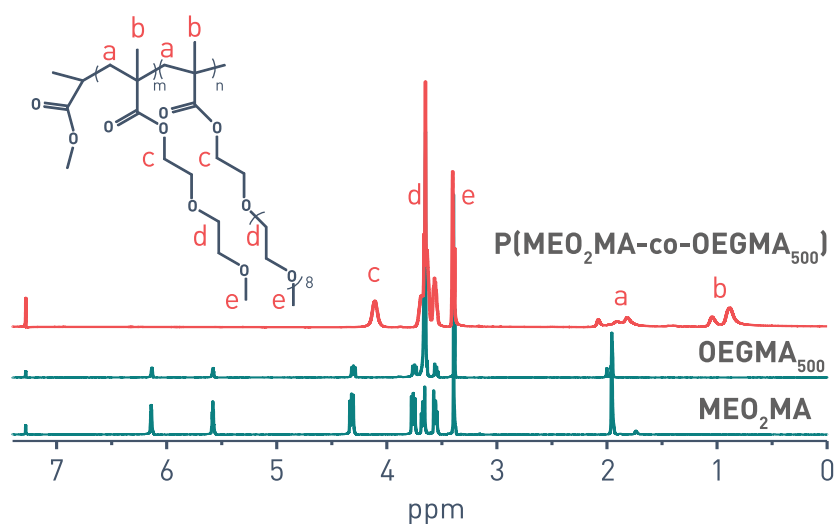


Figura 3: Espectros RMN ^1H del P(MEO₂MA-co-OEGMA₅₀₀) obtenido mediante FPR y de sus monómeros. a, b: -CH₂C(CH₃), c: CH₂-CH₂-O, d: -CH₂-O, e: -OCH₃

Se determinó también la proporción de comonómeros en el copolímero final empleando RMN ^1H . Para ello se integraron los picos a 3.5-3.7 ppm (I_d) y a 3.4 ppm (I_e) correspondientes a los protones de etilenglicol y metoxi respectivamente. Debido a que estos grupos están presentes en ambos comonómeros, es

posible determinar la relación entre ambos resolviendo un sistema lineal de dos ecuaciones (Ecuación 1).

$$\begin{aligned} \int d &= 6 \cdot [MEO_2MA] + 34 \cdot [OEGMA_{500}] \\ \int e &= 3 \cdot [MEO_2MA] + 3 \cdot [OEGMA_{500}] \end{aligned}$$

Ecuación 1: Sistema de ecuaciones empleado para determinar la proporción de comonómeros en el P(MEO₂MA-co-OEGMA₅₀₀).

Se determinó que la proporción (%) de comonómeros MEO₂MA/OEGMA₅₀₀ presente en el copolímero obtenido mediante FPR fue 89/11 ± 0.5, muy similar a la proporción real empleada en la síntesis (88/12).

La temperatura crítica de transición inferior (LCST) se determinó midiendo la transmitancia a 670 nm de una disolución acuosa del copolímero a una concentración de 3 mg/mL, en un rango de temperaturas entre 30 °C y 52 °C.

Por debajo de la LCST el copolímero es completamente soluble, por lo que la dispersión de la luz es mínima y la transmitancia de la disolución alta. Por encima de la LCST el copolímero se vuelve insoluble, los puentes de hidrógeno que forman los monómeros de OEGMA₅₀₀ con las moléculas de agua se rompen y la cadena polimérica colapsa provocando una transición helicoidal-globular que provoca la precipitación del polímero¹⁹¹. Es por esto por lo que una caída de la transmitancia

es indicativa de la transición hidrófila-hidrófoba del copolímero.

La temperatura de transición viene determinada por la proporción de comonómeros, mientras que la anchura a media altura depende de la polidispersidad y homogeneidad de las cadenas.

La curva de transmitancia del copolímero obtenido (Figura 4), presentó una transición estrecha (4 °C), indicativo de una polimerización controlada y una baja polidispersidad de las cadenas, con una LCST de 43 °C, situada dentro del rango fisiológico.

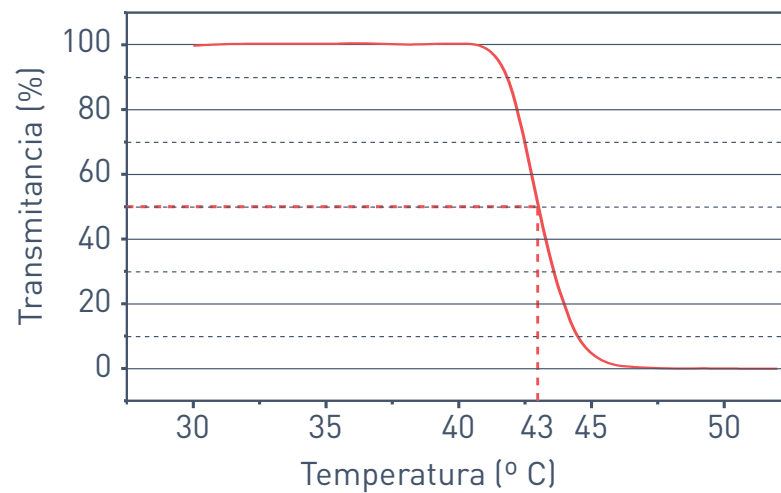


Figura 4: Curva de transmitancia a 670 nm frente a temperatura del $P(\text{MEO}_2\text{MA-co-OEGMA}_{500})$ obtenido mediante FPR.

4.2. Comparación frente a ATRP.

Adicionalmente, se determinó la velocidad de reacción, el grado de conversión y el peso molecular de copolímero sintetizado mediante FPR y se comparó con el obtenido mediante ATRP.

Ambas reacciones se realizaron empleando la misma proporción molar de monómeros/iniciador (100/1) y de comonómeros (MEO₂MA/OEGMA₅₀₀ : 88/12). La síntesis mediante ATRP se llevó a cabo a 60 °C en ausencia de oxígeno mientras que la síntesis mediante FPR se realizó a temperatura ambiente y se emplearon 400 veces menos catalizador.

La cinética de reacción se determinó monitorizando la conversión de los comonómeros frente al tiempo mediante RMN ¹H. Para ello se comparó la integración de los picos a 5.57 y 6.13 ppm correspondientes a los protones vinilo de los comonómeros, con la integración de la región 4.0-4.4 ppm que corresponde a dos protones de los comonómeros y dos del copolímero (-CH-CH-O-) (Figura 5).

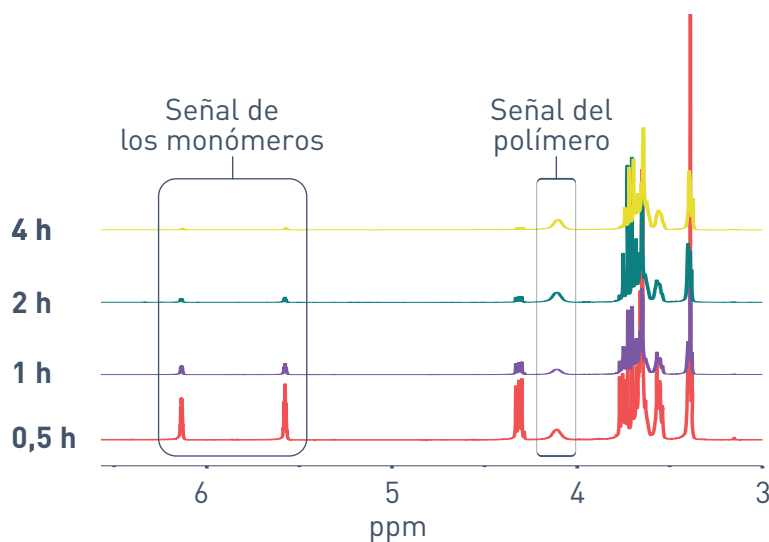


Figura 5: Evolución en el tiempo del espectro RMN 1H de la mezcla de reacción. Los picos a 5.57, 6.13 y 4.35 ppm, correspondientes a los monómeros disminuyen conforme avanza la reacción, mientras que el pico a 4.15 ppm correspondiente al copolímero se incrementa.

Se observó una velocidad de conversión mayor en el caso de la reacción FPR (Figura 6), alcanzándose el 50 % de conversión en menos de 1 h, mientras que mediante ATRP la conversión del 50 % se alcanzó tras 10 h de reacción. En ambos casos, el perfil de las curvas de conversión fue similar, observándose una mayor velocidad durante las 4 primeras horas de reacción, que decae notablemente a partir de la sexta hora. Este cambio de tendencia puede explicarse por la disminución de la concentración de monómeros disponibles en la reacción conforme se propaga el polímero, así como por el agotamiento del catalizador en el caso de ATRP.

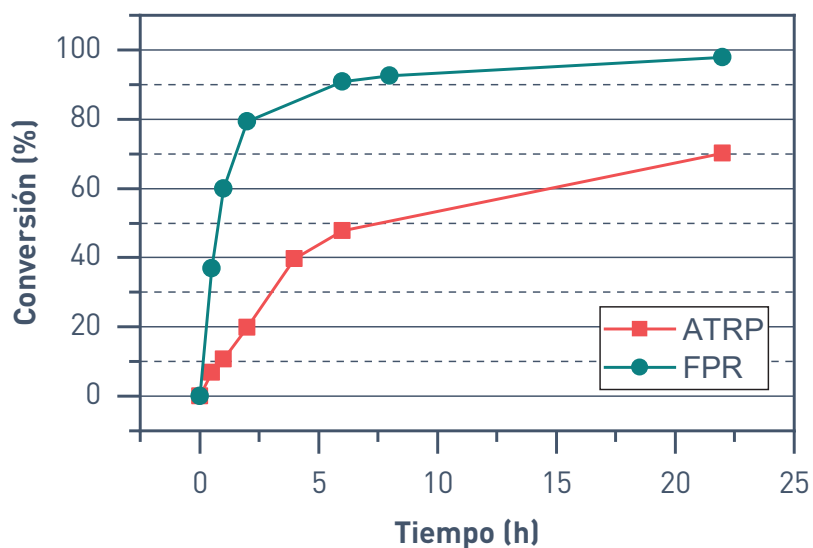


Figura 6: Conversión de los comonómeros en función del tiempo de reacción.

La tasa de reacción se analizó mediante la representación del logaritmo del cociente de concentración inicial de monómero respecto a la concentración en un momento determinado ($\ln(M_0/M_t)$) frente al tiempo de reacción (Figura 7).

En ambos casos se observó una cinética de primer orden, presentando una velocidad de reacción superior la FPR. Además, la linealidad de la función sugiere que en ambos casos se consiguió una concentración constante de radicales de propagación¹⁹², algo característico de los métodos de polimerización viva o controlada.

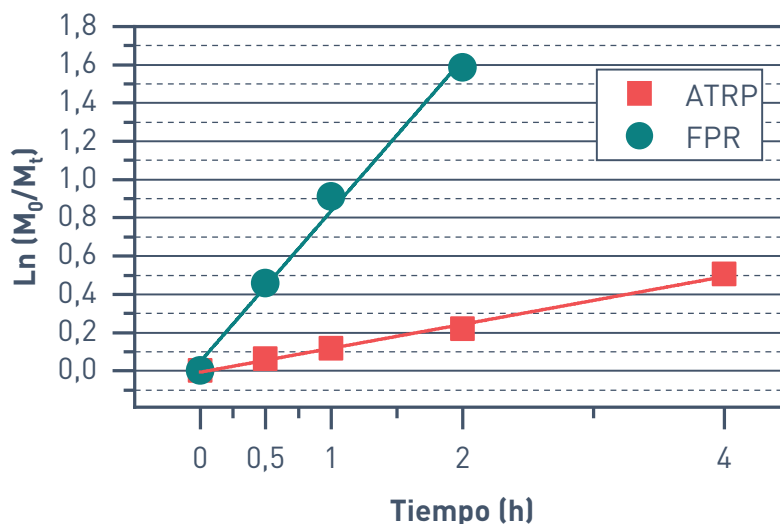


Figura 7: Representación de la tasa de reacción.

Tanto peso molecular de los polímeros obtenidos como índice de polidispersidad se obtuvieron mediante GPC calibrada frente a patrones de PMMA usando tetrahidrofurano como eluyente. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

Adicionalmente, se calculó el peso molecular teórico empleando la Ecuación 2.

$$Mn_{th} = F_c \cdot \frac{(500 \cdot N_{OEGMA} + 188 \cdot N_{MEO_2MA})}{N_i}$$

Ecuación 2: Fórmula empleada para el cálculo del peso molecular teórico. (Mn_{th}). N_{OEGMA} : número de unidades de monómero de OEGMA iniciales, N_{MEO_2MA} : número de unidades de monómero de MEO₂MA iniciales, N_i : número de unidades de iniciador, F_c : factor de conversión real determinado mediante RMN¹H.

En ambos casos, el peso molecular obtenido coincidió con el valor teórico determinado según sus respectivos grados de conversión. Respecto al índice de polidispersidad, el copolímero obtenido mediante ATRP presentó una polidispersidad significativamente menor que el obtenido mediante FPR. En gran medida esto puede ser explicado por la diferencia del grado de conversión alcanzado en cada síntesis, ya que la polidispersidad de las cadenas aumenta gradualmente con la conversión. Esto se debe a que el número de cadenas inactivas generadas por reacciones radicálicas terminales aumenta conforme se propagan las cadenas. Es por esto por lo que a mayor conversión la proporción de cadenas inactivas aumenta, impactando en la polidispersidad del polímero final¹⁹³⁻¹⁹⁵.

	Mn_{GPC} (kDa)	Mn_{th} (kDa)	IPD_{GPC} (M_w/M_n)
FPR	21.33 ± 1.89	20.88	1.31 ± 0.03
ATRP	15.21 ± 1.15	15.91	1.08 ± 0.00

Tabla 2: Peso molecular obtenido mediante GPC (Mn_{GPC}), teórico (Mn_{th}) e índice de polidispersidad (IPD_{GPC}) de los copolímeros obtenidos mediante FPR y ATRP.

Además, en el caso concreto de copolímeros de MEO₂MA y OEGMA, se ha demostrado que los métodos basados en ATRP proporcionan un elevado control de la reacción produciendo valores del índice de polidispersidad cercanos a 1 en conversiones cercanas al 80 %, sin embargo, por encima del 90 %, la polidispersidad alcanza valores de entre 1.22 y 1.72¹⁵³.

Resultados de fotopolimerización de PMMA empleando catalizadores de iridio publicados anteriormente mostraron valores de polidispersidad similares a los obtenidos en este trabajo con P(MEO₂MA-co-OEGMA₅₀₀) (1.24-1.36)¹⁸².

4.3. Evaluación in vitro de la citocompatibilidad

La citotoxicidad de copolímeros basados en OEGMA obtenidos mediante ATRP y derivados, ha sido ampliamente estudiada. Estudios disponibles en la literatura muestran una baja citotoxicidad de diversos copolímeros basados en POEGMA preparados mediante ATRP, en células humanas de hepatocarcinoma (HepG2)^{26,196}, en células de riñón de mono¹⁹⁷ y en células HeLa¹⁹⁸. En todos estos casos, la viabilidad superó el 90 %, sin embargo el copolímero debía ser purificado cuidadosamente para evitar la presencia de catalizador, altamente citotóxico¹⁹⁷. Copolímeros obtenidos mediante ARGET-ATRP con muy bajas cantidades de catalizador (25 ng por mg de polímero) mostraron valores de citocompatibilidad altos sin requerir de exhaustivos métodos de purificación, sin embargo un subproducto de la hidrólisis (dietilenglicol monometil éter) mostró una elevada toxicidad¹⁹⁹.

Para determinar la citotoxicidad del copolímero obtenido mediante FPR, se estudiaron sus efectos sobre el

metabolismo celular de cuatro líneas celulares empleando el ensayo comercial de viabilidad *Blue Cell*.

En los resultados obtenidos (Figura 8), no se apreciaron diferencias significativas entre las concentraciones estudiadas (0.025-0.4 mg/mL) ni entre las diferentes líneas celulares. En todos los casos la viabilidad estuvo por encima del 92 %, por lo que acorde a la norma ISO 10993-5, en las concentraciones estudiadas el copolímero sintetizado mediante FPR no es citotóxico, siendo potencialmente apto para aplicaciones biomédicas.

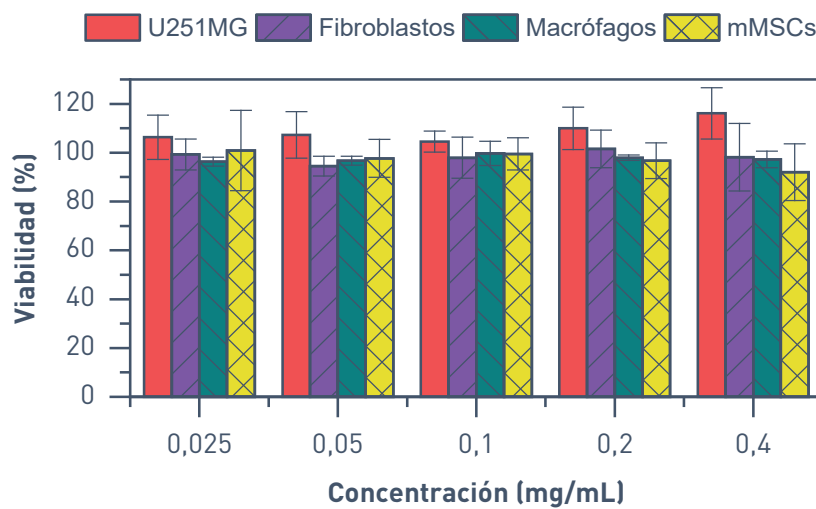


Figura 8: Viabilidad celular del $P(MEO2MA-co-OEGMA500)$ obtenido mediante FPR, sobre cuatro líneas celulares.

5. Conclusiones

En este capítulo se logró sintetizar con éxito el copolímero P(MEO₂MA-co-OEGMA₅₀₀) mediante un método de fotopolimerización radicalica no empleado anteriormente con este polímero.

Los resultados mostraron un gran control sobre el peso molecular y la composición del copolímero final. Además, se obtuvo una elevada conversión en un tiempo corto, alcanzándose el 50 % en menos de 1h de reacción.

El procedimiento propuesto presentó varias ventajas respecto al empleado para la polimerización mediante ATRP: Pudo ser realizado a temperatura ambiente, en presencia de oxígeno y requirió de concentraciones de catalizador mucho menores. Adicionalmente la tasa de conversión, la velocidad de reacción y la conversión final fueron considerablemente mayores.

Adicionalmente, el polímero final no mostró diferencias significativas con el obtenido mediante ATRP.

El copolímero obtenido no presentó citotoxicidad en ningún caso para las concentraciones y las líneas celulares estudiadas.

Por todo esto este nuevo procedimiento sintético para el P(MEO₂MA-co-OEGMA₅₀₀) se presenta como un método eficiente para la obtención de P(MEO₂MA-co-OEGMA₅₀₀) y prometedor para su aplicación en polimerización en sistemas dispersos.

Capítulo III: **Síntesis y caracterización
de nanomateriales híbridos con
respuesta opto-mecánica basados en
P(MEO2MA-co-OEGMA₅₀₀)**

1. Introducción

Los copolímeros basados en OEGMA han sido aplicados con éxito en liberación controlada de fármacos, no sólo en forma de polímero^{200,201}, sino también en otras formulaciones como micelas^{202,203}, vesículas²⁰⁴, microgeles y nanogeles²⁰⁵ e hidrogeles¹⁹⁰.

De entre estas formulaciones, los nanogeles se han mostrado como una de las opciones más prometedoras²⁰⁶. Esto se debe a que poseen unas características óptimas para la liberación controlada de fármacos, como su alta capacidad de carga y liberación de moléculas debido a la elevada relación interna superficie/volumen²⁰⁷, a la posibilidad de ajustar su tamaño²⁰⁸, a su baja toxicidad²⁰⁹, alta estabilidad y posibilidad de combinar liberación sostenida y controlada²¹⁰. Los métodos de síntesis más extendidos para la producción de nanogeles se basan en la polimerización radicalica heterogénea en presencia de un agente entrecruzante. Destacan principalmente la polimerización por dispersión²¹¹⁻²¹³, polimerización por precipitación²¹⁴⁻²¹⁶, polimerización en miniemulsión inversa²¹⁷⁻²¹⁹ y polimerización en microemulsión inversa²²⁰⁻²²². De todos, el más empleado en la síntesis de nanogeles basado en copolímeros de OEGMA ha sido la polimerización radicalaria por precipitación^{188,223}. Se trata de un método sencillo, permite encapsular moléculas terapéuticas durante la síntesis y

proporciona partículas con tamaños entre 100 nm y 3 μm ²²⁴. Sin embargo, en los últimos años, la polimerización en miniemulsión mediante ATRP y sus variantes ha ganado protagonismo gracias a los avances proporcionados por Krzysztof Matyjaszewski y su grupo²²⁵⁻²²⁸. En 2010, Dong y Matyjaszewski reportaron la síntesis de nanogeles de P(MEO₂MA-co-OEGMA) mediante AGET ATRP en miniemulsión inversa²²⁹. Este método demostró un gran control sobre la polimerización, proporcionado tanto polímero como nanogeles con un bajo índice de polidispersidad. La aplicación de métodos derivados de ATRP en la síntesis de nanogeles basados en OEGMA mediante miniemulsión inversa proporciona ventajas potenciales sobre otros métodos. Estos incluyen el alto nivel de control sobre la polimerización, que proporciona polímeros con baja polidispersidad y transiciones estrechas, así como un alto grado de funcionalización²³⁰ gracias a la posibilidad de añadir grupos funcionales terminales a las cadenas de polímero. Es precisamente el alto grado de funcionalización lo que representa una ventaja potencial en aplicaciones de liberación controlada de fármacos. La posibilidad de combinar los nanogeles termosensibles con otro material que actúe como transductor abre la puerta al desarrollo de nuevos sistemas que permitan un alto grado de control temporal y espacial sobre el tratamiento.

Algunos ejemplos aplicados con éxito son el uso de nanopartículas magnéticas^{135,231}. Cuando se combinan con un polímero termosensible son capaces de activarlo mediante el calor generado al aplicar un campo magnético alterno sobre ellas. Del mismo modo, las nanopartículas plasmónicas que producen un elevado calentamiento bajo un haz de luz coherente²³², son capaces de activar la respuesta térmica del polímero cuando se irradian con luz.

2. Resumen y objetivos

En este capítulo se presenta un procedimiento sintético que permite obtener nanogeles termosensibles de P(MEO₂MA-co-OEGMA₅₀₀) funcionalizados con grupos tiol mediante fotopolimerización radicalaria en miniemulsión. Asimismo, se emplean los nanogeles obtenidos en combinación con nanopartículas huecas de oro, para la producción de un sistema de liberación controlada activada por luz, para su potencial aplicación en el tratamiento del dolor crónico.

El objetivo de este capítulo es validar el comportamiento de dicho sistema y su potencial aplicación en la liberación controlada de fármacos. Para ello se caracterizó su estructura, composición y respuesta ante estímulos térmicos y ópticos. Del mismo modo, se evaluaron los perfiles de liberación sostenida y controlada.

Finalmente, se realizó un estudio completo in vitro de biocompatibilidad mediante ensayos de viabilidad celular y citometría de flujo en cuatro líneas celulares. Adicionalmente se cuantificó la cantidad de endotoxina presente en el material final, de cara su potencial aplicación en estudios in vivo.

3. Métodos y materiales

3.1. Síntesis de materiales

Los reactivos dietilenglicol metiléter metacrilato (95%) (MEO₂MA), oligoetilenglicol metiléter metacrilato (Mn. 500 g/mol) (OEGMA₅₀₀), bis[2-(2'-bromoisobutyryloxy)etil]disulfuro (BiBOEDS), tris[2-fenilpiridinato-C²,N] iridio(III) (99%) (Ir(ppy)₃), etilenglicol dimetacrilato (98%) (EGDMA), anisol (99%), hexadecano (99%), Brij[®] O20 (Mn 1150 Da), ácido L-ascórbico (99%), cloruro de cobalto (II) hexahidratado (98%), citrato de sodio tribásico dihidratado (99%), Polivinilpirrolidona (Mw 55000 Da) (PVP), borohidruro de sodio (99,99%) y cloruro de oro (III) hidratado (50% Au) se utilizaron como se recibieron.

Todos los reactivos fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (Madrid, España), a excepción del etanol anhidro que fue adquirido a Panreac Química S.A. (Barcelona, España).

3.1.1. Síntesis de nanogeles tiolados de P(MEO₂MA-co-OEGMA₅₀₀)

La síntesis de nanogeles tiolados de P(MEO₂MA-co-OEGMA₅₀₀) ((POEGMA)NGs) se realizó mediante una reacción de polimerización en un sistema disperso mediante miniemulsión.

En primer lugar, se añadió a un bote de polipropileno de 25 mL una mezcla compuesta por dos fases. Una fase orgánica formada por una mezcla de 600 mg de OEGMA₅₀₀, 1,65 g de MEO₂MA, 9 µL de BiBOEDS, 20 µL de EGDMA, 139 µL de hexadecano, 600 µL de anisol y 139 µL de una solución de Ir(ppy)₃ en etanol (1 mg/mL), y una fase acuosa formada por 5 mL de una disolución 5 mM de Brij[®] O20. A continuación, se formó una miniemulsión de la fase orgánica en la fase acuosa. Para ello se aplicaron tres ciclos consecutivos de emulsificación ultrasónica en un baño de hielo (90 s a una amplitud del 30 %) empleando un equipo de ultrasonidos de sonda de 400 W (Branson Digital Sonifier 450, Emerson Electric Co., US). La miniemulsión resultante se trasvasó a un matraz schlenk sellado de 25 mL, se desoxigenó empleando una línea de schlenk y se dejó reaccionar durante 8h bajo luz ultravioleta, empleando dos diodos led de longitud de onda 365 nm (LED Engin modelo LZ4-04UV00) y con un flujo radiante total de 6.6 W. Una vez finalizada la reacción, los nanogeles obtenidos se purificaron mediante ultracentrifugado. Para ello se realizaron primero tres lavados en etanol, seguidos de otros tres en una mezcla 50:50 vol. de agua y etanol, y finalmente cinco lavados en agua. Con el fin de obtener los grupos tiol funcionales en los nanogeles, se redujeron los enlaces disulfuro incubando los nanogeles a una concentración de 2 mg/mL durante 24 h en una solución acuosa de ácido ascórbico 1 M. Finalmente se eliminó el ácido

ascórbico mediante lavados por ultracentrifugación en agua Mili-Q (tres ciclos a 6000 rpm durante 20 minutos). Los nanogeles obtenidos se almacenaron en dispersión acuosa (20 mg/mL) a 4 °C hasta su uso.

3.1.2. Síntesis de nanopartículas huecas de oro

Las nanopartículas huecas de oro (HGNGPs) se sintetizaron siguiendo una versión escalada de un protocolo publicado anteriormente.

En primer lugar, se añadieron a un matraz de balón de tres bocas 400 mL de una solución acuosa 0.8 M de cloruro de cobalto hexahidratado, 1.6 mL de una solución acuosa 0.1 M de citrato de sodio tribásico dihidratado y 400 mL de agua desionizada. La solución se desgasificó borboteando argón durante 45 minutos. A continuación, y todavía bajo borboteo de argón y agitación magnética, se añadieron 4 mL de una solución acuosa al 1% en peso de PVP (55000 Da) y 900 µL de una solución acuosa 0.1 M de borohidruro de sodio. La solución se mantuvo en agitación y con borboteo de argón durante 15 minutos, adquiriendo un tono marrón oscuro, indicativo de la formación de los núcleos de cobalto. A continuación, 380 mL de la solución anterior se transfirieron a un vaso de precipitados en agitación que contenía 100 mL de una solución acuosa 0.38 mM de ácido cloroáurico hemipentahidratado. La mezcla se

dejó reaccionar durante 30 minutos para permitir el reemplazo galvánico del cobalto superficial de los núcleos por oro y asegurar la completa oxidación del resto del núcleo de cobalto. Finalmente, las nanopartículas huecas de oro obtenidas se purificaron y reconcentraron mediante al menos cinco lavados por ultracentrifugación (13000 rpm durante 10 minutos) y se almacenaron en dispersión coloidal a 2 mg/mL y 4 °C.

3.1.3. Conjugación de las nanopartículas huecas de oro y los nanogeles tiolados de P(MEO2MA-co-OEGMA500)

La conjugación de las nanopartículas huecas de oro y los nanogeles tiolados de P(MEO2MA-co-OEGMA500) se llevó a cabo incubando durante 24h y bajo agitación magnética, las soluciones stock de ambos materiales en una proporción volumétrica 1:2 (1:20 en masa) a favor de los (POEGMA)NGs. Una vez finalizada la reacción, los materiales híbridos obtenidos ((POEGMA)NGs@HG NPs) se aislaron mediante dos ciclos de separación por ultracentrifugación (6000 rpm durante 15 minutos). El material final se almacenó en dispersión acuosa a una concentración de 5 mg/mL y una temperatura de 4 °C.

3.1.4. Preparación de los nanomateriales cargados con hidrocloreuro de bupivacaína

El anestésico hidrocloreuro de bupivacaína (BPV) se cargó en los (POEGMA)NGs@HGNGPs mediante incubación y difusión en una solución saturada del mismo. Para ello se disolvió en la disolución stock de nanogeles híbridos (5 mg/mL) bupivacaína hasta una concentración final de 30 mg/mL. A continuación, se mantuvo en agitación suave durante 24 h para permitir la difusión del fármaco en el interior de los nanogeles. Finalmente, el exceso de bupivacaína se eliminó mediante varios lavados por ultra centrifugación (12000 rpm durante 15 minutos). Los nanogeles cargados se almacenaron a 4 °C a una concentración equivalente de bupivacaína de 2 mg/mL.

3.2. Caracterización

3.2.1. Microscopía electrónica de transmisión

El análisis por imagen de los materiales se realizó mediante un microscopio electrónico de transmisión (FEI TECNAI T20, Thermo Fisher Scientific, EEUU) operado a 200 kV. Todas las muestras se prepararon en rejillas portamuestras para TEM de cobre recubiertas de carbón/formar (200 mesh).

Para poder ver correctamente los materiales orgánicos y evitar altas diferencias de contraste entre materiales orgánicos e

inorgánicos, todas las muestras se contrastaron empleando ácido fosfotúngstico para microscopía (Sigma-Aldrich, España). El procedimiento consistió en aplicar una gota de una disolución acuosa (3 % en peso) de ácido fosfotúngstico sobre la muestra preparada y dejarla reaccionar durante 15 minutos. Posteriormente se eliminó el exceso de contraste aplicando una gota de agua mili-Q sobre la muestra durante 10 minutos.

Para determinar el tamaño medio del material mediante imagen se realizó un análisis cuantitativo sobre distintas imágenes de TEM correspondientes a 3 lotes distintos de materiales empleando el software de análisis de imagen ImageJ (*National Institutes of Health*, EEUU).

3.2.2. Dispersión dinámica de la luz

El diámetro hidrodinámico de los (POEGMA)NGs y su reducción volumétrica por calentamiento se caracterizaron mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz. Para ello se empleó un equipo de análisis de tamaño de nanopartículas Brookhaven 90Plus (Brookhaven Instruments, EEUU) equipado con una láser de 50 mW y 532 nm de longitud de onda.

Las muestras se midieron en dispersión acuosa con pH5.5 a una concentración de 0.01 mg/mL y empleando un valor de 90 ° de ángulo de dispersión. Para realizar las medidas

a diferentes temperaturas, se empleó el sistema de control de temperatura del propio equipo.

3.2.3. Espectroscopía atómica de emisión mediada por plasma

Con el fin de determinar la proporción entre HGNNPs y (POEGMA)NGs en el material híbrido final, se realizaron análisis elementales empleando un equipo de espectroscopía atómica de emisión mediada por plasma MP-AES 4100 (Agilent, EEUU). Para ello, se digirieron 5 muestras de 1 mg de cada material en agua regia (10 mg/mL) a temperatura ambiente durante 16h. Una vez digeridas, las muestras se diluyeron en agua mili-Q hasta unas concentraciones finales de 1 mg/mL ((POEGMA)NGs@HGNNPs) y de 0.1 mg/mL (HGNNPs). Finalmente, las muestras se filtraron y se midieron a dos longitudes diferentes (242 nm y 267 nm) contra un patrón de oro (TraceCert® 1000 ppm, Sigma-Aldrich, España).

3.2.4. Perfiles de calentamiento láser

Se irradiaron perpendicularmente muestras acuosas de 1 mL a una concentración de 0.05 mg/mL (HGNNPs) y 3 mg/mL ((POEGMA)NGs@HGNNPs/BPV), contenidas en un portamuestras cilíndrico de plástico (Ø15.50 x 17.50 mm) durante 10 minutos, mientras se monitorizaba la temperatura mediante un termopar situado en un lateral de las muestras.

Para ello se empleó un láser-diodo de 2W y longitud de onda 808 nm (MDL-III-808-2W, Changchun New Industries Optoelectronics Technology Co., China) equipado con una fibra óptica y un colimador fijo ($f= 11.07$ mm, $NA= 0.26$; Thorlabs, Alemania). En todas las muestras se aplicó una irradiancia de 7 W/cm^2 , calibrada mediante un sensor de fotodiodo (PD300-3W, Ophir Laser Measurement Group, Israel).

3.2.5. Cálculo de la carga efectiva

Para calcular la carga efectiva de bupivacaína, se realizaron múltiples extracciones mediante ciclos térmicos empleando un agitador termostatzado (Biosan TS-100C, Letonia).

El procedimiento consistió en calentar cinco muestras de 1 mL (1 mg/mL) en PBS hasta $48 \text{ }^\circ\text{C}$, mantener a esa temperatura durante 3 minutos y enfriar hasta temperatura ambiente. Tras cada ciclo se centrifugaron las muestras (12000 rpm, 15 min.), se retiró el sobrenadante (900 μL), se filtró y se determinó la concentración de bupivacaína mediante espectrofotometría UV midiendo la absorbancia a 272 nm y extrapolando respecto a una curva de calibración²³³. Antes de comenzar el nuevo ciclo, se repusieron los 900 μL con PBS nuevo. Se detuvo el procedimiento una vez se obtuvieron dos

medidas consecutivas sin presencia de bupivacaína en el sobrenadante.

3.2.6. Determinación de los perfiles de liberación

Se determinaron los perfiles tanto de liberación sostenida por difusión como liberación bajo demanda activada por ciclos de láser.

Para calcular la liberación sostenida, se colocaron en un agitador termostatzado (Biosan TS-100C, Letonia) múltiples muestras de 1 mL (1mg/mL) en PBS y se incubaron bajo agitación suave a 37 °C. Se tomaron 3 muestras aleatorias a 6 h, 24 h, 48 h, 96 h y 192 h. Se separó el sobrenadante mediante centrifugación (12000 rpm, 15 min.), se filtró y se midió la concentración de bupivacaína presente mediante espectrofotometría UV según el procedimiento descrito en el apartado anterior. Para determinar la liberación bajo demanda, se realizaron múltiples ciclos de calentamiento empleando un láser NIR (MDL-III-808-2W, Changchun New Industries Optoelectronics Technology Co., China) equipado con una fibra óptica y un colimador fijo ($f= 11.07$ mm, $NA= 0.26$; Thorlabs, Alemania). En cada ciclo se irradiaron 5 muestras de 1 mL en PBS (1 mg/mL) con una irradiancia de 7 W/cm^2 mientras se monitorizaba la temperatura. Una vez alcanzados los 46 °C se detuvo la irradiación y se dejó enfriar la muestra

hasta temperatura ambiente. Tras cada ciclo se centrifugaron las muestras, se retiraron 900 μL de sobrenadante, se filtraron y se midió la concentración de bupivacaína mediante espectrofotometría UV, de igual forma que en los experimentos anteriores. Antes de iniciar el siguiente ciclo, se añadieron 900 μL de PBS.

3.2.7. Estudios Biológicos²

Los ensayos in vitro descritos en este apartado fueron realizados por las doctoras Vanesa Andreu y Gracia Mendoza.

Para los estudios de citocompatibilidad se emplearon cuatro líneas celulares: fibroblastos dérmicos humanos (Lonza, Bélgica), células madre mesenquimales de ratón (mMSCs, cedidas por la doctora Pilar Martín Duque), células de glioblastoma humano (U251MG, cedidas por la doctora Pilar Martín Duque) y macrófagos humanos diferenciados a partir de células monocíticas de leucemia aguda THP1 (American Type Culture Collection, US) según el método publicado previamente por Gracia Mendoza et al.¹⁸⁴.

Las mMSCs se cultivaron en DMEM-F12 (Biowest, Francia) suplementado con suero fetal bovino (FBS) (Gibco,

² *Los procedimientos experimentales descritos en este apartado fueron realizados por las doctoras Vanesa Andreu y Gracia Mendoza.*

UK) (10 %), L-glutamina (Biowest, Francia) (2 mM) y penicilina-estreptomicina-amfotericina B (Biowest, Francia) (1 %) a 37 °C bajo atmósfera humectada al 5 % de CO₂ y condiciones de hipoxia (3 % de O₂).

Las células THP1 se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco, UK) suplementado con FBS (10 %), aminoácidos no esenciales (Biowest, Francia) (1 %), piruvato sódico (Biowest, Francia) (100 mM), búfer HEPES (Biowest, Francia) (10 mM), 2-mercaptoetanol (Gibco, UK) (0.05 mM) y penicilina-estreptomicina-amfotericina B (1 %), a 37 °C bajo atmósfera humectada al 5 % de CO₂. Posteriormente, las células THP1 se diferenciaron en macrófagos cultivándolas en medio RPMI 1640 suplementado con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (Sigma-Aldrich, Alemania) (1 µM) durante 72 h. Una vez diferenciados, se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con L-Glutamina (2 mM), FBS (10 %), 2-mercaptoetanol (50 mM), búfer HEPES (1 %), aminoácidos no esenciales (1 %), piruvato sódico (100 mM) y penicilina-estreptomicina-amfotericina B (1 %), a 37 °C bajo atmósfera humectada al 5 % de CO₂.

Los fibroblastos dérmicos humanos y las células U251MG se cultivaron en DMEM suplementado con L-glutamina (Biowest, Francia) (2 mM), FBS (10 %) y

penicilina-estreptomicina-amfotericina B (Biowest, Francia) (1 %), a 37 °C bajo atmósfera humedecida al 5 % de CO₂.

Sobre cada una de estas líneas celulares se realizaron tres tipos de estudios diferentes: viabilidad celular, citometría de flujo y cuantificación de endotoxina.

Para evaluar la viabilidad celular, ciclo celular y apoptosis, se incubaron (POEGMA)NGs, (POEGMA)NGs@HGNGs, (POEGMA)NGs@HGNGs/BPV y bupivacaína libre a distintas concentraciones con los cultivos celulares durante 24 h. La viabilidad celular se determinó mediante ensayo fluorométrico empleando el kit comercial *Blue Cell Viability Assay* (Abnova, Taiwan) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se empleó un lector de placas multimodal *Synergy HT* (Agilent, EEUU) con una longitud de onda de excitación de 530 nm y de lectura de 590 nm. Todos los valores de viabilidad son relativos al control sin tratar, considerándose este como 100% de viabilidad.

Los ensayos de citometría de flujo se llevaron a cabo con el fin de determinar los efectos de los materiales en el ciclo celular y la apoptosis. Los experimentos se desarrollaron empleando las concentraciones subcitotóxicas de cada material, determinadas en el estudio de viabilidad anterior. La apoptosis se evaluó mediante la doble tinción con anexina V-FITC y

yoduro de propidio. Para ello, se incubaron las muestras en un tampón de unión y se analizaron empleando un citómetro de flujo FACSAria (Becton Dickinson, EEUU). La distribución de ciclo celular se evaluó mediante tinción con la solución PI/RNASE (Immunostep, España). Tras fijar las células en etanol y lavarlas, las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACSAria (Becton Dickinson, EEUU) y el software MODIFIT (versión 3, Verity Software House, EEUU). La cuantificación de endotoxina en los materiales finales se realizó mediante ensayo LAL empleando el *Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit* (Thermo Fisher Scientific, US), siguiendo las instrucciones del fabricante.

4. Resultados y discusión

4.1. Síntesis y caracterización de los materiales

La síntesis de los POEGMA-NGs se realizó mediante el método de polimerización radicalaria entrecruzada en sistema disperso por miniemulsión. Este método permite contener la reacción dentro de la fase dispersa del sistema, dando lugar a múltiples reacciones aisladas que resultan en la obtención de partículas poliméricas independientes. Debido a que cada gota dispersa del sistema actúa como un “microreactor” aislado, el tamaño y homogeneidad de la dispersión tienen un impacto directo en los materiales resultantes²³⁴. Esto, unido a los tiempos de reacción necesarios, deriva en la necesidad de obtener una mezcla líquida monodispersa, isótropa y estable.

El procedimiento empleado se basó en el descrito por Dong y Matyjaszewski en 2010²²⁹, sustituyendo el método AGET-ATRP original por el método foto-ATRP descrito en el capítulo anterior²³⁵.

Como se ha dicho anteriormente, este nuevo procedimiento presenta múltiples ventajas frente al basado en AGET-ATRP: no es sensible al oxígeno, puede activarse y desactivarse mediante luz, requiere de una cantidad de catalizador mucho menor, todos los reactivos están disponibles comercialmente y puede llevarse a cabo a baja temperatura²³⁶⁻²³⁸.

Esta última característica es de especial importancia ya que las miniemulsiones son cinéticamente estables, pero termodinámicamente inestables²³⁹.

Una vez formada la miniemulsión, su degradación depende de dos fenómenos: por un lado, la coalescencia de partículas debida a las colisiones entre ellas y las fuerzas de van der Waals, y por otro la degradación de la fase dispersa por la difusión de monómeros (fenómeno de maduración de Ostwald). Ambos fenómenos se ven influidos directamente por la temperatura, por lo que poder llevar a cabo la reacción a baja temperatura supone una importante ventaja a la hora de mantener la estabilidad del sistema durante todo el proceso de polimerización. Además de modificar el método de polimerización respecto al procedimiento descrito por Dong y Matyjaszewski, también se sustituyó el iniciador original por uno con un puente disulfuro central, de cara a obtener grupos funcionales que permitiesen la unión covalente de las HGNGPs.

Una vez sintetizados los nanogeles, se rompió el puente disulfuro mediante reducción con ácido ascórbico, dando lugar a grupos tiol funcionales. Los nanogeles obtenidos se incubaron con las HGNGPs en una proporción 5:1 en masa y finalmente se recubrieron con PEG para mejorar su biocompatibilidad y estabilidad coloidal. Las HGNGPs se unieron con éxito a los (POEGMA)NGs gracias a la capacidad de los grupos tiol de

reaccionar con la superficie del oro formando enlaces Au-S mediante una reacción de reducción-oxidación^{240,241}.

La morfología (Figura 9) y la distribución de tamaños de partícula (Figura 10) se obtuvieron mediante microscopía electrónica de transmisión. Tras analizar las imágenes, se observaron poblaciones de nanogeles con geometría esférica, tanto antes (Figura 9, izquierda) como después de acoplar las HGNGPs (Figura 9, derecha), con un diámetro de 304.3 ± 43.3 nm y 312.1 ± 46.3 nm respectivamente. El índice de polidispersidad (PDI) fue en ambos casos 0.02, pudiendo considerarse altamente monodispersas²⁴². El diámetro ligeramente superior tras acoplar las HGNGPs puede achacarse a la variabilidad de la muestra o a la pérdida de los nanogeles de menor tamaño durante el proceso de purificación posterior al acoplamiento de las HGNGPs. En las imágenes posteriores a la incubación de los (POEGMA)NGs y las HGNGPs se observó que hubo acoplamiento entre ambos, estando la mayoría de nanogeles decorados con entre 1 y 3 HGNGPs. Se pudo observar también una mayor agregación del material una vez acopladas las HGNGPs, lo cual puede achacarse a la interacción de dos nanogeles con una misma nanopartícula de oro.

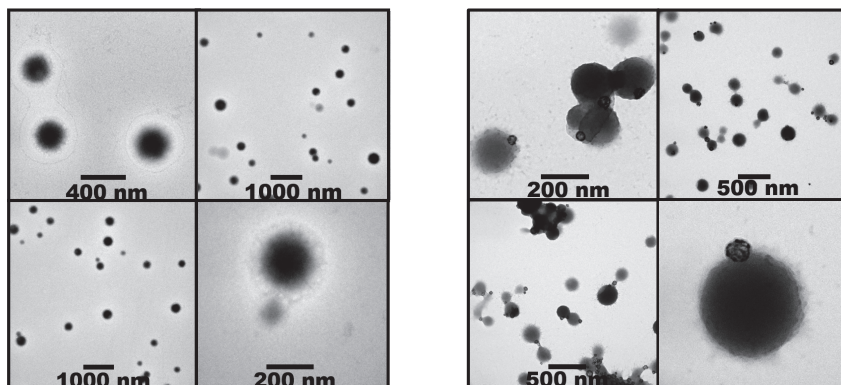


Figura 9: Micrografías de los (POEGMA)NGs (izquierda) y (POEGMA)NGs@HGNGPs (derecha).

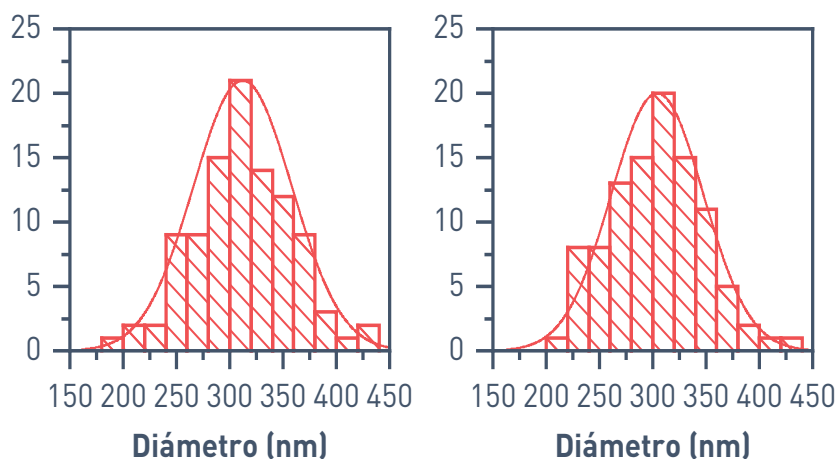


Figura 10: Histograma de distribución de tamaños de los POEGMA-NGs (izquierda) y los (POEGMA)NGs@HGNGPs (derecha).

Tras analizar la morfología de los materiales, se evaluó su composición. Para determinar la proporción real entre nanogeles de POEGMA y HGNGPs, se analizó mediante espectroscopía de emisión atómica por plasma de microondas la cantidad de oro, tanto en las HGNGPs como en el material híbrido final. Los resultados indicaron que las HGNGPs

contenían un $71.6\% \pm 0.4$ de oro mientras que los nanogeles de POEGMA decorados con HGNPs contenían un $1.5\% \pm 0.2$. Por tanto, se determinó que un $2.1\% \pm 0.2$ de la masa del material híbrido corresponde a las HGNPs. A continuación, se evaluó la funcionalidad de los materiales. En primer lugar, se analizó la capacidad de calentamiento de los (POEGMA)NGs decorados con HGNPs bajo irradiación láser y se comparó con el comportamiento de la HGNPs. No se observaron diferencias significativas en el perfil de calentamiento entre las muestras de (POEGMA)NGs@HGNPs/BPV y las HGNPs (Figura 11) cuando se irradiaron en las mismas condiciones y a concentraciones equivalentes de oro (3 mg/mL y 0.05 mg/mL respectivamente).

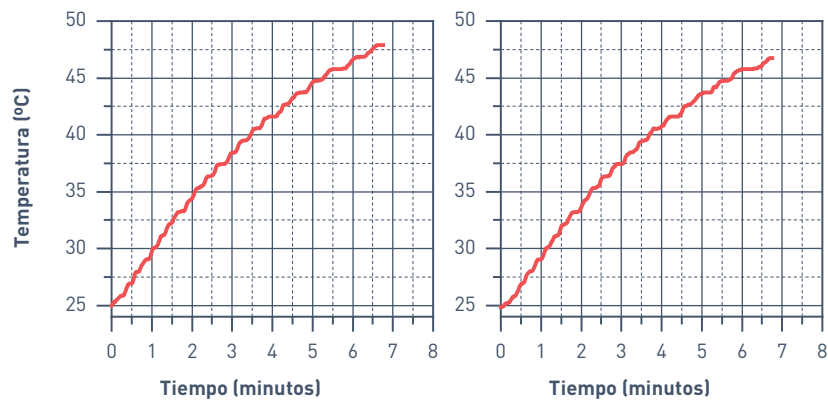


Figura 11: Perfiles de calentamiento de los POEGMA-NGs@HGNPs/BPV (izquierda) y las HGNPs (derecha).

Para determinar la capacidad de liberar el fármaco mediante el mecanismo propuesto de expulsión de agua por

cambio de fase, se determinó mediante DLS el diámetro hidrodinámico de los (POEGMA)NGs a diferentes temperaturas (Figura 12). Se observó que éste es similar a temperatura ambiente y a 38 °C, lo que indica que los nanogeles se encuentran en fase hidrófila a temperatura fisiológica. A 46 °C, se observa una reducción importante del diámetro hidrodinámico a casi la mitad, lo que indica el colapso de los nanogeles y por tanto su transición de fase.

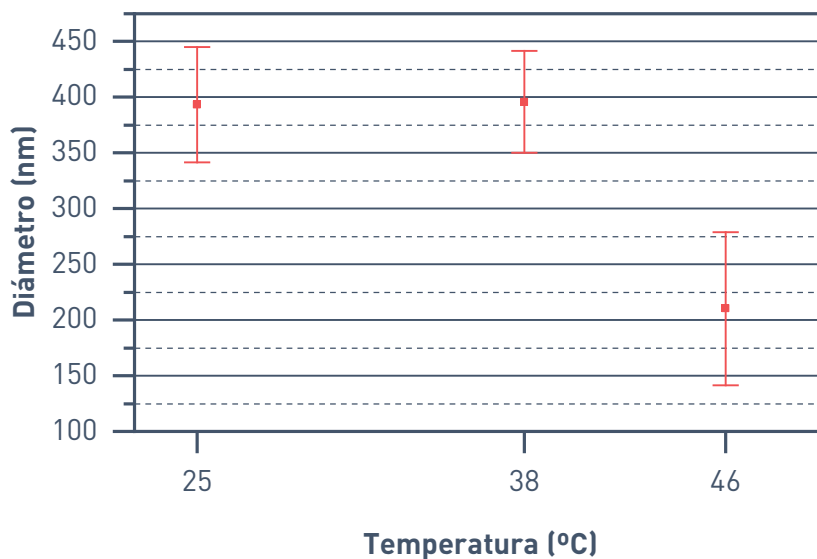


Figura 12: Diámetro hidrodinámico de los (POEGMA)NGs a temperatura ambiente, por debajo de la LCST y por encima de dicha temperatura.

En cuanto al volumen del material, se obtuvo a partir de los valores de diámetro hidrodinámico anteriores, resultando en una disminución volumétrica cercana al 85 % (Tabla 3).

Temperatura (°C)	Volumen promedio (nm ³)
25	31878800 ± 65450
38	320224900 ± 49647
46	4860920 ± 169921
Disminución Volumétrica = 84,82 %	

Tabla 3: Volumen promedio ($n=100$) de los (POEGMA)NGs a 25 °C, 38 °C y 46 °C.

Aunque estos valores no pueden ser tomados como reales ya que está calculados a partir del diámetro hidrodinámico y no del diámetro real, dan una idea de la gran pérdida de agua interior que se produce tras la transición de fase y que es compatible con el mecanismo de liberación propuesto.

4.2. Carga y liberación de bupivacaína

La carga de bupivacaína en los (POEGMA)NGs@HGNGPs se realizó mediante incubación en una solución saturada del fármaco durante 24h.

No fue posible determinar la carga real de bupivacaína mediante extracciones con solvente, por lo que se optó por determinar la carga efectiva mediante extracciones con ciclos térmicos a 48 °C en un agitador termostatzado. Para ello se separó el material del sobrenadante tras cada ciclo térmico y se determinó su contenido de bupivacaína (Figura 13). Toda la bupivacaína disponible se liberó tras ocho ciclos, resultando en una carga efectiva del 17.6% ± 1.7 en peso.

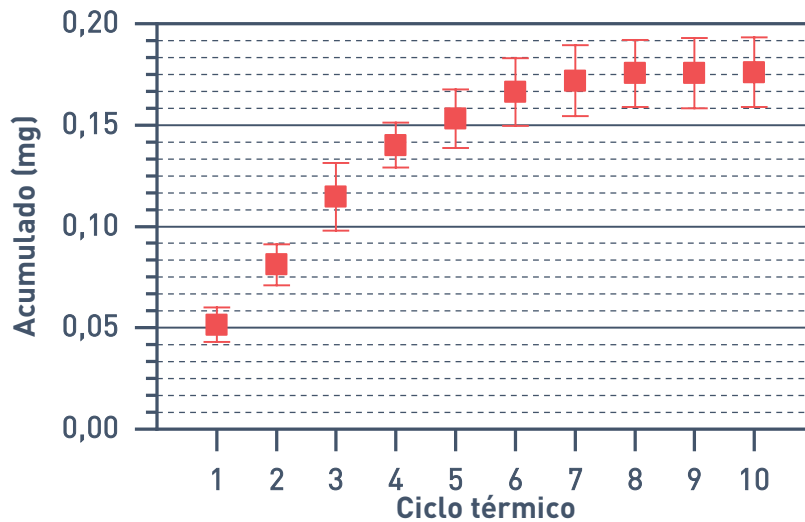


Figura 13: Extracciones de bupivacaína mediante ciclos térmicos.

Para tratar de confirmar este dato y evaluar el comportamiento del material en las condiciones reales de aplicación, se repitió la medida empleando un láser NIR como método de calentamiento (Figura 14). En este caso se obtuvieron resultados similares, observándose dos diferencias: una liberación ligeramente superior ($20.9\% \pm 5.8$) y una mayor variabilidad en las muestras. Esto puede deberse probablemente a los diferentes mecanismos de calentamiento. En el caso del primer experimento se calentó la disolución, por lo que la temperatura máxima alcanzada por material fue la misma que la de la solución. En el segundo experimento, las HGNPs calentaron tanto los nanogeles como el agua. Es por esto por lo que, aunque la temperatura máxima de la disolución en cada ciclo fue la misma, la temperatura local de los nanogeles

probablemente fue muy superior en el caso en el que se usó el láser, favoreciendo la desorción de la bupivacaína.

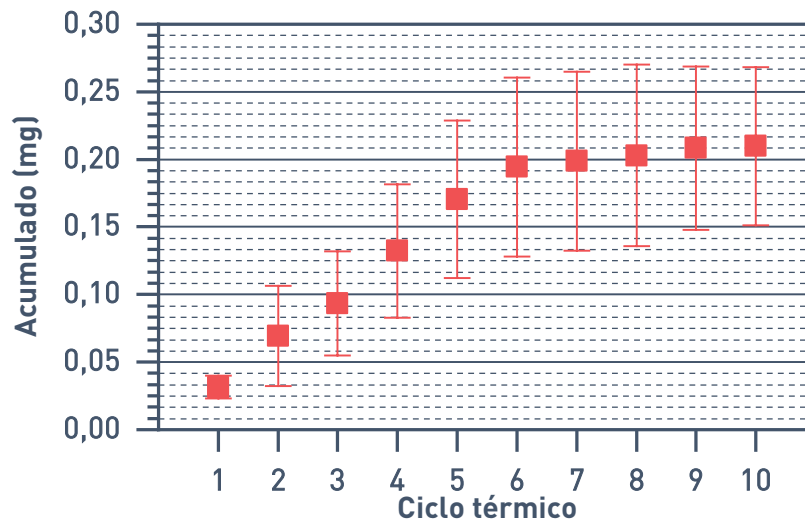


Figura 14: Liberación de bupivacaína mediante ciclos de calentamiento láser.

Debido a la naturaleza del material y del fármaco empleados, no se puede obviar el fenómeno de liberación por difusión cuando los nanogeles se encuentran en fase hidrófila, por lo que se analizó también la liberación sostenida a temperatura fisiológica durante 8 días (Figura 15). La mayor parte de la bupivacaína se liberó durante las primeras 48 h. A partir del cuarto día no se detectaron cantidades significativas de fármaco liberado, siendo el máximo el $47.1\% \pm 7.8$ de la bupivacaína disponible.

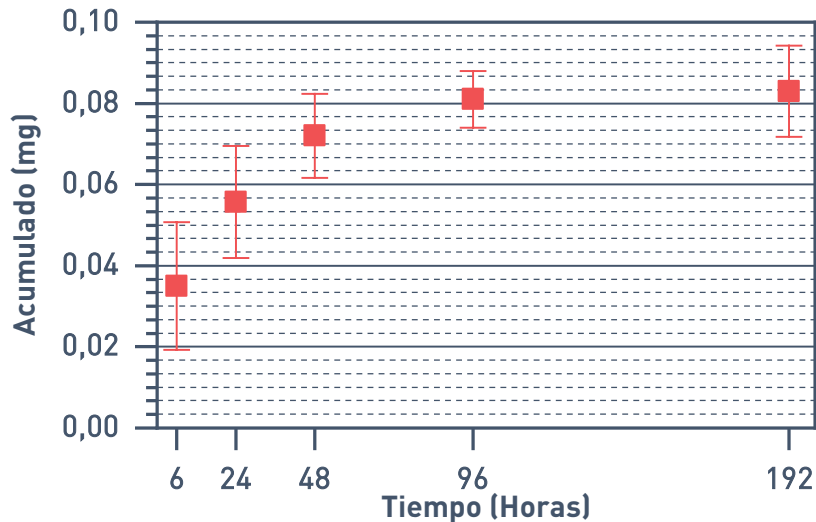


Figura 15: Liberación de bupivacaína por difusión a 37 °C durante 8 días.

La cantidad restante probablemente permanece en los nanogeles mediante interacciones con las cadenas de polímero de manera estable mientras éstos se encuentran en fase hidrófila, liberándose una vez se produce el cambio de fase del material. Este resultado es prometedor, ya que en tratamientos prolongados más de la mitad del fármaco queda disponible para liberación bajo demanda.

4.3. Biocompatibilidad de los materiales

La citocompatibilidad de todos los materiales ((POEGMA)NGs, (POEGMA)NGs@HGNGPs, (POEGMA)NGs@HGNGPs/BPV y bupivacaína libre) se evaluó en cuatro líneas celulares (mMSC, U251MG, fibroblastos dérmicos humanos y macrófagos humanos) tras

incubación de 24h con los cultivos empleando varias metodologías (estudio de viabilidad celular, influencia en la apoptosis y distribución del ciclo celular y detección de endotoxinas). En el estudio de viabilidad celular (Figura 16) no se observaron cambios significativos en aquellas muestras tratadas con (POEGMA)NGs y con (POEGMA)NGs@HGNNPs, en ninguna de las líneas celulares estudiadas ni concentraciones evaluadas. En el caso de los (POEGMA)NGs@HGNNPs/BPV se observó una ligera disminución de la viabilidad celular. En este caso sólo el ensayo con macrófagos arrojó una disminución superior al 30 % que establece la norma ISO 10993-5, debido principalmente a la alta actividad fagocítica de esta línea celular y a la posible desorción de bupivacaína provocada por los cambios de pH en el interior de las células. Se evaluó asimismo la viabilidad celular con bupivacaína libre en concentraciones equivalentes a las encapsuladas en los POEGMA-NGs@HGNNPs/BPV. Se observó que, mientras la bupivacaína libre disminuye la viabilidad en función de la concentración, cuando se encuentra encapsulada en los nanogeles no presenta diferencias significativas entre las concentraciones ensayadas, salvo en el caso anteriormente mencionado de los macrófagos. Estos resultados concuerdan con los disponibles en literatura para materiales similares^{232,243,244}. Acorde a la norma ISO 10993-5, se determinó que la dosis subcitotóxica para los (POEGMA)NGs

y para los (POEGMA)NGs@HGNTs es de 2 mg/mL, mientras que para los (POEGMA)NGs@HGNTs/BPV es de 0.4 mg/mL y para la BPV libre es de 0.026 mg/mL (equivalente a la encapsulada en 0.4 mg/mL de (POEGMA)NGs@HGNTs/BPV).

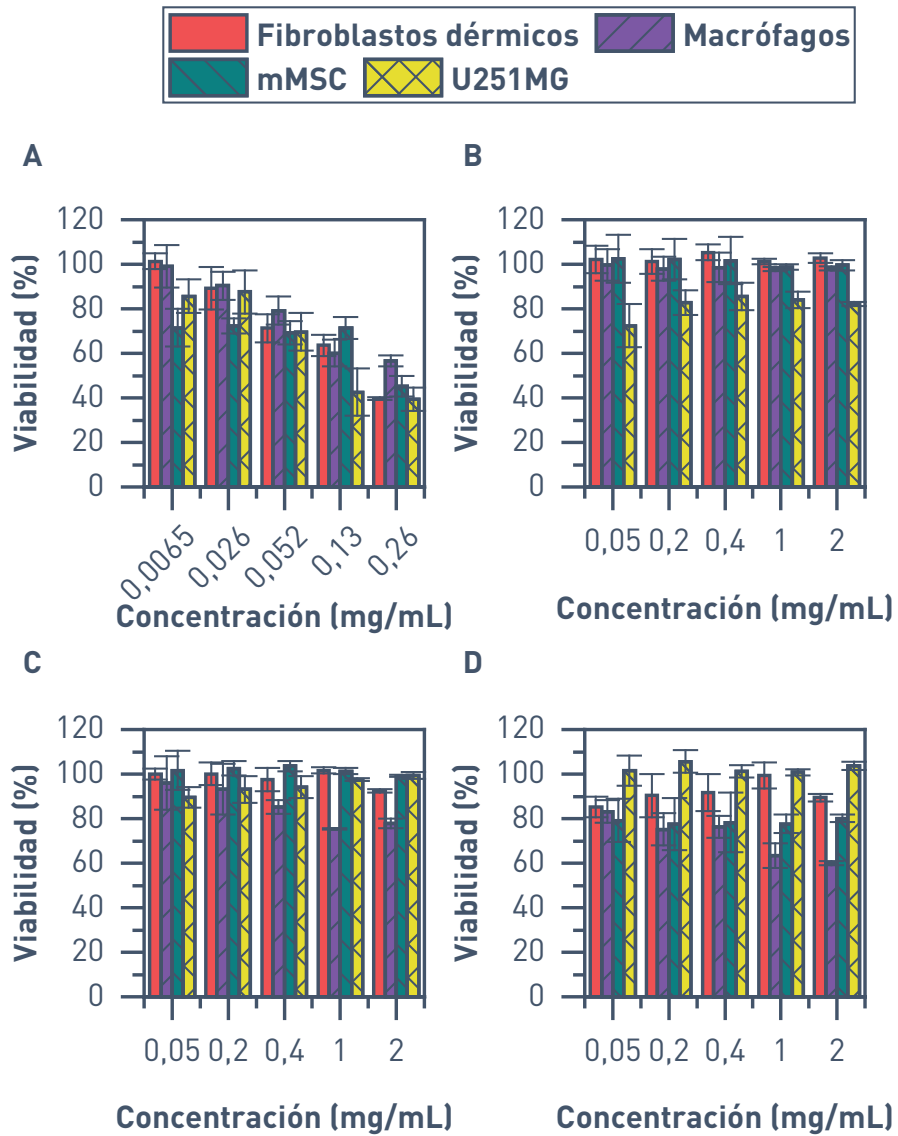


Figura 16: Viabilidad celular después de incubación durante 24 h con A) BPV libre, B) (POEGMA)NGs, C) (POEGMA)NGs@HGNGs y D) (POEGMA)NGs@HGNGs/BPV.

Con el fin de determinar los posibles efectos de los materiales sobre la membrana celular (apoptosis) y sobre el núcleo, se realizaron análisis de apoptosis y ciclo celular mediante citometría de flujo (Figura 16, Figura 17).

Tras incubación de 24 h de los materiales con las distintas líneas celulares, no se detectó una alteración significativa de las fases del ciclo celular (Figura 17).

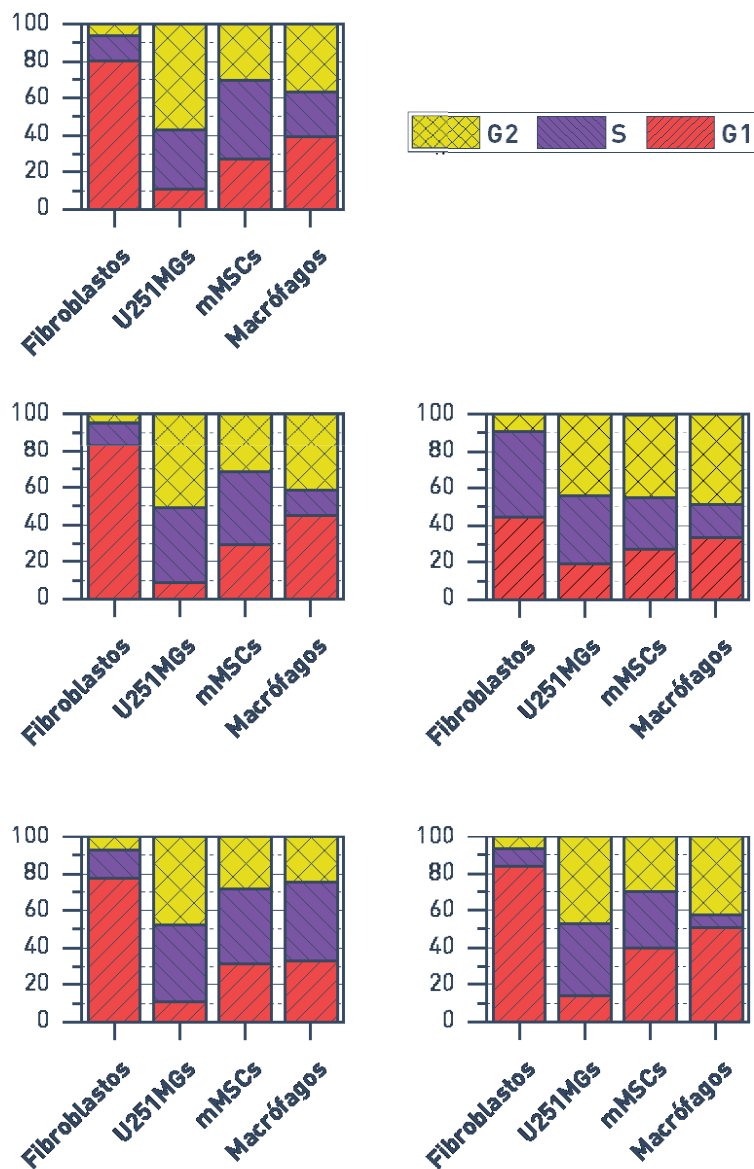


Figura 17: Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo para las cuatro líneas celulares tratadas. A) Control, B) BPV libre, C) (POEGMA)NGs, D) (POEGMA)NGs@HGNGs y E) (POEGMA)NGs@HGNGs/BPV.

Del mismo modo, no se detectó un incremento significativo de la apoptosis temprana ni tardía (inferior al 15 %) (Figura 18).

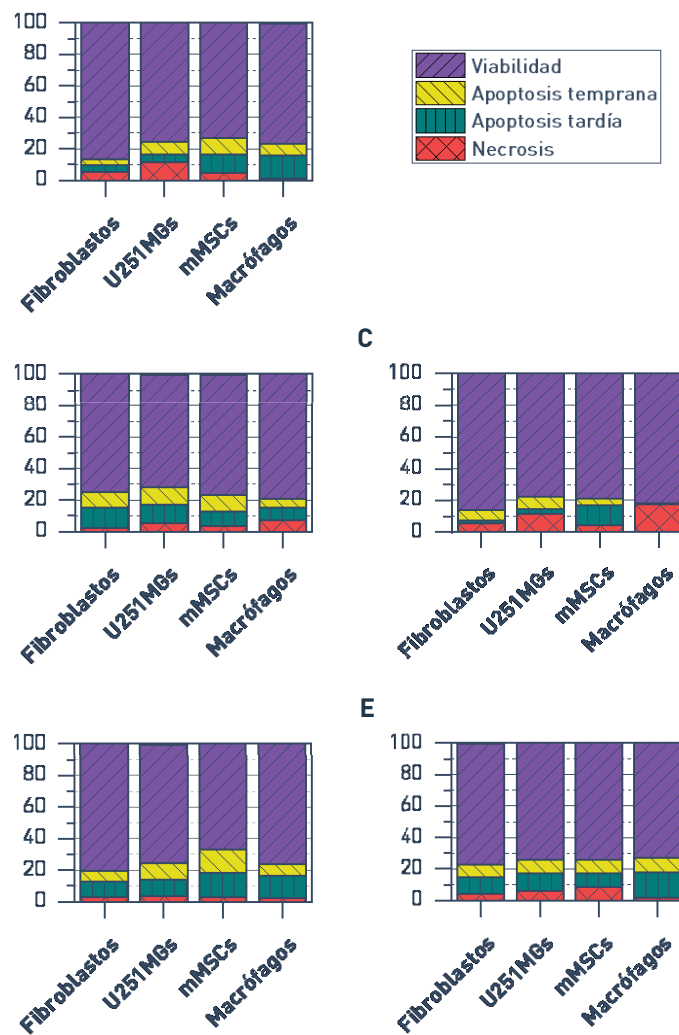


Figura 18: Análisis de la apoptosis celular mediante citometría de flujo para las cuatro líneas celulares tratadas. A) Control, B) BPV libre, C) (POEGMA)NGs, D) (POEGMA)NGs@HGNGPs y E) (POEGMA)NGs@HGNGPs/BPV.

Estos resultados apoyan los obtenidos en el estudio de viabilidad, reforzando su potencial uso en aplicaciones biomédicas.

Finalmente, se cuantificó la cantidad de endotoxina presente en los diferentes materiales mediante el *Pierce™ LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit*. La producción y manipulación de los materiales fuera de un ambiente estéril aumenta considerablemente el riesgo de contaminación con endotoxina, suponiendo un riesgo potencial para futuras aplicaciones biomédicas²⁴⁵.

Los resultados no mostraron concentraciones relevantes de endotoxina en los materiales sintetizados, estando en cualquier caso por debajo del umbral determinado por la FDA (0.05 ng/mL)²⁴⁶.

La baja concentración de endotoxina, a pesar de la producción en entornos no estériles puede explicarse por los procedimientos empleados en la propia producción, que involucran largas exposiciones a radiación UV y múltiples lavados en mezclas de etanol/agua, lo cual evita la proliferación bacteriana.

5. Conclusiones

Mediante método de fotopolimerización radicalaria en miniemulsión presentado, se logró producir nanogeles de P(MEO₂MA-co-OEGMA₅₀₀) de forma sencilla. Estos nanogeles mostraron un alta monodispersidad y baja agregación.

Los nanogeles obtenidos presentaron LCST por encima de 39 °C, así como una elevada reducción de volumen por encima de dicha temperatura.

El uso de un iniciador disulfuro en la polimerización y su posterior reducción a grupos tiol, permitió el acoplamiento de los (POEGMA)NGs y las HGNPs.

Se consiguió activar el material final mediante el aumento de temperatura y mediante la aplicación de luz a 808 nm.

Mediante la activación, tanto óptica como térmica, se consiguió liberar bupivacaína durante al menos 6 ciclos.

Además de la liberación controlada térmica u ópticamente, el sistema final mostró una liberación basal mediante difusión que se prolongó durante al menos 96 horas.

Los estudios in vitro realizados permitieron determinar la dosis subcitotóxica, siendo esta 0.4 mg/mL para el material final.

Capítulo IV: **Síntesis y caracterización
de nanogeles de P(MEO2MA-co-
OEGMA) cargados con Bupivacaína
cristalizada**

1. Introducción

El uso de fármacos tradicionales encapsulados en sistemas de liberación controlada presenta una limitación importante en lo que respecta a la capacidad de carga. En muchos casos esta capacidad de carga se encuentra por debajo del 10 % en peso²⁴⁷⁻²⁵¹. Esto se debe principalmente a los mecanismos de carga mediante interacciones moleculares, como interacción electrostática, puentes de hidrógeno o adsorción física, que con frecuencia presentan bajas eficiencias. Este hecho presenta múltiples inconvenientes, como la limitación de fármaco disponible para tratamientos a largo plazo o el incremento de toxicidad asociado al material de encapsulación derivado de la baja proporción de fármaco en las dosis²⁵². Algunas estrategias posibles planteadas para aumentar la carga de fármaco es el uso de su forma cristalizada o la unión mediante enlaces covalentes o de coordinación²⁵³⁻²⁵⁶.

Los nanocristales de fármaco han sido investigados en las dos últimas décadas como una solución para mejorar la biodisponibilidad y tasa de disolución de fármacos con baja solubilidad acuosa^{257,258}. Ajustando el tamaño de los nanocristales es posible variar el área superficial específica, mejorando la tasa de solubilidad en el medio fisiológico²⁵⁹. Es por esto que la actualidad se pueden encontrar en el mercado fármacos aprobados basados en formulaciones

nanocristalizadas²⁶⁰. La mayoría de estas formulaciones han sido preparadas mediante métodos *top-down*, proporcionando nanocristales uniformes mediante métodos económicos y fácilmente escalables^{261,262}. Por ejemplo, el uso de paclitaxel y camptotecina nanocristalizadas y estabilizadas con Pluronic 127 han demostrado tener una menor toxicidad que dosis equivalentes de fármaco libre²⁶³.

Una alternativa a los métodos *top-down* que ha mostrado buenos resultados en la obtención de nanocristales son los métodos *bottom-up* de precipitación antisolvente. Mediante estos métodos se han conseguido obtener nanocristales con tamaños en torno a los 200 nm empleando estabilizantes como derivados de la metilcelulosa^{264,265}, alcohol polivinílico²⁶⁶ o incluso sin necesidad de estabilizante²⁶⁷. Del mismo modo, mediante el uso de polietilenglicol como solvente y una disolución de hidroxipropilmetilcelulosa como antisolvente se han podido obtener nanocristales de carbamacepina en el rango de los 10 nm – 20 nm. La alta actividad superficial de los grupos metoxi e hidroxipropil de los derivados de celulosa permiten la interacción con las moléculas de fármaco mediante la formación de puentes de hidrógeno. Esto favorece la nucleación, mientras que limita el crecimiento, resultando en cristales de unos pocos nanómetros. Algunos fármacos nanocristalizados ha sido encapsulados con éxito en partículas poliméricas. Por ejemplo, se ha conseguido encapsular con éxito nanocristales de

breviscapina en micropartículas de PLGA, mostrando una mayor carga y un mayor tiempo de liberación respecto al fármaco sin cristalizar. El uso de fármacos nanocristalizados en los sistemas de liberación controlada de fármacos se muestra como una estrategia prometedora a la hora de aumentar la carga y biodisponibilidad del fármaco en tratamientos prolongados.

2. Resumen y objetivos

En este capítulo se presenta un procedimiento sintético que permite obtener nanocristales de bupivacaína para su posterior encapsulación en un nanogeles termosensibles de P(MEO₂MA-co-OEGMA₅₀₀).

El objetivo principal de este capítulo es evaluar las ventajas potenciales del uso de bupivacaína cristalizada frente su forma hidrófila, presentada en el capítulo anterior, como una mayor capacidad de carga o menor tasa de liberación. Para ello se caracterizó su estructura, composición y respuesta ante estímulos térmicos. Complementariamente se evaluó el perfil de liberación sostenida. Finalmente, se realizó un estudio completo in vitro de biocompatibilidad mediante ensayos de viabilidad celular y citometría de flujo en cuatro líneas celulares. Adicionalmente se cuantificó la cantidad de endotoxina presente en el material final, de cara su potencial aplicación en estudios in vivo.

3. Métodos y materiales

3.1. Síntesis de materiales

Los reactivos dietilenglicol metileter metacrilato (95%) (MEO₂MA), oligoetilenglicol metileter metacrilato (Mn. 500 g/mol) (OEGMA₅₀₀), etilenglicol dimetacrilato (98%) (EGDMA), dodecilsulfato sódico (98%) (SDS), persulfato de potasio (99 %) (KPS), hidroxipropilmetilcelulosa (Mn=10000) (HPMC), polietilenglicol (Mn=300) (PEG300), hidrocloreto de bupivacaína monohidrato (99 %) y (*S*)-(-)-Limoneno se adquirieron a Sigma-Aldrich (Madrid, España) y se utilizaron como se recibieron.

3.1.1. Síntesis de la base libre de bupivacaína

La base libre de bupivacaína se sintetizó siguiendo un procedimiento previamente descrito¹⁴⁸, con algunas modificaciones. Para ello, se disolvió 1 gramo de hidrocloreto de bupivacaína en 50 mL de agua desionizada. A continuación, se añadió gota a gota y bajo agitación una disolución 0.2 M de hidróxido de sodio hasta alcanzar un pH de 11, provocando la precipitación de la base libre de bupivacaína. El sólido precipitado se filtró en vacío, se lavó varias veces en agua desionizada y se secó bajo vacío. Finalmente, se verificó la obtención de la base libre de bupivacaína determinando su punto de fusión (107 °C – 108 °C).

3.1.2. Preparación de los nanocristales de bupivacaína (BPVNCs)

Los nanocristales de bupivacaína se prepararon siguiendo la técnica de precipitación antisolvente según un procedimiento modificado previamente descrito^{68,265}. Por un lado, se disolvieron 50 mg de base libre de bupivacaína en 1.5 mL de PEG300. Por otro, se preparó el antisolvente disolviendo 100 mg de hidroxipropilmetilcelulosa. Para conseguir la solubilización, se calentó la mezcla a 80 °C bajo agitación hasta conseguir una dispersión homogénea y posteriormente se enfrió en baño de hielo hasta alcanzar la temperatura de solubilidad. A continuación, se añadió rápidamente la disolución de fármaco en el antisolvente y se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente durante dos minutos, pasando de una disolución transparente a una opaca, señal de la formación de los nanocristales. Los nanocristales obtenidos se precipitaron mediante ultracentrifugación (25000 rpm, 40 min). Finalmente se lavaron en agua para eliminar los restos de polímero y se dispersaron en 5 mL de agua desionizada.

3.1.3. Síntesis de los nanogeles termosensibles cargados con nanocristales de bupivacaína.

Los nanogeles P(MEO₂MA-co-OEGMA₅₀₀) (NGs) se sintetizaron mediante el método de polimerización radicalaria

por precipitación siguiendo un método previamente descrito²⁶⁸ con varias modificaciones. Los nanocristales de bupivacaína (BPVNCs) se introdujeron en el medio de síntesis con el fin de encapsularlos durante la polimerización. En un matraz schlenk de 100 mL se añadieron los BPVNCs previamente preparados, 1.56 mmol de MEO₂MA, 0.21 mmol de OEGMA₅₀₀, 0.06 mmol de EGDMA, 0.035 mmol de SDS y agua mili-Q hasta alcanzar un volumen final de 40 mL. La mezcla se purgó con argón durante 30 minutos, posteriormente se calentó bajo agitación hasta 70 °C y se añadieron 0.037 mmol de KPS. La mezcla se dejó reaccionar durante 6h a 70 °C. Los nanogeles obtenidos se lavaron 3 veces en agua desionizada mediante ultracentrifugación (10000 rpm, 10 minutos) y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

3.2. Caracterización

3.2.1. Microscopía electrónica de transmisión

El análisis por imagen de los materiales se realizó mediante un microscopio electrónico de transmisión (FEI TECNAI T20, Thermo Fisher Scientific, EEUU) operado a 200 kV. Todas las muestras se prepararon en rejillas portamuestras para TEM de cobre recubiertas de carbón/formar (200 mesh). Las imágenes de alta resolución (HRTEM) se

obtuvieron en un microscopio FEI Tecnai F30 (Thermo Fisher Scientific, EEUU), operado a 300 kV

Para poder ver correctamente los materiales orgánicos y evitar altas diferencias de contraste entre materiales orgánicos e inorgánicos, todas las muestras se contrastaron empleando ácido fosfotúngstico para microscopía (Sigma-Aldrich, España). El procedimiento consistió en aplicar una gota de una disolución acuosa (3 % en peso) de ácido fosfotúngstico sobre la muestra preparada y dejarla reaccionar durante 15 minutos. Posteriormente se eliminó el exceso de contraste aplicando una gota de agua mili-Q sobre la muestra durante 10 minutos.

Para determinar el tamaño medio del material mediante imagen se realizó un análisis cuantitativo sobre distintas imágenes de TEM empleando el software de análisis de imagen ImageJ (*National Institutes of Health*, EEUU).

3.2.2. Dispersión dinámica de la luz

El diámetro hidrodinámico de los materiales y la reducción volumétrica por calentamiento de los nanogeles termosensibles se determinaron mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz. Para ello se empleó un equipo de análisis de tamaño de nanopartículas Brookhaven 90Plus (Brookhaven Instruments, EEUU) equipado con una láser de 50 mW y 532 nm de longitud de onda. Las muestras se

midieron en dispersión acuosa a una concentración de 0.01 mg/mL y empleando un valor de 90 ° de ángulo de dispersión, en un rango de temperaturas entre 20 °C y 65 °C y a un pH 5.5. Para realizar las medidas a diferentes temperaturas, se empleó el sistema de control de temperatura del propio equipo.

3.2.3. Determinación del valor de potencial ζ

El potencial ζ de la suspensión coloidal de nanogeles se midió empleando un equipo Brookhaven 90Plus (Brookhaven Instruments, EEUU), mediante el software ZetaPALS. Todas las muestras se midieron en una disolución acuosa 1 mM de KCl a pH 6 y a temperatura ambiente. El valor de potencial ζ se determinó estudiando la movilidad electroforética de las nanopartículas y aplicando la ecuación de Smoluchowski.

3.2.4. Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico se realizó empleando un equipo Mettler Toledo TGA/SDA 851e (Mettler Toledo, EEUU). Las medidas se realizaron en un rango entre 30 °C y 800 °C empleando una velocidad de 10 °C/min y bajo atmósfera de nitrógeno (50mL/min).

3.2.5. Análisis reológico

El estudio reológico de los nanogeles se realizó empleando un reómetro rotacional HAAKE Rheostress 1

(Thermo Fisher Scientific, EEUU). Todas las muestras se midieron mediante la configuración cono-plato con 35 mm de diámetro y un ángulo de cono de 1°. Para realizar las medidas se añadieron 500 μL de nanogeles (1 mg/mL) al plato inferior del reómetro. A continuación, se bajó el plato superior dejando una distancia de 0.051 mm entre platos. Después de dejar que se estabilizaran los nanogeles durante 5 minutos a 25 °C, se ejecutó el ensayo de cizalla oscilatoria aplicando un momento constante de 5 $\mu\text{N/m}$ a una frecuencia de 0.1 Hz. Se midió el módulo de almacenamiento G' y el módulo de pérdida G'' de los nanogeles a medida que se incrementaba la temperatura de 25 °C a 50 °C a una velocidad constante.

3.2.6. Difracción de rayos X

Con el fin de determinar la cristalinidad de los BPVNCs, se realizaron medidas de espectroscopía de rayos X (XRD). Los difractogramas se grabaron en un difractómetro Philips X'Pert (Philips, Países Bajos) equipado con una fuente de radiación $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1.54060 \text{ \AA}$, 40 kV, 20 mA) con un rango entre 5 ° y 60°, un paso de 0.013 y un tiempo de análisis de 5 s.

3.2.7. Estudio de liberación

Los perfiles de liberación de los BPVNCs y de los nanogeles de P(MEO₂MA-co-OEGMA) cargados con BPVNCs (NGs/BPVNCs) se obtuvieron empleando muestras

de 1 mL a una concentración de 0.180 mg/mL y 0.196 mg/mL en agua. Las concentraciones se escogieron de tal forma que la concentración de bupivacaína fuese equivalente entre ellas. Las muestras se incubaron en un agitador termostatzado Biosan TS-100C (Biosan, Lituania) a 37 °C y bajo agitación a 600 rpm. En cada punto temporal de medida se retiraron tres muestras aleatorias, se centrifugaron (13000 rpm, 10 min) y se recuperó y filtró el sobrenadante. La concentración de BPV se determinó mediante cromatografía de gases/masas. Para ello cada muestra de 100 µL se mezcló con 850 µL de etanol y 50 µL de una solución de limoneno en metanol como patrón interno. La carga de fármaco se determinó mediante la Ecuación 3.

$$\text{Carga (\%)} = \frac{\text{Peso del fármaco encapsulado}}{\text{Peso total de las nanopartículas}} \cdot 100$$

Ecuación 3: Determinación de la eficiencia de carga.

3.2.8. Estudios Biológicos³

Para los estudios de citocompatibilidad se emplearon cuatro líneas celulares: fibroblastos dérmicos humanos (Lonza, Bélgica), células madre mesenquimales de ratón (mMSCs, cedidas por la doctora Pilar Martín Duque), células de glioblastoma humano (U251MG, cedidas por la doctora Pilar

³ Los procedimientos experimentales descritos en este apartado fueron realizados por las doctoras Vanesa Andreu y Gracia Mendoza.

Martín Duque) y macrófagos humanos diferenciados a partir de células monocíticas de leucemia aguda THP1 (American Type Culture Collection, US) según el método publicado previamente por Gracia Mendoza et al.¹⁸⁴.

Las mMSCs se cultivaron en DMEM-F12 (Biowest, Francia) suplementado con suero fetal bovino (FBS) (Gibco, UK) (10 %), L-glutamina (Biowest, Francia) (2 mM) y penicilina-estreptomocina-amfotericina B (Biowest, Francia) (1 %) a 37 °C bajo atmósfera humectada al 5 % de CO₂ y condiciones de hipoxia (3 % de O₂).

Las células THP1 se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco, UK) suplementado con FBS (10 %), aminoácidos no esenciales (Biowest, Francia) (1 %), piruvato sódico (Biowest, Francia) (100 mM), búfer HEPES (Biowest, Francia) (10 mM), 2-mercaptoetanol (Gibco, UK) (0.05 mM) y penicilina-estreptomocina-amfotericina B (1 %), a 37 °C bajo atmósfera humectada al 5 % de CO₂. Posteriormente, las células THP1 se diferenciaron en macrófagos cultivándolas en medio RPMI 1640 suplementado con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (Sigma-Aldrich, Alemania) (1 µM) durante 72 h. Una vez diferenciados, se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con L-Glutamina (2 mM), FBS (10 %), 2-mercaptoetanol (50 mM), búfer HEPES (1 %), aminoácidos no esenciales (1 %), piruvato sódico (100 mM) y penicilina-estreptomocina-

amfotericina B (1 %), a 37 °C bajo atmósfera humectada al 5 % de CO₂.

Los fibroblastos dérmicos humanos y las células U251MG se cultivaron en DMEM suplementado con L-glutamina (Biowest, Francia) (2 mM), FBS (10 %) y penicilina-estreptomocina-amfotericina B (Biowest, Francia) (1 %), a 37 °C bajo atmósfera humedecida al 5 % de CO₂.

La viabilidad celular se determinó mediante ensayo fluorométrico empleando el kit comercial *Blue Cell Viability Assay* (Abnova, Taiwan) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se empleó un lector de placas multimodal *Synergy HT* (Agilent, EEUU) con una longitud de onda de excitación de 530 nm y de lectura de 590 nm.

Los ensayos de citometría de flujo se llevaron a cabo con el fin de determinar los efectos de los materiales en el ciclo celular y la apoptosis. Los experimentos se desarrollaron empleando las concentraciones subcitotóxicas de cada material, determinadas en el estudio de viabilidad anterior.

La apoptosis se evaluó mediante la doble tinción con anexina V-FITC y yoduro de propidio. Para ello, se incubaron las muestras en un tampón de unión y se analizaron empleando un citómetro de flujo FACSAria (Becton Dickinson, EEUU).

La distribución de ciclo celular se evaluó mediante tinción con la solución PI/RNASE (Immunostep, España). Tras fijar las células en etanol y lavarlas, las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACS Aria (Becton Dickinson, EEUU) y el software MODIFIT (versión 3, Verity Software House, EEUU).

La cuantificación de endotoxina en los materiales finales se realizó mediante en ensayo LAL empleando el *Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit* (Thermo Fisher Scientific, US), siguiendo las instrucciones del fabricante.

4. Resultados y discusión

4.1. Caracterización de los nanogeles termosensibles de P(MEO2MA-co-OEGMA)

La morfología y distribución de tamaños se analizaron mediante imagen por microscopía electrónica de transmisión (Figura 19). Los resultados mostraron nanopartículas esféricas con un tamaño medio de partícula de 64.7 ± 8.6 nm y un índice de polidispersidad de 0.016, lo que indica poblaciones altamente monodispersas.

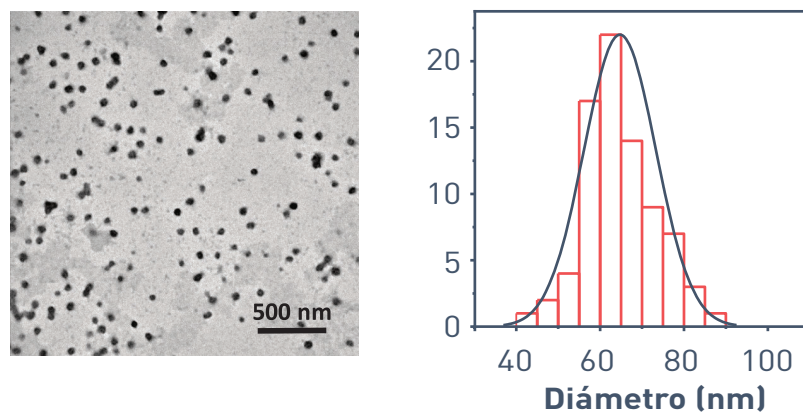


Figura 19: Micrografía mediante imagen TEM de una población de nanogeles termosensibles de POEGMA (izquierda) e histograma de distribución de tamaños ($n=80$).

Para evaluar la funcionalidad de los nanogeles, así como para calcular su temperatura de transición volumétrica de fase (VPTT), se determinó mediante DLS el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas en un rango de

temperaturas entre 22 °C y 65 °C (Figura 20). Los valores obtenidos mostraron poblaciones altamente monodispersas, con valores de índice de polidispersidad entre 0.001 y 0.09. Los valores obtenidos mediante DLS son consistentes con los obtenidos mediante TEM, pudiendo explicarse el menor tamaño de este último por la contracción sufrida por la deshidratación de las muestras durante su preparación.

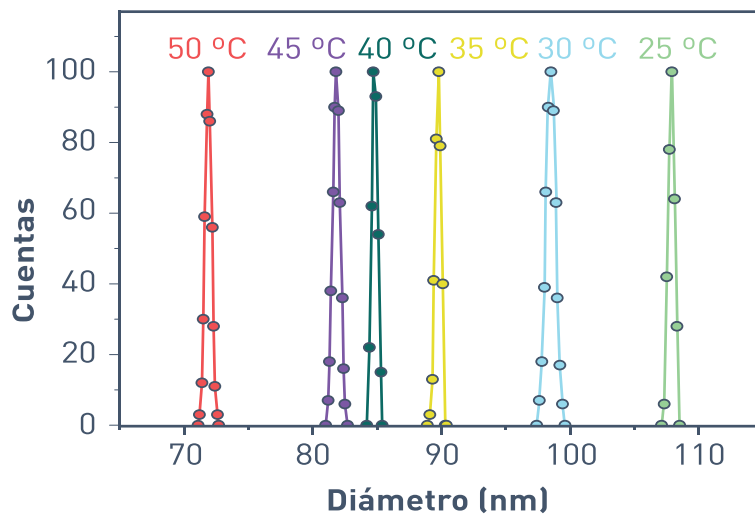


Figura 20: Gráficos DLS obtenidos a distintas temperaturas

La representación del diámetro hidrodinámico frente a la temperatura muestra el comportamiento termosensible del material (Figura 21). La reducción del tamaño en función de la temperatura se debe al colapso de las cadenas de polímero por su transición helicoidal-globular. Los resultados obtenidos arrojaron una temperatura de transición volumétrica de fase de 38.3 °C, la cual es coherente con los valores obtenidos con los

materiales presentados en los capítulos anteriores. Los nanogeles redujeron su tamaño desde 107.9 nm a 25 °C hasta 72.1 nm a 60 °C. Esto implica una reducción volumétrica del 70 %, similar a la obtenida en los nanogeles presentados en el capítulo anterior.

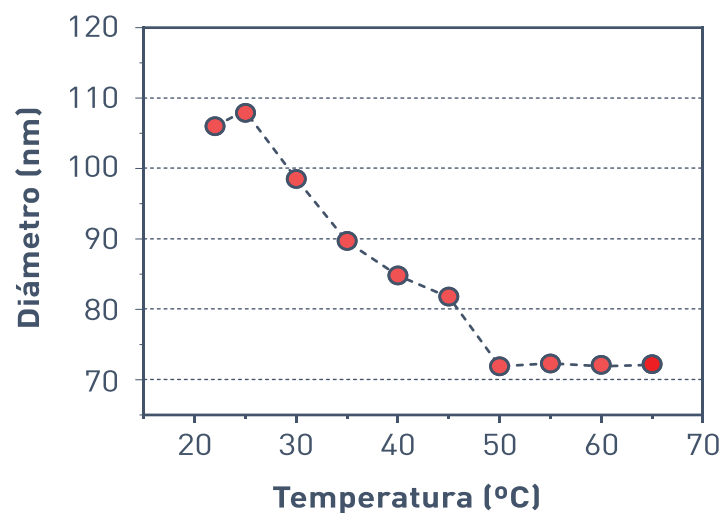


Figura 21: Representación del diámetro hidrodinámico de los nanogeles a distintas temperaturas, determinado mediante DLS.

La VPTT se puede obtener también mediante el seguimiento de la evolución de los módulos de almacenamiento y pérdida en ensayos reológicos (Figura 22). Los resultados obtenidos en el ensayo reológico mostraron un valor de VPTT de 40.5 °C. Cuando se alcanza esta temperatura, las interacciones intermoleculares e intramoleculares entre las cadenas de polímero aumentan, provocando la deshidratación del nanogel y un aumento rápido de su rigidez, lo que se refleja

en un incremento brusco de los valores G' y G'' ²⁶⁹. El estudio reológico y el análisis mediante DLS mostraron valores similares de VPTT. La pequeña desviación entre ambos puede explicarse por el uso de técnicas distintas que miden propiedades diferentes.

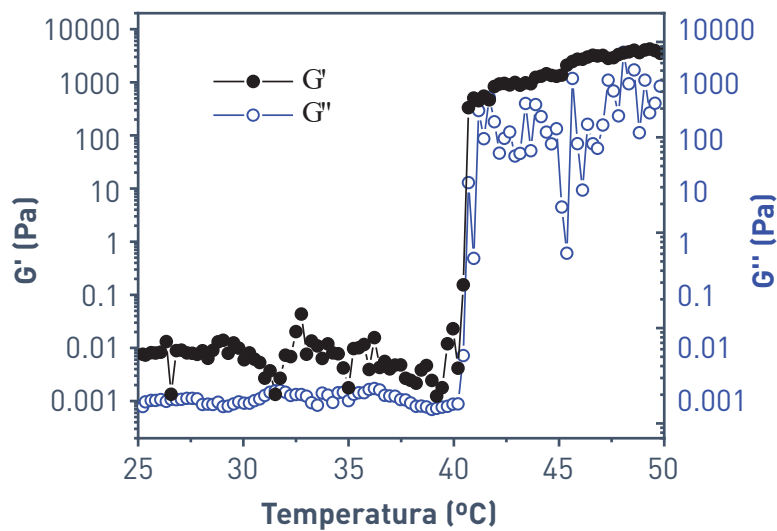


Figura 22: Barrido dinámico de temperaturas del módulo de almacenamiento (G') y del módulo de pérdida (G'') de los nanogeles.

4.2. Caracterización de los nanogeles cargados con nanocristales de bupivacaína.

Con el objetivo de obtener una elevada carga en los nanogeles, se cristalizó la bupivacaína. Los nanocristales se obtuvieron a partir de la base libre de bupivacaína, su forma hidrófoba, usando la técnica de precipitación antisolvente, para posteriormente añadirse a la solución precursora de los nanogeles.

Los BPVNCs se analizaron mediante imagen TEM para determinar su morfología y distribución de tamaños (Figura 23). Los resultados mostraron poblaciones monodispersas de nanocristales esféricos con un tamaño promedio de 21.9 ± 7.2 nm.

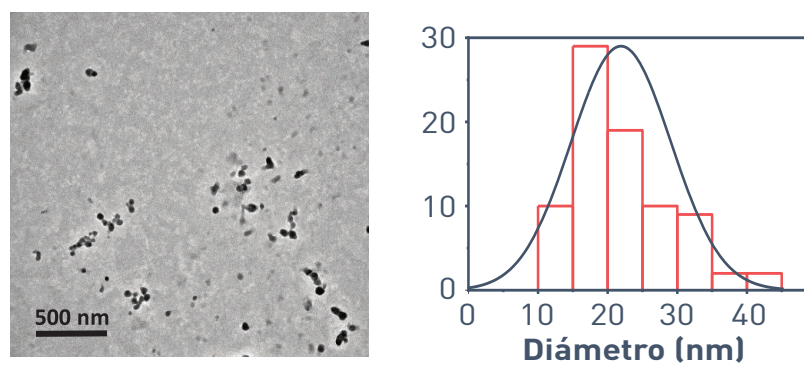


Figura 23: Micrografía mediante imagen TEM de una población de BPVNCs (izquierda) e histograma de distribución de tamaños ($n=80$).

Para determinar el grado de cristalinidad y el tamaño de cristalito se empleó la espectroscopía por difracción de rayos X (XRD). El espectro obtenido (Figura 24) para los BPVNCs coincide con la mayoría de planos de referencia de la bupivacaína (10° , 16.2° , 17.8° , 20° , 21.5° , 23.8° y 25.5°), lo que indica un alto grado de cristalinidad. La hidroxipropilmetilcelulosa usada como estabilizante mostró un espectro típico de compuestos amorfos, sin planos definidos. El tamaño promedio de cristalito de los BPVNCs se puede obtener mediante la ecuación de Scherrer. El análisis de los 5 picos más intensos mostró un tamaño promedio de cristalito de $35.93 \pm$

1.1 nm, empleando la constante de Scherrer para cristalitas esféricas ($k=0.94$) y el modelo de ajuste Voigt. Este valor concuerda con lo observado mediante imagen TEM.

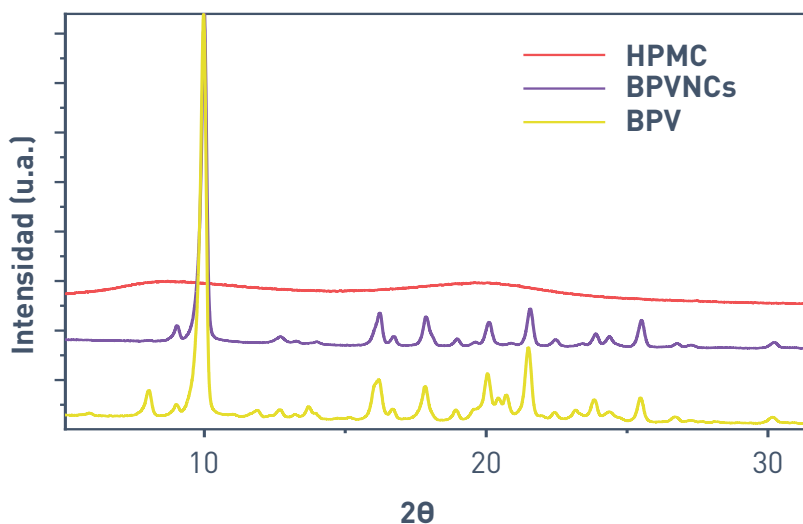


Figura 24: Espectro XRD de la bupivacaína, los nanocristales de bupivacaína y la hidroxipropilmetilcelulosa.

Con el fin de obtener los NGs/BPVNCs, se añadieron los BPVNCs durante la síntesis de los nanogeles con el propósito de crecer los nanogeles sobre la superficie de éstos. Las interacciones hidrófobas entre las zonas de glucosa altamente metilada de la hidroxipropilmetilcelulosa²⁷⁰ y la cadena principal del polímero, hacen que los nanogeles tiendan a formarse sobre superficie de los nanocristales..

El análisis mediante imagen TEM (Figura 25) mostró poblaciones homogéneas de NGs/BPVNCs. Los resultados mostraron poblaciones uniformes con un diámetro promedio de

148 ± 35 nm. El tamaño obtenido es aproximadamente el doble del que presentaron los nanogeles vacíos, lo que sugiere la encapsulación de los BPVNCs en el interior de los NGs.

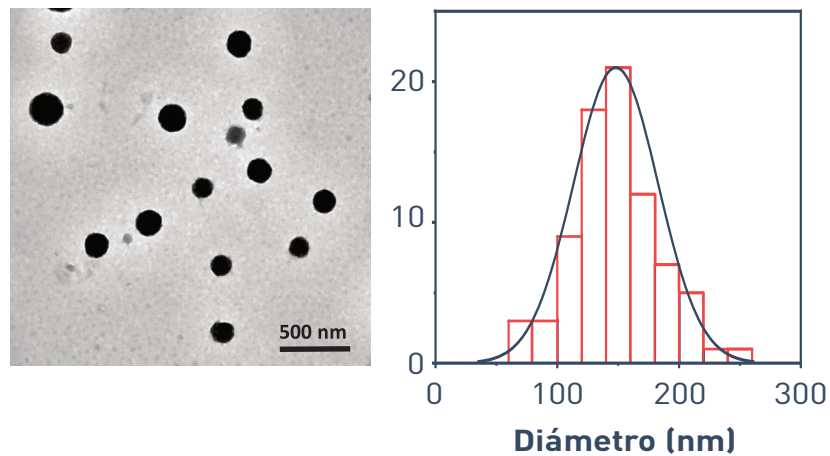


Figura 25: Micrografía mediante imagen TEM de una población de BPVNCs/NGs (izquierda) e histograma de su distribución de tamaños (n=80).

Asimismo, se observó que los NGs/BPVNCs presentaban una alta densidad electrónica en el núcleo, reflejada en un mayor contraste de imagen, lo que puede deberse a la estructura cristalina del nanocristal encapsulado.

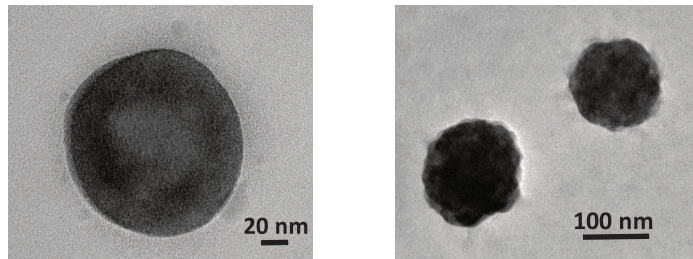


Figura 26: Micrografías TEM de los NGs/BPVNCs.

El análisis mediante espectroscopía de rayos X confirmó el éxito de la encapsulación. El espectro de los NGs/ BPVNCs mostró los mismos planos de difracción característicos de los BPVNCs, mientras el espectro de los NGs mostró un aspecto característico de los materiales amorfos, sin planos definidos (Figura 27).

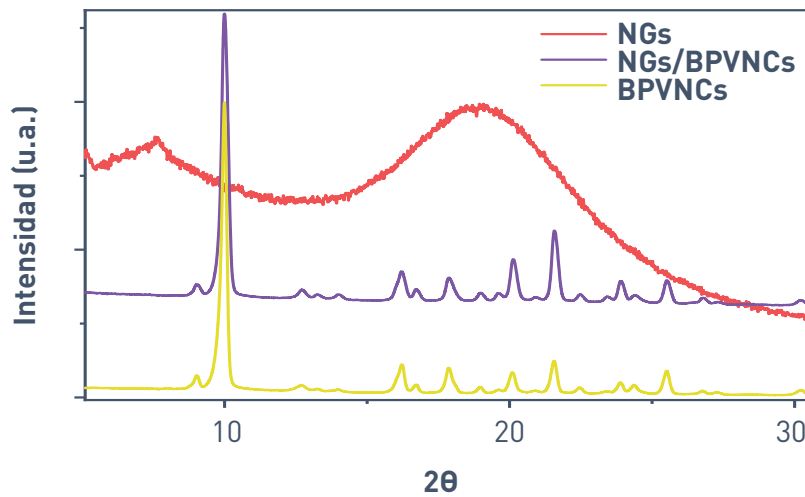


Figura 27: Difractograma de rayos X de los NGs, los BPVNCs y Los BPVNCs encapsulados en los NGs.

Los NGs/BPVNCs presentaron un valor de potencial ζ similar al de los nanogeles vacíos, -6.91 ± 0.38 mV frente a -6.4 ± 0.9 mV. Para confirmar la presencia de los nanogeles en la superficie de los BPVNCs y determinar la proporción entre ambos, se analizaron los NGs/BPVNCs mediante termogravimetría entre 30 °C y 800 °C (Figura 28). Se observó que la descomposición térmica de los NGs/BPVNCs sucede a una temperatura de entre 150 °C y 400 °C, mientras que la descomposición térmica de la bupivacaína sucede a una temperatura de 266 °C²³². La presencia de dos picos bien definidos a 260 °C y a 340 °C puede atribuirse, por lo tanto, a la descomposición térmica de los BPVNCs y de los nanogeles respectivamente. Según estos resultados de la masa total de los NGs/BPVNCs, aproximadamente un 13% se correspondería a los NGs y un 87% a los BPVNCs.

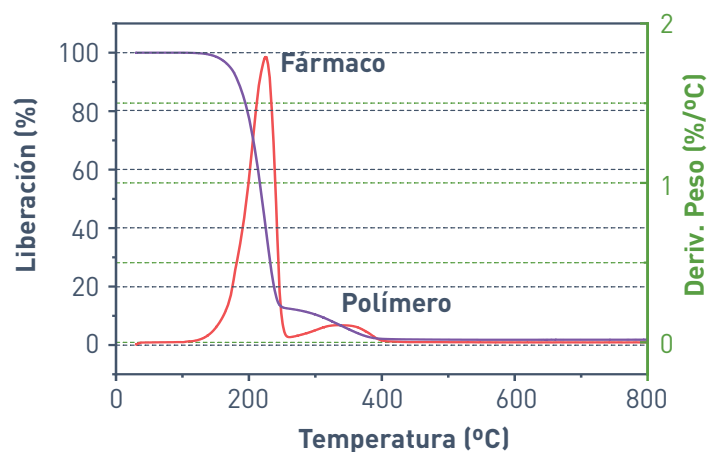


Figura 28: Gráfico del TGA (morado) y de la derivada del TGA (rojo) de los BPVNCs/NGs.

La carga real de fármaco y el perfil de liberación de los NGs/BPVNCs se determinó mediante cromatografía de gases-masas. Los resultados obtenidos mostraron una carga del $84.8\% \pm 1.2$ en peso, un valor similar al obtenido en el análisis termogravimétrico. Según los datos disponibles, se trata de uno de los mayores valores de encapsulación de bupivacaína obtenidos, superior incluso al 75 % en peso obtenido por Curley et al²⁷¹ mediante el método de emulsión/evaporación.

Los perfiles de liberación de bupivacaína se realizaron empleando muestras con una concentración equivalente de fármaco, esto es 0.196 mg/mL en el caso de los NGs/BPVNCs y 0.180 mg/mL en el caso de los BPVNCs, y por debajo de la concentración de saturación de la base libre de bupivacaína en agua (0.4 mg/mL), inferior a la del hidrocloreuro de bupivacaína (20-40 mg/mL)²⁷². Los resultados mostraron una rápida liberación durante los 30 primeros minutos, ligeramente inferior en el caso de los NGs/BPVNCs. Esta rápida liberación se puede atribuir a la alta tasa de solubilidad de los NCs de bupivacaína²⁷³ y a la presencia de BPVNCs expuestos en la superficie de los NGs²⁷⁴.

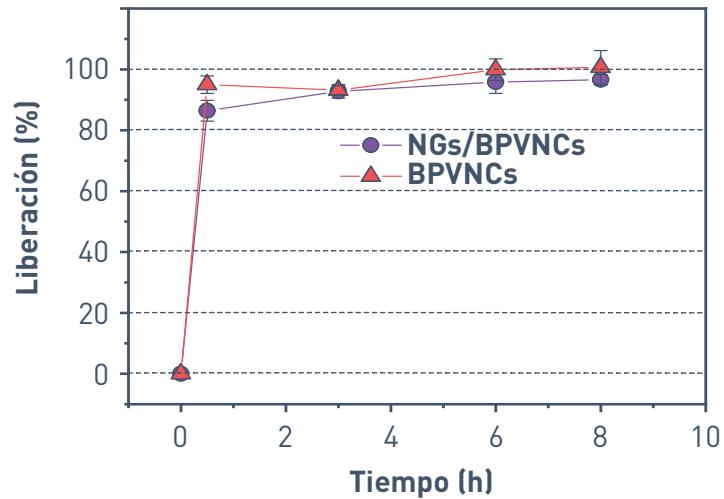


Figura 29: Perfiles de liberación por difusión de bupivacaína libre en los NGs/BPVNCs y los BPVNCs sin encapsular.

4.3. Biocompatibilidad de los materiales

Con el fin de valorar su potencia aplicación *in vivo*, se estudió la biocompatibilidad de los distintos materiales en cuatro líneas celulares: fibroblastos dérmicos humanos, células madre mesenquimales de ratón (mMSCs) y células tumorales de glioblastoma humano. Después de tratar las distintas líneas celulares con los materiales durante 24h, se evaluó su efecto en el metabolismo celular, el ciclo celular y la apoptosis.

En el estudio de viabilidad celular (Figura 30) se observó que los cultivos tratados con NGs no afectaron a la viabilidad celular de ninguna de las líneas celulares ni concentraciones estudiadas, estando todos los valores por encima del 90 %. Estos

resultados, en línea con los obtenidos en el capítulo anterior, demuestran el potencial de los NGs basados en POEGMA para aplicaciones biomédicas. Del mismo modo se observó que los cultivos tratados con BPVNCs, NGs/BPVNCs e hidrocloreto de bupivacaína presentaban resultados de viabilidad altos hasta concentraciones de 0.1 mg/mL, descendiendo considerablemente al alcanzar la concentración de 0.4 mg/mL, salvo en los macrófagos, cuya viabilidad se mantiene a todas las concentraciones estudiadas. En el caso de los cultivos de fibroblastos y U251MG tratados con 0.4 mg/mL de NGs/BPVNCs, se observa una viabilidad ligeramente superior a la obtenida con los BPVNCs, similar a la obtenida con la bupivacaína libre. Este hecho sugiere un ligero efecto protector de los NGs sobre los BPVNCs.

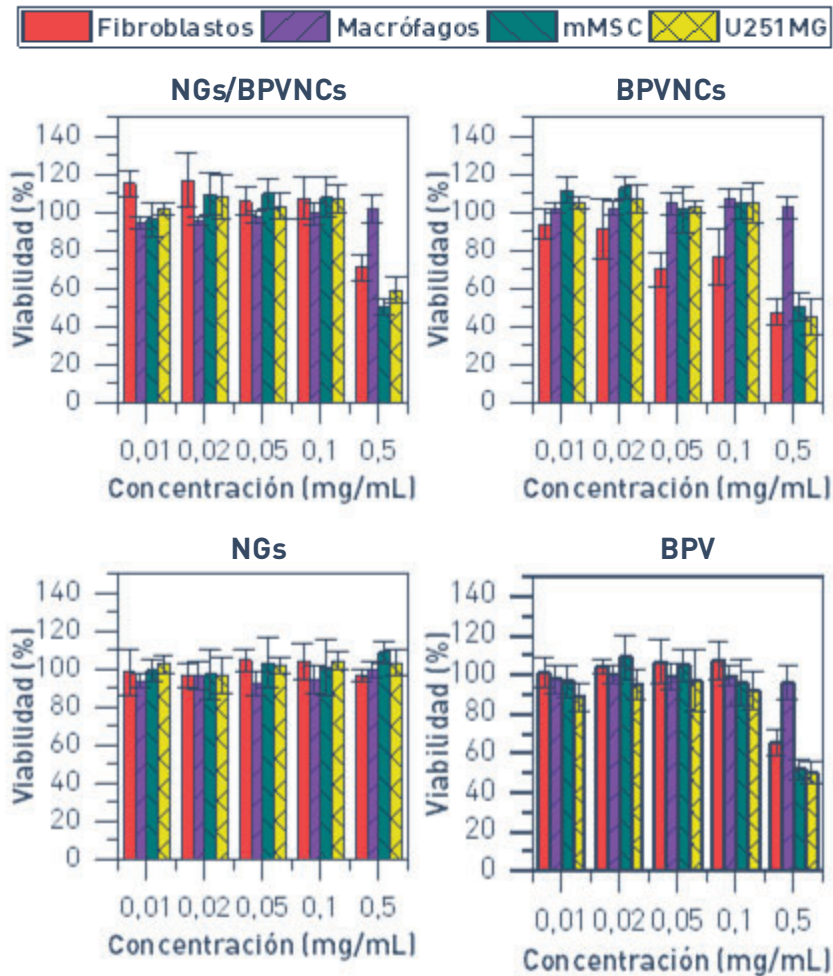


Figura 30: Resultados de viabilidad celular de los distintos materiales en las cuatro líneas celulares, respecto del control sin tratar (100%).

El daño de la membrana celular se evaluó mediante el análisis de la apoptosis celular por citometría de flujo (Figura 31). Los resultados no mostraron diferencias relevantes entre los controles y las muestras tratadas. Únicamente se observó un ligero incremento de la apoptosis total (temprana + tardía) (<10

%) en los cultivos de fibroblastos y macrófagos tratados con BPVNCs, así como en los cultivos de U251MG tratados con hidrocloreuro de bupivacaína y BPVNCs (12 % - 16 %). Esto último coincide con resultados publicados anteriormente donde los tratamientos con bupivacaína producen cambios en los porcentajes de apoptosis, necrosis y viabilidad celular en células U251MG²⁴⁴.

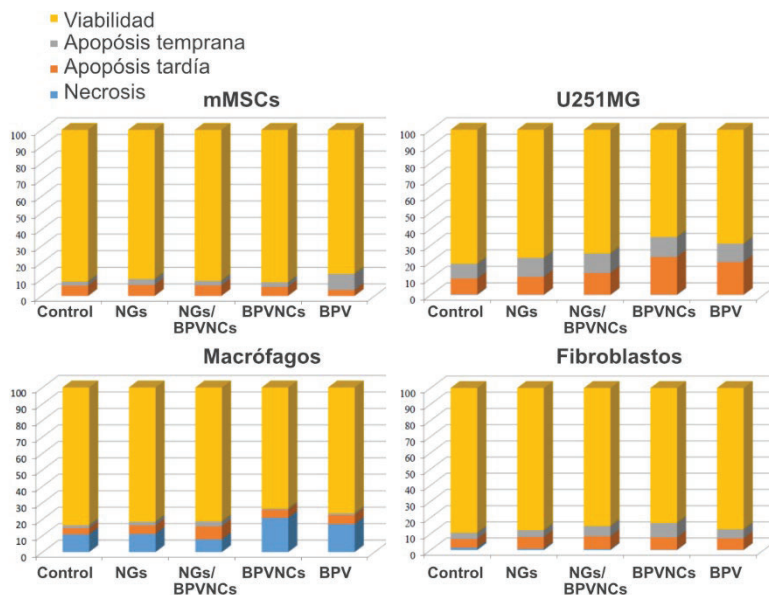


Figura 31: Análisis de la apoptosis celular mediante citometría de flujo para las cuatro líneas celulares tratadas.

Del mismo modo, se analizaron las fases del ciclo celular mediante citometría de flujo (Figura 32). Se observó un ligero incremento de la fase S (3 % - 23 %), en detrimento de las fases G1 y G2 en los cultivos de macrófagos tratados con los materiales, siendo mayores en el caso de los tratados con NGs y

NGS/BPVNCs. De todas formas, ninguno de los materiales afectó negativamente al ciclo celular.

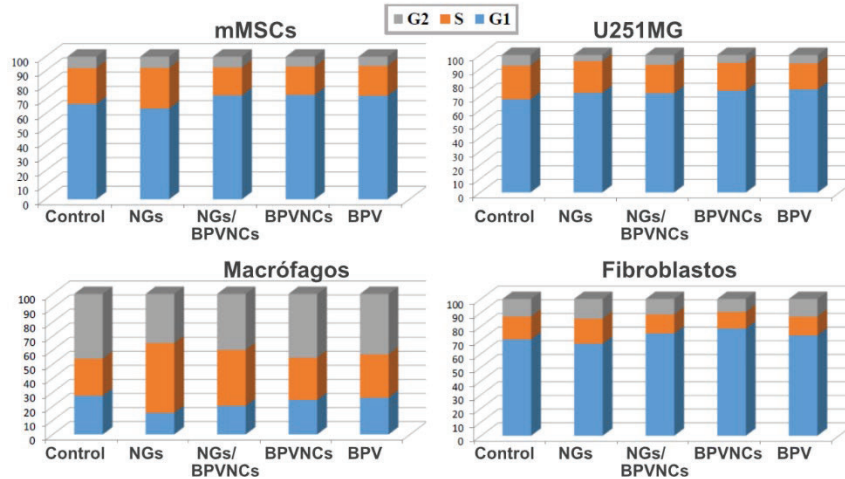


Figura 32: Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo para las cuatro líneas celulares tratadas.

La producción y manipulación de los materiales fuera de un ambiente estéril aumenta considerablemente el riesgo de contaminación con endotoxina, suponiendo un riesgo potencial para futuras aplicaciones biomédicas²⁴⁵. Por este motivo se cuantificó la cantidad de endotoxina presente en el material mediante el *Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit*. Los resultados mostraron concentraciones muy inferiores al umbral determinado por la FDA (0.05 ng/mL)²⁴⁶.

5. Conclusiones

En este capítulo se han obtenido con éxito nanocristales de bupivacaína que posteriormente han sido encapsulado en nanogeles de P(MEO₂MA-co-OEGMA) mediante el método de polimerización radicalaria por precipitación.

Los nanogeles de P(MEO₂MA-co-OEGMA) han exhibido una temperatura de transición volumétrica de fase a 40.5 °C y con una reducción volumétrica del 70 %, lo que demuestra su potencial aplicación como sistema de liberación bajo demanda.

Los nanogeles cargados con nanocristales de bupivacaína obtenidos han presentado una alta monodispersidad, así como una elevada capacidad de carga (84.8 % ± 1.2 en peso).

El estudio de liberación ha mostrado una rápida liberación de fármaco durante los 30 primeros minutos, sin observarse diferencias importantes entre los BPVNCs libres o encapsulados.

Mediante los estudios de viabilidad celular se ha podido fijar la dosis subcitotóxica de losNGs/BPVNCs y de los BPVNCs en 0.1 mg/mL. Del mismo modo, los materiales estudiados no mostraron un efecto perjudicial significativo sobre el ciclo celular o la apoptosis.

Capítulo V: **Aplicación en liberación controlada de fármacos para el tratamiento del dolor crónico**

1. Introducción

La evaluación in vivo del efecto analgésico de un nuevo tratamiento supone un reto debido a la complejidad y dificultad para obtener datos cuantitativos objetivos de manera sencilla y no invasiva. Adicionalmente, los condicionantes éticos ligados a trabajar con modelos animales sujetos a dolor implica que el modelo animal y los métodos de evaluación deban ser seleccionados cuidadosamente²⁷⁵.

Entre todos los modelos, el más común es el estudio de los nervios periféricos a través del nervio ciático de rata²⁷⁶⁻²⁷⁸ debido a su sencillez y robustez a la hora de estudiar múltiples aspectos del sistema nervioso central²⁷⁹.

Se han propuesto otros modelos de nervio que involucran el plexo braquial²⁸⁰⁻²⁸², el nervio facial^{283,284} o el nervio caudal²⁸⁵, así como otros modelos animales como perros^{286,287}, gatos²⁸⁸, conejos^{289,290}, ovejas²⁹¹ o primates^{292,293}. Sin embargo, todos estos han sido minoritarios en comparación al modelo de nervio ciático de rata.

A la hora de evaluar la recuperación funcional nerviosa en los modelos de nervio ciático de rata se han planteado múltiples ensayos cualitativos y cuantitativos. Actualmente no existe un consenso claro acerca de cuál es el más adecuado, por

lo que es recomendable realizar la evaluación en base a varios ensayos complementarios²⁹⁴⁻²⁹⁶.

Actualmente existen diversos ensayos de algesimetría estandarizados realizados mediante equipos especializados disponibles comercialmente. Este tipo de ensayos se emplean para evaluar la recuperación de la función nerviosa sensitiva en la piel mediante diversos estímulos.

Un ejemplo es el ensayo de algesimetría mecánica empleando filamentos de von Frey²⁹⁷ o equipos von Frey²⁹⁸. En este tipo de ensayos, la rata se sitúa sobre una rejilla y se ejerce suavemente una presión incremental empleando filamentos calibrados von Frey o una sonda sobre la superficie plantar del animal, hasta que éste responde al estímulo. La fuerza ejercida en el momento de la respuesta se toma como umbral nociceptivo^{299,300}. Algunas variaciones estandarizadas del ensayo de algesimetría mecánica son el ensayo de Randall-Selitto³⁰¹ o la aestesiometría plantar dinámica³⁰².

Otra técnica común es la algesimetría térmica o tolerancia en placa caliente³⁰³. En este ensayo, la rata se coloca en un recipiente con una base caliente a una temperatura concreta, con la superficie plantar extendida. Posteriormente se cronometra el tiempo que tarda en retirar la pata (latencia térmica) y este valor se toma como umbral nociceptivo^{299,304}.

La algesimetría mediante frío es una técnica similar a la anterior. En este caso se sustituye el estímulo de calor por uno de frío. Para ello se sitúa a la rata en una rejilla y se aplica hielo en la superficie plantar, se cronometra el tiempo de respuesta y se toma este valor como umbral nociceptivo³⁰⁵. Se demostró una mayor variabilidad de los resultados respecto a las dos técnicas anteriores^{298,306}.

Debido a la posibilidad de respuestas aleatorias no dependientes del estímulo o al factor aprendizaje del animal, los métodos basados en algesimetría requieren de control observacional por parte del operador. Habitualmente, la respuesta ante el estímulo viene acompañada de vocalizaciones o un reflejo consistente en lamer la garra.

El ensayo de reacción de empuje se basa en el reflejo de agarre y sustentación del animal ante una caída²⁸⁰. En este caso, la rata se sitúa sobre una rejilla vertical y se ejerce una presión sobre ella hasta que pierde el agarre. La fuerza ejercida en el momento de pérdida de agarre se toma como valor de respuesta. Se trata de un ensayo sencillo, no invasivo y que puede repetirse múltiples veces sin perjudicar al animal. El reflejo de empuje es un reflejo complejo que requiere de respuesta motora y sensitiva, por lo que se debe emplear como complemento a pruebas motoras y sensitivas específicas.

A la hora de valorar la función motora, uno de los métodos más habituales es la prueba de empuje extensor postural propuesta por Thalhammer et al.³⁰⁷. Este método consiste en colocar el miembro dañado sobre una báscula, medir la fuerza ejercida y compararla con la del miembro contrario. Una versión desarrollada a partir de ésta es el ensayo de distribución de peso, en el cual se posiciona la rata con ambos miembros sobre dos plataformas independientes y se mide la fuerza en ambos miembros de forma simultánea^{308,309}.

Otro método común de evaluar la recuperación de la función nerviosa motora es la prueba de paso en pista. Consiste en hacer caminar a la rata sobre una pista en la que se marcan sus pisadas. El método fue propuesto por De Medinaceli et al.³¹⁰ y refinado posteriormente por Hare et al.³¹¹, y se basa en el análisis de la longitud de paso y la separación entre dedos. El daño en el nervio ciático provoca un incremento en la longitud de paso y una reducción en la separación de los dedos 1 y 5 y 2 y 4. Mediante estos valores es posible extraer el índice funcional ciático (SFI), cuyo valor oscila entre 0 y 100 donde valores bajos indican que no existe daño en el nervio ciático.

A pesar de tratarse de un procedimiento popular, sus resultados presentan una alta variabilidad derivada de los múltiples factores externos que pueden alterar el paso³¹².

Bervar³¹³ desarrolló un método alternativo basado en análisis por imagen del paso. Este método emplea el índice estático ciático (SSI) como referencia³¹⁴ y, aunque permite automatizar las medidas y obtener mayor precisión, presenta los mismos problemas de variabilidad que el método anterior.

A la hora de evaluar la recuperación de la función nerviosa es importante seleccionar ensayos específicos que permitan evaluar cuantitativamente la función motora y sensitiva de forma independiente. La realización de ensayos complementarios tanto cualitativos como cuantitativos pueden ayudar a reforzar los resultados o a detectar medidas erróneas derivadas del aprendizaje del animal o de otros factores externos.

Asimismo, se debe tener en cuenta que la evaluación cuantitativa de un mismo fenómeno mediante técnicas distintas puede proporcionar resultados no correlacionales y por tanto no pueden combinados.

2. Resumen

En este capítulo se presentan los resultados del estudio in vivo realizado sobre los materiales obtenidos en el capítulo anterior. En dicho estudio se trataron grupos de cuatro ratas con el sistema desarrollado en el capítulo anterior, así como con diversos controles. Posteriormente se evaluó la función nerviosa motora y sensitiva del miembro tratado mediante dos pruebas cuantitativas (ensayo de tolerancia en placa caliente y ensayo de distribución de peso) y el estudio de dos reflejos (reacción de empuje y retirada de pata). Adicionalmente se evaluó cualitativamente el paso y se observó la aparición de contractura en los músculos flexores de la garra. Asimismo, se analizó la influencia del ángulo de irradiación, así como el uso de dexametasona como coadyuvante en el tratamiento. El objetivo de este capítulo es realizar una prueba de concepto destinada a evaluar el uso potencial del sistema basado en nanogeles de P(MEO₂MA-co-OEGMA₅₀₀) decorados con oro, en el tratamiento del dolor. Mediante los sistemas propuestos, se busca un doble objetivo: por un lado, prolongar el efecto del fármaco en el tiempo y por otro poder activarlo a demanda consiguiendo un control temporal del tratamiento. Para ello, se activó el material inmediatamente después de la administración, a 24h y a 48h. La evaluación de la función nerviosa se evaluó a 0.5, 1, 2, 4, 6, 24, 30, 48, 54, 96 y 102 horas tras la administración.

3. Métodos y materiales

3.1. Evaluación *in vivo* de los materiales

La evaluación *in vivo* de los materiales se realizó acorde a los protocolos diseñados por las doctoras Gracia Mendoza y Vanesa Andreu, contemplados en el proyecto con licencia PI01/16, aprobado por el Comité ético de experimentación animal de la Universidad de Zaragoza. En todos los experimentos se emplearon ratas macho Sprague Dawley (Janvier, Francia) con una edad de entre 6 y 9 semanas y un peso entre 330 y 450 gr. El tratamiento y cuidado de los animales se realizó acorde al Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia; que traspone la directiva europea 2010/63/UE relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. Tanto el alojamiento y gestión de los animales como los experimentos se llevaron a cabo en las instalaciones de animalario de la Universidad de Zaragoza. Las ratas se alojaron a una temperatura de entre 20 y 24 °C, con una humedad relativa del 50 % y ciclos día/noche de 12 h. Con el fin de familiarizar a los animales con la manipulación y técnicas experimentales, así como minimizar los efectos derivados del estrés, se realizaron entrenamientos diarios a lo largo de la semana previa a la experimentación. El comportamiento de las

ratas y la presencia de signos de estrés se analizaron diariamente antes de cada experimento. Los individuos se dividieron de forma aleatoria en 12 grupos de 4 individuos, excepto para los controles, en cuyo caso sólo se emplearon 2 individuos.

3.2. Procedimiento experimental

El procedimiento experimental se dividió en cuatro fases desarrolladas a lo largo de 102 h:

- Administración.
- Irradiación.
- Evaluación y seguimiento.
- Sacrificio.

3.2.1. Administración⁴

Para la administración, se anestesió cada rata en una cámara al 5 % de isoflurano bajo un flujo de oxígeno de 1 L/min y se mantuvo al 2 % de isoflurano durante todo el proceso de administración e irradiación mediante una máscara veterinaria de anestesia.

Una vez completamente anestesiada, se rasuró la cadera derecha y se administraron 200 μ L de la solución adecuada en

⁴ *La anestesia y administración fueron realizadas por la doctora Gracia Mendoza.*

función de cada grupo (a excepción de los animales del grupo control, los cuales no fueron administrados) (Tabla 4) en el caso de los materiales desarrollados en el capítulo III, o 50 μ L de la solución adecuada en función de cada grupo en el caso de los materiales desarrollados en el capítulo IV. Para la administración se empleó una aguja hipodérmica 21G, introducida con orientación lateral o perpendicular al trocánter mayor hasta tener contacto con el hueso, depositando la solución en la raíz del nervio ciático.

GRUPO	SOLUCIÓN INYECTADA	IRRAD.	CONCENT.
1	(POEGMA)NGs@HGNTs	No	38 mg/mL
2	(POEGMA)NGs@HGNTs	Si	38 mg/mL
3	(POEGMA)NGs@HGNTs/BPV	No	48 mg/mL
4	(POEGMA)NGs@HGNTs/BPV	Si	48 mg/mL
5	(POEGMA)NGs@HGNTs/BPV	No	48 mg/mL
6	(POEGMA)NGs@HGNTs/BPV	Si	48 mg/mL
7	BPV libre	No	10 mg/mL
8	BPV libre	Si	10 mg/mL
9	Solución salina	No	N.A.
10	Solución salina	Si	N.A.
11	-	No	N.A.
12	-	Si	N.A.
13	NGs/BPVNTs	No	47 mg/mL
14	BPVNTs	No	43 mg/mL
15	BPV libre	No	40 mg/mL

Tabla 4: Soluciones administradas a cada grupo experimental.

3.2.2. Irradiación

Inmediatamente después de la administración, y con el fin de demostrar la activación bajo demanda^{315,316}, los individuos

perteneciente a grupos irradiados, se irradiaron mediante un láser NIR con longitud de onda 808 nm acoplado a un colimador F810SMA-780 (NA = 0.25, f = 36.01 mm, Thorlabs, Alemania) mediante una fibra M37L01 ($\text{\O}550 \mu\text{m}$, 0.22 NA, Thorlabs, Alemania). Todas las irradiaciones se realizaron empleando una irradiancia de 630 mW/cm^2 , durante exposiciones de 5,5 minutos y perpendicularmente o en un ángulo de 45° respecto a la superficie del miembro posterior.



Figura 33: Montaje de irradiación empleado.

Para evaluar el comportamiento tras varias reactivaciones, las irradiaciones cortas (5.5 min.) se repitieron tras 24 h y 48 h.

3.2.3. Valoración del efecto del tratamiento⁵

Con el fin de cuantificar el efecto anestésico y la recuperación funcional del miembro, se realizaron diferentes ensayos cualitativos³¹⁷ y cuantitativos enfocados a determinar el grado de bloqueo nervioso motor y sensitivo. Para determinar el grado de bloqueo nervioso sensitivo se empleó un ensayo de tolerancia en placa caliente siguiendo metodologías previamente descritas^{76,318}. Para ello, se posicionó la superficie plantar del miembro tratado sobre una placa caliente a 56 °C (Ugo Basile, Italia) dotada con un cronómetro activado de forma automática al apoyar el miembro de la rata y un pulsador de pie para detener la cuenta, y se monitorizó el tiempo hasta que el animal retiró la pata (latencia térmica). Se consideró que el bloqueo nervioso sensitivo era completo si transcurrido un tiempo de 8 segundos el animal no retiraba la pata, momento en el cual se extraía de la placa caliente con el fin de evitar daños por calor en el miembro tratado. La prueba se realizó 3 veces consecutivas, tomando como valor de latencia térmica (Lt) el promedio de las tres medidas. Con el fin de discriminar la tolerancia específica de cada animal, se determinó la latencia térmica basal de cada rata previamente a comenzar los

⁵ *En los ensayos de evaluación del efecto del tratamiento, así como en la toma de datos participaron, además del autor, las doctoras Gracia Mendoza, Teresa Alejo, Laura Usón, Sara García, Cristina Yus y Guillermo Landa.*

experimentos. El grado de bloqueo nervioso sensitivo se calculó como el cociente entre el incremento de latencia térmica medido y la diferencia entre la latencia térmica de bloqueo total (8 s) y la latencia térmica basal (L_{t_b}) (Ecuación 4).

$$\text{Bloqueo nervioso sensitivo (\%)} = \frac{L_t - L_{t_b}}{8 - L_{t_b}} \cdot 100$$

Ecuación 4: Determinación del grado de bloqueo nervioso sensitivo.

El grado de bloqueo nervioso motor se determinó mediante el ensayo de distribución de peso siguiendo también metodologías descritas previamente^{318,319} empleando un equipo BIO-SWB Touch (Bioseb, Francia). El procedimiento consistió en introducir la rata en un soporte específico con los miembros posteriores posicionados sobre dos sensores de peso independientes, permitiendo descargar todo el peso sobre ellos.

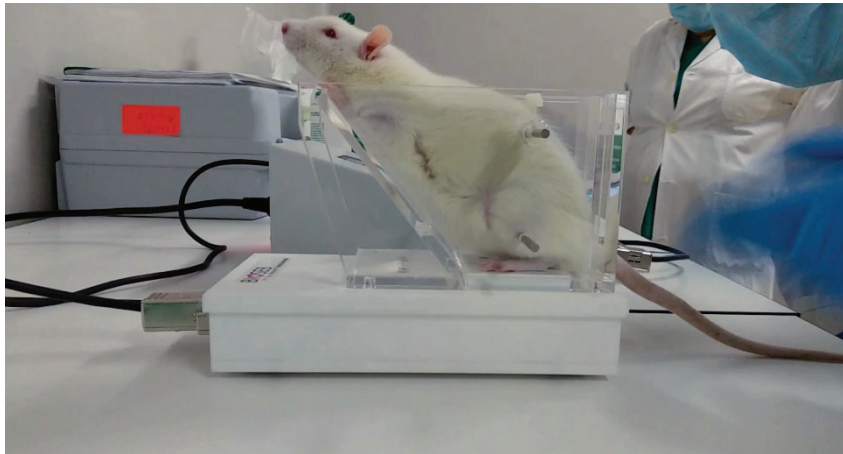


Figura 34: Imagen del ensayo de distribución de peso.

Mediante los sensores se monitorizó 10 veces consecutivas y durante 10 segundos el peso soportado por cada miembro, tomando como valor de distribución de peso (DP) el promedio de los cocientes del peso soportado por el miembro derecho respecto al izquierdo (Ecuación 5).

$$\text{Distribución de peso (DP)} = \frac{\text{Peso miembro derecho}}{\text{Peso miembro izquierdo}}$$

Ecuación 5: Cálculo de la distribución de peso.

De igual forma que en el ensayo anterior, se caracterizó para cada animal el valor basal de la distribución de peso (DP_b) previamente a los experimentos. El grado de bloqueo nervioso motor se calculó como el valor absoluto del cociente entre la variación de distribución de peso respecto a la distribución de peso basal (Ecuación 6).

$$\text{Bloqueo nervioso motor (\%)} = \frac{\text{Abs}(DP - DP_b)}{DP_b} \cdot 100$$

Ecuación 6: Cálculo del grado de bloqueo nervioso motor.

Además de estos ensayos cuantitativos, se analizaron dos reflejos de comportamiento: la retirada de la pata ante un estímulo de presión sobre la garra y la reacción de empuje o extensión postural.

La prueba de retirada de la pata indica la nocicepción del miembro evaluado del animal y se define como el reflejo de movimiento de retirada de la pata ante un estímulo mecánico

provocado sobre la garra, en este caso una presión ejercida por los dedos del operador sobre la palma y el dorso de la garra de la rata. La presencia de este reflejo es indicativa de sensibilidad ante el dolor en el miembro³²⁰⁻³²². Este reflejo se presenta como una contracción de los músculos flexores de las articulaciones de la cadera, la rodilla y el corvejón^{307,323-325}. Para unificar la valoración del reflejo se estableció una escala de 1 a 4, siendo 1 un reflejo de retirada de pata normal, 2 un reflejo con un tiempo de respuesta superior al habitual, 3 un reflejo más débil y retardado y 4 ausencia de reflejo.

La prueba de reacción de empuje o extensión postural se adaptó de metodologías descritas previamente^{307,323-325}. Mediante esta prueba se evaluó la función motora mediante el reflejo de agarre y la capacidad de sustentación del miembro tratado. Para ello se apoyaron las extremidades posteriores de la rata sobre una rejilla y analizó tanto la existencia del reflejo de agarre, como la capacidad de sostener su propio peso mediante el agarre a la rejilla. Del mismo modo que en la prueba anterior se estableció una escala numérica de 1 a 4, siendo 1 un reflejo y sustentación normales, 2 reflejo normal y sustentación débil, 3 reflejo sin fuerza y sustentación muy débil y 4 ausencia de reflejo y sustentación.

Las lesiones del nervio ciático pueden derivar en contracturas articulares junto con bloqueo nervioso motor

provocados por una reinervación deficiente de los músculos extensores en comparación con los flexores^{326,327}. Esto provoca que la rata se apoye en el dorso de la garra durante el paso en lugar de la palma. Otra consecuencia de las lesiones del nervio ciático puede ser la inervación selectiva de los músculos, provocando la activación irregular de éstos durante el paso y por tanto defectos en la locomoción.

Por este motivo se estudió la aparición de contractura en los músculos flexores de la garra, así como la capacidad motora del miembro tratado durante el paso^{326,328}.

La aparición de contractura en los músculos flexores se valoró de forma binaria, siendo 0 la ausencia de contractura y 1 la presencia de ésta.

La habilidad motora durante el paso se dividió en cuatro niveles, siendo 1 un movimiento normal durante el paso, 2 un movimiento ligeramente torpe durante el paso, 3 un movimiento limitado durante el paso y 4 ausencia de movimiento durante el paso.

Todos estas pruebas y valoraciones se realizaron previamente a los experimentos con el fin de determinar los valores basales de cada animal y posteriormente al tratamiento transcurridas 0.5, 1, 2, 4, 6, 24, 30, 48, 54, 96 y 102 horas. Adicionalmente, las muestras irradiadas se evaluaron también

30 minutos después de cada irradiación (24.5 horas y 48.5 horas).

3.2.4. Sacrificio⁶

Todos los animales fueron sacrificados con dióxido de carbono tras la última evaluación, esto es transcurridas 102 horas desde la administración.

⁶ *El sacrificio de los animales fue realizado por la doctora Gracia Mendoza.*

4. Resultados y discusión

La capacidad analgésica y anestésica de los sistemas de liberación desarrollados en los capítulos III y IV se estudiaron tras la administración intramuscular de las respectivas dosis de 200 μL o 50 μL en la raíz del nervio ciático y la posterior activación mediante irradiación con un láser NIR (800 nm, 630 mW/cm^2 , 5.5 minutos) en el caso de los materiales del capítulo III. En los grupos irradiados, se repitió la irradiación a las 24 y 48 horas con el fin de estudiar la posibilidad de múltiples activaciones.

4.1. Evaluación de los materiales desarrollados en el capítulo III

4.1.1. Evaluación de la efectividad del tratamiento respecto a la bupivacaína libre

Para evaluar el efecto de los tratamientos, se realizaron diferentes ensayos cuantitativos y cualitativos destinados a valorar el bloqueo nervioso sensitivo y motor. Estos estudios cuantitativos consistieron en el ensayo de tolerancia en placa caliente (determinación del bloqueo nervioso sensitivo) y el ensayo de distribución de peso (determinación del bloqueo nervioso motor), complementados con los estudios cualitativos de paso y aparición de contractura de los músculos flexores

además del análisis de los reflejos de reacción de empuje y retirada de la pata.

En el caso de los grupos no irradiados, los resultados del estudio de bloqueo nervioso sensitivo mediante el ensayo de tolerancia en placa caliente (Figura 35) mostraron un claro efecto anestésico de la bupivacaína libre tras la inoculación. Este efecto se prolongó durante las dos primeras horas, lo que concuerda con los resultados publicados en estudios previos^{329,330}. Por el contrario, la bupivacaína encapsulada en los (POEGMA)NGs@HGNTs no mostró ningún efecto relevante. Este hecho se puede atribuir a la lenta liberación por difusión a temperaturas inferiores a la LCST³¹⁵, y al decaimiento de la concentración local debida a la biodistribución del fármaco tras la administración^{331,332}. Estos dos factores favorecen que la concentración local no supere el umbral para producir un efecto anestésico relevante.

Respecto a los controles (control, control salino y (POEGMA)NGs@HGNTs), los resultados fueron los esperados, no observándose efectos significativos en ningún caso.

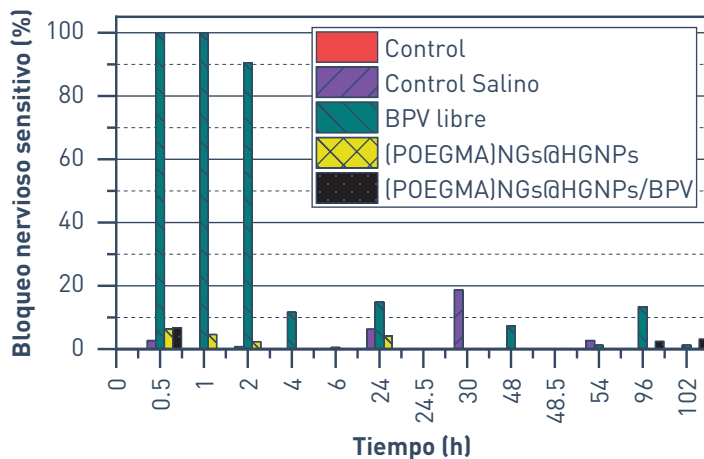


Figura 35: Bloqueo nervioso sensitivo de las muestras y controles sin irradiar.

En los grupos irradiados, los resultados fueron similares a los obtenidos en los grupos no irradiados tanto para la bupivacaína libre como para el resto de los controles (Figura 36).

Los (POEGMA)NGs@HGMPs cargados con bupivacaína mostraron un claro efecto anestésico tras la irradiación. Este efecto fue ligeramente menor al producido por la bupivacaína libre, lo cual puede ser atribuido a que la cantidad de fármaco liberado tras un ciclo de irradiación es menor a la cantidad inoculada en el caso de la bupivacaína libre. Asimismo, se observó que la duración del efecto era más prolongada en el tiempo. Esta mayor duración puede ser explicada por el efecto de la difusión del fármaco observada en los estudios de liberación presentados en el capítulo anterior. Una liberación sostenida puede favorecer que la concentración local de fármaco disminuya más lentamente³³³.

Tras 24 h desde la administración, se realizó una segunda irradiación para determinar la capacidad del material para ser reactivado. Los resultados muestran un ligero incremento del bloqueo nervioso sensitivo que sugiere la capacidad de reactivación, aunque con menor intensidad que tras la primera irradiación.

A las 48 h de la administración se realizó la tercera y última irradiación. Transcurridos 30 minutos no se observó un incremento significativo del bloqueo nervioso, sin embargo, sí se observó un ligero incremento en las 24 h y 48 h posteriores a esta irradiación. Una posible hipótesis para este comportamiento es que la cantidad de fármaco liberado tras esta tercera activación no fue suficiente para alcanzar el umbral de concentración local necesaria para producir un efecto anestésico, pero tras la liberación por difusión producida en las horas siguientes, la concentración local aumentó hasta alcanzar dicho umbral. Previamente se ha observado en literatura que la bupivacaína encapsulada en sistemas de liberación controlada pueden no producir efecto anestésico hasta transcurridas varias horas desde la administración, mientras que el efecto de la bupivacaína libre es prácticamente inmediato²³³.

En cualquier caso, los datos no son concluyentes y no es posible confirmar que se haya producido una tercera reactivación.

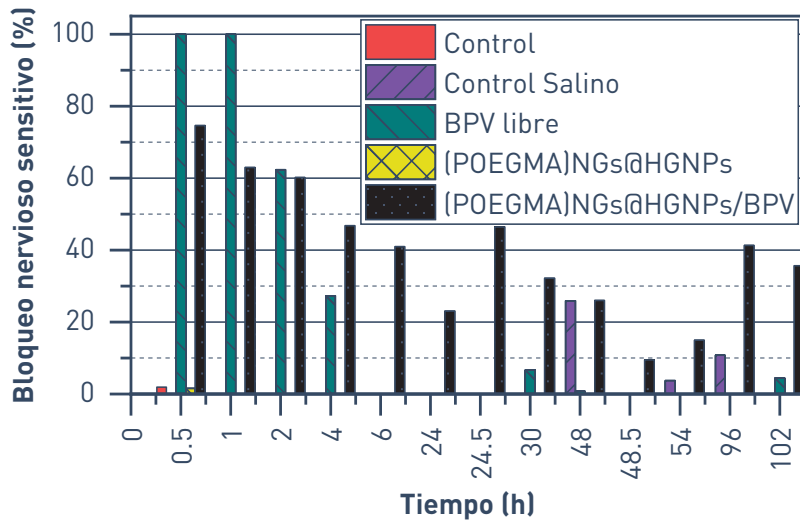


Figura 36: Bloqueo nervioso sensitivo de las muestras y controles irradiados.

Los ensayos de bloqueo nervioso motor mediante análisis de distribución de peso no mostraron ningún efecto significativo tanto en los grupos sin irradiar (Figura 37) como en los irradiados (Figura 38). Esto se debe a que las concentraciones de bupivacaina usadas están por debajo de la dosis mínima efectiva para producir bloqueo nervioso motor^{233,334}.

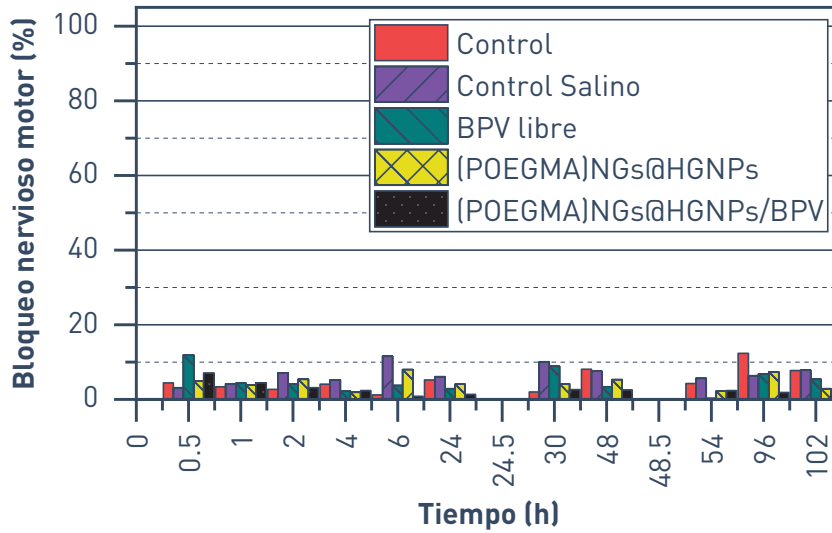


Figura 37: Bloqueo nervioso motor de las muestras y controles sin irradiar.

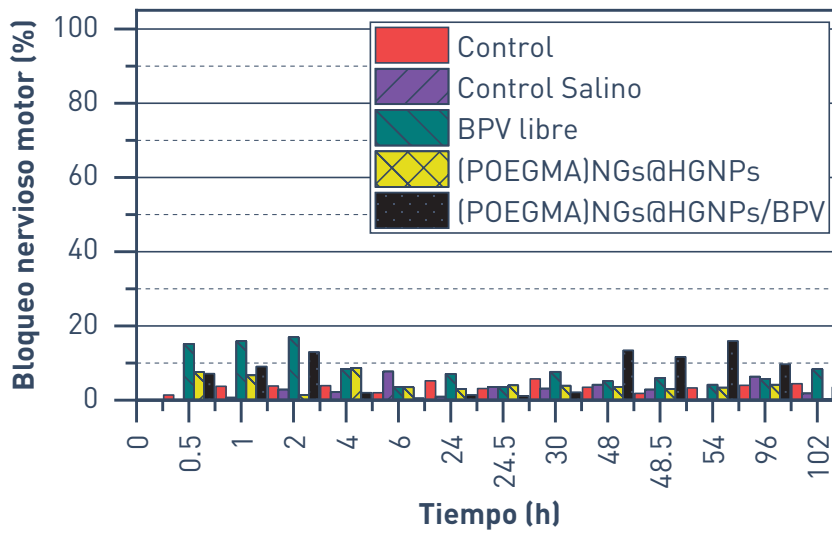


Figura 38: Bloqueo nervioso motor de las muestras y controles irradiados.

Los resultados obtenidos tras analizar los reflejos de retirada de pata y de reacción de empuje (Figura 39) concuerdan con los obtenidos en el ensayo de tolerancia en placa caliente.

En el caso de los (POEGMA)NGs@HGNGPs/BPV irradiados el efecto de la segunda activación no fue visible en el reflejo de retirada de pata, lo que puede indicar que tras la segunda activación el efecto anestésico fue menor. En ningún caso se vieron signos de la tercera activación en ninguno de los reflejos.

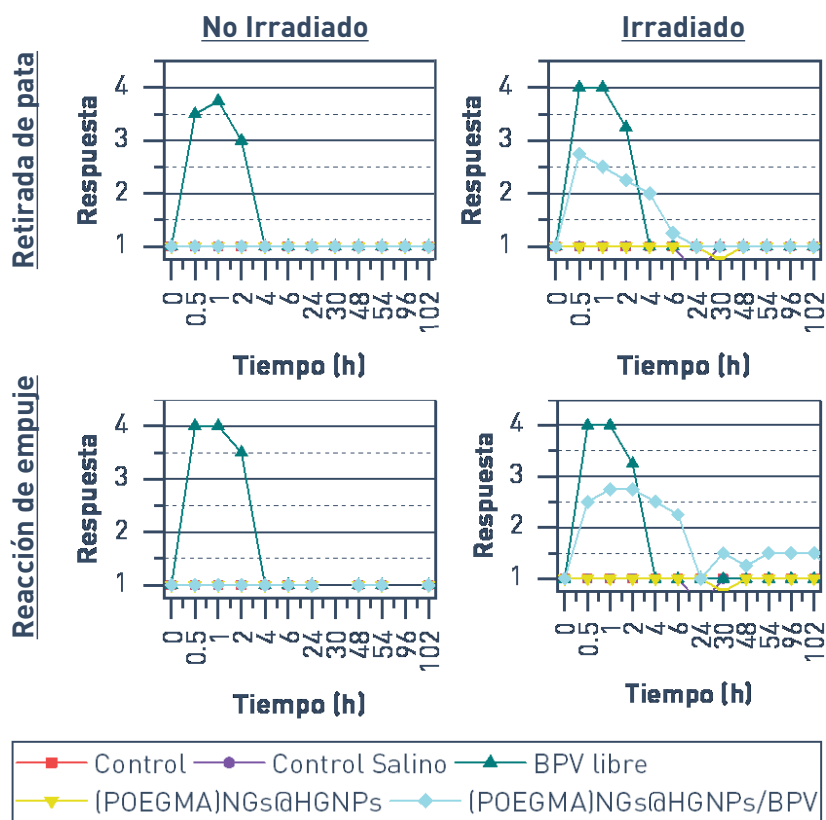


Figura 39: Evaluación de los reflejos de retirada de pata y reacción de empuje.

Del mismo modo, se observó una alteración del paso y la aparición de contractura en los músculos flexores de la garra en los grupos tratados con bupivacaína libre y con

(POEGMA)NGs@HG NPs/BPV irradiados y en el grupo tratado con bupivacaína libre sin irradiar. Este efecto fue visible durante las dos primeras horas para la bupivacaína libre y durante las cuatro primeras horas para los (POEGMA)NGs@HG NPs/BPV. En este caso no se observaron efectos tras la segunda y la tercera irradiación, lo que concuerda con los resultados anteriores y parece indicar que, aunque hay indicios de una segunda activación, la cantidad de fármaco liberado es menor que tras la primera irradiación.

El conjunto de resultados obtenidos indica que el sistema propuesto experimenta una transición hidrófila-hidrófoba que favorece la desorción de la bupivacaína debido al calentamiento provocado por las HG NPs acopladas a la superficie de los nanogeles³³⁵. Tras el calentamiento, el sistema recupera su estado hidrófilo y proporciona una liberación sostenida por difusión que incrementa la duración del efecto^{233,336}. Además, la reversibilidad del sistema³¹⁵ permite una reactivación tras 24 h lo cual representa la demostración de que es posible desarrollar un sistema activable bajo demanda.

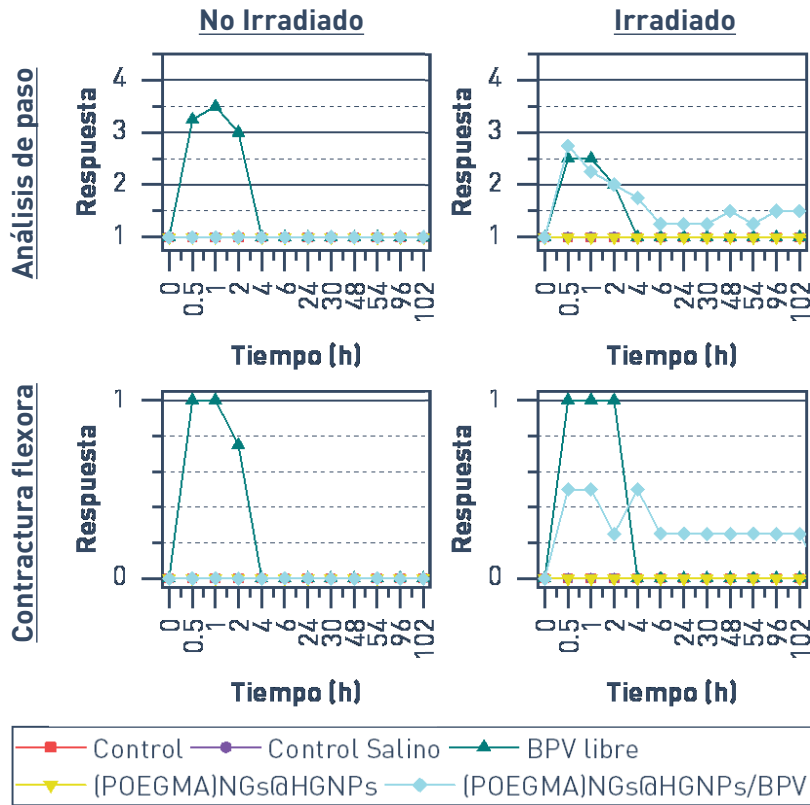


Figura 40: Evaluación del paso y aparición de la contractura de los músculos flexores de la garra.

4.1.2. Efecto de la dexametasona en el tratamiento

Estudios previos han demostrado que la administración de dexametasona en combinación con bupivacaína prolonga en el tiempo e incrementa el efecto analgésico³³⁷⁻³³⁹. En base a estos estudios, se inoculó a un grupo con una dosis de (POEGMA)NGs@HGNNPs/BPV combinados con 15 mg de dexametasona como coadyuvante con el objetivo de incrementar el efecto y duración de la bupivacaína liberada. Los resultados

del ensayo de bloqueo nervioso sensitivo (Figura 41) mediante tolerancia en placa caliente mostraron un claro incremento en el efecto anestésico y una menor pérdida de efectividad durante las cuatro primeras horas. En este caso, además de la reactivación tras la segunda irradiación, se observó un incremento significativo 30 minutos después de la tercera irradiación. Esto confirma la capacidad del sistema de reactivarse una tercera vez, aunque con una menor liberación que únicamente produce efectos significativos en combinación con dexametasona.

Respecto al bloqueo nervioso motor, la administración de dexametasona incrementó el efecto de la bupivacaína hasta producir bloqueo motor tras la primera irradiación, el cual desapareció transcurrida una hora.

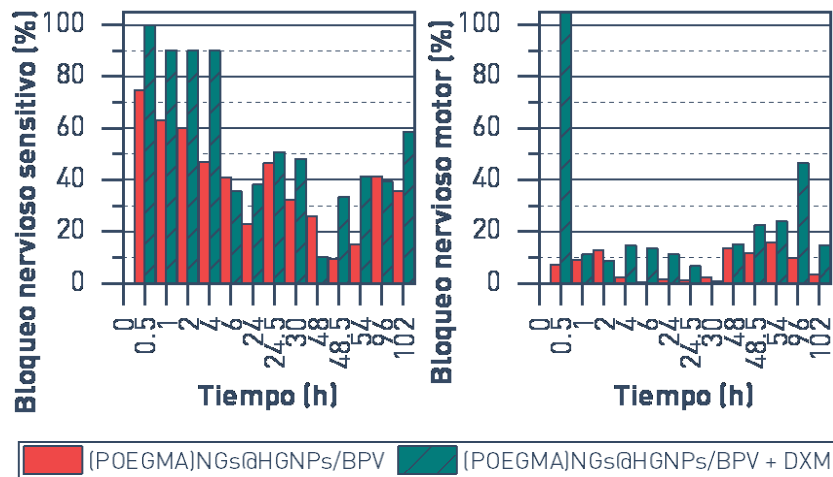


Figura 41: Efecto de la incorporación de la dexametasona en el bloqueo nervioso sensitivo y motor.

Los reflejos de retirada de pata y reacción de empuje también se vieron ligeramente incrementados por el efecto de la dexametasona. En línea con los resultados anteriores, se observó una mayor alteración del paso, así como una mayor presencia de contractura en los músculos flexores de la garra en el grupo tratado con dexametasona (Figura 42).

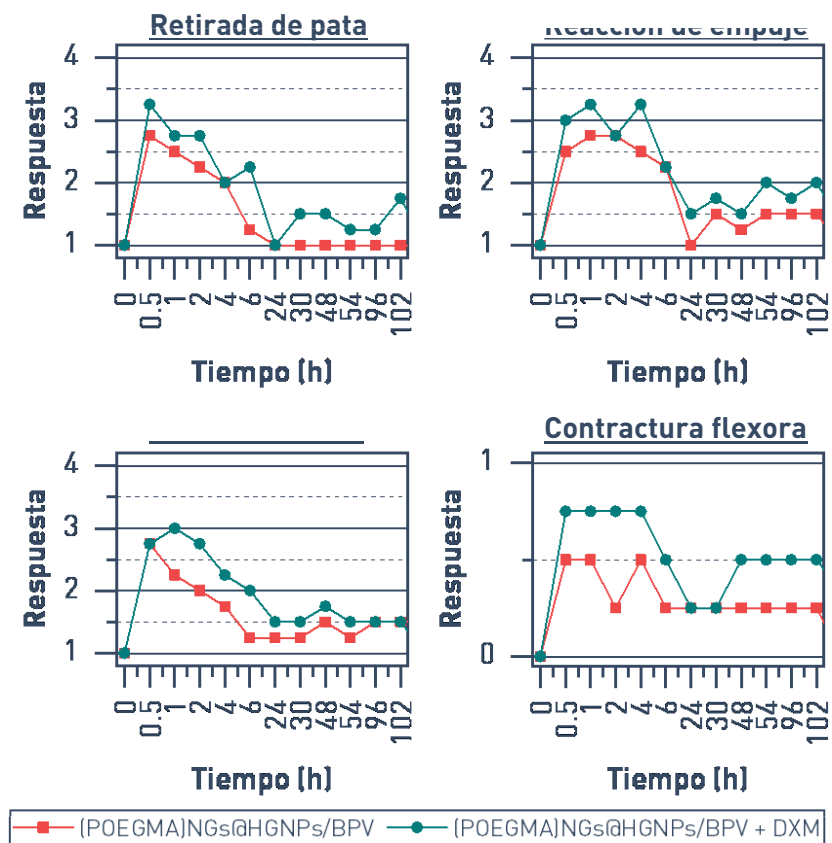


Figura 42: Efecto de la incorporación de la dexametasona en los reflejos, el paso y la aparición de contractura flexora.

Estos resultados suponen una mejora relevante del sistema propuesto en lo que respecta a la intensidad y duración del efecto anestésico acorde a lo descrito previamente en literatura³⁴⁰.

4.1.3. Efecto del ángulo de irradiación

Con el fin de determinar las mejores condiciones, se evaluó la influencia de la irradiación oblicua (45°). Los resultados de bloqueo nervioso sensitivo no mostraron diferencias significativas tras la primera irradiación, sin embargo, tras la segunda irradiación, se observó una reducción considerable del efecto anestésico. Los resultados de bloqueo nervioso motor no mostraron ningún efecto significativo tras ninguna de las tres irradiaciones.

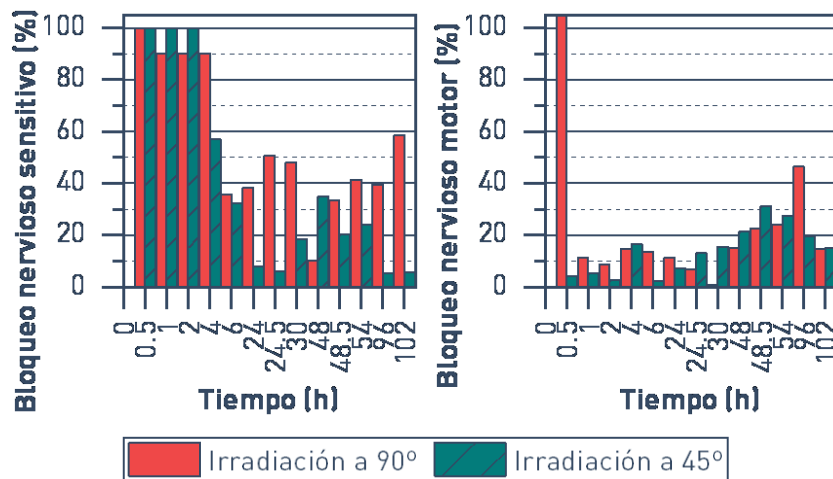


Figura 43: Efecto del ángulo de irradiación en el bloqueo nervioso sensitivo y motor.

Los resultados obtenidos, tanto en la evaluación de los reflejos como en el análisis del paso y la aparición de contractura de los músculos flexores, no mostraron diferencias significativas tras la primera irradiación, pero sí una ligera reducción tras la segunda y tercera irradiación.

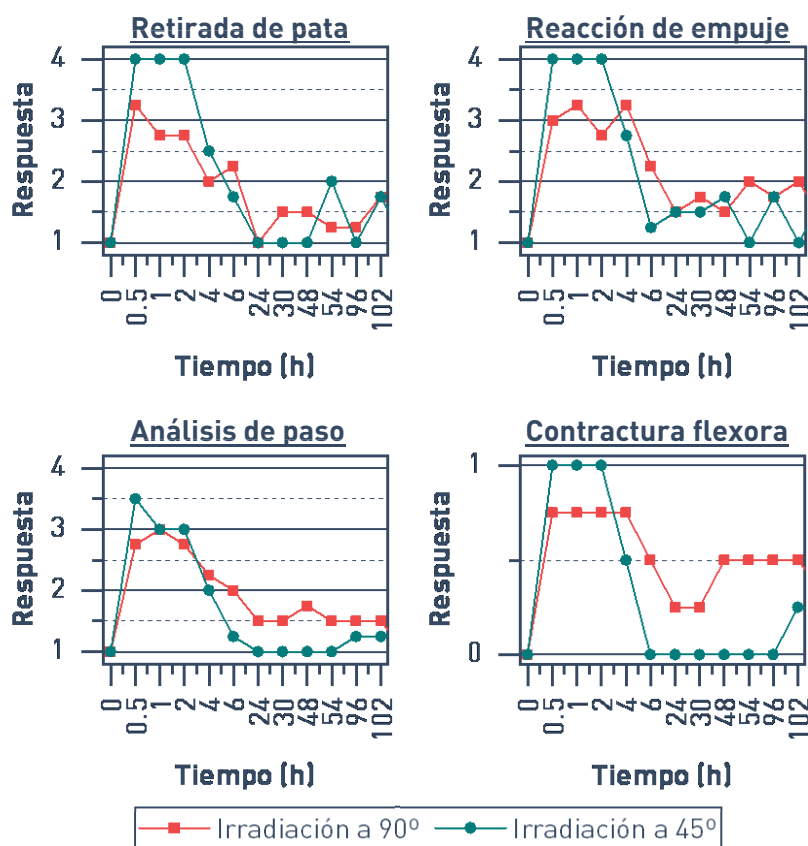


Figura 44: Efecto del ángulo de irradiación en los reflejos, el paso y la aparición de contractura flexora.

Los resultados obtenidos indicaron que una irradiación oblicua disminuye el rendimiento del sistema. Una irradiación

oblicua implica un recorrido mayor a través del tejido y por tanto una mayor atenuación y dispersión hasta alcanzar el material. Esto resultados coinciden con lo publicados en literatura³⁴¹.

4.2. Evaluación de los materiales desarrollados en el capítulo IV

4.2.1. Evaluación de la efectividad del tratamiento respecto a la bupivacaína libre

Con el fin de evaluar la efectividad de los materiales desarrollados en el capítulo IV y compararla con la proporcionada por la bupivacaína libre, se inyectaron dosis equivalentes a 2 mg/mL de bupivacaína en la raíz del nervio ciático de las ratas. Al igual que en el punto anterior, evaluó la efectividad mediante el ensayo de tolerancia en placa caliente (determinación del bloqueo nervioso sensitivo) y el ensayo de distribución de peso (determinación del bloqueo nervioso motor), complementados con los estudios cualitativos de paso y aparición de contractura de los músculos flexores además del análisis de los reflejos de reacción de empuje y retirada de la pata.

Los resultados del ensayo de tolerancia en placa caliente (Figura 45) mostraron que las tres formulaciones de bupivacaína proporcionaron el mayor valor de bloqueo nervioso sensitivo en la primera medida, 30 minutos después de la administración.

Tras dos horas, el efecto de la bupivacaína libre y de los BPVNCs comenzó a disminuir, manteniéndose en su máximo sólo el efecto producido por los NGs/BPVNCs. En los grupos tratados con bupivacaína libre y BPVNCs, el efecto desapareció por completo transcurridas entre 4 y 6 horas, mientras que el efecto de los NGs/BPVNCs se prolongó durante al menos 8 horas. Estos resultados mostraron que la diferencia de efectividad entre la bupivacaína libre y cristalizada no es significativa, probablemente debida a la rápida solubilidad derivada del pequeño tamaño de los nanocristales. Este resultado es coherente con el estudio de liberación presentado en el capítulo IV. Por otro lado, se observó que la bupivacaína encapsulada en los nanogeles produce un efecto entre 1.5 y 2 veces más duradero. Estos resultados sugieren que los nanogeles de P(MEO₂MA-co-OEGMA) pueden favorecer la retención de la bupivacaína en el entorno del nervio ciático. Una posible explicación a este fenómeno es que el colapso parcial de los nanogeles una vez alcanzada la temperatura fisiológica crea una capa hidrófoba sobre la superficie de los nanocristales que actuando como barrera de difusión y reduce la tasa de solubilidad.

Respecto al bloqueo nervioso motor, los resultados no mostraron un efecto significativo. Únicamente se observó un ligero efecto de la bupivacaína libre, que desapareció completamente transcurrida 1 hora desde la administración.

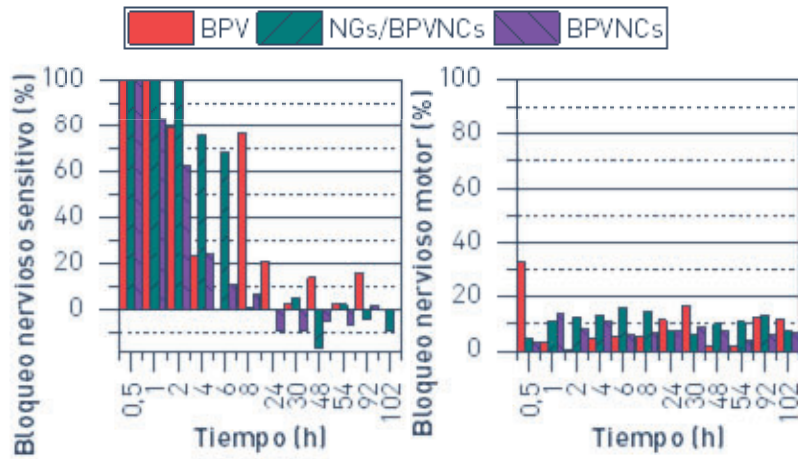


Figura 45: Efecto en el bloqueo nervioso sensitivo (izquierda) y motor (derecha).

Los resultados obtenidos en el análisis de los reflejos de retirada de pata y reacción de empuje refuerzan los obtenidos en el ensayo de tolerancia en placa caliente, al mostrar una tendencia similar. En ambos reflejos se observó una mayor duración del efecto producido por los NGs/BPVNCs, que se prolongó igualmente durante al menos 8 horas.

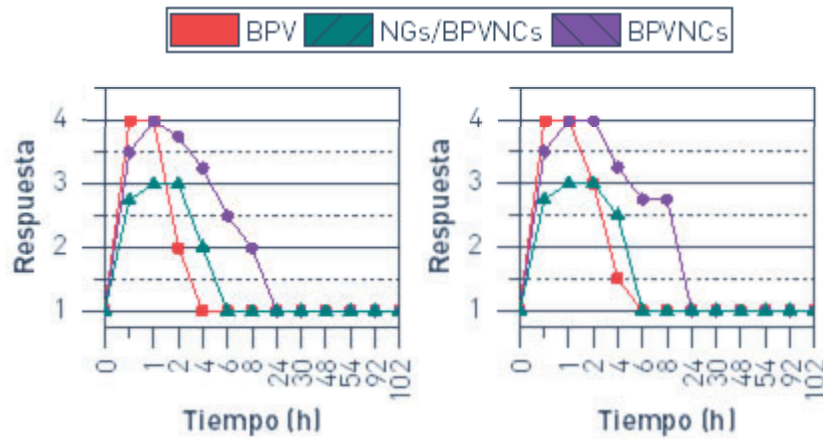


Figura 46: Efecto de los tratamientos en los reflejos de retirada de pata (izquierda) y de reacción de empuje (derecha).

Los tratamientos también tuvieron efecto sobre el paso de los animales y la aparición de contractura de los músculos flexores de la garra (Figura 47). La bupivacaína libre produjo una alteración más intensa del paso que desapareció por completo transcurridas 4 horas desde la administración, mientras que los NGs/BPVNCs produjeron una duración más prolongada del efecto. Respecto a la aparición de contractura de los músculos flexores de la garra, se observó su aparición en los grupos tratados con bupivacaína libre y NGs/BPVNCs. En el caso de la bupivacaína libre se mantuvo este efecto entre 2 y 4 horas, mientras que en el caso de los NGs/BPVNCs, este efecto se prolongó durante al menos 8 h.

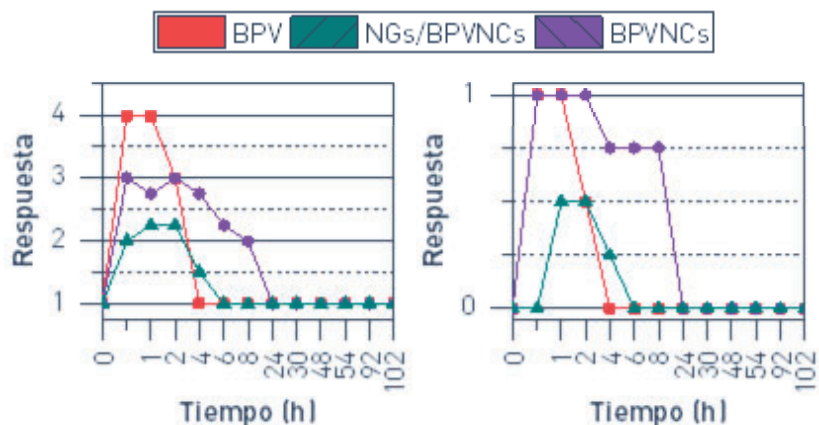


Figura 47: Efecto del tratamiento en el paso (izquierda) y en la aparición de contractura de los músculos flexores de la garra (derecha).

El conjunto de resultados obtenidos es coherente entre sí. Estos demuestran que la bupivacaína cristalizada y encapsulada en los nanogeles de P(MEO₂MA-co-OEGMA) produce un efecto anestésico más prolongado que los BPVNCs o la bupivacaína libre. La hidrofobicidad de la base libre de bupivacaína, comparada con la del hidrocloreuro de bupivacaína, probablemente favorece su penetración a través de la membrana celular, así como su enlace con la bicapa lipídica, minimizando su difusión a la matriz extracelular y por tanto su lavado. Además, a 37 °C los nanogeles se encuentran parcialmente colapsados, proporcionando una mayor hidrofobicidad a la estructura^{342,343}. Este fenómeno puede reducir la tasa de solubilidad y difusión de los NCs encapsulados en su interior, así como favorecer la permanencia en el entorno del nervio ciático.

5. Conclusiones

Los (POEGMA)NGs@HGNNPs/BPV inyectados cerca de la raíz del nervio ciático e irradiados con un láser NIR producen un bloqueo nervioso significativo, así como una reducción en los reflejos y una alteración del paso. La duración del efecto es de al menos 6 horas frente a las dos horas de la BPV libre, sin embargo, la intensidad del efecto es ligeramente menor.

El uso de dexametasona como coadyuvante en el tratamiento aumenta la duración e intensidad del efecto del tratamiento, permitiendo la reactivación a 24 h y 48h.

El ángulo de irradiación (90°, 45°), no produce diferencias significativas en el efecto del tratamiento.

La bupivacaína nanocristalizada en tamaños de entre 40 y 90 μm no proporciona diferencias significativas en la duración del efecto anestésico respecto a la bupivacaína libre.

Cuando los nanocristales de bupivacaína se encuentran encapsulados en el interior de nanogeles de P(MEO₂MA-co-OEGMA) se produce un efecto con una duración entre 1.5 y 2 veces superior a la proporcionada por la bupivacaína libre o por los mismos nanocristales de bupivacaína sin encapsular.

Capítulo VI: **Conclusiones generales**

1. Conclusiones generales

El principal objetivo del trabajo desarrollado en el transcurso de esta tesis doctoral ha consistido en el desarrollo de un sistema de liberación controlada para aplicación en el tratamiento del dolor. Del trabajo realizado y la experiencia adquirida se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Los copolímeros basados en oligo etilenglicol metiléter metacrilato (OEGMA), y más concretamente los copolímeros de MEO₂MA y OEGMA presentan una temperatura crítica de solubilidad inferior (LCST) que puede ser fácilmente ajustable dentro del rango biológico. Asimismo, muestran una transición de fase estrecha. Esto, unido a la baja citotoxicidad observada, lo convierte en un polímero termosensible adecuado para aplicaciones de liberación controlada de fármacos.
- La fotopolimerización radicalaria controlada se presenta como una alternativa viable a otros métodos basados en ATRP para la síntesis de P(MEO₂MA-co-OEGMA), al proporcionar un alto control de la polimerización. La baja concentración de catalizador requerido es una importante ventaja a la hora de producir copolímeros para aplicaciones biomédicas, mientras que la sencillez del proceso de síntesis en un paso, la disponibilidad

comercial de todos los reactivos, la baja sensibilidad al agua y oxígeno, la alta cinética de reacción y el sencillo proceso de purificación, pueden facilitar potencialmente su adaptación a procesos productivos industrializados.

- La fotopolimerización radicalaria controlada en miniemulsión inversa se ha mostrado como un método simple y eficiente en la producción de nanogeles de P(MEO₂MA-co-OEGMA). Permite obtener nanogeles termosensibles con un bajo índice de polidispersidad y un alto ratio de deshinchamiento tras la transición de fase.
- El uso de un iniciador disulfuro para ATRP y su posterior reducción a grupos tiol, permite el acoplamiento de nanopartículas de oro, obteniendo un material híbrido final con respuesta opto-mecánica. La disponibilidad comercial de diversos iniciadores funcionales para ATRP abre la puerta a la obtención de otras combinaciones de nanopartículas con el fin de obtener otro tipo de transducción.
- Los materiales híbridos compuestos por nanogeles de P(MEO₂MA-co-OEGMA) y HGNPs mostraron una alta biocompatibilidad y capacidad de carga. Además,

con el fármaco empleado (Bupivacaína), presentaron la capacidad de combinar dos tipos de liberación: una liberación basal por difusión y una liberación bajo demanda a través de un estímulo con luz NIR. Este doble perfil de liberación es especialmente interesante en el tratamiento del dolor crónico, ya que permite mantener una liberación sostenida para tratar el dolor basal y la posibilidad de liberar bajo demanda una mayor cantidad de fármaco durante los picos de dolor.

- El método de polimerización radicalaria por precipitación permite encapsular nanocristales de bupivacaína de pequeño tamaño en nanogeles de P(MEO₂MA-co-OEGMA).
- Debido a la reversibilidad de la transición de fase durante el enfriamiento, y a la ausencia de histéresis, los nanogeles de P(MEO₂MA-co-OEGMA) y HGNTs permiten múltiples activaciones y sus consiguientes liberaciones, lo que refuerza su potencial aplicación en sistemas de liberación controlada bajo demanda.
- El tratamiento con P(MEO₂MA-co-OEGMA) y HGNTs cargados con bupivacaína cerca del nervio ciático en un modelo de rata, y su subsiguiente

irradiación con láser NIR, producen una disminución de la función nerviosa sensitiva sin afectar a la función nerviosa motora. Su efecto es ligeramente menos intenso que el de la bupivacaína libre, pero más prolongado en el tiempo. El uso de dexametasona como coadyuvante en el tratamiento incrementa su intensidad y duración, al tiempo que permite al menos dos reactivaciones.

- El tratamiento con nanocristales de bupivacaína encapsulada en nanogeles de P(MEO₂MA-co-OEGMA) cerca del nervio ciático producen una disminución de la función nerviosa sensitiva sin afectar a la función nerviosa motora. Este efecto tiene una mayor duración en el tiempo en comparación con el tratamiento con bupivacaína libre o con bupivacaína nanocristalizada sin encapsular.

Anexo I: **Artículos científicos
publicados**

Prieto, M.; Arenal, R.; Henrard, L.; Gomez, L.; Sebastian, V.; Arruebo, M. Morphological Tunability of the Plasmonic Response: From Hollow Gold Nanoparticles to Gold Nanorings. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118* (49), 28804–28811. <https://doi.org/10.1021/jp5096129>.

Ortiz de Solorzano, I.; Prieto, M.; Mendoza, G.; Alejo, T.; Irusta, S.; Sebastian, V.; Arruebo, M. Microfluidic Synthesis and Biological Evaluation of Photothermal Biodegradable Copper Sulfide Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (33), 21545–21554. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b05727>.

Prieto, M.; Rwei, A. Y.; Alejo, T.; Wei, T.; Lopez-Franco, M. T.; Mendoza, G.; Sebastian, V.; Kohane, D. S.; Arruebo, M. Light-Emitting Photon-Upconversion Nanoparticles in the Generation of Transdermal Reactive-Oxygen Species. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (48), 41737–41747. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b14812>.

Martín-Saavedra, F.; Ruiz-Hernández, E.; Escudero-Duch, C.; Prieto, M.; Arruebo, M.; Sadeghi, N.; Deckers, R.; Storm, G.; Hennink, W. E.; Santamaría, J.; Vilaboa, N. Lipogels Responsive to Near-Infrared Light for the Triggered Release of Therapeutic Agents. *Acta Biomater.* **2017**, *61*, 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.08.010>.

Albisa, A.; Espanol, L.; Prieto, M.; Sebastian, V. Polymeric Nanomaterials as Nanomembrane Entities for Biomolecule and Drug Delivery. *Curr. Pharm. Des.* **2017**, *23* (2), 263–280.

Rubio-Ruiz, B.; Pérez-López, A. M.; Bray, T. L.; Lee, M.; Serrels, A.; Prieto, M.; Arruebo, M.; Carragher, N. O.; Sebastián, V.; Unciti-Broceta, A. High-Precision Photothermal Ablation Using Biocompatible Palladium Nanoparticles and Laser Scanning Microscopy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (4), 3341–3348. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b17282>.

Martín-Saavedra, F.; Escudero-Duch, C.; Prieto, M.; Sánchez-Casanova, S.; López, D.; Arruebo, M.; Voellmy, R.; Santamaría, J.; Vilaboa, N. Pro-Angiogenic near Infrared-Responsive Hydrogels for Deliberate Transgene Expression. *Acta Biomater.* **2018**, *78*, 123–136. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.08.006>.

Alejo, T.; Prieto, M.; García-Juan, H.; Andreu, V.; Mendoza, G.; Sebastián, V.; Arruebo, M. A Facile Method for the Controlled Polymerization of Biocompatible and Thermoresponsive Oligo(Ethylene Glycol) Methyl Ether Methacrylate Copolymers. *Polym. J.* **2018**, *50* (2), 203–211. <https://doi.org/10.1038/s41428-017-0004-8>.

Solorzano, I. O. de; Prieto, M.; Mendoza, G.; Sebastian, V.; Arruebo, M. Triggered Drug Release from Hybrid Thermoresponsive Nanoparticles Using near Infrared Light. *Nanomed.* **2019**. <https://doi.org/10.2217/nnm-2019-0270>.

Escudero-Duch, C.; Martín-Saavedra, F.; Prieto, M.; Sánchez-Casanova, S.; López, D.; Sebastian, V.; Arruebo, M.; Santamaria, J.; Vilaboa, N. Gold Nanoparticles for the in Situ Polymerization of Near-Infrared Responsive Hydrogels Based on Fibrin. *Acta Biomater.* **2019**. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.09.040>.

Herrero, C.; de la Fuente, A.; Casas-Arozamena, C.; Sebastian, V.; Prieto, M.; Arruebo, M.; Abalo, A.; Colás, E.; Moreno-Bueno, G.; Gil-Moreno, A.; Vilar, A.; Cueva, J.; Abal, M.; Muínelo-Romay, L. Extracellular Vesicles-Based Biomarkers Represent a Promising Liquid Biopsy in Endometrial Cancer. *Cancers* **2019**, *11* (12), 2000. <https://doi.org/10.3390/cancers11122000>.

Alejo, T.; Uson, L.; Landa, G.; Prieto, M.; Yus Argón, C.; Garcia-Salinas, S.; de Miguel, R.; Rodríguez-Largo, A.; Irusta, S.; Sebastian, V.; Mendoza, G.; Arruebo, M. Nanogels with High Loading of Anesthetic Nanocrystals for Extended Duration of Sciatic Nerve Block. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13* (15), 17220–17235. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c00894>.

Anexo II: **Bibliografía**

- (1) Hoffman, A. S. Hydrogels for Biomedical Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.010>.
- (2) Spicer, C. D. Hydrogel Scaffolds for Tissue Engineering: The Importance of Polymer Choice. *Polym. Chem.* **2020**, *11* (2), 184–219. <https://doi.org/10.1039/C9PY01021A>.
- (3) Vigata, M.; Meinert, C.; Hutmacher, D. W.; Bock, N. Hydrogels as Drug Delivery Systems: A Review of Current Characterization and Evaluation Techniques. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (12), 1188. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121188>.
- (4) Zha, L.; Banik, B.; Alexis, F. Stimulus Responsive Nanogels for Drug Delivery. *Soft Matter* **2011**, *7* (13), 5908–5916. <https://doi.org/10.1039/C0SM01307B>.
- (5) Sahu, P.; Kashaw, S. K.; Kushwah, V.; Sau, S.; Jain, S.; Iyer, A. K. PH Responsive Biodegradable Nanogels for Sustained Release of Bleomycin. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25* (17), 4595–4613. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.038>.
- (6) Salimi, F.; Dilmaghani, K. A.; Alizadeh, E.; Akbarzadeh, A.; Davaran, S. Enhancing Cisplatin Delivery to Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells Using Dual Sensitive Smart Nanocomposite. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* **2018**, *46* (5), 949–958. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1349777>.
- (7) Lou, S.; Gao, S.; Wang, W.; Zhang, M.; Zhang, J.; Wang, C.; Li, C.; Kong, D.; Zhao, Q. Galactose-Functionalized Multi-Responsive Nanogels for Hepatoma-Targeted Drug Delivery. *Nanoscale* **2015**, *7* (7), 3137–3146. <https://doi.org/10.1039/C4NR06714B>.
- (8) Curcio, M.; Diaz-Gomez, L.; Cirillo, G.; Concheiro, A.; Iemma, F.; Alvarez-Lorenzo, C. PH/Redox Dual-Sensitive Dextran

- Nanogels for Enhanced Intracellular Drug Delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV* **2017**, *117*, 324–332. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.05.002>.
- (9) Sang, G.; Bardajee, G. R.; Mirshokraie, A.; Didehban, K. A Thermo/PH/Magnetic-Responsive Nanogel Based on Sodium Alginate by Modifying Magnetic Graphene Oxide: Preparation, Characterization, and Drug Delivery. *Iran. Polym. J.* **2018**, *27* (3), 137–144. <https://doi.org/10.1007/s13726-017-0592-3>.
- (10) Dimde, M.; Neumann, F.; Reisbeck, F.; Ehrmann, S.; Cuellar-Camacho, J. L.; Steinhilber, D.; Ma, N.; Haag, R. Defined PH-Sensitive Nanogels as Gene Delivery Platform for SiRNA Mediated in Vitro Gene Silencing. *Biomater. Sci.* **2017**, *5* (11), 2328–2336. <https://doi.org/10.1039/C7BM00729A>.
- (11) Luckanagul, J. A.; Pitakchatwong, C.; Ratnatilaka Na Bhuket, P.; Muangnoi, C.; Rojsitthisak, P.; Chirachanchai, S.; Wang, Q.; Rojsitthisak, P. Chitosan-Based Polymer Hybrids for Thermo-Responsive Nanogel Delivery of Curcumin. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *181*, 1119–1127. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.027>.
- (12) Chang, R.; Tsai, W.-B. Fabrication of Photothermo-Responsive Drug-Loaded Nanogel for Synergetic Cancer Therapy. *Polymers* **2018**, *10* (10), 1098. <https://doi.org/10.3390/polym10101098>.
- (13) Rancan, F.; Volkmann, H.; Giulbudagian, M.; Schumacher, F.; Stanko, J. I.; Kleuser, B.; Blume-Peytavi, U.; Calderón, M.; Vogt, A. Dermal Delivery of the High-Molecular-Weight Drug Tacrolimus by Means of Polyglycerol-Based Nanogels. *Pharmaceutics* **2019**, *11* (8), 394. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11080394>.
- (14) Guo, Q.; Zhang, X. Synthesized of Glucose-Responsive Nanogels Labeled with Fluorescence Molecule Based on Phenylboronic Acid

- by RAFT Polymerization. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2019**, *30* (10), 815–831. <https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1603065>.
- (15) Pan, Y.; Liu, J.; Yang, K.; Cai, P.; Xiao, H. Novel Multi-Responsive and Sugarcane Bagasse Cellulose-Based Nanogels for Controllable Release of Doxorubicin Hydrochloride. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2021**, *118*, 111357. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111357>.
- (16) Tian, Y.; Tian, R.; Chen, L.; Jin, R.; Feng, Y.; Bai, Y.; Chen, X. Redox-Responsive Nanogel with Intracellular Reconstruction and Programmable Drug Release for Targeted Tumor Therapy. *Macromol. Rapid Commun.* **2019**, *40* (8), e1800824. <https://doi.org/10.1002/marc.201800824>.
- (17) Hosseinifar, T.; Sheybani, S.; Abdouss, M.; Hassani Najafabadi, S. A.; Shafiee Ardestani, M. Pressure Responsive Nanogel Base on Alginate–Cyclodextrin with Enhanced Apoptosis Mechanism for Colon Cancer Delivery. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2018**, *106* (2), 349–359. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36242>.
- (18) Seuring, J.; Agarwal, S. Polymers with Upper Critical Solution Temperature in Aqueous Solution. *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *33* (22), 1898–1920. <https://doi.org/10.1002/marc.201200433>.
- (19) Arotçaréna, M.; Heise, B.; Ishaya, S.; Laschewsky, A. Switching the inside and the Outside of Aggregates of Water-Soluble Block Copolymers with Double Thermoresponsivity. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (14), 3787–3793. <https://doi.org/10.1021/ja012167d>.
- (20) Saha, P.; Ganguly, R.; Li, X.; Das, R.; Singha, N. K.; Pich, A. Zwitterionic Nanogels and Microgels: An Overview on Their Synthesis and Applications. *Macromol. Rapid Commun.* **2021**, *42* (13), 2100112. <https://doi.org/10.1002/marc.202100112>.

- (21) Frazar, E. M.; Shah, R. A.; Dziubla, T. D.; Hilt, J. Z. Multifunctional Temperature-Responsive Polymers as Advanced Biomaterials and Beyond. *J. Appl. Polym. Sci.* **2020**, *137* (25), 48770. <https://doi.org/10.1002/app.48770>.
- (22) Lutz, J.-F.; Akdemir, Ö.; Hoth, A. Point by Point Comparison of Two Thermosensitive Polymers Exhibiting a Similar LCST: Is the Age of Poly(NIPAM) Over? *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (40), 13046–13047. <https://doi.org/10.1021/ja065324n>.
- (23) Wadajkar, A. S.; Koppolu, B.; Rahimi, M.; Nguyen, K. T. Cytotoxic Evaluation of N-Isopropylacrylamide Monomers and Temperature-Sensitive Poly(N-Isopropylacrylamide) Nanoparticles. *J. Nanoparticle Res.* **2009**, *11* (6), 1375–1382. <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9526-5>.
- (24) Cooperstein, M. A.; Canavan, H. E. Assessment of Cytotoxicity of (N-Isopropyl Acrylamide) and Poly(N-Isopropyl Acrylamide)-Coated Surfaces. *Biointerphases* **2013**, *8* (1), 19. <https://doi.org/10.1186/1559-4106-8-19>.
- (25) Yogev, S.; Shabtay-Orbach, A.; Nyska, A.; Mizrahi, B. Local Toxicity of Topically Administrated Thermoresponsive Systems: In Vitro Studies with In Vivo Correlation. *Toxicol. Pathol.* **2019**, *47* (3), 426–432. <https://doi.org/10.1177/0192623318810199>.
- (26) Lutz, J.-F.; Andrieu, J.; Üzgün, S.; Rudolph, C.; Agarwal, S. Biocompatible, Thermoresponsive, and Biodegradable: Simple Preparation of “All-in-One” Biorelevant Polymers. *Macromolecules* **2007**, *40* (24), 8540–8543. <https://doi.org/10.1021/ma7021474>.
- (27) Kaur, P.; Aliru, M. L.; Chadha, A. S.; Asea, A.; Krishnan, S. Hyperthermia Using Nanoparticles – Promises and Pitfalls. *Int. J. Hyperthermia* **2016**, *32* (1), 76–88. <https://doi.org/10.3109/02656736.2015.1120889>.

- (28) Amendola, V.; Pilot, R.; Frascioni, M.; Maragò, O. M.; Iatì, M. A. Surface Plasmon Resonance in Gold Nanoparticles: A Review. *J. Phys. Condens. Matter* **2017**, *29* (20), 203002. <https://doi.org/10.1088/1361-648X/aa60f3>.
- (29) Kang, H.; Trondoli, A. C.; Zhu, G.; Chen, Y.; Chang, Y.-J.; Liu, H.; Huang, Y.-F.; Zhang, X.; Tan, W. Near-Infrared Light-Responsive Core-Shell Nanogels for Targeted Drug Delivery. *ACS Nano* **2011**, *5* (6), 5094–5099. <https://doi.org/10.1021/nn201171r>.
- (30) Zhang, Z.; Wang, J.; Nie, X.; Wen, T.; Ji, Y.; Wu, X.; Zhao, Y.; Chen, C. Near Infrared Laser-Induced Targeted Cancer Therapy Using Thermoresponsive Polymer Encapsulated Gold Nanorods. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (20), 7317–7326. <https://doi.org/10.1021/ja412735p>.
- (31) Kawano, T.; Niidome, Y.; Mori, T.; Katayama, Y.; Niidome, T. PNIPAM Gel-Coated Gold Nanorods for Targeted Delivery Responding to a near-Infrared Laser. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20* (2), 209–212. <https://doi.org/10.1021/bc800480k>.
- (32) Dennis, C. L.; Ivkov, R. Physics of Heat Generation Using Magnetic Nanoparticles for Hyperthermia. *Int. J. Hyperthermia* **2013**, *29* (8), 715–729. <https://doi.org/10.3109/02656736.2013.836758>.
- (33) Somayeh Ghavami; Bardajee, G. R.; Mirshokraie, A.; Didehban, K. A Novel PH, Thermo, and Magnetic Responsive Hydrogel Nanocomposite Containing Nanogel for Anticancer Drug Delivery. *Polym. Sci. Ser. B* **2019**, *61* (3), 376–386. <https://doi.org/10.1134/S1560090419030047>.
- (34) Hayati, M.; Rezanejade Bardajee, G.; Ramezani, M.; Mizani, F. Temperature/PH/Magnetic Triple Sensitive Nanogel for Doxorubicin Anticancer Drug Delivery. *Inorg. Nano-Met. Chem.*

- 2020, 50 (11), 1189–1200.
<https://doi.org/10.1080/24701556.2020.1737821>.
- (35) Wang, H.; Yi, J.; Mukherjee, S.; Banerjee, P.; Zhou, S. Magnetic/NIR-Thermally Responsive Hybrid Nanogels for Optical Temperature Sensing, Tumor Cell Imaging and Triggered Drug Release. *Nanoscale* **2014**, *6* (21), 13001–13011. <https://doi.org/10.1039/C4NR03748K>.
- (36) Cazares-Cortes, E.; Espinosa, A.; Guigner, J.-M.; Michel, A.; Griffete, N.; Wilhelm, C.; Ménager, C. Doxorubicin Intracellular Remote Release from Biocompatible Oligo(Ethylene Glycol) Methyl Ether Methacrylate-Based Magnetic Nanogels Triggered by Magnetic Hyperthermia. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (31), 25775–25788. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b06553>.
- (37) Classification of Chronic Pain, Second Edition (Revised). *International Association for the Study of Pain (IASP)*.
- (38) Coghill, R. C. Individual Differences in the Subjective Experience of Pain: New Insights Into Mechanisms and Models. *Headache J. Head Face Pain* **2010**, *50* (9), 1531–1535. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4610.2010.01763.x>.
- (39) Woolf, C. J. What Is This Thing Called Pain? *J. Clin. Invest.* **2010**, *120* (11), 3742–3744. <https://doi.org/10.1172/JCI45178>.
- (40) Linley, J. E.; Rose, K.; Ooi, L.; Gamper, N. Understanding Inflammatory Pain: Ion Channels Contributing to Acute and Chronic Nociception. *Pflugers Arch.* **2010**, *459* (5), 657–669. <https://doi.org/10.1007/s00424-010-0784-6>.
- (41) Treede, R.-D.; Jensen, T. S.; Campbell, J. N.; Cruccu, G.; Dostrovsky, J. O.; Griffin, J. W.; Hansson, P.; Hughes, R.; Nurmikko, T.; Serra, J. Neuropathic Pain: Redefinition and a Grading System for Clinical and Research Purposes. *Neurology*

- 2008, 70 (18), 1630–1635.
<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000282763.29778.59>.
- (42) Tsang, A.; Von Korff, M.; Lee, S.; Alonso, J.; Karam, E.; Angermeyer, M. C.; Borges, G. L. G.; Bromet, E. J.; Demyttenaere, K.; de Girolamo, G.; de Graaf, R.; Gureje, O.; Lepine, J.-P.; Haro, J. M.; Levinson, D.; Oakley Browne, M. A.; Posada-Villa, J.; Seedat, S.; Watanabe, M. Common Chronic Pain Conditions in Developed and Developing Countries: Gender and Age Differences and Comorbidity with Depression-Anxiety Disorders. *J. Pain* **2008**, *9* (10), 883–891.
<https://doi.org/10.1016/j.jpain.2008.05.005>.
- (43) Johannes, C. B.; Le, T. K.; Zhou, X.; Johnston, J. A.; Dworkin, R. H. The Prevalence of Chronic Pain in United States Adults: Results of an Internet-Based Survey. *J. Pain* **2010**, *11* (11), 1230–1239.
<https://doi.org/10.1016/j.jpain.2010.07.002>.
- (44) Fillingim, R. B. Sex-Related Influences on Pain: A Review of Mechanisms and Clinical Implications. *Rehabil. Psychol.* **2003**, *48* (3), 165–174. <https://doi.org/10.1037/0090-5550.48.3.165>.
- (45) Holly Hedegaard, M.D., Margaret Warner, Ph.D., and Arialdi M. Miniño, M.P.H. *Drug Overdose Deaths in the United States, 1999–2016*; NCHS Data Brief 254; 2017.
- (46) Seth, P.; Rudd, R. A.; Noonan, R. K.; Haegerich, T. M. Quantifying the Epidemic of Prescription Opioid Overdose Deaths. *Am. J. Public Health* **2018**, *108* (4), 500–502.
<https://doi.org/10.2105/AJPH.2017.304265>.
- (47) Rummans, T. A.; Burton, M. C.; Dawson, N. L. How Good Intentions Contributed to Bad Outcomes: The Opioid Crisis. *Mayo Clin. Proc.* **2018**, *93* (3), 344–350.
<https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2017.12.020>.

- (48) Brown, G. K. A Causal Analysis of Chronic Pain and Depression. *J. Abnorm. Psychol.* **1990**, *99* (2), 127–137. <https://doi.org/10.1037/0021-843X.99.2.127>.
- (49) Dworkin, R. H.; Gitlin, M. J. Clinical Aspects of Depression in Chronic Pain Patients. *Clin. J. Pain* **1991**, *7* (2), 79–94. <https://doi.org/10.1097/00002508-199106000-00004>.
- (50) Social Interaction in Major Depressive Disorder, Social Phobia, and Controls: the Importance of Affect | SpringerLink <https://link.springer.com/article/10.1007/s41347-019-00121-x> (accessed 2022 -01 -02).
- (51) Bevan, Stephen; Quadrello, Tatiana; McGee, Robin. *Reducing Temporary Work Absence through Early Intervention: The Case of MSDs in the EU*; The Work Foundation, 2013.
- (52) Gaskin, D. J.; Richard, P. The Economic Costs of Pain in the United States. *J. Pain* **2012**, *13* (8), 715–724. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2012.03.009>.
- (53) Raftery, M. N.; Ryan, P.; Normand, C.; Murphy, A. W.; de la Harpe, D.; McGuire, B. E. The Economic Cost of Chronic Noncancer Pain in Ireland: Results from the PRIME Study, Part 2. *J. Pain* **2012**, *13* (2), 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2011.10.004>.
- (54) van Zundert, J.; van Kleef, M. Low Back Pain: From Algorithm to Cost-Effectiveness? *Pain Pract. Off. J. World Inst. Pain* **2005**, *5* (3), 179–189. <https://doi.org/10.1111/j.1533-2500.2005.05303.x>.
- (55) Ekman, M.; Johnell, O.; Lidgren, L. The Economic Cost of Low Back Pain in Sweden in 2001. *Acta Orthop.* **2005**, *76* (2), 275–284. <https://doi.org/10.1080/00016470510030698>.
- (56) Wenig, C. M.; Schmidt, C. O.; Kohlmann, T.; Schweikert, B. Costs of Back Pain in Germany. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* **2009**, *13* (3), 280–286. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2008.04.005>.

- (57) Lynch, M. E.; Watson, C. P. N. The Pharmacotherapy of Chronic Pain: A Review. *Pain Res. Manag. J. Can. Pain Soc.* **2006**, *11* (1), 11–38.
- (58) Turk, D. C.; Wilson, H. D.; Cahana, A. Treatment of Chronic Non-Cancer Pain. *Lancet Lond. Engl.* **2011**, *377* (9784), 2226–2235. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60402-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60402-9).
- (59) Turk, D. C. Clinical Effectiveness and Cost-Effectiveness of Treatments for Patients with Chronic Pain. *Clin. J. Pain* **2002**, *18* (6), 355–365. <https://doi.org/10.1097/00002508-200211000-00003>.
- (60) Trelle, S.; Reichenbach, S.; Wandel, S.; Hildebrand, P.; Tschannen, B.; Villiger, P. M.; Egger, M.; Jüni, P. Cardiovascular Safety of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: Network Meta-Analysis. *BMJ* **2011**, *342*, c7086. <https://doi.org/10.1136/bmj.c7086>.
- (61) Huscher, D.; Thiele, K.; Gromnica-Ihle, E.; Hein, G.; Demary, W.; Dreher, R.; Zink, A.; Buttgereit, F. Dose-Related Patterns of Glucocorticoid-Induced Side Effects. *Ann. Rheum. Dis.* **2009**, *68* (7), 1119–1124. <https://doi.org/10.1136/ard.2008.092163>.
- (62) Beiranvand, S.; Eatemadi, A.; Karimi, A. New Updates Pertaining to Drug Delivery of Local Anesthetics in Particular Bupivacaine Using Lipid Nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* **2016**, *11* (1), 307. <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1520-8>.
- (63) Papaleontiou, M.; Henderson, C. R.; Turner, B. J.; Moore, A. A.; Olkhovskaya, Y.; Amanfo, L.; Reid, M. C. Outcomes Associated with Opioid Use in the Treatment of Chronic Non-Cancer Pain Among Older Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Am. Geriatr. Soc.* **2010**, *58* (7), 1353–1369. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2010.02920.x>.

- (64) Rogers, E.; Mehta, S.; Shengelia, R.; Reid, M. C. Four Strategies for Managing Opioid-Induced Side Effects in Older Adults. *Clin. Geriatr.* **2013**, *21* (4), <http://www.consultant360.com/articles/four-strategies-managing-opioid-induced-side-effects-older-adults>.
- (65) Shah, S.; Dhawan, V.; Holm, R.; Nagarsenker, M. S.; Perrie, Y. Liposomes: Advancements and Innovation in the Manufacturing Process. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2020**, *154–155*, 102–122. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.002>.
- (66) Cereda, C. M. S.; Brunetto, G. B.; de Araújo, D. R.; de Paula, E. Liposomal Formulations of Prilocaine, Lidocaine and Mepivacaine Prolong Analgesic Duration. *Can. J. Anaesth. J. Can. Anesth.* **2006**, *53* (11), 1092–1097.
- (67) Cereda, C. M. S.; de Araujo, D. R.; Brunetto, G. B.; De Paula, E. Liposomal Prilocaine: Preparation, Characterization, and in Vivo Evaluation. *J. Pharm. Pharm. Sci. Publ. Can. Soc. Pharm. Sci. Soc. Can. Sci. Pharm.* **2004**, *7* (2), 235–240.
- (68) Douroumis, D.; Fahr, A. Stable Carbamazepine Colloidal Systems Using the Cosolvent Technique. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2007**, *30* (5), 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2006.12.003>.
- (69) de Araujo, D. R.; Cereda, C. M. S.; Brunetto, G. B.; Vomero, V. U.; Pierucci, A.; Neto, H. S.; de Oliveira, A. L. R.; Fraceto, L. F.; Braga, A. de F. de A.; de Paula, E. Pharmacological and Local Toxicity Studies of a Liposomal Formulation for the Novel Local Anaesthetic Ropivacaine. *J. Pharm. Pharmacol.* **2008**, *60* (11), 1449–1457. <https://doi.org/10.1211/jpp.60.11.0005>.
- (70) Tofoli, G. R.; Cereda, C. M. S.; Groppo, F. C.; Volpato, M. C.; Franz-Montan, M.; Ranali, J.; de Araújo, D. R.; de Paula, E. Efficacy of Liposome-Encapsulated Mepivacaine for Infiltrative Anesthesia in Volunteers. *J. Liposome Res.* **2011**, *21* (1), 88–94. <https://doi.org/10.3109/08982104.2010.483596>.

- (71) Goh, J. Z.; Tang, S. N.; Chiong, H. S.; Yong, Y. K.; Zuraini, A.; Hakim, M. N. Evaluation of Antinociceptive Activity of Nanoliposome-Encapsulated and Free-Form Diclofenac in Rats and Mice. *Int. J. Nanomedicine* **2014**, *10*, 297–303. <https://doi.org/10.2147/IJN.S75545>.
- (72) Elron-Gross, I.; Glucksam, Y.; Melikhov, D.; Margalit, R. Cyclooxygenase Inhibition by Diclofenac Formulated in Bioadhesive Carriers. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2008**, *1778* (4), 931–936. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.01.002>.
- (73) Elron-Gross, I.; Glucksam, Y.; Margalit, R. Liposomal Dexamethasone–Diclofenac Combinations for Local Osteoarthritis Treatment. *Int. J. Pharm.* **2009**, *376* (1), 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.04.025>.
- (74) Krugner-Higby, L.; Smith, L.; Clark, M.; Heath, T. D.; Dahly, E.; Schiffman, B.; Hubbard-VanStelle, S.; Ney, D.; Wendland, A. Liposome-Encapsulated Oxymorphone Hydrochloride Provides Prolonged Relief of Postsurgical Visceral Pain in Rats. *Comp. Med.* **2003**, *53* (3), 270–279.
- (75) Smith, L. J.; Valenzuela, J. R.; Krugner-Higby, L. A.; Brown, C.; Heath, T. D. A Single Dose of Liposome-Encapsulated Hydromorphone Provides Extended Analgesia in a Rat Model of Neuropathic Pain. *Comp. Med.* **2006**, *56* (6), 487–492.
- (76) Rwei, A. Y.; Lee, J.-J.; Zhan, C.; Liu, Q.; Ok, M. T.; Shankarappa, S. A.; Langer, R.; Kohane, D. S. Repeatable and Adjustable On-Demand Sciatic Nerve Block with Phototriggerable Liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112* (51), 15719–15724. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518791112>.
- (77) Zhan, C.; Wang, W.; Santamaria, C.; Wang, B.; Rwei, A.; Timko, B. P.; Kohane, D. S. Ultrasensitive Phototriggered Local

- Anesthesia. *Nano Lett.* **2017**, *17* (2), 660–665. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.6b03588>.
- (78) Zhai, Y.; Xu, R.; Wang, Y.; Liu, J.; Wang, Z.; Zhai, G. Ethosomes for Skin Delivery of Ropivacaine: Preparation, Characterization and Ex Vivo Penetration Properties. *J. Liposome Res.* **2015**, *25* (4), 316–324. <https://doi.org/10.3109/08982104.2014.999686>.
- (79) Zhu, X.; Li, F.; Peng, X.; Zeng, K. Formulation and Evaluation of Lidocaine Base Ethosomes for Transdermal Delivery. *Anesth. Analg.* **2013**, *117* (2), 352–357. <https://doi.org/10.1213/ANE.0b013e3182937b74>.
- (80) Chourasia, M. K.; Kang, L.; Chan, S. Y. Nanosized Ethosomes Bearing Ketoprofen for Improved Transdermal Delivery. *Results Pharma Sci.* **2011**, *1* (1), 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.rinphs.2011.10.002>.
- (81) Babaie, S.; Ghanbarzadeh, S.; Davaran, S.; Kouhsoltani, M.; Hamishehkar, H. Nanoethosomes for Dermal Delivery of Lidocaine. *Adv. Pharm. Bull.* **2015**, *5* (4), 549–556. <https://doi.org/10.15171/apb.2015.074>.
- (82) Maestrelli, F.; Capasso, G.; González-Rodríguez, M. L.; Rabasco, A. M.; Ghelardini, C.; Mura, P. Effect of Preparation Technique on the Properties and in Vivo Efficacy of Benzocaine-Loaded Ethosomes. *J. Liposome Res.* **2009**, *19* (4), 253–260. <https://doi.org/10.3109/08982100902788408>.
- (83) Ghanbarzadeh, S.; Arami, S. Enhanced Transdermal Delivery of Diclofenac Sodium via Conventional Liposomes, Ethosomes, and Transfersomes. *BioMed Res. Int.* **2013**, *2013*, e616810. <https://doi.org/10.1155/2013/616810>.
- (84) Sharma, G.; Goyal, H.; Thakur, K.; Raza, K.; Katare, O. Novel Elastic Membrane Vesicles (EMVs) and Ethosomes-Mediated Effective Topical Delivery of Aceclofenac: A New Therapeutic

- Approach for Pain and Inflammation. *Drug Deliv.* **2016**, *23* (8), 3135–3145. <https://doi.org/10.3109/10717544.2016.1155244>.
- (85) Barupal, A. K.; Gupta, V.; Ramteke, S. Preparation and Characterization of Ethosomes for Topical Delivery of Aceclofenac. *Indian J. Pharm. Sci.* **2010**, *72* (5), 582–586. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.78524>.
- (86) Ahad, A.; Raish, M.; Al-Mohizea, A. M.; Al-Jenoobi, F. I.; Alam, M. A. Enhanced Anti-Inflammatory Activity of Carbopol Loaded Meloxicam Nanoethosomes Gel. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *67*, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.03.011>.
- (87) Pathak, P.; Nagarsenker, M. Formulation and Evaluation of Lidocaine Lipid Nanosystems for Dermal Delivery. *AAPS PharmSciTech* **2009**, *10* (3), 985. <https://doi.org/10.1208/s12249-009-9287-1>.
- (88) Kaur, A.; Goindi, S.; Katare, O. P. Formulation, Characterisation and in Vivo Evaluation of Lipid-Based Nanocarrier for Topical Delivery of Diflunisal. *J. Microencapsul.* **2016**, *33* (5), 475–486. <https://doi.org/10.1080/02652048.2016.1216189>.
- (89) Küchler, S.; Wolf, N. B.; Heilmann, S.; Weindl, G.; Helfmann, J.; Yahya, M. M.; Stein, C.; Schäfer-Korting, M. 3D-Wound Healing Model: Influence of Morphine and Solid Lipid Nanoparticles. *J. Biotechnol.* **2010**, *148* (1), 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.01.001>.
- (90) Leng, F.; Wan, J.; Liu, W.; Tao, B.; Chen, X. Prolongation of Epidural Analgesia Using Solid Lipid Nanoparticles as Drug Carrier for Lidocaine. *Reg. Anesth. Pain Med.* **2012**, *37* (2), 159–165. <https://doi.org/10.1097/AAP.0b013e31823fc058>.
- (91) Basha, M.; Abd El-Alim, S. H.; Kassem, A. A.; El Awdan, S.; Awad, G. Benzocaine Loaded Solid Lipid Nanoparticles: Formulation Design, in Vitro and in Vivo Evaluation of Local

- Anesthetic Effect. *Curr. Drug Deliv.* **2015**, *12* (6), 680–692. <https://doi.org/10.2174/1567201812666150703115126>.
- (92) Balguri, S. P.; Adelli, G. R.; Majumdar, S. Topical Ophthalmic Lipid Nanoparticle Formulations (SLN, NLC) of Indomethacin for Delivery to the Posterior Segment Ocular Tissues. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV* **2016**, *109*, 224–235. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.10.015>.
- (93) Akbari, J.; Saeedi, M.; Morteza-Semnani, K.; Rostamkalaei, S. S.; Asadi, M.; Asare-Addo, K.; Nokhodchi, A. The Design of Naproxen Solid Lipid Nanoparticles to Target Skin Layers. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2016**, *145*, 626–633. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.064>.
- (94) Thakkar, H.; Kumar Sharma, R.; Murthy, R. S. R. Enhanced Retention of Celecoxib-Loaded Solid Lipid Nanoparticles after Intra-Articular Administration. *Drugs RD* **2007**, *8* (5), 275–285. <https://doi.org/10.2165/00126839-200708050-00002>.
- (95) Moraes, C. M.; de Matos, A. P.; de Lima, R.; Rosa, A. H.; de Paula, E.; Fraceto, L. F. Initial Development and Characterization of PLGA Nanospheres Containing Ropivacaine. *J. Biol. Phys.* **2008**, *33* (5), 455. <https://doi.org/10.1007/s10867-008-9094-z>.
- (96) Morales Moraes, C.; Prado de Matos, A.; Paula, E. de; Rosa, A. H.; Fernandes Fraceto, L. Benzocaine Loaded Biodegradable Poly-(D,L-Lactide-Co-Glycolide) Nanocapsules: Factorial Design and Characterization. *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.* **2009**, *165* (3), 243–246.
- (97) Moraes, C. M.; Paula, E. de; Rosa, A. H.; Fraceto, L. F. Physicochemical Stability of Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanocapsules Containing the Local Anesthetic Bupivacaine. *J.*

- Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 995–1000.
<https://doi.org/10.1590/S0103-50532010000600008>.
- (98) Campos, E. V. R.; Melo, N. F. S. de; Guilherme, V. A.; Paula, E. de; Rosa, A. H.; Araújo, D. R. de; Fraceto, L. F. Preparation and Characterization of Poly(ϵ -Caprolactone) Nanospheres Containing the Local Anesthetic Lidocaine. *J. Pharm. Sci.* **2013**, *102* (1), 215–226. <https://doi.org/10.1002/jps.23350>.
- (99) De Melo, N. F. S.; De Araújo, D. R.; Grillo, R.; Moraes, C. M.; De Matos, A. P.; de Paula, E.; Rosa, A. H.; Fraceto, L. F. Benzocaine-Loaded Polymeric Nanocapsules: Study of the Anesthetic Activities. *J. Pharm. Sci.* **2012**, *101* (3), 1157–1165. <https://doi.org/10.1002/jps.22829>.
- (100) de Melo, N. F. S.; Grillo, R.; Guilherme, V. A.; de Araujo, D. R.; de Paula, E.; Rosa, A. H.; Fraceto, L. F. Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanocapsules Containing Benzocaine: Influence of the Composition of the Oily Nucleus on Physico-Chemical Properties and Anesthetic Activity. *Pharm. Res.* **2011**, *28* (8), 1984–1994. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0425-6>.
- (101) Grillo, R.; de Melo, N. F. S.; de Araújo, D. R.; de Paula, E.; Rosa, A. H.; Fraceto, L. F. Polymeric Alginate Nanoparticles Containing the Local Anesthetic Bupivacaine. *J. Drug Target.* **2010**, *18* (9), 688–699. <https://doi.org/10.3109/10611861003649738>.
- (102) Kim, S. R.; Ho, M. J.; Kim, S. H.; Cho, H. R.; Kim, H. S.; Choi, Y. S.; Choi, Y. W.; Kang, M. J. Increased Localized Delivery of Piroxicam by Cationic Nanoparticles after Intra-Articular Injection. *Drug Des. Devel. Ther.* **2016**, *10*, 3779–3787. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S118145>.
- (103) Cetin, M.; Atila, A.; Kadioglu, Y. Formulation and in Vitro Characterization of Eudragit® L100 and Eudragit® L100-PLGA Nanoparticles Containing Diclofenac Sodium. *AAPS PharmSciTech*

- 2010**, *11* (3), 1250–1256. <https://doi.org/10.1208/s12249-010-9489-6>.
- (104) Asasutjarit, R.; Theerachayanan, T.; Kewsuwan, P.; Veeranodha, S.; Fuongfuchat, A.; Ritthidej, G. C. Development and Evaluation of Diclofenac Sodium Loaded-N-Trimethyl Chitosan Nanoparticles for Ophthalmic Use. *AAPS PharmSciTech* **2015**, *16* (5), 1013–1024. <https://doi.org/10.1208/s12249-015-0290-4>.
- (105) Ibrahim, M. M.; Abd-Elgawad, A.-E. H.; Soliman, O. A.-E.; Jablonski, M. M. Nanoparticle-Based Topical Ophthalmic Formulations for Sustained Celecoxib Release. *J. Pharm. Sci.* **2013**, *102* (3), 1036–1053. <https://doi.org/10.1002/jps.23417>.
- (106) Lee, B. K.; Yun, Y. H.; Park, K. Smart Nanoparticles for Drug Delivery: Boundaries and Opportunities. *Chem. Eng. Sci.* **2015**, *125*, 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2014.06.042>.
- (107) Constantin, M.; Bucătariu, S.; Stoica, I.; Fundueanu, G. Smart Nanoparticles Based on Pullulan-g-Poly(N-Isopropylacrylamide) for Controlled Delivery of Indomethacin. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *94*, 698–708. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.064>.
- (108) Samanta, D.; Meiser, J. L.; Zare, R. N. Polypyrrole Nanoparticles for Tunable, PH-Sensitive and Sustained Drug Release. *Nanoscale* **2015**, *7* (21), 9497–9504. <https://doi.org/10.1039/C5NR02196K>.
- (109) O'Donnell, A.; Moollan, A.; Baneham, S.; Ozgul, M.; Pabari, R. M.; Cox, D.; Kirby, B. P.; Ramtoola, Z. Intranasal and Intravenous Administration of Octa-Arginine Modified Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Nanoparticles Facilitates Central Nervous System Delivery of Loperamide. *J. Pharm. Pharmacol.* **2015**, *67* (4), 525–536. <https://doi.org/10.1111/jphp.12347>.
- (110) Fornaguera, C.; Dols-Perez, A.; Calderó, G.; García-Celma, M. J.; Camarasa, J.; Solans, C. PLGA Nanoparticles Prepared by Nano-

- Emulsion Templating Using Low-Energy Methods as Efficient Nanocarriers for Drug Delivery across the Blood-Brain Barrier. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2015**, *211*, 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.06.002>.
- (111) Lalani, J.; Raichandani, Y.; Mathur, R.; Lalan, M.; Chutani, K.; Mishra, A. K.; Misra, A. Comparative Receptor Based Brain Delivery of Tramadol-Loaded Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Nanoparticles. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2012**, *8* (6), 918–927. <https://doi.org/10.1166/jbn.2012.1462>.
- (112) Abioye, A. O.; Issah, S.; Kola-Mustapha, A. T. Ex Vivo Skin Permeation and Retention Studies on Chitosan–Ibuprofen–Gellan Ternary Nanogel Prepared by in Situ Ionic Gelation Technique— a Tool for Controlled Transdermal Delivery of Ibuprofen. *Int. J. Pharm.* **2015**, *490* (1), 112–130. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.05.030>.
- (113) Abrego, G.; Alvarado, H. L.; Egea, M. A.; Gonzalez-Mira, E.; Calpena, A. C.; Garcia, M. L. Design of Nanosuspensions and Freeze-Dried PLGA Nanoparticles as a Novel Approach for Ophthalmic Delivery of Pranoprofen. *J. Pharm. Sci.* **2014**, *103* (10), 3153–3164. <https://doi.org/10.1002/jps.24101>.
- (114) Neamtu, I.; Rusu, A. G.; Diaconu, A.; Nita, L. E.; Chiriac, A. P. Basic Concepts and Recent Advances in Nanogels as Carriers for Medical Applications. *Drug Deliv.* **2017**, *24* (1), 539–557. <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1276232>.
- (115) Hoare, T.; Sivakumaran, D.; Stefanescu, C. F.; Lawlor, M. W.; Kohane, D. S. Nanogel Scavengers for Drugs: Local Anesthetic Uptake by Thermoresponsive Nanogels. *Acta Biomater.* **2012**, *8* (4), 1450–1458. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.12.028>.
- (116) Scherlund, M.; Brodin, A.; Malmsten, M. Micellization and Gelation in Block Copolymer Systems Containing Local

- Anesthetics. *Int. J. Pharm.* **2000**, *211* (1–2), 37–49. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(00\)00589-5](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(00)00589-5).
- (117) Sharma, G.; Kamboj, S.; Thakur, K.; Negi, P.; Raza, K.; Katare, O. P. Delivery of Thermoresponsive-Tailored Mixed Micellar Nanogel of Lidocaine and Prilocaine with Improved Dermatokinetic Profile and Therapeutic Efficacy in Topical Anaesthesia. *AAPS PharmSciTech* **2017**, *18* (3), 790–802. <https://doi.org/10.1208/s12249-016-0561-8>.
- (118) Akkari, A. C. S.; Papini, J. Z. B.; Garcia, G. K.; Franco, M. K. K. D.; Cavalcanti, L. P.; Gasperini, A.; Alkschbirs, M. I.; Yokaichyia, F.; de Paula, E.; Tófoli, G. R.; de Araujo, D. R. Poloxamer 407/188 Binary Thermosensitive Hydrogels as Delivery Systems for Infiltrative Local Anesthesia: Physico-Chemical Characterization and Pharmacological Evaluation. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *68*, 299–307. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.088>.
- (119) Ss, K.; Nn, I.; Ym, C.; Sm, S.; Lc, B.; Vk, M. Mixed Micelle Formation with Hydrophobic and Hydrophilic Pluronic Block Copolymers: Implications for Controlled and Targeted Drug Delivery. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2011**, *88* (2). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.08.002>.
- (120) La, S. B.; Okano, T.; Kataoka, K. Preparation and Characterization of the Micelle-Forming Polymeric Drug Indomethacin-Incorporated Polyfethylene Oxide)-Poly(β -Benzyl L-Aspartate) Block Copolymer Micelles. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85* (1), 85–90. <https://doi.org/10.1021/js950204r>.
- (121) Wu, C.; Ma, R.; He, H.; Zhao, L.; Gao, H.; An, Y.; Shi, L. Fabrication of Complex Micelles with Tunable Shell for Application in Controlled Drug Release. *Macromol. Biosci.* **2009**, *9* (12), 1185–1193. <https://doi.org/10.1002/mabi.200900232>.

- (122) Abd-Elrahman, A. A.; El Nabarawi, M. A.; Hassan, D. H.; Taha, A. A. Ketoprofen Mesoporous Silica Nanoparticles SBA-15 Hard Gelatin Capsules: Preparation and in Vitro/in Vivo Characterization. *Drug Deliv.* **2016**, *23* (9), 3387–3398. <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1186251>.
- (123) Ambrogi, V.; Perioli, L.; Marmottini, F.; Giovagnoli, S.; Esposito, M.; Rossi, C. Improvement of Dissolution Rate of Piroxicam by Inclusion into MCM-41 Mesoporous Silicate. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* **2007**, *32* (3), 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2007.07.005>.
- (124) Lang, Y.; Finn, D. P.; Pandit, A.; Walsh, P. J. Pharmacological Activity of Ibuprofen Released from Mesoporous Silica. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2012**, *23* (1), 73–80. <https://doi.org/10.1007/s10856-011-4488-z>.
- (125) Van Speybroeck, M.; Barillaro, V.; Thi, T. D.; Mellaerts, R.; Martens, J.; Van Humbeeck, J.; Vermant, J.; Annaert, P.; Van den Mooter, G.; Augustijns, P. Ordered Mesoporous Silica Material SBA-15: A Broad-Spectrum Formulation Platform for Poorly Soluble Drugs. *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98* (8), 2648–2658. <https://doi.org/10.1002/jps.21638>.
- (126) Speybroeck, M. van; Mellaerts, R.; Thi, T. D.; Martens, J. A.; Humbeeck, J. V.; Annaert, P.; Mooter, G. V. den; Augustijns, P. Preventing Release in the Acidic Environment of the Stomach via Occlusion in Ordered Mesoporous Silica Enhances the Absorption of Poorly Soluble Weakly Acidic Drugs. *J. Pharm. Sci.* **2011**, *100* (11), 4864–4876. <https://doi.org/10.1002/jps.22703>.
- (127) Scarpa, J. S.; Mueller, D. Dean.; Klotz, I. M. Slow Hydrogen-Deuterium Exchange in a Non- α -Helical Polyamide. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89* (24), 6024–6030. <https://doi.org/10.1021/ja01000a006>.

- (128) Baysal, B. M.; Karasz, F. E. Coil-Globule Collapse in Flexible Macromolecules. *Macromol. Theory Simul.* **2003**, *12* (9), 627–646. <https://doi.org/10.1002/mats.200350028>.
- (129) Graziano, G. On the Temperature-Induced Coil to Globule Transition of Poly-N-Isopropylacrylamide in Dilute Aqueous Solutions. *Int. J. Biol. Macromol.* **2000**, *27* (1), 89–97. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(99\)00122-1](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00122-1).
- (130) Kubota, Kenji.; Fujishige, Shouei.; Ando, Isao. Single-Chain Transition of Poly(N-Isopropylacrylamide) in Water. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94* (12), 5154–5158. <https://doi.org/10.1021/j100375a070>.
- (131) Timko, B. P.; Arruebo, M.; Shankarappa, S. A.; McAlvin, J. B.; Okonkwo, O. S.; Mizrahi, B.; Stefanescu, C. F.; Gomez, L.; Zhu, J.; Zhu, A.; Santamaria, J.; Langer, R.; Kohane, D. S. Near-Infrared-Actuated Devices for Remotely Controlled Drug Delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111* (4), 1349–1354. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322651111>.
- (132) Wang, D.; Huang, H.; Zhou, M.; Lu, H.; Chen, J.; Chang, Y.-T.; Gao, J.; Chai, Z.; Hu, Y. A Thermoresponsive Nanocarrier for Mitochondria-Targeted Drug Delivery. *Chem. Commun.* **2019**, *55* (28), 4051–4054. <https://doi.org/10.1039/C9CC00603F>.
- (133) Cao, M.; Wang, Y.; Hu, X.; Gong, H.; Li, R.; Cox, H.; Zhang, J.; Waigh, T. A.; Xu, H.; Lu, J. R. Reversible Thermoresponsive Peptide-PNIPAM Hydrogels for Controlled Drug Delivery. *Biomacromolecules* **2019**, *20* (9), 3601–3610. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01009>.
- (134) Indulekha, S.; Arunkumar, P.; Bahadur, D.; Srivastava, R. Thermoresponsive Polymeric Gel as an On-Demand Transdermal Drug Delivery System for Pain Management. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *62*, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.01.021>.

- (135) Ferjaoui, Z.; Jamal Al Dine, E.; Kulmukhamedova, A.; Bezdetnaya, L.; Soon Chang, C.; Schneider, R.; Mutelet, F.; Mertz, D.; Begin-Colin, S.; Quilès, F.; Gaffet, E.; Alem, H. Doxorubicin-Loaded Thermoresponsive Superparamagnetic Nanocarriers for Controlled Drug Delivery and Magnetic Hyperthermia Applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (34), 30610–30620. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b10444>.
- (136) Rahikkala, A.; Aseyev, V.; Tenhu, H.; Kauppinen, E. I.; Raula, J. Thermoresponsive Nanoparticles of Self-Assembled Block Copolymers as Potential Carriers for Drug Delivery and Diagnostics. *Biomacromolecules* **2015**, *16* (9), 2750–2756. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00690>.
- (137) Sardon, H.; Tan, J. P. K.; Chan, J. M. W.; Mantione, D.; Mecerreyes, D.; Hedrick, J. L.; Yang, Y. Y. Thermoresponsive Random Poly(Ether Urethanes) with Tailorable LCSTs for Anticancer Drug Delivery. *Macromol. Rapid Commun.* **2015**, *36* (19), 1761–1767. <https://doi.org/10.1002/marc.201500247>.
- (138) Chen, Y.; Shi, J.; Zhang, Y.; Miao, J.; Zhao, Z.; Jin, X.; Liu, L.; Yu, L.; Shen, C.; Ding, J. An Injectable Thermosensitive Hydrogel Loaded with an Ancient Natural Drug Colchicine for Myocardial Repair after Infarction. *J. Mater. Chem. B* **2020**, *8* (5), 980–992. <https://doi.org/10.1039/C9TB02523E>.
- (139) Wang, Q.-S.; Li, K.; Gao, L.-N.; Zhang, Y.; Lin, K.-M.; Cui, Y.-L. Intranasal Delivery of Berberine via in Situ Thermoresponsive Hydrogels with Non-Invasive Therapy Exhibits Better Antidepressant-like Effects. *Biomater. Sci.* **2020**, *8* (10), 2853–2865. <https://doi.org/10.1039/C9BM02006C>.
- (140) Nagase, K.; Shimura, M.; Shimane, R.; Hanaya, K.; Yamada, S.; Akimoto, A. M.; Sugai, T.; Kanazawa, H. Selective Capture and Non-Invasive Release of Cells Using a Thermoresponsive Polymer

- Brush with Affinity Peptides. *Biomater. Sci.* **2021**, *9* (3), 663–674. <https://doi.org/10.1039/D0BM01453B>.
- (141) Evangelidis, A.; Beregoi, M.; Diculescu, V. C.; Galatanu, A.; Ganea, P.; Enculescu, I. Flexible Delivery Patch Systems Based on Thermoresponsive Hydrogels and Submicronic Fiber Heaters. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 17555. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35914-2>.
- (142) Fujishige, S.; Kubota, K.; Ando, I. Phase Transition of Aqueous Solutions of Poly(N-Isopropylacrylamide) and Poly(N-Isopropylmethacrylamide). *J. Phys. Chem.* **1989**, *93* (8), 3311–3313. <https://doi.org/10.1021/j100345a085>.
- (143) Brun-Graeppi, A. K. A. S.; Richard, C.; Bessodes, M.; Scherman, D.; Merten, O.-W. Thermoresponsive Surfaces for Cell Culture and Enzyme-Free Cell Detachment. *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *35* (11), 1311–1324. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.07.007>.
- (144) Dai, S.; Ravi, P.; Tam, K. C. Thermo- and Photo-Responsive Polymeric Systems. *Soft Matter* **2009**, *5* (13), 2513–2533. <https://doi.org/10.1039/B820044K>.
- (145) Schmaljohann, D. Thermo- and PH-Responsive Polymers in Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58* (15), 1655–1670. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.020>.
- (146) Vihola, H.; Laukkanen, A.; Valtola, L.; Tenhu, H.; Hirvonen, J. Cytotoxicity of Thermosensitive Polymers Poly(N-Isopropylacrylamide), Poly(N-Vinylcaprolactam) and Amphiphilically Modified Poly(N-Vinylcaprolactam). *Biomaterials* **2005**, *26* (16), 3055–3064. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.09.008>.
- (147) Wang, X.; Qiu, X.; Wu, C. Comparison of the Coil-to-Globule and the Globule-to-Coil Transitions of a Single Poly(N-

- Isopropylacrylamide) Homopolymer Chain in Water. *Macromolecules* **1998**, *31* (9), 2972–2976. <https://doi.org/10.1021/ma971873p>.
- (148) Kujawa, P.; Segui, F.; Shaban, S.; Diab, C.; Okada, Y.; Tanaka, F.; Winnik, F. M. Impact of End-Group Association and Main-Chain Hydration on the Thermosensitive Properties of Hydrophobically Modified Telechelic Poly(N-Isopropylacrylamides) in Water. *Macromolecules* **2006**, *39* (1), 341–348. <https://doi.org/10.1021/ma051876z>.
- (149) Roy, D.; Brooks, W. L. A.; Sumerlin, B. S. New Directions in Thermoresponsive Polymers. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (17), 7214–7243. <https://doi.org/10.1039/C3CS35499G>.
- (150) Ward, M. A.; Georgiou, T. K. Thermoresponsive Terpolymers Based on Methacrylate Monomers: Effect of Architecture and Composition. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2010**, *48* (4), 775–783. <https://doi.org/10.1002/pola.23825>.
- (151) Ward, M. A.; Georgiou, T. K. Multicompartment Thermoresponsive Gels: Does the Length of the Hydrophobic Side Group Matter? *Polym. Chem.* **2013**, *4* (6), 1893–1902. <https://doi.org/10.1039/C2PY21032K>.
- (152) Thermoresponsive triblock copolymers based on methacrylate monomers: effect of molecular weight and composition - *Soft Matter* (RSC Publishing) <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/sm/c2sm06743a/unauth> (accessed 2021 -12 -06).
- (153) Lutz, J.-F.; Hoth, A. Preparation of Ideal PEG Analogues with a Tunable Thermosensitivity by Controlled Radical Copolymerization of 2-(2-Methoxyethoxy)Ethyl Methacrylate and Oligo(Ethylene Glycol) Methacrylate. *Macromolecules* **2006**, *39* (2), 893–896. <https://doi.org/10.1021/ma0517042>.

- (154) Ma, H.; Hyun, J.; Stiller, P.; Chilkoti, A. "Non-Fouling" Oligo(Ethylene Glycol)- Functionalized Polymer Brushes Synthesized by Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization. *Adv. Mater.* **2004**, *16* (4), 338–341. <https://doi.org/10.1002/adma.200305830>.
- (155) Banerjee, P.; Irvine, D. J.; Mayes, A. M.; Griffith, L. G. Polymer Latexes for Cell-Resistant and Cell-Interactive Surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *50* (3), 331–339. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(20000605\)50:3<331::AID-JBM6>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(20000605)50:3<331::AID-JBM6>3.0.CO;2-T).
- (156) Hyun, J.; Ma, H.; Zhang, Z.; Beebe Jr., T. p.; Chilkoti, A. Universal Route to Cell Micropatterning Using an Amphiphilic Comb Polymer. *Adv. Mater.* **2003**, *15* (7–8), 576–579. <https://doi.org/10.1002/adma.200304496>.
- (157) Bianco-Peled, H.; Gryc, S. Binding of Amino Acids to "Smart" Sorbents: Where Does Hydrophobicity Come into Play? *Langmuir* **2004**, *20* (1), 169–174. <https://doi.org/10.1021/la0357155>.
- (158) Wang, X.-S.; Lascelles, S. F.; Jackson, R. A.; Armes, S. P. Facile Synthesis of Well-Defined Water-Soluble Polymers via Atom Transfer Radical Polymerization in Aqueous Media at Ambient Temperature. *Chem. Commun.* **1999**, No. 18, 1817–1818. <https://doi.org/10.1039/A904691G>.
- (159) Lutz, J.-F. Polymerization of Oligo(Ethylene Glycol) (Meth)Acrylates: Toward New Generations of Smart Biocompatible Materials. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2008**, *46* (11), 3459–3470. <https://doi.org/10.1002/pola.22706>.
- (160) Tao, L.; Mantovani, G.; Lecolley, F.; Haddleton, D. M. α -Aldehyde Terminally Functional Methacrylic Polymers from Living Radical Polymerization: Application in Protein

- Conjugation "Pegylation." *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (41), 13220–13221. <https://doi.org/10.1021/ja0456454>.
- (161) Neugebauer, D.; Zhang, Y.; Pakula, T.; Sheiko, S. S.; Matyjaszewski, K. Densely-Grafted and Double-Grafted PEO Brushes via ATRP. A Route to Soft Elastomers. *Macromolecules* **2003**, *36* (18), 6746–6755. <https://doi.org/10.1021/ma0345347>.
- (162) Yamamoto, S.; Pietrasik, J.; Matyjaszewski, K. ATRP Synthesis of Thermally Responsive Molecular Brushes from Oligo(Ethylene Oxide) Methacrylates. *Macromolecules* **2007**, *40* (26), 9348–9353. <https://doi.org/10.1021/ma701970t>.
- (163) Peng, Z.; Wang, D.; Liu, X.; Tong, Z. RAFT Synthesis of a Water-Soluble Triblock Copolymer of Poly(Styrenesulfonate)-b-Poly(Ethylene Glycol)-b-Poly(Styrenesulfonate) Using a Macromolecular Chain Transfer Agent in Aqueous Solution. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2007**, *45* (16), 3698–3706. <https://doi.org/10.1002/pola.22119>.
- (164) Garnier, S.; Laschewsky, A. Synthesis of New Amphiphilic Diblock Copolymers and Their Self-Assembly in Aqueous Solution. *Macromolecules* **2005**, *38* (18), 7580–7592. <https://doi.org/10.1021/ma0506785>.
- (165) Mertoglu, M.; Garnier, S.; Laschewsky, A.; Skrabania, K.; Storsberg, J. Stimuli Responsive Amphiphilic Block Copolymers for Aqueous Media Synthesised via Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer Polymerisation (RAFT). *Polymer* **2005**, *46* (18), 7726–7740. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.03.101>.
- (166) Luza, S. C.; Speisky, H. C. Liver Copper Storage and Transport during Development: Implications for Cytotoxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* **1996**, *63* (5), 812S-820S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/63.5.812>.

- (167) Matyjaszewski, K.; Xia, J. Atom Transfer Radical Polymerization. *Chem. Rev.* **2001**, *101* (9), 2921–2990. <https://doi.org/10.1021/cr940534g>.
- (168) Tsarevsky, N. V.; Matyjaszewski, K. “Green” Atom Transfer Radical Polymerization: From Process Design to Preparation of Well-Defined Environmentally Friendly Polymeric Materials. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (6), 2270–2299. <https://doi.org/10.1021/cr050947p>.
- (169) Ouchi, M.; Terashima, T.; Sawamoto, M. Transition Metal-Catalyzed Living Radical Polymerization: Toward Perfection in Catalysis and Precision Polymer Synthesis. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (11), 4963–5050. <https://doi.org/10.1021/cr900234b>.
- (170) Thomson, M. E.; Cunningham, M. F. Compartmentalization Effects on the Rate of Polymerization and the Degree of Control in ATRP Aqueous Dispersed Phase Polymerization. *Macromolecules* **2010**, *43* (6), 2772–2779. <https://doi.org/10.1021/ma902445u>.
- (171) Min, K.; Matyjaszewski, K. Atom Transfer Radical Polymerization in Aqueous Dispersed Media. *Open Chem.* **2009**, *7* (4), 657–674. <https://doi.org/10.2478/s11532-009-0092-1>.
- (172) Keddie, D. J.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. RAFT Agent Design and Synthesis. *Macromolecules* **2012**, *45* (13), 5321–5342. <https://doi.org/10.1021/ma300410v>.
- (173) Perrier, S.; Takolpuckdee, P.; Mars, C. A. Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer Polymerization: End Group Modification for Functionalized Polymers and Chain Transfer Agent Recovery. *Macromolecules* **2005**, *38* (6), 2033–2036. <https://doi.org/10.1021/ma047611m>.
- (174) Matyjaszewski, K.; Jakubowski, W.; Min, K.; Tang, W.; Huang, J.; Braunecker, W. A.; Tsarevsky, N. V. Diminishing Catalyst

- Concentration in Atom Transfer Radical Polymerization with Reducing Agents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103* (42), 15309–15314. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602675103>.
- (175) Konkolewicz, D.; Magenau, A. J. D.; Averick, S. E.; Simakova, A.; He, H.; Matyjaszewski, K. ICAR ATRP with Ppm Cu Catalyst in Water. *Macromolecules* **2012**, *45* (11), 4461–4468. <https://doi.org/10.1021/ma300887r>.
- (176) Treat, N. J.; Fors, B. P.; Kramer, J. W.; Christianson, M.; Chiu, C.-Y.; Read de Alaniz, J.; Hawker, C. J. Controlled Radical Polymerization of Acrylates Regulated by Visible Light. *ACS Macro Lett.* **2014**, *3* (6), 580–584. <https://doi.org/10.1021/mz500242a>.
- (177) Xu, J.; Atme, A.; Martins, A. F. M.; Jung, K.; Boyer, C. Photoredox Catalyst-Mediated Atom Transfer Radical Addition for Polymer Functionalization under Visible Light. *Polym. Chem.* **2014**, *5* (10), 3321–3325. <https://doi.org/10.1039/C4PY00193A>.
- (178) Xu, J.; Jung, K.; Atme, A.; Shanmugam, S.; Boyer, C. A Robust and Versatile Photoinduced Living Polymerization of Conjugated and Unconjugated Monomers and Its Oxygen Tolerance. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (14), 5508–5519. <https://doi.org/10.1021/ja501745g>.
- (179) Ma, W.; Chen, H.; Ma, Y.; Zhao, C.; Yang, W. Visible-Light-Induced Controlled Polymerization of Hydrophilic Monomers with Ir(Ppy)₃ as a Photoredox Catalyst in Anisole. *Macromol. Chem. Phys.* **2014**, *215* (10), 1012–1021. <https://doi.org/10.1002/macp.201400024>.
- (180) Zhang, X.; Zhao, C.; Ma, Y.; Chen, H.; Yang, W. One-Pot Synthesis of PTFEMA-b-PMMA-b-PTFEMA by Controlled Radical Polymerization with a Difunctional Initiator in Conjugation with Photoredox Catalyst of Ir(Ppy)₃ Under Visible

- Light. *Macromol. Chem. Phys.* **2013**, *214* (22), 2624–2631. <https://doi.org/10.1002/macp.201300442>.
- (181) Adali-Kaya, Z.; Tse Sum Bui, B.; Falcimaigne-Cordin, A.; Haupt, K. Molecularly Imprinted Polymer Nanomaterials and Nanocomposites: Atom-Transfer Radical Polymerization with Acidic Monomers. *Angew. Chem.* **2015**, *127* (17), 5281–5284. <https://doi.org/10.1002/ange.201412494>.
- (182) Fors, B. P.; Hawker, C. J. Control of a Living Radical Polymerization of Methacrylates by Light. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (35), 8850–8853. <https://doi.org/10.1002/anie.201203639>.
- (183) Elsen, A. M.; Burdyńska, J.; Park, S.; Matyjaszewski, K. Active Ligand for Low PPM Miniemulsion Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules* **2012**, *45* (18), 7356–7363. <https://doi.org/10.1021/ma301647w>.
- (184) Mendoza, G.; Solorzano, I. O. de; Pintre, I.; Garcia-Salinas, S.; Sebastian, V.; Andreu, V.; Gimeno, M.; Arruebo, M. Near Infrared Dye-Labelled Polymeric Micro- and Nanomaterials: In Vivo Imaging and Evaluation of Their Local Persistence. *Nanoscale* **2018**, *10* (6), 2970–2982. <https://doi.org/10.1039/C7NR07345C>.
- (185) Nguyen, J. D.; Tucker, J. W.; Konieczynska, M. D.; Stephenson, C. R. J. Intermolecular Atom Transfer Radical Addition to Olefins Mediated by Oxidative Quenching of Photoredox Catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (12), 4160–4163. <https://doi.org/10.1021/ja108560e>.
- (186) Matyjaszewski, K. Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP): Current Status and Future Perspectives. *Macromolecules* **2012**, *45* (10), 4015–4039. <https://doi.org/10.1021/ma3001719>.
- (187) GUO, Y.; LIU, H.-J.; CHEN, J.-Q.; SHANG, Y.-Z.; LIU, H.-L. Synthesis of P(MEO2MA-Co-OEGMA) Random

- Copolymers and Thermally Induced Phase Transition Behaviors in Aqueous Solutions. *Acta Phys.-Chim. Sin.* **2015**, *31* (10), 1914–1923. <https://doi.org/10.3866/PKU.WHXB201508263>.
- (188) Cai, T.; Marquez, M.; Hu, Z. Monodisperse Thermoresponsive Microgels of Poly(Ethylene Glycol) Analogue-Based Biopolymers. *Langmuir* **2007**, *23* (17), 8663–8666. <https://doi.org/10.1021/la700923r>.
- (189) Ferjaoui, Z.; Schneider, R.; Meftah, A.; Gaffet, E.; Alem, H. Functional Responsive Superparamagnetic Core/Shell Nanoparticles and Their Drug Release Properties. *RSC Adv.* **2017**, *7* (42), 26243–26249. <https://doi.org/10.1039/C7RA02437A>.
- (190) Xia, M.; Cheng, Y.; Theato, P.; Zhu, M. Thermo-Induced Double Phase Transition Behavior of Physically Cross-Linked Hydrogels Based on Oligo(Ethylene Glycol) Methacrylates. *Macromol. Chem. Phys.* **2015**, *216* (23), 2230–2240. <https://doi.org/10.1002/macp.201500242>.
- (191) Lutz, J.-F.; Weichenhan, K.; Akdemir, Ö.; Hoth, A. About the Phase Transitions in Aqueous Solutions of Thermoresponsive Copolymers and Hydrogels Based on 2-(2-Methoxyethoxy)Ethyl Methacrylate and Oligo(Ethylene Glycol) Methacrylate. *Macromolecules* **2007**, *40* (7), 2503–2508. <https://doi.org/10.1021/ma062925q>.
- (192) Xu, J.; Shanmugam, S.; Duong, H. T.; Boyer, C. Organo-Photocatalysts for Photoinduced Electron Transfer-Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer (PET-RAFT) Polymerization. *Polym. Chem.* **2015**, *6* (31), 5615–5624. <https://doi.org/10.1039/C4PY01317D>.
- (193) Wang, X.-S.; Armes, S. P. Facile Atom Transfer Radical Polymerization of Methoxy-Capped Oligo(Ethylene Glycol) Methacrylate in Aqueous Media at Ambient Temperature.

- Macromolecules* **2000**, *33* (18), 6640–6647.
<https://doi.org/10.1021/ma000671h>.
- (194) Mastan, E.; Zhu, S. A Molecular Weight Distribution Polydispersity Equation for the ATRP System: Quantifying the Effect of Radical Termination. *Macromolecules* **2015**, *48* (18), 6440–6449. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.5b01525>.
- (195) Mohammad Rabea, A.; Zhu, S. Controlled Radical Polymerization at High Conversion: Bulk ICAR ATRP of Methyl Methacrylate. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2014**, *53* (9), 3472–3477. <https://doi.org/10.1021/ie403731m>.
- (196) Deng, L.; Ren, J.; Li, J.; Leng, J.; Qu, Y.; Lin, C.; Shi, D. Magneto-thermally Responsive Star-Block Copolymeric Micelles for Controlled Drug Delivery and Enhanced Thermo-Chemotherapy. *Nanoscale* **2015**, *7* (21), 9655–9663. <https://doi.org/10.1039/C5NR00642B>.
- (197) Lutz, J.-F.; Andrieu, J.; Hoth, A.; Agarwal, S. Synthesis of Biorelevant Polymers by Controlled Radical Polymerization; 2008; pp 312–313.
- (198) Lu, B.; Li, L.; Wei, L.; Guo, X.; Hou, J.; Liu, Z. Synthesis and Thermo-Responsive Self-Assembly Behavior of Amphiphilic Copolymer β -CD-(PCL-P(MEO2MA-Co-PEGMA))₂₁ for the Controlled Intracellular Delivery of Doxorubicin. *RSC Adv.* **2016**, *6* (56), 50993–51004. <https://doi.org/10.1039/C6RA08108H>.
- (199) Elias, P. Z.; Liu, G. W.; Wei, H.; Jensen, M. C.; Horner, P. J.; Pun, S. H. A Functionalized, Injectable Hydrogel for Localized Drug Delivery with Tunable Thermosensitivity: Synthesis and Characterization of Physical and Toxicological Properties. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2015**, *208*, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.03.003>.

- (200) Fang, Q.; Chen, T.; Zhong, Q.; Wang, J. Thermoresponsive Polymers Based on Oligo(Ethylene Glycol) Methyl Ether Methacrylate and Modified Substrates with Thermosensitivity. *Macromol. Res.* **2017**, *25* (3), 206–213. <https://doi.org/10.1007/s13233-017-5037-5>.
- (201) Guo, Y.; Dong, X.; Ruan, W.; Shang, Y.; Liu, H. A Thermo-Sensitive OEGMA-Based Polymer: Synthesis, Characterization and Interactions with Surfactants in Aqueous Solutions with and without Salt. *Colloid Polym. Sci.* **2017**, *295* (2), 327–340. <https://doi.org/10.1007/s00396-016-4006-4>.
- (202) Zhu, C.; Xiao, J.; Tang, M.; Feng, H.; Chen, W.; Du, M. Platinum Covalent Shell Cross-Linked Micelles Designed to Deliver Doxorubicin for Synergistic Combination Cancer Therapy. *Int. J. Nanomedicine* **2017**, *12*, 3697–3710. <https://doi.org/10.2147/IJN.S130938>.
- (203) Li, X.; Qian, Y.; Liu, T.; Hu, X.; Zhang, G.; You, Y.; Liu, S. Amphiphilic Multiarm Star Block Copolymer-Based Multifunctional Unimolecular Micelles for Cancer Targeted Drug Delivery and MR Imaging. *Biomaterials* **2011**, *32* (27), 6595–6605. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.049>.
- (204) Wang, L.-H.; Xu, X.-M.; Hong, C.-Y.; Wu, D.-C.; Yu, Z.-Q.; You, Y.-Z. Biodegradable Large Compound Vesicles with Controlled Size Prepared via the Self-Assembly of Branched Polymers in Nanodroplet Templates. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (68), 9676–9678. <https://doi.org/10.1039/C4CC02836H>.
- (205) Qiao, Z.-Y.; Zhang, R.; Du, F.-S.; Liang, D.-H.; Li, Z.-C. Multi-Responsive Nanogels Containing Motifs of Ortho Ester, Oligo(Ethylene Glycol) and Disulfide Linkage as Carriers of Hydrophobic Anti-Cancer Drugs. *J. Controlled Release* **2011**, *152* (1), 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.02.029>.

- (206) Suhail, M.; Rosenholm, J. M.; Minhas, M. U.; Badshah, S. F.; Naeem, A.; Khan, K. U.; Fahad, M. Nanogels as Drug-Delivery Systems: A Comprehensive Overview. *Ther. Deliv.* **2019**, *10* (11), 697–717. <https://doi.org/10.4155/tde-2019-0010>.
- (207) Śliwa, T.; Jarzębski, M.; Andrzejewska, E.; Szafran, M.; Gapiński, J. Uptake and Controlled Release of a Dye from Thermo-Sensitive Polymer P(NIPAM-Co-Vim). *React. Funct. Polym.* **2017**, *115*, 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2017.04.003>.
- (208) Li, Y.; Xiao, K.; Luo, J.; Lee, J.; Pan, S.; Lam, K. S. A Novel Size-Tunable Nanocarrier System for Targeted Anticancer Drug Delivery. *J. Controlled Release* **2010**, *144* (3), 314–323. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.02.027>.
- (209) Zhou, T.; Xiao, C.; Fan, J.; Chen, S.; Shen, J.; Wu, W.; Zhou, S. A Nanogel of On-Site Tunable PH-Response for Efficient Anticancer Drug Delivery. *Acta Biomater.* **2013**, *9* (1), 4546–4557. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.08.017>.
- (210) Bhuchar, N.; Sunasee, R.; Ishihara, K.; Thundat, T.; Narain, R. Degradable Thermoresponsive Nanogels for Protein Encapsulation and Controlled Release. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23* (1), 75–83. <https://doi.org/10.1021/bc2003814>.
- (211) Song, J.-S.; Tronc, F.; Winnik, M. A. Two-Stage Dispersion Polymerization toward Monodisperse, Controlled Micrometer-Sized Copolymer Particles. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (21), 6562–6563. <https://doi.org/10.1021/ja048862d>.
- (212) Lee, H.; Lee, J. M.; Shim, S. E.; Lee, B. H.; Choe, S. Synthesis of Carboxylic Acid Functionalized Nanoparticles by Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer (RAFT) Miniemulsion Polymerization of Styrene. *Polymer* **2005**, *11* (46), 3661–3668. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.03.034>.

- (213) Woods, H. M.; Nouvel, C.; Licence, P.; Irvine, D. J.; Howdle, S. M. Dispersion Polymerization of Methyl Methacrylate in Supercritical Carbon Dioxide: An Investigation into Stabilizer Anchor Group. *Macromolecules* **2005**, *38* (8), 3271–3282. <https://doi.org/10.1021/ma048406+>.
- (214) Duracher, D.; Elaïssari, A.; Pichot, C. Preparation of Poly(N-Isopropylmethacrylamide) Latexes Kinetic Studies and Characterization. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **1999**, *37* (12), 1823–1837. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0518\(19990615\)37:12<1823::AID-POLA12>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0518(19990615)37:12<1823::AID-POLA12>3.0.CO;2-#).
- (215) Huang, G.; Gao, J.; Hu, Z.; St John, J. V.; Ponder, B. C.; Moro, D. Controlled Drug Release from Hydrogel Nanoparticle Networks. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2004**, *94* (2–3), 303–311. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2003.10.007>.
- (216) Hoare, T.; Pelton, R. Functional Group Distributions in Carboxylic Acid Containing Poly(N-Isopropylacrylamide) Microgels. *Langmuir* **2004**, *20* (6), 2123–2133. <https://doi.org/10.1021/la0351562>.
- (217) Landfester, K.; Willert, M.; Antonietti, M. Preparation of Polymer Particles in Nonaqueous Direct and Inverse Miniemulsions. *Macromolecules* **2000**, *33* (7), 2370–2376. <https://doi.org/10.1021/ma991782n>.
- (218) Kriwet, B.; Walter, E.; Kissel, T. Synthesis of Bioadhesive Poly(Acrylic Acid) Nano- and Microparticles Using an Inverse Emulsion Polymerization Method for the Entrapment of Hydrophilic Drug Candidates. *J. Controlled Release* **1998**, *56* (1), 149–158. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(98\)00078-9](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(98)00078-9).
- (219) Sun, Q.; Deng, Y. In Situ Synthesis of Temperature-Sensitive Hollow Microspheres via Interfacial Polymerization. *J. Am. Chem.*

- Soc.* **2005**, *127* (23), 8274–8275.
<https://doi.org/10.1021/ja051487k>.
- (220) Braun, O.; Selb, J.; Candau, F. Synthesis in Microemulsion and Characterization of Stimuli-Responsive Polyelectrolytes and Polyampholytes Based on N-Isopropylacrylamide. *Polymer* **2001**, *42* (21), 8499–8510. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(01\)00445-1](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(01)00445-1).
- (221) Fernandez, V. V. A.; Tepale, N.; Sánchez-Díaz, J. C.; Mendizábal, E.; Puig, J. E.; Soltero, J. F. A. Thermoresponsive Nanostructured Poly(N-Isopropylacrylamide) Hydrogels Made via Inverse Microemulsion Polymerization. *Colloid Polym. Sci.* **2006**, *284* (4), 387–395. <https://doi.org/10.1007/s00396-005-1395-1>.
- (222) Juraničová, V.; Kawamoto, S.; Fujimoto, K.; Kawaguchi, H.; Bartoň, J. Inverse Microemulsion Polymerization of Acrylamide in the Presence of N,N-Dimethylacrylamide. *Angew. Makromol. Chem.* **1998**, *258* (1), 27–31. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-9505\(19980801\)258:1<27::AID-APMC27>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-9505(19980801)258:1<27::AID-APMC27>3.0.CO;2-#).
- (223) Boullaras, M.; Deniau-Lejeune, E.; Alard, V.; Tranchant, J.-F.; Billon, L.; Save, M. Dual Stimuli-Responsive Oligo(Ethylene Glycol)-Based Microgels: Insight into the Role of Internal Structure in Volume Phase Transitions and Loading of Magnetic Nanoparticles to Design Stable Thermoresponsive Hybrid Microgels. *Polym. Chem.* **2015**, *7* (2), 350–363. <https://doi.org/10.1039/C5PY01078K>.
- (224) Pich, A.; Richtering, W. Microgels by Precipitation Polymerization: Synthesis, Characterization, and Functionalization. In *Chemical Design of Responsive Microgels*; Pich, A., Richtering, W., Eds.; Advances in Polymer Science; Springer: Berlin, Heidelberg, 2011; pp 1–37. https://doi.org/10.1007/12_2010_70.

- (225) Szczepaniak, G.; Fu, L.; Jafari, H.; Kapil, K.; Matyjaszewski, K. Making ATRP More Practical: Oxygen Tolerance. *Acc. Chem. Res.* **2021**, *54* (7), 1779–1790. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00032>.
- (226) Wang, Y.; Lorandi, F.; Fantin, M.; Chmielarz, P.; Isse, A. A.; Gennaro, A.; Matyjaszewski, K. Miniemulsion ARGET ATRP via Interfacial and Ion-Pair Catalysis: From Ppm to Ppb of Residual Copper. *Macromolecules* **2017**, *50* (21), 8417–8425. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.7b01730>.
- (227) Wang, Y.; Dadashi-Silab, S.; Matyjaszewski, K. Photoinduced Miniemulsion Atom Transfer Radical Polymerization. *ACS Macro Lett.* **2018**, *7* (6), 720–725. <https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.8b00371>.
- (228) Siegwart, D. J.; Oh, J. K.; Matyjaszewski, K. ATRP in the Design of Functional Materials for Biomedical Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37* (1), 18–37. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.08.001>.
- (229) Dong, H.; Matyjaszewski, K. Thermally Responsive P(M(EO)2MA-Co-OEOMA) Copolymers via AGET ATRP in Miniemulsion. *Macromolecules* **2010**, *43* (10), 4623–4628. <https://doi.org/10.1021/ma100570s>.
- (230) Coessens, V.; Pintauer, T.; Matyjaszewski, K. Functional Polymers by Atom Transfer Radical Polymerization. *Prog. Polym. Sci.* **2001**, *26* (3), 337–377. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(01\)00003-X](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00003-X).
- (231) Li, M.; Deng, L.; Li, J.; Yuan, W.; Gao, X.; Ni, J.; Jiang, H.; Zeng, J.; Ren, J.; Wang, P. Actively Targeted Magnetothermally Responsive Nanocarriers/Doxorubicin for Thermochemotherapy of Hepatoma. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (48), 41107–41117. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b14972>.

- (232) Alejo, T.; Andreu, V.; Mendoza, G.; Sebastian, V.; Arruebo, M. Controlled Release of Bupivacaine Using Hybrid Thermoresponsive Nanoparticles Activated via Photothermal Heating. *J. Colloid Interface Sci.* **2018**, *523*, 234–244. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.03.107>.
- (233) Kohane, D. S.; Lipp, M.; Kinney, R. C.; Lotan, N.; Langer, R. Sciatic Nerve Blockade with Lipid-Protein-Sugar Particles Containing Bupivacaine. *Pharm. Res.* **2000**, *17* (10), 1243–1249. <https://doi.org/10.1023/A:1026470831256>.
- (234) Zetterlund, P. B.; Thickett, S. C.; Perrier, S.; Bourgeat-Lami, E.; Lansalot, M. Controlled/Living Radical Polymerization in Dispersed Systems: An Update. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (18), 9745–9800. <https://doi.org/10.1021/cr500625k>.
- (235) Alejo, T.; Prieto, M.; García-Juan, H.; Andreu, V.; Mendoza, G.; Sebastián, V.; Arruebo, M. A Facile Method for the Controlled Polymerization of Biocompatible and Thermoresponsive Oligo(Ethylene Glycol) Methyl Ether Methacrylate Copolymers. *Polym. J.* **2018**, *50* (2). <https://doi.org/10.1038/s41428-017-0004-8>.
- (236) Zhu, N.; Hu, X.; Fang, Z.; Guo, K. Continuous Flow Photoinduced Reversible Deactivation Radical Polymerization. *ChemPhotoChem* **2018**, *2* (10), 831–838. <https://doi.org/10.1002/cptc.201800032>.
- (237) Junkers, T.; Wenn, B. Continuous Photoflow Synthesis of Precision Polymers. *React. Chem. Eng.* **2016**, *1* (1), 60–64. <https://doi.org/10.1039/C5RE00042D>.
- (238) Chen, M.; Johnson, J. A. Improving Photo-Controlled Living Radical Polymerization from Trithiocarbonates through the Use of Continuous-Flow Techniques. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (31), 6742–6745. <https://doi.org/10.1039/C5CC01562F>.

- (239) Asua, J. M. Miniemulsion Polymerization. *Prog. Polym. Sci.* **2002**, 27 (7), 1283–1346. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(02\)00010-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(02)00010-2).
- (240) Ron, H.; Rubinstein, I. Self-Assembled Monolayers on Oxidized Metals. 3. Alkylthiol and Dialkyl Disulfide Assembly on Gold under Electrochemical Conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120 (51), 13444–13452. <https://doi.org/10.1021/ja9823722>.
- (241) Xue, Y.; Li, X.; Li, H.; Zhang, W. Quantifying Thiol–Gold Interactions towards the Efficient Strength Control. *Nat. Commun.* **2014**, 5 (1), 4348. <https://doi.org/10.1038/ncomms5348>.
- (242) Raval, N.; Maheshwari, R.; Kalyane, D.; Youngren-Ortiz, S. R.; Chougule, M. B.; Tekade, R. K. Chapter 10 - Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development. In *Basic Fundamentals of Drug Delivery*; Tekade, R. K., Ed.; Advances in Pharmaceutical Product Development and Research; Academic Press, 2019; pp 369–400. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817909-3.00010-8>.
- (243) Ortiz de Solorzano, I.; Alejo, T.; Abad, M.; Bueno-Alejo, C.; Mendoza, G.; Andreu, V.; Irusta, S.; Sebastian, V.; Arruebo, M. Cleavable and Thermo-Responsive Hybrid Nanoparticles for on-Demand Drug Delivery. *J. Colloid Interface Sci.* **2019**, 533, 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.08.069>.
- (244) Solorzano, I. O. de; Prieto, M.; Mendoza, G.; Sebastian, V.; Arruebo, M. Triggered Drug Release from Hybrid Thermoresponsive Nanoparticles Using near Infrared Light. *Nanomed.* **2019**. <https://doi.org/10.2217/nnm-2019-0270>.
- (245) Smulders, S.; Kaiser, J.-P.; Zuin, S.; Van Landuyt, K. L.; Golanski, L.; Vanoirbeek, J.; Wick, P.; Hoet, P. H. Contamination of Nanoparticles by Endotoxin: Evaluation of Different Test

- Methods. *Part. Fibre Toxicol.* **2012**, *9* (1), 41.
<https://doi.org/10.1186/1743-8977-9-41>.
- (246) Affairs, O. of R. Bacterial Endotoxins/Pyrogens. *FDA* **2018**.
- (247) Zhang, J.; Li, S.; An, F.-F.; Liu, J.; Jin, S.; Zhang, J.-C.; Wang, P. C.; Zhang, X.; Lee, C.-S.; Liang, X.-J. Self-Carried Curcumin Nanoparticles for in Vitro and in Vivo Cancer Therapy with Real-Time Monitoring of Drug Release. *Nanoscale* **2015**, *7* (32), 13503–13510. <https://doi.org/10.1039/C5NR03259H>.
- (248) Yildiz, T.; Gu, R.; Zauscher, S.; Betancourt, T. Doxorubicin-Loaded Protease-Activated near-Infrared Fluorescent Polymeric Nanoparticles for Imaging and Therapy of Cancer. *Int. J. Nanomedicine* **2018**, *13*, 6961–6986.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S174068>.
- (249) Wang, Q.; Wei, N.; Liu, X.; Chang, A.; Luo, K. Q. Enhancement of the Bioavailability of a Novel Anticancer Compound (Acetyltanshinone IIA) by Encapsulation within MPEG-PLGA Nanoparticles: A Study of Formulation Optimization, Toxicity, and Pharmacokinetics. *Oncotarget* **2017**, *8* (7), 12013–12030.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.14481>.
- (250) Lakhani, P.; Patil, A.; Wu, K.-W.; Sweeney, C.; Tripathi, S.; Avula, B.; Taskar, P.; Khan, S.; Majumdar, S. Optimization, Stabilization, and Characterization of Amphotericin B Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Ocular Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* **2019**, *572*, 118771.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118771>.
- (251) Ruiz-Gatón, L.; Espuelas, S.; Huarte, J.; Larrañeta, E.; Martín-Arbella, N.; Irache, J. M. Nanoparticles from Gantrez® AN-Poly(Ethylene Glycol) Conjugates as Carriers for Oral Delivery of Docetaxel. *Int. J. Pharm.* **2019**, *571*, 118699.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118699>.

- (252) Lu, Y.; Lv, Y.; Li, T. Hybrid Drug Nanocrystals. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**, *143*, 115–133. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.06.006>.
- (253) Shen, S.; Wu, Y.; Liu, Y.; Wu, D. High Drug-Loading Nanomedicines: Progress, Current Status, and Prospects. *Int. J. Nanomedicine* **2017**, *12*, 4085–4109. <https://doi.org/10.2147/IJN.S132780>.
- (254) Zhang, R.; Xing, R.; Jiao, T.; Ma, K.; Chen, C.; Ma, G.; Yan, X. Carrier-Free, Chemophotodynamic Dual Nanodrugs via Self-Assembly for Synergistic Antitumor Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (21), 13262–13269. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b02416>.
- (255) Ribeiro, C. A. S.; Castro, C. E.; Albuquerque, L. J. C.; Batista, C. C. S.; Giacomelli, F. C. Biodegradable Nanoparticles as Nanomedicines: Are Drug-Loading Content and Release Mechanism Dictated by Particle Density? *Colloid Polym. Sci.* **2017**, *8* (295), 1271–1280. <https://doi.org/10.1007/s00396-016-4007-3>.
- (256) Cai, K.; He, X.; Song, Z.; Yin, Q.; Zhang, Y.; Uckun, F. M.; Jiang, C.; Cheng, J. Dimeric Drug Polymeric Nanoparticles with Exceptionally High Drug Loading and Quantitative Loading Efficiency. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (10), 3458–3461. <https://doi.org/10.1021/ja513034e>.
- (257) Al-Kassas, R.; Bansal, M.; Shaw, J. Nanosizing Techniques for Improving Bioavailability of Drugs. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2017**, *260*, 202–212. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.06.003>.
- (258) Jahangir, M. A.; Imam, S. S.; Muheem, A.; Chettupalli, A.; Al-Abbasi, F. A.; Nadeem, M. S.; Kazmi, I.; Afzal, M.; Alshehri, S. Nanocrystals: Characterization Overview, Applications in Drug

- Delivery, and Their Toxicity Concerns. *J. Pharm. Innov.* **2020**.
<https://doi.org/10.1007/s12247-020-09499-1>.
- (259) Dhaval, M.; Makwana, J.; Sakariya, E.; Dudhat, K. Drug Nanocrystals: A Comprehensive Review with Current Regulatory Guidelines. *Curr. Drug Deliv.* **2020**, *17* (6), 470–482.
<https://doi.org/10.2174/1567201817666200512104833>.
- (260) Sinha, B.; Müller, R. H.; Möschwitzer, J. P. Bottom-up Approaches for Preparing Drug Nanocrystals: Formulations and Factors Affecting Particle Size. *Int. J. Pharm.* **2013**, *453* (1), 126–141. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.01.019>.
- (261) Möschwitzer, J. P. Drug Nanocrystals in the Commercial Pharmaceutical Development Process. *Int. J. Pharm.* **2013**, *453* (1), 142–156. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.09.034>.
- (262) Gigliobianco, M. R.; Casadidio, C.; Censi, R.; Di Martino, P. Nanocrystals of Poorly Soluble Drugs: Drug Bioavailability and Physicochemical Stability. *Pharmaceutics* **2018**, *10* (3), E134. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030134>.
- (263) Liu, F.; Park, J.-Y.; Zhang, Y.; Conwell, C.; Liu, Y.; Bathula, S. R.; Huang, L. Targeted Cancer Therapy with Novel High Drug-Loading Nanocrystals. *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99* (8), 3542–3551. <https://doi.org/10.1002/jps.22112>.
- (264) Dong, Y.; Ng, W. K.; Shen, S.; Kim, S.; Tan, R. B. H. Preparation and Characterization of Spironolactone Nanoparticles by Antisolvent Precipitation. *Int. J. Pharm.* **2009**, *375* (1–2), 84–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.03.013>.
- (265) Raghavan, S. L.; Schuessel, K.; Davis, A.; Hadgraft, J. Formation and Stabilisation of Triclosan Colloidal Suspensions Using Supersaturated Systems. *Int. J. Pharm.* **2003**, *261* (1), 153–158. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00299-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00299-0).

- (266) Xia, D.; Quan, P.; Piao, H.; Piao, H.; Sun, S.; Yin, Y.; Cui, F. Preparation of Stable Nitrendipine Nanosuspensions Using the Precipitation-Ultrasonication Method for Enhancement of Dissolution and Oral Bioavailability. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* **2010**, *40* (4), 325–334. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.04.006>.
- (267) Zhang, J.-Y.; Shen, Z.-G.; Zhong, J.; Hu, T.-T.; Chen, J.-F.; Ma, Z.-Q.; Yun, J. Preparation of Amorphous Cefuroxime Axetil Nanoparticles by Controlled Nanoprecipitation Method without Surfactants. *Int. J. Pharm.* **2006**, *323* (1–2), 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.05.048>.
- (268) Tian, Y.; Bian, S.; Yang, W. A Redox-Labile Poly(Oligo(Ethylene Glycol)Methacrylate)-Based Nanogel with Tunable Thermosensitivity for Drug Delivery. *Polym. Chem.* **2016**, *7* (10), 1913–1921. <https://doi.org/10.1039/C6PY00057F>.
- (269) Hadaeghnia, M.; Goharpey, F.; Khademzadeh Yeganeh, J. Characterization and Phase-Transition Behavior of Thermoresponsive PVME Nanogels in the Presence of Cellulose Nanowhiskers: Rheology, Morphology, and FTIR Studies. *Polym. Eng. Sci.* **2019**, *59* (5), 899–912. <https://doi.org/10.1002/pen.25035>.
- (270) Nasatto, P. L.; Pignon, F.; Silveira, J. L. M.; Duarte, M. E. R.; Nosedá, M. D.; Rinaudo, M. Methylcellulose, a Cellulose Derivative with Original Physical Properties and Extended Applications. *Polymers* **2015**, *7* (5), 777–803. <https://doi.org/10.3390/polym7050777>.
- (271) Curley, J.; Castillo, J.; Hotz, J.; Uezono, M.; Hernandez, S.; Lim, J.-O.; Tigner, J.; Chasin, M.; Langer, R.; Berde, C. Prolonged Regional Nerve Blockade: Injectable Biodegradable Bupivacaine/Polyester Microspheres. *Anesthesiology* **1996**, *84* (6),

- 1401–1410. <https://doi.org/10.1097/00000542-199606000-00017>.
- (272) Hamed, R.; Awadallah, A.; Sunoqrot, S.; Tarawneh, O.; Nazzal, S.; AlBaraghthi, T.; Al Sayyad, J.; Abbas, A. PH-Dependent Solubility and Dissolution Behavior of Carvedilol—Case Example of a Weakly Basic BCS Class II Drug. *AAPS PharmSciTech* **2015**, *17* (2), 418–426. <https://doi.org/10.1208/s12249-015-0365-2>.
- (273) Gao, L.; Liu, G.; Ma, J.; Wang, X.; Zhou, L.; Li, X. Drug Nanocrystals: In Vivo Performances. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2012**, *160* (3), 418–430. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.013>.
- (274) Pettinelli, N.; Rodríguez-Llamazares, S.; Farrag, Y.; Bouza, R.; Barral, L.; Feijoo-Bandín, S.; Lago, F. Poly(Hydroxybutyrate-Co-Hydroxyvalerate) Microparticles Embedded in κ -Carrageenan/Locust Bean Gum Hydrogel as a Dual Drug Delivery Carrier. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *146*, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.193>.
- (275) Yerasi, A.; Manchikanti, L. Animal Models of Pain and Ethics of Animal Experimentation. In *Academic Pain Medicine: A Practical Guide to Rotations, Fellowship, and Beyond*; Khelemsky, Y., Malhotra, A., Gritsenko, K., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2019; pp 27–32. https://doi.org/10.1007/978-3-030-18005-8_5.
- (276) Dellon, A. L.; Mackinnon, S. E. Selection of the Appropriate Parameter to Measure Neural Regeneration. *Ann. Plast. Surg.* **1989**, *23* (3), 197–202.
- (277) Shen, N.; Zhu, J. Application of Sciatic Functional Index in Nerve Functional Assessment. *Microsurgery* **1995**, *16* (8), 552–555. <https://doi.org/10.1002/micr.1920160809>.

- (278) Di Cataldo, A.; La Greca, G.; Rodolico, M.; Candiano, C.; Li Destri, G.; Puleo, S. Experimental Models in Microsurgery. *Microsurgery* **1998**, *18* (8), 454–459. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2752\(1998\)18:8<454::AID-MICR5>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2752(1998)18:8<454::AID-MICR5>3.0.CO;2-J).
- (279) Savastano, L. E.; Laurito, S. R.; Fitt, M. R.; Rasmussen, J. A.; Gonzalez Polo, V.; Patterson, S. I. Sciatic Nerve Injury: A Simple and Subtle Model for Investigating Many Aspects of Nervous System Damage and Recovery. *J. Neurosci. Methods* **2014**, *227*, 166–180. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.01.020>.
- (280) Bertelli, J. A.; Mira, J. C. The Grasping Test: A Simple Behavioral Method for Objective Quantitative Assessment of Peripheral Nerve Regeneration in the Rat. *J. Neurosci. Methods* **1995**, *58* (1), 151–155. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)00169-H](https://doi.org/10.1016/0165-0270(94)00169-H).
- (281) Bontioti, E. N.; Kanje, M.; Dahlin, L. B. Regeneration and Functional Recovery in the Upper Extremity of Rats after Various Types of Nerve Injuries. *J. Peripher. Nerv. Syst.* **2003**, *8* (3), 159–168. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8027.2003.03023.x>.
- (282) Papalia, I.; Tos, P.; Stagno d'Alcontres, F.; Battiston, B.; Geuna, S. On the Use of the Grasping Test in the Rat Median Nerve Model: A Re-Appraisal of Its Efficacy for Quantitative Assessment of Motor Function Recovery. *J. Neurosci. Methods* **2003**, *127* (1), 43–47. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(03\)00098-0](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(03)00098-0).
- (283) Aldskogius, H.; Thomander, L. Selective Reinnervation of Somatotopically Appropriate Muscles after Facial Nerve Transection and Regeneration in the Neonatal Rat. *Brain Res.* **1986**, *375* (1), 126–134. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)90965-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)90965-0).
- (284) Jergović, D.; Stål, P.; Lidman, D.; Lindvall, B.; Hildebrand, C. Changes in a Rat Facial Muscle after Facial Nerve Injury and

- Repair. *Muscle Nerve* **2001**, *24* (9), 1202–1212. <https://doi.org/10.1002/mus.1133>.
- (285) Back, S. K.; Sung, B.; Hong, S. K.; Na, H. S. A Mouse Model for Peripheral Neuropathy Produced by a Partial Injury of the Nerve Supplying the Tail. *Neurosci. Lett.* **2002**, *322* (3), 153–156. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)00067-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)00067-8).
- (286) Lee, W. P. A.; Constantinescu, M. A.; Butler, P. E. M. Effect of Early Mobilization on Healing of Nerve Repair: Histologic Observations in a Canine Model. *Plast. Reconstr. Surg.* **1999**, *104* (6), 1718–1725.
- (287) Matsumoto, K.; Ohnishi, K.; Kiyotani, T.; Sekine, T.; Ueda, H.; Nakamura, T.; Endo, K.; Shimizu, Y. Peripheral Nerve Regeneration across an 80-Mm Gap Bridged by a Polyglycolic Acid (PGA)–Collagen Tube Filled with Laminin-Coated Collagen Fibers: A Histological and Electrophysiological Evaluation of Regenerated Nerves. *Brain Res.* **2000**, *868* (2), 315–328. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02207-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02207-1).
- (288) Suzuki, Y.; Tanihara, M.; Ohnishi, K.; Suzuki, K.; Endo, K.; Nishimura, Y. Cat Peripheral Nerve Regeneration across 50 Mm Gap Repaired with a Novel Nerve Guide Composed of Freeze-Dried Alginate Gel. *Neurosci. Lett.* **1999**, *259* (2), 75–78. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(98\)00924-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(98)00924-0).
- (289) Heijke, G. C. M.; Klopper, P. J.; Van Doorn, I. B. M.; Baljet, B. Processed Porcine Collagen Tubulization versus Conventional Suturing in Peripheral Nerve Reconstruction: An Experimental Study in Rabbits. *Microsurgery* **2001**, *21* (3), 84–95. <https://doi.org/10.1002/micr.1015>.
- (290) Sarikcioglu, L.; Oguz, N. Exercise Training and Axonal Regeneration After Sciatic Nerve Injury. *Int. J. Neurosci.* **2001**, *109* (3–4), 173–177. <https://doi.org/10.3109/00207450108986533>.

- (291) Glasby, M. A.; Gilmour, J. A.; Gschmeissner, S. E.; Hems, T. E. J.; Myles, L. M. The Repair of Large Peripheral Nerves Using Skeletal Muscle Autografts: A Comparison with Cable Grafts in the Sheep Femoral Nerve. *Br. J. Plast. Surg.* **1990**, *43* (2), 169–178. [https://doi.org/10.1016/0007-1226\(90\)90157-U](https://doi.org/10.1016/0007-1226(90)90157-U).
- (292) Mackinnon, S. E.; Dellon, A. L. A Study of Nerve Regeneration Across Synthetic (Maxon) and Biologic (Collagen) Nerve Conduits For Nerve Gaps Up to 5 Cm in the Primate. *J. Reconstr. Microsurg.* **1990**, *6* (2), 117–121. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1006810>.
- (293) Archibald, S. J.; Shefner, J.; Krarup, C.; Madison, R. D. Monkey Median Nerve Repaired by Nerve Graft or Collagen Nerve Guide Tube. *J. Neurosci.* **1995**, *15* (5), 4109–4123. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-05-04109.1995>.
- (294) Wong, B. J.; Mattox, D. E. Experimental Nerve Regeneration. A Review. *Otolaryngol. Clin. North Am.* **1991**, *24* (3), 739–752.
- (295) Kanaya, F.; Firrell, J. C.; Breidenbach, W. C. Sciatic Function Index, Nerve Conduction Tests, Muscle Contraction, and Axon Morphometry as Indicators of Regeneration. *Plast. Reconstr. Surg.* **1996**, *98* (7), 1264–1271.
- (296) Hadlock, T. A.; Koka, R.; Vacanti, J. P.; Cheney, M. L. A Comparison of Assessments of Functional Recovery in the Rat. *J. Peripher. Nerv. Syst. JPNS* **1999**, *4* (3–4), 258–264.
- (297) Chaplan, S. R.; Bach, F. W.; Pogrel, J. W.; Chung, J. M.; Yaksh, T. L. Quantitative Assessment of Tactile Allodynia in the Rat Paw. *J. Neurosci. Methods* **1994**, *53* (1), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)90144-9](https://doi.org/10.1016/0165-0270(94)90144-9).
- (298) Casals-Díaz, L.; Vivó, M.; Navarro, X. Nociceptive Responses and Spinal Plastic Changes of Afferent C-Fibers in Three Neuropathic Pain Models Induced by Sciatic Nerve Injury in the Rat. *Exp.*

- Neurol.* **2009**, *217* (1), 84–95.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.01.014>.
- (299) Palomés-Borrajo, G.; Badia, J.; Navarro, X.; Penas, C. Nerve Excitability and Neuropathic Pain Is Reduced by BET Protein Inhibition After Spared Nerve Injury. *J. Pain* **2021**, *22* (12), 1617–1630. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2021.05.005>.
- (300) Christensen, S. L.; Hansen, R. B.; Storm, M. A.; Olesen, J.; Hansen, T. F.; Ossipov, M.; Izzarzugaza, J. M. G.; Porreca, F.; Kristensen, D. M. Von Frey Testing Revisited: Provision of an Online Algorithm for Improved Accuracy of 50% Thresholds. *Eur. J. Pain* **2020**, *24* (4), 783–790. <https://doi.org/10.1002/ejp.1528>.
- (301) Santos-Nogueira, E.; Redondo Castro, E.; Mancuso, R.; Navarro, X. Randall-Selitto Test: A New Approach for the Detection of Neuropathic Pain after Spinal Cord Injury. *J. Neurotrauma* **2012**, *29* (5), 898–904. <https://doi.org/10.1089/neu.2010.1700>.
- (302) Campana, G.; Rimondini, R. Mechanical Nociception in Mice and Rats: Measurement with Automated von Frey Equipment. In *Opioid Receptors: Methods and Protocols*; Spampinato, S. M., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer US: New York, NY, 2021; pp 195–198. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0884-5_17.
- (303) Hargreaves, K.; Dubner, R.; Brown, F.; Flores, C.; Joris, J. A New and Sensitive Method for Measuring Thermal Nociception in Cutaneous Hyperalgesia. *PAIN* **1988**, *32* (1), 77–88. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(88\)90026-7](https://doi.org/10.1016/0304-3959(88)90026-7).
- (304) Bruna, J.; Alberti, P.; Calls-Cobos, A.; Caillaud, M.; Damaj, M. I.; Navarro, X. Methods for in Vivo Studies in Rodents of Chemotherapy Induced Peripheral Neuropathy. *Exp. Neurol.* **2020**, *325*, 113154. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.113154>.
- (305) Casals-Díaz, L.; Casas, C.; Navarro, X. Changes of Voltage-Gated Sodium Channels in Sensory Nerve Regeneration and Neuropathic

- Pain Models. *Restor. Neurol. Neurosci.* **2015**, *33* (3), 321–334. <https://doi.org/10.3233/RNN-140444>.
- (306) Galtrey, C. M.; Fawcett, J. W. Characterization of Tests of Functional Recovery after Median and Ulnar Nerve Injury and Repair in the Rat Forelimb. *J. Peripher. Nerv. Syst.* **2007**, *12* (1), 11–27. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8027.2007.00113.x>.
- (307) Thalhammer, J. G.; Vladimirova, M.; Bershadsky, B.; Strichartz, G. R. Neurologic Evaluation of the Rat during Sciatic Nerve Block with Lidocaine. *Anesthesiology* **1995**, *82* (4), 1013–1025. <https://doi.org/10.1097/00000542-199504000-00026>.
- (308) Howard, C. S.; Blakeney, D. C.; Medige, J.; Moy, O. J.; Peimer, C. A. Functional Assessment in the Rat by Ground Reaction Forces. *J. Biomech.* **2000**, *33* (6), 751–757. [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(00\)00023-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(00)00023-3).
- (309) Clarke, K. A.; Smart, L.; Still, J. Ground Reaction Force and Spatiotemporal Measurements of the Gait of the Mouse. *Behav. Res. Methods Instrum. Comput. J. Psychon. Soc. Inc* **2001**, *33* (3), 422–426. <https://doi.org/10.3758/bf03195396>.
- (310) Use of sciatic function index and walking track assessment - 1990 - Microsurgery - Wiley Online Library <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/micr.1920110221?sid=nlm%3Apubmed> (accessed 2022 -01 -02).
- (311) Hare, G. M.; Evans, P. J.; Mackinnon, S. E.; Best, T. J.; Midha, R.; Szalai, J. P.; Hunter, D. A. Walking Track Analysis: Utilization of Individual Footprint Parameters. *Ann. Plast. Surg.* **1993**, *30* (2), 147–153. <https://doi.org/10.1097/00000637-199302000-00009>.
- (312) Dellon, A. L.; Mackinnon, S. E. Sciatic Nerve Regeneration in the Rat. Validity of Walking Track Assessment in the Presence of Chronic Contractures. *Microsurgery* **1989**, *10* (3), 220–225. <https://doi.org/10.1002/micr.1920100316>.

- (313) Bervar, M. Video Analysis of Standing — an Alternative Footprint Analysis to Assess Functional Loss Following Injury to the Rat Sciatic Nerve. *J. Neurosci. Methods* **2000**, *102* (2), 109–116. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(00\)00281-8](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(00)00281-8).
- (314) Bozkurt, A.; Tholl, S.; Wehner, S.; Tank, J.; Cortese, M.; O'Dey, D. mon; Deumens, R.; Lassner, F.; Schügner, F.; Gröger, A.; Smeets, R.; Brook, G.; Pallua, N. Evaluation of Functional Nerve Recovery with Visual-SSI—A Novel Computerized Approach for the Assessment of the Static Sciatic Index (SSI). *J. Neurosci. Methods* **2008**, *170* (1), 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.01.006>.
- (315) Alejo, T.; Uson, L.; Arruebo, M. Reversible Stimuli-Responsive Nanomaterials with on-off Switching Ability for Biomedical Applications. *J. Controlled Release* **2019**, *314*, 162–176. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.10.036>.
- (316) Liu, G.; Liu, W.; Dong, C.-M. UV- and NIR-Responsive Polymeric Nanomedicines for on-Demand Drug Delivery. *Polym. Chem.* **2013**, *4* (12), 3431–3443. <https://doi.org/10.1039/C3PY21121E>.
- (317) Dijkstra, J. R.; Meek, M. F.; Robinson, P. H.; Gramsbergen, A. Methods to Evaluate Functional Nerve Recovery in Adult Rats: Walking Track Analysis, Video Analysis and the Withdrawal Reflex. *J. Neurosci. Methods* **2000**, *96* (2), 89–96. [https://doi.org/10.1016/s0165-0270\(99\)00174-0](https://doi.org/10.1016/s0165-0270(99)00174-0).
- (318) Shankarappa, S. A.; Sagie, I.; Tsui, J. H.; Chiang, H. H.; Stefanescu, C.; Zurakowski, D.; Kohane, D. S. Duration and Local Toxicity of Sciatic Nerve Blockade with Coinjected Site 1 Sodium-Channel Blockers and Quaternary Lidocaine Derivatives. *Reg. Anesth. Pain Med.* **2012**, *37* (5), 483–489. <https://doi.org/10.1097/AAP.0b013e31826125b3>.

- (319) Rwei, A. Y.; Zhan, C.; Wang, B.; Kohane, D. S. Multiply Repeatable and Adjustable On-Demand Phototriggered Local Anesthesia. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2017**, *251*, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.01.031>.
- (320) Caillaud, M.; Chantemargue, B.; Richard, L.; Vignaud, L.; Favreau, F.; Faye, P.-A.; Vignoles, P.; Sturtz, F.; Trouillas, P.; Vallat, J.-M.; Desmoulière, A.; Billet, F. Local Low Dose Curcumin Treatment Improves Functional Recovery and Remyelination in a Rat Model of Sciatic Nerve Crush through Inhibition of Oxidative Stress. *Neuropharmacology* **2018**, *139*, 98–116. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.07.001>.
- (321) Bester, H.; Beggs, S.; Woolf, C. J. Changes in Tactile Stimuli-Induced Behavior and c-Fos Expression in the Superficial Dorsal Horn and in Parabrachial Nuclei after Sciatic Nerve Crush. *J. Comp. Neurol.* **2000**, *428* (1), 45–61. [https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20001204\)428:1<45::AID-CNE5>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20001204)428:1<45::AID-CNE5>3.0.CO;2-A).
- (322) Decosterd, I.; Allchorne, A.; Woolf, C. J. Progressive Tactile Hypersensitivity after a Peripheral Nerve Crush: Non-Noxious Mechanical Stimulus-Induced Neuropathic Pain. *Pain* **2002**, *100* (1–2), 155–162. [https://doi.org/10.1016/s0304-3959\(02\)00275-0](https://doi.org/10.1016/s0304-3959(02)00275-0).
- (323) Schouenborg, J.; Holmberg, H.; Weng, H. R. Functional Organization of the Nociceptive Withdrawal Reflexes. II. Changes of Excitability and Receptive Fields after Spinalization in the Rat. *Exp. Brain Res.* **1992**, *90* (3), 469–478. <https://doi.org/10.1007/BF00230929>.
- (324) Schouenborg, J.; Kalliomäki, J. Functional Organization of the Nociceptive Withdrawal Reflexes. I. Activation of Hindlimb Muscles in the Rat. *Exp. Brain Res.* **1990**, *83* (1), 67–78. <https://doi.org/10.1007/BF00232194>.

- (325) Creed, R. S.; Denny-Brown, D.; Eccles, J. C.; Liddell, E. G. T.; Sherrington, C. S. *Reflex Activity of the Spinal Cord*; Reflex activity of the spinal cord; Clarendon Press: Oxford, England, 1932; p 183.
- (326) Chamberlain, L. j.; Yannas, I. v.; Hsu, H.-P.; Strichartz, G. r.; Spector, M. Near-Terminus Axonal Structure and Function Following Rat Sciatic Nerve Regeneration through a Collagen-GAG Matrix in a Ten-Millimeter Gap. *J. Neurosci. Res.* **2000**, *60* (5), 666–677. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(20000601\)60:5<666::AID-JNR12>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(20000601)60:5<666::AID-JNR12>3.0.CO;2-0).
- (327) Sarikcioglu, L.; Demirel, B. M.; Utuk, A. Walking Track Analysis: An Assessment Method for Functional Recovery after Sciatic Nerve Injury in the Rat. *Folia Morphol.* **2009**, *68* (1), 1–7.
- (328) Varejão, A. S.; Meek, M. F.; Ferreira, A. J.; Patrício, J. A.; Cabrita, A. M. Functional Evaluation of Peripheral Nerve Regeneration in the Rat: Walking Track Analysis. *J. Neurosci. Methods* **2001**, *108* (1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/s0165-0270\(01\)00378-8](https://doi.org/10.1016/s0165-0270(01)00378-8).
- (329) Kang, S. C.; Jampachaisri, K.; Seymour, T. L.; Felt, S. A.; Pacharinsak, C. Use of Liposomal Bupivacaine for Postoperative Analgesia in an Incisional Pain Model in Rats (*Rattus Norvegicus*). *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. JAALAS* **2017**, *56* (1), 63–68.
- (330) Weldon, C.; Ji, T.; Nguyen, M.-T.; Rwei, A.; Wang, W.; Hao, Y.; Zhao, C.; Mehta, M.; Wang, B. Y.; Tsui, J.; Marini, R. P.; Kohane, D. S. Nanoscale Bupivacaine Formulations To Enhance the Duration and Safety of Intravenous Regional Anesthesia. *ACS Nano* **2019**, *13* (1), 18–25. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b05408>.
- (331) Yu, H.-Y.; Li, S.-D.; Sun, P. Kinetic and Dynamic Studies of Liposomal Bupivacaine and Bupivacaine Solution after Subcutaneous Injection in Rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **2002**, *54* (9), 1221–1227. <https://doi.org/10.1211/002235702320402062>.

- (332) Wu, Y.-T.; Kao, Y.-L.; Lin, L.-C.; Tsai, T.-H. Effects of a P-Glycoprotein Modulator on the Pharmacokinetics and Distribution of Free Levobupivacaine and Bupivacaine in Rats. *Int. J. Pharm.* **2010**, *396* (1), 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.06.038>.
- (333) Zhang, W.; Xu, W.; Ning, C.; Li, M.; Zhao, G.; Jiang, W.; Ding, J.; Chen, X. Long-Acting Hydrogel/Microsphere Composite Sequentially Releases Dexmedetomidine and Bupivacaine for Prolonged Synergistic Analgesia. *Biomaterials* **2018**, *181*, 378–391. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.07.051>.
- (334) Kau, Y.-C.; Hung, Y.-C.; Zizza, A. M.; Zurakowski, D.; Greco, W. R.; Wang, G. K.; Gerner, P. Efficacy of Lidocaine or Bupivacaine Combined with Ephedrine in Rat Sciatic Nerve Block. *Reg. Anesth. Pain Med.* **2006**, *31* (1), 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.rapm.2005.08.008>.
- (335) Ren, Y.; Wang, R.; Gao, L.; Li, K.; Zhou, X.; Guo, H.; Liu, C.; Han, D.; Tian, J.; Ye, Q.; Hu, Y. T.; Sun, D.; Yuan, X.; Zhang, N. Sequential Co-Delivery of MiR-21 Inhibitor Followed by Burst Release Doxorubicin Using NIR-Responsive Hollow Gold Nanoparticle to Enhance Anticancer Efficacy. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2016**, *228*, 74–86. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.03.008>.
- (336) Sponchioni, M.; Capasso Palmiero, U.; Moscatelli, D. Thermo-Responsive Polymers: Applications of Smart Materials in Drug Delivery and Tissue Engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *102*, 589–605. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.069>.
- (337) Abu Elyazed, M. M.; Eid, G. M. Dexamethasone versus Neostigmine as an Adjuvant to Bupivacaine 0.25% for Caudal Analgesia in Children Undergoing Open Inguinal Hernia Repair.

- Egypt. J. Anaesth.* **2017**, *33* (3), 283–288.
<https://doi.org/10.1016/j.egja.2017.03.004>.
- (338) Estebe, J.-P.; Gentili, M. E.; Corre, P. L.; Leduc, C.; Moulinoux, J.-P.; Ecoffey, C. Contralateral Effect of Amitriptyline and Bupivacaine for Sciatic Nerve Block in an Animal Model of Inflammation. *Br. J. Anaesth.* **2004**, *93* (5), 705–709.
<https://doi.org/10.1093/bja/aeh264>.
- (339) An, K.; Elkassabany, N. M.; Liu, J. Dexamethasone as Adjuvant to Bupivacaine Prolongs the Duration of Thermal Antinociception and Prevents Bupivacaine-Induced Rebound Hyperalgesia via Regional Mechanism in a Mouse Sciatic Nerve Block Model. *PLOS ONE* **2015**, *10* (4), e0123459.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123459>.
- (340) Rwei, A. Y.; Sherburne, R. T.; Zurakowski, D.; Wang, B.; Kohane, D. S. Prolonged Duration Local Anesthesia Using Liposomal Bupivacaine Combined With Liposomal Dexamethasone and Dexmedetomidine. *Anesth. Analg.* **2018**, *126* (4), 1170–1175.
<https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000002719>.
- (341) Yin, Y.; Ren, Y.; Li, H.; Qi, H. Characteristic Analysis of Light and Heat Transfer in Photothermal Therapy Using Multiple-Light-Source Heating Strategy. *Int. J. Therm. Sci.* **2020**, *158*, 106533. <https://doi.org/10.1016/j.ijthermalsci.2020.106533>.
- (342) Kohane, D. S.; Langer, R. Biocompatibility and Drug Delivery Systems. *Chem. Sci.* **2010**, *1* (4), 441–446.
<https://doi.org/10.1039/C0SC00203H>.
- (343) Padera, R.; Bellas, E.; Tse, J. Y.; Hao, D.; Kohane, D. S. Local Myotoxicity from Sustained Release of Bupivacaine from Microparticles. *Anesthesiology* **2008**, *108* (5), 921–928.
<https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e31816c8a48>.

