TESIS DE DOCTORADO

NUEVA PLATAFORMA DE ADMINISTRACIÓN PULMONAR BASADA EN REDES METAL-ORGÁNICAS CON POTENCIAL APLICACIÓN EN EL TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS

Cristina Fernández Paz

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE MEDICAMENTOS

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2021

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Nueva plataforma de administración pulmonar basada en redes metal-orgánicas con potencial aplicación en el tratamiento de la tuberculosis

Dña. Cristina Fernández Paz

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.
4) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.

En Narón, a …… 2021

Fdo. Cristina Fernández Paz

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Nueva plataforma de administración pulmonar basada en redes metal-orgánicas con potencial aplicación en el tratamiento de la tuberculosis

D[a]. María del Carmen Remuñán López
D[a]. Patricia Horcajada Cortés

INFORMAN:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por Dª. Cristina Fernández Paz, bajo nuestra dirección, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directoras de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declaran también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de Monográfica con reproducción de publicaciones, en los que la participación de la doctoranda fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En Santiago de Compostela, a …… 2021

Fdo. María del Carmen Remuñán López

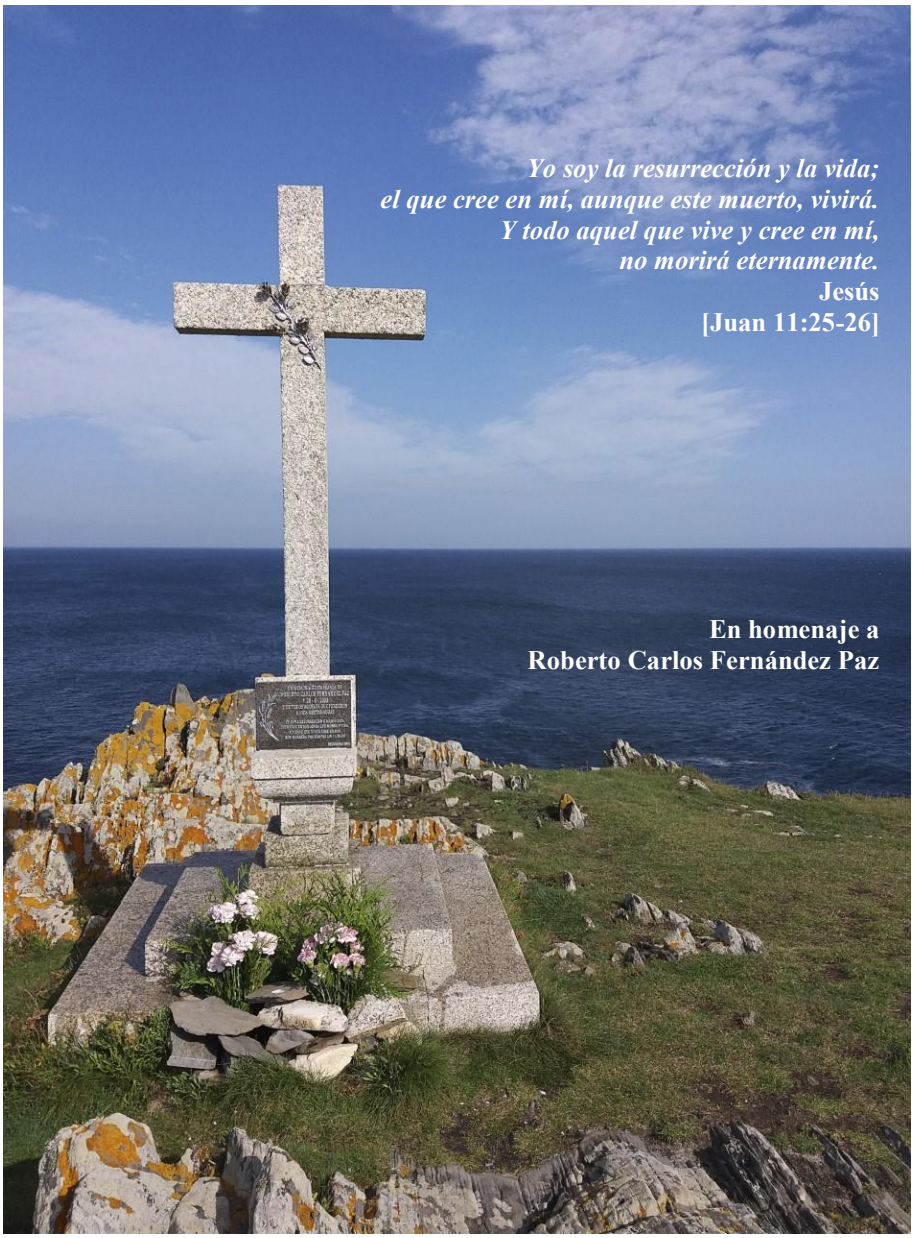
Fdo. Patricia Horcajada Cortés

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

A mis padres y hermanos

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

“El futuro pertenece a quienes creen

en la belleza de sus sueños”

Eleanore Roosevelt

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Los que me conocen, ya saben que va a haber momentos en los que me va a costar hablar en primera persona, ya que he sentido muchas veces la gratitud de forma compartida con mi hermana gemela Fany. De todos modos, intentaré ser lo más correcta posible.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mi Tutora y Directora de Tesis Carmen Remuñán López. Agradezco la valentía que tuvo por aceptar dirigirnos a mi hermana y a mí a la vez. No todo el mundo está dispuesto a atreverse a dirigir a dos gemelas. Le doy las gracias por entendernos, distinguirnos desde el principio (no sólo nuestros físicos, sino también nuestras formas distintas de ser y nuestras características individuales), sabernos llevar (aunque a veces la podíamos volver un poco loca cuando le consultábamos las dos a la vez) y por convertirse en alguien especial para nosotras. Agradezco su cercanía y familiaridad, nuestras charlas profesionales y personales, sus consejos y ayuda, sus enseñanzas y, sobre todo, su cariño. En fin… ¿Qué más puedo decir? ¡Qué somos las niñas de Carmucha!

Agradezco también este trabajo a mi otra Directora de Tesis Patricia Horcajada Cortés. Agradezco la gran oportunidad que me dio de ir a su centro de investigación (Instituto Madrileño de Estudios Avanzados, IMDEA Energía). Agradezco su profesionalidad, sus ánimos y la confianza que depositó en mí, a pesar de las dificultades por las que he pasado durante la Tesis. Le agradezco haber permanecido a mi lado y a darme la oportunidad de crecer profesionalmente.

A Sara Rojas y a Pablo Salcedo, por sus enseñanzas, ayuda y profesionalidad.

A mis compañeros del IMDEA Energía, en especial a las técnicas Laura y a Eugenia por su ayuda, amabilidad y simpatía; a Sergio, por su preocupación y todas sus atenciones; y a Gabriel, porque para mí fue un profesor, muy buen compañero y ese gran apoyo que tanto valoré durante mi estancia en Madrid.

A mis compañeras del CiMUS: Sheila, Carla, Blanca y las dos Rocíos, por sus enseñanzas y ayuda ofrecida.

A mis compañeras/os de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela: Inés, Jesús, Helena, Víctor, Lorena, Diana, Vasco, Kristin, Iago, Gabriel, Lucía, Jaccopo, Natalia,

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Silvia, Manuel, Rubén, Laurin, Andrea, Omar, Santi y Alba, por su compañerismo. A mis más que compañeras: Rebeca, Katia, Ana, Catherine, Lucía Feijoo y Celina por su ayuda, amistad, consejos y buenos momentos juntas… A mi amigo Fernando David, por su apoyo, saber estar, familiaridad y esa sensibilidad especial que le hace tan único. Y a mi amiga Eli, a su papá León y a su hija Emi, que siempre los llevaré en el corazón y por ser mi familia en Medellín. Agradezco la experiencia de conocerlos a todos y por abrir mi mente a diferentes culturas, conocimientos, puntos de vista y, sobre todo, por ser tan buenas personas.

Agradecer a los profesores del Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Santiago de Compostela y, quiero recordar, a los que ya partieron: Juan Torres Lavandeira, Begoña Seijo y José Luis Gómez Amoza. Reconocer especialmente a Noemi Csaba por su confianza, consejos y fantástica ayuda. Mención especial también a Dolores Torres y a Begoña Seijo, dos grandes ferrolanas pero, sobre todo, dos grandes personas que siempre me han ayudado, mostrado su apoyo y su buen hacer, como fruto de su calidad humana.

A Rafael Romero… Me sorprendió su retranca gallega y su ingenio pero, sobre todo, su profesionalidad. Agradezco que siempre nos fuese a ayudar en los momentos más complicados, y nos dedicase tiempo dentro de su apretada agenda.

A las técnicas/os de microscopía del CACTUS: Raquel, María José, Mercedes, Ramiro, Ezequiel y Javier, por vuestra cercanía, amabilidad, simpatía, ayuda y consejos.

A las técnicas del CiMUS: Montse, Ana y Luz por vuestra ayuda y generosidad.

A los técnicos de la USC Gonzalo y Miguel Anxo, por su ayuda eficaz.

Al Decano Fran, a la anterior Decana Bebel, a la Vicedecana Reyes, a la Vicedecana Paz, a Teresa (de Asuntos Económicos), a la Técnica Chus, al Técnico Julio y a la Secretaria del Departamento Sagrario por vuestra ayuda. A los conserjes Joses, Vicky, María, Alfonso y Chelo, que han sido muy agradables, simpáticos, voluntariosos y súper trabajadores… En especial a Chelo… que es una

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

gran amiga. A las señoras que se encargan de la limpieza, que son unas currantas… En concreto, a Socorro, Merche, Celsa y Sandra, por compartir vuestras alegrías, vuestras penas y, sobre todo, por hacernos tanta compañía día tras día y darnos vuestros ánimos. Y no quiero olvidarme de los Profesores Arturo, Monteagudo, Matilde, Creus y Cristina por las charlas distendidas en el café y las risas…

A Carlos Calderón… Por ayudarnos en cuanto estaba de su mano como profesional y como amigo. Su eficacia y profesionalidad son resultado de su buen hacer como persona.

A mis jefas/es de las Oficinas de Farmacia que me dieron la oportunidad de ganarme la vida honradamente para costearme mis estudios de Máster y Doctorado, y que me permitieron desarrollarme profesionalmente en ese otro ámbito: Farmacia Rodríguez y Rivas C.B. (Ferrol), Farmacia Esteban Pantoja e Hijos C.B. (Cedeira), Farmacia Maceiras Bidegain (Narón), Farmacia del Cantón (Ferrol), Farmacia Benigna Villasuso Cores (Monfero), Farmacia Isabel Campo (Ferrol). A mis compañeras/os de estas Oficinas de Farmacia que me han ayudado y enseñado.

A mis amigas/os…A Mariluz, por su cariño, apoyo, ánimos y ser una luz en el camino; a Irene, por ser mi hermana moral (mi trilliza), mi fiel amiga y por su cariño; a Carlos y Rosi, por ser mis amigos del alma; a Eva María, por animarnos siempre, por nuestras charlas divertidas, y por valorar y entender lo que hacíamos en nuestras Tesis; a Celsa, por ser tan comprensiva, por su corazón enorme, su sensibilidad y por valorarnos siempre; a Reyes… por su apoyo y por llamarnos "Señoritas Doctoras", aunque todavía no lo fuéramos. A Mou, a María, a Lorena, a Almudena, a Noelia, a Tatiana, a Fran y a Merchy… Por todas vuestras palabras de ánimo, por vuestra confianza en nosotras, por ser tan buenas/os amigas/os, por vuestro apoyo en los buenos y malos momentos… y, sobre todo, por vuestro cariño. ¡Gracias a todas/os!

A Sonia, a Manolo y a Óscar por ser parte de mi familia durante mucho tiempo. Agradezco el cariño, el apoyo y los ánimos que nos dieron para seguir adelante. Óscar… ¡Deseo que seas muy feliz en el cielo!

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A mi familia: mi tías/os Julia, Manel, Rafael y Carmen; a mis primas/os: Jose, Pablo, Sergio, Rafita, María del Mar, Bárbara y Antía; por confiar en nosotras y valorar nuestro esfuerzo desde pequeñas. A Fran, que es como otro primo, le agradezco toda su ayuda. Y al resto de mi familia, que nos dan su apoyo.

A mi familia del cielo, que siempre siento su amor: a mi tía Rosa, por ser mi segunda madre y la mejor tía que pudiera tener; a mi primo Fran, por enseñarme que por muy dura que sea la vida, hay que aprender y luchar hasta el final; a mis abuelos paternos Manolo y Magdalena, por vuestro amor y generosidad, por compartir lo que teníais con nosotras y por transmitir el trabajo duro a través de la familia; a mi abuelo materno Andrés, por ser mi padrino, un cachito de pan, un bromista, un gran abuelo y, sobre todo, una gran persona; y a mi hermano Roberto Carlos (Killo), por cuidarnos, por mostrarnos que hay más mundo detrás de los libros, por enseñarnos que por "perder" un año académico, o dos o tres en la vida no pasa nada… por enseñarnos que cada día hay que ser feliz… por su alegría, por valorarnos, por darnos ánimo, por el orgullo que siente por nosotras y por su apoyo que sé que nos está dando desde el cielo: *"¡Seguid adelante, niñas!"*. ¡Gracias por todos los momentos felices vividos como hermanos!

A mis padres, Carlos y Reme por vuestro amor, por darnos el apoyo que tanto necesitábamos para crecer personal, profesional y académicamente, por enseñarnos desde pequeñas a entender el valor que tienen las cosas y el esfuerzo del trabajo duro. Concretamente, a mi padre por enseñarme a ser respetuosa con todo el mundo y a cada uno dedicarle el tiempo que se merece; por enseñarme que hay que levantarse cuando la vida te tira al suelo; a que el éxito sólo es para aquellas personas que creen en él... Y a cruzar las "piedras del río"… A mi madre, en especial, por enseñarnos desde pequeñas a ser autosuficientes; por demostrarnos que se pueden sacar fuerzas de donde sea, aunque se esté pasando por los momentos más duros; por ser el pilar de la familia; por darnos el ejemplo de lo que es ser una "mujer campeona"… Y porque, aunque no entendiera bien lo que hacíamos, nos seguía animando diciéndonos: "Vosotras sabéis lo que tenéis que hacer" y "Si es bueno para vosotras, es bueno para mí".

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Me gustaría terminar mis agradecimientos con la persona que más se lo merece: mi hermana Fany. Agradecer toda la ayuda que me ofreció desde pequeña… Nunca me imaginé llegar tan lejos; por confiar en mí; por ser mi maestra de los estudios y de la vida; por darme el apoyo cuando lo he necesitado; por hacerme reír tantas veces; por ser "mi muy mejor amiga" y "compañera de la vida"; por enseñarme a ser mejor persona; por ser mi referente y modelo a seguir en la vida; por el amor que me da… El más bonito de todos… ¡No podría ser más afortunada!

Finalmente, me gustaría agradecer a Dios y a la vida las oportunidades que me han dado y que me están dando de seguir siempre adelante, de crecer como persona, de desarrollarme profesionalmente, de salir de mi zona de confort y de descubrir que soy capaz de hacer cosas espectaculares.

Cristina Fernández Paz
En Narón, 25 de agosto de 2021

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

TABLA DE CONTENIDO

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Tabla de contenido

Listados 27
Abreviaturas (I, con letras latinas) 29
Abreviaturas (II, con letras griegas) 35
Fórmulas químicas 35
Sistemas micro- y nanoparticulados 36
Unidades 37

Listado de figuras 38

Listado de tablas 45

1. Resumen 49

2. Introducción 53
2.1. Redes metal-orgánicas (MOFs) 55
2.2. Interés de las MOFs para aplicaciones biomédicas 56
2.3. Aplicación de las MOFs en administración de fármacos 59
2.3.1. Vía parenteral 59
2.3.2. Vía cutánea 66
2.3.3. Vía oral 72
2.3.4. Vía bucal 77
2.3.5. Vía ocular 79
2.3.6. Vía rectal 82
2.3.7. Vía pulmonar 85
2.4. Interés de la vía pulmonar para la administración de fármacos 88
2.4.1. Anatomofisiología del tracto respiratorio 88
2.4.2. Administración de AIs para efectos local y sistémico 91
2.4.3. Interés de la administración de antibióticos por vía pulmonar ... 98

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.4.4. Tuberculosis pulmonar 99
2.4.5. Tratamiento de la tuberculosis: Isoniazida (INH) 100
2.5. Biocompatibilidad de las mofs con el pulmón 103
2.5.1. Estudios *in vitro* *103*
2.5.2. Estudio *ex vivo* *104*
2.5.3. Estudios *in vivo* *105*
2.6. Perspectiva actual: ensayos clínicos y comercialización de medicamentos a base de mofs para la administración pulmonar de fármacos 106

3. Antecedentes, hipótesis y objetivos 107

4. Materiales y métodos 113
4.1. Materiales 115
4.2. Síntesis y caracterización de las MOFs 116
4.2.1. Síntesis y activación de MIL-100 116
4.2.2. Encapsulación de isoniazida (INH) 116
4.2.3. Cálculo del porcentaje de humedad y porcentaje de materia seca de las MOFs 117
4.2.4. Dispersión de las MOFs 118
4.2.4.1. MOFs destinadas a estudios celulares 118
4.2.4.2. MOFs destinadas a formulación por atomización 119
4.2.5. Caracterización fisicoquímica y morfológica de las MOFs dispersadas 121
4.3. Microencapsulación de las MOFs y caracterización de las microsferas (MS) obtenidas 121
4.3.1. Preparación de MS control y selección del mejor excipiente de atomización 121
4.3.2. Microencapsulación de las NPs MIL-100 e INH@MIL-100: Obtención de Ma-MIL-100 MS y Ma-IHN@MIL-100 MS 122
4.3.3. Caracterización morfológica y aerodinámica de las MS 123
4.3.4. Estudio de composición e integridad estructural de las MS 124
4.4. Estudio de liberación de las nps mil-100 e inh@mil-100 a partir de las microsferas de manitol (Ma MS). Estabilidad coloidal y química, y liberación de isoniazida (INH) 126
4.5. Estudios *in vitro* en la línea celular a549 127

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.5.1. Línea celular A549 127
4.5.2. Preparación y caracterización de formulaciones 127
4.5.3. Preparación de las soluciones test de Ma 128
4.5.4. Estudios de viabilidad celular 128
4.5.5. Captación intracelular y distribución 130
4.5.6. Cuantificación de células A549 internalizadas con NPs: Citometría de flujo 132
4.6. Estudios *in vivo* 133
4.6.1. Distribución pulmonar de las NPs MIL-100 e INH@ MIL-100 microencapsuladas 134
4.6.1.1. Estudio histológico 134
4.6.1.2. Biodistribución 135
4.6.2. Examen toxicológico 136
4.6.2.1. Determinación de interleucina-6 (IL-6) 136
4.6.2.2. Estudio histopatológico de los pulmones 136

5. Resultados y discusión 137
5.1. Síntesis y caracterización de las MOFs 139
5.1.1. Encapsulación de isoniazida (INH) 139
5.1.2. Cálculo del porcentaje de humedad y porcentaje de materia seca de las MOFs 142
5.1.3. Caracterización fisicoquímica y morfológica de las MOFs dispersadas 143
5.2. Microencapsulación de las MOFs y caracterización de las microsferas (MS) obtenidas 145
5.2.1. Caracterización de MS control y selección del mejor excipiente de atomización 145
5.2.2. Caracterización de las Ma-MIL-100 MS y Ma-INH@ MIL-100 MS: Morfología y propiedades aerodinámicas 148
5.2.3. Estudio de composición e integridad estructural de las MS 152
5.3. Estudio de liberación de las NPs MIL-100 e INH@MIL-100 a partir de las microsferas de manitol (Ma MS). Estabilidad coloidal y química, y liberación de isoniazida (INH) 161
5.4. Estudios *in vitro* en la línea celular A549 169
5.4.1. Estudios de viabilidad celular 169
5.4.2. Captación intracelular y distribución 173

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.4.3. Cuantificación de células A549 internalizadas con NPs: Citometría de flujo 177
5.5. Estudios *in vivo* *182*
5.5.1. Distribución pulmonar de las NPs MIL-100 e INH@ MIL-100 microencapsuladas 182
5.5.2. Examen toxicológico 189
5.5.2.1. Determinación de interleucina-6 (IL-6) 189
5.5.2.2. Estudio histopatológico de los pulmones 189

6. Conclusiones 193

7. Perspectivas 197

8. Bibliografía 201

9. Declaraciones: Conflicto de interés, uso de imágenes y contenido publicado 235

10. Permisos 247

11. Listas de verificación 263

12. Financiación 271

13. Premio 275

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

LISTADOS

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Listado de abreviaturas (I, con letras latinas)

Abreviatura	Inglés	Español
ADN	deoxyribonucleic acid	ácido desoxirribonucleico
AI/s	active ingredient/s	ingrediente/s activo/s
ALF	artificial lysosomal fluid	fluido lisosomal artificial
anti-TB	antituberculosis	antituberculoso/s
AzA	azelaic acid	ácido azelaico
AZT-TP	azidothymidine triphosphate	azidotimidina trifosfato
A549	line cell of adenocarcinoma human alveolar basal epithelial	línea celular de adenocarcinoma epitelial basal alveolar humano
BAL	bronchoalveolar lavage	lavado bronchoalveolar
BALF	bronchoalveolar lavage fluid	líquido de lavado bronchoalveolar
BET	Brunauer, Emmett and Teller equation	Ecuación de Brunauer, Emmett y Teller
bioMOF/s	biological metal-organic frameworks (whose linkers are biomolecules)	redes metal-orgánicas biológicas (cuyos ligandos son biomoléculas)
Bri	brimonidine	brimonidina
BTCA	benzene-1,3,5-tricarboxyl + adenine	benceno-1,3,5-tricarboxílico + adenina
Bu	busulfan	busulfán
Calu-3	human lung cancer cell line	línea celular de cáncer de pulmón humano

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CDV	cidofovir	cidofovir
CI	cellular index	índice celular
CLSM	confocal laser scanning microscopy	microscopía de barrido láser confocal
CMC	carboxymethylcellulose	carboximetilcelulosa
CRC	colorectal cancer	cáncer colorrectal
CRR	cosmic ray remover	corrector de rayos cósmicos
CS	chitosan	quitosano
D_{aer}	aerodynamic diameter	diámetro aerodinámico
DAPI	4´,6-diamino-2-phenylindole	4 ',6-diamidino-2-fenilindol
DDP	cisplatin	cisplatino
DDS	drug delivery system/s	sistema/s de administración de fármaco/s
Dex	dextran	dextrano
D_g	geometric diameter	diámetro geométrico
DLS	dynamic light scattering	dispersión dinámica de luz
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DOPC	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DOX	doxorubicin	doxorrubicina
DPIs	dry powder inhalers	inhaladores de polvo seco
EA	elemental analysis	análisis elemental
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	ácido etilendiaminotetraacético
FBS	fetal bovine serum	suero fetal bovino

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FCM	flow cytometry	citometría de flujo
FDA	Food and Drug Administration	Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
Fru	D-(-)-fructose	D-(-)-fructosa
FSC	forward scattering	dispersión hacia adelante
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy	espectrofotometría de infrarrojos por transformada de Fourier
5-FU	5-fluorouracil	5-fluorouracilo
GEL	gelatin from pig skin	gelatina de piel de cerdo
GMP	gemcitabine monophosphate	gemcitabina monofosfato
HA	hyaluronic acid	ácido hialurónico
HD	high dose	dosis alta
HPLC	high performance liquid chromatography	cromatografía líquida de alta resolución
IBU	ibuprofen	ibuprofeno
IBUNa	sodium ibuprofen	ibuprofeno sódico
ICP-OES	inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy	espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente
IL-6	interleukin-6	interleucina-6
INH	isoniazid	isoniazida
i.v.	intravenous	intravenoso
LC	leucine	leucina
LD	low dose	dosis baja
LDA	laser doppler anemometry	anemometría láser doppler

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Ma	D-mannitol	D-manitol
Man	D-(+)-mannose	D-(+)-manosa
MFI	mean fluorescence intensity	intensidad media de fluorescencia
MIL	material of Institut Lavoisier	material del Instituto Lavoisier
MOF/s	metal-organic framework/s	red/es metal-orgánicas
MP/s	microparticle/s	micropartícula/s
MRI	magnetic resonance imaging	imagen de resonancia magnética
MS	microsphere/s	microsfera/s
MW	molecular weight	peso molecular
nanoMOF/s	nano-sized metal-organic framework/s	red/es metal-orgánica/s de tamaño nanométrico
NC/s	nanocapsule/s	nanocápsula/s
Nic	nicotinamide	nicotinamida
NP/s	nanoparticle/s	nanopartícula/s
Ola	oleanolic acid	ácido oleanólico
PBS	phosphate buffered saline	tampón fosfato salino
PDA	photodiode array	matriz de fotodiodos
PDD	cisplatin	cisplatino
PdI	polydispersity index	índice de polidispersión
PEG	polyethylene glycol	polietilenglicol
PLGA	poly(lactic-co-glycolic acid)	ácido poliláctico-co-glicólico
POA	pyrazinoic acid	ácido pirazinoico

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

P/S	Prussian blue	Azul de Prusia
PU	polyurethane	poliuretano
PVA	polyvinyl alcohol	alcohol polivinílico
PXRD	powder X-ray diffraction	difracción de rayos X en polvo
PY	process yield	rendimiento del proceso
PZA	pyrazinamide	pirazinamida
RFB	rifabutin	rifabutina
RGD	peptide arginine-glycine-aspartic acid	péptido arginina-glicina-ácido aspártico
ROS	reactive oxygen species	especies de oxígeno reactivas
RT	room temperature	temperatura ambiente
SA	salicylic acid	ácido salicílico
S.D.	standard deviation	desviación estándar
SDS	sodium dodecyl sulphate	dodecilsulfato sódico
SDZ	sulfadiazine	sulfadiazina
SEM	scanning electron microscope	microscopía electrónica de barrido
SIDA	acquired immunodeficiency syndrome	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SLF	simulated lung fluid	fluido pulmonar simulado
SLN	solid lipid nanoparticles	nanopartículas lipídicas sólidas
Sor	D-sorbitol	D-sorbitol
SSC	side scattering	dispersión lateral

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Sub BG	sub background	línea base
t	time	tiempo
TB	tuberculosis	tuberculosis
TEM	transmission electron microscopy	Microscopía electrónica de barrido
TGA	thermogravimetric analysis	análisis termogravimétrico
T_{Inlet}	inlet temperature	temperatura de entrada
TM	timolol	timolol
T_{Outlet}	outlet temperature	temperatura de salida
TPP	tripolyphosphate	tripolifosfato
Tre	D-(+)-trehalose dihydrate	D-(+)-trehalosa dihidrato
t.s.c.	total solids content	contenido en sólidos totales
Vp	pore volume	volumen de poros
UiO	University of Oslo	Universidad de Oslo
WHO	World Health Organization	Organización Mundial de la Salud (OMS)
ZIF	zeolitic imidazole frameworks	redes de imidazol zeolítico
ZJU	University of Zhejiang	Universidad de Zhejiang

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Listado de abreviaturas (II, con letras griegas)

Abreviatura	Inglés	Español
α-CD	α-cyclodextrin	ciclodextrina α
λ	dynamic shape factor	factor de forma dinámica
$\lambda_{Ex/Em}$	excitation and emission wavelength values	valores de longitud de onda de excitación y de emisión
ρ_{real}	real density	densidad real
TNF-α	tumor necrosis factor alpha	factor de necrosis tumoral alfa

Listado de fórmulas químicas

Fórmula	Inglés	Español
CO	carbon monoxide	monóxido de carbono
EtOH	ethanol	etanol
$FeCl_3.6H_2O$	iron(III) chloride hexahydrate	cloruro férrico hexahidratado
H_3BTC	trimesic acid or 1,3,5-benzenetricarboxylic acid	ácido trimésico o ácido benceno-1,3,5-tricarboxílico
H_3PO_4	phosphoric acid	ácido fosfórico
KF	potassium fluoride	fluoruro de potasio
MeOH	methanol	metanol
NO	nitric oxide	óxido nítrico
H_2O_2	hydrogen peroxide	peróxido de hidrógeno
H_2S	hydrogen sulfide	sulfuro de hidrógeno

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Listado de sistemas micro- y nanoparticulados

Sistema	Inglés	Español
MIL-100 NP/s*	nanoparticle/s of iron (III) trimesate metal-organic framework/s	nanopartícula/s de red/es metal orgánica/s de trimesato de hierro (III)
INH@MIL-100 NP/s	nanoparticle/s of isoniazid-loaded iron (III) trimesate metal-organic framework/s	nanopartícula/s de red/es metal orgánica/s de trimesato de hierro (III) cargada/s de isoniazida
Ma MS	mannitol microsphere/s	microsfera/s de manitol
Ma-MIL-100 MS	mannitol microsphere/s containing iron (III) trimesate metal-organic frameworks nanoparticles	microsfera/s de manitol conteniendo nanopartículas de redes metal orgánicas de trimesato de hierro (III)
Ma-INH@MIL-100 MS	mannitol microsphere/s containing isoniazid-loaded iron (III) trimesate metal-organic frameworks nanoparticles	microsfera/s de manitol conteniendo nanopartículas de redes metal orgánicas de trimesato de hierro (III) cargadas con isoniazida
α-CD MS	α-cyclodextrin microsphere/s	microsfera/s de ciclodextrina α

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Dex MS	dextran microsphere/s	microsfera/s de dextrano
Man MS	mannose microsphere/s	microsfera/s de manosa
Tre MS	trehalose microsphere/s	microsfera/s de trehalosa
Sor MS	sorbitol microsphere/s	microsfera/s de sorbitol
Fru MS	fructose microsphere/s	microsfera/s de fructosa

* Las MIL-100 pueden estar constituidas de diferentes metales (ej.: Fe, Al, Cr) pero, cuando se emplee este término en el presente trabajo de Tesis, será para referenciar a las MOFs de trimesato de hierro (III): MIL-100(Fe); en concreto, a los carboxilatos de Fe (III): Fe_3O-$(H_2O)_2OH(BTC)_2]\cdot nH_2O$.

Listado de unidades

Símbolo	**Inglés**	**Español**
rpm	revolutions per minute	revoluciones por minuto
$tap\cdot min^{-1}$	taps per minute	golpes por minuto
v/v	volume/volume	volumen/volumen
wt%	percentage in weight	porcentaje en peso
w/v	weight/volume	peso/volumen
w/w	weight/weight	peso/peso

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Listado de figuras

Figura 1. Esquema simplificado de formación de una MOF. La unión de ligandos orgánicos polidentados (representados con palos rojos) y unidades inorgánicas (indicadas mediante esferas azules), dan lugar a la estructura en forma de red de la MOF. (Figura de nueva creación) 55

Figura 2. Formación de la estructura de MOF MIL-100. En el cuadro, se representan los trímeros de los átomos del metal(III) hexacoordinado (en forma de octaedro) que, tras la coordinación con el ligando trimesato, forman un supertetraedro híbrido. El ensamblado de los supertetrahedros da lugar a la formación de una estructura cúbica de tipo zeolítico (imagen TEM), en donde hay dos tipos de cavidades mesoporosas (25 y 29 Å), accesibles a través de ventanas penta- (4.5*5.5 Å) y/o hexagonales (12 Å). Para su mejor comprensión, los poliedros metálicos se representan en naranja, los átomos de carbono en negro, los átomos de oxígeno en rojo y los átomos de hidrógeno han sido eliminados para mayor claridad. (Figura adaptada del trabajo de Liu et al. [61], ACS Appl. Mater. Interfaces. 9 (2017) 20255-20275. Copyright © 2017, American Chemical Society)..... 58

Figura 3. Ramificaciones dicotómicas del tracto respiratorio a medida en que se profundiza en el pulmón. (Imagen libre de derechos de autor)..... 89

Figura 4. Anatomía del tracto respiratorio. (Imagen libre de derechos de autor)..... 90

Figura 5. Mecanismos de depósito de las partículas inhaladas en el tracto respiratorio. (Figura adaptada del trabajo de Davenport et al. [129], Front. Physiol. 1 (2010) 139-146. Open Access Statement)93

Figura 6. Estructura del ascensor mucociliar. (Figura adaptada del trabajo de Pérez et al. [147], Rev. médica Chile. 142 (2014) 606-615. Bajo licencia Creative Commons)..... 96

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 7. Estructura química de la isoniazida (INH). (Figura de nueva creación) 101

Figura 8. (a) Patrones PXRD, (b) TGA e (c) Isotermas de adsorción/desorción de N_2 a 77 K de las NPs MIL-100 e INH@MIL-100. El patrón PXRD de la INH libre se ha incluido para su comparación en la Figura 8a. Los símbolos coloreados y huecos en la Figura 8c indican la rama de adsorción y desorción, respectivamente. (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors) 140

Figura 9. Espectros FTIR de los materiales INH, INH@MIL-100 y MIL-100: (a) en un rango de espectro amplio, aproximadamente de 4000 a 400 cm^{-1} y (b) una sección de ese espectro, alrededor de 1800 a 400 cm^{-1}. (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors) 142

Figura 10. Microfotografías TEM de: (a) NPs MIL-100 y (b) NPs INH@MIL-100 dispersadas en agua MilliQ. Escala: 100 nm. (Figura de nueva creación) 145

Figura 11. Microfotografías SEM de MS control de: (a) Ma, (b) α-CD, (c) Dex y (d) Tre. (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors) 147

Figura 12. Microfotografías SEM de Ma-MIL-100 MS preparadas con una relación MIL-100:Ma de: (a) 1:5, (b) 1:10 y (c) 1:100. (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors)..... 149

Figura 13. Microfotografías SEM de Ma MS preparadas a: (a) 170 °C y (b) 160 °C. (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors) 150

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 14. Microfotografía SEM de: (a) Ma-MIL-100 MS y (b) Ma-INH@MIL-100 MS. (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors)..... 151

Figura 15. Patrones PXRD de: (a) MIL-100, INH@MIL-100 e INH, y (b) INH@MIL-100, Ma-INH@MIL-100 MS y Ma MS. (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors)..... 153

Figura 16. Espectros de superficie RAMAN de: (a) Ma MS y (b) Ma-MIL-100 MS. (Figura de nueva creación)..... 155

Figura 17. Espectros RAMAN en diferentes planos de una Ma-MIL-100 MS: pico específico de MIL-100 (flecha de color naranja, columna de la izquierda) y pico característico de Ma (flecha de color verde, columna de la derecha). Los planos son: (a y h) Plano 2: 0.38 µm, (b y i) Plano 4: 0.76 µm, (c y j) Plano 6: 1.14 µm y (d y k) Plano 8: 1.52 µm. (Figura de nueva creación) 156

Figura 17 (continuación). Espectros RAMAN en diferentes planos de una Ma-MIL-100 MS: pico específico de MIL-100 (flecha de color naranja, columna de la izquierda) y pico característico de Ma (flecha de color verde, columna de la derecha). Los planos son: (e y l) Plano 10: 1.90 µm, (f y m) Plano 12: 2.28 µm y (g y n) Plano 14: 2.66 µm. (Figura de nueva creación)..... 157

Figura 18. Imágenes RAMAN en diferentes planos de una Ma-MIL-100 MS, donde las NPs MIL-100 están representadas en color rojo y el excipiente Ma, en azul: (a) Plano 2: 0.38 µm, (b) Plano 4: 0.76 µm, (c) Plano 6: 1.14 µm, (d) Plano 8: 1.52 µm, (e) Plano 10: 1.90 µm, (f) Plano 12: 2.28 µm y (g) Plano 14: 2.66 µm. (Figura de nueva creación)..... 158

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 19. Imágenes de CLSM de Ma-MIL-100 MS: Ma-Bodipy (canal rojo, primera columna), NPs MIL-100 (canal verde, segunda columna) y canales superpuestos (tercera columna). (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [195], ACS Appl. Mater. Interfaces. 12 (2020) 25676-25682. Copyright © 2020, American Chemical Society) 160

Figura 20. Estabilidad coloidal de las NPs MIL-100 liberadas a partir de las MS en: (a) agua, (b) PBS y (c) SLF, mostrando la evolución del tamaño de las NPs (negro, izquierda) y de la carga superficial (rojo, derecha) *vs.* tiempo (media ± S.D.; n = 3). (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [195], ACS Appl. Mater. Interfaces. 12 (2020) 25676-25682. Copyright © 2020, American Chemical Society)..... 162

Figura 21. Estabilidad coloidal de las NPs INH@MIL-100 liberadas a partir de las MS en: (a) agua, (b) PBS y (c) SLF, mostrando la evolución del tamaño de las NPs (negro, izquierda) y de la carga superficial (rojo, derecha) *vs.* tiempo (media ± S.D.; n = 3). (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors)..... 163

Figura 22. Liberación de INH (%) (rojo) desde las NPs INH@MIL-100 y degradación de MOFs (%) (azul) en agua (círculo), PBS (pH = 7.4) (cuadrado) y SLF (triángulo) *vs.* tiempo durante: (a) 168 h y (b) las primeras 8 h (media ± S.D.; n = 3). (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors)..... 166

Figura 23. Microfotografías TEM de las NPs de INH@MIL-100 liberadas desde Ma MS en: (a) agua MilliQ, (b) PBS y (c) SLF. (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors)..... 167

Figura 24. Patrones PXRD de: (a) NPs de MIL-100 liberadas en SLF y Ma-MIL-100 MS; (b) NPs de INH@MIL-100 liberadas en SLF y Ma-INH@MIL-100 MS. (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors)..... 168

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 25. Viabilidad celular a las 24 h (círculo) y 48 h (triángulo) tras la eliminación de NPs MIL-100 (azul), NPs INH@ MIL-100 (rojo) y Ma (verde) en células A549, medido por la fluorescencia de CellTiter-Blue® (media ± S.D.; n = 4). (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors) 170

Figura 26. Imágenes Luna II de: (a) células A549 (control positivo de viabilidad), (b) células A549 tratadas con NPs MIL-100, (c) células A549 incubadas con NPs INH@MIL-100 y (d) A549 tratadas con Tritón (control negativo de viabilidad). Las células vivas y muertas se marcaron con un círculo verde y rojo, respectivamente (media ± S.D.; n = 3). (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors)..... 172

Figura 27. Imágenes CLSM de células A549: (a-c) sin NPs (control), (d-f) con NPs de MIL-100 (17.2 µL), (g-i) con NPs de INH@ MIL-100 (17.2 µL) y (j-l) con NPs de INH@MIL-100 (20 µL). Canal verde: MOFs, autorreflexión del Fe; canal azul: núcleos celulares, DAPI. Escala: 100 nm. (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors)..... 174

Figura 27 (continuación). Imágenes CLSM de células A549: (m-o) con NPs de INH@MIL-100 (30 µL), (p-r) con NPs de INH@ MIL-100 (40 µL) y (s-u) con NPs de INH@MIL-100 (50 µL). Canal verde: MOFs, autorreflexión del Fe; canal azul: núcleos celulares, DAPI. Escala: 100 nm. (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors)..... 175

Figura 28. Imágenes CLSM de células A549: (a-c) con NPs de MIL-100 (17.2 µL) y (d-f) con NPs de INH@MIL-100 (20 µL). Canal verde: MOFs, autorreflexión del Fe; canal azul: núcleos celulares, DAPI. Escala: 25 nm. (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors)..... 176

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 29A. Análisis del primer replicado de células cargadas con NPs de MIL-100 e INH@MIL-100 por FCM: (a) diagramas de dispersión de FCM de la población total de eventos, (b) gráficos de dispersión de FCM del área de complejidad positiva seleccionada [el eje vertical es la dispersión lateral (SSC) y el eje horizontal es la dispersión directa (FSC)], (c) histogramas de FCM de la intensidad de fluorescencia media del reactivo de viabilidad Aqua. (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors) 178

Figura 29B. Análisis del segundo replicado de células cargadas con NPs de MIL-100 e INH@MIL-100 por FCM: (a) diagramas de dispersión de FCM de la población total de eventos, (b) gráficos de dispersión de FCM del área de complejidad positiva seleccionada [el eje vertical es la dispersión lateral (SSC) y el eje horizontal es la dispersión directa (FSC)], (c) histogramas de FCM de la intensidad de fluorescencia media del reactivo de viabilidad Aqua. (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors) 179

Figura 29C. Análisis del tercer replicado de células cargadas con NPs de MIL-100 e INH@MIL-100 por FCM: (a) diagramas de dispersión de FCM de la población total de eventos, (b) gráficos de dispersión de FCM del área de complejidad positiva seleccionada [el eje vertical es la dispersión lateral (SSC) y el eje horizontal es la dispersión directa (FSC)], (c) histogramas de FCM de la intensidad de fluorescencia media del reactivo de viabilidad Aqua. (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors) 180

Figura 30. Cortes histológicos de pulmón de rata tratada con Ma MS (control, columna de la izquierda) y con Ma-MIL-100 MS (columna de la derecha) a diferentes niveles: lóbulo superior, medio e inferior (de arriba abajo). Escala: 10 μm. (Figura de nueva creación)..... 183

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 31. Secciones histológicas de pulmones: control, Ma-MIL-100-0.5-LD, Ma-MIL-100-0.5-HD y Ma-MIL-100-24-HD, de izquierda a derecha. Los pulmones se tiñeron con hematoxilina-eosina y las NPs, con P/S. (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [195], ACS Appl. Mater. Interfaces. 12 (2020) 25676-25682. Copyright © 2020, American Chemical Society)..... 184

Figura 32. Concentración del ligando H_3BTC (%) en diferentes regiones pulmonares (superior, medio e inferior) del pulmón derecho y tráquea encontradas en los diferentes grupos en donde se administró: Ma-MIL-100-0.5-LD, Ma-MIL-100-0.5-HD y Ma-MIL-100-24-HD. (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [195], ACS Appl. Mater. Interfaces. 12 (2020) 25676-25682. Copyright © 2020, American Chemical Society)..... 187

Figura 33. Concentración del ligando H_3BTC (%) en hígado, bazo y riñón tras la administración de Ma-MIL-100 MS para los dos grupos de animales administrados con altas dosis a 0.5 y 24 h (Ma-MIL-100-0.5-HD y Ma-MIL-100-24-HD). (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [195], ACS Appl. Mater. Interfaces. 12 (2020) 25676-25682. Copyright © 2020, American Chemical Society)..... 187

Figura 34. Fotos de pulmones recién extraídos de rata: sin tratar (primera columna) y de ratas tratadas con Ma MS (control), Ma-MIL-100 MS y Ma-INH@MIL-100 MS (columnas 2, 3 y 4, respectivamente). (Figura de nueva creación)..... 189

Figura 35. Fotos de cortes histológicos de pulmones de ratas tratadas con: (a) Ma MS 0.5 h (control), (b) Ma-MIL-100 MS 0.5 h, (c) Ma-INH@MIL-100 MS 0.5 h y (d) Ma-INH@MIL-100 MS 24 h. Escala: 10 μm. (Figura de nueva creación)..... 190

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Listado de tablas

Tabla 1. Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía parenteral. 62

Tabla 1 (continuación 1). Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía parenteral. 63

Tabla 1 (continuación 2). Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía parenteral. 64

Tabla 1 (continuación 3). Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía parenteral. 65

Tabla 2. Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía cutánea..... 68

Tabla 2 (continuación 1). Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía cutánea. 69

Tabla 2 (continuación 2). Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía cutánea. 70

Tabla 2 (continuación 3). Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía cutánea. 71

Tabla 3. Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía oral..... 74

Tabla 3 (continuación 1). Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía oral. 75

Tabla 3 (continuación 2). Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía oral. 76

Tabla 4. Ejemplo investigado para la administración de fármacos por vía bucal..... 78

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 5. Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía ocular. 80

Tabla 5 (continuación). Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía ocular. 81

Tabla 6. Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía rectal. 83

Tabla 6 (continuación). Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía rectal. 84

Tabla 7. Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía pulmonar. 87

Tabla 8. Concentraciones de nanoMOFs en DMEM y de Ma en DMEM evaluadas en células A549. 129

Tabla 9. Condiciones empleadas en el estudio de captación y distribución intracelular de NPs de MIL-100 e INH@MIL-100 (3.2 $mg \cdot mL^{-1}$ en agua MilliQ) en células A549. 132

Tabla 10. Ejemplos de porcentaje de humedad y su correspondiente porcentaje de materia seca de MOFs (sin/con INH)..... 143

Tabla 11. Características fisicoquímicas de las MOFs dispersadas en agua MilliQ (para estudios celulares) y en solución de Ma (para atomización) sin/con INH (media ± S.D.; n = 3)..... 144

Tabla 12. Rendimiento del proceso de atomización (wt%), morfología y densidad aparente ($g \cdot cm^{-3}$) de MS control (polvos secos) preparadas con diferentes excipientes (media ± S.D.; n = 3). 146

Tabla 13. Rendimientos de los procesos de atomización utilizando Ma (media ± S.D.; n = 3). 151

Tabla 14. Propiedades aerodinámicas y físicas de Ma MS, Ma-MIL-100 MS y Ma-INH@MIL-100 MS (media ± S.D.; n = 3)..... 152

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 15. Composición elemental (wt%) de Ma MS, Ma-MIL-100 MS y Ma-INH@MIL-100 MS..... 154

Tabla 16. Porcentajes de formulación en las diferentes regiones del tracto respiratorio a los 30 min de ser administradas, dependiendo de la dosis administrada (baja: LD; alta: HD) (media ± S.D.). 185

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. RESUMEN

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

El principal objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido el diseño y desarrollo de un nuevo sistema micro-nanoparticulado a base de redes metal-orgánicas (MOFs) para el tratamiento pulmonar de la tuberculosis (TB), sin fibrosis subyacente.

De este modo, las nanopartículas (NPs) de trimesato de hierro (III) mesoporoso MIL-100 fueron microencapsuladas en microsferas de manitol (Ma MS) mediante una técnica simple y eficiente de atomización. Además, el fármaco antituberculoso (anti-TB) de primera línea isoniazida (INH) se encapsuló en las MOFs (NPs INH@MIL-100), alcanzado una gran carga farmacológica. Se caracterizaron las Ma MS control, las Ma-MIL-100 MS y las Ma-INH@MIL-100 MS obtenidas, presentando propiedades morfológicas y aerodinámicas adecuadas para su llegada a la zona profunda del pulmón. Se llevó a cabo la liberación del sistema y del fármaco en medios fisiológicos simulados (agua MilliQ, tampón fosfato salino (PBS) y fluido pulmonar simulado (SLF)) a 37 °C. Se demostró que las partículas fueron liberadas con un tamaño nanométrico y carga negativa, siendo la INH más fácilmente liberada en PBS que en agua. Además, se realizaron estudios *in vitro* empleando la línea celular de adenocarcinoma epitelial basal alveolar humano A549. Se examinó la biocompatibilidad de las NPs MIL-100 e INH@MIL-100, así como del excipiente Ma demostrando baja citotoxicidad de los sistemas. La presencia y ubicación de ambos nanosistemas dentro de las células, fueron corroboradas mediante microscopía de barrido láser confocal (CLSM). Finalmente, se realizaron diferentes estudios *in vivo* administrando de forma intratraqueal las Ma MS control, Ma-MIL-100 MS y Ma-INH@MIL-100 MS a ratas Wistar-Kyoto. Las NPs se liberaron en el fluido alveolar, observándose una distribución homogénea de las mismas en el pulmón profundo. Además, se produjo una pequeña retención de la formulación en la tráquea. No hubo embolismo pulmonar, como se confirmó mediante observación macro y microscópica. El examen histopatológico de los pulmones demostró la presencia de un parénquima normal, con la apariencia típica de alvéolos de paredes delgadas y la ausencia de cualquier signo de inflamación.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

De este modo, los resultados confirman que nuestro sistema micro-nanoparticulado es un candidato prometedor para el tratamiento local de enfermedades infecciosas mediante la vía pulmonar, siendo interesante para el tratamiento de la TB.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. INTRODUCCIÓN

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2.1. Redes metal-orgánicas (MOFs)

La Nanotecnología es un área de investigación dentro de la Tecnología Farmacéutica de gran interés para la creación de nuevos vehículos farmacológicos destinados para uso terapéutico en el tratamiento de diferentes enfermedades [1].

Las MOFs constituyen en la actualidad uno de los materiales más prometedores para la administración de fármacos y otros ingredientes activos (AIs) [2,3]. Las MOFs son materiales híbridos cristalinos porosos basados en la asociación ionocovalente de subunidades inorgánicas (cationes aislados, clústeres, cadenas, planos o, incluso redes tridimensionales de cationes) y ligandos orgánicos polidentados que actúan como espaciadores entre los centros metálicos (carboxilatos, fosfonatos, compuestos nitrogenados, etc.). Esta unión crea un sistema tridimensional cristalino (Figura 1) con una gran versatilidad estructural y composicional, y una porosidad excepcional [2,4-6]. Gracias a estas propiedades, los MOFs se han propuesto en numerosas aplicaciones de interés social e industrial [7], como adsorción [8], catálisis [9],pilas de combustible [10], separación [11], sensores [12], alimentación [13] o medio ambiente [14], entre otros.

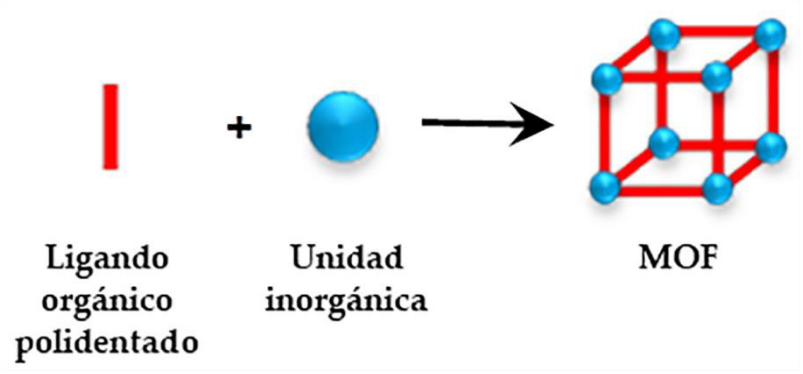


Figura 1. Esquema simplificado de formación de una MOF. La unión de ligandos orgánicos polidentados (representados con palos rojos) y unidades inorgánicas (indicadas mediante esferas azules), dan lugar a la estructura en forma de red de la MOF. (Figura de nueva creación)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Aunque su aplicación en biomedicina no surgió hasta 2006 [15], utilizando MOFs micrométricos basados en cromo como prueba de concepto, no fue hasta 2010 cuando se propusieron varias nanopartículas de MOF biocompatibles a base de hierro como sistemas de liberación de fármacos combinado a diagnóstico (teragnóstico) [16]. En este campo, se han estudiado principalmente MOFs basados en cationes biocompatibles o inertes como Ca, Mg, Zn, Fe, Zr y Ti [3]. Como ligandos, se han propuesto diversas moléculas orgánicas polidentadas de baja toxicidad o, incluso, biomoléculas contribuyendo a la bioseguridad y a la actividad terapéutica de la MOF resultante (también llamadas bioMOFs) [17,18]. Algunos ejemplos de moléculas biológicas empleadas son los aminoácidos, péptidos y proteínas, nucleobases, ciclodextrinas y porfirinas, entre otras [18-20].

Las MOFs presentan propiedades que las convierten en "únicas" para aplicaciones biomédicas. Entre ellas, cabe destacar su elevada porosidad (superficies BET de hasta 7000-8000 $m^2 \cdot g^{-1}$ con tamaños de poro de 3 a 90 Å) [21] y poseer una composición altamente versátil (tanto el ligando orgánico como las subunidades inorgánicas son modulables) [22]. Incluso, la superficie interna y externa de las MOFs se puede modificar para mejorar la funcionalidad [23]. En definitiva, las características morfológicas, estructurales y fisicoquímicas de las MOFs están determinadas por las propiedades de los ligandos orgánicos y las subunidades inorgánicas, siendo sistemas muy prometedores como vehículos para la administración de diferentes AIs [24-27].

2.2. Interés de las MOFs para aplicaciones biomédicas

Las MOFs presentan varias características que los hacen excelentes candidatos para diferentes aplicaciones biomédicas [28-30]: i) pueden sintetizarse de forma homogénea y estable [30-32], ii) presentan elevadas superficies de poros y, por lo tanto, buena capacidad de adsorción de fármacos (elevada carga farmacológica) [16]; iii) puede funcionalizarse la superficie interna (poros) y externa para establecer interacciones específicas con el AI [23], permitiendo el

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

proceso reversible de adsorción/desorción con el mismo, optimizar su estabilidad *in vivo* y/o mejorar su biodistribución [25,33]; iv) realizar la liberación del fármaco de forma controlada, evitando el "efecto burst", que es la liberación rápida del AI durante las primeras horas; v) posibilidad de emplear agentes de contraste saludables y componentes bioactivos (como cationes o ligandos orgánicos) en sus estructuras, llamados dichos sistemas bioMOFs) [17,18]; vi) estabilidad para llevar a cabo su función en el organismo y biodegradabilidad, impidiendo su acumulación endógena y, por tanto, los efectos tóxicos asociados [34].

Las MOFs pueden cargar y vehiculizar de forma controlada numerosos AIs, incluyendo fármacos [24-27,35,36], cosméticos [37,38], o macromoléculas, como material genético [39-44], proteínas [45-48] y vacunas [49]. Además, las MOFs pueden utilizarse también en la producción y liberación de gases terapéuticos [50-53] e, incluso, para el tratamiento de intoxicaciones orales causadas por sobredosis de fármacos [54,55]. Aún más, dependiendo de los materiales constituyentes, algunos tipos de MOFs pueden ser utilizadas como agentes de diagnóstico múltiple (con propiedades de imagen), en terapias avanzadas combinadas y en teragnosis [3]. Por ejemplo, los preparados con Mn, Gd o Fe pueden usarse en imágenes de resonancia magnética (MRI) [28,29,56,57]. Por tanto, las MOFs tienen un gran potencial en teragnosis (basada en la estrategia combinada de diagnóstico y tratamiento del paciente a la vez) [16,58], ofreciendo muchas ventajas en el seguimiento y tratamiento de los pacientes al mismo tiempo. Además, las MOFs pueden presentar otras ventajas, como propiedades antibacterianas, por ejemplo en aquellas con Ag, Cu o Zn en su estructura. En consecuencia, la multifuncionalidad de las MOFs permite unas amplias aplicaciones biomédicas [59].

En este trabajo, nos centraremos en la aplicación de las MOFs en la liberación controlada de fármacos. Para ello, las MOFs se pueden adaptar fácilmente en función de la carga del fármaco deseada, la vía de administración por la que se pretenden administrar en el organismo, los perfiles de liberación y las necesidades terapéuticas [25,33,39,60]. Además, de entre la gran variedad de MOFs, hemos

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

seleccionado una de las estructuras más prometedoras, la denominada MIL-100(Fe), basada en hierro(III) y el anión trimesato.

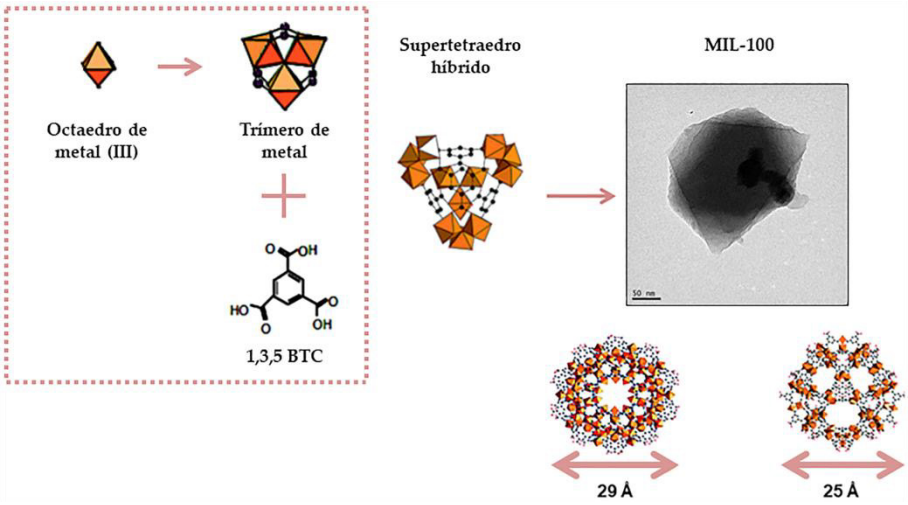


Figura 2. Formación de la estructura de MOF MIL-100. En el cuadro, se representan los trímeros de los átomos del metal(III) hexacoordinado (en forma de octaedro) que, tras la coordinación con el ligando trimesato, forman un supertetraedro híbrido. El ensamblado de los supertetrahedros da lugar a la formación de una estructura cúbica de tipo zeolítico (imagen TEM), en donde hay dos tipos de cavidades mesoporosas (25 y 29 Å), accesibles a través de ventanas penta- (4.5*5.5 Å) y/o hexagonales (12 Å). Para su mejor comprensión, los poliedros metálicos se representan en naranja, los átomos de carbono en negro, los átomos de oxígeno en rojo y los átomos de hidrógeno han sido eliminados para mayor claridad. (Figura adaptada del trabajo de Liu et al. [61], ACS Appl. Mater. Interfaces. 9 (2017) 20255-20275. Copyright © 2017, American Chemical Society)

Esta estructura cúbica presenta una porosidad muy elevada (S_{BET} ~ 1800 $m^2 \cdot g^{-1}$; volumen de poro ~1.2 $cm^3 \cdot g^{-1}$) con dos cavidades mesoporosas (2.5 y 2.9 nm, Figura 2) accesibles mediante ventanas microporosas penta y hexagonales (4.8-5.8 y 8.6 Å, respectivamente) [62,63]. Por tanto, pueden cargar grandes cantidades de fármaco [16] por adsorción en los poros (encapsulado por inmersión de las MOFs en la solución farmacológica), funcionalización de superficie externa (interacción entre el fármaco y la superficie de la MOF) o formando parte de la estructura de la MOF (atrapado en la red cuando se forman

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

las MOFs). En el primer caso, las MOFs pueden adsorber numerosos AIs mediante su difusión a través de los poros. El carácter anfifílico del material MIL-100 permite adsorber fármacos con una gran variedad de propiedades fisicoquímicas (polaridad, hidrofilia, etc.), aunque esta limitado a las dimensiones del AI que debe ser inferior al tamaño de poro de la MOF [16,64]. La liberación del AI se produce como consecuencia de la difusión del AI a través de la porosidad, las interacciones AI-MOF y la degradación de la MOF. En el segundo tipo, los AIs de mayores dimensiones pueden interaccionar con la superficie externa de las MOFs, que presentan grupos reactivos (carboxilatos, metales parcialmente coordinados) capaces de interaccionar con los AIs. La liberación está gobernada principalmente por las interacciones AI-MOF y la degraqdación de la estructura MOF. En el tercer caso, los AIs se liberan por destrucción de la red. Algunas MOFs también se pueden modificar con compuestos que modulan la degradación y/o la liberación de las moléculas activas desde los poros en entornos biológicos [65-72]. Por otro lado, el proceso de liberación de ciertas redes puede ser producida por estímulos (luz UV, pH, ATP, etc.) [73-77]. De este modo, las MOFs actúan como reservorios farmacológicos que reducen las dosis de AIs administrados, los efectos secundarios y la duración del tratamiento cuando se administran por una ruta biológica específica.

2.3. Aplicación de las MOFs en administración de fármacos

2.3.1. Vía parental

Las MOFs, para administrarse por vía parenteral, suelen incluirse en suspensiones inyectables. Algunos ejemplos de MOFs propuestas para esta vía son MIL-100, MIL-88A, y MIL-88B-4CH_3 [16], conteniendo fármacos antitumorales (busulfán-Bu, doxorrubicina (DOX) o gemcitabina monofosfato (GMP)) y antivirales (cidofovir (CDV) o azidotimidina trifosfato (AZT-TP)) [16,78,79] (ver Tabla 1). Para la preparación de estos inyectables, se ha propuesto por ejemplo modificar la superficie externa de las MOFs con polímeros hidrófilos [80,81] para disminuir el reconocimiento inicial por parte del sistema

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

inmunológico. En el caso específico de las NPs MIL-100 cargadas con GMP, fueron evaluadas tras su administración intravenosa para tratar cáncer de pulmón gracias a su focalización pasiva por filtración dentro del delgado lecho capilar pulmonar [82] (ver Tabla 1). Esta formulación es estable coloidalmente en condiciones ácidas (4.5 - 6.5) y forma agregados a pH neutro. Cuando estas NPs MOFs se inyectan de forma estable en una suspensión de pH <6.5, como la sangre tiene un pH en torno a 7.4, las NPs forman agregados microscópicos de tamaño óptimo para ser retenidos dentro de los capilares pulmonares. Allí, los aglomerados se desagregan y las MOFs libres pueden entrar en las células pulmonares, continuando con su degradación y liberando el fármaco. Este método no ocasiona hiperplasia o necrosis de órganos y no provoca reacciones inmunes. Otra forma innovadora de liberar fármacos anticancerosos mediante MOFs por vía parenteral consiste en utilizar un catéter de fibra óptica (ver Tabla 1). De hecho, se investigó este dispositivo recubierto con 5-fluorouracilo utilizando una MOF basada en el tereftalato de Zr UiO-66 (5-FU@UiO-66) [83] para conseguir una liberación controlada del fármaco en la localización diana. Para ello, se propone utilizar un catéter de fibtras ópticas recubierto por la MOF y localizado cerca del área del tumor, produciéndose la liberación del fármaco mediante su irradiación a una longitud de onda adecuada a las MOFs a través de la fibra. Este dispositivo ofrece la posibilidad de un tratamiento localizado, disminuyendo la toxicidad inespecífica. Sin embargo, este procedimiento presenta varias desventajas con respecto a las suspensiones inyectables, tales como: i) necesidad de personal especializado, ii) molesto para el paciente y iii) mayor coste económico.

Otra forma inyectable con resultados prometedores consiste en MOFs nanométricas basadas en Fe propuestas como nanoplataformas teragnósticas (combinando diagnosis por MRI y liberación controlada de fármacos) y en terapia fototérmica (ver Tabla 1). Por ejemplo, se han propuesto composites basados en MOF de Fe asociados a nanopartículas de oro (Au@Fe-MOFs) para el tratamiento de cáncer de mama [84]. Estos sistemas, asociados al péptido arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) están dirigidos a la integrina αvβ3 que se

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

expresa altamente en la angiogénesis del tumor (ver Tabla 1). Los mejores resultados *in vivo* se obtuvieron en combinación con láser, debido a la existencia de una sinergia entre el efecto de la quimioterapia antitumoral y el tratamiento fototérmico, no detectándose daño tisular ni inflamación visible en los principales órganos, como pulmones. Teniendo en cuenta la eficacia y viabilidad de esta terapia, se piensa que podría emplearse en un futuro próximo en la práctica clínica.

Por lo tanto, a la vista de los buenos resultados obtenidos en estos estudios, parece factible el tratamiento de determinadas enfermedades mediante la administración parenteral de fármacos vehiculizados en MOFs.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 1. Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía parenteral.

MOFs	FÁRMACO	SISTEMA	ESTUDIOS	PRINCIPALES HALLAZGOS	REF.
MIL-88A, MIL-88B-4CH_3, MIL-100	Bu DOX CDV AZT-TP	Suspensiones inyectables	Degradabilidad Citotoxicidad Liberación de fármacos Toxicidad *in vivo* (Ratas hembras Wistar)	Degradabilidad importante de MIL-88A y MIL-100 después de 7 días de incubación en condiciones fisiológicas simuladas No citotoxicidad Liberación progresiva de fármacos Leve crecimiento reversible del peso del hígado y del bazo Sin reacciones inmunes	[16]
MIL-88A, MIL-88B-4CH_3, MIL-100	-	Suspensiones inyectables	Toxicidad *in vivo* (Ratas hembras Wistar)	Disminución leve inicial de la concentración sérica de hierro Pequeño aumento inicial del peso del hígado, el bazo y los pulmones 1 semana después de la administración, retorno tanto de la concentración sérica de hierro como del peso de los órganos Sin hiperplasia, ni necrosis	[34]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 1 (continuación 1). Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía parenteral.

MOFs	FÁRMACO	SISTEMA	ESTUDIOS	PRINCIPALES HALLAZGOS	REF.
MIL-100	-	Suspensión inyectable	Estudio de biodistribución *in vivo* (Ratas hembras Wistar)	Aumento de los niveles de BTC en el bazo (4%) y en el hígado (45%) a los 30 min. Reconocimiento rápido y opsonización de MIL-100 por parte del sistema inmunológico Recomendación de modificar la superficie externa de MIL-100 con polímeros hidrofílicos	[78]
UiO-66	5-FU	Catéter de fibras ópticas recubierto con UiO-66	Preparación de fibras ópticas recubiertas de UiO-66 cargadas con 5-FU Liberación de fármacos	Obtención de un dispositivo prototipo capaz de administrar fármacos anticancerosos de forma local Liberación de 110×10^{-6} M de 5-FU en menos de 1 min Conclusión de que una matriz de fibra óptica de diámetro inferior a 1 mm podría liberar cantidades terapéuticas de 5-FU Reducción de la toxicidad inespecífica del 5-FU mediante la liberación localizada del fármaco en el área	[83]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 1 (continuación 2). Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía parenteral.

MOFs	FÁRMACO	SISTEMA	ESTUDIOS	PRINCIPALES HALLAZGOS	REF.
				cancerosa	
MIL-100(Fe)	GMP	Suspensión inyectable	Estabilidad de las MOFs en suero de rata Estabilidad de MOFs en PBS suplementado con albúmina de suero bovino Liberación de fármacos Estudio *in vivo* (Ratones C57BL/6J) Estudio histológico	Aparición de agregados de tamaños micrométricos a los 30 min de incubación en suero de rata y desaparición a las 3 h en suero y a las 6 h en PBS suplementado con albúmina de suero bovino Desagregación posiblemente debida a la adsorción de proteínas del medio en la superficie de las MOFs Liberación en PBS suplementado del 40% y 60% de GMP a las 0.25 h y 4 h, respectivamente Ausencia de distrés pulmonar en los animales Falta de toxicidad aguda o necrosis en cortes histológicos pulmonares	[82]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 1 (continuación 3). Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía parenteral.

MOFs	FÁRMACO	SISTEMA	ESTUDIOS	PRINCIPALES HALLAZGOS	REF.
Sistemas RGD-Au@Fe-MOF (RAMOFs)	DOX	Suspensión inyectable	Viabilidad celular Estudios *in vivo* (Ratones macho Balb/c) Tolerancia a los tejidos sanos	RAMOFs: sin efectos citotóxicos importantes en las células MD-MBA-231 RAMOFs-DOX: citotoxicidad dependiente de la dosis de fármaco administrada RAMOF-DOX + Laser: mejor tratamiento (efecto sinérgico en el tumor) Longitud de onda óptima: 808 nm Tejidos sanos que rodean los tumores apenas afectados Ausencia de daño tisular o inflamación visible en los órganos principales (como los pulmones)	[84]

2.3.2. Vía cutánea

En los últimos 5 años, ha habido un desarrollo significativo de formas de dosificación basadas en MOFs para la administración transdérmica y cutánea de AIs, en forma de parches o hidrogeles. Los parches se preparan generalmente utilizando biopolímeros (tales como, alcohol polivinílico (PVA) y gelatina de piel de cerdo (GEL)), MOFs (ej. MIL-100, MIL-127(Fe) y UiO-66(Zr)), y diversos fármacos (ej. ácido salicílico (SA), ibuprofeno (IBU), ácido azelaico (AzA), nicotinamida (Nic) (ver Tabla 2) [37,85-87]. Los procesos de liberación, bajo condiciones cutáneas simuladas, mostraron distintas cinéticas. Las MOFs de pequeño tamaño de poro (como MIL-127(Fe)) producen una liberación más lenta que las redes de poros de grandes dimensiones (como MIL-100). Además, la naturaleza hidrófila/hidrófoba del fármaco influye en la velocidad de liberación, siendo más lenta para el IBU (hidrófobo) que para el SA (hidrófilo) a partir de la matriz de UiO-66 [85]. Otros ejemplos de MOFs empleadas para esta vía son las MIL-53, MIL-53-$(OH)_2$, MIL-163, UiO-66-NH_2 y ZIF-8 cargadas con diferentes cantidades de SA, según el tipo de MOF y la relación MOF:SA (véase el Tabla 2) [88]. Adicionalmente, MIL-53(Al) y MIL-53-(Zn,Al) se cargaron con sulfadiazina (SDZ) [89] y se evaluó su liberación *in vitro* (con células eucariotas) y *ex vivo* (con piel de cerdo) (ver Tabla 2), y se demostró ausencia de toxicidad en las células. Los estudios *ex vivo* e *in vivo*, llevados a cabo con piel de oreja de cerdo y con voluntarios humanos, respectivamente, demostraron que los parches de MIL-100 y MIL-127(Fe) cargados con una combinación de fármacos antiacné (AzA y Nic) son seguros [86].

Además, se evaluaron hidrogeles de polietilenglicol diacrilado (PEG) conteniendo MOFs (basados en Cu, Co o Zn) con glutarato y ligandos 1,2-bis (4-piridil)etileno [90] para demostrar su actividad antibacteriana (empleando *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*) y se realizaron estudios de citotoxicidad (utilizando fibroblastos dérmicos humanos HDF) (ver Tabla 2). Los resultados mostraron que los efectos son diferentes empleando *E. coli* con respecto a *S. aureus*, y que su bioactividad está más influenciada por el metal empleado y la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

estructura de la MOF, que por el ligando utilizado [91]. Finalmente, la MOF con Cu se reveló como la más adecuada para fines antibacterianos porque mostró una ausencia de toxicidad para los HDFs y un comportamiento bactericida.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 2. Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía cutánea.

MOFs	FÁRMACO	SISTEMA	ESTUDIOS	PRINCIPALES HALLAZGOS	REF.
MIL-100(Fe)	IBU	Parches a base de MIL-100	Preparación: - Molienda de componentes - Mezclado - Preparación de obleas ejerciendo presión Encapsulación de fármacos Liberación de fármacos	Alta carga de fármaco: - 33 wt% en NPs MIL-100 - 17.5 wt% en el parche Baja liberación de fármaco (30% a las 2 h) debido a su carácter hidrofóbico	[37]
MIL-100(Fe), MIL-127(Fe), UiO-66(Zr)	SA IBU	-	Carga de fármaco: - Equilibrio hidrofílico/hidrofóbico - Accesibilidad de los fármacos a través de la matriz Liberación de fármaco: - Control de perfiles cinéticos de liberación	Carga de fármaco elevada Gran estabilidad acuosa Liberación adecuada de la carga de fármaco (entre 1 y 7 días), siendo más lento para: - IBU (fármaco hidrofóbico) que para SA (fármaco hidrofílico) - MOFs de poros estrechos [MIL-127(Fe)] que para MOFs de poros anchos [MIL-100]	[85]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 2 (continuación 1). Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía cutánea.

MOFs	FÁRMACO	SISTEMA	ESTUDIOS	PRINCIPALES HALLAZGOS	REF.
Cu-MOF 1, Co-MOF 2, Zn-MOF 3	-	Hidrogeles embebiendo MOFs	Preparación de hidrogeles embebiendo MOFs Ensayo antibacteriano: - *Escherichia coli* (G(-)) - *Staphylococcus aureus* (G(+)) Degradación y liberación de iones metálicos Ensayos de citotoxicidad con fibroblastos humanos (HDFs)	Actividad antibacteriana de: - MOF libres: Cu-MOF 1> Co-MOF 2> Zn-MOF 3 (MBC: 20 μg · mL^{-1}, 1000 μg·mL^{-1} y 2000 μg·mL^{-1}, respectivamente) - Hidrogeles embebiendo MOFs: hidrogel@Cu-MOF 1 e hidrogel@Co-MOF 2 exhibieron 99.9%, mientras que el hidrogel@Zn-MOF 3 no presentó actividad bactericida (MBC: 2000 μg·mL^{-1}) Liberación de iones metálicos de 5.6 ppm El hidrogel@Cu-MOF 1 a 20 μg·mL^{-1} (MBC) no es tóxica para los HDFs y es bactericida	[90]
MIL-100(Fe), MIL-127(Fe)	AzA Nicotinamida	Parches (PVA-MOFs) a base de MOFs con alcohol polivinílico (PVA)	Síntesis de MOFs Encapsulación de fármacos Liberación de fármacos	Alta carga de fármaco: - 77.4 wt% en NPs MIL-100 - 48.1 wt% en NPs MIL-127 NPs - 38.8 wt% en el parche PVA-MIL-100	[86]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 2 (continuación 2). Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía cutánea.

MOFs	FÁRMACO	SISTEMA	ESTUDIOS	PRINCIPALES HALLAZGOS	REF.
			Elaboración de parches Permeación de fármacos *ex vivo* (piel de oreja de cerdo) Irritación de la piel Extracción de fármacos desde la piel *In vivo* (voluntarios)	- 24.2 wt% en el parche PVA-MIL-127 Los parches permiten la administración controlada de fármacos Los parches son seguros *ex vivo* e *in vivo*	
MIL-53(Al), MIL-53-(Zn,Al)	SDZ	-	Carga de SDZ Liberación de fármacos Estudio *in vitro* (células eucariotas) Estudio *ex vivo* (piel de cerdo)	MIL-53-(Zn,Al) liberan fármaco más rápidamente que MIL-53(Al) No toxicidad para las células eucariotas SDZ y ligando penetran a través de la piel de cerdo durante 3 h	[89]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 2 (continuación 3). Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía cutánea.

MOFs	FÁRMACO	SISTEMA	ESTUDIOS	PRINCIPALES HALLAZGOS	REF.
UiO-66, UiO-66-NH_2, MIL-163, MIL-127, MIL-53, MIL-53-$(OH)_2$, MIL-100, ZIF-8	SA	-	Adsorción de SA mediante MOFs Estabilidad de las MOFs Liberación de SA desde UiO-66-NH_2	SA se adsorbe en función de la relación MOFs:SA: - 1:0.5 → MIL-53-$(OH)_2$ ≈ MIL-100 ≈ MIL-127 ≈ MIL-163 < MIL-53 ≈ UiO-66 < ZIF-8 < UiO-66-NH_2 - 1:2 → MIL-100 ≈ MIL-127 < ZIF-8 < MIL-163 < UiO-66 < MIL-53-$(OH)_2$ << UiO-66-NH_2 << MIL-53 UiO-66-NH_2 es el mejor candidato UiO-66-NH_2 presenta alta carga de fármaco (12.1 wt%) UiO-66-NH_2 exhibe una estabilidad importante La cinética de liberación de SA desde UiO-66-NH_2 es adecuada por vía cutánea	[88]

2.3.3. Vía oral

Diferentes tipos de MOFs, como NPs de MIL-100, se recubrieron con diferentes polímeros como quitosano (CS) y carboximetilcelulosa (CMC) [92-94] para favorecer su administración por vía oral (ver Tabla 3). Se comprobó que el CS protege a las MOFs frente a la degradación enzimática, facilita su bioadhesión y mejora la absorción del fármaco. En efecto, el CS promueve el transporte de las NPs a través de la mucosa intestinal [95]. Se evaluó la biocompatibilidad de las MIL-100 no recubiertas y recubiertas con CS (CS_MIL-100) *in vitro* en células de carcinoma colorrectal humano (Caco-2), observándose una disminución de la citotoxicidad en los sistemas recubiertos con CS. Además, un estudio de evaluación de la respuesta inflamatoria, demuestra que las NPs CS_MIL-100 disminuyen la respuesta inmune debido a que no inducen la activación del complemento. Esto podría explicarse por una disminución del reconocimiento de las NPs por el recubrimiento de CS que, además, mejora la biocompatibilidad y otorga funciones adicionales, como una mejora de la estabilidad química en fluidos orales simulados, la bioadhesividad y el paso a través de la barrera intestinal. Además, varias MOFs (UiO-66, UiO-66-NH_2, UiO-66-COOH, UiO-67 y Zr-NDC) se cargaron con 5-FU (ver Tabla 3) para el tratamiento de cáncer (mamá, colorrectal (CRC), tracto digestivo, etc.), siendo las MOFs de Zr-NDC las que asocian la mayor cantidad de fármaco. Las Zr-NDC también fueron recubiertas con CS para permitir una administración adecuada de 5-FU por vía oral [92], obteniéndose una elevada liberación del fármaco (70%).

Como se mencionó anteriormente, también se usó CMC para recubrir MOFs destinadas al tratamiento de cáncer de colon vía oral. Así, el MOF-5 se asoció con el 5-FU y se recubrió con CMC sensible al pH (CMC/5-FU@MOF-5) para proteger las NPs 5-FU@MOF-5 [93] frente al ambiente ácido del estómago, y provocar una liberación específica en el medio intestinal (ver Tabla 3). Se demostró *in vitro* que el 5-FU se libera de manera sostenida durante un período de tiempo prolongado, atribuido al comportamiento sensible al pH de la CMC, mostrando una toxicidad notable contra la línea celular HeLa.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Además, las NPs UiO-66-PDC cargadas con ibuprofeno sódico (IBUNa), utilizando el ácido 2,5-piridindicarboxílico como ligando, y las NPs ZJU-16 conteniendo IBUNa (NPs IBUNa@ZJU-16) también se emplearon como sistemas sensibles al pH [96] (ver Tabla 3). De esta forma, en ambos casos la liberación del fármaco depende del pH del medio, siendo más rápida y en mayor extensión bajo condiciones intestinales (pH = 7.4) que en el medio gástrico (pH = 2.0). Por tanto, todas estas MOFs han demostrado ser interesantes como sistemas de administración oral de fármacos en el tratamiento de enfermedades como el cáncer de colon [92-94,96,97].

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC

Tabla 3. Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía oral.

MOFs	FÁRMACO	ESTUDIOS	PRINCIPALES HALLAZGOS	REF.
MIL-100(Fe), CS_MIL-100(Fe)	-	Biocompatibilidad Citotoxicidad Estudios de respuesta inflamatoria: - Ensayo de activación del complemento - Perfil de citoquinas	Ambos sistemas exhiben: - perfiles citotóxicos bajos - no inducción de la activación del complemento - buena biocompatibilidad La cubierta de CS: - mejora la biocompatibilidad - mejora la estabilidad química en fluidos orales simulados - aumenta la bioadhesividad - mejora el paso a través de la barrera intestinal - mejora la captación celular - disminuye la respuesta inmune	[94]
UiO-66, UiO-66-NH2, UiO-66-COOH, UiO-67, Zr-NDC	5-FU	Carga con 5-FU Preparación de Zr-NDC recubierto de CS Liberación de fármacos	Zr-NDC carga la mayor cantidad de 5-FU Liberación del fármaco: - 20% en ambiente ácido - 70% en fluido intestinal artificial	[92]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 3 (continuación 1). Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía oral.

MOFs	FÁRMACO	ESTUDIOS	PRINCIPALES HALLAZGOS	REF.
MOF-5	5-FU	Carga con 5-FU Preparación de 5-FU@MOF-5 recubierto de CMC Liberación de fármacos Ensayos MTT	Cubierta de CMC proporciona al sistema: - mayor protección contra el ambiente ácido del estómago - liberación de fármacos de forma sostenida - CMC/5-FU@MOF-5 presenta toxicidad notable contra la línea celular HeLa	[93]
UiO-66-PDC (ligando: ácido 2,5-piridinedicarboxílico)	IBUNa	Caracterización Estabilidad en agua Ensayos MTT Carga con IBUNa Liberación de fármacos	Buena estabilidad de la MOF en agua tras 5 días Buena biocompatibilidad con células 4T1 Carga de fármaco, aprox.: 27.60 wt% Liberación de fármaco dependiente del pH: - mayor en medio intestinal (pH = 7.4) - menor en ambiente gástrico (pH = 2.0)	[96]

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 3 (continuación 2). Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía oral.

MOFs	FÁRMACO	ESTUDIOS	PRINCIPALES HALLAZGOS	REF.
ZJU-16	IBUNa	Carga con IBUNa Liberación de fármacos	La carga máxima de fármaco, aprox.: 53.46 wt% Liberación de fármaco dependiente del pH: - mayor en medio intestinal (pH = 7.4) - menor en ambiente gástrico (pH = 2.0)	[97]

2.3.4. Vía bucal

Se investigaron también estructuras basadas en MOFs para la administración y tratamiento por vía bucal de diversas enfermedades, como por ejemplo, la dependencia al tabaco mediante tratamiento sistémico con nicotina [98] (ver Tabla 4). Para su administración por vía bucal, las MOFs fueron formuladas en films orales mucoadhesivos de una única capa (de liberación de fármaco multidireccional) o de varias capas (multicapa, de liberación de fármaco unidireccional). Éste último presenta una capa externa protectora que disminuye la difusión de saliva hacia el interior de las capas siguientes, habiendo además una capa mucoadhesiva. En ocasiones, el sistema contiene otra capa entre las dos capas antes mencionadas, que actúa como un depósito de fármaco y garantiza la liberación sostenida del mismo [99,100]. Estos sistemas bucales basados en MOFs presentan ventajas, tales como: gran flexibilidad, no necesitan ingerir agua, permiten una administración de dosis precisas (en comparación con gotas y jarabes), el paso directo del fármaco a través de la mucosa bucal a circulación sistémica, una acción rápida, una mayor biodisponibilidad del fármaco, la ausencia de metabolismo de primer paso hepático, la disminución de los efectos secundarios y una fácil manipulación, transporte y almacenamiento [99,101,102].

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 4. Ejemplo investigado para la administración de fármacos por vía bucal.

MOFs	FÁRMACO	SISTEMA	ESTUDIOS	PRINCIPALES HALLAZGOS	REF.
-*	Nicotina	Films orales mucoadhesivos	Diseño de: - films orales mucoadhesivas de una sola capa, como de polivinil pirrolidona y alginato (liberación multidireccional del fármaco). - films orales mucoadhesivas multicapa, como de hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa, policarbofil, CMC sódica (liberación unidireccional del fármaco)	- Flexibilidad - Dosis de administración precisa - Paso directo del fármaco a la circulación sistémica - Inicio rápido de acción - Mejor biodisponibilidad bucal del fármaco - Disminución de los efectos secundarios - Fácil manejo, transporte y almacenamiento	[98]

*Tipo de MOF no especificada en el artículo original.

2.3.5. Vía ocular

Recientemente, se llevaron a cabo varios estudios para demostrar el potencial de MOFs, como NH_2-MIL-88(Fe) [103,104] y UiO-67(Zr) [105], como sistemas de administración de fármacos por vía ocular (ver Tabla 5). El material NH_2-MIL-88(Fe) se cargó con timolol (TM) (TM@NH_2-MIL-88(Fe)) [103] y brimonidina (Bri) (Bri@NH_2-MIL-88(Fe)) [104], ambas destinadas a pacientes con presión intraocular elevada (ej. glaucoma) (ver Tabla 5). Las células de la retina en contacto con el NH_2-MIL-88(Fe) mostraron una elevada viabilidad, superior al 90% [103]. Los estudios *in vivo* en conejos demostraron que las NPs Bri@NH_2-MIL-88(Fe) permiten una biodisponibilidad prolongada del fármaco (4 h), así como la disminución de la presión intraocular. Por otro lado, se utilizaron NPs de UiO-67(Zr) y poliuretano (PU), utilizado como matriz polimérica, para preparar films [105]. La liberación del fármaco fue también sostenida, cuantificándose hasta 14 días. Este film presenta características adecuadas para la administración ocular de fármacos, siendo las MOFs también interesantes para la formación de otros sistemas como lentes de contacto o inserciones sub-espiga [105]. Las formulaciones a base de MOFs parecen ser una gran opción para la administración ocular de fármacos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 5. Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía ocular.

MOFs	FÁRMACO	SISTEMA	ESTUDIOS	PRINCIPALES HALLAZGOS	REF.
NH_2-MIL-88(Fe)	Bri	Mucoadhesivo	Síntesis solvotermal Caracterización de NPs Carga con Bri Liberación de fármacos Estudio *in vivo* (conejos)	NH_2- MIL-88(Fe) presenta propiedad mucoadhesiva Buena capacidad de carga de fármaco La liberación de Bri se mantiene hasta 12 h Los estudios *in vivo* muestran que: - NH_2-MIL-88(Fe)/Bri permanece en la superficie ocular de conejos durante 4 h - alta biodisponibilidad del fármaco - prolongación del efecto de la disminución de la presión intraocular	[104]
UiO-67 a base de Zr	Bri	Film de nanocom-puestos poliméricos	Análisis de estabilidad Microscopía SEM Medidas de adsorción de etileno (25ºC) TGA Análisis FTIR Mediciones de Synchrotron PXRD	Estabilidad mejorada de MOFs en matriz de PU Distribución homogénea de MOFs en matriz de PU ≥ 45% de las MOFs son accesibles para la adsorción de moléculas no polares Adsorción mejorada de la matriz de PU (tras la inclusión de NPs UiO-67) Presencia demostrada de Bri en la película UiO-67@PU	[105]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 5 (continuación). Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía ocular.

MOFs	FÁRMACO	SISTEMA	ESTUDIOS	PRINCIPALES HALLAZGOS	REF.
				Carga de Bri: - 58.4 $mg \cdot g^{-1}$ sistema - 194.7 $mg \cdot g^{-1}$ MOF Buen proceso de adsorción/liberación de fármaco	
NH_2-MIL-88(Fe)	TM	Mucoadhesivo	Síntesis solvotermal Caracterización de NPs Carga de TM Liberación de fármacos Estudio de viabilidad Estudio de inestabilidad	NH_2-MIL-88(Fe) presenta propiedad mucoadhesiva Buena capacidad de carga de fármaco Liberación mantenida de TM hasta 10 h (hasta 63%) Alta viabilidad tras interacción de células de la retina con NH_2-MIL-88(Fe) e interacción persistente con TM@NH_2-MIL-88(Fe)	[103]

2.3.6. Vía rectal

Se han investigado NPs MOFs para la administración rectal, especialmente para tratar el CRC (ver Tabla 6). Para ello, se propusieron las NPs MOFs PCN-223(Zr) cargadas con 5-FU y otras NPs MOFs cargadas con cisplatino (PDD) y ácido oleanólico (Ola) recubiertas adicionalmente de ácido hialurónico (HA) (HA/PDD/Ola) (ver Tabla 6) [106,107]. Concretamente, el sistema 5-FU@PCN-223 proporciona una liberación sostenida en células HCT-116 (línea celular de CRC humano), mejorando el efecto anticanceroso y disminuyendo la viabilidad celular en comparación con un tratamiento de solución de 5-FU en bolo. Además, las NPs HA/PDD/Ola son altamente biocompatibles con la sangre [107], liberando ambos fármacos de forma más prolongada en condiciones fisiológicas (pH = 7.4) que en entornos patológicos. Esta diferencia de liberación podría deberse al pH del medio, ya que la descomposición de la MOF está fuertemente influenciada por el pH. Además, se probó la biocompatibilidad en células HCT-116, demostrando que la combinación de PDD y Ola presentaban un efecto sinérgico anticanceroso mayor que la de los fármacos administrados por separado. Incluso, la presencia de HA en la estructura promovió la acumulación del sistema en HCT-116 [107]. En resumen, los sistemas basados en MOFs también parecen muy atractivos para la administración rectal de fármacos para el tratamiento de enfermedades como el CRC.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 6. Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía rectal.

MOFs	FÁRMACO	ESTUDIOS	PRINCIPALES HALLAZGOS	REF.
PCN-223	5-FU	Síntesis solvotermal Caracterización de NPs Carga con 5-FU Captación intracelular Viabilidad celular	Carga de fármaco de 79.4 $\mu g \cdot mg^{-1}$ Liberación sostenida de 5-FU PCN-223 y 5-FU@PCN-223 se internalizan en células HCT-116 en, aprox., 2 h 5-FU@PCN-223 disminuye la viabilidad celular en comparación con un tratamiento de solución de 5-FU en bolo PCN-223 parece mejorar la eficacia del fármaco en poco tiempo de exposición	[106]
-	PDD y Ola	Síntesis de HM/PDD/Ola por método de co-precipitación Estabilidad Estudio de biocompatibilidad Liberación de fármacos Estudio de viabilidad Efecto de apoptosis Efecto de HA	HM/PDD/Ola son estables en condiciones fisiológicas Las NPs son altamente biocompatibles con la sangre Los estudios de liberación de fármacos muestran que: - en ambientes fisiológicos (pH = 7.4), ambos fármacos se liberan de forma lenta (PDD: 33.26% y Ola: 25.4% a las 120 h post-incubación) - en ambientes patológicos, ambos fármacos se liberan de forma rápida	[107]

Tabla 6 (continuación). Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía rectal.

MOFs	FÁRMACO	ESTUDIOS	PRINCIPALES HALLAZGOS	REF.
			(PDD: 90.8% y Ola: 69.6%) Descomposición de MOF dependiente del pH La combinación de PDD y Ola mejora el efecto anticanceroso (contra las células HCT-116) a dosis más bajas A concentración farmacológica de 0.82/8.2 μM y tras 72 h de incubación, el efecto de apoptosis es: HM/PDD de: 43.6% HM/Ola de: 31.4% HM/PDD/Ola de: 72.3% HA promueve la acumulación del sistema en las células HCT-116	

2.3.7. Vía pulmonar

La vía pulmonar permanece casi inexplorada para la administración de sistemas de liberación a base de MOFs. Se han propuesto varias estrategias para administrar las MOFs por vía pulmonar, incluyendo: i) agrupaciones de MOFs constituyendo partículas de tamaños micrométricos [108]; ii) asociaciones de MOFs con otras moléculas (como ciclodextrinas), que no son objeto de este trabajo de Tesis [109]; y iii) MOFs incluidas en microsistemas de excipientes (como Ma) [110].

En el primer caso, se sintetizó partículas de $CuPOA_2$ MOFs a partir de Cu (con potencial sinergia anti-TB con algunos fármacos [111-113]) y ácido pirazinoico (POA; considerado un profármaco del fármaco antituberculoso de primera línea, pirazinamida (PZA)) a baja temperatura (RT o 60ºC) (ver Tabla 7) [108]. Mediante un método de atomización, se prepararon micropartículas huecas de un tamaño alrededor de 2.6 μm. Aunque este sistema parecía adecuado para la vía pulmonar, sus propiedades aerodinámicas no fueron suficientemente evaluadas (tales como, la densidad real y la densidad aparente) para corroborar su idoneidad [114,115]. Además, aunque estas partículas están dentro del tamaño aerodinámico comúnmente aceptado (1-5 μm), es más fácil alcanzar el pulmón profundo con partículas no huecas de tamaño comprendido entre 1-5 μm o con partículas huecas de diámetro aerodinámico (D_{aer}) inferior, fenómenos observados en estudios previos con otros materiales [116-118]. Por tanto, teóricamente, su llegada al pulmón profundo no es probable. Además, aunque así fuese, sería necesario que las partículas fuesen sonicadas en abundante agua para su posible internalización celular; ya que, ante el bajo volumen de fluido alveolar, sería esperable una bioacumulación del sistema en la región pulmonar. Es por ello que resulta muy interesante la inclusión de las MOFs en MS o micropartículas (MPs) de un excipiente para su adecuada administración por vía pulmonar. Además, los excipientes pueden conferir ventajas, como es el caso del Ma (que es termoprotector, osmótico y mucolítico [119]).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Por otro lado, también dirigido a su futura aplicación vía pulmonar, se realizó un estudio *ex vivo* utilizando el material Fe-MIL-101-NH_2 cargado con INH para el tratamiento de la TB [120] (ver Tabla 7). Para ello, se extirparon los pulmones de ratas Wistar y se les administraron intratraquealmente MPs de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) y leucina (LC) conteniendo Fe-MIL-101-NH_2 cargado con INH. Los resultados mostraron que estos micro-nanosistemas eran biocompatibles y capturados de manera eficiente por los macrófagos RAW 246.9. De este modo, los micro-nanosistemas a base de MOFs parecen también buenos candidatos para la administración de antibióticos por vía pulmonar.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 7. Algunos ejemplos de MOFs investigadas para la administración de fármacos por vía pulmonar.

MOFs	FÁRMACO	SISTEMA	ESTUDIOS	PRINCIPALES HALLAZGOS	REF.
$CuPOA_2$	POA, profármaco de PZA	Partículas formadas por Cu y POA	Atomización Caracterización de partículas	Ventajas: - D_{aer} (~2.6 µm) - Morfología esférica - Alta carga de fármaco Desventajas: - Incompleta caracterización de las partículas - Propiedades aerodinámicas de dudosa calidad - Imposibilidad de liberación en volumen acuoso bajo - Riesgo de bioacumulación y obstrucción respiratoria	[108]
Fe-MIL-101-NH_2	INH	Micro-nanosistemas formados por MPs de: - PLGA - LC conteniendo Fe-MIL-101-NH_2 cargadas de INH	Administración pulmonar *ex vivo* de los micro-nanosistemas Estudio de biocompatibilidad *ex vivo* con macrófagos	Ventajas: - Biocompatibilidad con macrófagos RAW 246.9 - Eficiente captación por macrófagos RAW 246.9 Desventaja: - Potencial no demostrado *in vivo*	[120]

2.4. Interés de la vía pulmonar para la administración de fármacos

La vía pulmonar es una ruta muy atractiva para la administración de AIs (ej., fármacos, ácidos nucleicos, y péptidos) para tratar no sólo enfermedades pulmonares locales, sino también enfermedades sistémicas. Mediante esta vía, se puede conseguir un acceso directo y preciso del AI al lugar de acción deseado en pulmón para tratar localmente una enfermedad respiratoria [121-123].

Esta vía presenta interesantes ventajas para la administración de medicamentos: i) es no invasiva e indolora, lo que favorece la comodidad y el cumplimiento posológico por el paciente [124], ii) permite aumentar la concentración del fármaco en el lugar de acción, a la vez que se reduce la dosis administrada y los posibles efectos secundarios adversos asociados con la administración no pulmonar; iii) presenta una gran superficie (70-140 m^2 en humanos adultos) y una membrana alveolar-capilar extremadamente fina (0.1-0.2 μm) muy vascularizada [125], que favorece la absorción de fármacos (en los alvéolos); iv) menor actividad enzimática y menor degradación con respecto a otras vías de administración (como la vía oral) [121-123]; y v) ausencia de efecto de primer paso hepático [126,127].

De todos modos, antes de comprender el proceso por el cual un AI es capaz de llegar a la zona deseada del pulmón para realizar su efecto terapéutico, es fundamental conocer tanto la estructura del árbol respiratorio como su fisiología para conseguir una adecuada biodistribución y eficacia terapéutica.

2.4.1. Anatomofisiología del tracto respiratorio

Los sistemas respiratorio y cardiovascular son los encargados de suministrar oxígeno a todas las células del organismo, así como de expulsar al exterior el dióxido de carbono a través del intercambio de gases con el medio ambiente [128,129]. El órgano más importante es el pulmón, que está en contacto con el exterior a través de conductos que se subdividen dicotómicamente a medida en que se profundiza, de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

tal forma que disminuye el diámetro de los conductos y aumenta, sin embargo, la superficie (Figura 3) [130].

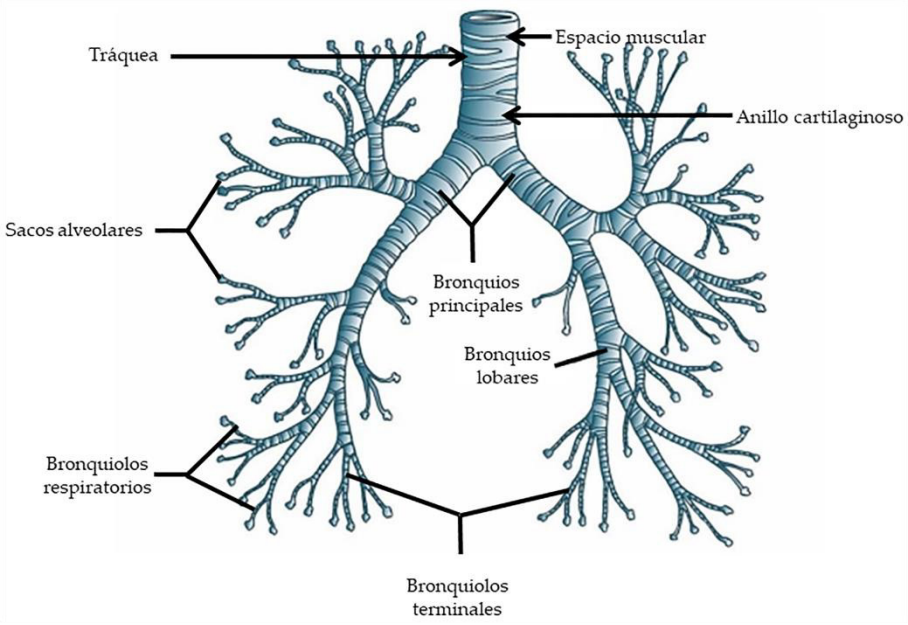


Figura 3. Ramificaciones dicotómicas del tracto respiratorio a medida en que se profundiza en el pulmón. (Imagen libre de derechos de autor)

Anatómicamente, el árbol respiratorio se subdivide en dos partes: el tracto respiratorio superior y el inferior. El tracto superior está formado por la boca, la cavidad nasal, la faringe y la laringe; mientras que el inferior, está compuesto por la tráquea, los bronquios primarios, los bronquiolos primarios y sus ramificaciones, y el área alveolar (ver Figura 3) [131]. En el tracto respiratorio inferior existen dos áreas funcionales: el área de conducción y el área respiratoria. El área de conducción es la que está constituida por la tráquea, los bronquios y los bronquiolos, llegando hasta los bronquiolos terminales, y está dedicada a la filtración, calentamiento y humidificación del aire inspirado. A continuación, está el área respiratoria, formada por bronquiolos terminales y sacos alveolares respiratorios (que tienen una

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

superficie de aprox. 120 m^2), y su función es el intercambio de gases entre el aire de los pulmones y la sangre (Figura 4) [132].

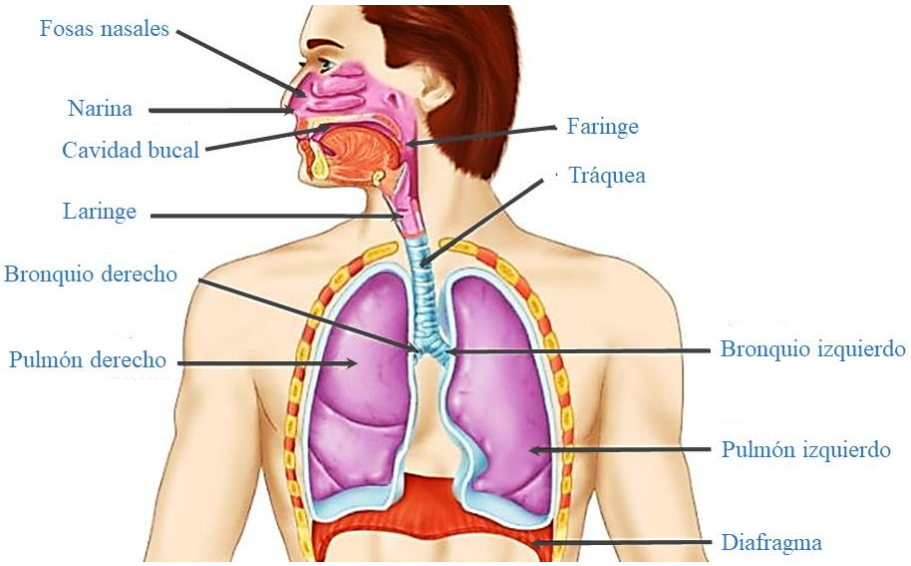


Figura 4. Anatomía del tracto respiratorio. (Imagen libre de derechos de autor)

El tracto respiratorio está revestido de tejido epitelial que disminuye de grosor y aumenta su permeabilidad a medida que se acerca a la zona alveolar [133]. Específicamente, el tracto respiratorio superior está revestido con un epitelio cilíndrico pseudoestratificado, que está formado por células ciliadas, caliciformes (secretoras de moco) y basales [133]. En los bronquiolos, el epitelio es cilíndrico simple y está constituido por células ciliadas y células de Clara fundamentalmente, siendo escasas las células caliciformes. En la parte distal de los bronquiolos (bronquiolos respiratorios), el epitelio es cuboidal simple, principalmente de células no ciliadas. Además, hay células más habituales de la zona alveolar y, por tanto, es posible el intercambio gaseoso [133]. En la zona alveolar existe un epitelio simple, que está formado por células epiteliales alveolares de tipo I o neumocitos I y células epiteliales alveolares de tipo II o neumocitos II. Las primeras son células planas que ocupan la mayor parte de la zona alveolar y es en donde se produce el intercambio gaseoso; mientras

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

que las segundas son células de forma entre esférica y cúbica, que secretan surfactante pulmonar que recubre los neumocitos, disminuyendo la tensión superficial. Los neumocitos II son precursores de los neumocitos I [134].

El conocimiento de la anatomía y la fisiología del tracto respiratorio permite entender con más claridad el mecanismo de depósito de las partículas inhaladas y su gran influencia en la administración de AIs para producir un efecto local o sistémico.

2.4.2. Administración de AIs para efectos local y sistémico

Como se mencionó anteriormente, una de las mayores ventajas de la vía pulmonar es su versatilidad para administrar AIs tanto para tratar patologías locales (pulmonares), como sistémicas; siendo imprescindible considerar cómo se realiza el depósito de las partículas en el árbol respiratorio.

Para administrar un fármaco por vía pulmonar, debe formularse en forma de aerosol y utilizarse un dispositivo para inhalación. Un aerosol es un sistema constituido por gotas líquidas o partículas sólidas suspendidas de forma estable en una fase gaseosa o aire [132].

Para lograr el efecto terapéutico deseado, es muy importante que llegue la dosis de fármaco adecuada al lugar deseado, dependiendo del efecto se pretende lograr. De este modo, si el fármaco se deposita en los alvéolos, éste podrá pasar a la circulación sanguínea produciendo efecto sistémico; mientras que, para conseguir un efecto local, deberá depositarse en bronquios o bronquiolos [135]. Es el caso por ejemplo de los tratamientos empleados en el asma (ej., el salbutamol actúa en los receptores adrenérgicos β2 localizados en bronquios primarios y bronquiolos terminales [136]).

A su vez, el depósito de las partículas en una región u otra del árbol respiratorio está fuertemente determinado por sus características físicas: tamaño, densidad, higroscopicidad y carga eléctrica, destacando sobre todos ellos la influencia del D_{aer}, que se define como el diámetro de una esfera de densidad unitaria con la misma velocidad de asentamiento terminal que la partícula de interés. Para calcular el D_{aer}, se emplea la siguiente fórmula [137]:

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

$$D_{aer} = D_g \sqrt{\frac{\rho_{real}}{\rho_0 \lambda}} \quad (1)$$

donde D_g es el diámetro geométrico (calculado como la media de los diámetros de Feret (μm)), ρ_{real} es la densidad real de las microsferas ($g \cdot cm^{-3}$), ρ_0 es 1 $g \cdot cm^{-3}$ y λ es el factor de forma dinámica de la microsfera (λ = 1, en microsferas esféricas, o λ = 2 en microsferas irregulares) [138-140].

Una vez se han inhalado las partículas, en función de su tamaño, pueden experimentar uno de los siguientes fenómenos: impacto (o choque), sedimentación o difusión hacia el exterior [141].

Inicialmente, las partículas inhaladas entran en el árbol respiratorio mediante un flujo rápido y turbulento, de tal forma que las partículas más grandes se depositan por impacto en los primeros tramos del tracto respiratorio porque les resulta muy difícil adaptarse a la morfología curva de las vías respiratorias. Específicamente, las partículas de diámetro superior a 10 μm, se depositan en la zona oro-faríngea, siendo deglutidas posteriormente. Tras su deglución, una parte puede ser absorbida intestinalmente, contribuyendo al efecto terapéutico en menor cantidad. Las partículas comprendidas entre 5 y 10 μm se depositan también por impacto, aunque en tráquea y bronquios. Las partículas con tamaños comprendidos entre 1 y 5 μm descienden por el árbol respiratorio hasta alcanzar zonas más profundas, en las que los conductos respiratorios tienen una luz más estrecha, llegando a los alvéolos. Allí, las partículas tienen un movimiento lento y laminar, depositándose por gravedad (sedimentación) [141]. Aquéllas con un tamaño inferior a 1 μm, no se verán afectadas por la gravedad y se encontrarán sometidas a movimientos brownianos. De este modo, las partículas se mueven de forma errática dentro del árbol respiratorio, siendo muy complicado su depósito y difundiendo hacia el exterior del organismo mediante el aire expirado (ver Figura 5) [141]. Por consiguiente, es fundamental diseñar sistemas para inhalación con un tamaño adecuado, debiendo estar comprendidos entre 1-5 μm para evitar su pérdida, bien por impacto en el tracto respiratorio superior, o bien por difusión al

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

exterior. Si queremos un efecto local en bronquios y bronquiolos, el D_{aer} debe estar entre 3 y 5 µm; mientras que si deseamos alcanzar los alvéolos para un efecto sistémico, el tamaño debe oscilar entre 1 y 3 µm [141].

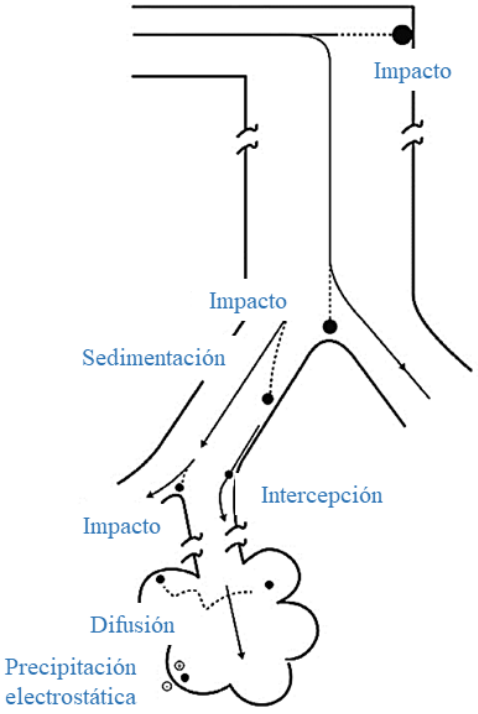


Figura 5. Mecanismos de depósito de las partículas inhaladas en el tracto respiratorio. (Figura adaptada del trabajo de Davenport et al. [129], Front. Physiol. 1 (2010) 139-146. Open Access Statement)

De todas formas, el depósito de las partículas puede verse alterado por un aumento del tamaño de las mismas producido por la humedad del aire del árbol respiratorio. Teniendo en cuenta que la humedad relativa es de un 99.5%, la temperatura es de 37 ºC y que el sistema farmacológico es higroscópico, se entiende que la partícula absorba parte de la humedad, pudiendo aumentar su tamaño y disminuir su densidad [142]. Sin embargo, este aumento está condicionado por el

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

tamaño inicial de la partícula, así como por sus características intrínsecas y las condiciones ambientales del tracto respiratorio [141].

El último de los factores físico-químicos que influyen en el depósito pulmonar de las partículas es su carga electrostática superficial. En concreto, si es positiva establece interacciones con la mucina presente en la mucosa respiratoria (de carga negativa), pudiéndose adherir a la misma. En este sentido, las partículas más positivamente cargadas se depositan más fácilmente en el tracto respiratorio superior que las partículas con carga negativa o neutra [141].

También, es muy importante tener en cuenta que hay una intervariabilidad individual fisiológica, que puede afectar el depósito de partículas, como son el volumen corriente, la frecuencia respiratoria, el diámetro de las vías aéreas, el volumen de mucus y la disminución del diámetro de los conductos respiratorios derivado de una condición fisiológica (pacientes pediátricos) o de una patología obstructiva.

El volumen corriente es la capacidad de aire inspirado o expirado durante una respiración normal. Se obtiene mayor eficacia terapéutica cuanto mayor es el volumen corriente porque el fármaco llega a zonas más distales del tracto respiratorio. La frecuencia respiratoria es el número de respiraciones que hace una persona en un tiempo determinado [143]. Ambos condicionan el llamado "flujo inspiratorio", que es el volumen de aire que se inspira en un minuto ($L \cdot min^{-1}$). Cuando el flujo inspiratorio es alto, se produce un mayor depósito de partículas por impacto en el tracto respiratorio superior; mientras que un flujo lento, promueve la llegada de las partículas al pulmón profundo, sedimentando por efecto de la gravedad. Es por ello que los valores recomendados de flujo inspiratorio están entre 30 y 60 $L \cdot min^{-1}$, debiéndose hacer una inspiración profunda y homogénea, manteniendo una apnea tras la inhalación de unos 10 segundos como mínimo para ayudar a la sedimentación de las partículas en el tracto respiratorio inferior [144]. En el caso de una disminución del diámetro de los conductos respiratorios (bien por una cuestión fisiológica o por una patología obstructiva), se produce un aumento del impacto de partículas, incrementando el depósito en los pulmones [145].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Además, debemos tener en cuenta que el tracto respiratorio se encuentra en contacto directo con el medio exterior, por lo que dispone de sus propios mecanismos de defensa para eliminar todas aquellas partículas y microorganismos perjudiciales, manteniendo la homeostasis pulmonar. Así, estos mecanismos ventajosos para el organismo suponen a la vez un obstáculo para la llegada de aerosoles medicamentosos. Como se mencionó anteriormente, el tracto respiratorio tiene una estructura ramificada con conductos cada vez más estrechos a medida en que se profundiza, en donde se produce el impacto de las partículas externas y en los que se reduce la velocidad de movimiento de circulación del aire. Incluso la existencia de uniones estrechas entre las células sirven de barrera física de protección frente a agentes externos [145]. Todo ello, promueve el depósito de las partículas externas, lo que facilitará su eliminación del organismo. Para ello, existen ciertos mecanismos de defensa del pulmón, que son diferentes en función de la región pulmonar, encargados deeliminar las partículas extrañas. Los mecanismos de defensa pulmonar son el ascensor mucociliar, tos, estornudo, macrófagos alveolares y actividad enzimática. Así, por ejemplo, las partículas depositadas en bronquios y bronquiolos, se pueden eliminar mediante el "ascensor mucociliar" o disolverse en esa región realizando una acción a nivel local. En cambio, parte de aquellas partículas que se han depositado en el área alveolar, serán fagocitadas por macrófagos y, por tanto, se disminuye el paso hacia el torrente circulatorio.

Ascensor mucociliar: es uno de los mecanismos de defensa más importantes. Se trata de la combinación de un fluido situado en la superficie del árbol respiratorio, junto con el movimiento ciliar [146]. Este fluido es producido, fundamentalmente, por células caliciformes, glándulas de la mucosa y glándulas serosas de la submucosa. Se subdivide en dos capas: la más próxima al lumen es el mucus, de apariencia viscosa (debido al alto contenido en mucinas), en donde se retienen las partículas que han depositado. Debajo de este mucus, está la capa de líquido periciliar, de baja viscosidad y en donde se realiza el movimiento de los cilios. A su vez, por debajo del líquido periciliar, está el epitelio respiratorio, compuesto de células caliciformes

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(encargadas de las secreciones) y células ciliadas (encargadas del movimiento del fluido hacia el exterior) (Figura 6) [146].

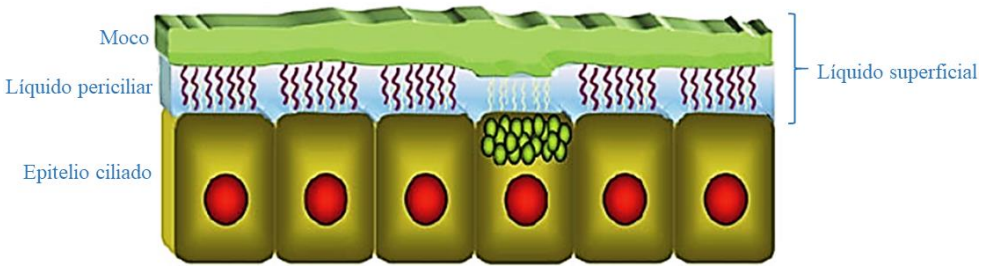


Figura 6. Estructura del ascensor mucociliar. (Figura adaptada del trabajo de Pérez et al. [147], Rev. médica Chile. 142 (2014) 606-615. Bajo licencia Creative Commons)

Cuando las partículas inhaladas se depositan en bronquios y en bronquiolos, se adhieren a la capa de mucus y son impulsadas hacia la faringe por medio del movimiento de los cilios. Este mucus con partículas se puede expulsar al exterior o deglutirse, pasando al tracto gastrointestinal. Por lo tanto, cuando se tratan de partículas medicamentosas, éstas apenas contribuyen al efecto terapéutico a nivel sistémico. Además, la existencia de enzimas como peroxidasas o lisozimas contribuyen a su eliminación [146]. En el caso de que la persona presente una situación fisiológica normal, la aclaración es en torno a 1L de moco por día; mientras que en condiciones patológicas, se produce exceso de moco, pudiendo llegar a producirse obstrucción, como en el caso de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) y en asma. En estas situaciones patológicas, actúan otros mecanismos de defensa como la tos y el estornudo.

Tos: es un acto reflejo que sirve para la desobstrucción de las vías aéreas. Comienza por el estímulo de receptores sensoriales de áreas tusígenas, situadas en cuerdas bucales, laringe, mucosa traqueal, mucosa bronquial y en pleura. En función del lugar en donde se produce el estímulo, estos receptores envían una señal a través de diferentes nervios (glosofaríngeo, laríngeo superior, vago o trigémino) al bulbo raquídeo, en donde se encuentra el Centro Tusígeno. Allí se

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

origina una respuesta que es enviada mediante los nervios eferentes. A continuación, se produce una fase de inspiración, el cierre de la glotis (mediante un aumento de la presión pulmonar) y la apertura súbita de la glotis con exhalación [148].

Estornudo: es un acto reflejo que se produce por la estimulación del nervio trigémino en nariz y orofaringe a causa de agentes irritantes. Éstos pueden estimular terminaciones nerviosas sensoriales o desencadenar la liberación de ciertas moléculas mediadoras como, por ejemplo, la histamina. Cuando se estimulan los nervios trigéminos, se transmiten señales al centro del estornudo, situado en la médula ubicada en el tronco del encéfalo. Allí se activan neuronas parasimpáticas que se comunican con las glándulas lacrimales, pero también se activan neuronas motoras que conducen a los músculos faciales y del tracto respiratorio. Se cree que este mecanismo de defensa ayuda a evitar no sólo la entrada de partículas irritantes y patógenas en los pulmones, si no también la formación de elevadas densidades de bacterias antes de que desarrollen biopelículas patógenas [148].

Macrófagos alveolares: son células fagocíticas que derivan de monocitos y que son el principal mecanismo de defensa que hay en los alvéolos pulmonares. Teniendo en cuenta que allí no hay cilios, las partículas extrañas que han llegado a la zona alveolar y que no han pasado al torrente circulatorio, pueden ser eliminadas mediante fagocitosis por los macrófagos. La fagocitosis es altamente dependiente de varios factores, como son la composición, carga superficial, tamaño y forma los nanosistemas, así como la presencia o ausencia de ligandos en su superficie [149,150]. Así, por ejemplo, la fagocitosis aumenta con partículas que contienen en su composición fosfatidilserina, fosfatidilglicerol y ácido hialurónico; partículas con alta carga superficial positiva o negativa; partículas de tamaños comprendidos entre 100-200 nm y 1-6 μm; partículas esféricas; y partículas cuya superficie está modificada con manosa, proteína surfactante A y D, O-esteroil amilopectina, albúmina de suero bovino maleilada, tuftsina [150]. Una vez fagocitadas las partículas, éstas pueden eliminarse por el sistema linfático o ser llevadas al ascensor

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

mucociliar para su llegada a la faringe y, desde allí, pueden deglutirse o ser expulsadas hacia el exterior [149].

Actividad enzimática: las enzimas presentes en el tracto respiratorio (ej.: inhibidores de proteasas, isoenzimas de la familia del citocromo P-450 y lisozimas) [151] se encargan de degradar las partículas inhaladas, por lo que influyen en la biodisponibilidad de los fármacos inhalados. Esta actividad enzimática es menor en comparación con otras vías como, por ejemplo, la oral [151].

En general, estos mecanismos de defensa disminuyen el tiempo en que permanecen las partículas e AIs en los pulmones. Por consiguiente, cuando se pretende un efecto local, es de suma importancia que el fármaco se libere muy rápidamente y se disuelva para realizar su acción terapéutica a tiempo, antes de ser eliminado.

2.4.3. Interés de la administración de antibióticos por vía pulmonar

Entre los distintos tipos de enfermedades que afectan al pulmón, cabe destacar las infecciones bacterianas, fúngicas y víricas. Todas ellas llegan a afectar a gran parte de la población mundial, siendo más populares las infecciones bacterianas, cuyo tratamiento se ve frecuentemente dificultado por las resistencias a los antibióticos.

Para conseguir mejores efectos terapéuticos, resulta de gran interés la administración de los antibióticos directamente al pulmón por vía inhalatoria. Ésta presenta importantes ventajas, como son la administración directa del fármaco en el lugar de acción, que da lugar a una mayor eficacia terapéutica, una reducción de la dosis administrada en comparación a otras vías (como la oral) y una disminución de los efectos secundarios/adversos asociados a la administración sistémica. Además, entre otras ventajas, se disminuye la aparición de resistencias.

Entre las infecciones bacterianas, la TB tiene una elevada incidencia y produce una gran cantidad de muertes en todo el mundo cada año (ver sección 2.4.4). Por ello, se están dirigiendo muchos esfuerzos de investigación a su comprensión y tratamiento.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.4.4. Tuberculosis pulmonar

Actualmente, la TB es una de las 10 principales causas de muerte en todo el mundo [152,153]. En el año 2020, en el ranking de fallecimientos producidos en todo el mundo debido a enfermedades infecciosas, la TB fue la segunda causa (1.5 millones de personas en el mundo [154]), tan solo por detrás de la reciente pandemia ocasionada por el SARS-CoV-2 (> 1.9 millones) [155]. La TB se ocasiona principalmente por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* [156]. La transmisión de la enfermedad se produce habitualmente por la emisión de gotitas infectadas con el bacilo al aire por personas con TB pulmonar activa. Estas gotitas presentan un tamaño inferior a 50 mm. En suspensión, se secan rápidamente originando partículas sólidas denominadas núcleos de gotitas, con tamaños de 1 a 5 mm, y pueden permanecer en el aire durante horas. Estas partículas infectadas se inhalan y se depositan en las vías respiratorias profundas.

La enfermedad afecta principalmente a los pulmones, pero también puede extenderse a otros órganos [157]. La probabilidad de que un sujeto pueda infectarse por *M. tuberculosis* es mayor con el incremento de la concentración de núcleos de gotitas infecciosos en el ambiente, una ventilación de aire inadecuada, un tiempo prolongado en el espacio contaminado y un estado de salud general deficiente [158-160]. Para que una persona desarrolle TB, primero debe ocurrir la infección por *M. tuberculosis* y, en segundo lugar, dicha infección debe progresar a la enfermedad de TB [161]. Después de la infección inicial, *M. tuberculosis* puede ser erradicado por la respuesta inmune o, de lo contrario, avanzar la enfermedad, desarrollando TB activa. En este caso, el sujeto puede presentar síntomas de tipo pulmonar o extra-pulmonar (por ejemplo, tos productiva, fatiga, fiebre, malestar, sudores nocturnos y pérdida de peso). Alternativamente, la respuesta inmune puede prevenir una mayor proliferación y diseminación de *M. tuberculosis* y el individuo no desarrollar TB activa, pero los bacilos permanecen vivos en los pulmones o en otros órganos durante años, ocasionando una infección latente. El 5% de los sujetos con infección latente desarrollará la enfermedad más adelante en la vida debido a una depresión inmunitaria, generalmente como consecuencia de, por

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ejemplo, una desnutrición o el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) [162,163].

Las primeras células que se encuentran con *M. tuberculosis* son los macrófagos alveolares, que presentan una importancia en la protección del cuerpo humano contra la infección. Además, estos macrófagos son un nicho de crecimiento, donde los bacilos residen y se multiplican. La terapia convencional para el tratamiento de la tuberculosis (TB) recomendada por la Organización Mundial de la Salud (WHO) consiste en un difícil régimen diario de múltiples fármacos por vía oral, que comprende la toma durante los dos primeros meses de isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida (fármacos antituberculosos de primera línea) y los cuatro meses siguientes de isoniazida y rifampicina [164]. Sin embargo, aunque se estimó que la eficacia del tratamiento era del 85% [165], existen varios factores que pueden afectar a la tasa de éxito, como el uso inadecuado de medicamentos antiTB, el empleo de medicamentos de calidad deficiente o las malas condiciones de almacenamiento de los medicamentos antituberculosos. Asimismo, el tratamiento del paciente es una tarea difícil por varios motivos, ya que los fármacos antiTB presentan baja estabilidad y absorción, importante metabolismo hepático, y dificultades para llegar a los granulomas y penetrar en las bacterias. Además, el tratamiento es demasiado prolongado y lleva asociados importantes efectos secundarios indeseables (por ejemplo, tos productiva, fatiga, fiebre, malestar, sudores nocturnos y pérdida de peso [157]). Por tanto, el cumplimiento del tratamiento por parte de los pacientes puede verse comprometido [166] y, además, se pueden desarrollar resistencias bacterianas graves y generalizadas [165].

2.4.5. Tratamiento de la tuberculosis: Isoniazida (INH)

La INH es un fármaco antiTB empleado para combatir *M. tuberculosis*, utilizándose desde hace más de 60 años en el tratamiento de primera línea en todos los tipos de TB, siendo uno de los más efectivos hasta la fecha [167]. Fue descubierto de forma casi accidental en el año 1945 ya que, por entonces, se conocía la acción

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

tuberculostática de la estructura nicotinamida (que forma parte de la molécula INH).

La INH, o piridina-4-carbohidrazida, es un polvo blanco (incoloro) sintético. Su fórmula molecular es $C_6H_7N_3O$; su peso molecular, 137.14 $g \cdot mol^{-1}$; su punto de fusión, 173 °C y el LogP es de -0.64. Presenta una baja solubilidad en agua (~ 14% a 25 °C, ~ 26% a 40 °C), siendo inferior en etanol (~ 2% a 25 °C) y aún menor en cloroformo (~ 0,1% a 25 °C). En solventes orgánicos (ejemplo, éter etílico) ya es prácticamente insoluble. Además, la INH es estable a temperatura ambiente (RT). Al 1% en solución acuosa, su pH es de 5.5 a 6.5; y su pKa es de 1.82, a 20 °C [168].

La estructura de la INH (Figura 7) consta de un anillo de piridina y un grupo hidracina unido en posición "para" al nitrógeno de la piridina.

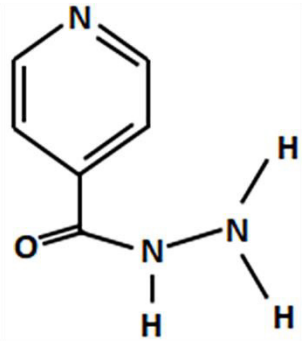


Figura 7. Estructura química de la isoniazida (INH). (Figura de nueva creación)

Tanto la INH como sus derivados son heterociclos con nitrógeno en su estructura y, por ello, han sido objeto de un gran interés en la química farmacéutica al tener una gran versatilidad farmacológica: antibacteriana, antimicobacteriana, antifúngica, antivírica, antitumoral, anticonvulsiva, etc. [169-172]. Concretamente, dentro del espectro antibacteriano, la INH actúa contra micobacterias de crecimiento rápido; mientras que tiene una acción bacteriostática en aquéllas de crecimiento lento o latente [168]. De hecho, la actividad más destacada de la INH es la anti-TB. Su espectro comprende varias

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

especies dentro del género *Mycobacterium*, como *M. tuberculosis, M. kansaii y M. bovis*. Realmente, uno de los grandes éxitos del uso de este fármaco es su baja concentración inhibitoria (de 0.1 a 0.7 μM [168]) contra *M. tuberculosis* y, aunque habitualmente se co-administra con otros fármacos, también se ha usado sola en tratamiento profiláctico.

Inicialmente, la INH penetra en la bacteria cruzando la pared celular por difusión pasiva [173]. Cuando está dentro de la bacteria, la INH no es bactericida de por sí, ya que es un profármaco que, a su vez, es activado por una catalasa llamada KatG [167,168]. El metabolito obtenido origina especies de oxígeno reactivas (ROS), como son el peróxido de hidrógeno, superóxido, peroxinitrito e isonicotinoilo [174]. Este último radical interfiere en una serie de procesos celulares que conducen en último término a la inhibición de la síntesis de la pared celular, produciendo la muerte de la bacteria [175]. Asimismo, las ROS también dañan otras estructuras o moléculas vitales, como los lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, membranas, etc. [167,168], favoreciendo el efecto bactericida.

Sin embargo, el uso de INH a largo plazo hace que la aparición de resistencias sea cada vez más común. En efecto, los mecanismos de resistencia más habituales son los relacionados con la enzima KatG y con el gen inhA (responsable, en último término, de la formación de la pared bacteriana), evitando que la INH se transforme en un metabolito activo. También, hay resistencias a la INH relacionadas con mutaciones de los genes ahpC, KasA y ndh [176].

Por ello, cada vez es más urgente el uso de derivados de la INH o de nuevas estrategias más específicas y efectivas del uso de la INH para el correcto tratamiento de la TB. En el primer caso, se ha sugerido el empleo de análogos de la INH más lipófilos (mediante la adición de estructuras lipofílicas a la molécula INH [177]) para mejorar su permeabilidad en las bacterias, incrementando el efecto antituberculoso. En el segundo caso, es importante tener en cuenta que las vías de administración empleadas para la INH son la oral, intravenosa e intramuscular, siendo la más usada la vía oral. Por esta ruta, el fármaco se absorbe rápidamente, alcanzando el pico de concentración sérica a las 0.5-2 h; pero existien varios factores que

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

disminuyen de forma importante su biodisponibilidad, como es la toma concomitante de alimentos o la presencia de enfermedades subyacentes (ejemplo, SIDA) [178]). La distribución del fármaco en fluidos y tejidos del organismo es amplia (en torno al 61% del peso corporal), produciéndose una unión baja a proteínas en sangre. La metabolización se produce principalmente por acetilación en el hígado, siendo fuertemente dependiente de factores genéticos. La vida media es de 0.5-4 h, eliminándose a través de la orina el fármaco y los metabolitos en un 75 al 96%, a las 24 h [168]. De hecho, su principal efecto secundario es la toxicidad hepática [167]. Por ello, es interesante plantear estrategias más específicas, efectivas y con menor dosis de INH que permitan mejorar la actividad y el éxito terapéutico, disminuyendo la toxicidad y acortando los tiempos de tratamiento.

2.5. Biocompatibilidad de las MOFs con el pulmón

Se ha investigado la biocompatibilidad de las MOFs en las diferentes rutas biológicas para determinar su posible toxicidad en células y tejidos, destacando especialmente los estudios dirigidos a la vía parenteral [78].

De todas las vías de administración, la vía pulmonar (objeto de este estudio) es muy interesante por ser una vía de administración novedosa y alternativa debido a sus ventajas respecto a las vías tradicionales parenteral y oral (ver sección 2.4.).

Los avances más significativos en los estudios de biocompatibilidad de las MOFs destinadas al pulmón se detallan a continuación, agrupados en estudios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

2.5.1. Estudios *in vitro*

Previamente a la utilización de las MOFs como portadores de fármacos por vía pulmonar, es muy importante evaluar su biocompatibilidad mediante estudios *in vitro*. Así, se ha evaluado su citotoxicidad en contacto con diferentes líneas celulares. Específicamente, las NPs de Fe-MIL-101-NH_2 cargadas con INH se evaluaron en fibroblastos L929 [179]; las NPs MIL-100(Fe) y el tereftálato de cromo MIL-101(Cr) (recubiertas o no de bicapas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

lipídicas de soporte de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina) [180] se examinaron en células epiteliales alveolares murinas MLE12 [181]; NPs MIL-100(Fe), en células A549 y en la línea celular de cáncer de pulmón humano Calu-3 [182]; y las NPs de UiO-66, en células A549 [183]. En todos los casos, se observó una viabilidad elevada en todas las líneas celulares investigadas. Además, en el primer caso, las NPs se ubicaron dentro de las células L929, preservando la integridad celular. En el segundo estudio, se demostró que las bicapas lipídicas mejoran la biocompatibilidad de las NPs MIL-100(Fe) y MIL-101(Cr) en MLE12. En el tercer caso, se observó una elevada viabilidad, incluso a la concentración más alta empleada de NPs (50 $\mu g.mL^{-1}$). Las MOFs de UiO-66 y MIL-100(Fe) han demostrado ser estables en agua por lo que, en principio, podrían ser candidatos adecuados para la administración de fármacos en el fluido pulmonar [184-186]. Además, exhiben estabilidad dependiente del pH, degradabilidad en condiciones intracelulares y resistencia a la degradación en ambientes extracelulares. La citotoxicidad evaluada con NPs de varios niveles de defectividad mostró altas viabilidades, revelando una buena biocompatibilidad de ambas NPs, UiO-66 y MIL-100(Fe) como vehículos de fármacos por vía pulmonar. Por lo tanto, y a la vista de estos resultados prometedores, se podría apoyar la biocompatibilidad de las MOFs para administración pulmonar.

2.5.2. Estudio *ex vivo*

Los estudios *ex vivo* resultan también muy interesantes para conocer la biocompatibilidad. En el caso de las MOFs, se llevó a cabo un estudio *ex vivo* con NPs de Fe-MIL-101-NH_2 en macrófagos murinos RAW 246.9 [120]. Para ello, inicialmente se extirparon los pulmones de ratas Wistar y se administraron MPs de PLGA y LC que contenían NPs Fe-MIL-101-NH_2 cargadas con INH a través de la tráquea. Se comprobó que las MPs no originaban toxicidad en el tejido pulmonar y, a las 24 h, se localizaron en los macrófagos. Como era de esperar, se produjo un aumento de la concentración de INH en los macrófagos durante el experimento, especialmente con las MPs de PLGA, que activaron la fagocitosis [187-189]. Por lo tanto, además de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ser biocompatibles, estas MOFs fueron capturadas de manera eficiente por los macrófagos RAW 246.9.

2.5.3. Estudios *in vivo*

Aunque los estudios *in vitro* y *ex vivo* son muy útiles para estudiar los sistemas, previamente a los ensayos *in vivo*, existen numerosos fenómenos imposibles de determinar mediante los estudios anteriores (como, por ejemplo, efectos inflamatorios).

Aunque previamente a esta Tesis, no existían ensayos *in vivo* por vía pulmonar, existe un estudio donde las NPs de MIL-100 cargadas con GMP se administraron por vía intravenosa a ratones para el tratamiento del cancer de pulmón [82]. Se confirmó que el nanosistema llegaba a los capilares pulmonares por direccionamiento pasivo, filtrándose y accediendo al tumor [190,191]. Los resultados demostraron que las NPs de MIL-100 eran biocompatibles con el tejido pulmonar, habiendo una disminución en la proliferación de células cancerosas de los animales tratados con MIL-100-GMP. En cualquier caso, como ya se comentó, para el tratamiento de enfermedades pulmonares, es preferible una administración directa por vía pulmonar para evitar los problemas asociados a las vías oral y parenteral (dolor, efecto de primer paso hepático, etc.).

Un estudio reciente propuso la administración pulmonar NPs de UiO-66 mediante instilación orotraqueal a ratones hembra C57BL/6J [183]. Tras 24 h de la administración, se comprobó que las NPs originaban una baja activación proinflamatoria en macrófagos alveolares y no se encontraba un aumento importante de los niveles de TNF-α e IL-6. Las NPs de UiO-66 se eliminaron del organismo después de 7 días de su administración. Los resultados demostraron que las NPs de UiO-66 son biocompatibles y seguras como portadores de fármacos por vía pulmonar. Sin embargo, teniendo en cuenta las barreras fisiológicas mencionadas anteriormente, así como la escasa estabilidad de las formulaciones líquidas, reviste más interés su formulación como polvos secos [192].

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.6. Perspectiva actual: Ensayos clínicos y comercialización de medicamentos a base de MOFs para la administración pulmonar de fármacos

Teniendo en cuenta los buenos resultados de las MOFs para la liberación de fármacos y su alta biocompatibilidad con el pulmón, se pone de manifiesto su enorme potencial para el tratamiento de enfermedades pulmonares infecciosas. Sin embargo, hoy en día, no se comercializan medicamentos basados en MOFs para el tratamiento de enfermedades por vía pulmonar, ni existen ensayos clínicos registrados en los que se incluyan sistemas basados en MOFs con fines de liberación pulmonar de AIs. Esto es debido, seguramente, a que los estudios de MOFs para terapia por vía pulmonar son muy recientes y, por tanto, no ha transcurrido el tiempo suficiente para su llegada a ensayos clínicos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Antecedentes

La Nanotecnología es un área de investigación dentro de la Tecnología Farmacéutica de gran interés para la creación de nuevos vehículos destinados a la administración de moléculas activas, con uso terapéutico en el tratamiento de diferentes enfermedades [1].

1. Las nanopartículas (NPs) MOFs han demostrado ser interesantes para múltiples propósitos, destacando su papel en Biomedicina como un novedoso transportador de moléculas activas (fármacos, proteínas, enzimas, material genético, etc.) [30], pudiendo ser aplicado por diferentes rutas (parenteral, cutánea, oral, bucal, ocular, rectal…) [16]. De entre ellas, actualmente está emergiendo un nuevo campo de investigación destinado a su uso para la vía pulmonar, siendo todavía muy incipiente. Las perspectivas son muy alentadoras, ofreciendo la posibilidad de desarrollar formulaciones a base de MOFs con capacidad de administración directa y potencialmente más ventajosas que los tratamientos convencionales dirigidos a patologías que afectan al pumón.

2. Existen numerosas enfermedades que afectan al tracto respiratorio. De entre ellas, destacan las infecciones pulmonares, no sólo por la preocupante incidencia mundial, sino también por las complicaciones que se producen frecuentemente en sus tratamientos. Este es el caso de la tuberculosis (TB), que en el 2020 supuso la segunda causa infecciosa de muerte mundial, tan sólo por detrás del SARS-CoV-2 [155]. Su tratamiento es complejo y consta de varios fármacos, administrados en múltiples dosis y por largo tiempo. Esto conduce al incumplimiento posológico frecuente por parte del paciente y trae consigo otros problemas asociados, como son la aparición de resistencias y efectos adversos [164,165].

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. Para la administración directa de nanosistemas al pulmón, su microencapsulación en microsferas (MS) de un excipiente adecuado (polvos secos) es una interesante opción, ya que se consigue administrar de forma precisa en la región diana pulmonar, reduciendo la dosis, así como los efectos adversos. El excipiente de mayor éxito empleado en estudios previos es el manitol (Ma), ya utilizado para la microencapsulación de NPs poliméricas, lipídicas, nanocápsulas, etc., con excelentes resultados [116,192,193].

4. La atomización es un proceso de secado, gracias al cual una solución de excipiente o una suspensión de nanosistemas en una solución de excipiente se convierte en un polvo seco. Este polvo está conformado por MS del excipiente (generalmente un azúcar) que, en el segundo caso, contiene los nanosistemas dispersos en su microestructura [192]. Es una técnica apta para formulaciones que contienen moléculas lábiles, ya que mantiene su integridad [119]; y, además, se pueden modular las características del polvo final en función de los valores seleccionados de los parámetros del proceso de atomización [194]. La preparación de polvos secos para inhalación mediante atomización tiene un enorme potencial para satisfacer en un futuro próximo las necesidades terapéuticas actuales, en comparación con los tratamientos convencionales por otras vías de administración.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Hipótesis

Es posible desarrollar un sistema micro-nanoparticulado a base de redes metal-orgánicas (MOFs), para tratar de forma local una infección pulmonar causada por *Mycobacterium tuberculosis* mediante su administración directa a la región diana. Se espera que mejore el tratamiento convencional (por vía oral) y sea biocompatible con la vía pulmonar. De este modo, la hipótesis general planteada se puede desglosar en:

Hipótesis I: La isoniazida (INH) es uno de los fármacos de primera línea empleados para el tratamiento de la tuberculosis (TB). Es razonable considerar que su administración directa al pulmón reducirá su dosis y efectos secundarios respecto al tratamiento convencional por vía oral.

Hipótesis II: Teniendo en cuenta que las NPs MOFs de trimesato de hierro (III) mesoporoso MIL-100(Fe) se pueden sintetizar mediante un método verde, son estables, biocompatibles y presentan una alta porosidad, es esperable que puedan transportar una alta carga del fármaco anti-tuberculoso INH.

Hipótesis III: Se puede emplear el método de atomización para preparar polvos secos de forma segura y controlada, ya que se trata de una técnica sencilla y eficaz de fabricación con la que se permite el desarrollo de forma racional y controlada de las características del polvo para inhalación.

Hipótesis IV: En vista de los excelentes resultados de las formulaciones previas preparadas por nuestro grupo de investigación, empleando el manitol (Ma) como excipiente de atomización y otros nanosistemas de distinta naturaleza, se piensa que la obtención de polvos secos con características aerodinámicas adecuadas para la administración de NPs MOFs a la zona pulmonar profunda, es factible.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Objetivos

Diseñar y desarrollar una plataforma micro-nanoparticulada para administrar fármacos antituberculosos por vía pulmonar, consistente en redes metal-orgánicas (MOFs) de tamaño nanométrico MIL-100(Fe) conteniendo un fármaco anti-tuberculoso y microencapsuladas en microsferas de manitol (Ma MS). Este objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos específicos:

Objetivo I: Cargar las nanopartículas (NPs) MIL-100(Fe) con isoniazida (INH), un fármaco antituberculoso de primera línea, utilizando el método de impregnación en dos pasos de las NPs MIL-100(Fe) en una solución acuosa de INH.

Objetivo II: Optimizar el procedimiento de atomización y seleccionar el excipiente más adecuado para la microencapsulación de MOFs.

Objetivo III: Microencapsular las MOFs (con y sin fármaco) con el mejor excipiente de atomización y determinar la mejor relación NPs:excipiente.

Objetivo IV: Caracterizar las MS obtenidas en cuanto a morfología, diámetro aerodinámico teórico, diámetro geométrico, densidad real y densidad aparente.

Objetivo V: Comprobar si las MOFs y la INH son liberadas en medios pulmonares simulados.

Objetivo VI: Evaluar la biocompatibilidad de las MOFs y del excipiente de atomización en cultivo de células pulmonares, así como la distribución pulmonar del sistema.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4. MATERIALES Y MÉTODOS

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4.1. Materiales

Ácido trimésico (H_3BTC, 95%, Peso Molecular-MW: 210.14 $g \cdot mol^{-1}$), cloruro férrico hexahidratado ($FeCl_3.6H_2O$ ≥99%, MW: 162.20 $g \cdot mol^{-1}$), isoniazida (INH, ≥99%, MW: 137.14 $g \cdot mol^{-1}$), D-manitol (Ma, ≥98%, MW: 182.17 $g \cdot mol^{-1}$), ciclodextrina α (α-CD, ≥99%, MW: 972.84 $g \cdot mol^{-1}$), dextrano (Dex, ≥99%, MW = 72200 $g \cdot mol^{-1}$), D-(+)-manosa (Man, ≥99%, MW: 180.16 $g \cdot mol^{-1}$), D-(+)-trehalosa dihidrato (Tre, ≥99%, MW: 378.33 $g \cdot mol^{-1}$), D-sorbitol (Sor, ≥98%, MW: 182.17 $g \cdot mol^{-1}$), D-(-)-fructosa (Fru, ≥99%, MW: 180.16 $g \cdot mol^{-1}$), L-glutamina, dodecilsulfato sódico (SDS) y comprimidos de tampón fosfato salino (PBS, pH = 7.4) fueron adquiridos a Sigma Aldrich (Madrid, España). La línea celular A549 fue obtenida de ATCC (Manassas, EE.UU.). El medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), suero fetal bovino (FBS), tripsina-EDTA (0.05%) y Fluoromount® fueron comprados a Gibco™ (ThermoFisher Scientific, Madrid, España). Fluoruro de potasio (KF, 99%, MW: 58.09 $g \cdot mol^{-1}$) fue obtenido de Acros Organics™ (Madrid, España). Triton® X-100 (grado biológico molecular) fue adquirido a Laboratorios Scharlab S.L. (Barcelona España). CellTiter-Blue (AlamarBlue®) fue obtenido de Promega (Fitchburg, EE.UU.). LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit fue adquirido a Invitrogen™ (Waltham, EE.UU.). 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) fue obtenido de Emp-Biotech (Berlin, Germany). Trypan Blue fue conseguido de Logos Biosystems (Sainghin-en-Mélantois, Francia). Formalina neutra tamponada (10% *v/v*) fue comprada a Bio-Optica (Milan, Italia). Agua MilliQ fue obtenida por filtración (filtros 0.2 μm, Millex®-GN, Millipore Iberica, Madrid, España). Etanol (96%) fue adquirido a Labkem (Murcia, España). Curosurf® (surfactante pulmonar porcino, 80 $mg \cdot mL^{-1}$ de fosfolípidos pulmonares) fue facilitado por el Profesor Almeida (de la Universidad de Lisboa, Portugal), quien lo obtuvo de Angelini Pharmacêutica, Lda. (Lisboa, Portugal).

Todos los materiales se usaron sin purificación adicional.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2. Síntesis y caracterización de las MOFs

4.2.1. Síntesis y activación de MIL-100

Cantidades de 6.0 mmol de $FeCl_3.6H_2O$ y 4.0 mmol de H_3BTC fueron disueltas en 30 mL de agua destilada. La reacción se llevó a cabo mediante una síntesis asistida por microondas con un Mars-5 instrument, CEM (Midland, Canadá) a 130 °C durante 30 s, manteniendo a esta temperatura durante 5 min y 30 s. Al finalizar la reacción, se dejó que descendiera la temperatura hasta 80-90°C y se introdujeron los tubos reactores en hielo. Después, se recuperaron las NPs mediante centrifugación (a 10500 rpm, durante 25 min, a 20 °C) y, posteriormente, se lavaron con 20 mL de agua MilliQ (6 veces) y EtOH (1 vez) en una centrífuga Thermo Scientific Heraeus Megafuge 16R (Loughborough, Reino Unido) [195].

A continuación, se llevó acabo la "activación" o purificación de las NPs MOFs para eliminar posibles reactivos no reaccionados y dejar accesibles los poros. Para ello, las NPs se resuspendieron en 20 mL de una solución de 0.1 M de KF y se dejaron en agitación magnética durante 1 h y 40 min. Después, se recuperaron las NPs mediante centrifugación (a 15000 rpm, durante 10 min, a 20 °C) y luego se lavaron con 20 mL de agua MilliQ (2 veces) y EtOH (1 vez). A continuación, las NPs se almacenaron a RT con unas pocas gotas de EtOH para impedir el secado completo de las NPs [62].

4.2.2. Encapsulación de isoniazida (INH)

La encapsulación de INH en las NPs MIL-100 se llevó a cabo mezclando una suspensión de NPs MIL-100 (0.029 mmol de polvo seco en 500 μL de agua MilliQ) con 0.6 mL de solución de INH (0.15 M), bajo agitación durante 4 h. El sólido conformado por NPs INH@MIL-100 obtenido se recuperó por centrifugación (a 14500 rpm, durante 10 min, a 20 °C) y se resuspendió en una nueva solución de INH, repitiendo el mismo procedimiento. La cantidad de INH incorporada en las NPs MIL-100 se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, Jasco LC-4000 series, equipado con

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

un detector PDA MD-4015 y un multimuestreador AS-4150 controlado por un software ChromNav (Jasco Inc, España)) y análisis termogravimétrico (TGA, termobalanza SDT Q-600, TA Instruments, New Castle, De, EE.UU.). Las condiciones de HPLC fueron: la fase móvil consistió en una solución 98:2 (*v/v*) de PBS (0.02 M, pH = 6.8) y MeOH. El volumen de inyección se fijó a 30 µL, la tasa de flujo fue de 1 $mL \cdot min^{-1}$ y la temperatura de la columna se estableció en 25 °C. La curva estándar de calibración presentó un buen coeficiente de correlación (≥ 0.99). El cromatograma de las soluciones estándar presentó un tiempo de retención de 8.77 min, identificado como INH (λ_{max} a 266 nm). Los TGA se realizaron en una termobalanza SDT Q-600 (TA Instruments, New Castle, EE.UU.), usando un perfil de calentamiento general (desde 30 °C a 600 °C), con una velocidad de calentamiento de 5 $°C \cdot min^{-1}$, bajo aire con un flujo de 100 $mL \cdot min^{-1}$.

Las NPs INH@MIL-100 fueron conservadas a RT en la cantidad justa de agua MilliQ.

4.2.3. Cálculo del porcentaje de humedad y porcentaje de materia seca de las MOFs

Para trabajar con cantidades controladas y conocidas de NPs MIL-100 (en EtOH) e INH@MIL-100 (en agua MilliQ), se determinó el porcentaje de humedad de los lotes preparados y su correspondiente porcentaje de materia seca.

Inicialmente, se pesó una determinada cantidad de muestra (superior a 1 mg para que se reduzca el error). Se secó en estufa a 100 ºC durante 5 h. A continuación, se pesó la muestra seca.

Para calcular el % de humedad y el % de MOFs secas, se calculó de la siguiente forma:

$$\%\, Humedad = \frac{Peso\ MOFs\ húmedas\ -\ Peso\ MOFs\ secas}{Peso\ MOFs\ húmedas}\ x\ 100 \qquad (2)$$

$$\%\, MOFs\ secas\ =\ 100\%\ -\ \%\, Humedad$$

El estudio se hizo por triplicado (n = 3).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2.4. Dispersión de las MOFs

La dispersión de las MOFs se hizo siempre del mismo modo, pero con pequeñas variaciones en función del uso al que se fuera a destinar (estudios celulares o atomización), así como de la muestra de NPs de la que se parte (MIL-100 (en EtOH) o INH@MIL-100 (en agua MilliQ)).

4.2.4.1. MOFs destinadas a estudios celulares

Las MOFs se dispersaron en agua MilliQ, utilizando la siguiente metodología:

a) Dispersión de NPs MIL-100:

Se pesó en éppendorf la cantidad de MOFs (en EtOH) necesaria en función del estudio. Se eliminó el EtOH mediante lavados con agua MilliQ. Para ello, se añadió volumen suficiente de agua MilliQ (hasta 1.5 mL) y se vortexeó la muestra. Se centrifugó a 10500 rpm, 20 min y a 14 °C con una centrífuga Beckman Coulter™ Microfuge® 22R (Hyland Scientific, Stanwood, EE.UU). A continuación, se eliminó el sobrenadante, se añadió otra vez agua MilliQ hasta 1.5 mL, se vortexeó y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Tras eliminar el sobrenadante, se pesaron las MOFs húmedas, se añadió el correspondiente volumen de agua MilliQ (hasta que el volumen total fuese de 1.5 mL) y se vortexeó nuevamente. Se sonicó con una punta de ultrasonidos Ultrasonic Processor UP400 S – Hielscher 700 W Digital Sonifer, Alemania) a 10% de amplitud, 30 s, seguido de dos pulsos de 1 s, manteniendo la muestra en un baño de agua-hielo (para evitar el calentamiento de las NPs y, por consiguiente, su agregación durante el proceso). Después, se realizó la caracterización físico-química (determinación de tamaño y potencial ζ) de las muestras (se explicará en el apartado 4.2.5.) y se hicieron diluciones seriadas hasta conseguir las concentraciones oportunas para los estudios celulares (apartado 4.5.4.).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

b) Dispersión de NPs INH@MIL-100:

Se pesó en éppendorf la cantidad de MOFs necesaria en función del estudio. Como en este caso la muestra no contiene EtOH, se omitió el paso de eliminación de este solvente y se añadió el correspondiente volumen de agua MilliQ (hasta que el volumen total fue de 2.1 mL) y se vortexeó nuevamente. Se sonicó con una punta de ultrasonidos Ultrasonic Processor UP400 S – Hielscher 700 W Digital Sonifer, Alemania) a 10% de amplitud, 30 s, seguido de dos pulsos de 1 s, manteniendo la muestra en baño de agua-hielo (para evitar el calentamiento de las NPs y, por consiguiente, su agregación durante el proceso). Después, se realizó la caracterización fisicoquímica (determinación de tamaño y potencial ζ) de las muestras (se explicará en el apartado 4.2.5.) y se hicieron diluciones seriadas hasta conseguir las concentraciones oportunas para los estudios celulares (apartado 4.5.4.).

4.2.4.2. MOFs destinadas a formulación por atomización

La dispersión de las NPs se hace en solución del excipiente de atomización (solución de Ma) en una relación 1:10 (NPs:Ma), previo a su microencapsulación. Además, hay una pequeña variación teniendo en cuenta si se parte de NPs MIL-100 con o sin INH. Por lo tanto, la metodología de su dispersión se realiza como sigue:

a) Dispersión de NPs MIL-100:

Se pesó en falcon la cantidad de NPs MIL-100 (en EtOH) calculada para atomización. Como la muestra contiene EtOH, se eliminó el solvente mediante lavados con agua MilliQ. Para ello, se añadió volumen suficiente de agua MilliQ (hasta 11 mL) y se vortexeó la muestra. Se centrifugó con una centrífuga Beckman Coulter™ Microfuge® 22R (Hyland Scientific, Stanwood, EE.UU) a 10500 rpm, 20 min y a 14 °C. A continuación, se eliminó el sobrenadante, se añadieron hasta 11 mL de agua MilliQ, se vortexeó y se volvió a

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

centrifugar en las mismas condiciones. Tras eliminar el sobrenadante, se añadió parte de la solución de Ma (previamente preparada) hasta 10 mL y se vortexeó nuevamente. Se sonicó con una punta de ultrasonidos Ultrasonic Processor UP400 S – Hielscher 700 W Digital Sonifer, Alemania) a 10% de amplitud, 30 s, seguido de dos pulsos de 1 s, manteniendo la muestra en baño de agua-hielo (para evitar el calentamiento de las NPs y, por consiguiente, su agregación) durante el proceso. Después, se vertió la muestra en un vaso de precipitados y se barrieron las NPs que quedaron en el falcon con la restante solución de Ma, que se vortexeó e incluyó también en el vaso. Las MIL-100 se sonicaron otra vez empleando las mismas condiciones. A continuación, a la muestra se le aplicó un baño de ultrasonidos (Branson 1210, North Hampton, EE.UU) durante 15 min (condición óptima de dispersión). Finalmente, se realizó la caracterización físico-química (determinación de tamaño y potencial ζ) de las muestras (apartado 4.2.5.) antes de la atomización.

b) Dispersión de NPs INH@MIL-100:

Se pesó en falcon la cantidad de INH@MIL-100 en agua MilliQ calculada para atomización. Como en este caso la muestra no contiene EtOH, se omitió el paso de eliminación de este solvente. Se añadió parte de la solución de Ma (previamente preparada) hasta 10 mL y se vortexeó. Se sonicó con una punta de ultrasonidos Ultrasonic Processor UP400 S – Hielscher 700 W Digital Sonifer, Alemania) a 10% de amplitud, 30 s, seguido de dos pulsos de 1 s, manteniendo la muestra en baño de agua-hielo (para evitar el calentamiento de las NPs y, por consiguiente, su agregación) durante el proceso. Después, se vertió la muestra en un vaso de precipitados y se barrieron las NPs que quedaron en el falcon empleando la restante solución de Ma, que se vortexeó e incluyó también en el vaso. Las NPs INH@MIL-100 se sonicaron otra vez empleando las mismas condiciones. A continuación, a la muestra se le aplicó un baño de ultrasonidos (Branson 1210, North Hampton, EE.UU) durante 15 min (condición óptima de dispersión). Finalmente, se realizó la caracterización físico-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

química (determinación de tamaño y potencial ζ) de las muestras (apartado 4.2.5.) antes de la atomización.

4.2.5. Caracterización fisicoquímica y morfológica de las MOFs dispersadas

Las NPs MOFs se caracterizaron en cuanto a tamaño, PdI y potencial ζ mediante dispersión dinámica de luz (DLS) y anemometría láser doppler (LDA) usando un Zetasizer® Nano-ZS (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, Reino Unido). El análisis se realizó a 25 °C, con un tiempo de estabilización de 0 s. Las medidas se hicieron por triplicado (n = 3).

Además, la caracterización morfológica se realizó por Microscopía electrónica de barrido (TEM, Jem-2010 Electron Microscope, Oberkochen, Alemania) a 120 KV. Para su observación, se depositaron 10 µL de muestra en rejillas de cobre con películas de carbono y se tiñeron durante 2 min con ácido fosfotúngstico al 2% (*w/v*).

4.3. Microencapsulación de las MOFs y caracterización de las microsferas (MS) obtenidas

4.3.1. Preparación de MS control y selección del mejor excipiente de atomización

Se eligieron siete sacáridos (Ma, α-CD, Dex, Man, Tre, Sor y Fru) como excipientes de atomización. Pertenecen a la Lista Modelo de Medicamentos Esenciales de la WHO [196] y/o a la búsqueda de ingredientes inactivos para productos farmacéuticos aprobados de la Food and Drug Administration (FDA) [197]. Se utilizan en aplicaciones médicas, en cuidado de la salud, y en la industria alimentaria y de bebidas [198]. Las soluciones de estos excipientes se atomizaron mediante una técnica sencilla, empleando un Mini Secador por aspersión Buchi® B-290 (Flawil, Suiza). El contenido en sólidos totales (t.s.c.) se fijó en 3.7 wt% y las condiciones de atomización fueron de temperatura de entrada (T_{Inlet}): 102 °C y 160 °C, aspirador:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

70%, limpiador de boquilla: 5 (diámetro de 0.7 mm), velocidad de alimentación: 2 mL·min^{-1}, velocidad de flujo de aire: 400 Nl·h^{-1}, resultando en una temperatura de salida (T_{Outlet}) de 61 - 94 °C. Los polvos secos obtenidos, que consisten en MS de sacáridos, se recogieron y almacenaron a RT en un desecador hasta su uso.

Los rendimientos de los procesos (PY) de atomización se calcularon empleando la siguiente fórmula:

$$PY\ (\%) = \frac{Peso\ de\ MS}{Peso\ del\ t.s.c.} x\ 100 \qquad (3)$$

4.3.2. Microencapsulación de las NPs MIL-100 e INH@MIL-100: Obtención de Ma-MIL-100 MS y Ma-IHN@MIL-100 MS

Una vez seleccionado el Ma como el mejor excipiente de atomización, se dispersaron 136 mg de NPs MIL-100 y 189 mg de NPs INH@MIL-100 en 39.34 mL y 55.48 mL, respectivamente, de una solución de Ma (3.4 wt%) como se explicó previamente en el apartado 4.2.4.2. El tamaño y el potencial ζ de partícula se determinaron como se indicó anteriormente en el apartado 4.2.5. Posteriormente, las dispersiones se atomizaron utilizando un Mini Secador por aspersión Buchi® B-290 (Flawil, Suiza) para obtener Ma-MIL-100 MS y Ma-INH@MIL-100 MS. Las suspensiones destinadas a atomización se prepararon con una relación de 1:10 (*w/w*) NPs:Ma y un c.s.t. de 3.7 wt%. Los parámetros empleados para obtener las MS fueron T_{Inlet}: 160 ± 2 °C, aspirador: 70%, limpiador de boquilla: 5 (diámetro de 0.7 mm), velocidad de alimentación: 2 mL·min^{-1}, caudal de aire: 400 NI·h^{-1} [195,199], resultando en un T_{Outlet} de 92 - 94 °C. Los polvos se recogieron y almacenaron a RT en un desecador hasta su uso.

Los PY de atomización se calcularon empleando la fórmula del apartado anterior (apartado 4.3.1.).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3.3. Caracterización morfológica y aerodinámica de las MS

La morfología de las MS se caracterizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), utilizando un microscopio ULTRA PLUS (Zeiss, FESEM Ultra-Plus, Alemania) a 3 KV. Las muestras se colocaron sobre stubs usando un disco de grafito adhesivo de doble cara y se recubrieron con una capa de 10 nm de iridio usando un Emitechk 550 Sputter Coater (Londres, Inglaterra). Esta técnica también se empleó para obtener los diámetros de Feret (espacios entre dos tangentes en lados opuestos de una MS), midiendo para ello las imágenes SEM de MS utilizando el programa z-SmartTiff (n = 50). El D_g de cada muestra se calculó como el promedio de los diámetros de Feret obtenidos (µm). La densidad aparente se calculó tras someter un polvo a golpeteo mecánico con el dispositivo Tecnociencia (A Coruña, España). Para ello, se introdujo una muestra de polvo de peso conocido en un tubo de ensayo de 10 mL en este equipo, previamente calibrado a 30 tap·min^{-1}, y se sometió a un movimiento rotatorio y vertical simultáneo. El volumen del polvo se comprobó cada 5 min hasta que se volvió constante (n = 3). Como el proceso se realizó por triplicado, se utilizó el promedio de los tres valores para obtener la densidad aparente. El D_{aer} teórico se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$D_{aer} = D_g \sqrt{\frac{\rho_{real}}{\rho_0 \lambda}} \quad (1)$$

Donde ρ_0 es 1 g·cm^{-3}, D_g es el diámetro geométrico (resultante del promedio de los diámetros de Feret (µm)), ρ_{real} es la densidad real de la MS (g·cm^{-3}) y λ es el factor de forma dinámica de la MS, siendo su valor de 1 para MS esféricas y de 2 para MS irregulares [138-140].

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3.4. Estudio de composición e integridad estructural de las MS

Una vez que se incorporaron las NPs MIL-100 y las NPs INH@MIL-100 en las Ma MS, se analizaron las MS con respecto a su composición e integridad estructural. Los patrones de difracción de rayos X en las muestras de polvo (PXRD) se recogieron en un difractómetro Empyream Panalytical, equipado con un detector PIXcel3D y una fuente de radiación de cobre (Cu Kα, λ = 1.5406 Å), operando a 45 KV y 40 mA. Los perfiles se colectaron generalmente en el rango de 3° <2θ <35° con un tamaño de paso típico de 0.013 ° y 40 s de adquisición. Las isotermas de adsorción de N_2 se obtuvieron a 77 K usando un equipo AutosorbQ2 (Quantachrome Instruments, Boynton Beach, EE.UU.). Previa a la medida, las muestras se desgasificaron a 130 °C en vacío primario durante 3 h. Las áreas de superficie específicas se determinaron aplicando la ecuación de Brunauer, Emmett & Teller (BET) en el intervalo de presión relativa p/p0 = 0.01-0.3 (siendo p0 la presión de saturación). Los TGAs se realizaron en una termobalanza SDT Q-600 (TA Instruments, New Castle, EE.UU.), con un perfil de calentamiento general de 30 °C a 600 °C y una velocidad de calentamiento de 5 $°C \cdot min^{-1}$ en atmósfera de aire, usando un flujo de 100 $mL \cdot min^{-1}$. El análisis elemental (EA) se determinó utilizando FLASH 2000 (Thermoscientific, Waltham, EE.UU.). Los análisis de espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente se realizaron en un Perkin Elmer Optima 7300 DV (Madrid, España).

Adicionalmente, se realizaron dos estudios RAMAN para verificar la presencia y localización de NPs MIL-100 en Ma MS. Para ello, se examinaron las superficies de Ma MS control y Ma-MIL-100 MS para obtener sus espectros composicionales y obtener los picos característicos de los componentes (MIL-100 y Ma) por Microscopía Confocal Raman WITec (modelo Alpha 300R, Ulm, Alemania), utilizando una mesa piezoeléctrica y un láser DPSS (a 532 nm). Se utilizó un rango de exploración continuo de hasta 100 µm en las direcciones X e Y, y 20 µm en la dirección Z. La posición de precisión (resolución de exploración) fue de <1 nm en las direcciones X e Y, y <0.2 nm en la dirección Z. Además, se utilizó un Espectrómetro de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ultra alto rendimiento UHTS300 para VIS (con 2 rejillas: 600 y 1800 líneas·mm^{-1}), un detector de cámara CCD retroiluminada (con formato de 1024x127 píxeles), enfriamiento Peltier (cercano a -60 ºC) y VIS optimizado (QE> 90%). Para el tratamiento de los resultados, se empleó el software WITec Project Five 5.1.

Se examinó una Ma-MIL-100 MS (tamaño: 2.85 µm) en planos de cortes Z a diferentes longitudes de profundidad (15 capas, de 10x10 µm), con 190 nm entre cada capa, empleando 30 líneas/capa y 30 puntos/línea de resolución, 532 nm de láser (con 3 mW de potencia), un objetivo Zeiss EC Epiplan-Neofluar 100x/0.9 NA, un tiempo de integración de 0.2 s y un tiempo de registro aproximado de 1 h para comprobar la presencia de NPs MIL-100 en su estructura y su localización. Los planos examinados fueron: 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14, pertenecientes a: 0.38, 0.76, 1.14, 1.52, 1.90, 2.28 y 2.66 µm de profundidad, respectivamente. Al principio, los espectros de superficie de las Ma MS y las Ma-MIL-100 MS, así como los espectros de cada plano de la Ma-MIL-100 MS se corrigieron con el corrector de rayos cósmicos (CRR), para eliminar los rayos cósmicos infiltrados, y la línea base (Sub BG). De esta manera, cada espectro corregido de cada componente de cada plano se comparó con los espectros superficiales de las Ma MS y las Ma-MIL-100 MS para comprobar la presencia de los dos componentes (NPs MIL-100 y Ma) en cada plano. Además, este método fue útil para determinar la presencia de las NPs en la superficie de la Ma-MIL-100 MS mediante la comparación entre ambos espectros de superficie.

Las imágenes RAMAN de Ma-MIL-100 MS se obtuvieron mediante procesamiento matemático/computarizado de los espectros, empleando Project Five 5.0 (innovaciones de enfoque WITec). En la imagen RAMAN de cada plano, se asignó un color a cada componente (NPs MIL-100 en rojo y el Ma en azul) para ser identificado y ubicado en la Ma-MIL-100 MS.

Además, para verificar la presencia y localización de las NPs MIL-100 en las Ma-MIL-100 MS, se realizó un estudio de microsccopía confocal. Para eso, Ma se marcó con un fluoróforo para permitir su visualización en CLSM. En este caso, se agregó el fluoróforo Bodipy a las soluciones de Ma (430 µL de una solución de

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1 $mg \cdot mL^{-1}$ de Bodipy, 0.32 μg de Bodipy por mg de Ma), siendo la concentración de Ma de 3.42% (*w/w*) en 40 mL. Los estudios de CLSM se llevaron a cabo utilizando un microscopio confocal Leica TCS SP5 X (Wetzlar, Alemania) mediante una línea láser blanca. Se colocaron las Ma-MIL-100 MS en un portaobjetos de vidrio y se añadió una gota de aceite de inmersión para evitar el desplazamiento de las partículas durante la visualización (lente de inmersión en aceite HCX PL Fluotar). Se utilizaron longitudes de onda de excitación láser de 488 y 633 nm para escanear el polvo, y emisiones fluorescentes de autorreflexión del Fe (488/485-490 nm ($\lambda_{Ex/Em}$)) y Bodipy (633/650-660 nm ($\lambda_{Ex/Em}$)), recogiéndose mediante canales separados.

4.4. Estudio de liberación de las NPs MIL-100 e INH@MIL-100 a partir de las microsferas de manitol (Ma MS). Estabilidad coloidal y química, y liberación de isoniazida (INH)

Se incubó una cantidad de 4 mg de Ma-MIL-100 MS y de Ma-INH@MIL-100 MS (polvos secos) en 1 mL de diferentes medios (agua MilliQ, PBS (pH = 7.4) y SLF), bajo agitación bidimensional (incubadora Heidolph Titramax 1000, Schwabach, Alemania) a 37 °C para examinar las características fisicoquímicas de las NPs MIL-100 e INH@MIL-100 liberadas (tamaño de partícula, carga superficial, y estabilidad coloidal y química), así como los perfiles de liberación del fármaco. En diferentes momentos (0, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 120 y 168 h), se suspendió una alícuota de 50 μL de NPs liberadas en 950 μL de su respectivo medio y se caracterizaron sus propiedades fisicoquímicas como se indicó en el apartado 4.2.5., manteniendo la temperatura a 37 °C. La muestra restante se centrifugó con una centrífuga Beckman Coulter™ Microfuge® 22R (Hyland Scientific, Stanwood, EE.UU.) a 14500 rpm, 25 °C, durante 10 min. El sólido recuperado se midió por PXRD y, para cuantificar el H_3BTC e INH, el sobrenadante se analizó por HPLC, utilizando un sistema de HPLC de fase reversa Jasco LC-4000 series (Jasco, Madrid, España), equipado con un detector PDA MD-4015 y un muestreador múltiple AS-4150 controlado por el software ChromNav (Jasco Inc, Madrid, España). Se utilizó una columna de fase reversa Purple ODS (5 μm, 4.6 x 150 mm,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Análisis Vínicos, Tomelloso, España). Para el H_3BTC, la fase móvil utilizada consistió en una solución 50:50 (*v/v*) de PBS (0.02 M, pH = 2.5) y MeOH. Para la INH, la fase móvil consistió en una solución 98:2 (*v/v*) de PBS (0.02 M, pH = 6.8) y MeOH. El volumen de inyección se fijó en 30 µL (con un caudal de 1 $mL \cdot min^{-1}$) y la temperatura de la columna se mantuvo en 25 °C. La curva de calibración estándar mostró un buen coeficiente de correlación ≥ 0.99. El cromatograma de las soluciones estándar mostró un tiempo de retención de 3.51 min (identificado como H_3BTC, λ_{max} a 225 nm) y un tiempo de retención de 8.77 min (identificado como INH, λ_{max} a 266 nm). Los estudios se realizaron por triplicado (n = 3).

El examen morfológico de las NPs de MIL-100 e INH@MIL-100 liberadas se realizó mediante TEM como se especificó en la sección 4.2.5.

4.5. Estudios *in vitro* en la línea celular A549

4.5.1. Línea celular A549

Se utilizó una línea celular de adenocarcinoma alveolar (células epiteliales basales de adenocarcinoma alveolar humano, A549) [200] como modelo para evaluar la toxicidad de las NPs MIL-100, las NPs INH@MIL-100 y el excipiente Ma (estudio de viabilidad); la captación y la distribución intracelular de NPs (estudio de CLSM) y la cuantificación de células A549 internalizadas con NPs (estudio de Citometría). Las células A549 se cultivaron en DMEM suplementado con L-glutamina (antibiótico) 200 mM y FBS al 10% (*v/v*). Las células se incubaron a 37 °C con una atmósfera humidificada de 5% de CO_2 y 95% de aire. Se emplearon células A549 entre los pases 12 y 32.

4.5.2. Preparación y caracterización de formulaciones

Las NPs de MIL-100 e INH@MIL-100 se dispersaron en agua MilliQ (3.2 $mg \cdot mL^{-1}$) mediante vórtex y una punta de ultrasonidos (Procesador ultrasónico UP400 S - Hielscher 700 W Digital Sonifer, Alemania) con 10% de amplitud, 30 s de tiempo, seguido de dos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

pulsos de 1 s, utilizando un baño de agua-hielo. Las NPs MIL-100 se lavaron previamente dos veces con agua MilliQ para eliminar el etanol, empleando una centrífuga Beckman Coulter™ Microfuge® 22R (Hyland Scientific, Stanwood, EE.UU.).

Se caracterizaron las propiedades fisicoquímicas de las NPs MIL-100 e INH@MIL-100. El tamaño de las partículas y los potenciales ζ se determinaron mediante DLS y LDA utilizando un Zetasizer (como se explicó en el apartado 4.2.5.) fijado a 25 °C. Las propiedades fisicoquímicas se analizaron por triplicado (n = 3).

4.5.3. Preparación de las soluciones test de Ma

Se preparó una solución de Ma al 15% (*w/v*) disolviendo directamente el excipiente Ma en DMEM suplementado en condiciones estériles. Luego, se realizó una dilución en serie a la cuarta parte utilizando DMEM suplementado estéril para probar la viabilidad celular a diferentes concentraciones de solución de Ma.

4.5.4. Estudios de viabilidad celular

Los estudios de viabilidad de células A549 tratadas con dispersiones acuosas de NPs MIL-100 e INH@MIL-100, y solución de Ma se realizaron utilizando CellTiter-Blue® como reactivo de viabilidad. Se sembraron dos placas de 96 pocillos con 100 µL de células A549 y DMEM (9000 células/pocillo) y se incubaron a 37 °C durante 48 h, empleando una atmósfera humidificada de 5% CO_2 y 95% aire, para producir el crecimiento y desarrollo de las células hasta su confluencia. Los medios se reemplazaron con 100 µL de una mezcla de: i) 1:10 (*v/v*) agua MilliQ:DMEM (control positivo), ii) 1:10 (*v/v*) NPs MIL-100:DMEM, iii) 1:10 (*v/v*) NPs INH@MIL-100:DMEM, iv) 1:10 (*v/v*) Triton (1% (*v/v*)):DMEM (control negativo) y v) Ma:DMEM. Se ensayaron diferentes concentraciones de nanoMOFs (NPs MIL-100 e INH@MIL-100) y Ma en DMEM (ver Tabla 8).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 8. Concentraciones de nanoMOFs en DMEM y de Ma en DMEM evaluadas en células A549.

nanoMOFs ($mg \cdot mL^{-1}$)	Ma ($mg \cdot mL^{-1}$)
0.32	15.00
0.16	3.75
0.08	0.94
0.04	0.23
0.02	0.059
0.01	0.015
0.005	0.0037

Después de 4 h de incubación a 37 °C, se retiraron los controles y las muestras, y las células se lavaron con PBS (pH = 7.4). A continuación, se añadieron 100 µL de DMEM fresco a cada pocillo. Las células se incubaron durante 24 y 48 h. Se añadieron en oscuridad 20 µL de CellTiter-Blue® a cada pocillo para marcar los núcleos celulares y se midió la capacidad metabólica de las células vivas de acuerdo con las instrucciones del fabricante después de la lisis con SDS al 3% (*w/v*). Brevemente, los lisados se colocaron en una placa negra de 96 pocillos y se midió la fluorescencia en un lector de microplacas (SYNERGY H1M BioTek®, Friedrichshall, Alemania) a 539 nm de longitud de onda de excitación y a 620 nm de longitud de onda de emisión mediante el software Gen5 (Image Sofware BioTek®).

La viabilidad celular (%), en comparación con las células control, se calculó de la siguiente manera:

$$Viabilidad\ celular\ (\%) = \frac{Fluorescencia\ de\ la\ muestra}{Fluorescencia\ del\ control\ positivo}\ x\ 100 \quad (4)$$

El estudio se realizó por cuadriplicado (n = 4).

Además, se llevó a cabo un ensayo complementario para probar la viabilidad celular utilizando el instrumento Luna II (Contador Celular Automatizado Luna II™, Logos Biosystems, Annandale, EE.UU.).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Para ello, se sembraron placas de 24 pocillos con 400 µL de células A549 y DMEM (60000 células/pocillo) y se incubaron a 37 °C durante 48 h, empleando una atmósfera humidificada de 5% CO_2 y 95% aire para facilitar la crecimiento y desarrollo de las células hasta su confluencia. Los medios se reemplazaron con 400 µL de una mezcla de: i) 1:10 (*v/v*) agua MilliQ:DMEM (control positivo), ii) 1:23 (*v/v*) NPs MIL-100:DMEM, iii) 1:20 (*v/v*) NPs INH@MIL-100:DMEM y iv) 1:10 (*v/v*) Triton:DMEM (control negativo). Originalmente, ambas dispersiones de nanoMOFs en agua MilliQ presentaban una concentración de 3.2 $mg \cdot mL^{-1}$ y, posteriormente, diluidas con DMEM fueron de 0.14 y 0.16 $mg \cdot mL^{-1}$ por pocillo para NPs MIL-100 e INH@MIL-100, respectivamente. Las placas se incubaron a 37 °C durante 4 h y, luego, las células se lavaron 3 veces con PBS (pH = 7.4, 5 min, a RT, en agitación de balanceo con 15° de inclinación, usando un agitador de plataforma oscilante VWR 230V (Lutterworth, Reino Unido). Las células se desprendieron mediante 120 µL de tripsina (5 min, 37 ºC). Para desactivar la tripsina, se agregaron 280 µL de DMEM. Las células se centrifugaron a 1477 rpm (Eppendorf 5415R Refrigerated Centrifuge, North Hampton, EE.UU.) durante 5 min, obteniendo un pellet que se resuspendió en 500 µL de PBS (pH = 7.4) suplementado con FBS al 10% (*v/v*). Se mezclaron 10 µL de muestra con 10 µL de tinción Trypan Blue (al 0.4%, *w/v*) mediante vórtex y las células se observaron en una cámara de contaje para obtener los valores de viabilidad mediante recuento automático de imágenes. El estudio se realizó por triplicado (n = 3).

4.5.5. Captación intracelular y distribución

Se sembraron placas de 24 pocillos con 400 µL de células A549 en DMEM (60000 células/pocillo) empleando, previamente, cubreobjetos tratados con polilisina en el fondo de los pocillos. Como se indicó anteriormente, las células se incubaron a 37 °C durante 48 h, empleando una atmósfera humidificada de CO_2 al 5% y aire al 95% para facilitar el crecimiento y desarrollo de las células hasta su confluencia. Los medios se reemplazaron con 400 µL de: i) DMEM (control) y una mezcla de: ii) 1:23 (*v/v*) NPs MIL-100:DMEM y iii)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1:20 (*v/v*) NPs INH@MIL-100:DMEM. Originalmente, ambas dispersiones de nanoMOFs en agua MilliQ presentaban una concentración de 3.2 $mg \cdot mL^{-1}$ y, posteriormente, diluidas con DMEM fueron de 0.14 $mg \cdot mL^{-1}$/pocillo. En el caso de las NPs cargadas con fármaco, para verificar su mejor visualización mediante microscopía confocal, se ensayaron diferentes volúmenes (20, 30, 40 y 50 µL) de dispersión acuosa de NPs INH@MIL-100 de 3.2 $mg \cdot mL^{-1}$. Las células se incubaron a 37 ºC durante 4 h y, posteriormente, se lavaron 3 veces con PBS (pH = 7.4, 5 min, a RT, en agitación de balanceo con 15° de inclinación). Las células se fijaron mediante la adición de 350 µL de formalina neutra tamponada al 10% (*v/v*) (15 min, a RT, en agitación de balanceo con 15° de inclinación). Entonces, se realizaron otros 3 lavados y se marcaron los núcleos de las células con 200 µL de una dilución 1:1000 (*v/v*) de DAPI en PBS (1 $mg \cdot mL^{-1}$). El exceso de DAPI se eliminó lavando 3 veces como se mencionó anteriormente. Los cubreobjetos de vidrio se colocaron sobre portaobjetos de vidrio empleando medio de montaje acuoso Fluoromount® para su visualización por CLSM (Leica TCS SP5 X, Wetzlar, Alemania), empleando un objetivo HCX PL APO CS 63.0 x 1.30 GLYC 21 °C UV (a 63X) y un láser blanco. Para visualizar las muestras, se añadió una gota de aceite de inmersión (lente de inmersión en aceite HCX PL Fluotar).

La visualización de las NPs MIL-100 e INH@MIL-100 se obtuvo mediante autorreflexión del Fe ($\lambda_{Ex/Em}$: 488/485-490 nm). El color verde se configuró manualmente para las NPs MIL-100 e INH@MIL-100 empleando el software LAS AF (Leica Application Suite Advanced Fluorescence). Para visualizar los núcleos de las células marcadas con DAPI, se empleó otro canal ($\lambda_{Ex/Em}$: 405/414-440 nm) y se fijó el color azul. Por lo tanto, las dos señales se recopilaron utilizando canales separados. Las condiciones empleadas en CLSM se resumen en la Tabla 9.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 9. Condiciones empleadas en el estudio de captación y distribución intracelular de NPs de MIL-100 e INH@MIL-100 (3.2 $mg \cdot mL^{-1}$ en agua MilliQ) en células A549.

Muestra	Volumen de dispersiones de NPs (µL)	Número de acumulaciones por plano
Sin NPs	-	2
MIL-100	17.2	2
INH@MIL-100	17.2	2
INH@MIL-100	20.0	16
INH@MIL-100	30.0	16
INH@MIL-100	40.0	16
INH@MIL-100	50.0	16

4.5.6. Cuantificación de células A549 internalizadas con NPs: Citometría de flujo

Para cuantificar las células A549 internalizadas con nanoMOFs, se llevó a cabo un estudio basado en citometría de flujo (FCM). Se sembraron placas de 24 pocillos con 400 µL de células A549 y DMEM (60000 células/pocillo). Como se indicó anteriormente, las células se incubaron a 37 °C durante 48 h, empleando una atmósfera humidificada de CO_2 al 5% y aire al 95% para el crecimiento y desarrollo de las células hasta su confluencia. Los medios se reemplazaron con 400 µL de: i) DMEM (control) y una mezcla de: ii) 1:23 (*v/v*) NPs MIL-100:DMEM y iii) 1:20 (*v/v*) NPs INH@MIL-100:DMEM. Originalmente, ambas dispersiones de nanoMOFs en agua MilliQ presentaban una concentración de 3.2 $mg \cdot mL^{-1}$ y, posteriormente, diluidas con DMEM fueron de 0.14 y 0.16 $mg \cdot mL^{-1}$ por pocillo para NPs MIL-100 NPs e INH@MIL-100, respectivamente. Las células se incubaron a 37 °C durante 4 h y luego, se lavaron 3 veces con PBS (pH = 7.4, 5 min, a RT, en agitación de balanceo con 15° de inclinación). Entonces, a excepción del control, las células se trataron con 200 µL de LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit diluido en PBS (1 µL de Aqua en 2 mL de PBS (*v/v*)) (15 min, a RT, en agitación de balanceo con 15° de inclinación).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Las células A549 se lavaron con PBS como se mencionó anteriormente y, posteriormente, se desprendieron mediante 120 µL de tripsina (5 min, 37 °C). Para desactivar la tripsina, se agregaron 280 µL de DMEM. Las células se centrifugaron a 1477 rpm (Eppendorf 5415R Refrigerated Centrifuge, North Hampton, EE.UU.) durante 5 min obteniendo un pellet que se resuspendió en 500 µL de PBS (pH = 7.4) suplementado con FBS al 10% (*v/v*). Finalmente, se contaron automáticamente un total de 10000 eventos, aproximadamente, empleando un citómetro modelo Accuri Becton Dickinson (BD Accuri™, Ann Arbor, EE.UU.) y se analizaron con el software de muestra BD (BD Biosciences, San José, EE.UU.). La cuantificación de las células internalizadas con NPs MIL-100 e INH@MIL-100 se realizó por complejidad, empleando el detector de dispersión lateral (SSC-A). Además, para verificar la viabilidad de las células internalizadas se utilizó el filtro BP 515/20 (Waltham, EE.UU.) para el reactivo de viabilidad Aqua. El estudio se realizó por triplicado (n = 3).

4.6. Estudios *in vivo*

Los procedimientos experimentales fueron realizados en la Université Paris Sud 11 (Chatenay-Malabry, Francia), de acuerdo con la normativa Europea 2010/63/EU sobre principios de cuidado de los animales de laboratorio. Así, los procedimientos experimentales fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Facultad de Farmacia de la Université Paris-Sud 11 (Proyecto número 8314/201609191924867). Las ratas hembras Wistar Kyoto (7 meses, 225±14 g) fueron proporcionadas por el Centro de cría y cuidado animal Janvier Labs, Francia. Se escogió este modelo animal, debido a los excelenles resultados obtenidos previamente por nuestro grupo de investigación [192]. Además, se emplearon ratas Wistar Kyoto porque se previó que su tejido pulmonar facilitaría la visualización del sistema a nivel pulmonar. Se garantizó el uso del mínimo número de ratas para estos estudios.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.6.1. Distribución pulmonar de las NPs MIL-100 e INH@MIL-100 microencapsuladas

4.6.1.1. Estudio histológico

Como prueba de concepto para la evaluación de la administración pulmonar, el modelo de rata parece ser apropiado ya que presenta muchas ventajas: i) bajo coste, ii) gran disponibilidad y iii) pruebas de farmacocinética y biodistribución realizadas de manera óptima en este modelo. Las ratas se dividieron aleatoriamente en grupos de 6 animales (teniendo en cuenta los estudios de biodistribución de MOFs previos y la variabilidad interindividual bastante importante previamente evidenciada). Todos los animales se agruparon en jaulas de 2 animales por jaula y se mantuvieron en una habitación con aire acondicionado (20-24 °C) en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h con agua y comida disponible.

Se estudiaron cuatro grupos diferentes que recibieron Ma MS control y dosis distintas (bajas o altas) de Ma-MIL-100 MS, sacrificando a los animales en diferentes momentos (0.5 o 24 h). Los grupos se denominaron: "Control" (Ma MS administradas) y "Ma-MIL-100-XY" correspondiente a las Ma MS que contienen NPs MIL-100 (donde X = tiempo de sacrificio, 0.5 o 24 h, e Y = LD: dosis baja-8 mg, o HD: dosis alta-20 mg).

Previamente a la administración, se anestesió a los animales mediante inyección inguinal de un anestésico (ketamina y xilacina en solución salina). Se administraron 8 o 20 mg de cada muestra a través de una cánula traqueal (adaptador en Y, apertura de 1.3 mm) conectada a un ventilador Harvard® (Inspira ASV 55-7058, EE.UU., Aparato Harvard) en funcionamiento de 80 respiraciones·min^{-1}, volumen total = 1.53 cm^3, para simular la respiración normal de los animales. Después de 0.5 o 24 h de administración de polvo, se sacrificaron los animales, se extrajeron los pulmones y se enjuagaron con NaCl al 0.9%. Para realizar la observación histológica, los pulmones se fijaron con solución de formaldehído al 4% durante 48 h, se lavaron con PBS (pH = 7.4) y se almacenaron en solución de EtOH

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(70%) a 4 °C. Posteriormente, los pulmones se tiñeron con el colorante azul de Prusia (P/S), y con hematoxilina y eosina para la identificación de NPs MIL-100 y el examen histológico de rutina, respectivamente. Se realizaron cortes histológicos transversales de diferentes secciones de pulmón (apical, medio, basal) para considerar la penetración de las NPs MIL-100.

4.6.1.2. Biodistribución

La cuantificación del ligando H_3BTC se realizó mediante HPLC utilizando un sistema de HPLC de fase reversa (Jasco LC-4000 series, Madrid, España), equipado con un detector PDA MD-4015 y un muestreador múltiple AS-4150 controlado por el software ChromNav (Jasco Inc, Madrid, España). Se utilizó una columna de fase reversa Purple ODS (5 μm, 4.6 x 150 mm, Análisis Vínicos, Tomelloso, España). La fase móvil empleada consistió en una solución 50:50 (*v/v*) de PBS (0.02 M, pH = 2.5) y MeOH. El volumen de inyección se fijó en 30 μL con un caudal de 1 $mL \cdot min^{-1}$ y la temperatura de la columna se estableció en 25 °C. La curva de calibración estándar presentó un buen coeficiente de correlación ≥ 0.99. El cromatograma de soluciones estándar mostró un tiempo de retención de 3.51 min (identificado como H_3BTC, $\lambda_{máx}$ a 225 nm). Las muestras se prepararon como sigue: se añadieron 2 g de hígado, 0.1 g de bazo o riñón y 0.2 g de pulmón a 10 mL de solución de hidróxido de sodio 0.5 M. La homogeneización se realizó mediante molienda, con ayuda de un Potter. Luego, las muestras se agitaron durante 1 h en la oscuridad a temperatura ambiente. El sobrenadante se recogió por centrifugación (14500 rpm durante 10 min) y se filtró a través de un filtro de jeringa de 0.2 μm. Antes de la inyección en el sistema HPLC, las muestras se diluyeron en la fase móvil.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.6.2. Examen toxicológico

4.6.2.1. Determinación de interleucina-6 (IL-6)

Se realizó un estudio serológico preliminar de detección de la IL-6. De este modo, se extrajeron 700 µL de sangre de la cola de la rata 10 días antes del estudio para determinar los valores normales. Durante el estudio *in vivo*, se extrajeron otros 700 µL de sangre de rata mediante punción cardíaca. Ambos tipos de muestra de sangre se recogieron en tubos heparinizados y, a partir de ahí, se obtuvieron muestras de suero para realizar el análisis de IL-6. Los resultados obtenidos tras el estudio fueron comparados con los valores normales de IL-6. Las muestras fueron analizadas siguiendo las instrucciones especificadas en el Kit ELISA de IL-6 humana. Además, durante este estudio, la absorbancia fue medida a 450 nm en un lector de placas ELISA (Spectrostar Omega, BMG LABTECH, Offenburg, Alemania).

4.6.2.2. Estudio histopatológico de los pulmones

Este estudio se hizo conjuntamente con el de la distribución pulmonar de las NPs MIL-100 e INH@MIL-100 microencapsuladas. Como se explicó anteriormente, después de 0.5 h o 24 h tras la administración del polvo, se sacrificaron los animales, se extrajeron los pulmones y se enjuagaron con NaCl al 0.9%. Los pulmones se fijaron con solución de formaldehído al 4% (24 - 48 h), se lavaron con PBS (pH = 7.4) y se almacenaron en solución de EtOH (70%) a 4 °C. A continuación, para realizar el examen histológico de rutina, los pulmones se tiñeron con hematoxilina y eosina. Después, se realizaron cortes histológicos transversales de diferentes secciones de pulmón (apical, medio, basal) y se buscaron signos de daño o inflamación tisular.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5.1. Síntesis y caracterización de las MOFs

5.1.1. Encapsulación de isoniazida (INH)

La INH se encapsuló con éxito en los poros de las NPs MIL-100 con un método de impregnación (ver sección 4.2.2.) en una solución acuosa de INH, alcanzando una carga de fármaco de 29.5 ± 2.21 wt%.

Los patrones PXRD evidenciaron que el proceso de encapsulación del fármaco no altera la estructura cristalina del material poroso (Figura 8a). La ausencia de picos de Bragg correspondientes a INH libre descarta la presencia de fármaco libre recristalizado fuera de los poros de las NPs MIL-100. El contenido de fármaco se estimó combinando HPLC y TGA (Figura 8b). Esta carga de INH (sobre 29.5 wt%) es excelente en comparación con la obtenida para NPs MIL-101-NH_2(Fe) (12 wt%), de otro estudio anterior [120], y permanece en el rango de los fármacos incorporados previamente en la MOF MIL-100 (por ejemplo, 25 wt% de SA [201] y 31 wt% de IBU [85]).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

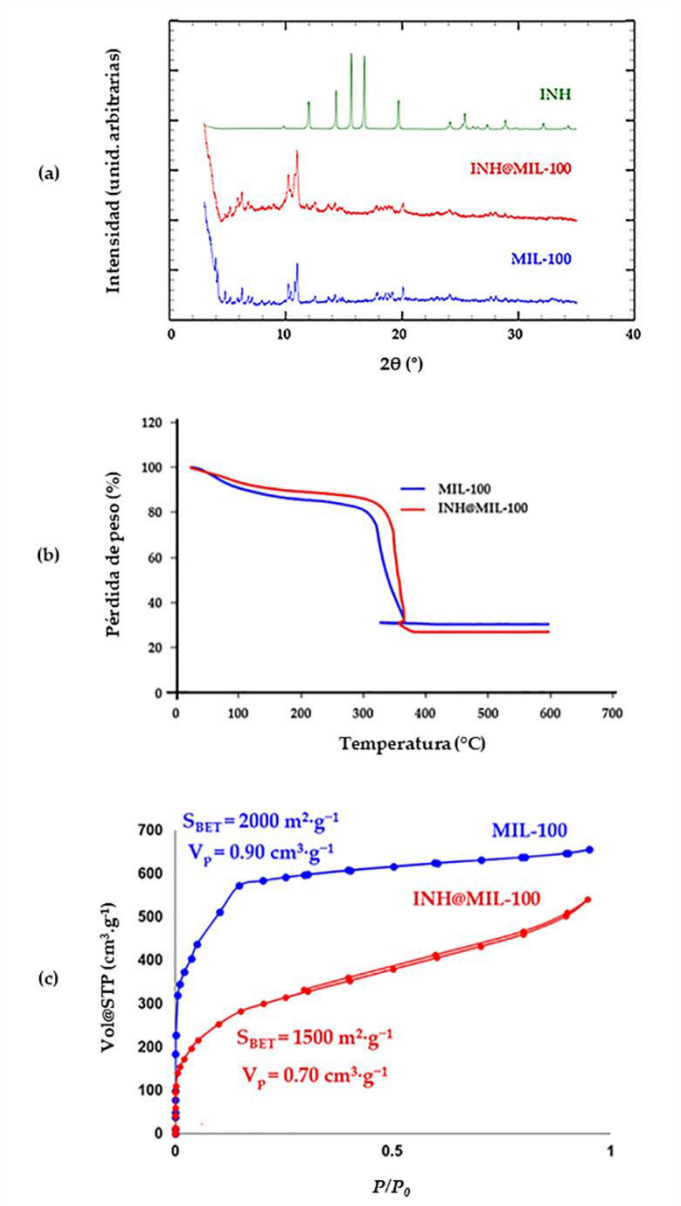


Figura 8. (a) Patrones PXRD, (b) TGA e (c) Isotermas de adsorción/desorción de N_2 a 77 K de las NPs MIL-100 e INH@MIL-100. El patrón PXRD de la INH libre se ha incluido para su comparación en la Figura 8a. Los símbolos coloreados y huecos en la Figura 8c indican la rama de adsorción y desorción, respectivamente. (Figura

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors)

Además, se demostró la incorporación del fármaco anti-TB en el interior de las cavidades de las NPs MIL-100 por la reducción drástica de la capacidad de adsorción de N_2 en las MOFs (Figura 8c). En las NPs INH@MIL-100, aún existe una porosidad residual después del proceso de encapsulación del fármaco (SBET = 1500 $m^2 \cdot g^{-1}$, Vp = 0.70 $cm^3 \cdot g^{-1}$) [85]. Esto sugiere que la carga máxima de fármaco no se alcanza en NPs MIL-100, seguramente debido a que algunas cavidades no son accesibles al fármaco, pero sí al N_2. De hecho, la adsorción de INH (dimensiones estimadas a vacío: 7.3 x 4.6 x 3.0 $Å^3$) podría ocurrir preferentemente en las cavidades más grandes de las NPs MIL-100 (de 29 Å, accesibles a través de ventanas hexagonales de ~8.6 Å). Por el contrario, la INH podría no se capaz de cruzar las ventanas de acceso pentagonales (aproximadamente, 4.8-5.8 Å), como ya se reportó para otros fármacos en NPs MIL-100 (por ejemplo, el IBU) [15]. Finalmente, si se excluye la localización del fármaco dentro de las cavidades más pequeñas, se estima que el volumen máximo disponible de MOF para la ocupación de INH sería del 44% (191.4 $Å^3$). Teniendo en cuenta que la carga de INH en las MOFs es del 29.5 ± 2.21 wt%, se confirma una elevada capacidad de carga.

Los espectros obtenidos por espectrofotometría de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) de NPs INH@MIL-100 confirmaron la presencia de INH en las NPs de MOFs a través de la presencia de algunas bandas correspondientes al fármaco (Figura 9). Se puede ver, por ejemplo, las bandas ν(anillo C-C-H) a 1217–1195 cm^{-1} y 843 cm^{-1}, y ν(C-C = O) a 689 cm^{-1} correspondientes al fármaco [202]. Además, el espectro FTIR de NPs INH@MIL-100 mostró un desplazamiento en comparación con las bandas características de las MIL-100 vacías: la banda de los grupos carboxilato ν(CO) (de 1630 cm^{-1} a 1624 cm^{-1}), y las bandas vibracionales asimétrica y simétrica características del grupo -O-C-O- (de 1449 a 1443 cm^{-1} y de 1378 a 1371 cm^{-1}) [203]. Estos resultados sugieren la formación de interacciones entre el fármaco y la red híbrida.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

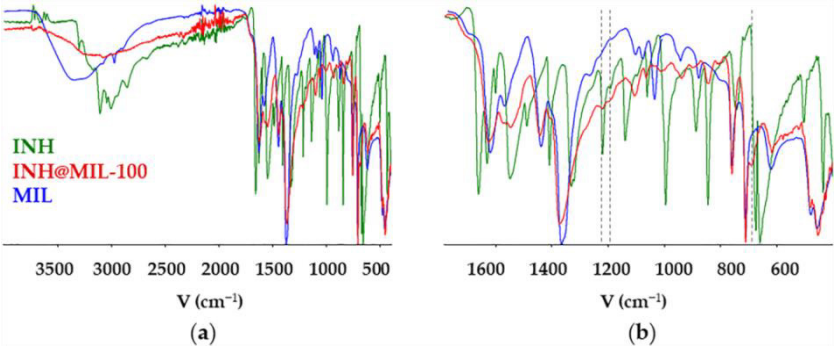


Figura 9. Espectros FTIR de los materiales INH, INH@MIL-100 y MIL-100: (a) en un rango de espectro amplio, aproximadamente de 4000 a 400 cm^{-1} y (b) una sección de ese espectro, alrededor de 1800 a 400 cm^{-1}. (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors)

5.1.2. Cálculo del porcentaje de humedad y porcentaje de materia seca de las MOFs

El cálculo del porcentaje de humedad y de materia seca de las MOFs es muy importante para poder realizar los cálculos posteriores de las masas de MIL-100 (en EtOH) y de INH@MIL-100 (en agua MilliQ) que hay que pesar para hacer las correspondientes dispersiones (ver sección 4.2.3.).

Como es de esperar, los valores de porcentaje de humedad/materia seca de las MOFs es variable de un lote de muestra a otro, como también es variable en un mismo lote a medida que transcurre el tiempo (debido a una cierta pérdida del solvente por evaporación). Por lo tanto, es imprescindible calcularlo antes de la utilización de un lote.

En la Tabla 10 se recogen algunos de los resultados obtenidos:

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 10. Ejemplos de porcentaje de humedad y su correspondiente porcentaje de materia seca de MOFs (sin/con INH).

NPs MIL-100		NPs INH@MIL-100	
% EtOH	% materia seca	% agua MilliQ	% materia seca
72.3	27.7	75.6	24.4
83.2	16.8	80.1	19.9
89.8	10.2	87.5	12.5
92.9	7.1	91.1	8.9
93.8	6.2	91.5	8.5

Como se puede comprobar, las MOFs (con/sin INH) presentan un alto contenido en humedad, que oscila entre el 70% y el 94%, correspondiéndose con un porcentaje de materia seca de entre el 6% y el 30%, aproximadamente.

Además, también es muy importante tener en cuenta el porcentaje de INH cargada en la muestra (29.5 ± 2.21 wt%) para recalcular la cantidad de NPs INH@MIL-100 que corresponde dispersar.

5.1.3. Caracterización fisicoquímica y morfológica de las MOFs dispersadas

Una vez dispersadas las NPs MOFs (sección 4.2.4.), es necesario caracterizar sus propiedades fisicoquímicas (sección 4.2.5.) para asegurar su calidad antes de su posterior uso. Las características de las NPs MIL-100 e INH@MIL-100 se resumen en la Tabla 11:

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 11. Características fisicoquímicas de las MOFs dispersadas en agua MilliQ (para estudios celulares) y en solución de Ma (para atomización) sin o con INH (media ± S.D.; n = 3).

Formulación destinada a	Sistema (sin/con INH)	Tamaños (nm)	Potencial ζ (mV)
estudios celulares	NPs MIL-100 (en agua MilliQ)	101 ± 19	-10 ± 1
	NPs INH@MIL-100 (en agua MilliQ)	137 ± 25	-17 ± 2
atomización	NPs MIL-100 (en solución de Ma)	289 ± 38	-20 ± 1
	NPs INH@MIL-100 (en solución de Ma)	355 ± 44	-23 ± 1

Como se puede observar en la Tabla 11, las MOFs sin o con INH dispersadas en agua MilliQ (destinadas a estudios celulares) presentan unos tamaños inferiores a 162 nm, así como unos potenciales ζ negativos entre -9 y -19 mV; siendo más grandes y negativas las MOFs cargadas con INH (ver Figura 10). Incluso, las MOFs dispersadas en solución de Ma (destinadas a atomización), permanecen con un tamaño submicrométrico (entre 251 y 399 nm) y con un potencial ζ algo más negativo (-19 a -24 mV). En estos casos, el aumento de tamaño es debido a la presencia de Ma, que establece ciertas interacciones con las MOFs, motivo por el cual también descienden sus respectivas cargas negativas, ya que el Ma tiene por propia naturaleza una carga ligeramente negativa (−8 ± 6 mV). Se cree que las NPs de carga negativa son menos tóxicas e inducen menos reacciones infamatorias que las cargadas positivamente [204], por lo que su uso es interesante. Por tanto, se puede confirmar la correcta dispersión de las formulaciones, presentando características físico-químicas adecuadas para su utilización en posteriores estudios.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

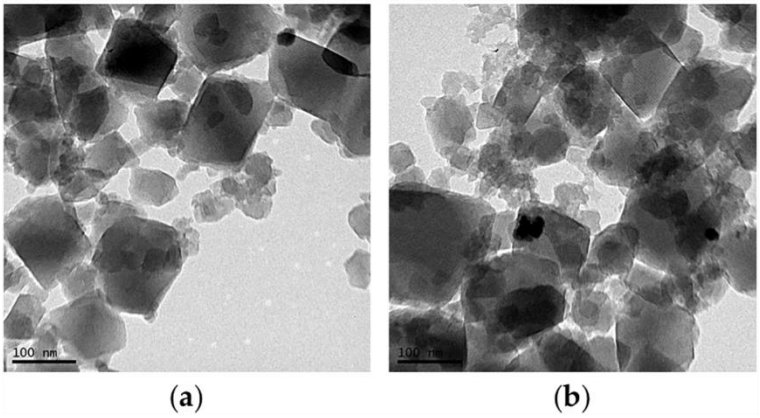


Figura 10. Microfotografías TEM de: (a) NPs MIL-100 y (b) NPs INH@MIL-100 dispersadas en agua MilliQ. Escala: 100 nm. (Figura de nueva creación)

En las microfotografías TEM recogidas en la Figura 10, se puede comprobar cómo las NPs INH@MIL-100 presentan mayor tamaño y desviación que las NPs MIL-100, corroborando los resultados mostrados en la Tabla 11.

5.2. Microencapsulación de las MOFs y caracterización de las microsferas (MS) obtenidas

Previo a la dispersión de las MOFs en la solución del excipiente de atomización, se llevó a cabo un estudio para la selección del mejor excipiente de atomización; para lo cual, se prepararon MS control (sin NPs MOFs) a partir de diferentes excipientes: Ma, α-CD, Dex, Man, Tre, Sor y Fru.

5.2.1. Caracterización de MS control y selección del mejor excipiente de atomización

Se caracterizaron los polvos obtenidos tras atomización de los diferentes excipientes testados (sección 4.3.3.), prestando especial atención al PY, morfología y densidad aparente (Tabla 12). Se obtuvieron PY elevados para α-CD y Ma (74.0 ± 3.0 wt% y 58.5 ± 3.5wt %, respectivamente), en contraposición con los PY bajos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

calculados para Tre y Dex (27.0 ± 1.0 wt% y 10.5 ± 1.5 wt%, respectivamente). Sor, Man y Fru no permitieron la recuperación de cantidades medibles de polvo; por lo tanto, fueron descartados. Las muestras restantes se analizaron mediante SEM (Figura 11), demostrando que la morfología de las MS depende en gran medida del excipiente utilizado. Ma MS son partículas esféricas, no agregadas, bien definidas, con una superficie lisa y homogénea (Figura 11a); mientras que α-CD MS y Dex MS son más irregulares y con una superficie más heterogénea (Figura 11b y Figura 11c, respectivamente). Por el contrario, las estructuras de Tre no resultan aptas para la administración pulmonar porque están aglomeradas. Se podría esperar que las Ma MS esféricas regulares, con menos puntos de contacto entre las partículas y menos fricción entre ellas [205], presenten mejores propiedades de flujo, facilitando su administración pulmonar.

Tabla 12. Rendimiento del proceso de atomización (wt%), morfología y densidad aparente ($g \cdot cm^{-3}$) de MS control (polvos secos) preparadas con diferentes excipientes (media ± S.D.; n = 3).

Formulación	Excipiente atomizado	PY (% en peso)	Morfología	Densidad aparente ($g \cdot cm^{-3}$)
Ma MS	manitol	58.5 ± 3.5	Esférica	0.43 ± 0.01
a-CD MS	ciclodextrina *a*	74.0 ± 3.0	Menos esférica	0.36 ± 0.01
Dex MS	dextrano	10.5 ± 1.5	Menos esférica	- [1]
Tre MS	trehalosa	27.0 ± 1.0	Aglomerado	- [1]

[1]Muestra insuficiente para realizar este cálculo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

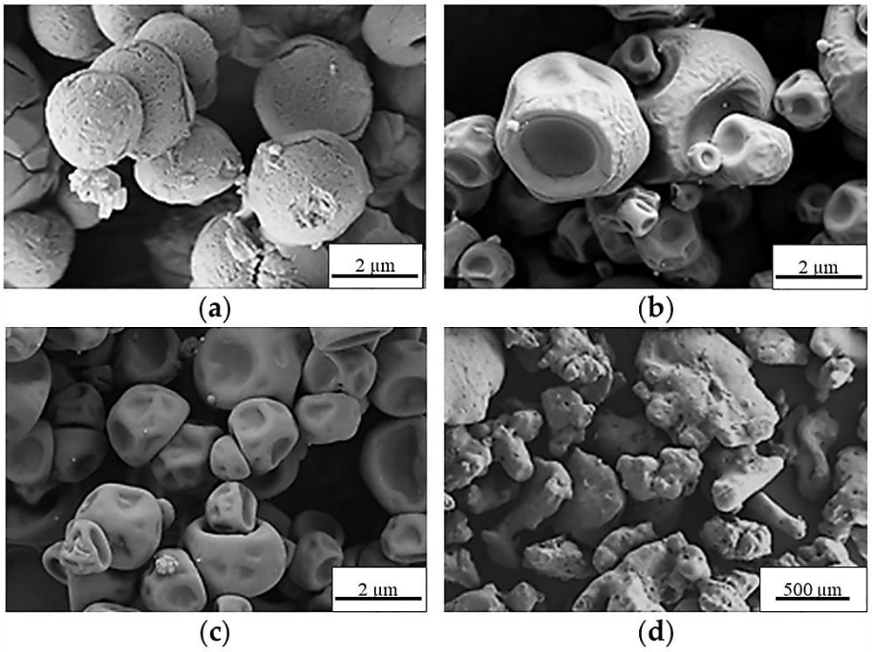


Figura 11. Microfotografías SEM de MS control de: (a) Ma, (b) α-CD, (c) Dex y (d) Tre. (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors)

La mayor densidad aparente obtenida para Ma MS (0.43 ± 0.01 $g \cdot cm^{-3}$), en comparación con α-CD MS (0.36 ± 0.01 $g \cdot cm^{-3}$; Tabla 12), puede explicarse por la diferente morfología de superficie. De hecho, la densidad aparente de α-CD MS fue muy similar a la de las MS de goma de algarrobo (alrededor de 0.37 $g \cdot cm^{-3}$), que presentan una morfología superficial análoga [137]. Las densidades aparentes de MS de Dex y de Tre no pudieron determinarse debido a su bajo PY (9-28%). El Ma fue el único excipiente que resultó en MS control con buenas propiedades de manipulación, probablemente porque el Ma permite obtener polvos con bajo contenido de humedad [206], lo que también debería facilitar la aerosolización *in vivo*. Teniendo en cuenta el elevado PY de secado por aspersión, así como las ventajas del polvo seco de las Ma MS (como, por ejemplo, la esfericidad regular de sus partículas y su menor contenido en humedad, que confieren

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

propiedades de flujo mejoradas), se seleccionó el Ma como el excipiente para la microencapsulación de las nanoMOFs. El Ma se ha utilizado ampliamente en aerosolización [207], está aceptado por las autoridades reguladoras para su uso en productos farmacéuticos de inhalación, tiene características adecuadas para el secado por aspersión (lo que permite una fácil adaptación de la morfología y tamaño de las partículas [208]), mejora la manipulación de la formulación en polvo en comparación con otros excipientes (como la lactosa [151]) y, además, ayuda a la penetración de las NPs en el tracto respiratorio, debido a su efecto mucolítico y osmótico [209], resultando un excipiente prometedor para realizar la formulación con las NPs MIL-100.

5.2.2. Caracterización de las Ma-MIL-100 MS y Ma-INH@MIL-100 MS: Morfología y propiedades aerodinámicas

Una vez seleccionado el Ma como el excipiente de atomización, se procedió a la preparación de las MS teniendo en cuenta varios parámetros; como por ejemplo, la temperatura de la boquilla, que puede afectar a la estabilidad del fármaco y al efecto de adsorción en la interfaz aire/líquido tras el secado de las gotitas [210].

La relación de NPs INH@MIL-100:Ma se eligió después de algunas pruebas preliminares de secado por aspersión de NPs MIL-100 en solución de Ma. Para ello, se ensayaron tres proporciones distintas de NPs MIL-100:Ma (1:5, 1:10, 1:100), y el proceso de secado por aspersión se llevó a cabo con un limpiador de boquilla fijado a 5 (diámetro de 0.7 mm), una velocidad de alimentación de 2 $mL \cdot min^{-1}$, manteniendo una T_{Inlet}: 170 ± 2 °C, que fue superior a la posteriormente utilizada en la microencapsulación de NPs INH@MIL-100, que fue una T_{Inlet}: 160 ± 2 °C, para asegurar la estabilidad de la INH (temperatura de fusión: 173 °C). Los resultados mostraron que las MS tenían una forma redondeada, presentando una porosidad característica (ver Figura 12).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

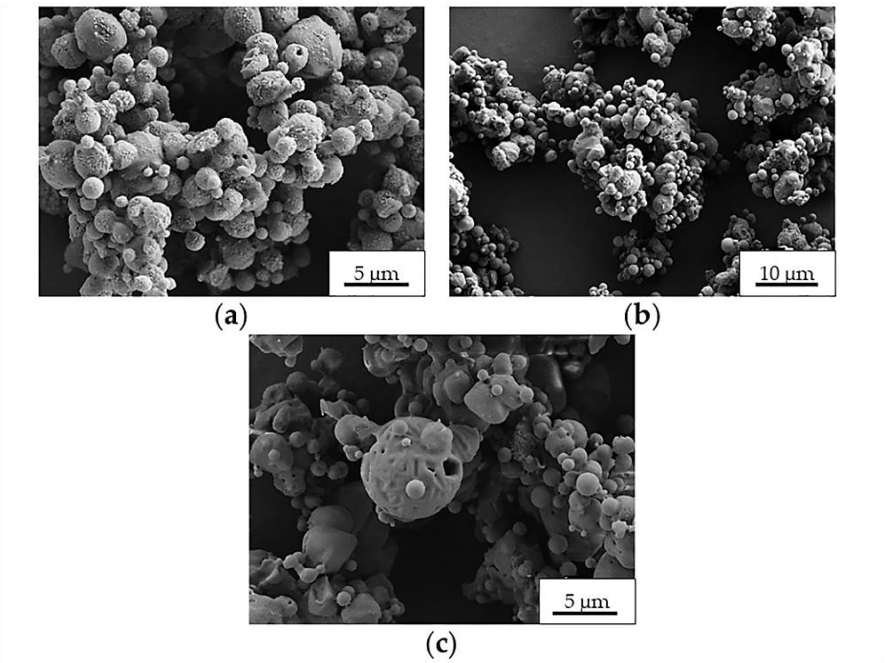


Figura 12. Microfotografías SEM de Ma-MIL-100 MS preparadas con una relación MIL-100:Ma de: (a) 1:5, (b) 1:10 y (c) 1:100. (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors)

Como se puede ver en la Figura 12, la porosidad de la superficie de las MS disminuye a medida que aumenta el contenido de Ma. Todas las muestras de polvo obtenidas presentaron un tamaño similar, estando en el rango de 1.8 - 2.2 µm. Inicialmente, se descartaron las MS con una proporción de 1:5 ya que las MS estaban menos definidas en comparación a los otros polvos (Figura 12). Finalmente, elegimos la formulación con relación 1:10 porque permitió una mayor carga de NPs que las MS de proporción 1:100.

Por precaución, la T_{Inlet} del proceso de microencapsulación de INH@MIL-100 se ajustó a 160 °C debido a la presencia de INH, cuya temperatura de fusión es 173 °C. De este modo, también se prepararon Ma MS control a 160 °C. Las apariencias de superficie de las Ma MS preparadas a ambos T_{Inlets} (170 y 160 °C) son diferentes (comparar

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

imágenes de la Figura 13). Las Ma MS preparadas a 170 °C tienen una superficie más porosa (Figura 13a) que las obtenidas a 160 °C (Figura 13b). Esto podría explicarse por la temperatura de fusión del manitol (166ºC), apareciendo con un aspecto fundido a 170 °C, en contraste con una morfología intacta a 160ºC.

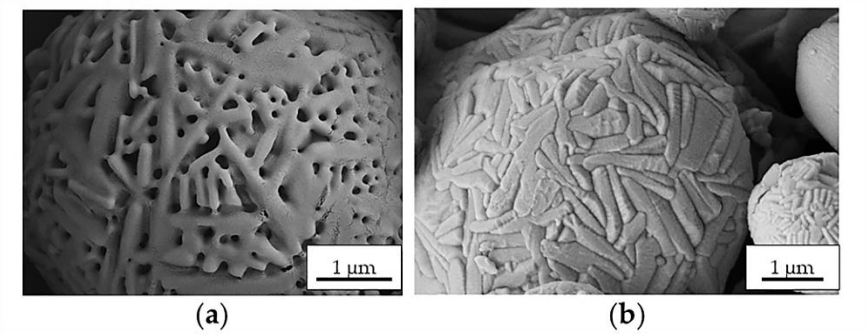


Figura 13. Microfotografías SEM de Ma MS preparadas a: (a) 170 °C y (b) 160 °C. (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors)

Los rendimientos de los polvos obtenidos tras la atomización de las NPs MIL-100 e INH@MIL-100 fueron elevados (ver Tabla 13). Además, las MS no están aglomeradas, presentan forma esférica y bien definida, y una superficie lisa (ver Figura 14).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 13. Rendimientos de los procesos de atomización utilizando Ma (media ± S.D.; n = 3).

Formulación	Relación MOF:Ma	T_{Inlet} (°C)	Rendimiento de atomización (%)
Ma (control)	-	170	55.8 ± 4.0
Ma (control)	-	160	58.5 ± 3.5
MIL-100:Ma	1:5	170	53.3 ± 2.1
MIL-100:Ma	1:10	170	65.7 ± 5.8
MIL-100:Ma	1:100	170	72.2 ± 4.3
MIL-100:Ma	1:10	160	68.0 ± 8.0
INH@MIL-100:Ma	1:10	160	74.5 ± 3.5

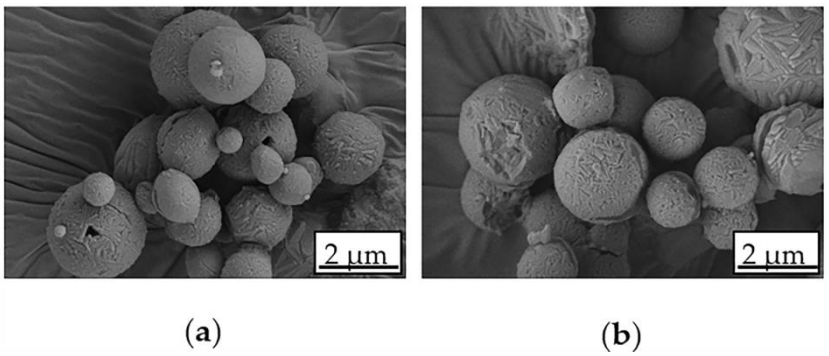


Figura 14. Microfotografía SEM de: (a) Ma-MIL-100 MS y (b) Ma-INH@MIL-100 MS. (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors)

Para evaluar el potencial interés de las Ma-MIL-100 MS y las Ma-INH@MIL-100 MS para administración pulmonar, se caracterizaron (sección 4.3.3.) sus propiedades aerodinámicas y físicas (ver Tabla 14). Tradicionalmente, los diámetros entre 1 y 5 µm están asociados a un depósito pulmonar profundo; mientras que, los obtenidos en el presente estudio, alcanzan valores por debajo de 1 µm (Tabla 14). De todos modos, teniendo en cuenta que sus propiedades aerodinámicas son similares a las de otras formulaciones previas que alcanzaron el pulmón profundo con excelentes resultados *in vivo* [151,193], se puede considerar que las formulaciones preparadas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

podrían ser aptas para la administración pulmonar. Cabe señalar que los bajos diámetros aerodinámicos obtenidos están relacionados con una naturaleza hueca de las MS. Como se esperaba, la densidad aparente de Ma-INH@MIL-100 MS (0.52 ± 0.01 $g \cdot cm^{-3}$) fue mayor que la de Ma-MIL-100 MS (0.44 ± 0.02 $g \cdot cm^{-3}$), teniendo en cuenta la carga adicional de INH (Tabla 14). La baja densidad aparente de cada formulación junto a su diámetro pequeño se relaciona con un buen comportamiento del flujo aerodinámico, tal como se demostró anteriormente para otras formulaciones [114,115]. De hecho, los valores de densidades reales y diámetros aerodinámicos están en el mismo rango que los obtenidos para otro tipo de partículas huecas que resultaron aptas para administración pulmonar [117,118]. Por lo tanto, las Ma-MIL-100 MS y las Ma-INH@MIL-100 MS presentan características teóricamente adecuadas para su llegada al pulmón profundo.

Tabla 14. Propiedades aerodinámicas y físicas de Ma MS, Ma-MIL-100 MS y Ma-INH@MIL-100 MS (media ± S.D.; n = 3).

Muestra	Diámetro geométrico (μm)	Densidad real ($g.cm^{-3}$)	Densidad aparente ($g.cm^{-3}$)	Diámetro aerodinámico (μm)
Ma MS	2.3 ± 1.0	0.0666 ± 0.0001	0.43 ± 0.01	0.594 ± 0.010
Ma-MIL-100 MS	1.8 ± 0.7	0.0550 ± 0.0001	0.44 ± 0.02	0.422 ± 0.007
Ma-INH@MIL-100 MS	1.4 ± 0.4	0.0907 ± 0.0003	0.52 ± 0.01	0.422 ± 0.007

A la vista de los resultados presentados en la Tabla 14, las formulaciones preparadas con Ma dieron buenos resultados, así como ocurrió anteriormente para otras formulaciones microencapsuladas en Ma MS, como es en el caso de nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), CS NPs o las nanocápsulas de quitosano (CS NCs) [116,192,193].

5.2.3. Estudio de composición e integridad estructural de las MS

Los estudios de PXRD (sección 4.3.4.) muestran que la estructura cristalina de las NPs MIL-100 se mantiene no sólo tras la encapsulación de INH (Figura 15a) sino también tras su formulación

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

en forma de MS, como lo demuestra la presencia de los picos característicos de Bragg de las NPs MIL-100 (Figura 15b). Por otro lado, no se observan reflexiones debidas a INH recristalizada, apoyando su encapsulación dentro de los poros. Además, los picos de difracción típicos de Ma están presentes en las MS (sobre 20 2 θ (°)).

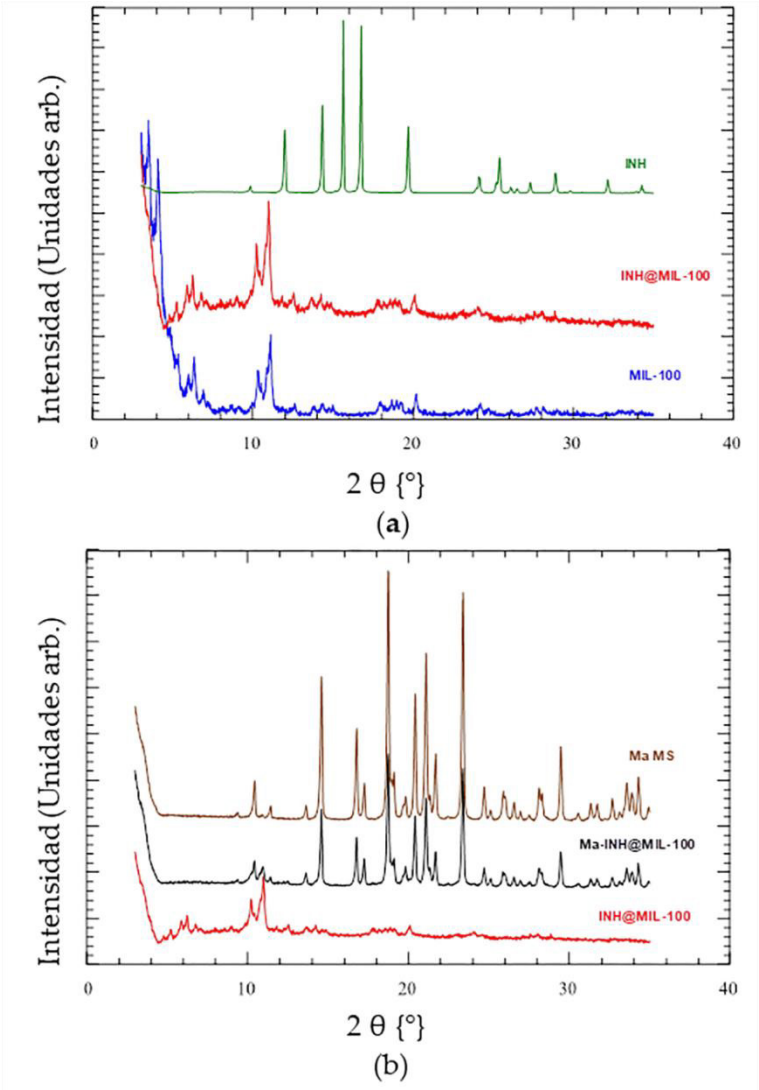


Figura 15. Patrones PXRD de: (a) MIL-100, INH@MIL-100 e INH, y (b) INH@MIL-100, Ma-INH@MIL-100 MS y Ma MS. (Figura adaptada del trabajo de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors)

Los análisis composicionales de las diferentes MS se realizaron mediante análisis elemental (sección 4.3.4.) (Tabla 15), determinando el contenido de INH, MIL-100 y Ma mediante la determinación de nitrógeno, hierro y carbono, respectivamente. Asimismo, es importante su comparación con los valores teóricos de estos elementos característicos empleados para preparar las muestras de polvo. Como se aprecia en la Tabla 15, los valores experimentales coinciden con los valores teóricos, confirmando que la composición final de las formulaciones preparadas mantiene las cantidades de los elementos estimados.

Tabla 15. Composición elemental (wt%) de Ma MS, Ma-MIL-100 MS y Ma-INH@MIL-100 MS.

M*	Valores teóricos				Valores experimentales			
	%C	%H	%N	%Fe	%C	%H	%N	%Fe
1	39.50	7.68	-	-	39.72 ± 0.24	7.50 ± 0.01	-	-
2	38.89	7.08	-	2.50	39.79 ± 0.06	6.75 ± 0.07	-	2.68 ± 0.13
3	39.40	7.32	0.55	1.60	39.98 ± 0.09	7.24 ± 0.06	0.56 ± 0.07	1.25 ± 0.06

*Muestras: (1) Ma MS, (2) Ma-MIL-100 MS y (3) Ma-INH@MIL-100 MS.

Como se mencionó anteriormente, se aplicó la técnica de RAMAN (sección 4.3.4.) para determinar la presencia y localización de NPs MIL-100 en Ma MS desde dos puntos de vista:

En el primer estudio, se prepararon los espectros de superficie de Ma MS (Figura 16a) y Ma-MIL-100 MS (Figura 16b) y se identificaron los picos representativos de los componentes. En el espectro Ma MS, el pico característico del Ma se detectó a 879 número de onda cm^{-1}, y en el espectro de Ma-MIL-100 MS, los picos representativos de MIL-100 y Ma se localizaron a 1601 y 877 número de onda cm^{-1}, respectivamente.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

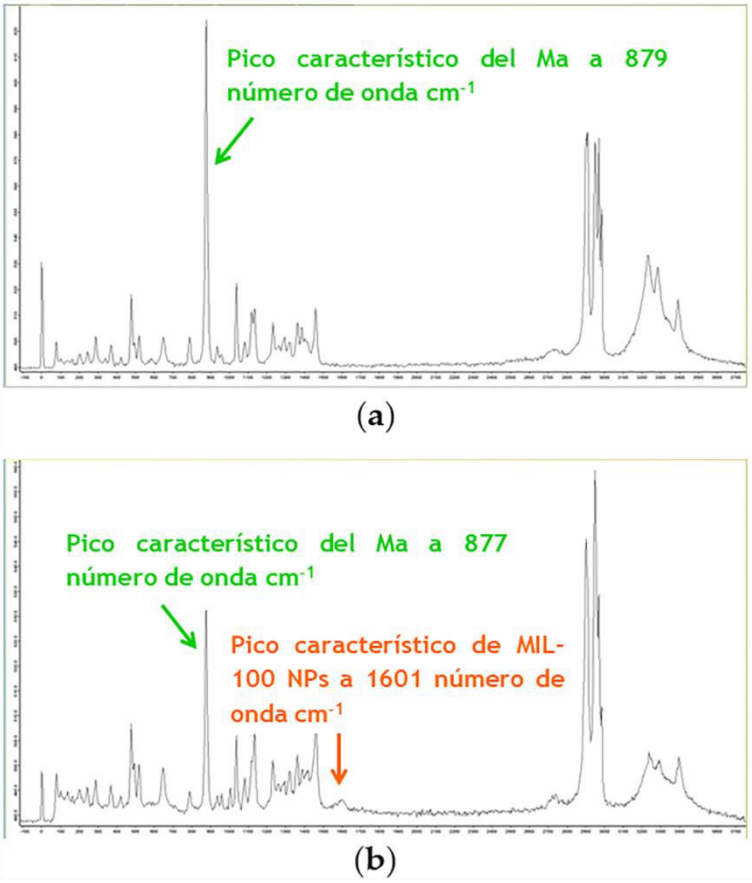


Figura 16. Espectros de superficie RAMAN de: (a) Ma MS y (b) Ma-MIL-100 MS. (Figura de nueva creación)

Además, los picos de NPs MIL-100 (Figura 17a-g) y de Ma (Figura 17h-n) se examinaron en los espectros obtenidos de diferentes planos de una Ma-MIL-100 MS (2.85 μm) (Figura 17). El pico representativo de Ma está presente en todos los espectros de los diferentes planos estudiados, con menor intensidad a medida que se profundiza en la misma. Por el contrario, el pico de NPs MIL-100 fue difícil de localizar en los planos más cercanos al exterior de la microsfera, que hacia el interior de la misma. De este modo, se

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

detectan ambos componentes en toda la MS, presentando tendencia a la oquedad debido a la menor presencia del Ma en su interior.

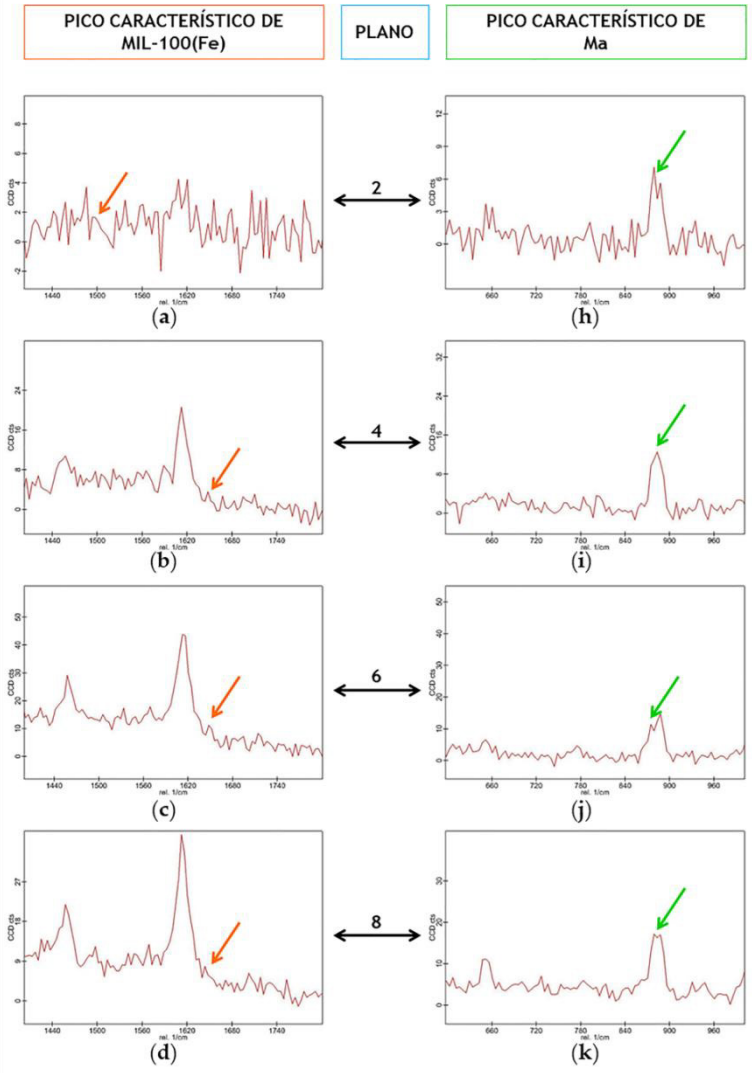


Figura 17. Espectros RAMAN en diferentes planos de una Ma-MIL-100 MS: pico específico de MIL-100 (flecha de color naranja, columna de la izquierda) y pico característico de Ma (flecha de color verde, columna de la derecha). Los planos son:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(a y h) Plano 2: 0.38 µm, (b y i) Plano 4: 0.76 µm, (c y j) Plano 6: 1.14 µm y (d y k) Plano 8: 1.52 µm. (Figura de nueva creación)

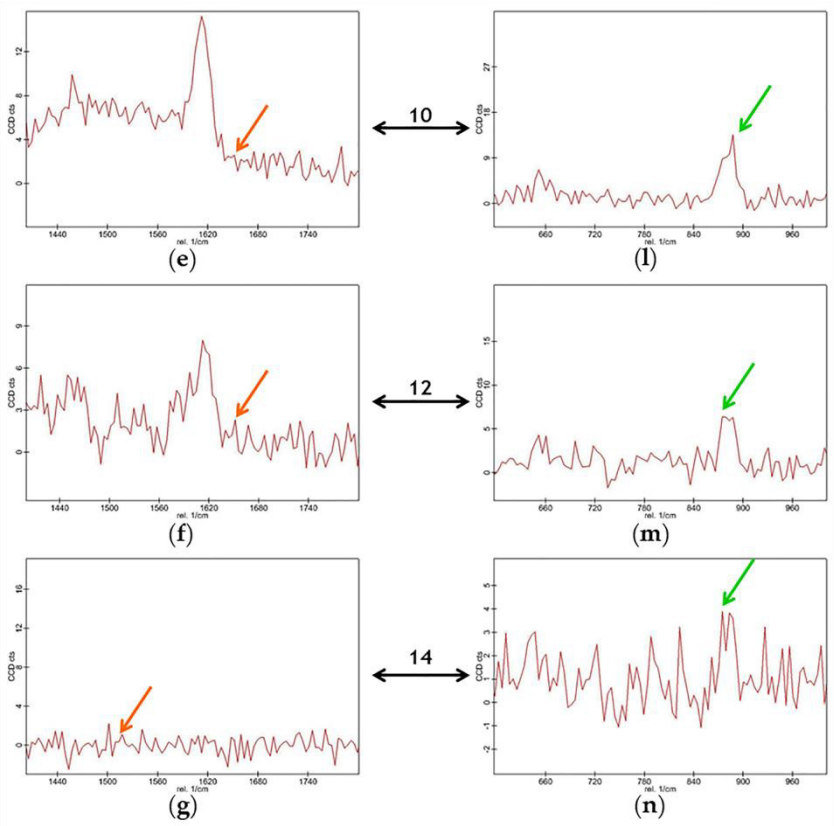


Figura 17 (continuación). Espectros RAMAN en diferentes planos de una Ma-MIL-100 MS: pico específico de MIL-100 (flecha de color naranja, columna de la izquierda) y pico característico de Ma (flecha de color verde, columna de la derecha). Los planos son: (e y l) Plano 10: 1.90 µm, (f y m) Plano 12: 2.28 µm y (g y n) Plano 14: 2.66 µm. (Figura de nueva creación)

Adicionalmente, se obtuvieron imágenes RAMAN de la misma Ma-MIL-100 MS (Figura 18). En todas las capas examinadas de la MS se detectaron NPs MIL-100 (en color rojo), así como el excipiente Ma (en color azul), evidenciando una distribución de Ma en forma de matriz continua, conteniendo las NPs MIL-100. Estas imágenes nos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

llevan a concluir que las NPs MIL-100 están microencapsuladas en la Ma MS, localizándose fundamentalmente en el interior de la MS. El Ma está presente en toda la MS, siendo más marcado en los planos extremos, acentuando la estructura de la MS y mostrando tendencia a la oquedad.

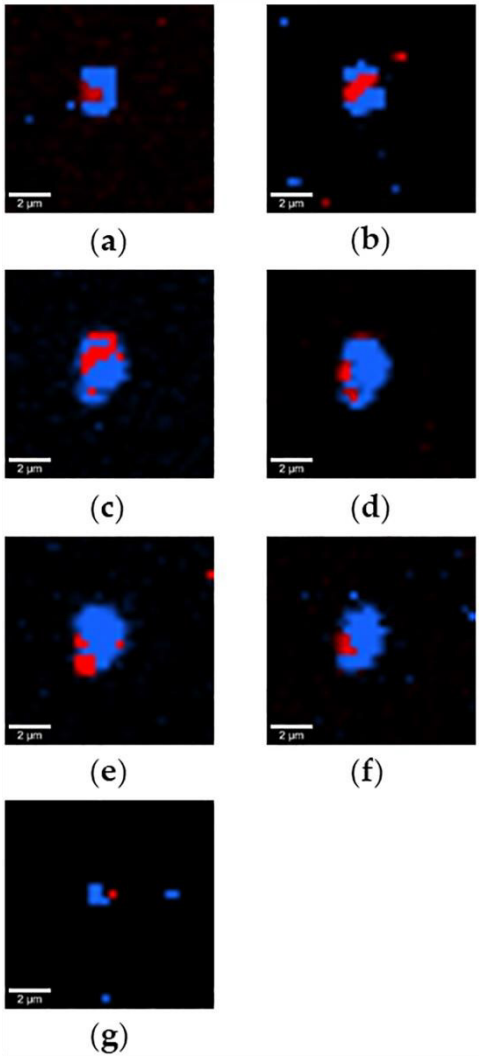


Figura 18. Imágenes RAMAN en diferentes planos de una Ma-MIL-100 MS, donde las NPs MIL-100 están representadas en color rojo y el excipiente Ma, en azul: (a)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Plano 2: 0.38 µm, (b) Plano 4: 0.76 µm, (c) Plano 6: 1.14 µm, (d) Plano 8: 1.52 µm, (e) Plano 10: 1.90 µm, (f) Plano 12: 2.28 µm y (g) Plano 14: 2.66 µm. (Figura de nueva creación)

En las imágenes CLSM (Figura 19), se demuestra la presencia de Ma distribuido por toda la MS formando una especie de matriz continua (canal rojo), en la que las NPs se dispersaron homogéneamente (canal verde). En la tercera columna de la Figura 19, se produce la superposición de canales, en donde se pueden observar ambos componentes, apreciándose de color amarillo por la confluencia de ambos. Adicionalmente, hay una capa externa de color rojo en la MS, correspondiéndose con la cubierta de Ma. Este tipo de estructura es diferente a las de los nanosistemas lipídicos microencapsulados (como las SLN de dibehenato de glicerilo y triestearato de glicerilo microencapsuladas en Ma MS) [193], en los que los nanosistemas se distribuyen dentro de la MS llegando al borde de la microestructura. De todos modos, el sistema presentado en este trabajo es coherente con otras micro-nanoestructuras a base de NPs, en las que se observó también la cubierta de Ma [205,211,212]. Existen dos hipótesis que explican esta diferencia en la presencia o no de una capa externa de Ma. La primera hipótesis se centra en la T_{Inlet} utilizada en la atomización de los nanosistemas. Teniendo en cuenta que la temperatura de atomización de las MOFs y de otras NPs es alta (160 °C o superior) a diferencia de la temperatura de atomización empleada para sistemas lipídicos (103 °C), el proceso de secado es mayor en el primer caso, produciendo esa capa exterior de Ma en la MS. Además, la segunda hipótesis contempla la concentración empleada del excipiente de atomización. Si la concentración es alta, se asocia a una mayor viscosidad que, en el momento del secado, dificulta la salida de moléculas de agua hacia el exterior, impidiendo la salida concomitante de Ma. Esto es lo que se produce en el caso de los nanosistemas lipídicos, en los que se usan concentraciones más altas de Ma que las empleadas para las MOFs y otras NPs no lipídicas. Teniendo en cuenta que la concentración de Ma utilizada en este trabajo es baja (3.4%), es totalmente coherente que se forme la capa externa de Ma recubriendo las MOFs. Los resultados de CLSM

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

mostrados en la Figura 19 revelan la correcta microencapsulación de las MOFs dentro de las Ma MS.

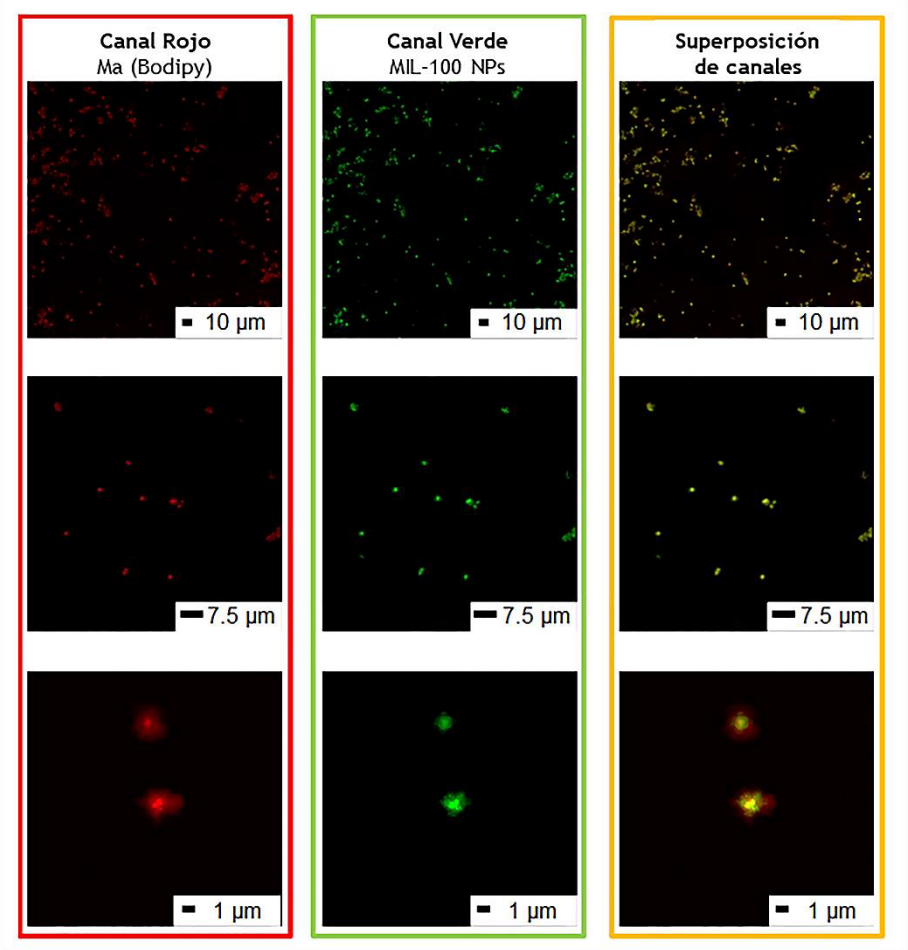


Figura 19. Imágenes de CLSM de Ma-MIL-100 MS: Ma-Bodipy (canal rojo, primera columna), NPs MIL-100 (canal verde, segunda columna) y canales superpuestos (tercera columna). (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [195], ACS Appl. Mater. Interfaces. 12 (2020) 25676-25682. Copyright © 2020, American Chemical Society)

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Básicamente, los resultados de CLSM son coherentes con los obtenidos en RAMAN. En ambos estudios, el Ma es detectado en los diferentes planos estudiados de la MS, así como en superficie. Además, en el estudio RAMAN, se apreció el pico característico de las MOFs en la superficie de la MS, revelando la posible llegada de una cierta cantidad de NPs hacia el exterior, manteniendo una fuerte señal de Ma (Figura 16b) que corrobora la conformación de la capa exterior fundamentalmente por el excipiente.

5.3. Estudio de liberación de las NPs MIL-100 e INH@MIL-100 a partir de las microsferas de manitol (Ma MS). Estabilidad coloidal y química, y liberación de isoniazida (INH)

Los excipientes pueden proteger a los nanosistemas de las condiciones de secado por atomización, en particular de la degradación por el proceso de calentamiento y evitar las interacciones entre las NPs en las MS, que podrían causar su agregación. Además, mejora la calidad del polvo obtenido y su depósito en el pulmón profundo [151,213]. Así, se evaluaron tanto la liberación de NPs MIL-100 y NPs INH@MIL-100 desde Ma MS, como sus estabilidades coloidales durante el proceso de liberación (sección 4.4.). Para ello, se monitorizó la evolución del tamaño y del potencial ζ de las NPs liberadas en tres medios acuosos, simulando las condiciones pulmonares: agua MilliQ, PBS (pH = 7.4) y SLF (pH = 7.4), a 37 °C y durante 24 h (Figuras 20 y 21).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

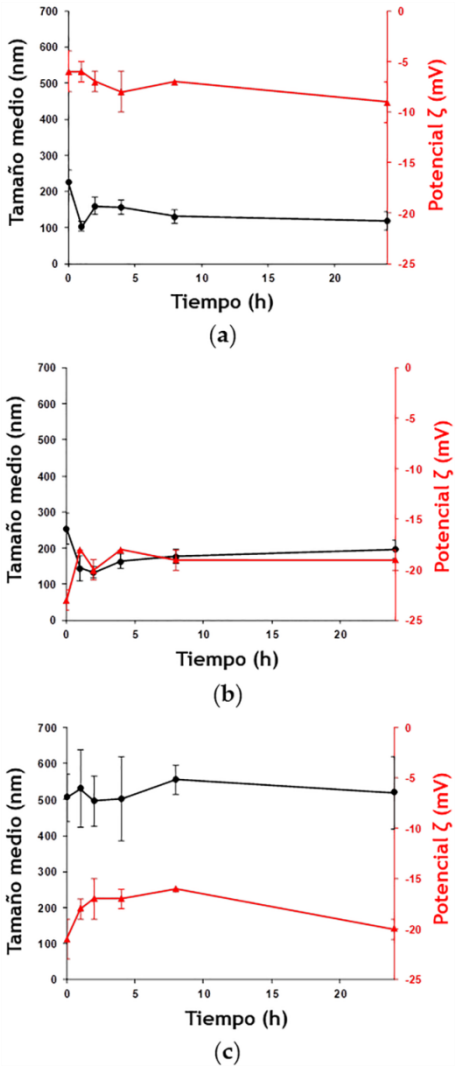


Figura 20. Estabilidad coloidal de las NPs MIL-100 liberadas a partir de las MS en: (a) agua, (b) PBS y (c) SLF, mostrando la evolución del tamaño de las NPs (negro, izquierda) y de la carga superficial (rojo, derecha) *vs.* tiempo (media ± S.D.; n = 3). (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [195], ACS Appl. Mater. Interfaces. 12 (2020) 25676-25682. Copyright © 2020, American Chemical Society)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

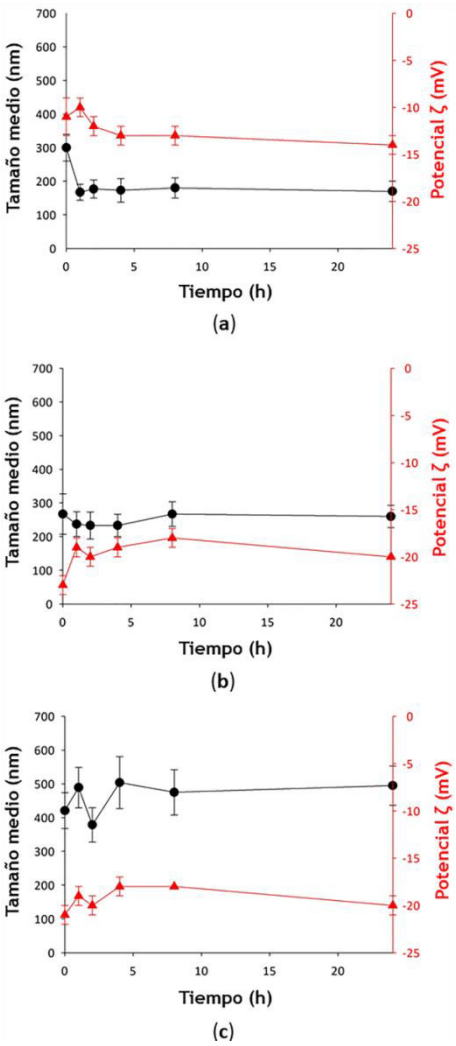


Figura 21. Estabilidad coloidal de las NPs INH@MIL-100 liberadas a partir de las MS en: (a) agua, (b) PBS y (c) SLF, mostrando la evolución del tamaño de las NPs (negro, izquierda) y de la carga superficial (rojo, derecha) *vs.* tiempo (media ± S.D.; n = 3). (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors)

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Cabe señalar que el Ma se disuelve rápidamente en los medios acuosos, liberando las NPs MIL-100 e INH@MIL-100. Al monitorizar las dimensiones de las partículas liberadas, se comprobó que las NPs MIL-100 e INH@MIL-100 exhiben una estabilidad coloidal adecuada en agua y PBS (pH = 7.4), mostrando una disminución del tamaño de partícula durante la primera hora (de ~ 240 a 120 nm y de ~ 283 a 202 nm, respectivamente) (ver Figuras 20 y 21). Después, las dimensiones de las NPs permanecieron coloidalmente estables a lo largo de 24 h en ambos medios. Por otro lado, las NPs MIL-100 e INH@MIL-100 se liberaron inmediatamente en SLF y mantuvieron un tamaño ligeramente elevado y constante, pero aun así adecuado (~500 nm), durante las 24 h estudiadas.

Además, en ambos casos, los valores de potencial ζ permanecieron estables y negativos durante todo el estudio de estabilidad, independientemente del medio empleado (Figuras 20 y 21). Como se mencionó anteriormente, esto es una ventaja porque las NPs cargadas negativamente a menudo generan una respuesta inflamatoria más baja que las NPs positivas [204]. La carga superficial de las NPs INH@MIL-100 es menos negativa en comparación con las de las NPs MIL-100 en todos los medios (-8.0 *vs.* -12.2 mV, en agua MilliQ; -19.5 *vs.* -19.8 mV, en PBS; y -18.2 frente a -19.3 mV, en SLF). Probablemente, se deba a que el fármaco se encuentra tanto en la superficie porosa interna como en la superficie externa de las NPs.

Curiosamente, el aumento del tamaño de 164 a 518 nm y de 194 a 460 nm (para las NPs MIL-100 e INH@MIL-100, respectivamente) y la reducción del potencial ζ de -10 a -20 mV y de -12 a -19 mV (para las NPs MIL-100 e INH@MIL-100, correspondientemente), al comparar las NPs liberadas en agua MilliQ con las liberadas en SLF, podría explicarse por la formación de una corona sobre las NPs constituida por proteínas y lípidos provenientes del SLF. Sin embargo, el estudio aquí presentado no ha abordado sistemáticamente la adsorción de proteínas y lípidos sobre las NPs.

Con respecto a la liberación de INH (Figura 22), se observa una liberación inicial (t = 0 h) rápida en agua MilliQ y PBS del 21% y 44%, respectivamente. Tras lo cual, se produce una liberación progresiva y controlada durante 1 semana, alcanzando una liberación

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

máxima del 27% y 84%, a las 48 y 120 h, respectivamente. La liberación incompleta de INH podría explicarse por la formación de interacciones específicas con las MOFs. La INH liberada no pudo detectarse en SLF, probablemente debido a la formación de interacciones fuertes entre el fármaco y los fosfolípidos del medio, lo que dificulta su cuantificación por HPLC.

Por otro lado, se produce una mayor liberación de fármaco cuando las NPs MOFs son liberadas en PBS que en agua MilliQ. Esta diferencia en la cinética de liberación podría estar relacionada con una degradación más rápida de las NPs en PBS que en agua MilliQ. De hecho, a las 168 h, se produce una degradación del 49% de las NPs en PBS, a diferencia del 1% en agua MilliQ (Figura 22), apoyando esta explicación. Este fenómeno puede deberse a una posible competencia entre los fosfatos del medio con los carboxilatos de la estructura MIL-100 por la coordinación del Fe. En SLF, la estabilidad química de las NPs fue similar que en PBS durante a las primeras 8 h (Figura 21b). A tiempos posteriores, se observa una mayor degradación en SLF; lo que genera una buena expectativa de cara su aplicación *in vivo*.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

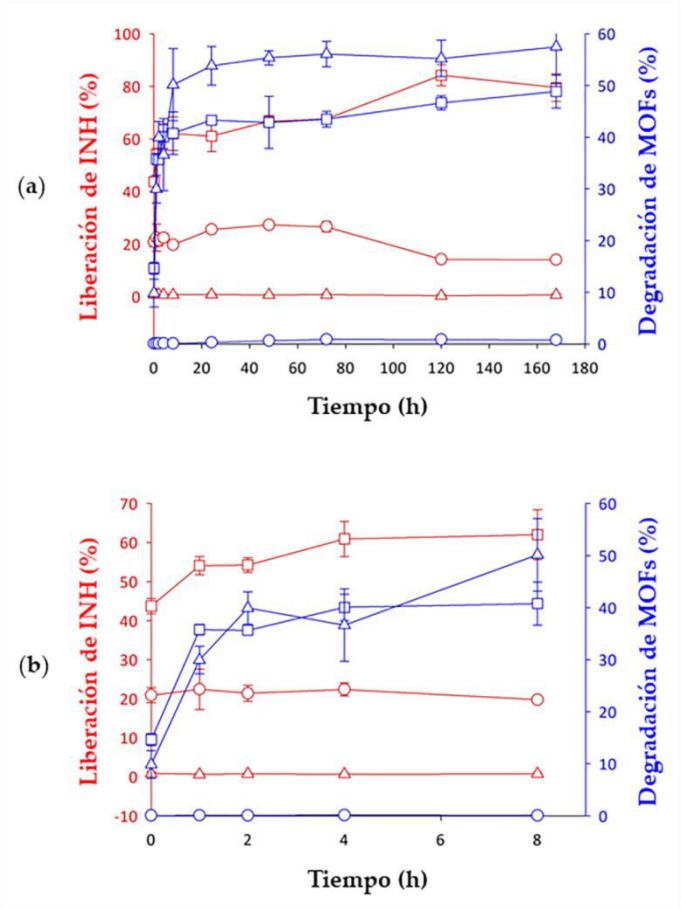


Figura 22. Liberación de INH (%) (rojo) desde las NPs INH@MIL-100 y degradación de MOFs (%) (azul) en agua (círculo), PBS (pH = 7.4) (cuadrado) y SLF (triángulo) *vs.* tiempo durante: (a) 168 h y (b) las primeras 8 h (media ± S.D.; n = 3). (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors)

La degradación inicial en cada medio fue verificada por TEM (muestras tomadas a la 1 h de liberación, Figura 23), donde se apreció que las NPs INH@MIL-100 mantuvieron su forma inicial en agua (Figura 23a), pero no en PBS con una morfología no definida debido a

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

su mayor degradación (Figura 23b). Por otro lado, cuando las NPs se liberaron en SLF, se recuperó una cantidad sustancial de partículas, mostrando un aspecto facetado bien definido (Figura 23c) cuando se compara con las liberadas en PBS.

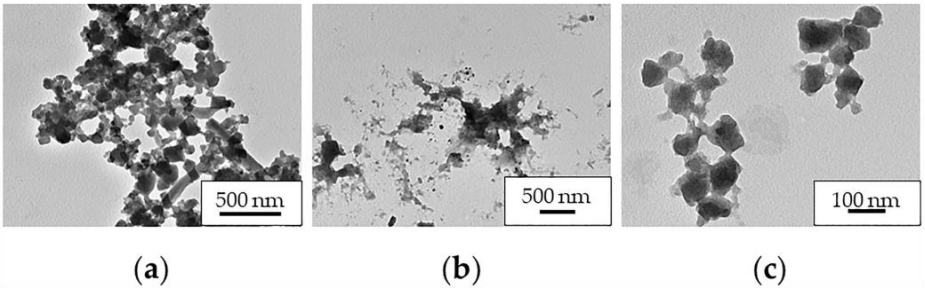


Figura 23. Microfotografías TEM de las NPs de INH@MIL-100 liberadas desde Ma MS en: (a) agua MilliQ, (b) PBS y (c) SLF. (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors)

La cristalinidad de las NPs liberadas también se analizó mediante PXRD (sección 4.4.). En este caso, las NPs MIL-100 e INH@MIL-100 liberadas desde Ma MS en SLF se compararon con la cristalinidad de las Ma-MIL-100 MS y Ma-INH@MIL-100 MS, respectivamente (Figura 24).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

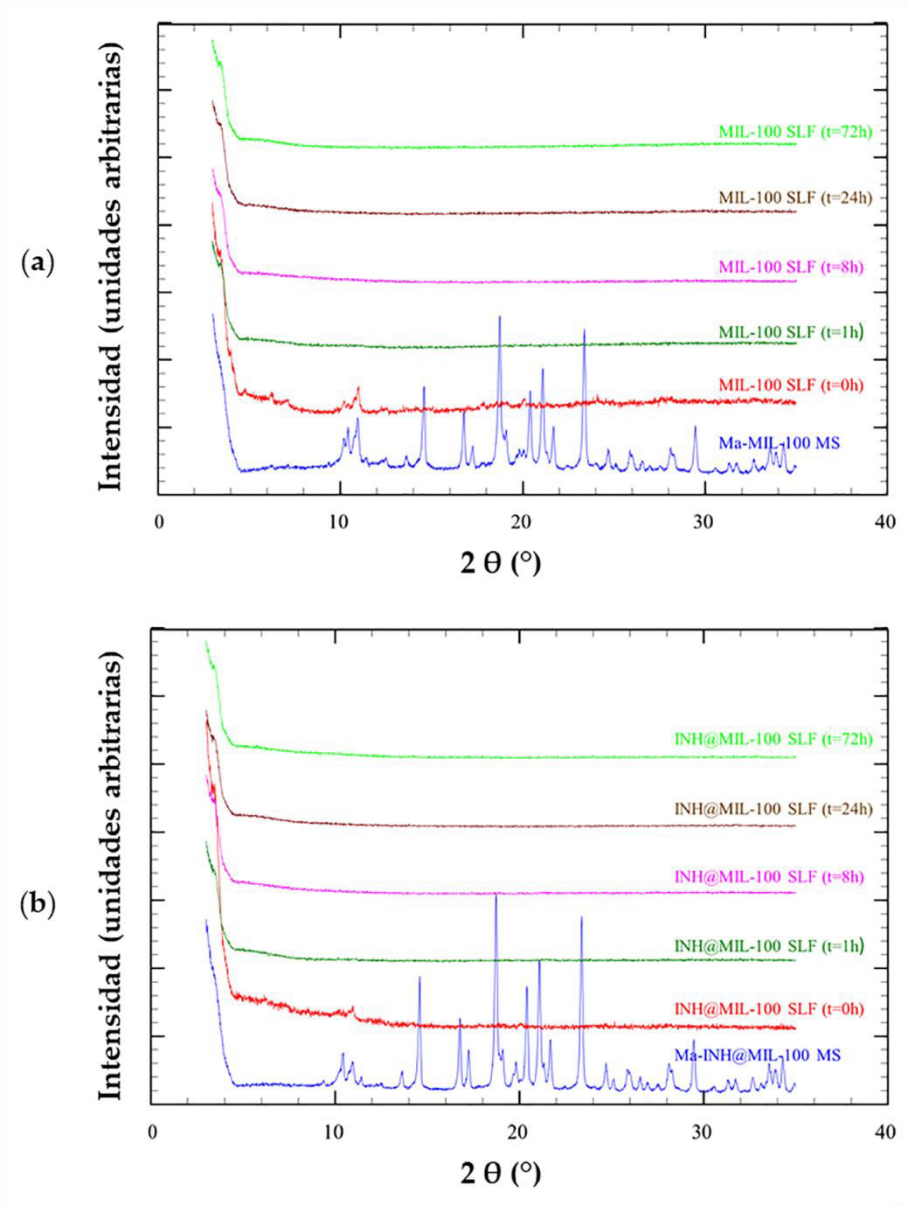


Figura 24. Patrones PXRD de: (a) NPs de MIL-100 liberadas en SLF y Ma-MIL-100 MS; (b) NPs de INH@MIL-100 liberadas en SLF y Ma-INH@MIL-100 MS.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors)

En el difractogramal, se observaron picos de difracción de Ma de las MS (sobre 20 2 θ (°), en ambas líneas azules), mostrando la cristalinidad de estos vehículos. A diferentes tiempos de liberación, los picos de difracción de Ma no se aprecian porque el excipiente se encuentra disuelto en SLF, mientras que las NPs están siendo liberadas. Los picos caracteristicos de la estructura cristalina de las MOFs sólo son visibles a tiempo 0 (aproximadamente 10 2 θ (°), indicando una degradación estructural rápida en contacto con el medio SLF.

Este estudio confirma la cristalinidad del Ma y de las NPs, previamente a las liberaciones; pero también, la solubilización del Ma y la degradación de las MOFs en SLF, lo que facilitó la liberación de la INH. Además, es razonable esperar que las NPs INH@MIL-100 se liberen de manera más lenta desde las Ma MS en el líquido alveolar debido a su pequeño volumen, en comparación con las condiciones experimentales (4 $mg \cdot mL^{-1}$ de polvo en medio de liberación) [192].

5.4. Estudios *in vitro* en la línea celular A549

5.4.1. Estudios de viabilidad celular

Para realizar el estudio de viabilidad (sección 4.5.4.), se eligió la línea celular A549, que ha sido ampliamente utilizada *in vitro* para evaluar la eficacia y seguridad de diversos sistemas de administración de fármacos [214]. En este estudio, se emplearon diferentes concentraciones de NPs MIL-100, NPs INH@MIL-100 y Ma (ver Tabla 8, sección 4.5.4.). Los resultados se recogen en la Figura 25. Tras 24 h post-incubación, la viabilidad celular no se vio afectada con las concentraciones más bajas (<0.01 $mg \cdot mL^{-1}$) de las NPs MIL-100 e INH@MIL-100 (Figura 25). A partir de 0.02 $mg \cdot mL^{-1}$, la viabilidad celular disminuye levemente a medida en que aumenta la concentración de NPs. Se obtuvieron resultados similares a las 48 post-incubación. Básicamente, este estudio muestra una baja toxicidad

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de ambos nanosistemas, indicando también que la presencia de INH no afecta negativamente a la viabilidad de las células A549. Los resultados obtenidos en este trabajo están de acuerdo con estudios previos, en que las NPs MIL-100 no indujeron toxicidad *in vitro* en células A549 (medida como supervivencia/muerte celular, impedancia celular, daño del ADN y generación de ROS) [182]. En comparación con otros nanoportadores previamente propuestos para la vía pulmonar (por ejemplo, SLN de dibehenato de glicerilo o triestearato de glicerilo con/sin rifabutina (RFB) [215], así como NPs de CS/TPP [214]), la viabilidad de nuestros sistemas es mayor. También, se confirmó que el Ma, después de 24 y 48 h post-incubación, es totalmente biocompatible con las células (100% de viabilidad, Figura 25).

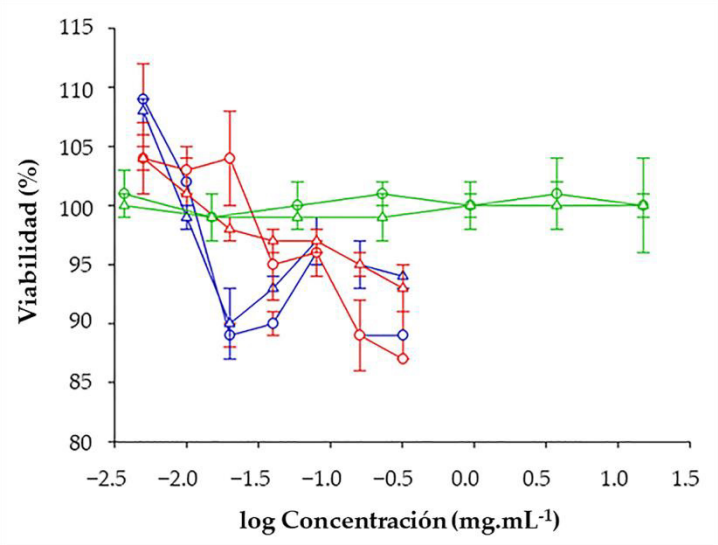


Figura 25. Viabilidad celular a las 24 h (círculo) y 48 h (triángulo) tras la eliminación de NPs MIL-100 (azul), NPs INH@MIL-100 (rojo) y Ma (verde) en células A549, medido por la fluorescencia de CellTiter-Blue® (media ± S.D.; n = 4). (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors)

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular complementario empleando Luna II (sección 4.5.4.), que permitió corroborar los resultados anteriores de forma visual por recuento automático de células vivas. Como se muestra en la Figura 26, la viabilidad de las células incubadas con NPs MIL-100 fue de 90.8 ± 2.6%, mientras que la viabilidad empleando NPs INH@MIL-100 fue de 80.4 ± 7.4%.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

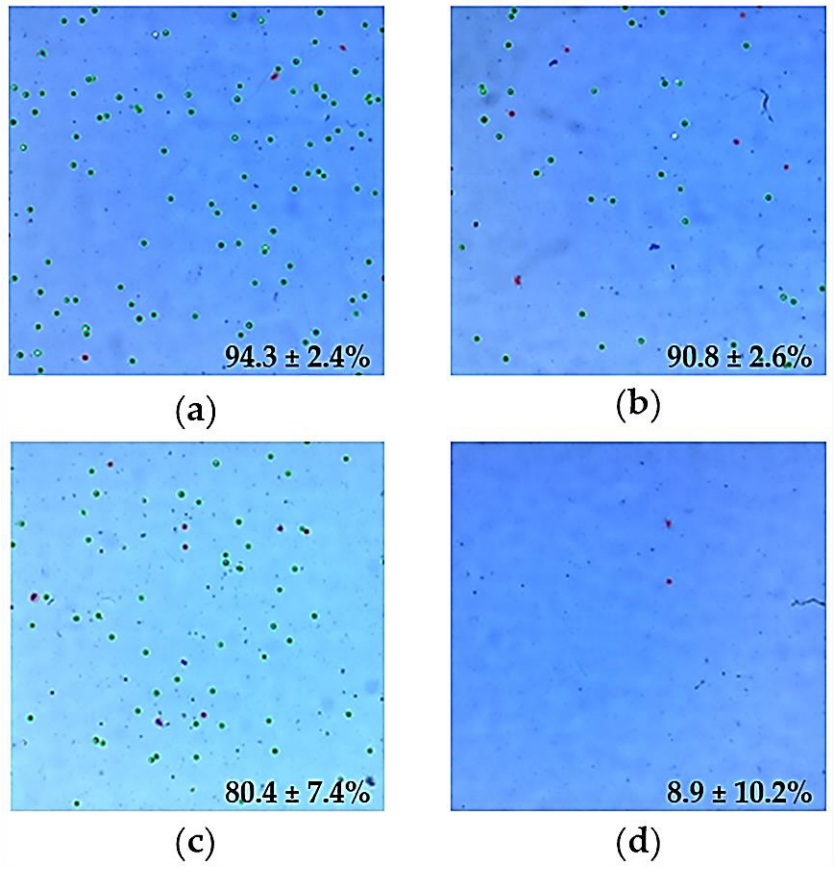


Figura 26. Imágenes Luna II de: (a) células A549 (control positivo de viabilidad), (b) células A549 tratadas con NPs MIL-100, (c) células A549 incubadas con NPs INH@MIL-100 y (d) A549 tratadas con Tritón (control negativo de viabilidad). Las células vivas y muertas se marcaron con un círculo verde y rojo, respectivamente (media ± S.D.; n = 3). (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors)

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.4.2. Captación intracelular y distribución

Se evaluó la captación intracelular de NPs MIL-100 y NPs INH@MIL-100 en células A549 mediante autorreflexión del Fe (canal verde) y utilizando DAPI como tinción nuclear de las células (canal azul), empleando la técnica de CLSM (sección 4.5.5.). Las imágenes de las células (Figura 27) confirmaron la localización citoplasmática de las NPs MIL-100 e INH@MIL-100. Cabe señalar que la señal de autorreflexión del Fe perteneciente a las NPs MIL-100 (Figura 27d-f) fue más alta que la de las NPs INH@MIL-100 (Figura 27g-i). Este hecho se debió a un posible efecto de "apantallamiento" producido por la INH. Sin embargo, la ganancia de señal de las NPs INH@MIL-100 se corrigió aumentando: i) el volumen de dispersión de estos nanosistemas (20, 30, 40 y 50 μL), ii) la potencia del láser y iii) el número de acumulaciones por plano (ver Figura 27m-u).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

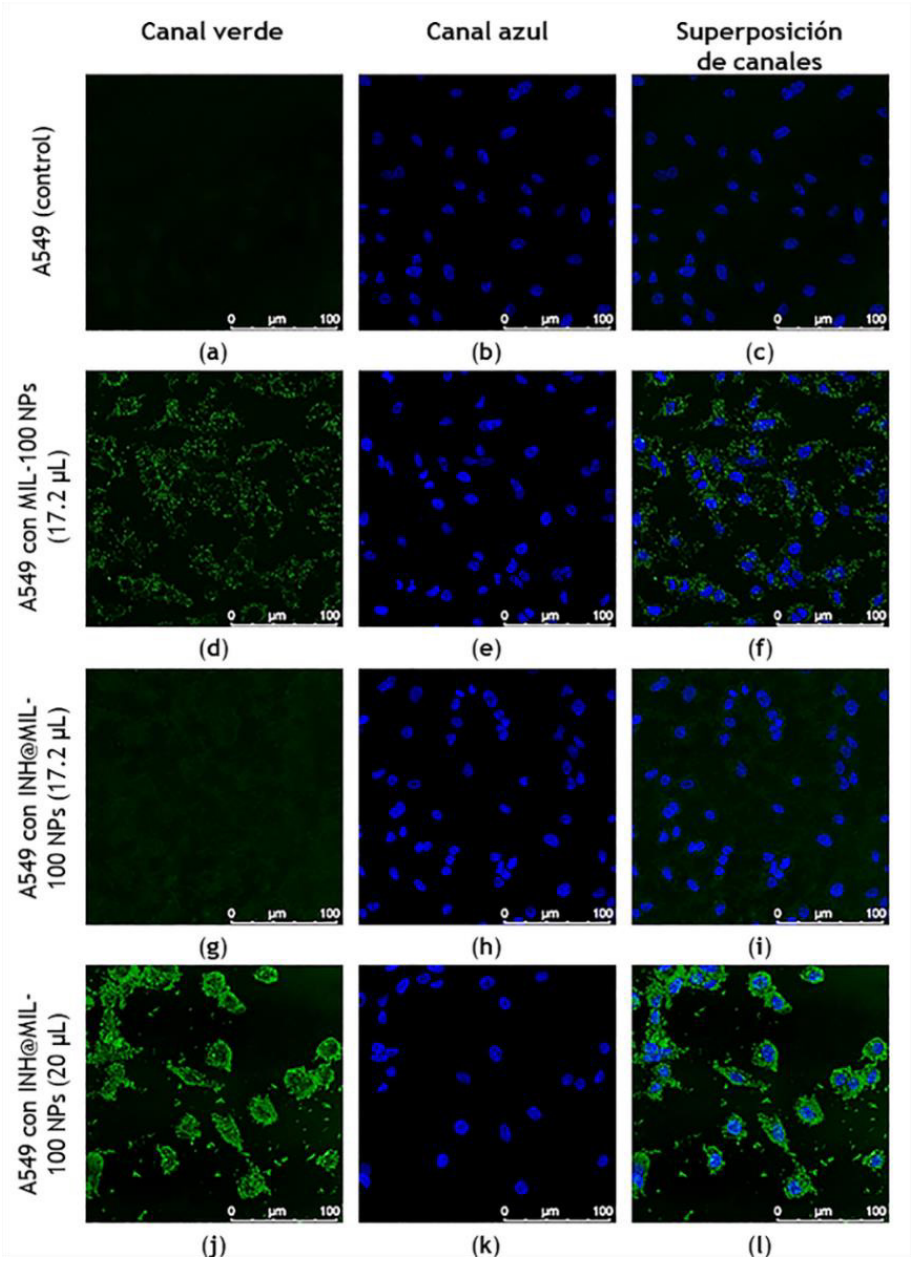


Figura 27. Imágenes CLSM de células A549: (a-c) sin NPs (control), (d-f) con NPs de MIL-100 (17.2 µL), (g-i) con NPs de INH@MIL-100 (17.2 µL) y (j-l) con NPs

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de INH@MIL-100 (20 µL). Canal verde: MOFs, autorreflexión del Fe; canal azul: núcleos celulares, DAPI. Escala: 100 nm. (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors)

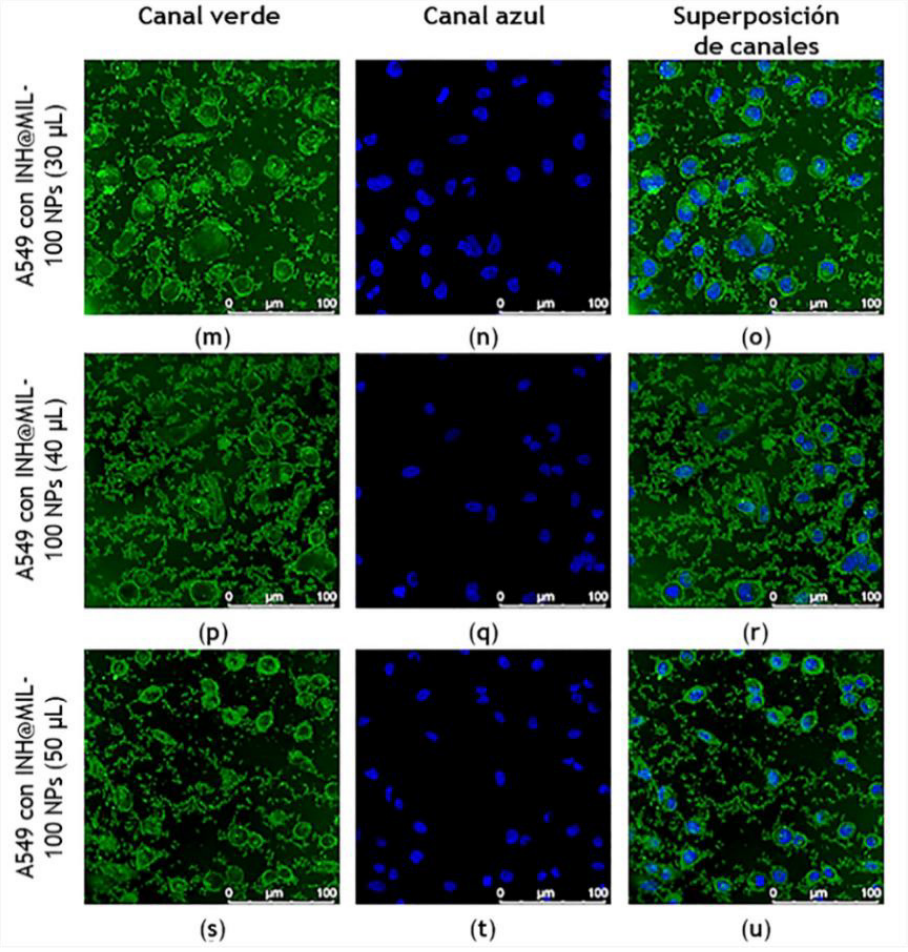


Figura 27 (continuación). Imágenes CLSM de células A549: (m-o) con NPs de INH@MIL-100 (30 µL), (p-r) con NPs de INH@MIL-100 (40 µL) y (s-u) con NPs de INH@MIL-100 (50 µL). Canal verde: MOFs, autorreflexión del Fe; canal azul: núcleos celulares, DAPI. Escala: 100 nm. (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors)

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Cuando se aumentó progresivamente el volumen de dispersión de NPs INH@MIL-100 (manteniendo la concentración a 3.2 $mg \cdot mL^{-1}$), se detectó que gradualmente había más NPs fuera de las células, viéndose afectada la morfología de las células por volúmenes superiores a 40 µL. Sin embargo, estos volúmenes elevados fueron sólo utilizados para detectar la presencia de NPs INH@MIL-100 dentro de las células. Si se comparan los resultados obtenidos para las NPs MIL-100 con los de las NPs INH@MIL-100 utilizando volúmenes de 17.2 y 20 µL, respectivamente, se concluye que en ambos casos las nanoMOFs se internalizaron perfectamente dentro de las células A549, localizándose en el citoplasma (Figura 28).

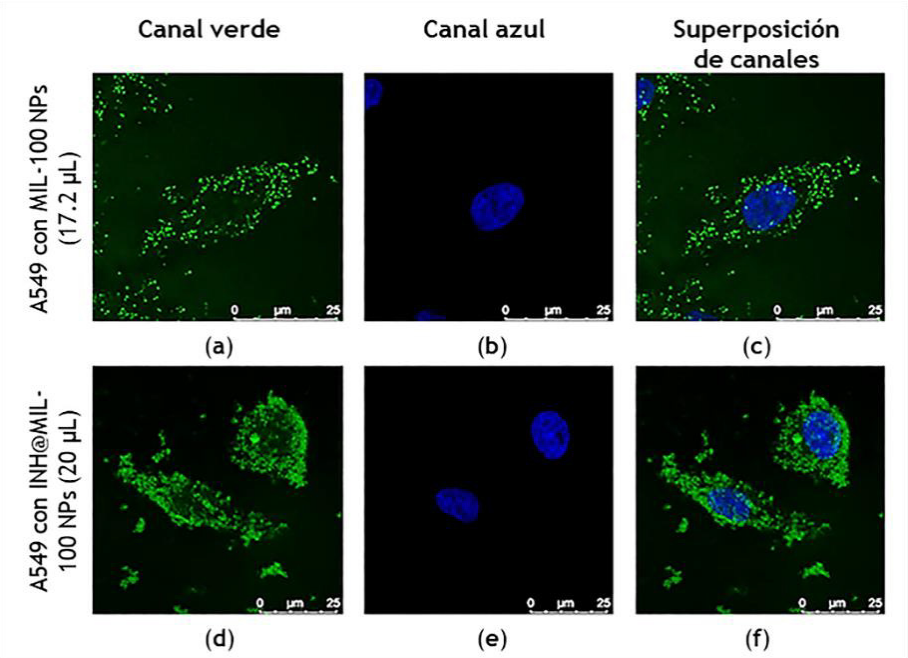


Figura 28. Imágenes CLSM de células A549: (a-c) con NPs de MIL-100 (17.2 µL) y (d-f) con NPs de INH@MIL-100 (20 µL). Canal verde: MOFs, autorreflexión del Fe; canal azul: núcleos celulares, DAPI. Escala: 25 nm. (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.4.3. Cuantificación de células A549 internalizadas con NPs: Citometría de flujo

Una vez confirmada visualmente la internalización, se realizó la cuantificación de las células que han captado NPs, mediante FCM (sección 4.5.6.). El estudio se basó en un análisis de complejidad, examinando un total de 10000 eventos, aproximadamente, comparando las células control (sin NPs) con las muestras que han internalizado las NPs MIL-100 y NPs INH@MIL-100. En este caso, las células que contienen NPs INH@MIL-100 presentan más complejidad que las que contienen NPs MIL-100, y éstas son más complejas que las células control (sin NPs). En las Figuras 29A, B y C (replicados 1, 2 y 3, respectivamente), la primera columna de diagramas de dispersión de FCM (a) representa la población total de los eventos analizados. La segunda columna de diagramas de dispersión de FCM (b), en donde se excluyeron los debris (células apoptóticas, fragmentos de membrana, etc.), corresponde a aquellos eventos que presentan complejidad celular positiva. La tercera columna de histogramas FCM (c) representa la intensidad media de fluorescencia del reactivo de viabilidad Aqua para verificar la viabilidad de los eventos seleccionados con complejidad positiva.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

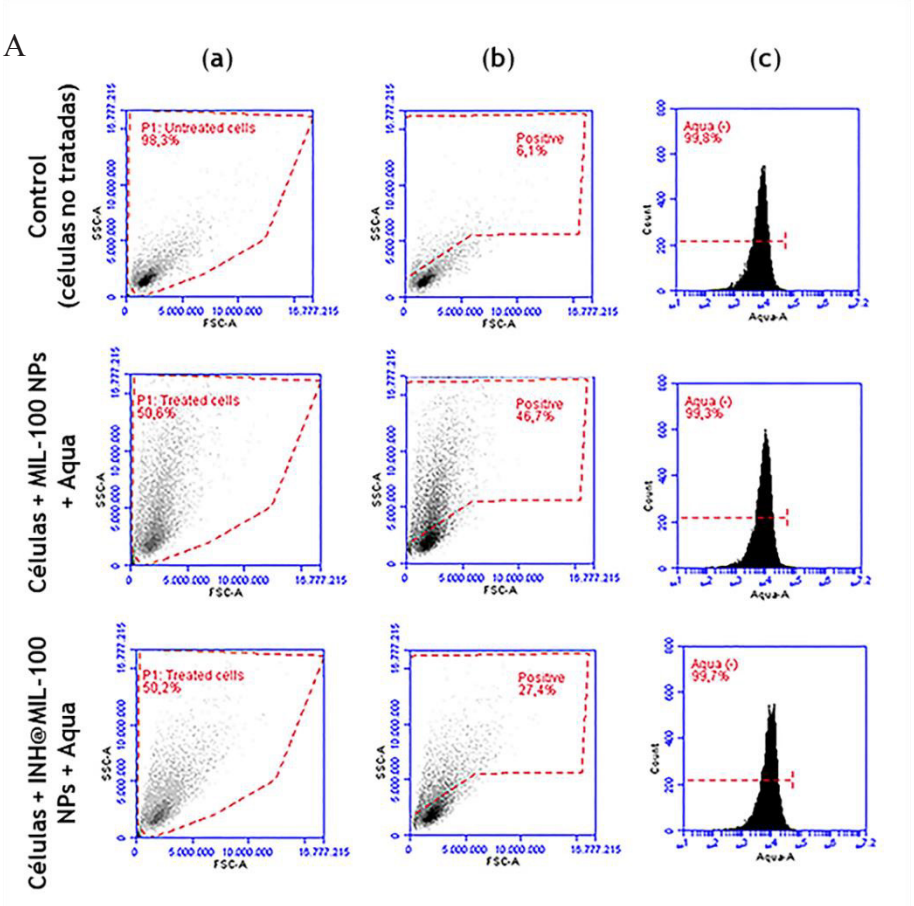


Figura 29A. Análisis del primer replicado de células cargadas con NPs de MIL-100 e INH@MIL-100 por FCM: (a) diagramas de dispersión de FCM de la población total de eventos, (b) gráficos de dispersión de FCM del área de complejidad positiva seleccionada [el eje vertical es la dispersión lateral (SSC) y el eje horizontal es la dispersión directa (FSC)], (c) histogramas de FCM de la intensidad de fluorescencia media del reactivo de viabilidad Aqua. (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

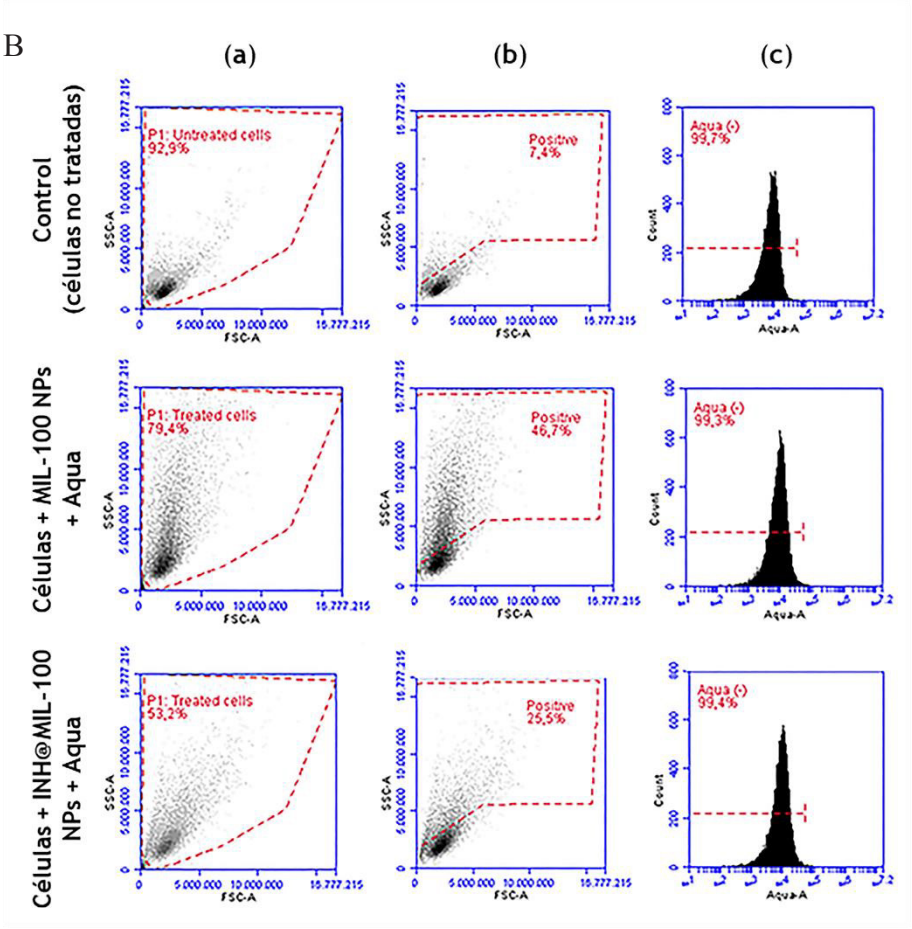


Figura 29B. Análisis del segundo replicado de células cargadas con NPs de MIL-100 e INH@MIL-100 por FCM: (a) diagramas de dispersión de FCM de la población total de eventos, (b) gráficos de dispersión de FCM del área de complejidad positiva seleccionada [el eje vertical es la dispersión lateral (SSC) y el eje horizontal es la dispersión directa (FSC)], (c) histogramas de FCM de la intensidad de fluorescencia media del reactivo de viabilidad Aqua. (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

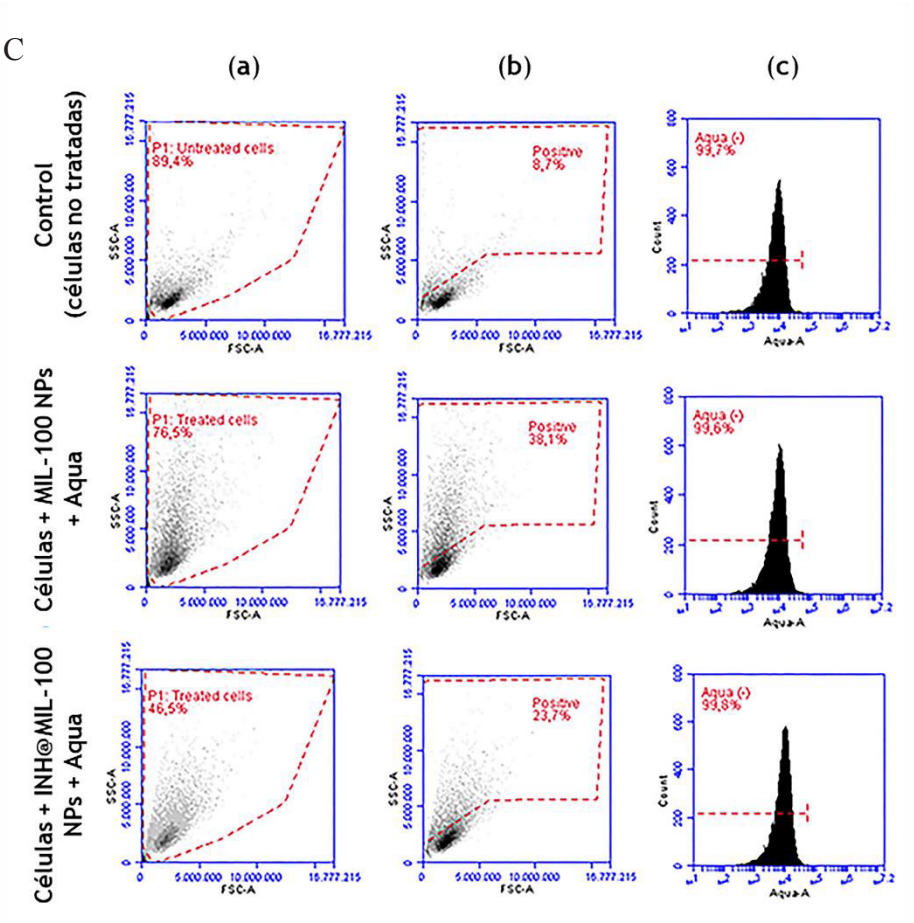


Figura 29C. Análisis del tercer replicado de células cargadas con NPs de MIL-100 e INH@MIL-100 por FCM: (a) diagramas de dispersión de FCM de la población total de eventos, (b) gráficos de dispersión de FCM del área de complejidad positiva seleccionada [el eje vertical es la dispersión lateral (SSC) y el eje horizontal es la dispersión directa (FSC)], (c) histogramas de FCM de la intensidad de fluorescencia media del reactivo de viabilidad Aqua. (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [199], Molecules. 26 (2021) 6408. Copyright: © 2021 by the authors)

Para las réplicas de los diagramas de dispersión de FCM del control (células no tratadas), se analizó casi el 100% del total de eventos (93.5 ± 4.5%) y se comparó con los de las células tratadas con

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

NPs MIL-100 (68.8 ± 15.9%) y NPs INH@MIL-100 (50.0 ± 3.4%) (consultar Figura 29a). La diferencia de porcentaje de células analizadas se debió a la exposición de las células A549 a las NPs MIL-100 y NPs INH@MIL-100, lo que dio lugar a una serie de eventos pertenecientes a los detritos, que debieron excluirse para el análisis de complejidad celular. En el diagrama de dispersión de FCM, donde se determina el área de complejidad celular, el control muestra valores bajos de complejidad como se esperaba (7.4 ± 1.3%) (ver Figura 29b), verificando que las células analizadas se encontraron sin NPs. Sin embargo, en los diagramas de dispersión de FCM de las células A549 tratadas con las nanoMOFs muestran un mayor porcentaje de complejidad celular en comparación con el control. En el caso de las células tratadas con NPs MIL-100, se obtuvieron valores de complejidad positivos (43.8 ± 5.0%) (ver Figura 29b). Por tanto, podríamos suponer que este porcentaje de células era positivo para la captación de este nanosistema. En el caso de las células tratadas con NPs cargadas con fármaco, también se obtuvieron valores de complejidad positivos (25.5 ± 1.8%), siendo inferiores a los relativos al nanosistema anterior (ver Figura 29b), demostrando que hubo captación de NPs INH@MIL-100. Se sospecha que el detector no era lo suficientemente sensible para determinar la diferencia de complejidad entre las células control y las células internalizadas con nanoMOFs, debido al pequeño tamaño de los nanosistemas. Por ello, se cree que estos valores experimentales se subestimaron. Además, el resultado es más infravalorado en el caso de las células tratadas con NPs INH@MIL-100, probablemente como resultado de un efecto de "apantallamiento" del fármaco en el método de análisis. De hecho, se confirmó anteriormente una buena captación de ambos sistemas mediante el estudio de CLSM, siendo respaldado también por un estudio de Wyszogrodzka-Gaweł [120], en el que se demostró que las NPs de Fe-MIL-101-NH_2 cargadas con INH fueron captadas en más cantidad en comparación con las NPs no cargadas.

Finalmente, vale la pena resaltar la falta de citotoxicidad en todos los casos, como se observa en los histogramas de FCM (Aqua (-); ver Figura 29c). En efecto, se confirmó una elevada viabilidad de las células A549 tratadas con ambas NPs MIL-100 e INH@MIL-100

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(99.4 ± 0.2% y 99.6 ± 0.2%, respectivamente), en comparación con el control (99.7 ± 0.1%) (Figura 29c), siendo ligeramente superior para las células tratadas con NPs cargadas con INH que para los nanosistemas no cargados.

5.5. Estudios *in vivo*

5.5.1. Distribución pulmonar de las NPs MIL-100 e INH@MIL-100 microencapsuladas

La formulación de Ma-MIL-100 MS se administró por vía intratraqueal a ratas hembras (Wistar-Kyoto) con el fin de investigar su depósito pulmonar. Se administraron polvos simulando la respiración fisiológica de la rata, tal como se indicó en la sección 4.6.1. Se utilizaron cuatro grupos de animales para evaluar el efecto de dos dosis diferentes (dosis baja-LD-8 mg y dosis alta-HD-20 mg) y tiempos (0.5 y 24 h). Se investigó la distribución de las Ma-MIL-100 MS en los pulmones y su posible acumulación cuantificando el ligando H_3BTC de las NPs MIL-100 en diferentes secciones del pulmón derecho (lóbulos: superior, medio e inferior) y en tráquea, tras 0.5 y 24 h de la administración de las formulaciones. Teniendo en cuenta que las dosis administradas de Ma-MIL-100 MS son de 8 y 20 mg, y su contenido de NPs MIL-100 es de 9.1 wt%, la formulación será útil para administraciones farmacológicas de dosis bajas (<2.5 mg, como en el caso de INH [216,217], corticosteroides [218] o agonistas adrenérgicos β2 [219]), sirviendo también para administraciones múltiples y/o repetidas. Cabe destacar que hay inhaladores de polvo seco capaces de administrar masas máximas de hasta 100 mg de polvo [220].

En este sentido, una ventaja importante de este micro-nanosistema inhalado en comparación con los sistemas administrados por vía intravenosa u oral para tratamiento pulmonar, es que la administración local evita niveles elevados de fármaco en sangre, responsables de neuropatías periféricas [216]. Además, la formulación propuesta presenta como grandes ventajas la protección del fármaco de la degradación, así como su liberación progresiva y localizada en el pulmón.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El examen microscópico del pulmón derecho tratado con Ma-MIL-100 MS mostró la presencia de una cantidad importante de NPs MIL-100 (visibles después de la tinción con P/S, en color azul oscuro), distribuidas por todo el tejido pulmonar (lóbulos: superior, medio e inferior del pulmón) (Figura 30).

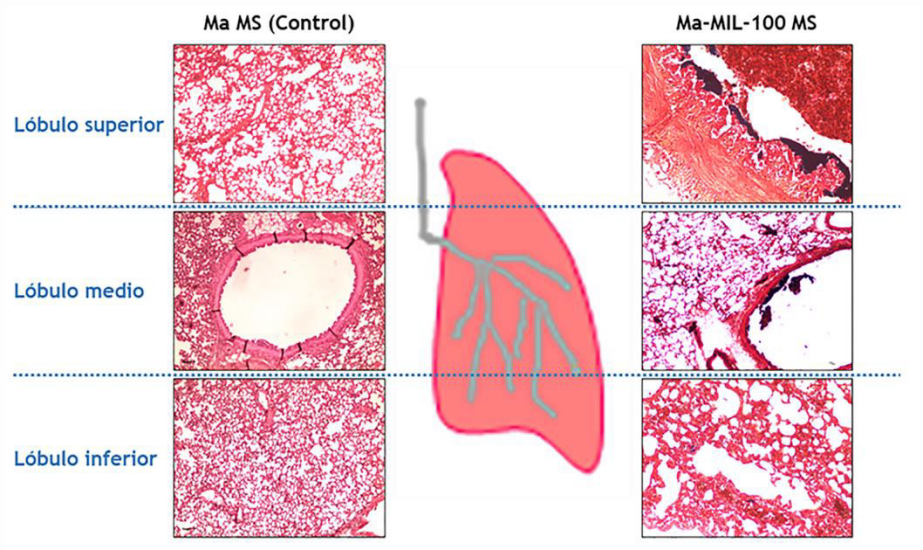


Figura 30. Cortes histológicos de pulmón de rata tratada con Ma MS (control, columna de la izquierda) y con Ma-MIL-100 MS (columna de la derecha) a diferentes niveles: lóbulo superior, medio e inferior (de arriba abajo). Escala: 10 µm. (Figura de nueva creación)

Es común que la dosis de depósito sea mayor en las regiones pulmonares proximales y disminuya rápidamente a medida en que se profundiza en el pulmón. Sin embargo, en todos los grupos testados, las NPs MIL-100 se distribuyeron en gran cantidad a lo largo de todo el pulmón, independientemente del tiempo y de la dosis empleada (Figura 31).

De este modo, se pone de manifiesto que las Ma-MIL-100 MS son capaces de alcanzar el pulmón profundo, liberando las NPs principalmente en la superficie de bronquiolos y alvéolos (Figuras 30 y 31).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

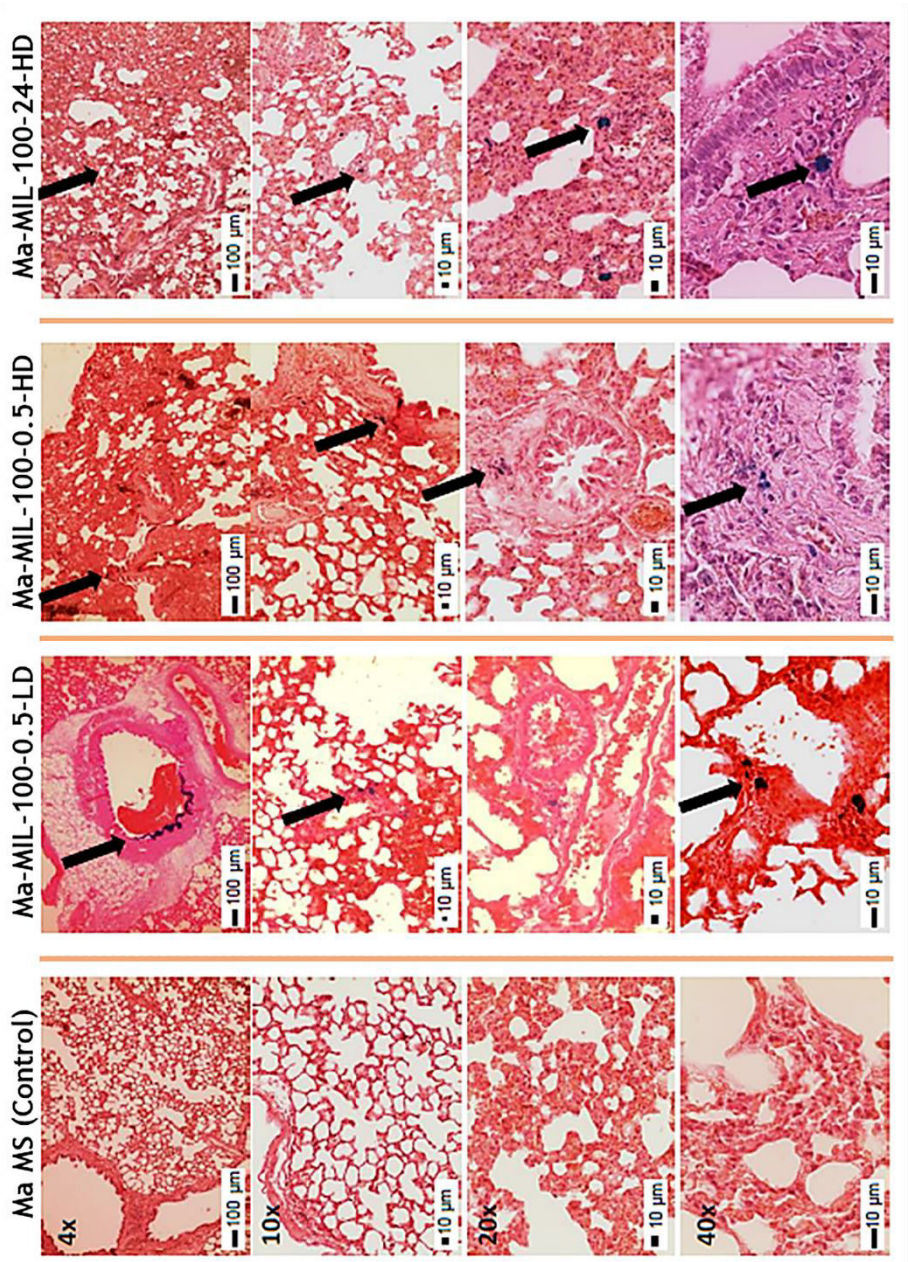


Figura 31. Secciones histológicas de pulmones: control, Ma-MIL-100-0.5-LD, Ma-MIL-100-0.5-HD y Ma-MIL-100-24-HD, de izquierda a derecha. Los pulmones se tiñeron con hematoxilina-eosina y las NPs, con P/S. (Figura adaptada del trabajo de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Fernández-Paz et al. [195], ACS Appl. Mater. Interfaces. 12 (2020) 25676-25682. Copyright © 2020, American Chemical Society)

Los agregados de NPs MIL-100, en azul oscuro (señalados con flechas negras), son visibles y se acumulan principalmente en la superficie de los bronquiolos y alvéolos, distribuidos por todo el tejido pulmonar. Sin embargo, hemos visto diferencias significativas ($p < 0.05$, análisis de varianza bidireccional, ANOVA) en la proporción total de formulación depositada en el pulmón en función de la dosis: Ma-MIL-100-0.5-LD aprox. 4%/lóbulo (~ 0.10 mg) de la formulación total administrada; Ma-MIL-100-0.5-HD aprox. 14%/lóbulo (~ 2.11 mg) de la formulación total administrada (ver Tabla 16). Al aumentar la dosis, no sólo llega una mayor concentración de la formulación a los pulmones (0.01 $mg \cdot g^{-1}$ *vs* 1.44 $mg \cdot g^{-1}$); sino que también es tres veces más eficiente (4% *vs* 14% de la dosis administrada). Curiosamente, la formulación encontrada en la sección traqueal no mostró diferencias significativas, independientemente de la dosis después de 30 min desde la administración (ver Tabla 16). Esta observación es coherente con una retención traqueal máxima de las partículas, independientemente de la dosis administrada, lo que hace que las formulaciones de dosis altas se dirijan a los pulmones de manera más eficiente.

Tabla 16. Porcentajes de formulación en las diferentes regiones del tracto respiratorio a los 30 min de ser administradas, dependiendo de la dosis administrada (baja: LD; alta: HD) (media ± S.D.).

Región	Ma-MIL-100-0.5-LD (%)	Ma-MIL-100-0.5-HD (%)
Lóbulo superior	4.2 ± 1.5	12.8 ± 1.2
Lóbulo medio	3.8 ± 1.5	13.2 ± 3.7
Lóbulo inferior	4.0 ± 1.5	16.5 ± 5.1
Tráquea	12.3 ± 1.6	19.0 ± 5.0

Además, tras la administración pulmonar a ratas de Ma-INH@MIL-100-0.5-HD, se demostró una biodistribución similar a la de su análogo sin fármaco (lóbulo superior: 16.65 ± 5.98%, lóbulo medio: 13.00 ± 5.95% y lóbulo inferior: 18.07 ± 4.80%). Por lo tanto,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

la cantidad de INH estimada que llega a los pulmones es de aprox. 40 $\mu g \cdot g^{-1}$, siendo un valor superior al mínimo terapéutico (concentración mínima inhibitoria = 0.2−20 $\mu g \cdot mL^{-1}$) [221].

Por otro lado, cabe señalar que, aunque estamos por debajo del tamaño aerodinámico comúnmente aceptado (<1-5 μm), nuestra formulación muestra un depósito pulmonar adecuado, como se describió anteriormente en otras partículas pequeñas y porosas [117,118]. Además, se podría esperar mejorar aún más el direccionamiento pulmonar optimizando las condiciones de administración. Por ejemplo, la retención traqueal podría minimizarse seleccionando el dispositivo de aerosolización adecuado [222,223]. De todos modos, la cantidad de formulación capaz de llegar a la zona objetivo en los pulmones es similar a los datos reportados anteriormente, que describen nanoesferas de diferente naturaleza mediante administración intratraqueal (aprox. 3-13.5% de nanoesferas de ácido poliláctico-coglicólico en cobayas) [222].

Además, cuando se considera la dosis alta a lo largo del tiempo, la proporción de NPs MIL-100 tanto en la tráquea como en las diferentes secciones de pulmón se reduce de 1.60 a 0.93 $mg \cdot g^{-1}$, a 30 min y 24 h, respectivamente; correspondiéndose a ∼7% de la formulación administrada (Figura 32). Esto podría estar asociado con la eliminación de NPs MIL-100 en otros órganos responsables de la eliminación de compuestos exógenos. De hecho, se detecta un 0.5% de la dosis administrada en hígado, riñones y bazo, confirmando la bioeliminación de las nanoMOFs (Figura 33). En efecto, la cantidad de NPs MIL-100 detectada en estos órganos aumenta con el tiempo, especialmente en hígado y riñón, confirmando la movilización de las partículas (en hígado: de 0.61 ± 0.17% a 2.68 ± 0.68%, en riñones: de 0.23 ± 0.17% a 0.59 ± 0.31%, y en bazo: de 0.09 ± 0.17% a 0.11 ± 0.9%).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

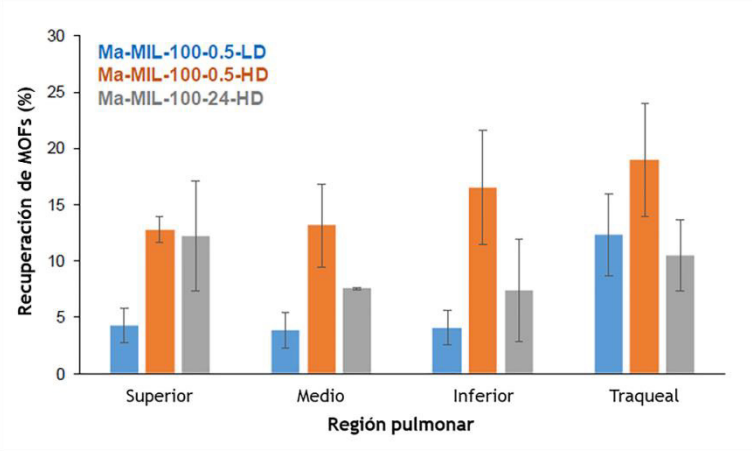


Figura 32. Concentración del ligando H_3BTC (%) en diferentes regiones pulmonares (superior, medio e inferior) del pulmón derecho y tráquea encontradas en los diferentes grupos en donde se administró: Ma-MIL-100-0.5-LD, Ma-MIL-100-0.5-HD y Ma-MIL-100-24-HD. (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [195], ACS Appl. Mater. Interfaces. 12 (2020) 25676-25682. Copyright © 2020, American Chemical Society)

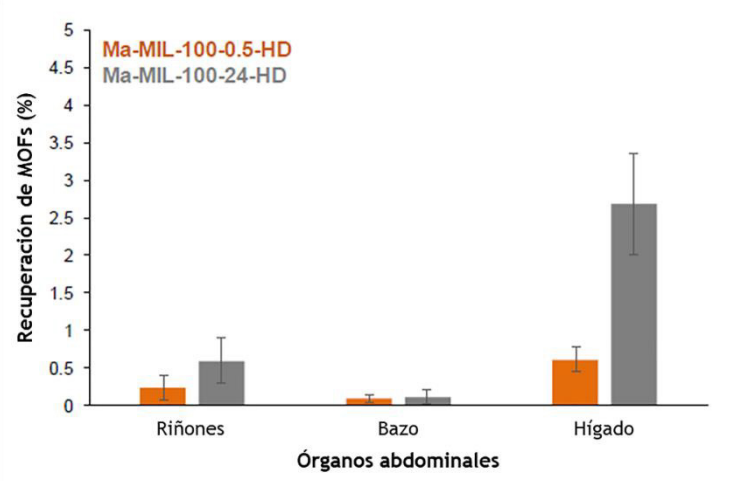


Figura 33. Concentración del ligando H_3BTC (%) en hígado, bazo y riñón tras la administración de Ma-MIL-100 MS para los dos grupos de animales administrados con altas dosis a 0.5 y 24 h (Ma-MIL-100-0.5-HD y Ma-MIL-100-24-HD). (Figura adaptada del trabajo de Fernández-Paz et al. [195], ACS Appl. Mater. Interfaces. 12 (2020) 25676-25682. Copyright © 2020, American Chemical Society)

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En la Figura 32, se puede observar que, cuando se administran dosis bajas (LD-8 mg; Ma-MIL-100-0.5-LD, barras azules), las Ma-MIL-100 MS se retienen en mayor porcentaje en la tráquea, con respecto al pulmón. En el área pulmonar, los porcentajes son más bajos y similares, independientemente de la región (lóbulo superior, medio e inferior). Además, el porcentaje del ligando encontrado después de 24 h de la administración de una dosis alta (HD-20 mg; Ma-MIL-100-24-HD, barras grises), muestra que las Ma-MIL-100 MS se encuentran en una cantidad notablemente más baja que la encontrada después de 30 min (Ma-MIL-100-0.5-HD, barras naranjas), independientemente de la región pulmonar o traqueal examinada, lo que confirma la eliminación de las NPs MIL-100 a medida en que pasa el tiempo. De hecho, en la Figura 33 también se observa que, a las 24 h (barras grises), hay una mayor presencia del nanoMOF en riñones, bazo e hígado, siendo más notable en éste último. Teniendo en cuenta que a las 24 h ha disminuido la cantidad de ligando en el tracto respiratorio y ha aumentado en los órganos de eliminación evaluados, se puede concluir que se produce la eliminación fisiológica de las MOFs en el organismo.

Estos resultados concuerdan además con otros estudios anteriores que confirmaron la biodegradación y bioeliminación de MOFs de carboxilato de hierro administradas por vía intravenosa, que fueron eliminadas vía heces y orina tras su acumulación en hígado, bazo y riñón [34]. Esto demuestra que las NPs MIL-100 se eliminan del cuerpo, evitando su acumulación y la posible toxicidad asociada a la sobrecarga de Fe.

Finalmente, cabe señalar que el Ma se bioelimina fácilmente del organismo. Es un diurético osmótico metabólicamente inerte y su eliminación ocurre naturalmente en humanos como un azúcar o un alcohol de azúcar. Como diurético, el Ma puede promover la excreción urinaria de materiales tóxicos y protege contra la nefrotoxicidad al prevenir la concentración de sustancias tóxicas [224].

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.5.2. Examen toxicológico

5.5.2.1. Determinación de interleucina-6 (IL-6)

La IL-6 es una citocina con actividad proinflamatoria pleiotrópica [225]. Estructuralmente, se trata de una glucoproteína secretada por células T, entre otras. Niveles elevados de esta molécula se asocian con procesos inflamatorios y trastornos inmunes. Por ello, resulta de gran interés su determinación (sección 4.6.2.1.) para comprobar la posible respuesta inflamatoria originada por las Ma-MIL-100 MS. Es interesante destacar que no se observó una producción de IL-6 significativa (datos no mostrados), corroborando la biocompatibilidad y la baja toxicidad del polvo administrado.

5.5.2.2. Estudio histopatológico de los pulmones

No se detectó embolia, ni ningún otro tipo de daño pulmonar mediante observación macroscópica de los pulmones extraídos (Figura 34), pero tampoco mediante análisis microscópico tisular (Figura 35). El examen histopatológico (sección 4.6.2.2.) mostró un parénquima completamente normal en los grupos testados, con presencia de alvéolos de pared delgada y ausencia de cualquier signo de inflamación (Figuras 30, 31 y 35).

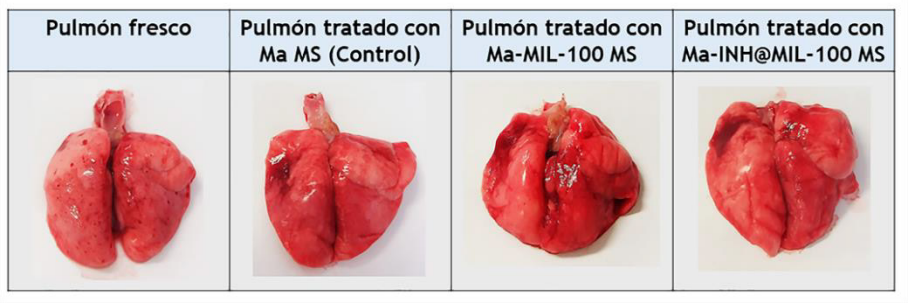


Figura 34. Fotos de pulmones recién extraídos de rata: sin tratar (primera columna) y de ratas tratadas con Ma MS (control), Ma-MIL-100 MS y Ma-INH@MIL-100 MS (columnas 2, 3 y 4, respectivamente). (Figura de nueva creación)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En la Figura 34 se observa que los pulmones tratados con Ma MS control, así como los tratados con las diferentes formulaciones (con/sin INH), presentan una apariencia idéntica al de los pulmones frescos (no tratados). Por lo tanto, no hay señal visible de trombos, necrosis o cualquier otro signo de toxicidad asociada a los sistemas, presentando un color y una apariencia normales. Además, los pulmones se analizaron a nivel tisular (Figura 35).

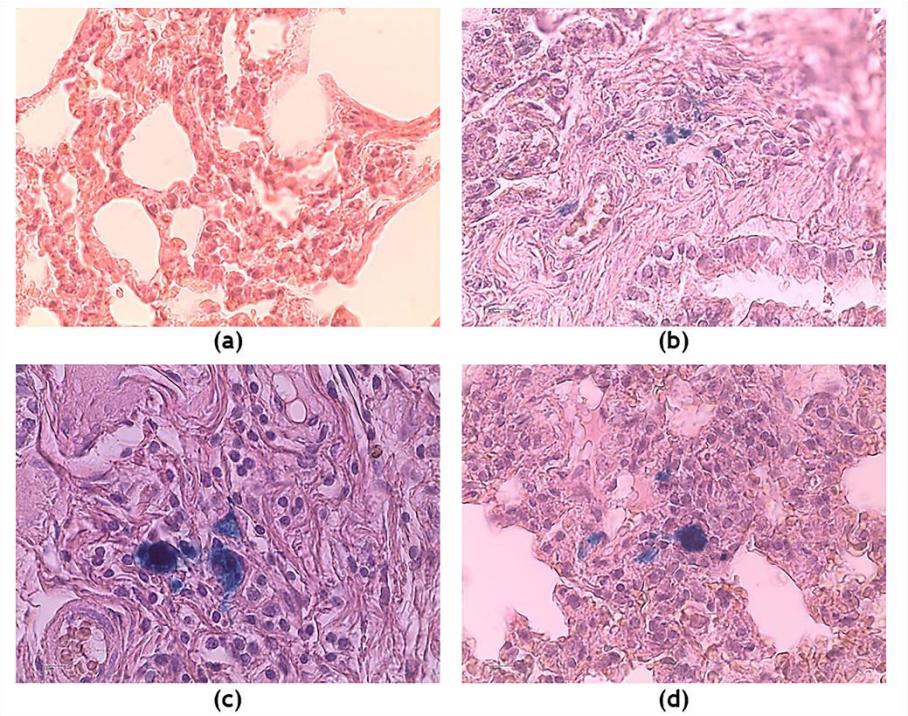


Figura 35. Fotos de cortes histológicos de pulmones de ratas tratadas con: (a) Ma MS 0.5 h (control), (b) Ma-MIL-100 MS 0.5 h, (c) Ma-INH@MIL-100 MS 0.5 h y (d) Ma-INH@MIL-100 MS 24 h. Escala: 10 µm. (Figura de nueva creación)

En la Figura 35, se compararon los tejidos tratados con: Ma MS 0.5 h (control), Ma-MIL-100 MS 0.5 h, (c) Ma-INH@MIL-100 MS 0.5 h y (d) Ma-INH@MIL-100 MS 24 h. En todos los casos, los resultados son coherentes con la ausencia de respuesta inflamatoria, como se demostró en el examen toxicológico de determinación de IL-6.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Estos buenos resultados son alentadores de cara al uso de polvos secos a base de MOFs con potencial aplicación en TB por vía pulmonar, pero es muy importante tener en cuenta una última apreciación. Previo al uso de estos sistemas, hay que considerar el grado de desarrollo de la TB pulmonar a tratar, ya que en el caso de una TB avanzada con presencia de fibrosis pulmonar, el tejido pulmonar puede ser fibrótico [226] y, por tanto, la función pulmonar normal verse afectada. Esta funcionalidad alterada hace que los macrófagos disminuyan la captación de Fe [227] y que la baja cantidad de hierro fagocitada se metabolice menos. Por consiguiente, se acumulan mayores cantidades de Fe en el pulmón. Este exceso de Fe aumenta la actividad de la prolil-hidroxilasa, una enzima importante involucrada en la síntesis [228] y maduración [229] del colágeno, lo que podría empeorar la enfermedad fibrótica. Los niveles elevados de Fe también pueden aumentar la proliferación de citocinas proinflamatorias. Por consiguiente, no es descartable que en estas circunstancias la fibrosis pulmonar pueda empeorar tras la administración de sistemas a base de Fe. Es por ello que las NPs MIL-100(Fe) parecen ser más interesantes en el tratamiento temprano de la TB.

Por lo tanto, y a la vista de los excelentes resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis, se allana el camino para la utilización de micro-nanosistemas a base de MOFs como plataformas eficientes para la administración de fármacos anti-TB por vía pulmonar para el tratamiento de TB sin fibrosis subyacente.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

6. CONCLUSIONES

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Conclusiones específicas

1. Se han desarrollado microsferas (MS) control utilizando una técnica de atomización y diferentes excipientes, siendo seleccionado el manitol (Ma) como el mejor excipiente para la microencapsulación de redes metal-orgánicas (MOFs).

2. El fármaco anti-tuberculoso de primera línea isoniazida (INH) se ha asociado de manera eficiente a las nanopartículas (NPs) MIL-100, obteniéndose elevadas cargas.

3. Las NPs MIL-100 cargadas o no con INH se han microencapsulado exitosamente en Ma MS mediante una sencilla técnica de atomización, obteniéndose polvos secos con potencial aplicación en inhalación.

4. La micro-nanoplataforma resultante ha presentado características morfológicas y aerodinámicas adecuadas para su administración por vía pulmonar y depósito en el pulmón profundo.

5. Las NPs MOFs se han liberado fácilmente desde las Ma MS en diferentes medios acuosos que simulan el fluido pulmonar, manteniendo sus tamaños en el rango nanométrico y sus potenciales ζ en valores negativos.

6. Las NPs MIL-100 e INH@MIL-100, y el excipiente Ma han demostrado *in vitro* una baja toxicidad en células epiteliales basales de adenocarcinoma alveolar humano (A549), siendo eficientemente internalizadas y localizándose en el citoplasma. Además, las formulaciones han demostrado biocompatibilidad *in vivo*, alcanzando de manera homogénea los bronquiolos y alvéolos del pulmón profundo.

7. Estos sistemas son candidatos prometedores para el tratamiento pulmonar de enfermedades infecciosas, siendo de interés para la tuberculosis (TB) pulmonar sin fibrosis subyacente.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Conclusión general

Ha sido posible diseñar y desarrollar una plataforma micro-nanoparticulada biocompatible basada en nanopartículas (NPs) de trimesato de hierro (III) mesoporoso MIL-100(Fe) microencapsuladas en microsferas de manitol (Ma MS), con potencial aplicación para el tratamiento local de la tuberculosis (TB) pulmonar. Esta plataforma es muy prometedora de cara a mejorar las perspectivas del tratamiento convencional. Por lo tanto, la exploración de los micro-nanosistemas basados en MOFs podría abrir un enorme campo de investigación de gran interés para futuros ensayos clínicos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7. PERSPECTIVAS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Las nanopartículas (NPs) de MIL-100(Fe) microencapsuladas en microsferas de manitol (Ma MS) han demostrado potencial interés para la administración inhalada de isoniazida (INH) en el tratamiento de tuberculosis (TB) pulmonar, por lo que se justifica la continuación de estudios posteriores. Éstos complementarían la información presentada en esta Tesis y fortalecerían las capacidades de este micro-nanosistema inhalable. Por ello, en la continuación de este trabajo, revestiría gran interés:

1. Microencapsular NPs MIL-100(Fe) cargadas simultáneamente con dos o más fármacos antituberculosos de primera línea, con el objetivo de realizar un tratamiento terapéutico más completo, favoreciendo el cumplimiento posológico por parte del paciente. Se propone la pirazinamida como segundo fármaco antituberculoso.

2. Estudiar en detalle la estabilidad de los polvos secos a lo largo del tiempo y teniendo en cuenta distintos factores como, por ejemplo, la humedad.

3. Caracterizar más profundamente las propiedades aerodinámicas de los polvos en cuanto a diámetro aerodinámico, siendo también de interés la evaluación *in vitro* de su distribución en el tracto respiratorio mediante un impactador en cascada Andersen. Este trabajo se podría realizar en colaboración con Ana Grenha (Universidad del Algarve).

4. Realizar ensayos *in vitro* en los que se pruebe la formulación en modelos de macrófagos no infectados y, posteriormente, en macrófagos infectados con *Mycobacterium tuberculosis*, para lo cual se necesitaría un laboratorio de nivel 3. Este trabajo se podría relizar en colaboración con el Prof. Camille Locht (Institut Pasteur de Lille, Francia). En este sentido, es importante testar la dosis requerida para matar las micobacterias, pero también el mecanismo de internalización exacto de las NPs MOFs en las células (A549, macrófagos, etc.), así como los receptores implicados en la mediación de la captación. Así, sería interesante utilizar la microscopía confocal para localizar los sistemas en los macrófagos.

5. Testar la eficacia terapéutica mediante la evaluación biológica *in vivo* en otro modelo animal adecuado (ejemplo, ratones BALB/c) infectados con *M. tuberculosis*, al que se le administre la formulación para matar las micobacterias. Este estudio es muy apropiado para

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

valorar de forma más precisa el potencial de las Ma-MIL-100 MS como portadores inhalables de INH y otros fármacos antituberculosos. Se podría realizar un estudio similar al realizado previamente por nuestro grupo de investigación [193], en colaboración con el Prof. Camille Locht (Institut Pasteur de Lille, Francia), especialista reconocido internacionalmente en TB.

6. Evaluar los perfiles de seguridad en TB concomitante con otras posibles enfermedades pulmonares (como, por ejemplo, asma, EPOC, deficiencia de alfa-1 antitripsina, etc.) sin fibrosis subyacente.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

8. BIBLIOGRAFÍA

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

[1] D.A. Scheinberg, J. Grimm, D.A. Heller, E.P. Stater, M. Bradbury, M.R. McDevitt, Advances in the clinical translation of nanotechnology, Curr. Opin. Biotechnol. 46 (2017) 66–73. doi:10.1016/j.copbio.2017.01.002.

[2] P. Horcajada, R. Gref, T. Baati, P.K. Allan, G. Maurin, P. Couvreur, G. Férey, R.E. Morris, C. Serre, Metal-organic frameworks in biomedicine, Chem. Rev. 112 (2012) 1232-1268. doi:10.1021/cr200256v.

[3] S. Rojas, A. Arenas-Vivo, P. Horcajada, Metal-organic frameworks: A novel platform for combined advanced therapies, Coord. Chem. Rev. 388 (2019) 202-226. doi:10.1016/j.ccr.2019.02.032.

[4] C.S. Diercks, M.J. Kalmutzki, N.J. Diercks, O.M. Yaghi, Conceptual advances from werner complexes to metal-organic frameworks, ACS Cent. Sci. 4 (2018) 1457-1464. doi:10.1021/acscentsci.8b00677.

[5] K.J. Barnham, A.I. Bush, Biological metals and metal-targeting compounds in major neurodegenerative diseases, Chem. Soc. Rev. 43 (2014) 6727–6749. doi: 10.1039/c4cs00138a.

[6] G. Férey, Hybrid porous solids: past, present, future, Chem. Soc. Rev. 37 (2008) 191–214. doi:10.1039/B618320B.

[7] C. Pettinari, F. Marchetti, N. Mosca, G. Tosi, A. Drozdov, Application of metal − organic frameworks, Polym. Int. 66 (2017) 731-744. doi:10.1002/pi.5315.

[8] Z. Zhang, Y. Zhao, Q. Gong, Z. Li, J. Li, MOFs for CO_2 capture and separation from flue gas mixtures: The effect of multifunctional sites on their adsorption capacity and selectivity, Chem. Commun. 49 2013 653–661. doi:10.1039/c2cc35561b.

[9] V. Pascanu, G. González Miera, A.K. Inge, B. Martín-Matute, Metal-Organic Frameworks as catalysts for organic synthesis: A

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

critical perspective, J. Am. Chem. Soc. 141 2019 7223–7234. doi:10.1021/jacs.9b00733.

[10] S. Vilela, T. Devic, A. Varez, F. Salles, P.A. Horcajada, New proton-conducting bi-carboxylate framework, Dalt. Trans. 48 (2019) 11181–11185. doi:10.1039/c9dt02009h.

[11] D. Madden, R. Babu, C. Camur, N. Rampal, J. Silvestre-Albero, T. Curtin, D. Fairen-Jimenez, Monolithic Metal-Organic Frameworks for carbon dioxide separation, Faraday Discuss. 231 (2021) 51–65. doi:10.1039/d1fd00017a.

[12] A.A. García-Valdivia, S. Pérez-Yáñez, J.A. García, B. Fernández, J. Cepeda, A. Rodríguez-Diéguez, Magnetic and photoluminescent sensors based on metal-organic frameworks built up from 2-aminoisonicotinate, Sci. Rep. 10 (2020) 1–17. doi:10.1038/s41598-020-65687-6.

[13] N. Manousi, G. Zachariadis, E. Deliyanni, V. Samanidou, Applications of metal-organic frameworks in food sample preparation, Mol. 23 (2018) 2896. doi:10.3390/molecules23112896.

[14] S. Rojas, P. Horcajada, Metal−Organic Frameworks for the removal of emerging organic contaminants in water, Chem. Rev. 120 (2020) 8378−8415. doi:10.1021/acs.chemrev.9b00797.

[15] P. Horcajada, C. Serre, M. Vallet-Regi, M. Sebban, F. Taulelle, G. Ferey, Metal-organic frameworks as efficient materials for drug delivery, Angew. Chem. Int. Ed. 45 (2006) 5974–5978. doi:10.1002/ange.200601878.

[16] P. Horcajada, T. Chalati, C. Serre, B. Gillet, C. Sebrie, T. Baati, J.F. Eubank, D. Heurtaux, P. Clayette, C. Kreuz, J.-S. Chang, Y.K. Hwang, V. Marsaud, P.-N. Bories, L. Cynober, S. Gil, G. Férey, P. Couvreur, R. Gref, Porous metal-organic-framework nanoscale carriers as a potential platform for drug delivery and imaging, Nat. Mater. 9 (2010) 172-178. doi:10.1038/nmat2608.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[17] S. Rojas, T. Devic, P. Horcajada, Metal organic frameworks based on bioactive components, J. Mater. Chem. B: Mater. Biol. Med. 5 (2017) 2560-2573. doi:10.1039/c6tb03217f.

[18] H. Cai, Y.-L. Huang, D. Li, Biological metal-organic frameworks: Structures, host-guest chemistry and bio-applications, Coord. Chem. Rev. 378 (2019) 207-221. doi:10.1016/j.ccr.2017.12.003.

[19] J. An, O.K. Farha, J.T. Hupp, E. Pohl, J.I. Yeh, N.L. Rosi, Metal-adeninate vertices for the construction of an exceptionally porous metal-organic framework, Nat. Commun. 3 (2012) 604. doi:10.1038/ncomms1618.

[20] M. Jurow, A. Varotto, V. Manichev, N.A. Travlou, D.A. Giannakoudakis, C.M. Drain, Self-organized nanostructured materials of alkylated phthalocyanines and underivatized C_{60} on ITO, RSC Adv. 3 (2013) 21360-21364. doi:10.1039/c3ra43795g.

[21] O.K. Farha, I. Eryazici, N.C. Jeong, B.G. Hauser, C.E. Wilmer, A.A. Sarjeant, R.Q. Snurr, SB. T. Nguyen, A.Ö. Yazaydın, J.T. Hupp, Metal-Organic Framework materials with ultrahigh surface areas: Is the sky the limit? J. Am. Chem. Soc. 134 (2012) 15016–15021. doi:10.1021/ja3055639.

[22] S.L. Griffin, N.R. Champness, A periodic table of metal-organic frameworks, Coord. Chem. Rev. 414 (2020) 213295. doi:10.1016/j.ccr.2020.213295.

[23] Q. Xing, Y. Pan, Y. Hu, L. Wang, Review of the biomolecular modification of the Metal-Organ-Framework, Front. Chem. 8 (2020) 642. doi:10.3389/fchem.2020.00642.

[24] A.C. McKinlay, R.E. Morris, P. Horcajada, G. Ferey, R. Gref, P. Couvreur, C. Serre, BioMOFs: Metal-organic frameworks for biological and medical applications, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 49 (2010) 6260-6266. doi:10.1002/anie.201000048.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[25] T. Simon-Yarza, A. Mielcarek, P. Couvreur, C. Serre, Nanoparticles of metal-organic frameworks: On the road to in vivo efficacy in biomedicine, Adv. Mater. 30 (2018) 1707365. doi:10.1002/adma.201707365.

[26] M.-X. Wu, Y.-W. Yang, Metal-organic framework (MOF)-based drug/cargo delivery and cancer therapy, Adv. Mater. 29 (2017) 1606134. doi:10.1002/adma.201606134.

[27] D. Giliopoulos, A. Zamboulis, D. Giannakoudakis, D. Bikiaris, K. Triantafyllidis, Polymer/metal organic framework (MOF) nanocomposites for biomedical applications, Mol. 25 (2020) 185. doi:10.3390/molecules25010185.

[28] S. Keskin, S. Kizilel, Biomedical applications of metal organic frameworks, Ind. Eng. Chem. Res. 50 (2011) 1799-1812. doi:10.1021/ie101312k.

[29] K.M.L. Taylor-Pashow, J.D. Rocca, R.C. Huxford, W. Lin, Hybrid nanomaterials for biomedical applications, Chem. Commun. 46 (2010) 5832-5849. doi:10.1039/c002073g.

[30] H.D. Lawson, S.P. Walton, C. Chan, Metal−organic frameworks for drug delivery: A design perspective, ACS Appl. Mater. Interfaces 13 (2021) 7004-7020. doi:10.1021/acsami.1c01089.

[31] A. Botet-Carreras, C. Tamames-Tabar, F. Salles, S. Rojas, E. Imbuluzqueta, H. Lana, M.J. Blanco-Prieto, P. Horcajada, Improving the genistein oral bioavailability via its formulation into the metal–organic framework MIL-100(Fe), J. Mater. Chem. B. 9 (2021) 2233-2239. doi:10.1039/d0tb02804e.

[32] C. Doonan, R. Riccò, K. Liang, D. Bradshaw, P. Falcaro, Metal-organic frameworks at the biointerface: Synthetic strategies and applications, Acc. Chem. Res. 50 (2017) 1423-1432. doi:10.1021/acs.accounts.7b00090.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[33] M.J. Velásquez-Hernández, E. Astria, S. Winkler, W. Liang, H. Wiltsche, A. Poddar, R. Shukla, G. Prestwich, J. Paderi, P. Salcedo-Abraira, H. Amenitsch, P. Horcajada, C.J. Doonan, P. Falcaro, Modulation of metal-azolate frameworks for the tunable release of encapsulated glycosaminoglycans, Chem. Sci. 11 (2020) 10835-10843. doi:10.1039/d0sc01204a.

[34] T. Baati, L. Njim, F. Neffati, A. Kerkeni, M. Bouttemi, R. Gref, M.F. Najjar, A. Zakhama, P. Couvreur, C. Serre, P. Horcajada, In depth analysis of the in vivo toxicity of nanoparticles of porous iron (III) metal-organic frameworks, Chem. Sci. 4 (2013) 1597-1607. doi:10.1039/c3sc22116d.

[35] V. Agostoni, R. Anand, S. Monti, S. Hall, G. Maurin, P. Horcajada, C. Serre, K. Bouchemala, R. Gref, Impact of phosphorylation on the encapsulation of nucleoside analogues within porous iron(III) metal-organic framework MIL-100(Fe) nanoparticles, J. Mat. Chem. B. 1 (2013) 4231-4242. doi:10.1039/c3tb20653j.

[36] T. Chalati, P. Horcajada, P. Couvreur, C. Serre, M.B. Yahia, G. Maurin, R. Gref, Porous metal organic framework nanoparticles to address the challenges related to busulfan encapsulation, Nanomed. 6 (2011) 1683-1695. doi:10.2217/nnm.11.69.

[37] A. García-Márquez, T. Hidalgo, H. Lana, D. Cunha, M.J. Blanco-Prieto, C. Álvarez-Lorenzo, C. Boissièred, C. Sánchez, C. Serre, P. Horcajada, Biocompatible polymer-metal-organic framework composite patches for the cutaneous administration of cosmetic molecules, J. Mater. Chem. B. 4 (2016) 7031-7040. doi:10.1039/C6TB01652A.

[38] S. Mallakpour, E. Nikkhoo, C.M. Hussain, Application of MOF materials as drug delivery systems for cancer therapy and dermal treatment, Coordination Chem. Rev. 451 (2022) 214262. doi:10.1016/j.ccr.2021.214262.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[39] A. Ringaci, A.V. Yaremenko, K.G. Shevchenko, S.D. Zvereva, M.P. Nikitin, Metal-organic frameworks for simultaneous gene and small molecule delivery in vitro and in vivo, Chem. Eng. J. 418 (2021) 129386. doi:10.1016/j.cej.2021.129386.

[40] Q. Chen, M. Xu, W. Zheng, T. Xu, H. Deng, J. Liu, Se/Ru-decorated porous metal-organic framework nanoparticles for the delivery of pooled siRNAs to reversing multidrug resistance in taxol-resistant breast cancer cells, ACS Appl. Mater. Interfaces 9 (2017) 6712-6724. doi:10.1021/acsami.6b12792.

[41] C. He, K. Lu, D. Liu, W. Lin, Nanoscale metal-organic frameworks for the co-delivery of cisplatin and pooled siRNAs to enhance therapeutic efficacy in drug-resistant ovarian cancer cells, J. Am. Chem. Soc. 136 (2014) 5181-5184. doi:10.1021/ja4098862.

[42] Y. Li, K. Zhang, P. Liu, M. Chen, Y. Zhong, Q. Ye, M.Q. Wei, H. Zhao, Z. Tang, Encapsulation of plasmid DNA by nanoscale metal−organic frameworks for efficient gene transportation and expression, Adv. Mater. 31 (2019) 1901570. doi:10.1002/adma.201901570.

[43] P.-H. Tong, L. Zhu, Y. Zang, J. Li, X.-P. He, T.D. James, Metal-Organic frameworks (MOFs) as host materials for the enhanced delivery of biomacromolecular therapeutics, Chem. Commun. 57 (2021) 12098–12110. doi:10.1039/d1cc05157a.

[44] T. Hidalgo, M. Alonso-Nocelo, B.L. Bouzo, S. Reimondez-Troitiño, C. Abuin-Redondo, M. de la Fuente, P. Horcajada, Biocompatible iron(iii) carboxylate metal-organic frameworks as promising RNA nanocarriers, Nanoscale. 12 (2020) 4839–4845. doi:10.1039/c9nr08127e.

[45] G. Cheng, W. Li, L. Ha, X. Han, S. Hao, Y. Wan, Z. Wang, F. Dong, X. Zou, Y. Mao, S.-Y. Zheng, Self-assembly of extracellular vesicle-like metal−organic framework nanoparticles for protection and

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

intracellular delivery of biofunctional proteins, J. Am. Chem. Soc. 140 (2018) 7282-7291. doi:10.1021/jacs.8b03584.

[46] L. Ding, X. Lin, Z. Lin, Y. Wu, X. Liu, J. Liu, M. Wu, X. Zhang, Y. Zeng, Cancer cell-targeted photosensitizer and therapeutic protein co-delivery nanoplatform based on a metal-organic framework for enhanced synergistic photodynamic and protein therapy, ACS Appl. Mater. Interfaces 12 (2020) 36906-36916. doi:10.1021/acsami.0c09657.

[47] Y. Zhou, L. Liu, Y. Cao, S. Yu, C. He, X. Chen, A nanocomposite vehicle based on metal-organic framework nanoparticle incorporated biodegradable microspheres for enhanced oral insulin delivery, ACS Appl. Mater. Interfaces 12 (2020) 22581-22592. doi:10.1021/acsami.0c04303.

[48] X.-X. Yang, P. Feng, J. Cao, W. Liu, Y. Tang, Composition-engineered metal-organic framework-based microneedles for glucose-mediated transdermal insulin delivery, ACS Appl. Mater. Interfaces 12 (2020) 13613-13621. doi:10.1021/acsami.9b20774.

[49] M.A. Luzuriaga, R.P. Welch, M. Dharmarwardana, C.E. Benjamin, S. Li, A. Shahrivarkevishahi, S. Popal, L.H. Tuong, C.T. Creswell, J.J. Gassensmith, Enhanced stability and controlled delivery of MOF-encapsulated vaccines and their immunogenic response in vivo, ACS Appl. Mater. Interfaces 11 (2019) 9740-9746. doi:10.1021/acsami.8b20504.

[50] M.J. Neufeld, A. Lutzke, W.M. Jones, M.M. Reynolds, Nitric oxide generation from endogenous substrates using metal-organic frameworks: Inclusion within poly(vinyl alcohol) membranes to investigate reactivity and therapeutic potential, ACS Appl. Mater. Interfaces 9 (2017) 35628-35641. doi:10.1021/acsami.7b11846.

[51] X. Zhang, Y. Wang, J. Liu, J. Shi, D. Mao, A.C. Midgley, X. Leng, D. Kong, Z. Wang, B. Liu, S. Wang, A metal-organic-framework incorporated vascular graft for sustained nitric oxide

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

generation and long-term vascular patency, Chem. Eng. J. 421 (2021) 129577. doi:10.1016/j.cej.2021.129577.

[52] J. Chen, D. Sheng, T. Ying, H. Zhao, J. Zhang, Y. Li, H. Xu, S. Chen, MOFs-based nitric oxide therapy for tendon regeneration, Nano-Micro Lett. 13 (2021) 1-17. doi:10.1007/s40820-020-00542-x.

[53] Y. Zhou, T. Yang, K. Liang, R. Chandrawati, Metal-organic frameworks for therapeutic gas delivery, Adv. Drug Deliv. Rev. 171 (2021) 199-214. doi:10.1016/j.addr.2021.02.005.

[54] S. Rojas, N. Guillou, P. Horcajada, Ti-based nanoMOF as an efficient oral therapeutic agent, ACS Appl. Mater. Interfaces 11 (2019) 22188-22193. doi:10.1021/acsami.9b06472.

[55] B.A. Howell, A. Chauhan, Current and emerging detoxification therapies for critical care, Mater. 3 (2010) 2483-2505. doi:10.3390/ma3042483.

[56] X. Li, Z. Cai, L.-P. Jiang, Z. He, J.-J. Zhu, Metal−ligand coordination nanomaterials for biomedical imaging, Bioconjug. Chem. 31 (2020) 332-339. doi:10.1021/acs.bioconjchem.9b00642.

[57] S. Beg, M. Rahman, A. Jain, S. Saini, P. Midoux,; C. Pichon, F.J. Ahmad, S. Akhter, Nanoporous metal organic frameworks as hybrid polymer-metal composites for drug delivery and biomedical applications, Drug Discov. Today 22 (2017) 625-637. doi:10.1016/j.drudis.2016.10.001.

[58] M.A. Chowdhury, Metal-organic-frameworks for biomedical applications in drug delivery, and as MRI contrast agents, J. Biomed. Mater. Res. Part A. 105 (2017) 1184-1194. doi:10.1002/jbm.a.35995.

[59] P. Cao, X. Wu, W. Zhang, L. Zhao, W. Sun, Z. Tang, Killing oral bacteria using metal−organic frameworks, Ind. Eng. Chem. Res. 59 (2020) 1559-1567. doi:10.1021/acs.iecr.9b05659.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[60] H. Pham, K. Ramos, A. Sua, J. Acuna, K. Slowinska, T. Nguyen, A. Bui, M.D.R. Weber, F. Tian, Tuning crystal structures of iron-based metal-organic frameworks for drug delivery applications, ACS Omega. 5 (2020) 3418-3427. doi:10.1021/acsomega.9b03696.

[61] X. Liu, Y. Zhou, J. Zhang, L. Tang, L. Luo, G. Zeng, Iron containing metal-organic frameworks: Structure, synthesis, and applications in environmental remediation, ACS Appl. Mater. Interfaces. 9 (2017) 20255-20275. doi.org/10.1021/acsami.7b02563.

[62] A. García-Márquez, A. Demessence, A.E. Platero-Prats, D. Heurtaux, P. Horcajada, C. Serre, J.-S. Chang, G. Férey, V.A. de la Peña-O'Shea, C. Boissière, D. Grosso, C. Sanchez, Green microwave synthesis of MIL-100(Al, Cr, Fe) nanoparticles for thin-film elaboration, Eur. J. Inorg. Chem. (2012) 5165-5174. doi:10.1002/ejic.201200710.

[63] P. Horcajada, S. Surblé, C. Serre, D.Y. Hong, Y.K. Seo, J.S. Chang, J.M. Grenèche, I. Margiolaki, G. Férey, Synthesis and catalytic properties of MIL-100(Fe), an iron(III) carboxylate with large pores, Chem. Commun. 27 (2007) 2820–2822. doi:10.1039/b704325b.

[64] E. Binaeian, N. Motaghedi, S. Maleki, M. Arjmandi, Ibuprofen uptake through dimethyl ethylenediamine modified MOF: Optimization of the adsorption process by response surface methodology technique, J. Dispers. Sci. Technol. (2020) 1-14. doi:10.1080/01932691.2020.1810696.

[65] W.H. Chen, O. Karmi, B. Willner, R. Nechushtai, I. Willner, Thrombin aptamer-modified metal−organic framework nanoparticles: Functional nanostructures for sensing thrombin and the triggered controlled release of anti-blood clotting drugs, Sens. 19 (2019) 5260. doi:10.3390/s19235260.

[66] W.-H. Chen, X. Yu, A. Cecconello, Y.S. Sohn, R. Nechushtai, I. Willner, Stimuli-responsive nucleic acid-functionalized metal−organic

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

framework nanoparticles using pH- and metal-ion-dependent DNAzymes as locks, Chem. Sci. 8 (2017) 5769-5780. doi:10.1039/c7sc01765k.

[67] W.H. Chen, G.F. Luo, Y.S. Sohn, R. Nechushtai, I. Willner, Enzyme-driven release of loads from nucleic acid−capped metal−organic framework nanoparticles, Adv. Funct. Mater. 29 (2019) 1805341. doi:10.1002/adfm.201805341.

[68] W.H. Chen, W.C. Liao, Y.S. Sohn, M. Fadeev, A. Cecconello, R. Nechushtai, I. Willner, Stimuli-responsive nucleic acid-based polyacrylamide hydrogel-coated metal−organic framework nanoparticles for controlled drug release, Adv. Funct. Mater. 28 (2018) 1705137. doi:10.1002/adfm.201705137.

[69] W.H. Chen, S. Yang Sung, M. Fadeev, A. Cecconello, R. Nechushtai, I. Willner, Targeted VEGF-triggered release of an anti-cancer drug from aptamer-functionalized metal-organic framework nanoparticles, Nanoscale. 10 (2018) 4650-4657. doi:10.1039/c8nr00193f.

[70] W.H. Chen, X. Yu, W.C. Liao, Y.S. Sohn, A. Cecconello, A. Kozell, R. Nechushtai, I. Willner, ATP-responsive aptamer-based metal−organic framework nanoparticles (NMOFs) for the controlled release of loads and drugs, Adv. Funct. Mater. 27 (2017) 1702102. doi:10.1002/adfm.201702102.

[71] H. Zheng, Y. Zhang, L. Liu, W. Wan, P. Guo, A.M. Nyström, X. Zou, One-pot synthesis of metal−organic frameworks with encapsulated target molecules and their applications for controlled drug delivery, J. Am. Chem. Soc. 138 (2016) 962-968. doi:10.1021/jacs.5b11720.

[72] C. Carrillo-Carrión, R. Martínez, M.F. Navarro Poupard, B. Pelaz, E. Polo, A. Arenas-Vivo, A. Olgiati, P. Taboada, M.G. Soliman, Ú. Catalán, S. Fernández-Castillejo, R. Solà, W.J. Parak, P. Horcajada, R.A. Alvarez-Puebla, P. Del Pino, Aqueous stable gold

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

nanostar/ZIF-8 nanocomposites for light-triggered release of active cargo inside living cells, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 58 (2019) 7078–7082. doi:10.1002/anie.201902817.

[73] J. An, S.J. Geib, N.L. Rosi, Cation-triggered drug release from a porous zinc-adeninate metal-organic framework, J. Am. Chem. Soc. 131 (2009) 8376-8377. doi:10.1021/ja902972w.

[74] B. Lei, M. Wang, Z. Jiang, W. Qi, R. Su, Z. He, Constructing redox-responsive metal−organic framework nanocarriers for anticancer drug delivery, ACS Appl. Mater. Interfaces. 10 (2018) 16698-16706. doi:10.1021/acsami.7b19693.

[75] X. Yang, Q. Tang, Y. Jiang, M. Zhang, M. Wang, L. Mao, Nanoscale ATP-responsive zeolitic imidazole framework-90 as a general platform for cytosolic protein delivery and genome editing, J. Am. Chem. Soc. 141 (2019) 3782-3786. doi:10.1021/jacs.8b11996.

[76] J.W. Brown, B.L. Henderson, M.D. Kiesz, A.C. Whalley, W. Morris, S. Grunder, H. Deng, H. Furukawa, J.I. Zink, J.F. Stoddart, O.M. Yaghi, Photophysical pore control in an azobenzene-containing metal-organic framework, Chem. Sci. 4 (2013) 2858-2864. doi:10.1039/c3sc21659d.

[77] Y. Wang, J. Yan, N. Wen, H. Xiong, S. Cai, Q. He, Y. Hu, D. Peng, Z. Liu, Y. Liu, Metal-organic frameworks for stimuli-responsive drug delivery, Biomater. 230 (2020) 119619. doi:10.1016/j.biomaterials.2019.119619.

[78] T. Simon-Yarza, T. Baati, F. Neffati, L. Njim, P. Couvreur, C. Serre, R. Gref, M.F. Najjar, A. Zakhama, P. Horcajada, In vivo behavior of MIL-100 nanoparticles at early times after intravenous administration, Int. J. Pharm. 511 (2016) 1042-1047. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.08.010.

[79] T. Chalati, P. Horcajada, R. Gref, P. Couvreur, C. Serre, Optimization of the synthesis of MOF nanoparticles made of flexible

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

porous iron fumarate MIL-88A, J. Mater. Chem. 21 (2011) 2220-2227. doi:10.1039/C0JM03563G.

[80] E. Bellido, T. Hidalgo, M.V. Lozano, M. Guillevic, R. Simón-Vázquez, M.J. Santander-Ortega, Á. González-Fernández, C. Serre, M.J. Alonso, P. Horcajada, Heparin-engineered mesoporous iron metal-organic framework nanoparticles: Toward stealth drug nanocarriers, Adv. Healthc. Mater. 4 (2015) 1246-1257. doi:10.1002/adhm.201400755.

[81] M. Giménez-Marqués, E. Bellido, T. Berthelot, T. Simón-Yarza, T. Hidalgo, R. Simón-Vázquez, Á. González-Fernández, J. Avila, M. Carmen Asensio, R. Gref, P. Couvreur, C. Serre, P. Horcajada, Graftfast surface engineering to improve MOF nanoparticles furtiveness, 2018, 14(40), 1801900. doi:10.1002/smll.201801900.

[82] T. Simón-Yarza, M. Giménez-Marqués, R. Mrimi, A. Mielcarek, R. Gref, P. Horcajada, C. Serre, P. Couvreur, A smart metal-organic framework nanomaterial for lung targeting, Angewandte Chem. Int. Ed. 56 (2017) 15565-15569. doi:10.1002/ange.201707346.

[83] M. Nazari, M. Rubio-Martinez, G. Tobias, J. Pérez Barrio, R. Babarao, F. Nazari, K. Konstas, B.W. Muir, S.F. Collins, A.J. Hill, M.C. Duke, M.R. Hill, Metal-organic-framework-coated optical fibers as light-triggered drug delivery vehicles, Adv. Funct. Mater. 26 (2016) 3244-3249. doi:10.1002/adfm.201505260.

[84] W. Shang, L. Peng, P. Guo, H. Hui, X. Yang, J. Tian, Metal-organic frameworks as a theranostic nanoplatform for combinatorial chemophotothermal therapy adapted to different administration, ACS Biomater. Sci. Eng. 6 (2019) 1008-1016. doi:10.1021/acsbiomaterials.9b01075.

[85] S. Rojas, I. Colinet, D. Cunha, T. Hidalgo, F. Salles, C. Serre, N. Guillou, P. Horcajada, Toward understanding drug incorporation and delivery from biocompatible metal-organic frameworks in view of

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

cutaneous administration, ACS Omega. 3 (2018) 2994-3003. doi:10.1021/acsomega.8b00185.

[86] S.D. Taherzade, S. Rojas, J. Soleimannejad, P. Horcajada, Combined cutaneous therapy using biocompatible metal-organic frameworks, Nanomater. 10 (2020) 2296. doi:10.3390/nano10122296.

[87] M. Kubovics, S. Rojas, A.M. Lopez, J. Fraile, P. Horcajada, C. Domingo, Fully supercritical CO_2 preparation of a nanostructured MOF composite with applications in cutaneous drug delivery, J. Supercrit. Fluids. 178 (2021) 105379–105390. doi:10.1016/j.supflu.2021.105379.

[88] S. Rojas, P. Horcajada, Understanding the incorporation and release of salicylic acid in metal-organic frameworks for topical administration, Eur. J. Inorg. Chem. 2021 (2021) 1325-1331. doi:10.1002/ejic.202001134.

[89] J. Águila-Rosas, T. Quirino-Barreda, G. Leiva-Gómez, E. González-Zamora, I.A. Ibarra, E. Lima, Sulfadiazine hosted in MIL-53(Al) as a biocide topical delivery system, RSC Adv. 10 (2020) 25645-25651. doi:10.1039/d0ra03636f.

[90] K. Gwon, I. Han, S. Lee, Y. Kim, D.N. Lee, Novel metal−organic framework-based photocrosslinked hydrogel system for efficient antibacterial applications, ACS Appl. Mater. Interfaces. 12 (2020) 20234-20242. doi:10.1021/acsami.0c03187.

[91] J.H. Jo, H.-C. Kim, S. Huh, Y. Kim, D.N. Lee, Antibacterial activities of Cu-MOFs containing glutarates and bipyridyl ligands, Dalton Trans. 48 (2019) 8084-8093. doi:10.1039/c9dt00791a.

[92] L. Li, S. Han, S. Zhao, X. Li, B. Liu, Y. Liu, Chitosan modified metal–organic frameworks as a promising carrier for oral drug delivery, RSC Adv. 10 (2020) 45130-45138. doi:10.1039/d0ra08459j.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[93] S. Javanbakht, A. Hemmati, H. Namazi , A. Heydari, Carboxymethylcellulose-coated 5-fluorouracil@MOF-5 nano-hybrid as a bio-nanocomposite carrier for the anticancer oral delivery, Int. J. Biol. Macromol. 155 (2020) 876-882. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.12.007.

[94] T. Hidalgo, M. Giménez-Marqués, E. Bellido, J. Avila, M.C. Asensio, F. Salles, M.V. Lozano, M. Guillevic, R. Simón-Vázquez, A. González-Fernández, C. Serre, M.J. Alonso, P. Horcajada, Chitosan-coated mesoporous MIL-100(Fe) nanoparticles as improved bio-compatible oral nanocarriers, Sci. Rep. 7 (2017) 43099-43113. doi.10.1038/srep43099.

[95] P.K. Dutta, J. Dutta, V.S. Tripathi, Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications, J. Sci. Ind. Res. 63 (2004) 20-31.

[96] Y. Wang, W. Lin, S. Yu, X. Huang, X. Lang, Q. He, L. Gao, H. Zhu, J. Chen, A biocompatible Zr-based metal-organic framework UiO-66-PDC as an oral drug carrier for pH-response release, J. Solid State Chem. 293 (2021) 121805. doi:10.1016/j.jssc.2020.121805.

[97] X. Huang, S. Yu, W. Lin, Y. Wang, Q. He, J. Zheng, H. Zhu, J. Chen, A biocompatible Y-based metal-organic framework based on nitrogen heterocycle as a pH-responsive oral drug carrier, J. Mol. Struct. 1236 (2021) 130351. doi:10.1016/j.molstruc.2021.130351.

[98] B.M.A. Silva, A.F. Borges, C. Silva, J.F.J. Coelho, S. Simões, Mucoadhesive oral films: The potential for unmet needs, Int. J. Pharm. 494 (2015) 537-551. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.08.038.

[99] H. Landová, Z. Daněk, J. Gajdziok, D. Vetchý, J. Štembírek, Mucoadhesive films as perspective oral dosage form, Czech Slovak Pharm. 62 (2013) 4-11.

[100] M. Preis, C. Woertz, P. Kleinebudde, J. Breitkreutz, Oromucosal film preparations: Classification and characterization

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

methods, Expert Opin. Drug Deliv. 10 (2013) 1303-1317. doi:10.1517/17425247.2013.804058.

[101] G.P. Andrews, T.P. Laverty, D.S. Jones, Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery, Eur. J. Pharm. Biopharm. 71 (2009) 505-518. doi:10.1016/j.ejpb.2008.09.028.

[102] R.P. Dixit, S.P. Puthli, Oral strip technology: Overview and future potential, J. Control. Release. 139 (2009) 94-107. doi:10.1016/j.jconrel.2009.06.014.

[103] Chansi, S. Upreti, Punya, J. Singh, M.P. Ghosh, T. Basu, Rapid electrochemical quantification for in vitro release trait of ophthalmic drug loaded within mucoadhesive metal organic framework (MOF), Chem. Sel. 6 (2021) 3006-3012. doi:10.1002/slct.202004558.

[104] S.-N. Kim, C.G. Park, B.K. Huh, S.H. Lee, C.H. Min, Y.Y. Lee, Y.K. Kim, K.H. Park, Y.B. Choy, Metal-organic frameworks, NH_2-MIL-88(Fe), as carriers for ophthalmic delivery of brimonidine, Acta Biomater. 79 (2018) 344-353. doi:10.1016/j.actbio.2018.08.023.

[105] J. Gandara-Loe, B.E. Souza, A. Missyul, G. Giraldo, J.-C. Tan, J. Silvestre-Albero, MOF-based polymeric nanocomposite films as potential materials for drug delivery devices in ocular therapeutics, ACS Appl. Mater. Interfaces. 12 (2020) 30189-30197. doi:10.1021/acsami.0c07517.

[106] N.Y. Chun, S.-N. Kim, Y.S. Choi, Y.B. Choy, PCN-223 as a drug carrier for potential treatment of colorectal cancer, J. Ind. Eng. Chem. 84 (2020) 290-296. doi:10.1016/j.jiec.2020.01.010.

[107] Q. Huang, E. Wang, W. Gu, W. Ma, Y. Zhou, Hyaluronan-coated meta-organic framework loaded with cisplatin and oleanolic acid for synergetic chemotherapy of colorectal cancer, J. Mater. Res. 35 (2020) 3106-3115. doi:10.1557/jmr.2019.311.

[108] I. Luz, I.E. Stewart, N.P. Mortensen, A.J. Hickey, Designing inhalable metal organic frameworks for pulmonary Tuberculosis

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

treatment and theragnostics via spray drying, Chem. Commun. 56 (2020) 13339-13342. doi:10.1039/d0cc05471b.

[109] Y. He, T. Xiong, S. He, H. Sun, C. Huang, X. Ren, L. Wu, L.H. Patterson, J. Zhang, Pulmonary targeting crosslinked cyclodextrin Metal–Organic Frameworks for lung cancer therapy, Adv. Funct. Mater. 31 (2021) 2004550. doi:10.1002/adfm.202004550.

[110] Y. Zhou, B. Niu, B. Wu, S. Luo, J. Fu, Y. Zhao, G. Quan, X. Pan, C. Wu, A homogenous nanoporous pulmonary drug delivery system based on metal-organic frameworks with fine aerosolization performance and good compatibility, Acta Pharm. Sin. B. 10 (2020) 2404-2416. doi:10.1016/j.apsb.2020.07.018.

[111] T.J. Manning, K. Wilkerson, T. Holder, A.C. Bartley, C. Jackson, S. Plummer, D. Phillips, L. Krajewski, G. Wylie, Pharmacokinetic studies of a three-component complex that repurposes the front line antibiotic isoniazid against Mycobacterium tuberculosis, Tuberc. 107 (2017) 149-155. doi:10.1016/j.tube.2017.08.011.

[112] O. Neyrolles, F. Wolschendorf, A. Mitra, M. Niederweis, Mycobacteria, metals, and the macrophage, Immunolog. Rev. 264 (2015) 249-263. doi:10.1111/imr.12265.

[113] R.A. Festa, M.E. Helsel, K.J. Franz, D.J. Thiele, Exploiting innate immune cell activation of a copper-dependent antimicrobial agent during infection, Chem. Biol. 21 (2014) 977-987. doi:10.1016/j.chembiol.2014.06.009.

[114] M.M. Bailey, E.M. Gorman, E.J. Munson, C. Berkland, Pure insulin nanoparticle agglomerates for pulmonary delivery, Langmuir. 24 (2008) 13614-13620. doi:10.1021/la802405p.

[115] C. Sinsuebpol, J. Chatchawalsaisin, P. Kulvanich, Preparation and in vivo absorption evaluation of spray dried powders containing salmon calcitonin loaded chitosan nanoparticles for pulmonary

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

delivery, Drug Des. Dev. Ther. 7 (2013) 861-873. doi:10.2147/dddt.s47681.

[116] E. Fernández-Paz, L. Feijoo-Siota, M.M. Gaspar, N. Csaba, C. Remuñán-López, Microencapsulated chitosan-based nanocapsules: A new platform for pulmonary gene delivery, Pharm. 13 (2021) 1377. doi:10.3390/pharmaceutics13091377.

[117] J. Weers, T. Tarara, The PulmoSphere^{TM} platform for pulmonary drug delivery, Ther. Deliv. 5 (2014) 277−295. doi:10.4155/tde.14.3.

[118] S. Gharse, J. Fiegel, Large porous hollow particles: Lightweight champions of pulmonary drug delivery, Curr. Pharm. Des. 22 (2016) 2463−2469. doi:10.2174/1381612822666160128145356.

[119] S. Al-Qadi, P. Taboada, C. Remuñán-López, Micro/nanostructured inhalable formulation based on polysaccharides: Effect of a thermoprotectant on powder properties and protein integrity, Int. J. Pharm. 551 (2018) 23-33. doi:10.1016/j.ijpharm.2018.08.049.

[120] G. Wyszogrodzka-Gaweł, P. Dorożyński, S. Giovagnoli, W. Strzempek, E. Pesta, W.P. Węglarz, B. Gil, E. Menaszek, P. Kulinowski, An inhalable theranostic system for local tuberculosis treatment containing an isoniazid loaded metal organic framework Fe-MIL-101-NH_2-from raw MOF to drug delivery system, Pharm. 11 (2019) 687-712. doi:10.3390/pharmaceutics11120687.

[121] N.R Labiris, M.B. Dolovich, Pulmonary drug delivery. Part I: Physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications, Br. J. Clin. Pharmacol. 56 (2003) 588−599. doi:10.1046/j.1365-2125.2003.01892.x.

[122] M. Ibrahim, R. Verma, L. Garcia-Contreras, Inhalation drug delivery devices: Technology update, Med. Devices: Evid. Res. 8 (2015) 131−139. doi:10.2147/MDER.S48888.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[123] S. Bhattacharyya, B. Sogali, Inhalation therapy - Approaches and challenges, Asian J. Pharm. Clin. Res. 11 (2018) 9−16. doi:10.22159/ajpcr.2018.v11i4.24117.

[124] A.G. Ogienko, E.G. Bogdanova, N.A. Trofimov, S.A. Myz, A.A. Ogienko, B.A. Kolesov, A.S. Yunoshev, N.V. Zubikov, A.Y. Manakov, V.V. Boldyrev, E.V. Boldyreva, Large porous particles for respiratory drug delivery. Glycine-based formulations, Eur. J. Pharm. Sci. 110 (2017) 148–156. doi:10.1016/j.ejps.2017.05.007.

[125] M.T. Newhouse, J. Strand, Tennis anyone? The lungs as a new court for systemic therapy, CMAJ. 161 (1999) 1287−1288.

[126] Y. Javadzadeh, S. Yaqoubi, Therapeutic nanostructures for pulmonary drug delivery. Nanostructures for drug delivery, Micro and Nano Technol. (2017) 619−638. doi:10.1016/B978-0-323-46143-6.00020-8.

[127] A. Kuzmov, T. Minko, Nanotechnology approaches for inhalation treatment of lung diseases, J. Control. Release. 219 (2015) 500−518. doi:10.1016/j.jconrel.2015.07.024.

[128] L. Knudsen, M. Ochs, The micromechanics of lung alveoli: Structure and function of surfactant and tissue components, Histochem. Cell Biol. 150 (2018) 661–676. doi:10.1007/s00418-018-1747-9.

[129] P.W. Davenport, A. Von Leupoldt, K. Wheeler-Hegland, I.M. Colrain, Frontiers in respiratory physiology - grand challenge, Front. Physiol. 1 (2010) 139-146. doi:10.3389/fphys.2010.00139.

[130] L. Feng, J. Delacoste, D. Smith, J. Weissbrot, E. Flagg, W.H. Moore, F. Girvin, R. Raad, P. Bhattacharji, D. Stoffel, D. Piccini, M. Stuber, D.K. Sodickson, R. Otazo, H. Chandarana, Simultaneous evaluation of lung anatomy and ventilation using 4D respiratory-motion-resolved ultrashort echo time sparse MRI, J. Magn. Reson. Imaging. 49 (2019) 411-422. doi:10.1002/jmri.26245.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[131] M.M. Swapnil, S.K. Sagar, A review on-pulmonary drug delivery system, World J. Pharm. Pharm. Sci. 10 (2021) 625-641. doi:10.17605/OSF.IO/29J6A.

[132] M. Ochs, J. Hegermann, E. Lopez-Rodriguez, S. Timm, G. Nouailles, J. Matuszak, S. Simmons, M. Witzenrath, W.M. Kuebler, On top of the alveolar epithelium: Surfactant and the glycocalyx, Int. J. Mol. Sci. 21 (2020) 3075. doi:10.3390/ijms21093075.

[133] B. Forbes, C. Ehrhardt, Human respiratory epithelial cell culture for drug delivery applications, Eur. J. Pharm. Biopharm. 60 (2005) 193-205. doi:10.1016/j.ejpb.2005.02.010.

[134] A. Ciechanowicz, Stem cells in lungs, Adv. Exp. Med. Biol. 2101 (2019) 261-274. doi:10.1007/978-3-030-31206-0_13.

[135] Q. Zhong, O.M. Merkel, J.J. Reineke, S.R.P. da Rocha, Effect of the route of administration and PEGylation of Poly(amidoamine) dendrimers on their systemic and lung cellular biodistribution, Mol. Pharm. 13 (2016) 1866-1878. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.6b00036.

[136] M. Kolinski, A. Plazinska, K. Jozwiak, Recent progress in understanding of structure, ligand interactions and the mechanism of activation of the β 2-adrenergic receptor, Curr. Med. Chem. 19 (2012) 1155-1163. doi:10.2174/092986712799320547.

[137] A.D. Alves, J.S. Cavaco, F. Guerreiro, J.P. Lourenço, A.M.R. da Costa, A. Grenha, Inhalable antitubercular therapy mediated by locust bean gum microparticles, Mol. 21 (2016) 702, doi:10.3390/molecules21060702.

[138] F. Palazzo, S. Giovagnoli, A. Schoubben, P. Blasi, C. Rossi, M. Ricci, Development of a spray-drying method for the formulation of respirable microparticles containing ofloxacin-palladium complex, Int. J. Pharm. 440 (2013) 273–282. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.05.045.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[139] A. Gupta, G. Pant, K. Mitra, J. Madan, M.K. Chourasia, A. Misra, Inhalable particles containing rapamycin for induction of autophagy in macrophages infected with mycobacterium tuberculosis, Mol. Pharm. 11 (2014) 1201–1207. doi: 10.1021/mp4006563.

[140] C. Bosquillon, V. Préat, R. Vanbever, Pulmonary delivery of growth hormone using dry powders and visualization of its local fate in rats, J. Control. Release. 96 (2004) 233–244. doi:10.1016/j.jconrel.2004.01.027.

[141] Y.-W. Lin, J. Wong, L. Qu, H.-K. Chan, Q.T. Zhou, Powder production and particle engineering for dry powder inhaler formulations, Curr. Pharm. Des. 21 (2015) 3902-3916. doi:10.2174/1381612821666150820111134.

[142] J. Heyder, Deposition of inhaled particles in the human respiratory tract and consequences for regional targeting in respiratory drug delivery, Proc. Am. Thorac. Soc. 1 (2004) 315-320. doi:10.1513/pats.200409-046TA.

[143] J. Brady Scott, R. Kaur, Monitoring breathing frequency, pattern, and effort, Respir. Care. 65 (2020) 793-806. doi:10.4187/respcare.07439.

[144] J. Weers, A. Clark, The impact of inspiratory flow rate on drug delivery to the lungs with dry powder inhalers, Pharm. Res. 34 (2017) 507-528. doi:10.1007/s11095-016-2050-x.

[145] S. Ren, M. Cai, Y. Shi, W. Xu, X. Douglas Zhang, Influence of bronchial diameter change on the airflow dynamics based on a pressure-controlled ventilation system, I. J. Numer. Methods Biomed. Eng. 34 (2017) 2929. doi:10.1002/cnm.2929.

[146] X.M. Bustamante-Marin, L.E. Ostrowski, Cilia and mucociliary clearance, Cold. Spring Harb. Perspect. Biol. 9 (2017) 028241. doi:10.1101/cshperspect.a028241.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[147] B.F. Pérez, G.A. Méndez, R.A. Lagos, M.S.L. Vargas, Dinámica y patología del barrido mucociliar como mecanismo defensivo del pulmón y alternativas farmacológicas de tratamiento, Rev. médica Chile. 142 (2014) 606−615.

[148] T.S. Wilkinson, J.-M. Sallenave, J. Simpson, Pulmonary defense mechanisms, Curr. Respir. Med. Rev. 8 (2012) 149-162. doi:10.2174/157339812800493322.

[149] M. Geiser, Update on macrophage clearance of inhaled micro- and nanoparticles, J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv. 23 (2010) 207-217. doi:10.1089/jamp.2009.0797.

[150] B. Patel, N. Gupta, F. Ahsan, Particle engineering to enhance or lessen uptake by alveolar macrophages and to influence therapeutic outcomes, Eur. J. Pharm. Biopharm. 89 (2015) 163-174. doi:10.1016/j.ejpb.2014.12.001.

[151] A. Grenha, B. Seijo, C. Remuñán-López, Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery, Eur. J. Pharm. Sci. 25 (2005) 427–437. doi:10.1016/j.ejps.2005.04.009.

[152] L.J. Smulan, N. Martinez, M.C. Kiritsy, C. Kativhu, K. Cavallo, C.M. Sassetti, A. Singhal, H.G. Remold, H. Kornfelda, Sirtuin 3 downregulation in Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages reprograms mitochondrial metabolism and promotes cell death, Am. Soc. Microbiol. 12 (2021) e03140–20. doi:10.1128/mBio.03140-20.

[153] F.C.d.Q. Mello, D.R. Silva, M.P. Dalcolmo, Tuberculosis: Where are we?, J. Bras. Pneumol. 44 (2018) 82. doi:10.1590/s1806-37562017000000450.

[154] World Health Organization. Tuberculosis. Disponible online: https://www.who.int/health-topics/tuberculosis#tab=tab_1 (accedido el 11 de Noviembre del 2021).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[155] World Health Organization. WHO Coronavirus (Covid-19) Dashboard. Disponible online: https://covid19.who.int/ (accedido el 11 de Noviembre del 2021).

[156] N. Fogel, Tuberculosis: A disease without boundaries, Tuberc. 95 (2015) 527–531. doi:10.1016/j.tube.2015.05.017.

[157] B. Vishwa, A. Moin, D.V. Gowda, S.M.D. Rizvi, W.A.H. Hegazy, A.S.A. Lila, E.-S. Khafagy, A.N. Allam, Pulmonary tar-815 geting of inhalable moxifloxacin microspheres for effective management of Tuberculosis, Pharm. 13 (2021) 79. doi:10.3390/pharmaceutics13010079.

[158] K. Dheda, C.E. Barry 3rd, G. Maartens, Tuberculosis, Lancet. 387 (2016) 1211-1226. doi:10.1016/S0140-6736(15)00151-8.

[159] P.A. LoBue, D.A. Enarson, T.C. Thoen, Tuberculosis in humans and its epidemiology, diagnosis and treatment in the United States, Int. J. Tuberc. Lung Dis. 14 (2010) 1226-1232.

[160] W. Cruz-Knight, L. Blake-Gumbs, Tuberculosis: An overview. Prim. Care: Clin. Off. Pract. 40 (2013) 743-756.

[161] V.A.C.M. Koeken, E.S. van der Pasch, G.P. Leijte, V.P. Mourits, L.C.J. de Bree, S.J.C.F.M. Moorlag, I. Budnick, N. Idh, M. Lerm, M. Kox, A. van Laarhoven, M.G. Netea, R. van Crevel, The effect of BCG vaccination on alveolar macrophages obtained from induced sputum from healthy volunteers, Cytokine. 133 (2020) 155135. doi:10.1016/j.cyto.2020.155135.

[162] P.A. Jensen, L.A. Lambert, M.F. Iademarco, R. CDC Ridzon, Guidelines for preventing the transmission of Mycobacterium tuberculosis in health-care settings, MMWR Recomm. Rep. 54 (2005) 1-141.

[163] P. Jain, I. Jain, Oral manifestations of Tuberculosis: Step towards early diagnosis, J. Clin. Diagn. Res. 8 (2014) 18-21. doi:10.7860/JCDR/2014/10080.5281.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[164] World Health Organization. Guidelines for treatment of tuberculosis. Disponible online: https://www.who.int/tb/publications/2010/9789241547833/en/ (accedido el 9 de Octubre del 2021).

[165] World Health Organization. Global Tuberculosis report 2020. Disponible online: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/336069/9789240013131-eng.pdf (accedido el 11 de Noviembre del 2021).

[166] V. Dartois, The path of anti-tuberculosis drugs: From blood to lesions to mycobacterial cells, Nat. Rev. Microbiol. 12 (2014) 159-167. doi:10.1038/nrmicro3200.

[167] Y.-Q. Hu , S. Zhang, F. Zhao, C. Gao, L.-S. Feng, Z.-S. Lv, Z. Xu, X. Wu, Isoniazid derivatives and their anti-tubercular activity, Eur. J. Med. Chem. 133 (2017) 255-267. doi:10.1016/j.ejmech.2017.04.002.

[168] G.F. Dos Santos Fernandes, H.R. Nunes Salgado, J.L. Dos Santos, Isoniazid: a review of characteristics, properties and analytical methods, Crit. Rev. Anal. Chem. 47 (2017) 298-308. doi:10.1080/10408347.2017.1281098.

[169] L. Xia, Y.-F. Xia, L.-R. Huang, X. Xiao, H.-Y. Lou, T.-J. Liu, W.-D. Pan, H. Luo, Benzaldehyde schiff bases regulation to the metabolism, hemolysis, and virulence genes expression in vitro and their structure-microbicidal activity relationship, Eur. J. Med. Chem. 97 (2015) 83-93. doi:10.1016/j.ejmech.2015.04.042.

[170] V. Judge, B. Narasimhan, M. Ahuja, D. Sriram, P. Yogeeswari, E. De Clercq, C. Pannecouque, J. Balzarini, Synthesis, antimycobacterial, antiviral, antimicrobial activity and QSAR studies of N2-acyl isonicotinic acid hydrazide derivatives, Med. Chem. 9 (2013) 53-76. doi:10.2174/157340613804488404.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[171] F. Martins, S. Santos, C. Ventura, R. Elvas-Leitão, L. Santos, S. Vitorino, M. Reis, V. Miranda, H. F. Correia, J. Aires-de-Sousa, V. Kovalishyn, D. A. R. S. Latino, J. Ramos, M. Viveiros, Design, synthesis and biological evaluation of novel isoniazid derivatives with potent antitubercular activity, Eur. J. Med. Chem. 81 (2014) 119-138. doi:10.1016/j.ejmech.2014.04.077.

[172] M. Malhotra, S. Sharma, A. Deep, Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel derivatives of isoniazid, Med. Chem. Res. 21 (2012) 1237-1244. doi:10.1007/s00044-011-9634-0.

[173] F. Bardou, C. Raynaud, C. Ramos, M.A. Lanéelle, G. Lanéelle, Mechanism of isoniazid uptake in mycobacterium tuberculosis. Microbiol. 144 (1998) 2539–2544. doi:10.1099/00221287-144-9-2539.

[174] G.S. Timmins, V. Deretic, Mechanisms of action of isoniazid, Mol. Microbiol. 62 (2006) 1220–1227. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05467.x.

[175] H. Marrakchi, G. Lanéelle, A. Quémard, InhA, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II. Microbiol. 146 (2000) 289–296. doi:10.1099/00221287-146-2-289.

[176] S. Shekar, Z.X. Yeo, J.C.L. Wong, M.K.L. Chan, D.C.T. Ong, P. Tongyoo, S.-Y. Wong, A.S.G. Lee, Detecting novel genetic variants associated with isoniazid-resistant mycobacterium tuberculosis. PLoS One. 9 (2014) e102383. doi:10.1099/00221287-146-2-289.

[177] J. Sandy, A. Mushtaq, A. Kawamura, J. Sinclair, E. Sim, M. Noble, The structure of arylamine N-acetyltransferase from Mycobacterium smegmatis--An enzyme which inactivates the anti-tubercular drug, isoniazid, J. Mol. Biol. 318 (2002) 1071-1083. doi:10.1016/s0022-2836(02)00141-9.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[178] H. McIlleron, R. Rustomjee, M. Vahedi, T. Mthiyane, P. Denti, C. Connolly, W. Rida, A. Pym, P.J. Smith, P.C. Onyebujohc, Reduced antituberculosis drug concentrations in HIV-infected patients who are men or have low weight: Implications for international dosing guidelines, Antimicrob. Agents Chemother. 56 (2012) 3232–3238. doi:10.1128/AAC.05526-11.

[179] G. Wyszogrodzka, P. Dorożyński, B. Gil, W.J. Roth, M. Strzempek, B. Marszałek, W.P. Węglarz, E. Menaszek, W. Strzempek, P. Kulinowski, Iron-based metal-organic frameworks as a theranostic carrier for local tuberculosis therapy, Pharm. Res. 35 (2018) 1-11. doi:10.1007/s11095-018-2425-2.

[180] S. Wuttke, S. Braig, T. Preiss, A. Zimpel, J. Sicklinger, C. Bellomo, J.O. Raedler, A.M. Vollmar, T. Bein, MOF nanoparticles coated by lipid bilayers and their uptake by cancer cells, Chem. Commun. 51 (2015) 15752-15755. doi:10.1039/c5cc06767g.

[181] S. Wuttke, A. Zimpel, T. Bein, S. Braig, K. Stoiber, A. Vollmar, D. Müller, K. Haastert-Talini, J. Schaeske, M. Stiesch, G. Zahn, A. Mohmeyer, P. Behrens, O. Eickelberg, D.A. Bölükbas, S. Meiners, Validating metal-organic framework nanoparticles for their nanosafety in diverse biomedical applications, Adv. Healthc. Mater. 6 (2017) 1-11. doi:10.1002/adhm.201600818.

[182] R. Grall, T. Hidalgo, J. Delic, A. Garcia-Marquez, S. Chevillard, P. Horcajada, In vitro biocompatibility of mesoporous metal (III; Fe, Al, Cr) trimesate MOF nanocarriers, J. Mater. Chem. B. 3 (2015) 8279-8292. doi:10.1039/c5tb01223f.

[183] B.M. Jarai, Z. Stillman, L. Attia, G.E. Decker, E.D. Bloch, C.A. Fromen, Evaluating UiO-66 metal-organic framework nanoparticles as acid-sensitive carriers for pulmonary drug delivery applications, ACS Appl. Mater. Interfaces. 12 (2020) 38989-39004. doi:10.1021/acsami.0c10900.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[184] J.B. DeCoste, G.W. Peterson, H. Jasuja, T.G. Glover, Y. Huang, K.S. Walton, Stability and degradation mechanisms of metal-organic frameworks containing the $Zr_6O_4(OH)_4$ secondary building unit, J. Mater. Chem. A. 1 (2013) 5642-5650. doi:10.1039/c3ta10662d.

[185] C. Orellana-Tavra, E.F. Baxter, T. Tian, T.D. Bennett, N.K.H. Slater, A.K. Cheetham, D. Fairen-Jimenez, Amorphous metal-organic frameworks for drug delivery, Chem. Commun. 51 (2015) 13878-13881. doi:10.1039/c5cc05237h.

[186] E. Bellido, M. Guillevic, T. Hidalgo, M.J. Santander-Ortega, C. Serre, P. Horcajada, Understanding the colloidal stability of the mesoporous MIL-100(Fe) nanoparticles in physiological media, Langmuir. 30 (2014) 5911–5920. doi:10.1021/la5012555.

[187] K. Hirota, T. Hasegawa, T. Nakajima, H. Inagawa, C. Kohchi, G.I. Soma, K. Makino, H. Terada, Delivery of rifampicin-PLGA microspheres into alveolar macrophages is promising for treatment of tuberculosis, J. Control. Release. 142 (2010) 339-346. doi:10.1016/j.jconrel.2009.11.020.

[188] R. Nicolete, D.F. dos Santos, L.H. Faccioli, The uptake of PLGA micro or nanoparticles by macrophages provokes distinct in vitro inflammatory response, Int. Immunopharmacol. 11 (2011) 1557-1563. doi:10.1016/j.intimp.2011.05.014.

[189] I. Takeuchi, Y. Taniguchi, Y. Tamura, K. Ochiai, K. Makino, Effects of L-leucine on PLGA microparticles for pulmonary administration prepared using spray drying: Fine particle fraction and phagocytotic ratio of alveolar macrophages, Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Asp. 537 (2018) 411-417. doi:10.1016/j.colsurfa.2017.10.047.

[190] C.-L. Fang, C.-J. Wen, I.A. Aljuffali, C.T. Sung, C.-L. Huang, J.-Y. Fang, Passive targeting of phosphatiosomes increases rolipram delivery to the lungs for treatment of acute lung injury: An animal

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

study, J. Control. Release 213 (2015) 69-78. doi:10.1016/j.jconrel.2015.06.038.

[191] Y. Wei, L. Zhao, Passive lung-targeted drug delivery systems via intravenous administration, Pharm. Dev. Technol. 19 (2014) 129-136. doi:10.3109/10837450.2012.757782.

[192] S. Al-Qadi, A. Grenha, D. Carrión-Recio, B. Seijo, C. Remuñán-López, Microencapsulated chitosan nanoparticles for pulmonary protein delivery: In vivo evaluation of insulin-loaded formulations, J. Control. Release. 157 (2012) 383-390. doi:10.1016/j.jconrel.2011.08.008.

[193] D.P. Gaspar, M.M. Gaspar, C.V. Eleutério, A. Grenha, M. Blanco, L.M.D. Gonçalves, P. Taboada, A.J. Almeida, C. Remuñán-López, Microencapsulated solid lipid nanoparticles as a hybrid platform for pulmonary antibiotic delivery, Mol. Pharm. 14 (2017) 2977–2990. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.7b00169.

[194] A. Ziaee, A.B. Albadarin, L. Padrela, T. Femmer, E. O'Reilly, G. Walker, Spray drying of pharmaceuticals and biopharmaceuticals: Critical parameters and experimental process optimization approaches, Eur. J. Pharm. Sci. 127 (2019) 300-318. doi:10.1016/j.ejps.2018.10.026.

[195] C. Fernández-Paz, S. Rojas, P. Salcedo-Abraira, T. Simón-Yarza, C. Remuñán-López, P. Horcajada, Metal-organic framework microsphere formulation for pulmonary administration, ACS Appl. Mater. Interfaces. 12 (2020) 25676-25682. doi:10.1021/acsami.0c07356.

[196] World Health Organization. WHO model lists of essential medicines. Disponible online: https://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/ (accedido el 11 de Noviembre del 2021).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[197] U.S. Food and Drug Administration. Inactive ingredient search for approved drug products. Disponible online: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm (accedido el 11 de Noviembre del 2021).

[198] D. Porru, A. Parmigiani, C. Tinelli, D. Barletta, D. Choussos, C. Di Franco, B. Rovereto, Oral D-mannose in recurrent urinary tract infections in women: A pilot study, J. Clin. Urol. 7 (2014) 208–213. doi:10.1177/2051415813518332.

[199] C. Fernández-Paz, E. Fernández-Paz, P. Salcedo-Abraira, S. Rojas, S. Barrios-Esteban, N. Csaba, P. Horcajada, C. Remuñán-López, Microencapsulated isoniazid-loaded metal–organic frameworks for pulmonary administration of antituberculosis drugs, Molecules, 26 (2021) 6408. doi:10.3390/molecules26216408.

[200] S. Rodrigues, C. Cordeiro, B. Seijo, C. Remuñán-López, A. Grenha, Hybrid nanosystems based on natural polymers as protein carriers for respiratory delivery: Stability and toxicological evaluation, Carbohydr. Polym. 123 (2015) 369–380. doi:10.1016/j.carbpol.2015.01.048.

[201] B. Singco, L.-H. Liu, Y.-T. Chen, Y.-H. Shih, Y.-H. Huang, C.-H. Lin, Approaches to drug delivery: Confinement of aspirin in MIL-100(Fe) and aspirin in the de novo synthesis of metal-organic frameworks, Microporous Mesoporous Mater. 223 (2016) 254–260. doi:10.1016/j.micromeso.2015.08.017.

[202] S. Gunasekaran, E. Sailatha, S. Seshadri, S. Kumaresan, FTIR, FT Raman spectra and molecular structural confirmation of isoniazid, Indian J. Pure Appl. Phys. 47 (2009) 12–18.

[203] H. Leclerc, A. Vimont, J.-C. Lavalley, M. Daturi, A.D. Wiersum, P.L. Llwellyn, P. Horcajada, G. Ferey, C. Serre, Infrared study of the influence of reducible iron(iii) metal sites on the adsorption of CO, CO_2, propane, propene and propyne in the

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

mesoporous metal-organic framework MIL-100, Phys. Chem. Chem. Phys. 13 (2011) 11748–11756. doi:10.1039/c1cp20502a.

[204] M. Elsabahy, K.L. Wooley, Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications, Chem. Soc. Rev. 41 (2012) 2545–2561. doi:10.1039/c2cs15327k.

[205] A. Grenha, B. Seijo, C. Serra, C. Remuñán-López, Chitosan nanoparticle-loaded mannitol microspheres: Structure and surface characterization, Biomacromol. 8 (2007) 2072–2079. doi:10.1021/bm061131g.

[206] D.M.K. Jensen, D. Cun, M.J. Maltesen, S. Frokjaer, H.M. Nielsen, C. Foged, Spray drying of siRNA-containing PLGA nanoparticles intended for inhalation, J. Control. Release. 142 (2010) 138–145. doi:10.1016/j.jconrel.2009.10.010.

[207] H.L. Ohrem, E. Schornick, A. Kalivoda, R. Ognibene, Why is mannitol becoming more and more popular as a pharmaceu-tical excipient in solid dosage forms?, Pharm. Dev. Technol. 19 (2014) 257–262. doi:10.3109/10837450.2013.775154.

[208] S.G. Maas, G. Schaldach, E.M. Littringer, A. Mescher, U.J. Griesser, D.E. Braun, P.E. Walzel, N.A. Urbanetz, The impact of spray drying outlet temperature on the particle morphology of mannitol, Powder Technol. 213 (2011) 27–35. doi:10.1016/j.powtec.2011.06.024.

[209] E. Daviskas, S.D. Anderson, S. Eberl, I.H. Young, Beneficial effect of inhaled mannitol and cough in asthmatics with mucociliary dysfunction, Respir. Med. 104 (2010) 1645–1653. doi:10.1016/j.rmed.2010.05.019.

[210] J. Elversson, A. Millqvist-Fureby, In situ coating-An approach for particle modification and encapsulation of proteins during spray-drying, Int. J. Pharm. 323 (2006) 52–63. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.05.066.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[211] S. Al-Qadi, A. Grenha, C. Remuñán-López, Microspheres loaded with polysaccharide nanoparticles for pulmonary delivery: Preparation, structure and surface analysis, Carbohydr. Polym. 86 (2011) 25-34. doi:10.1016/j.carbpol.2011.03.022.

[212] S. Al-Qadi, C. Remuñán-López, A micro- and nano-structured drug carrier based on biocompatible, hybrid polymeric nanoparticles for potential application in dry powder inhalation therapy, Polym. 55 (2014) 4012-4021. doi:10.1016/j.polymer.2014.06.046.

[213] P. Tewa-Tagne, S. Briançon, H. Fessi, Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: Development and characterization, Eur. J. Pharm. Sci. 30 (2007) 124-135. doi:10.1016/j.ejps.2006.10.006.

[214] A. Grenha, C.I. Grainger, L.A. Dailey, B. Seijo, G.P. Martin, C. Remuñán-López, B. Forbes, Chitosan nanoparticles are compatible with respiratory epithelial cells in vitro, Eur. J. Pharm. Sci. 31 (2007) 73–84. doi:10.1016/j.ejps.2007.02.008.

[215] D.P. Gaspar, V. Faria, L.M.D. Gonçalves, P. Taboada, C. Remuñán-López, A.J. Almeida, Rifabutin-loaded solid lipid nanoparticles for inhaled antitubercular therapy: Physicochemical and in vitro studies. Int. J. Pharm. 497 (2016) 199–209. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.11.050.

[216] P. Lempens, C.J. Meehan, K. Vandelannoote, K. Fissette, P. De Rijk, A. Van Deun, L. Rigouts, B.C. de Jong, Isoniazid resistance levels of mycobacterium tuberculosis can largely be predicted by high-confidence resistance-conferring mutations, Sci. Rep. 8 (2018) 3246. doi:10.1038/s41598-018-21378-x.

[217] L. Liu, Y. Xu, C. Shea, J.S. Fowler, J.M. Hooker, P.J. Tonge, Radiosynthesis and bioimaging of the tuberculosis chemotherapeutics isoniazid, rifampicin and pyrazinamide in baboons, J. Med. Chem. 53 (2010) 2882−2891. doi:10.1021/jm901858n.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[218] J.L. Izquierdo, B.G. Cosio, The dose of inhaled corticosteroids in patients with COPD: When less is better, Int. J. Chronic Obstr. Pulm. Dis. 13 (2018) 3539−3547. doi:10.2147/COPD.S175047.

[219] D.P. Tashkin, L.M. Fabbri, Long-acting beta-agonists in the management of chronic obstructive pulmonary disease: Current and future agents, Respir. Res. 11 (2010) 149. doi:10.1186/1465-9921-11-149.

[220] N.A. Mohamed, R.P. Davies, P.D. Lickiss, B. Ahmetaj-Shala, D.M. Reed, H.H. Gashaw, H. Saleem, G.R. Freeman, P.M. George, S.J. Wort, D. Morales-Cano, B. Barreira, T.D. Tetley, A.H. Chester, M.H. Yacoub, N.S. Kirkby, L. Moreno, J.A. Mitchell, Chemical and biological assessment of metal organic frameworks (MOFs) in pulmonary cells and in an acute in vivo model: Relevance to pulmonary arterial hypertension therapy, Pulm. Circ. 7 (2017) 643−653. doi:10.1177/2045893217710224.

[221] S.S. Jhamb, A. Goyal, P.P. Singh, Determination of the activity of standard anti-tuberculosis drugs against intramacrophage Mycobacterium tuberculosis, in vitro: MGIT 960 as a viable alternative for BACTEC 460, Braz. J. Infect. Dis. 18 (2014) 336−340. doi:10.1016/j.bjid.2013.12.004.

[222] Y. Kawashima, H. Takeuchi, T. Hino, S. Fujioka, H. Yamamoto, Pulmonary delivery of insulin with nebulized dl-lactide/glycolide copolymer (PLGA) nanospheres to prolong hypoglycemic effect, J. Control. Release. 62 (1992) 279−287. doi:10.1016/S0168-3659(99)00048-6.

[223] J.S. Patton, C.S. Fishburn, J.G. Weers, The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery, Proc. Am. Thorac. Soc. 1 (2004) 338−344. doi:10.1513/pats.200409-049TA.

[224] M.D. Larrañaga, R.J. Lewis, R.A. Lewis, Hawley's condensed chemical dictionary, sixteenth ed., Wiley, Weinheim, Germany, 2016.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[225] S. Kaur, Y. Bansal, R. Kumar, G. Bansal, A panoramic review of IL-6: Structure, pathophysiological roles and inhibitors, Bioorg. Med. Chem. 28 (2020) 115327. doi:10.1016/j.bmc.2020.115327.

[226] M.K. Ali, R.Y. Kim, A.C. Brown, C. Donovan, K.S. Vanka, J.R. Mayall, G. Liu, A.L. Pillar, J.-F. Bernadette, D. Xenaki, T. Borghuis, R. Karim, J.W. Pinkerton, R. Aryal, M. Heidari, K.L. Martin, J.K. Burgess, B.G. Oliver, D. Trinder, D.M. John-stone; E.A. Milward, P.M. Hansbro, J.C. Horvat, Critical role for iron accumulation in the pathogenesis of fibrotic lung disease, J. Pathol. 251 (2020) 49-62. doi:10.1002/path.5401.

[227] S.J. Allden, P.P. Ogger, P. Ghai, P. McErlean, R. Hewitt, R. Toshner, S.A. Walker, P. Saunders, S. Kingston, P.L. Molyneaux, T.M. Maher, C.M. Lloyd, A.J. Byrne, The transferrin receptor CD71 delineates functionally distinct airway macrophage subsets during idiopathic pulmonary fibrosis, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 200 (2019) 209-219. doi:10.1164/rccm.201809-1775oc.

[228] A. Pietrangelo, R. Gualdi, G. Casalgrandi, G. Montosi, E. Ventura, Molecular and cellular aspects of iron-induced hepatic cirrhosis in rodents, J. Clin. Invest. 95 (1995) 1824-1831. doi:10.1172/JCI117861.

[229] L. Tuderman, R. Myllyla, K.I. Kivirikko, Mechanism of the prolyl hydroxylase reaction. 1. Role of co-substrates. Eur. J. Biochem. 80 (1977) 341-348. doi:10.1111/j.1432-1033.1977.tb11888.x.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

9. DECLARACIONES: CONFLICTO DE INTERÉS, USO DE IMÁGENENES Y CONTENIDO PUBLICADO

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DE AUSENCIA DE CONFLICTO DE INTERÉS DE LA DOCTORANDA

De acuerdo con las directrices de la Escuela de Doctorado Internacional (EDI) en Ciencias de la Salud de la Universidad de Santiago de Compostela (USC) (acuerdo del 3 de mayo de 2018), la Doctoranda Cristina Fernández Paz declara no tener ningún posible conflicto de interés en relación con la presente tesis doctoral.

En Narón, a …… 2021

Fdo. Cristina Fernández Paz

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DE USO DE IMÁGENES DE LA DOCTORANDA

Las imágenes presentadas en el presente Libro de Tesis, titulado: Nueva plataforma de administración pulmonar basada en redes metal-orgánicas con potencial aplicación en el tratamiento de la tuberculosis, fueron elaboradas por la doctoranda: Cristina Fernández Paz mediante,

a) Nueva creación. Figuras: 1, 7, 10, 16, 17, 17 (continuación), 18, 30, 34 y 35.

b) Adaptación/modificación de figuras originales (es decir, de figuras procedentes de artículos publicados por la Doctoranda)**.** Figuras: 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 27 (continuación), 28, 29A, 29B, 29C, 31, 32 y 33.

c) Adaptación/modificación de figuras no originales (es decir, de figuras procedentes de artículos no publicados por la Doctoranda)**.** Figuras: 2, 5 y 6.

d) Libre de derechos de autor. Figuras: 3 y 4.

Todas las figuras están adecuadamente citadas al pie de las mismas, con referencia a su fuente original y copyright en los casos correspondientes.

En Narón, a …… 2021

Fdo. Cristina Fernández Paz

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DEL CONTENIDO PUBLICADO POR LA DOCTORANDA

El presente Libro de Tesis: "Nueva plataforma de administración pulmonar basada en redes metal-orgánicas con potencial aplicación en el tratamiento de la tuberculosis" está estructurado de forma monográfica y en español, con reproducción parcial de publicaciones derivadas del trabajo de investigación de la Doctoranda: Cristina Fernández Paz.

A continuación, se describen las secciones publicadas, así como los índices de calidad de las publicaciones:

SECCIONES PUBLICADAS:

1. Los estudios relativos a las NPs MIL-100 y Ma-MIL-100 MS (sin isoniazida) están publicados en un artículo de investigación, en una revista revisada por pares.
2. Los estudios referentes a las NPs INH@MIL-100 y Ma-INH@MIL-100 MS (con isoniazida) están publicados en un artículo de investigación, en una revista revisada por pares.

TÍTULOS DE LOS ARTÍCULOS:

1. "Metal–Organic Framework Microsphere Formulation for Pulmonary Administration".
2. "Microencapsulated Isoniazid-Loaded Metal–Organic Frameworks for Pulmonary Administration of Antituberculosis Drugs".

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

AUTORES Y AFILIACIONES:

1. Cristina Fernández-Paz[1], Sara Rojas[2], Pablo Salcedo-Abraira[2], Teresa Simón-Yarza[3], Carmen Remuñán-López[1], Patricia Horcajada[2]

   [1]Grupo Nanobiofar, Departamento de Farmacología, Farmacia & Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Vida, 15782 Santiago de Compostela, Galicia, España.
   [2] Unidad de materiales porosos avanzados (APMU), Instituto IMDEA Energía, Av. Ramón de la Sagra, 3, 28035 Móstoles, Madrid, España.
   [3]Instituto Nacional de la Salud e Investigación Sanitaria (INSERM U1148). Laboratorio de Ciencia Traslacional Vascular, Hospital Bichat, Universidad de París, 75018 París, Francia.

2. Cristina Fernández-Paz[1], Estefanía Fernández-Paz[1], Pablo Salcedo-Abraira[2], Sara Rojas[2], Sheila Barrios-Esteban[3], Noemi Csaba[3], Patricia Horcajada[2], Carmen Remuñán-López[1]

   [1]Grupo Nanobiofar, Departamento de Farmacología, Farmacia & Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Vida, 15782 Santiago de Compostela, Galicia, España.
   [2] Unidad de materiales porosos avanzados (APMU), Instituto IMDEA Energía, Av. Ramón de la Sagra, 3, 28035 Móstoles, Madrid, España.
   [3]Grupo Nanobiofar, Grupo de polímeros naturales y biomiméticos (NPNB) Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CiMUS), Universidad de Santiago de Compostela, Campus Vida, 15706 Santiago de Compostela, Galicia, España.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FECHA DE PUBLICACIÓN:

1. 04/05/2020
2. 23/10/2021

REVISTA:

1. ACS Applied Materials & Interfaces
2. Molecules

DOI, VOLUMEN, PÁGINAS/NÚMERO DE ARTÍCULO, ISSN:

1. doi:10.1021/acsami.0c07356, volumen: 12, páginas: 25676-25682, ISSN: 1944-8244.
2. doi: 10.3390/molecules26216408, volumen: 26, número de artículo: 6408,ISSN:1420-3049.

CONTRIBUCIÓN DE LA DOCTORANDA A LAS PUBLICACIONES:

En ambas publicaciones, la Doctoranda contribuyó en:

1. Conceptualización: formulación de ideas y planteamiento de objetivos generales de la investigación.
2. Metodología: diseño y desarrollo de metodología.
3. Investigación: realización de experimentos y recopilación de resultados.
4. Validación: verificación de la replicación y reproducibilidad general de los experimentos y resultados.
5. Software: manejo de diferentes softwares.
6. Tratamiento de datos: recopilación, depuración e interpretación de resultados de investigación.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7. Análisis formal: aplicación de técnicas estadísticas, matemáticas y computacionales para analizar los resultados de los estudios.
8. Recursos: gestión de obtención de material de laboratorio, reactivos e instrumentación.
9. Visualización: visualización y presentación de datos.
10. Redacción: preparación del borrador original.

La Doctoranda realizó los estudios presentados en las publicaciones y en la Tesis. Los estudios en los que participó en colaboración con otros investigadores fueron los siguientes:

1. Preparación de las NPs MIL-100 y asociación de INH, así como la caracterización de estos sistemas (PXRD, FTIR, adsorción de N_2, TGA, HPLC, EA, estabilidad estructural y química), en colaboración con el grupo de Patricia Horcajada Cortés (Instituto IMDEA Energía, Madrid). Realizó su trabajo bajo las directrices de Patricia Horcajada, su co-Directora de Tesis.
2. Toma de imágenes de microscopía (SEM, TEM, CLSM y RAMAN), realizadas por el personal especializado de los Servicios Generales de la Universidad de Santiago de Compostela. La Doctoranda preparó las muestras, realizó el procesado de imágenes y, además, se encargó de la interpretación, redacción y discusión de resultados.
3. La Doctoranda llevó a cabo todos los estudios celulares, gracias los protocolos y disponibilidad de instalaciones (CiMUS) que fueron ofrecidos por parte del grupo de Noemi Csaba.
4. Estudios *in vivo* realizados por Patricia Horcajada y Sara Rojas, quienes se encargaron de los procesos asociados a la manipulación de las ratas. La Doctoranda preparó las muestras de polvo para administración y se encargó de la interpretación, redacción y discusión de los resultados.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ÍNDICES DE CALIDAD:

Las revistas donde se realizaron las publicaciones presentan:

1. índice de impacto de la revista en el año de su publicación (2020): 9.229; índice CiteScore: 14.0 (calculado por Scopus en 2020); Cuartil 1 (Q1) en "Nanociencia y nanotecnología" (SJR 2020 2.535) calculado por Scimago: http://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=19700171101&tip=sid
2. índice de impacto de la revista en el año de su publicación (2021): no determinado (en 2020: 4.411); Índice CiteScore: 4.7 (calculado por Scopus en 2020);Cuartil 1 (Q1) en "Ciencias farmacéuticas"(SJR 2020 0.782) calculado por Scimago: https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=26370&tip=sid&clean=0

CONSIDERACIONES ÉTICAS:

En este Libro de Tesis se han incluido ciertos datos y figuras adaptados/modificados de:

a) datos y figuras originales, publicados en:

1. "ACS Applied Materials & Interfaces", se ha solicitado previamente el permiso a la revista y se ha obtenido la autorización correspondiente para la reproducción parcial del contenido y de las figuras. Figuras: 19, 20, 31, 32 y 33.
2. "Molecules", no se requirió permiso a la revista porque el artículo publicado está distribuido bajo los términos y condiciones de licencia "Creative Commons Attribution (CC BY)" (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). Figuras: 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 27 (continuación), 28, 29A, 29B y 29C.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

b) figuras no originales:

1. Se solicitó permiso a “ACS Applied Materials & Interfaces” para el empleo y modificación de una figura (Figura 2 del Libro de Tesis).
2. No se solicitó permiso a “Frontiers in Physiology” para el empleo y modificación de una figura (Figura 5 del Libro de Tesis) porque cumple con los mandatos de Open Access Statement, bajo la licencia “Creative Commons Attribution (CC BY)”.
3. No se solicitó permiso a “Revista médica de Chile” para el empleo y modificación de una figura (Figura 6 del Libro de Tesis) porque está bajo la licencia “Creative Commons”.
4. No se incluyeron permisos para las figuras libres de derechos de autor (Figuras 3 y 4 del Libro de Tesis).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

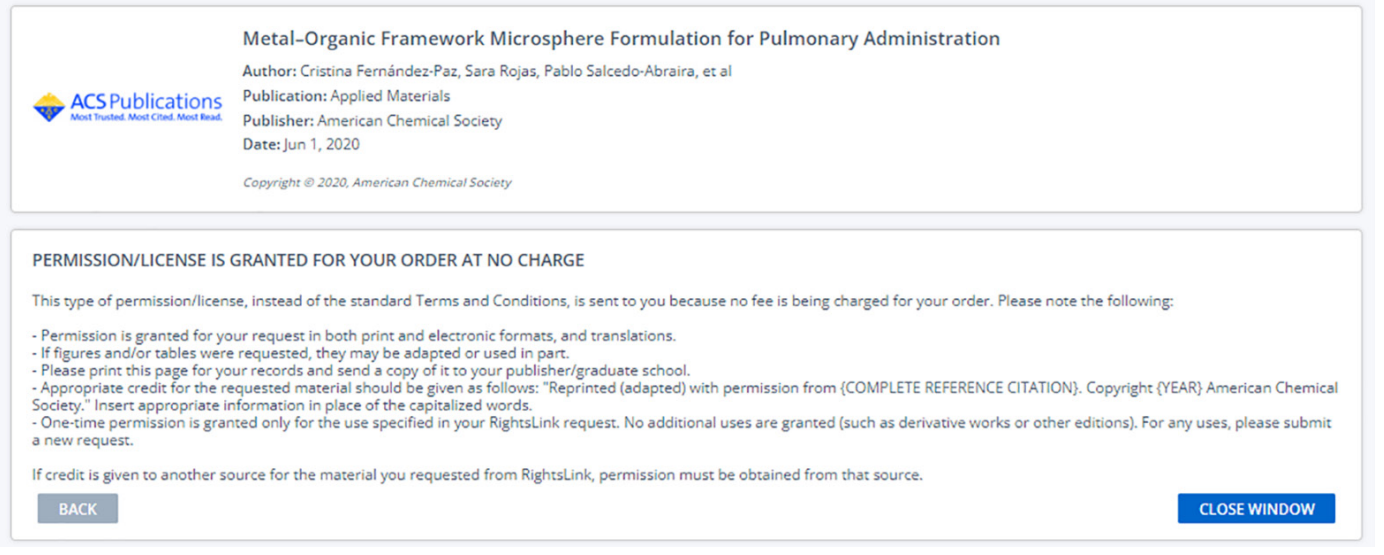
10. PERMISOS

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Permiso concedido de ACS Applied Materials & Interfaces para el **empleo y modificación de figuras y texto originales**.



Metal–Organic Framework Microsphere Formulation for Pulmonary Administration

Author: Cristina Fernández-Paz, Sara Rojas, Pablo Salcedo-Abraira, et al
Publication: Applied Materials
Publisher: American Chemical Society
Date: Jun 1, 2020

Copyright © 2020, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

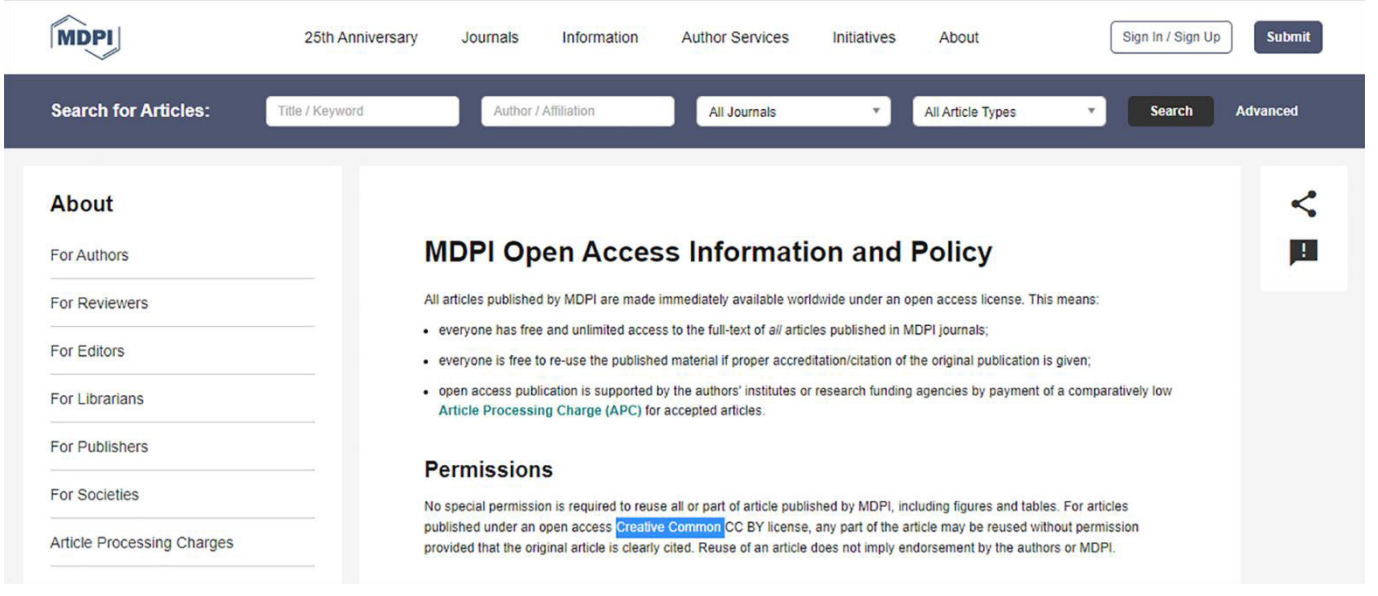
- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

BACK CLOSE WINDOW

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Permiso concedido de Molecules para el **empleo y modificación de figuras y texto originales**.



molecules

MDPI

Article

Microencapsulated Isoniazid-Loaded Metal–Organic Frameworks for Pulmonary Administration of Antituberculosis Drugs

Cristina Fernández-Paz [1], Estefanía Fernández-Paz [1], Pablo Salcedo-Abraira [2], Sara Rojas [2], Sheila Barrios-Esteban [3], Noemi Csaba [3], Patricia Horcajada [2] and Carmen Remuñán-López [1,*]

[1] Nanobiofar Group, Department of Pharmacology, Pharmacy & Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Santiago de Compostela, Campus Vida, 15782 Santiago de Compostela, Galicia, Spain; cristina.fernandez.paz@rai.usc.es (C.F.-P.); estefania.fernandez.paz@rai.usc.es (E.F.-P.)
[2] Advanced Porous Materials Unit (APMU), IMDEA Energy Institute, Av. Ramón de la Sagra, 3, 28035 Móstoles, Madrid, Spain; pablo.salcedo@imdea.org (P.S.-A.); srojas@ugr.es (S.R.); patricia.horcajada@imdea.org (P.H.)
[3] Nanobiofar Group-Natural Polymers and Biomimetics (NPNB) Group, Center of Research in Molecular Medicine and Chronic Diseases (CiMUS), University of Santiago de Compostela, Campus Vida, 15706 Santiago de Compostela, Galicia, Spain; sheila.barrios@rai.usc.es (S.B.-E.); noemi.csaba@usc.es (N.C.)
* Correspondence: mdelcarmen.remunan@usc.es; Tel.: +34-881815045

check for updates

Citation: Fernández-Paz, C.; Fernández-Paz, E.; Salcedo-Abraira, P.; Rojas, S.; Barrios-Esteban, S.; Csaba, N.; Horcajada, P.; Remuñán-López, C. Antituberculosis Drugs. *Molecules* **2021**, *26*, 6408. https://doi.org/10.3390/molecules26216408

Academic Editors: Pasquale Del Gaudio, Carlos A. García-González, Ana Leite Oliveira and Ricardo Starbird

Received: 9 September 2021
Accepted: 13 October 2021
Published: 23 October 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Abstract: Tuberculosis (TB) is an infectious disease that causes a great number of deaths in the world (1.5 million people per year). This disease is currently treated by administering high doses of various oral anti-TB drugs for prolonged periods (up to 2 years). While this regimen is normally effective when taken as prescribed, many people with TB experience difficulties in complying with pulmonary TB treatment consisting of mannitol microspheres (Ma MS) containing iron (III) trimesate metal–organic framework (MOF) MIL-100 nanoparticles (NPs). In the present work, we loaded this system with the first-line anti-TB drug isoniazid (INH) and evaluated both the viability and safety of the drug vehicle components, as well as the cell internalization of the formulation in alveolar A549 cells. Results show that INH-loaded MOF (INH@MIL-100) NPs were efficiently microencapsulated in Ma MS, which displayed suitable aerodynamic characteristics for pulmonary administration and non-toxicity. MIL-100 and INH@MIL-100 NPs were efficiently internalized by A549 cells, mainly localized in the cytoplasm. In conclusion, the proposed micro-nanosystem is a good candidate for the pulmonary administration of anti-TB drugs.

Keywords: A549 cells; isoniazid; mannitol; metal–organic frameworks; microencapsulation; pulmonary administration; tuberculosis

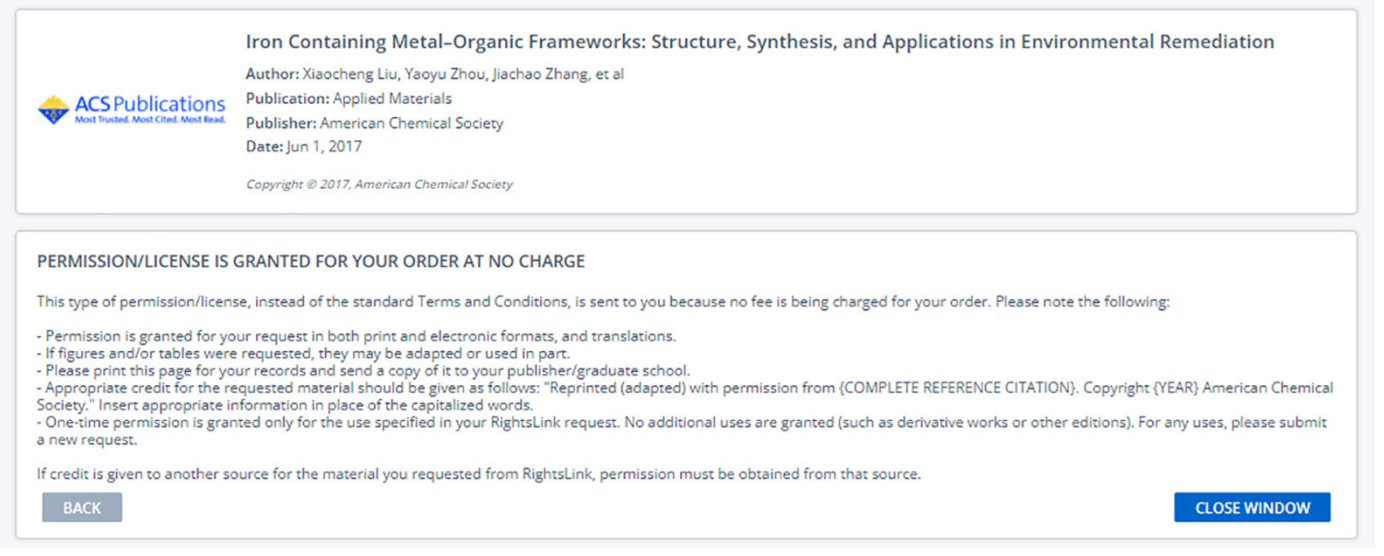
1. Introduction

Currently, TB continues to be one of the principal 10 causes of death worldwide [1,2], and is the second leading cause of death (1.5 million people in the world per year [3]) due to an infectious disease, behind SARS-CoV-2 (>1.9 million deaths in 2020 [4]). TB is mainly caused by the bacteria *Mycobacterium tuberculosis* [5] and principally affects the lungs but also can be spread to other organs (e.g., productive cough, fatigue, fever, malaise, night sweats, and weight loss) [6].

Once in the body, alveolar macrophages are a growth niche in which the bacilli reside and multiply. The conventional TB therapy recommended by the World Health Organization (WHO) consists of a difficult daily oral multidrug regimen that is prolonged in time (often lasts up to 2 years), in which the treatment during the first two months is with INH, rifampicin, ethambutol, and pyrazinamide (first-line anti-TB drugs), and

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Permiso concedido de ACS Applied Materials & Interfaces para el **empleo y modificación de una figura no original** (Figura 2 del Libro de Tesis).



ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

Iron Containing Metal–Organic Frameworks: Structure, Synthesis, and Applications in Environmental Remediation

Author: Xiaocheng Liu, Yaoyu Zhou, Jiachao Zhang, et al
Publication: Applied Materials
Publisher: American Chemical Society
Date: Jun 1, 2017

Copyright © 2017, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

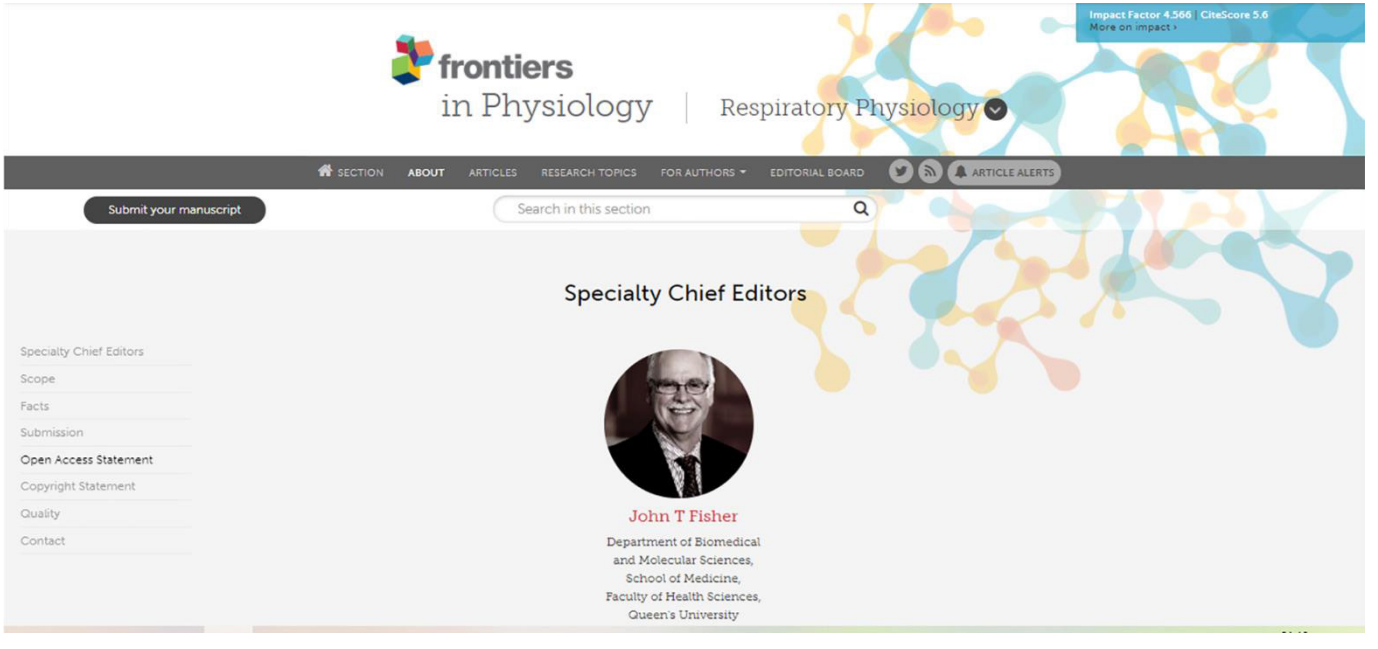
- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

BACK CLOSE WINDOW

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Frontiers in Physiology cumple con los mandatos de Open Access Statement, bajo la licencia “Creative Commons Attribution (CC BY)”; usado para el **empleo y modificación de una figura no original** (Figura 5 del Libro de Tesis).



Specialty Chief Editors
Scope
Facts
Submission
Open Access Statement
Copyright Statement
Quality
Contact

Open Access Statement

OPEN ACCESS

Frontiers' philosophy is that all research is for the benefit of humankind. Research is the product of an investment by society and therefore its fruits should be returned to all people without borders or discrimination, serving society universally and in a transparent fashion.

That is why Frontiers provides online free and open access to all of its research publications. For more information on open access click here.

Open Access funder and institutional mandates: Frontiers is fully compliant with open access mandates, by publishing its articles under the Creative Commons Attribution licence (CC-BY). Funder mandates such as those by the Wellcome Trust (UK), National Institutes of Health (USA) and the Australian Research Council (Australia) are fully compatible with publishing in Frontiers. Authors retain copyright of their work and can deposit their publication in any repository. The work can be freely shared and adapted provided that appropriate credit is given and any changes specified.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Revista médica de Chile está bajo la licencia “Creative Commons”, usada para el **empleo y modificación de una figura no original** (Figura 6 del Libro de Tesis).



SciELO

artículos | búsqueda de artículos

sumario | anterior | próximo | autor | materia | búsqueda | home | alfab

Revista médica de Chile
versión impresa ISSN 0034-9887

Rev. méd. Chile vol.142 no.5 Santiago mayo 2014

http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872014000500009

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

Dinámica y patología del barrido mucociliar como mecanismo defensivo del pulmón y alternativas farmacológicas de tratamiento

Mucociliary clearance system in lung defense

Francisco Pérez B.[1,a], Andrea Méndez G.[1,b], Andrea Lagos R.[2], Sergio L. Vargas M.[1]

[1] Laboratorio de Infecciones Respiratorias, Programa de Microbiología y Micología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina Universidad de Chile.
[2] Servicio de Enfermedades Respiratorias, Hospital San José, SSMN.
[a] Licenciado en Biología. Estudiante Doctorado en Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Becario Conicyt.
[b] Kinesióloga. Estudiante Doctorado en Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Becaria Conicyt.

Correspondencia a:

The first line of defense to maintain the sterility of the intrapulmonary airways is the mucociliary clearance system. This rapidly responding, non-specific, immune defensive system is challenged by approximately 12,000 liters of air filtered by the lungs each day, containing millions of particles like spores, environmental and eventually toxic

Servicios Personalizados
Revista
SciELO Analytics
Google Scholar H5M5 (2020)
Articulo
Español (pdf)
Articulo en XML
Como citar este artículo
SciELO Analytics
Traducción automática
Indicadores
Links relacionados
Compartir
Otros
Otros
Permalink

78. Ballmann M, Hardt HVD. Hypertonic saline and recombinant human DNase: a randomised cross-over pilot study in patients with cystic Fibrosis. J Cyst Fibros 2002; 1 (1): 35-7. [Links]

79. Suri R, Grieve R, Normand C, Metcalfe C, Thompson S, Wallis C, et al. Effects of hypertonic saline, alternate day and daily rhDNase on healthcare use, costs and outcomes in children with cystic fibrosis. Thorax 2002; 57 (10): 841-6. [Links]

80. Barbato A, Frischer T, Kuehni CE, Snijders D, Azevedo I, Baktai G, et al. Primary ciliary dyskinesia: a consensus statement on diagnostic and treatment approaches in children. Eur Respir J 2009; 34: 1264-76. [Links]

81. Strieter RM, Belperio JA, Keane MP. Cytokines in innate host defense in the lung. J Clin Invest 2002; 109: 699-705. [Links]

Recibido el 25 de septiembre de 2012, aceptado el 2 de diciembre de 2013.

Financiamiento: Proyecto Fondecyt 1100225.

Correspondencia a: Dr. Sergio L. Vargas Munita.
Laboratorio de Infecciones Respiratorias, Programa de Microbiología y Micología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile Independencia 1027, Santiago, Chile. Fax: (56 2) 732 5160
svargas@med.uchile.cl

Conflictos de Intereses:

Sergio L. Vargas M.

Andrea Lagos R.

Francisco Pérez B.

Andrea Méndez G.

Todo el contenido de esta revista, excepto dónde está identificado, está bajo una Licencia Creative Commons

Bernarda Morín 488, Providencia,
Casilla 168, Correo 55
Santiago - Chile

Tel.: (56-2) 2753 5520

revmedchile@smschile.cl

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR,
DE LA RECHERCHE ET DE L'INNOVATION

Paris, le 27 MARS 2018

Direction générale
de la recherche
et de l'innovation

Service de la performance,
du financement et de la
contractualisation avec les
organismes de recherche

Département de la culture
scientifique et des relations
avec la société

Cellule Animaux utilisés à des
Fins Scientifiques – AFiS –

Affaire suivie par
Virginie Vallet
Chargée de mission
Responsable de la cellule AFiS

Mél.
virginie.vallet@recherche.gouv.fr

Plateforme
apafis.demat@recherche.gouv.fr

1 rue Descartes
75231 Paris Cedex 05

Objet : Notification d'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques

En application des dispositions du code rural et de la pêche maritime, notamment ses articles R.214-87 à R.214-126, le projet :

- référencé sous le numéro APAFIS#8314-201609191924867 v4,
- ayant pour titre : Etude de la pharmacocinétique et de la biodistribution chez le petit animal de nanomatériaux poreux pour la détoxification.
- déposé par l'Établissement Utilisateur : Université Paris Sud- UFR de pharmacie, numéro d'agrément C9201901, dont la responsable est Madame Sylvie RETAILLEAU,
- et dont la responsabilité de la mise en œuvre générale du projet et de sa conformité à l'autorisation est assurée par Madame Patricia HORCAJADA, Madame Sara ROJAS,

est autorisé.

L'autorisation de projet est accordée, sous réserve de la validité de l'agrément de l'Etablissement Utilisateur, pour une durée de 2 ans à compter de l'autorisation.

Le projet précité a été évalué sur le plan éthique par le Comité d'éthique en expérimentation animale N°026 et a reçu un avis favorable.

Ce projet ne fera pas l'objet, à l'issue de sa réalisation, d'une appréciation rétrospective.

Pour la ministre et par délégation
le chef du service de la performance, du financement
et de la contractualisation avec les organismes de
recherche

Thierry BERGEONNEAU

Madame Sylvie RETAILLEAU
Université Paris Sud- UFR de pharmacie

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AVIS DU COMITÉ D'ÉTHIQUE
(à transmettre au secrétariat autorisation de projet :
autorisation-projet@recherche.gouv.fr)

Date 20/10/2017

Référence du dossier : 8314 / 201609191924867 v3

Titre du Projet : Etude de la pharmacocinétique et de la biodistribution chez le petit animal de nanomatériaux poreux pour la détoxification.

1- Avis éthique sur le projet : ☒ Favorable
☐ Défavorable

Motif(s) en cas d'avis défavorable :

2- Proposition de reclassement des procédures expérimentales selon le degré de gravité indiqué par le responsable de projet : ☐ **oui** ☒ **non**

Procédure(s) reclassée(s) et proposition de reclassement :
- procédure n° :
  reclassement :

(le bloc Procédure(s) reclassée(s) et proposition de reclassement est à reproduire le cas échéant)

3- En application de l'article R.214-120 du décret n°2013-118 du 1er février 2013, le projet devra t'il bénéficier d'une appréciation rétrospective à l'issue de sa réalisation : ☐ **oui** ☒ **non**

4- Le cas échéant (cf point 4.3 du dossier), avis sur la réutilisation d'un animal pour autant que l'animal n'ait pas été utilisé, préalablement à ce projet, plus d'une fois dans une procédure expérimentale entraînant une douleur intense, de l'angoisse ou une souffrance équivalente (article R.214-113 du décret n°2013-118 du 1er février 2013) :
☐ Favorable ☐ Défavorable

Motif(s) en cas d'avis défavorable :

Nom du Comité d'éthique CAPSUD /N° 26 et signature du Président P GONIN

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CENTRE DE FORMATION

CNRS - 31, chemin Joseph-Aiguier – 13009 Marseille

QUALIFICATION DES PERSONNELS DES ETABLISSEMENTS D'EXPERIMENTATION ANIMALE

Formation complémentaire destinée aux personnes habilitées à expérimenter, sollicitant l'autorisation d'effectuer, dans le cadre de leurs expériences, des interventions chirurgicales.
(Connaissance de l'animal de laboratoire spécialisation chirurgicale)

agréés par le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
Sous – direction de la Santé et de la Protection Animales
(N° B-13C2483-Cha(1-10))

ATTESTATION

Je soussigné, Docteur Ivan BALANSARD , Vétérinaire, responsable pédagogique des programmes ci-dessus mentionnés, certifie que

Madame HORCAJADA Patricia

a suivi la totalité des cours et enseignements pratiques (28 H) du cycle de formation complémentaire de spécialisation en chirurgie, dispensés conformément aux textes législatifs sur l'expérimentation animale (arrêté du 19 avril 1988 - annexe 2), qui s'est tenu à Marseille du 2 au 6 avril 2012.

L'intéressée a subi avec succès, en fin de session, un contrôle de ses connaissances.

Dr Ivan BALANSARD
Responsable Pédagogique
Formations expérimentation animale
Centre Joseph Aiguier
CNRS

Fait à Marseille, le 6 avril 2012.
Pour servir et valoir ce que de droit

Le responsable pédagogique
Ivan BALANSARD

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA





Lycée Voltaire
2 avenue Voltaire
45072 Orléans cedex 2
Fax 02 38 40 12 13
Internet

ATTESTATION DE STAGE

FORMATION SPECIALE
A L'EXPERIMENTATION ANIMALE POUR
LES CADRES BIOLOGISTES
- Niveau 1-

enregistrée sous le numéro : R-15GRETA-F1-04
approuvée par décision du Ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche et de la ruralité
en date du 15 octobre 2004

Je soussigné Francis TRIQUET, Proviseur du Lycée Voltaire, Chef de l'Etablissement Support du GRETA LOIRET CENTRE à Orléans, certifie que

HORCAJADA Patricia

A suivi la **formation spéciale à l'expérimentation animale** niveau 1
du 20 septembre au 1er octobre 2010.

Le programme de cette formation a été celui défini par l'arrêté du 18 avril 1988

HORCAJADA Patricia a subi avec succès l'évaluation de fin de stage.

Aucun duplicata ne sera délivré.

Fait à Orléans, le 1er octobre 2010

Le Chef de l'Etablissement Support

F. TRIQUET

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



CENTRE DE FORMATION

CNRS - 31, chemin Joseph-Aiguier – 13009 Marseille

QUALIFICATION DES PERSONNELS DES ETABLISSEMENTS D'EXPERIMENTATION ANIMALE

Formation destinée aux personnes assumant la responsabilité de concepteur de projets

Agréée par le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
Sous - direction de la Santé et de la Protection Animales
(N° R-13CNRS-F1-10)

ATTESTATION

Je soussigné Docteur Ivan BALANSARD, Vétérinaire, responsable pédagogique des programmes ci-dessus mentionnés, certifie que

Madame ROJAS Sara

A suivi la totalité des cours et enseignements pratiques du cycle de formation de Concepteur de Projets modèle rongeurs dispensé conformément aux textes législatifs sur l'expérimentation animale (arrêté du 1er février 2013), qui s'est tenu à Marseille du 14 au 22 Novembre 2016.

L'intéressé a subi avec succès, en fin de session, un contrôle de ses connaissances.

Fait à Marseille, le 22 Novembre 2016.
Pour servir et valoir ce que de droit

Le responsable pédagogique
Ivan BALANSARD

Dr Ivan BALANSARD
Responsable Pédagogique
Formations expérimentation animale
Centre Joseph Aiguier
CNRS

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

11. LISTAS DE VERIFICACIÓN

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Lista de verificación para Tesis con animales de experimentación. **EXPERIMENTACIÓN ANIMAL ARRIVE**

Sí/No/NA		Página
	Título	
Sí	Proporcionar una descripción tan exacta y concisa como sea posible sobre el contenido del trabajo.	133-136
	Resumen	
Sí	Proporcionar un resumen preciso de los antecedentes, los objetivos de la investigación, incluyendo detalles de la especie y cepa de los animales utilizados, métodos relevantes, hallazgos principales y conclusiones del estudio.	133-136, 182-191, 195
	Antecedentes	
Sí	Incluir suficientes antecedentes científicos (incluyendo las referencias pertinentes al trabajo anterior) a fin de comprender la motivación y el contexto para el estudio, y explicar las bases y el enfoque experimental.	133
Sí	Explicar cómo y por qué la especie y el modelo animal utilizados permiten abordar los objetivos científicos y, cuando sea apropiado, la relevancia del estudio para la biología humana.	133
	Objetivos	
Sí	Describir claramente los objetivos primarios y secundarios del estudio, o las hipótesis específicas que se van a probar.	111, 112, 133-136
	Declaración Ética	
Sí	Indicar el permiso del comité ético, y las leyes o decretos pertinentes para el cuidado y uso de animales, bajo las que se realiza la investigación.	133, 257, 258
	Diseño del estudio	
Sí	Número de grupos experimentales y control.	134
Sí	Cualquier medida adoptada para minimizar los efectos de sesgo subjetivo al asignar los animales a los grupos de tratamiento (por ej., procedimiento aleatorio) y al evaluar los resultados (por ej., si se hace, describir quiénes eran ciegos y cuándo).	134
Sí	La unidad experimental (por ej., un solo animal, grupos o	134

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

	jaulas de animales). Un diagrama cronológico o de flujo pueden ser útiles para ilustrar cómo se realizaron los diseños de estudio complejos.	
	Procedimientos experimentales	
Sí	Cómo (por ej., formulación y dosis del tratamiento, el sitio y la vía de administración, anestesia y analgesia utilizadas [incluyendo la monitorización], procedimiento quirúrgico, el método de eutanasia). Proporcionar detalles de cualquier equipo especializado utilizado, incluyendo proveedor(es).	133-136
NA	Cuándo (por ej., la hora del día).	
Sí	Dónde (por ej., jaula de alojamiento, laboratorio, prueba del laberinto acuático).	134
Sí	Por qué (por ej., fundamentos para la elección del anestésico específico, la vía de administración, dosis del fármaco utilizado).	134
	Animales de experimentación	
Sí	Proporcionar detalles de los animales utilizados, incluyendo especie, cepa, sexo, etapa de desarrollo (por ej., edad media o mediana de edad y rango) y peso (por ej., media o mediana más rango de peso).	133
NA	Proporcionar otra información pertinente, como la procedencia de los animales, nomenclatura internacional de la cepa, modificación genética (por ej., animal deficiente o transgénico), genotipo, estado de salud/inmune, si los animales han sido incluidos en estudios o recibido tratamientos anteriormente, procedimientos previos, etc.	
	Animales	
Sí	Alojamiento (tipo de instalación por ej., libre de patógenos específicos [SPF], tipo de jaula o habitáculo, material del lecho, número de animales por jaula, forma y material del tanque, etc. para peces).	134
Sí	Condiciones de cría (por ej., programa de reproducción, ciclo de luz/oscuridad, temperatura, calidad de agua, etc. para peces, el tipo de alimentación, el acceso a los alimentos y al agua, enriquecimiento ambiental).	134
Sí	Evaluaciones e intervenciones relacionadas con el bienestar que se llevaron a cabo antes, durante o después del experimento	134
	Tamaño de la muestra	
Sí	Especificar el número total de animales utilizados en cada experimento, y el número de animales en cada grupo	133

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

	experimental.	
NA	Explicar cómo se determinó el número de animales. Proporcionar detalles del cálculo del tamaño muestral utilizado.	
NA	Indicar el número de repeticiones independientes de cada experimento, si es pertinente.	
	Asignación de animales a grupos experimentales	
Sí	Proporcionar detalles completos de la forma en que los animales fueron asignados a grupos experimentales, incluyendo distribución aleatoria o asignación específica, si así se hizo.	134
NA	Describir el orden en el que los animales en los diferentes grupos experimentales fueron tratados y evaluados.	
Sí	Resultados experimentales 12 Definir claramente los resultados primarios y secundarios evaluados (por ej., muerte celular, marcadores moleculares, cambios de comportamiento).	182-191
	Métodos estadísticos	
Sí	Proporcionar detalles sobre los métodos estadísticos utilizados para cada análisis.	185-189
Sí	Especificar la unidad de análisis para cada grupo de datos (por ej., un solo animal, grupo de animales, neurona individual).	134
NA	Describir los métodos utilizados para evaluar si los datos corroboran las suposiciones del método estadístico.	
	Datos basales	
Sí	Para cada grupo experimental, indicar las características relevantes y estado de salud de los animales (por ej., peso, estado microbiológico, si los animales han sido incluidos en estudios o recibido drogas anteriormente) antes de iniciar el tratamiento o prueba. (Esta información puede ser a menudo tabulada).	133
	Cantidades analizadas	
Sí	Indicar el número de animales en cada grupo incluido en cada análisis. Presentar números absolutos (por ej., 10/20, no 50 %2).	134
NA	Si alguno de los animales o datos no fue incluido en el análisis, explicar por qué.	
	Resultados y Discusión	
Sí	Indicar los resultados de cada análisis llevado a cabo, con una medida de precisión (por ej., error estándar o intervalo	182-191

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

	de confianza).	
	Eventos adversos	
NA	Dar detalles de todos los eventos adversos importantes en cada grupo experimental.	
NA	Describir las modificaciones a los protocolos experimentales realizadas para reducir los eventos adversos.	
	Interpretación /implicaciones científicas	
Sí	Interpretar los resultados, teniendo en cuenta los objetivos y las hipótesis del estudio, la teoría actual y otros estudios pertinentes en la literatura.	182-191
NA	Comentar las limitaciones del estudio incluyendo cualquier fuente potencial de sesgo, cualquier limitación del modelo animal y la imprecisión asociada con los resultados	
NA	Describir cualquier implicación de los métodos experimentales o hallazgos para el reemplazo, refinamiento o reducción (las 3 R) del uso de los animales en investigación.	
	Capacidad de generalización/aplicabilidad	
Sí	Comentar si, y de qué forma, los hallazgos de este estudio son aplicables a otras especies o sistemas, incluyendo cualquier relevancia para la biología humana.	191
	Financiación	
Sí	Listar todas las fuentes de financiación (incluyendo el número del proyecto) y el papel de la fuente(s) de financiación en el estudio.	273

Basado en The ARRIVE guidelines: Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments.

Firma Doctorando

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Lista de verificación de recomendaciones para **Tesis EDI saúde. GENERAL**

Sí-No-N/A		Página
Para todas las Tesis		
Sí	Declaración de potenciales conflictos de interés por parte del autor	237
Sí	Declaración sobre el origen y copyright de las figuras no originales y permiso en caso necesario. Incluirlos en el pie de cada figura no original.	38, 58, 93, 96, 239, 247, 252-256
N/A	Lista de adecuación estadística en caso de no cubrir ninguna de las otras tres checklist específicas.	
Para Tesis que implican a seres humanos, sus muestras o sus datos de carácter personal		
N/A	Declaración sobre su aprobación por el comité de ética de la investigación	
N/A	Código de registro del estudio	
N/A	Copia del informe favorable	
N/A	Declaración de que los datos se basan en información anónima y por tanto no se necesita aprobación del comité de ética de la investigación	
N/A	Si el estudio es observacional, checklist STROBE	
Para Tesis que describen un ensayo clínico		
N/A	Declaración sobre su autorización por la Agencia Española de Medicamentos y productos sanitarios.	
N/A	Copia de la autorización	
N/A	Checklist CONSORT	
Para Tesis que usan células troncales humanas, embrionarias o inducidas		
N/A	Declaración sobre su autorización	
N/A	Referencia de la autorización	
N/A	Copia de la autorización	

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Para Tesis que incluyen estudios con animales de experimentación		
Sí	Declaración de su autorización	257, 258
Sí	Número de la autorización del proyecto de experimentación animal	133, 258
No	Registro del centro de usuario autorizado si es español	
No	Copia del certificado de capacitación si los experimentos los ha hecho el doctorando	
Sí	Indicación de la persona, empresa o servicio que llevó a cabo el experimento en su caso	244, 260, 261
Sí	Checklist ARRIVE	265-268

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

12. FINANCIACIÓN

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

FINANCIACIÓN

La Doctoranda Cristina Fernández Paz agradece a las entidades que han financiado sus estudios de Doctorado:

- Proyecto I+D+I PID2019-107500RB-I00, financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033
- Instituto de Salud Carlos III de España (Acción de Salud Estratégica, Proyectos FIS PS09/00816 y FIS PSI14/00059)
- Xunta de Galicia (Grupos de referencia competitivos, ED431C 2021/17-FEDER)
- Proyecto H + MOF Ramón Areces
- Programa español Ramón y Cajal (Proyecto 2014-16823)

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

13. PREMIO

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DEL PREMIO RECIBIDO POR LA DOCTORANDA

Cristina Fernández Paz recibió el Primer Premio al: Best Collaborative Poster Contribution at the International Conference on Aerogels for Biomedical and Environmental Applications (Santiago de Compostela, España; Febrero de 2020), por el póster titulado: “A new micro-nanoMOF platform for pulmonary drug delivery”.

Además, fue invitada a presentar una publicación en la revista Molecules, que fue financiada con dicho premio.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

molecules

AEROGELS
COST ACTION CA18125

BEST COMMUNICATION PRIZE

This is to certify that

Cristina Fernández Paz

has obtained the 1st Prize for the **Best Collaborative Poster Contribution** in

International Conference on Aerogels for Biomedical and Environmental Application

held at Santiago de Compostela, Spain, February 18-20, 2020.

Carlos A. García-González
Conference Chair

cost

Funded by the Horizon 2020 Framework Programme of the European Union

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA