



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

Liberación controlada de fármacos: Aplicación contra el Cáncer

Memoria de Trabajo Fin de Grado
Sant Joan d'Alacant
Junio 2019

Autor: Gabriel Fco. Abellán Girona
Modalidad: Revisión bibliográfica
Tutor/es: Dr. Julio César Álvarez Santos

INDICE

• <u>RESUMEN.....</u>	<u>3</u>
• <u>ANTECEDENTES.....</u>	<u>4</u>
.1 <u>INTRODUCCIÓN.....</u>	<u>4</u>
.2 <u>OBJETIVOS.....</u>	<u>6</u>
.3 <u>ESTRATEGIAS USADAS PARA LA LIBERACIÓN <i>IN VIVO</i>.....</u>	<u>7</u>
.3.1 <u>MODO PASIVO.....</u>	<u>7</u>
.3.2 <u>MODO ACTIVO.....</u>	<u>7</u>
.3.2.1 <u>PEQUEÑAS MOLECULAS COMO LIGANDO.....</u>	<u>8</u>
.3.2.2 <u>BIOMOLÉCULAS.....</u>	<u>8</u>
.4 <u>MATERIALES.....</u>	<u>9</u>
• <u>RESULTADOS.....</u>	<u>20</u>
.5 <u>Liberación de fármacos en función del pH del medio.....</u>	<u>20</u>
.6 <u>Liberación de fármacos en función de la temperatura.....</u>	<u>25</u>
.7 <u>Liberación de fármacos en función del potencial redox.....</u>	<u>27</u>
.8 <u>Liberación de fármacos a través de múltiples estímulos.....</u>	<u>32</u>
• <u>CONCLUSIÓN.....</u>	<u>34</u>
• <u>ANEXO.....</u>	<u>35</u>
• <u>BIBLIOGRAFIA.....</u>	<u>38</u>

RESUMEN

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por la existencia de células que han sufrido un cambio en los mecanismos de control que regulan su capacidad de diferenciación y proliferación. En el siglo pasado aparecieron numerosos fármacos antitumorales como los taxanos o la doxorubicina (DOX), que inhibían procesos específicos del ciclo celular, pero no eran específicos de las células cancerosas y generaban una alta toxicidad sistémica. El desarrollo de nuevos sistemas de liberación controlada de fármacos ha progresado mucho durante las últimas décadas. Los nuevos sistemas de liberación consiguen que las nanopartículas estén preparadas para liberar el medicamento bajo unas condiciones específicas dadas por el microentorno tumoral y conseguir disminuir así los efectos secundarios. La biocompatibilidad y biodegradabilidad son unas características específicas que deben reunir los materiales elegidos como carriers para formularse así los vehículos que transportan los fármacos.

En esta revisión se intentará mostrar el gran abanico de posibilidades a la hora de escoger los materiales utilizados en la nanoterapia, así como en su aplicación frente al cáncer.

ANTECEDENTES

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por la existencia de células que han sufrido un cambio en los mecanismos de control que regulan su capacidad de diferenciación y proliferación. Según los últimos datos publicados por el Instituto Nacional de Estadística (INE) (Tabla 1), en diciembre de 2018, correspondientes al año 2017, los tumores constituyeron la segunda causa de muerte en España (26,7% de los fallecimientos), por detrás de las enfermedades cardiovasculares (28,8% de muertes).¹

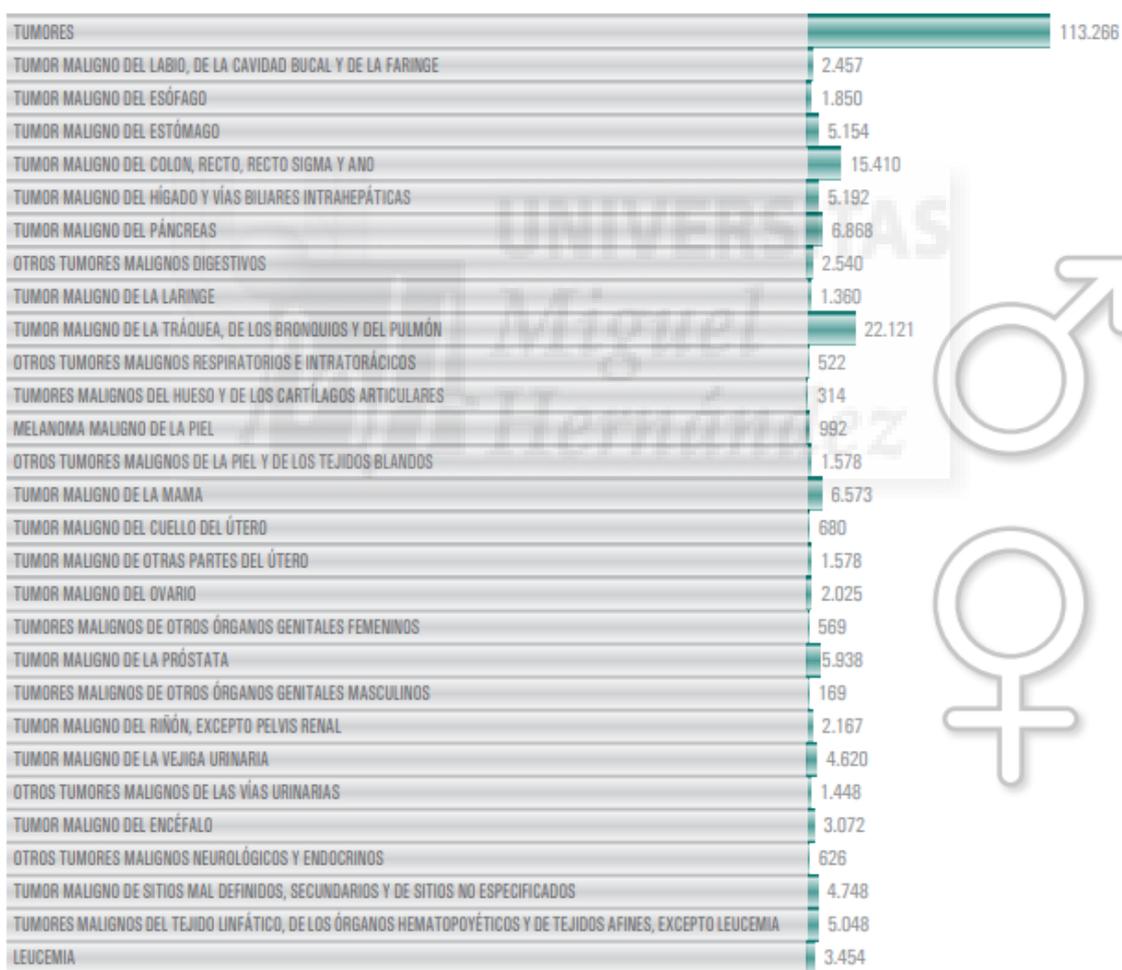


Tabla 1. Fallecimientos por tumores en España para el año 2017 ambos sexos.

Asimismo, según datos de la OMS, el cáncer es la 2ª causa de muerte en el mundo². No es de extrañar por tanto que una parte importante de la investigación en medicina se centre en la lucha contra dicha enfermedad.

Ya en el siglo pasado aparecieron numerosos fármacos antitumorales como los taxanos o la doxorubicina (DOX), que inhibían procesos específicos del ciclo celular pero no eran específicos de las células cancerosas, generando una alta toxicidad sistémica. Sin embargo, ésta no es el único obstáculo a evitar: muchos antitumorales no tienen perfiles farmacocinéticos o farmacológicos favorables; la baja solubilidad, la carencia de estabilidad, el corto tiempo de semivida, la naturaleza irritante y la resistencia al tratamiento después de la exposición prolongada resultan en una baja biodisponibilidad y eficacia.³

Los sistemas de liberación controlada surgieron para hacer frente a estos inconvenientes, así como para conseguir el transporte de los fármacos al lugar específico del tumor, lo cual previene la aparición de efectos adversos en órganos y tejidos sanos.

El desarrollo de nuevos sistemas de liberación ha progresado mucho durante las últimas décadas. Estos avances tecnológicos han permitido mejorar el perfil de seguridad de los medicamentos con un margen terapéutico más estrecho. Los sistemas de liberación sostenida consiguen que las nanopartículas, o también llamadas *nanocarriers*, estén preparadas para sufrir cambios estructurales en respuesta a ciertos estímulos, lo que permite enviar y liberar el medicamento bajo unas condiciones específicas dadas por el microentorno tumoral como son la hipoxia, la angiogénesis tumoral y el incremento del catabolismo de la glucosa.²

2. OBJETIVOS

El objetivo de esta revisión es recopilar en un mismo documento los diferentes sistemas de liberación que responden a cambios fisiológicos de la matriz extratumoral (TME) (como el pH, la T^a, el potencial redox etc.) y los materiales más usados. Finalmente se discutirán los resultados obtenidos en los algunos estudios.



3. ESTRATEGIAS USADAS PARA LA LIBERACIÓN *IN VIVO*

3.1 MODO PASIVO

Existe una característica anatómico-fisiopatológica única en los tumores que se utiliza para dirigir las terapias: el aumento de la permeabilidad y retención de las sustancias del tejido neoplásico (EPR effect), causada por el defecto en la formación de vasos sanguíneos y la síntesis de factores que aumentan la permeabilidad vascular. Este efecto es un fenómeno dependiente del peso molecular: moléculas mayores de 40 kDa, (límite de la filtración renal), muestran un mayor tiempo de circulación en sangre y un aclaramiento renal más lento. Por ello, estas moléculas acaban penetrando en el tumor de una manera selectiva.⁴

3.2 MODO ACTIVO

Debido a que las células neoplásicas cumplen en muchos de los casos unas características comunes que las diferencian de las células sanas del cuerpo, estas características se han aprovechado para idear estrategias contra ellas con el fin de aumentar la especificidad y efectividad de los tratamientos. Entre esas características destaca la sobreexpresión de ciertas moléculas en las células cancerígenas, que por el contrario no están presentes, o lo están en una concentración mucho menor, en las células sanas. Algunas de esas moléculas se encuentran en la superficie celular, pudiendo aprovecharse como punto de anclaje para las nanopartículas, siempre que a su vez en la superficie de éstas se hayan introducido ligandos específicos para esas moléculas. Dado que gran parte de la eficacia de la nanoterapia depende del proceso de internalización de las nanopartículas, es fundamental una alta afinidad entre los ligandos de éstas y las moléculas que actúan como receptores en la superficie celular. Una vez dentro de las células cancerígenas, las nanopartículas deben ser capaces de liberar cargas significativas de medicamento dentro del entorno tumoral, facilitando que aquél ejerza su potencial citotóxico.

3.2.1 Pequeñas moléculas como ligando

En más del 40% de los cánceres existe una sobreexpresión en la membrana celular de los receptores de folato. Por tanto, esta pequeña molécula es usada comúnmente para modificar las nanopartículas, añadiendo selectividad a los fármacos encapsulados.⁵

Otro grupo de moléculas habitualmente sobreexpresadas está constituido por la familia de las lectinas, proteínas de membrana que se unen a azúcares con elevada especificidad. A modo de ejemplo, la expresión de la galectina-3, una lectina de unión a galactosa, se correlaciona con la transformación neoplásica y la progresión metastásica del cáncer de colon.⁶

Se sintetizaron tres tipos de copolímeros de N-(2-hidroxipropil) metacrilamida (HPMA) que contenían los epítomos de sacáridos: galactosamina, lactosa o galactosa ternaria, y compararon su biorreconocimiento por células de cáncer de colon humano. Los resultados mostraron que existe una correlación positiva entre el contenido de azúcar en los copolímeros de HPMA y su grado de unión con las células tumorales. Asimismo, comprobaron que esa correlación no es igual para los tres azúcares ensayados: la introducción de residuos de galactosa en el copolímero de HPMA dio como resultado un aumento significativo en la unión de los copolímeros a las células, mientras que los copolímeros de HPMA con lactosa mostraron bajo biorreconocimiento por todas las líneas celulares utilizadas.⁷

3.2.2 Biomoléculas

Los anticuerpos monoclonales son herramientas muy útiles para reconocer los objetivos con una alta especificidad. Por tanto, existen numerosos trabajos en la bibliografía sobre su unión a la superficie de las nanopartículas.^{8,9} Por ejemplo, el receptor de factores de crecimiento epidérmico (EGFR) es una glicoproteína transmembrana y forma parte de la familia ErbB, que consiste en cuatro receptores tirosina-quinasa: EGFR, HER2, HER3 y HER4. Específicamente EGFR y HER2 se encuentran sobreexpresados en las células cancerígenas y se ha visto que juegan un papel importante en la progresión del cáncer incluyendo la proliferación, angiogénesis, invasión y metástasis.¹⁰

Los péptidos también pueden ser utilizados como herramienta para la nanoterapia. Por ejemplo, la mitad del péptido iRGD(CRGDK/RGPD/EC) se une preferentemente a alfa integrinas, las cuales están sobreexpresadas en muchos tipos de células neoplásicas, así como en las células endoteliales del tumor. Después de una hidrólisis proteolítica, la molécula adquiere una secuencia con un C terminal que le permite unirse a la Neuropilina-1, a través de la cual alcanza el interior de las células cancerígenas. (Fig. 1)¹¹

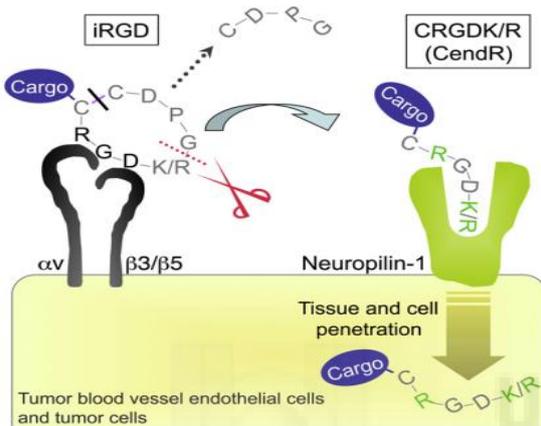


Fig. 1. Mecanismo de unión y penetración del péptido iRGD.

También se han utilizado como ligandos pequeñas secuencias de nucleótidos llamados aptámeros, los cuales son altamente resistentes a las nucleasas de la sangre y los tumores debido a que se les han añadido azúcares terminales modificados a su extremo 2', mientras que sus $-NH_2$ 3' pueden ser modificados por PEGilación.

Al comparar la utilización de ligandos de pequeño tamaño con la de biomoléculas, se observa que mientras los anticuerpos monoclonales o proteínas presentan limitaciones, como posibles complicaciones *in vivo* o los altos costes de su producción industrial, los péptidos o aptámeros tienen una estructura estable y son relativamente baratos de producir a gran escala mediante síntesis química.¹² Es por eso que son una gran innovación y una nueva vía para los tratamientos.

4. MATERIALES

En esta sección se comentarán algunos ejemplos de los materiales utilizados en la liberación controlada por estímulos (Anexo 1).

Existe una gran variedad de materiales que reúnen una serie de características específicas necesarias para ser utilizadas como transportadores, como por ejemplo retrasar el proceso de difusión.¹³

Los nanotubos de sílice (MSNTs) han sido objeto de buen número de estudios, ya que su no toxicidad, biocompatibilidad, su tamaño ajustable de poro y su capacidad de carga, los convierten en excelentes candidatos para su utilización como nanopartículas.

En 2010, Yang et al. sintetizaron dichos nanotubos¹⁴ con una superficie semiporosa, con un tamaño de poro aproximado de 20 nm, y recubierta de diferentes electrolitos, como hidrocarburo policíclico aromático (PAH/PSS) o alginato/chitosan (ALG/CHI). El par PAH/PSS presenta una gran sensibilidad frente a variaciones de pH, mientras ALG y CHI son polisacáridos biocompatibles, biodegradables, y económicos. Las moléculas liberadas fueron Doxorubicina (DOX) y Fluoresceína (FLU).

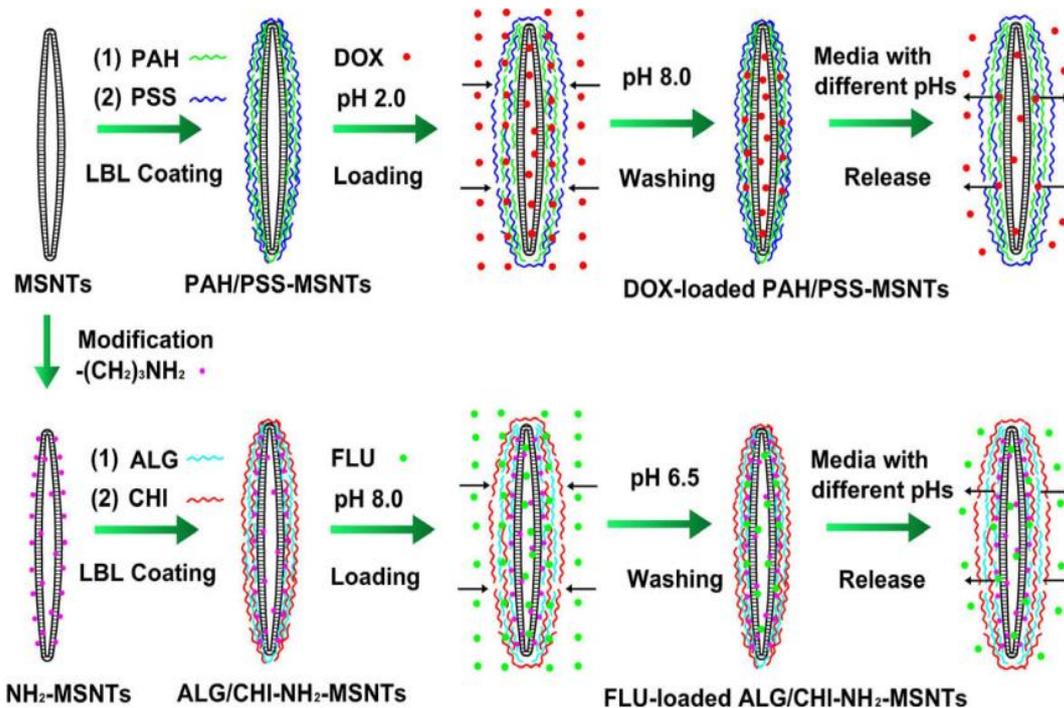


Fig. 2. Proceso experimental para el recubrimiento de los nanotubos.

En ambos casos, los MSNTs se obtuvieron con una estructura alternada entre ambos electrolitos en la superficie, PAH/PSS-MSNTs y ALG/CHI-NH₂-MSNTs respectivamente. (Fig. 2)

En la tabla 2 se resumen los parámetros físico-químicos de los nanotubos de sílice fabricados antes y después del recubrimiento con polielectrolitos.

Sample	S_{BET} ($m^2 g^{-1}$)	V_{Pore} ($cm^3 g^{-1}$)	D_{Pore} (nm)	Drug-loading efficiency (%)	
				DOX	FLU
MSNTs	638	0.78	8.2	81.7 ± 3.6	48.9 ± 2.9
NH ₂ -MSNTs	285	0.57	8.7	–	–
PAH/PSS-MSNTs	86	0.42	19.1	89.4 ± 4.8	9.6 ± 1.4
ALG/CHI-NH ₂ -MSNTs	139	0.63	19.6	–	20.5 ± 2.1

Tabla 2. Nanotubos de Sílice sintetizados.

Se observa que en el caso del fármaco DOX, los PAH/PSS-MSNT presentan una mayor eficiencia de carga de DOX (89,4 ± 4,8%) que los

nanotubos sin modificar MSNT ($81,7 \pm 3,6\%$), a pesar de que tanto el área superficial como el volumen de poros de PAH/PSS-MSNT son más bajos que los de MSNT. Entre las posibles razones de la mejora de la capacidad de almacenamiento de DOX en las PAH/PSS-MSNT cabe mencionar el almacenamiento de fármacos en poros entre PAH/PSS, y sobre todo la adsorción electrostática de DOX (molécula cargada positivamente) a la capa exterior de PSS, con carga fuertemente negativamente. Esta última hipótesis resulta especialmente probable, ya que cuando se analiza la eficiencia de carga de esos mismos nanotubos modificados para el otro fármaco (FLU), con carga negativa, se observa una reducción significativa de la misma (de $48,9 \pm 2,9$ a $9,6 \pm 1,4\%$), lo cual es consistente con la existencia de una repulsión electrostática entre FLU y la capa PSS más externa. Cuando los nanotubos de silicio se recubrieron con el par CHI/ALG, en los que la capa superficial quedaba cargada positivamente, no se detectó carga del medicamento con carga positiva (DOX), y por el contrario, aumentó la capacidad de carga frente al medicamento con carga negativa (FLU) hasta $20,5 \pm 2,1\%$, lo que significó el doble de la eficiencia de almacenamiento de FLU en los nanotubos de PAH/PSS-NH₂-MSNT.

Y.-T. Chiang y C.-L. Lo en 2014, utilizaron liposomas como carriers debido a su baja toxicidad y biocompatibilidad, y un uso muy extendido en las formulaciones magistrales.¹⁵ Dado que los liposomas tienen tres grandes inconvenientes: baja estabilidad, una liberación de fármacos muy lenta y una mayor acumulación en el bazo e hígado, para mejorar la estabilidad y la distribución a la matriz extracelular del tumor (ECM), los liposomas se prepararon a partir de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), metoxi-poli(etilenglicol) B, poli(N 2-hidroxipropil)metacrilamida-co-histidina)-colesterol (mPEG-P(HPMA-g-His)-colesterol), copolímeros, y biotina-polietilenglicol-biotina (Biotin2-PEG) reticulados.

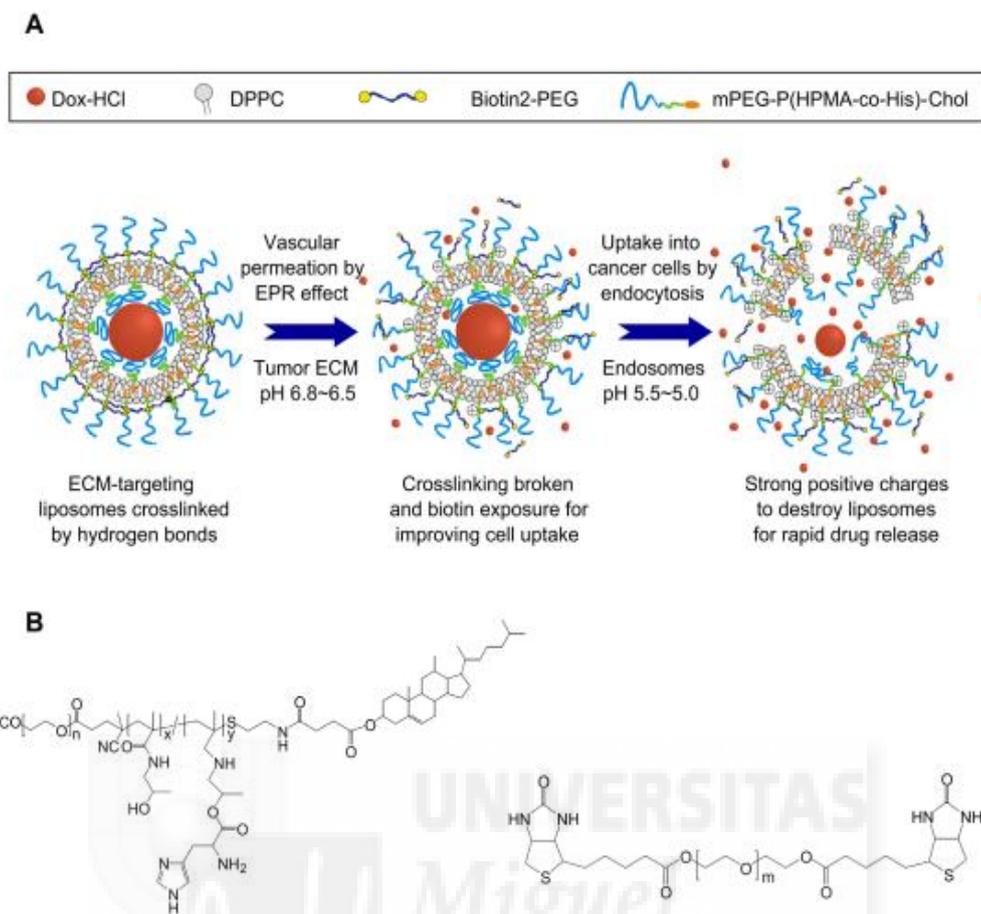


Fig. 3. (A) Esquema de la representación de liposomas con diana basados en la rotura de enlaces de hidrógeno. (B) Estructura química de mPEG-P(HPMA-g-His)-colesterol y Biotin2-PEG.

En este estudio, se sintetizaron dos tipos de liposomas, unos sin biotin2-PEG, no selectivos de la ECM, y otros que sí lo contenían. Este liposoma, dirigido a la ECM presenta varias características interesantes, como son (1) la capacidad de prevenir la adsorción de proteínas y la fuga de fármacos de los liposomas, gracias a la presencia de biotin2-PEG como agente reticulante en la interfaz del liposoma, (2) mejora de la captación celular por las células cancerígena mediante un agente que rompe los enlaces de hidrógeno por la variación de pH en la ECM (el valor medio de pH en la ECM está alrededor de 6,5-6,8), y (3) la capacidad activa de dirigirse al tumor y aumentar la acumulación.

Los liposomas resultantes se muestran en la siguiente tabla.

Code	Composition (wt %)			Particle size (nm) ^c	PDI ^c
	Copolymer	DPPC	Biotin2-PEG		
DPPC	0	100	0	96.7 ± 3.7	0.18 ± 0.05
His9PL ^a	33	67	0	108.4 ± 0.6	0.13 ± 0.02
His14 PL ^b	33	67	0	103.9 ± 1.5	0.08 ± 0.02
His9ECMTL ^a	25	50	25	90.6 ± 1.9	0.14 ± 0.07
His14ECMTL ^b	25	50	25	96.2 ± 2.1	0.11 ± 0.03

^a His9 polymer-incorporated liposomes and His9 ECM-targeting liposomes were prepared from Poly_HP47-His9 copolymers.

^b His14 polymer-incorporated liposomes and His14 ECM-targeting liposomes were prepared from Poly_HP44-His14 copolymers.

^c Particle sizes and PDIs were determined by DLS.

Tabla 3. Características fisicoquímicas de los liposomas.

Los transportadores también pueden tener naturaleza polimérica. Fei Liu et al. en 2015 sintetizaron un novedoso polimerosoma, un copolímero tribloque de tipo ABA, en el que los bloques A consistían en poli(N-vinilcaprolactama) (PVLC) como parte hidrófila y termosensible, unidos a una larga cadena hidrófoba de polidimetilsiloxano (PDMS) que constituye el bloque B.¹⁶

La longitud de la cadena de PVCL se reguló variando el tiempo de reacción, y se obtuvieron 5 copolímeros tribloques de $PVCL_n$ - $PDMS_{65}$ - $PVCL_n$ con $n = 10, 15, 19, 29$ y 50 (Tabla 4). Todos los copolímeros de bloques probados produjeron morfologías vesiculares con una periferia más oscura y un interior hueco que permaneció sin teñir, lo que implica que la membrana permaneció intacta y no permeable. Ello demuestra que bajo condiciones normales no se produce liberación del fármaco. Los copolímeros con cadenas de PVCL más grandes ($n = 29$ y $n = 50$) no produjeron vesículas, sino que se ensamblaron en micelas con un diámetro promedio por debajo de 30 nm como se evidencia en las mediciones de DLS (no se muestran).

ABA copolymer	M_n (¹ H NMR), Da	M_n (GPC) ^a , Da	Đ (GPC)	PVCL, wt %	PVCL:PDMS ratio
PVCL ₁₀ -PDMS ₆₅ -PVCL ₁₀	7780	5034	1.13	36	1:3.5
PVCL ₁₅ -PDMS ₆₅ -PVCL ₁₅	9170	5209	1.15	45	1:2.1
PVCL ₁₉ -PDMS ₆₅ -PVCL ₁₉	10280	5540	1.15	52	1:1.7
PVCL ₂₉ -PDMS ₆₅ -PVCL ₂₉	13060	7093	1.17	62	1:1.1
PVCL ₅₀ -PDMS ₆₅ -PVCL ₅₀	18900	11947	1.15	79	1:0.7

^aThe GPC number-average molecular weights were obtained using polystyrene linear standards.

Tabla 4. Composición química de los copolímeros, pesos moleculares (M_n) y polidispersidad (D).

En 2014, Chunli Shi et al. crearon una serie de micelas en forma de estrella a partir de polímeros anfipáticos como estrategia para evitar la liberación de fármacos de forma precipitada.¹⁷ Comparados con los tradicionales polímeros lineales, este copolímero con múltiples “brazos” permite reducir la concentración micelar crítica¹⁸ sin comprometer la carga de las micelas y su liberación. El objetivo de dichas micelas fue desarrollar un sistema de liberación con una capacidad de reaccionar basada en su potencial redox, con el fin de lograr una alta eficacia terapéutica para tumores sólidos y una baja toxicidad para los tejidos normales. Las micelas en forma de estrella fueron autoensambladas a partir del copolímero de poli(ϵ -caprolactona (PCL)-poli(PEG) de cuatro brazos. El PEG se utilizó como segmento hidrófilo para evitar la agregación y el aclaramiento del sistema fagocítico-nuclear. La PCL se utilizó como segmento hidrófobo debido a su buena biodegradabilidad y no citotoxicidad.

El comportamiento sensible a redox se consiguió mediante la conexión de los segmentos hidrófilos e hidrófobos con enlaces disulfuro. Los grupos finales del segmento hidrófilo incorporaron ligandos de ácido fólico para conseguir especificidad frente a las células tumorales.

Con el fin de comparar la eficacia de estas micelas, se obtuvieron sistemas en estrella sin ácido fólico y sin puentes disulfuro. (Fig. 4)

Tanto estas últimas micelas patrón (DOX @ star-PECL) como las sintetizadas incorporando dichos elementos (DOX @ star-PECLss-FA) se cargaron con DOX.

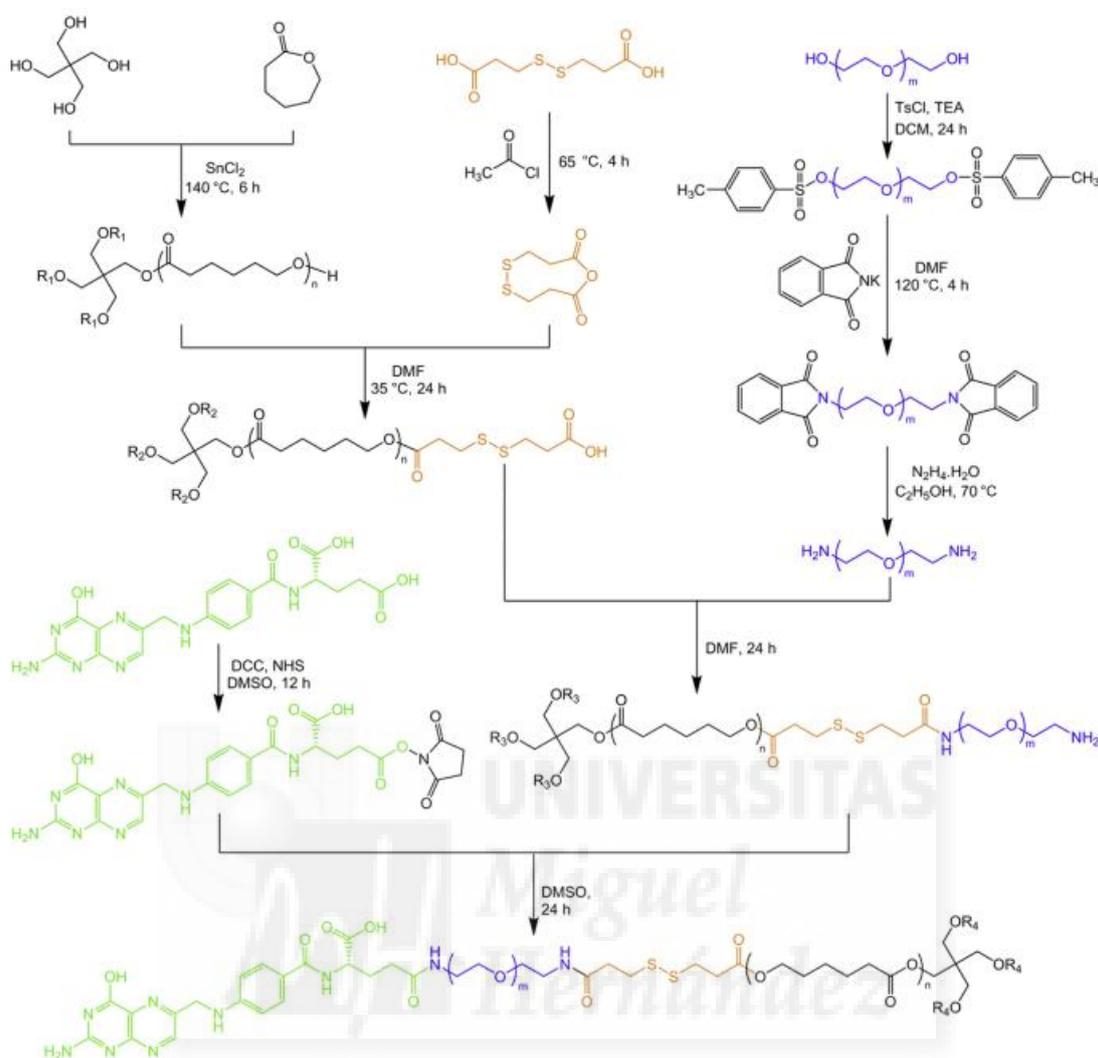


Fig. 4. Ruta de síntesis de star-PECLss-FA.

En 2014, H. Chen, W. He y Z. Guo¹⁹ reportaron un sistema sinérgico en el que nanopartículas de poli(ácido D, L-láctico-co-glicólico) (PLGA) incorporaban catalasa en su cavidad, de naturaleza hidrofílica, como agente generador de O₂, junto con agentes anticancerígenos de platino. Dado que en el interior de los tumores suele darse un ambiente oxidante, la concentración de H₂O₂ es más alta en las células cancerígenas, por lo que su entrada en las nanopartículas provoca un aumento de la concentración de O₂ en su interior que se traduce en un aumento de la presión interna, que rompe la cubierta. De esta forma, las nanopartículas podrían descargar selectivamente los fármacos encapsulados en su interior en virtud de los altos niveles de estrés de ROS en

las células cancerosas, lo que resultaría en la apoptosis celular. Además, el O₂ producido en el proceso de liberación del fármaco puede ser útil para superar la multirresistencia (MDR) de las células tumorales inducida por la hipoxia y mejorar la eficacia de la quimioterapia contra el cáncer.

PLGA (mg)	PVA ^a (%, w/w)	Mean diameter (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
5	1	239	0.17	-19
	2	223	0.19	-20
	4	216	0.13	-25
10	1	245	0.18	-15
	2	230	0.11	-18
	4	224	0.14	-20
20	1	269	0.21	-11
	2	257	0.17	-13
	4	246	0.19	-15

Tabla 5. Diámetro principal, potencial zeta y polidispersidad de las diferentes nanopartículas preparadas.

En 2014, R. Li et al.²⁰ publicaron un novedoso sistema de respuesta a tres estímulos diferentes. Dicho sistema está compuesto por: un núcleo de poli(ácido metacrílico/N,N-bis (acriloil)cistamina, o también llamado (p(MAA/BAC)), sensible al pH; un recubrimiento de poli(N-isopropilacrilamida/glicidilmetacrilato/N,N-bis(acriloil)cistamina), o también llamado [p(NIPAAm/GMA/BAC)], que es termosensible en disolución acuosa, y ácido fólico en la superficie para dirigir la microesfera al tumor. Adicionalmente, el agente reticulante N,N-bis (acriloil)cistamina (BAC) también puede ser activado por el glutatión (GSH) mediante la reducción de su enlace disulfuro, lo que otorga a las microesferas degradabilidad inducida por redox y características de liberación del fármaco.

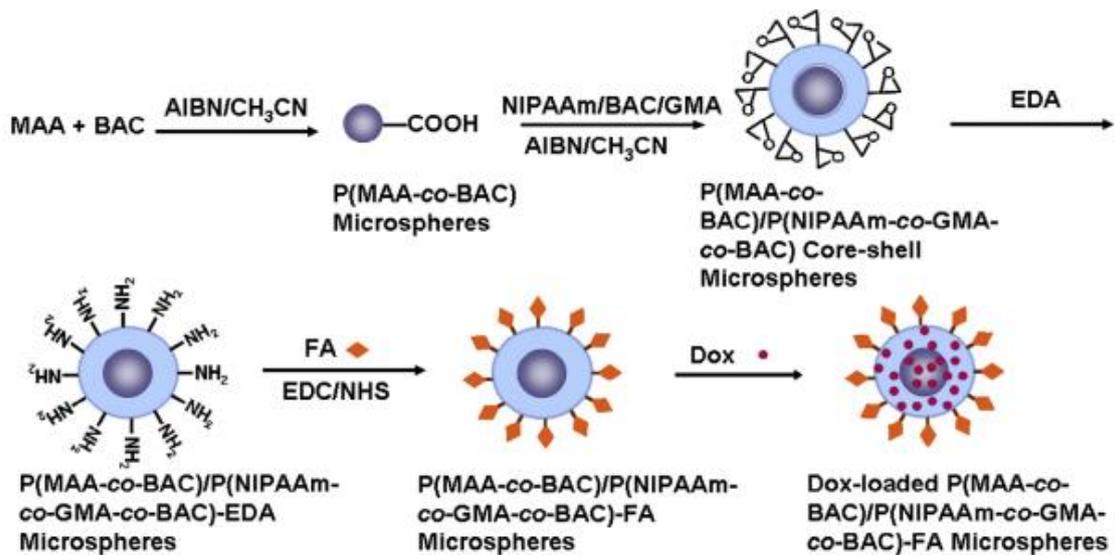


Fig. 5. Esquema de la síntesis de las microesferas.

En 2013 C. Ansari et al.²¹ diseñaron y caracterizaron un novedoso y multifuncional sistema de nanopartículas “teranósticas” (terapéuticas + diagnósticas) (TNPs) descritas para una activación enzima-sustrato en el lugar del tumor *in vivo* (Fig.6), comprobable a través de imagen por resonancia magnética del fármaco liberado. Estas TNPs, consisten en un núcleo de hierro superparamagnético y un recubrimiento de carboximetildextrano

En este estudio se utilizó ITC3104, que contiene una secuencia de péptidos con fluoresceína: FITC-βAla-Cys-Arg-Ser-CitGly-HPhe-Tyr-Leu-Tyr que son reconocidos por MMP-14, un enzima que se encuentra en el lugar del tumor y que escinde específicamente entre glicina y homofenilalanina (HPhe). Por lo que en caso de ocurrir la reacción en el entorno tumoral, podría ser detectado por resonancia magnética por imagen.

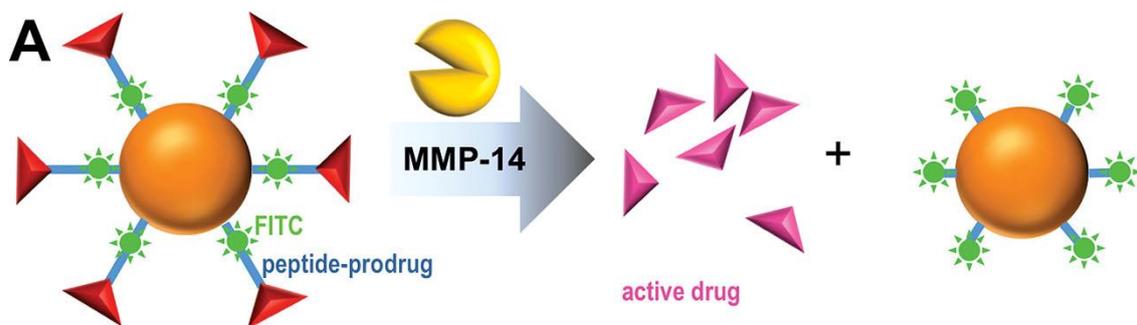


Fig. 6. Representación esquemática de las nanopartículas teranósticas activadas por MMP-14

La figura 7 resume los diversos estímulos descritos en la literatura y los parámetros que controlan la liberación. El área de los diferentes sectores es proporcional al grado de aplicación de los diferentes estímulos. La variación del pH, en verde, es indudablemente el estímulo más frecuente a la hora de controlar la liberación, debido a que se puede utilizar asociado con gran parte de los materiales descritos y a que su implementación es generalmente simple. La liberación controlada por luz (color azul claro) también se utiliza ampliamente, especialmente con luz UV, pero aun supone un desafío importante desarrollar nuevos carriers capaces de trabajar bajo la irradiación con diferentes longitudes de onda, con el fin de conseguir un mayor número de aplicaciones. Se precisa más investigación en este sentido para conseguir en terapia contra el cáncer el grado de desarrollo que ya existe con otras longitudes de onda en otros campos (la luz roja o láser en campo médico, la luz visible en agricultura...). Asimismo, existen otros sistemas de liberación controlada por estímulos menos utilizados, como el potencial redox o estímulos térmicos, pero con beneficios específicos que hay que seguir estudiando.

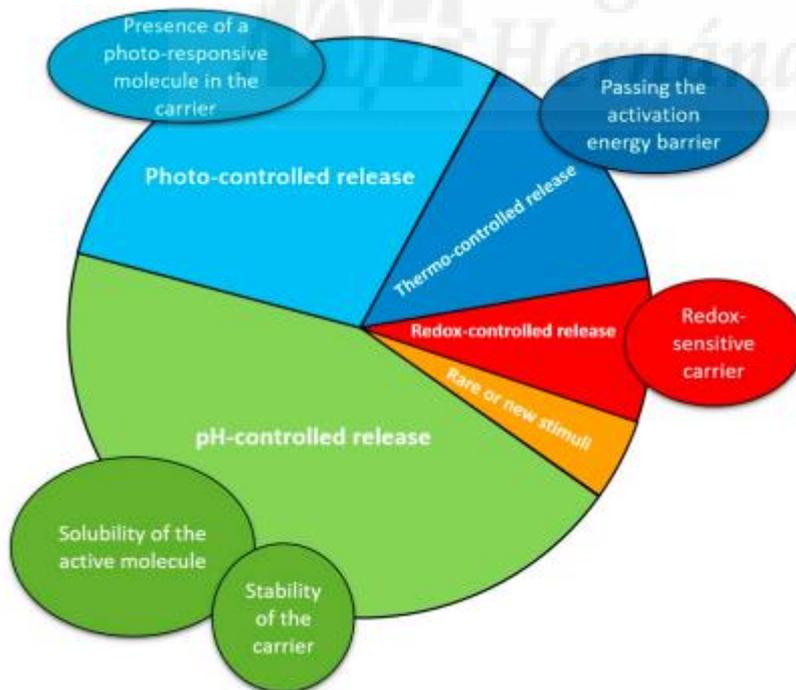


Fig. 7. Esquema de las diferentes formas de liberación controlada y porcentaje de estudio.

RESULTADOS

En esta sección pasaremos a hablar de los resultados obtenidos en algunos de los estudios comentados en la sección anterior.

5. Liberación de fármacos en función del pH del medio

En cuanto a los nanotubos de sílice, éstos fueron cargados positiva y negativamente con DOX y FLU respectivamente.

La figura 8 muestra la liberación de moléculas de DOX de PAH/ PSS-MSNT en disoluciones de diferentes valores de pH durante un período de 48 h. Se observa que la liberación de DOX aumentó al disminuir el pH de 8,0 a 1,2: el sistema de administración exhibió sólo un 17% de liberación de DOX a pH 8,0 durante 48 h, pero superior al 95% a pH 1,2 en 16 h. Estos datos sobre la liberación de DOX en los PAH/PSS-MSNT pueden explicarse básicamente de la siguiente forma: el recubrimiento multicapa en MSNT está formado por un polielectrolito fuerte (PSS, pKa 2,0) con un grado de ionización independiente de las condiciones ambientales, y un polielectrolito débil (PAH, pKa 9,0), cuyo grado de ionización depende del pH. Cuando éste es neutro, los grupos laterales positivos y negativos (NH_3^+ y SO_3^-) de los polielectrolitos se compensan. Al disminuir el pH, los grupos amino de PAH se ionizan gradualmente y, al mismo tiempo, los contraiones se ven atraídos a la multicapa para compensar el exceso de carga neta de PAH, lo que conduce a un aumento de la presión osmótica. Posteriormente, las moléculas de agua difunden en la multicapa desde la disolución, impulsada por esta diferencia de presión osmótica.

Como resultado, la multicapa comienza gradualmente a hincharse y desarrolla una arquitectura porosa o defectos locales que facilitan la permeabilidad de las moléculas de fármaco. Adicionalmente, el aumento de la repulsión electrostática entre las moléculas del fármaco y las partículas de PAH/PSS-MSNT podría ser otro factor importante en la liberación acelerada de DOX con un pH decreciente. Por lo tanto, los MSNT recubiertas de PAH/PSS podrían considerarse aplicables en la liberación de moléculas de fármaco con control de pH.

En contraste con la liberación de DOX, la liberación de FLU de los ALG/CHI-NH₂-MSNT disminuyó al disminuir pH de 8,0 a 4,0 (Fig. 9). Este sistema de administración mostró una liberación de casi el 84% de FLU a pH 8,0 durante

6,5 h, pero inferior al 38% a pH 4,0. Una posible explicación de las diferencias en la liberación de DOX y FLU podría ser la presencia de diferentes grupos funcionales entre PAH/PSS y ALG/CHI, y los diferentes signos de las cargas en las moléculas de DOX y FLU. Los valores de pK_a de las unidades de ácido manurónico y ácido glucurónico de la cadena ALG son 3,4 y 3,7, respectivamente, mientras que el pK_a del chitosan es 6,3.²² Por tanto, a pH 8,0, los grupos amino de CHI se encuentran mayoritariamente no ionizados, mientras que los grupos carboxílicos de ALG están principalmente en la forma COO^- . En este caso, los contraiones (K^+ , Na^+ , etc.) difundirían en el recubrimiento multicapa para compensar el exceso de carga neta de ALG, que daría lugar a una hinchazón osmótica de la multicapa y una arquitectura porosa. Esta arquitectura, junto con repulsión electrostática entre grupos COO^- de las moléculas FLU y las capas ALG, facilitaría la liberación de FLU en los ALG/CHI- NH_2 -MSNT a pH 8,0. Con una disminución gradual del pH de 8,0 a 4,0 los grupos amino en CHI se ionizarían progresivamente a NH_3^+ . Así, la menor presencia tanto de COO^- como el aumento de NH_3^+ podría mejorar cada vez más la estabilidad en la multicapa ALG/CHI, lo que inevitablemente conduciría a una permeabilidad deficiente. Comparando la figura 8 con la figura 9, se puede ver que la liberación de FLU alcanza el equilibrio más rápidamente que la de DOX. La razón probable es que los polisacáridos ALG y CHI tienen una afinidad más fuerte por el agua que los PAH/PSS y sus matrices están altamente hidrolizadas, por lo que los fármacos hidrofílicos de bajo peso molecular podrían difundirse más fácilmente.

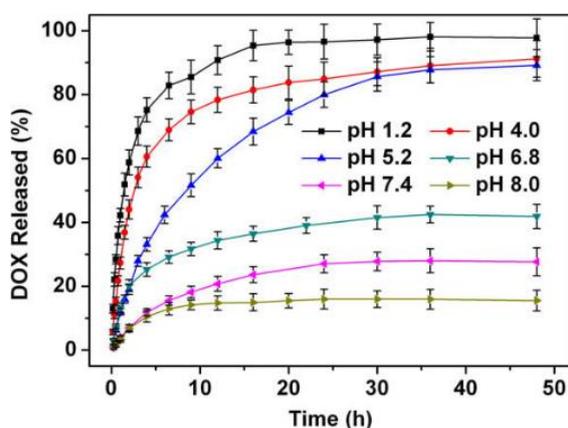


Fig 8. Porcentaje de liberación de DOX de los PAH/PSS-MNSTs en diferentes medidas de pH.

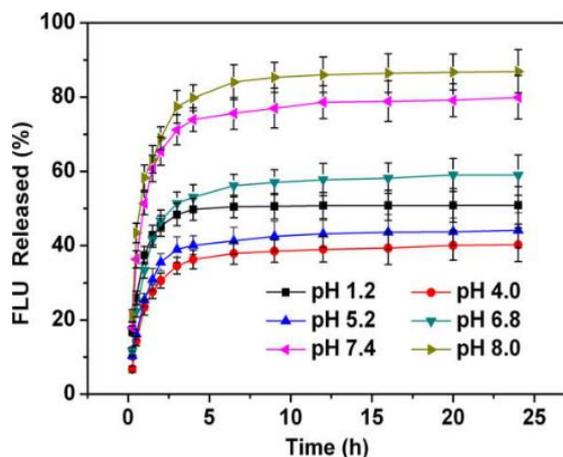


Fig. 9. Porcentaje de liberación de FLU de los ALG/CHI-NH₂-MSNTs.

Para comprobar adicionalmente la sensibilidad al pH de los nanotubos (Fig. 10) se ensayó la citotoxicidad de DOX cargada contra células HT-1080 y MCF-7 en cultivo a pH 7,4 y 6,8. Al analizar la Fig. 10A se observa una mayor citotoxicidad contra las células HT-1080 a pH 6,8 frente al fisiológico, 7,4, en las concentraciones de DOX 50, 100 y 500 ng·ml⁻¹ ($p < 0,05$).

Por el contrario, la citotoxicidad del DOX libre frente a las células HT-1080 no mostró diferencias significativas entre el cultivo a pH 7,4 y pH 6,8 para las mismas concentraciones de DOX ($p > 0,05$). Esto se debe probablemente a la mayor liberación de DOX de las PAH/PSS-MSNT a un pH de 6,8 que a un pH de 7,4, como se muestra en la Fig. 9. También se pueden encontrar resultados similares en la citotoxicidad dependiente de pH de los nanotubos cargados con DOX contra las células MCF-7 en la figura 10 B. Además, los compuestos en blanco sin DOX no mostraron citotoxicidad contra células HT-1080 y MCF-7 en medios de cultivo de pH 7,4 y 6,8. Todas estas observaciones proporcionan una evidencia adicional de que estos nanotubos fabricados son sensibles al pH.

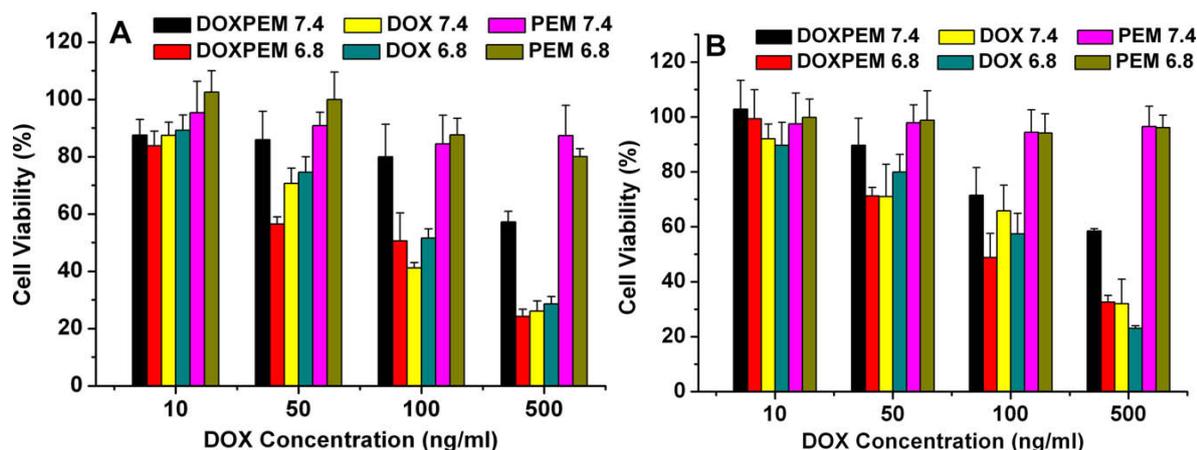


Fig. 10. Citotoxicidad de los nanotubos PAH/PSS cargados con DOX contra las células (A) HT-1080 y (B) MCF-7 en cultivo.

En el estudio de Y.-T. Chiang y C.-L. Lo se realizaron ensayos *in vitro* e *in vivo*. En estos ensayos se estudiaron y compararon los efectos citotóxicos del DOX libre, los liposomas con polímeros incorporados cargados con DOX, y liposomas con polímeros y moléculas diana para la matriz extracelular tumoral (ECM) cargados con DOX. Este ensayo *in vitro* fue realizado en medio McCoy a pH 7,4 y 6,5. En la figura 11 podemos observar que a pH 7,4 y 37°C, la viabilidad de las células tratadas con los liposomas cargados con una concentración fija de DOX con diana y sin diana no mostró diferencias significativas. Sin embargo, a un pH de 6,5 y 37°C, los liposomas con diana tuvieron una mayor citotoxicidad que los liposomas sin diana, lo que demuestra que un pH bajo alrededor del tumor puede mejorar la orientación y la citotoxicidad. Además, las células HCT116 también se incubaron a pH 6,5 y 4°C para permitir la interacción de la membrana celular y la biotina. Después de 2 h de incubación, las células HCT116 se calentaron a 37°C para la internalización celular. Los resultados analíticos muestran que los liposomas dirigidos tenían mayor citotoxicidad que los liposomas sin diana. La prueba se realizó para que la biotina compitiera con el receptor de biotina en la superficie de las células HCT116.

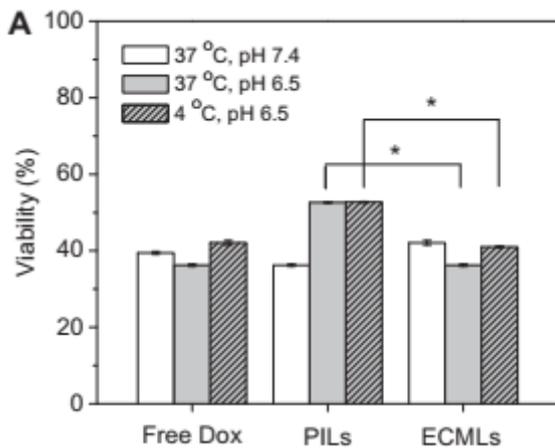


Fig. 11. Citotoxicidad de DOX libre, PILs cargados con DOX y Liposomas cargados con DOX con diana (ECMLs).

En el ensayo *in vivo*, los liposomas se marcaron con Cy5.5 y se administraron a ratones portadores de tumores HCT116, por inyección intravenosa a través de la cola para evaluar directamente la capacidad de respuesta al pH en animales. Todos los ratones se sacrificaron 24 h después de la inyección y sus órganos principales se recogieron para observar las intensidades fluorescentes de los liposomas mediante el sistema IVIS. Los resultados muestran que una gran cantidad de liposomas dirigidos a ECM cargados con DOX se acumularon en el tumor (Fig. 12).

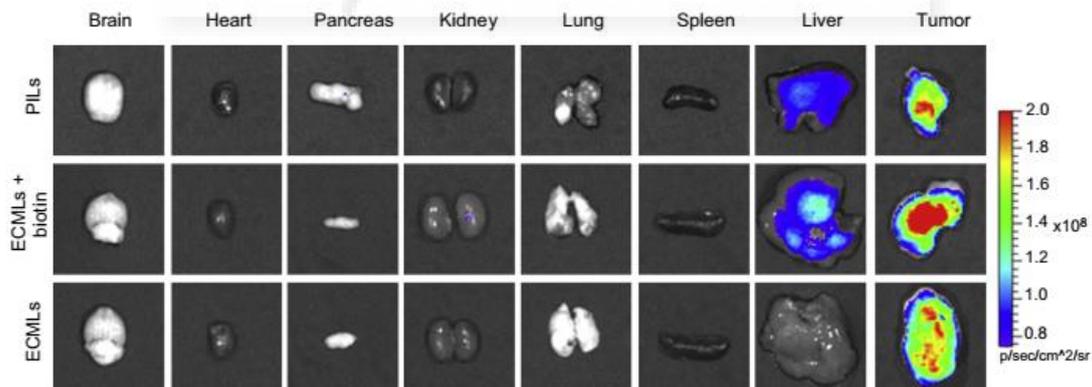


Fig. 12. Estudio de acumulación en tejidos en ratones a las 24 h post-inyección de liposomas con polímero incorporado (PILs) unidos a Cy5.5 y cargados con DOX.

Para evaluar la eficacia terapéutica de los liposomas, los ratones que portaban células de cáncer de colon HCT116 se trataron con DOX libre, liposomas cargados sin diana y liposomas cargados con diana. A los ratones se les inyectó un total de 20 mg/kg de doxorubicina en concentraciones ajustadas

en los días 0 y 7. La Fig. 13 muestra la inhibición tumoral y la citotoxicidad en ratones tratados con fármacos y carriers con fármacos después de 27 días. Los tumores en el grupo control crecieron con el tiempo. En comparación con los ratones de control, los que fueron tratados con DOX libre, liposomas sin diana y los liposomas dirigidos cargados con DOX inhibieron el crecimiento del tumor. En particular, los liposomas dirigidos a la ECM descargados mostraron la mejor eficacia de la terapia contra el cáncer. Por lo tanto, el sistema de liposomas dirigido a la ECM mejoró la orientación, tuvo un excelente efecto terapéutico y redujo la incidencia de los efectos secundarios.

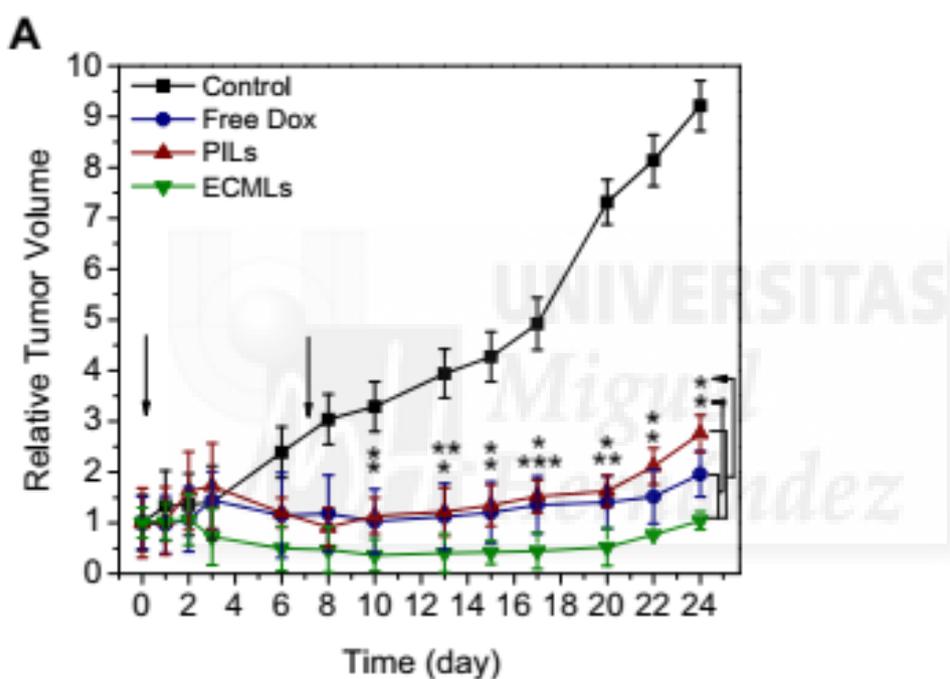


Fig. 13. Inhibición del crecimiento tumoral *in vivo*.

Para evaluar más a fondo las relaciones entre el efecto dirigido y la acumulación, se observaron secciones de tejido específicas (Anexo 2).

6. Liberación de fármacos en función de la temperatura

En el estudio de F. Liu et al. se realizó un ensayo *in vitro* para evaluar las propiedades terapéuticas de las vesículas PVCL₁₀-PDMS₆₅-PVCL₁₀ cargadas con DOX. En primer lugar, se incubaron células de adenocarcinoma A549 alveolar humano con vesículas sin DOX y cargadas con dicho fármaco, con diferentes concentraciones y tiempos de incubación (24, 48 y 72 h), a pH 7,4 y

37°C. La solución sin DOX (PBS, pH 7,4, 37°C) con la concentración correspondiente a las alícuotas de vesículas se usó como control positivo para la citotoxicidad celular, mientras que las células no tratadas se usaron como control negativo. La viabilidad de las células incubadas con las vesículas PVCL₁₀-PDMS₆₅-PVCL₁₀ sin DOX no disminuyó con el tiempo, manteniéndose por encima del 90% incluso después de 72 horas de incubación (Fig. 14). Ello indica que sin DOX las vesículas no fueron tóxicas para las células cancerosas. Por el contrario, cuando los polímerosomas PVCL₁₀-PDMS₆₅-PVCL₁₀ cargados con DOX se incubaron con las células, la viabilidad celular disminuyó gradualmente a lo largo de la incubación (Fig. 14b, c): después de 24 y 48 h de incubación, la viabilidad celular disminuyó de $85 \pm 1\%$ a $59 \pm 5\%$ para las vesículas que contenían $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de DOX, y de $71 \pm 1\%$ a $50 \pm 2\%$ para las que contenían $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, lo que demuestra que a mayor concentración de DOX, la viabilidad disminuye (Fig. 14b, c). Sin embargo, tras 48 h de exposición, la viabilidad celular se mantuvo estable, lo que implica una saturación en la liberación de DOX para ambas concentraciones. A diferencia de los polímerosomas cargados con bajas concentraciones de DOX, las muestras que contenían 1 y $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de DOX continuaron eliminando células durante todo el período de incubación de 72 h, con una citotoxicidad celular superior a 75 y 97%, respectivamente. Asimismo, se observa que una liberación intracelular sostenida

de DOX desde las vesículas cargadas es más eficiente que DOX libre a la hora de destruir células cancerosas.

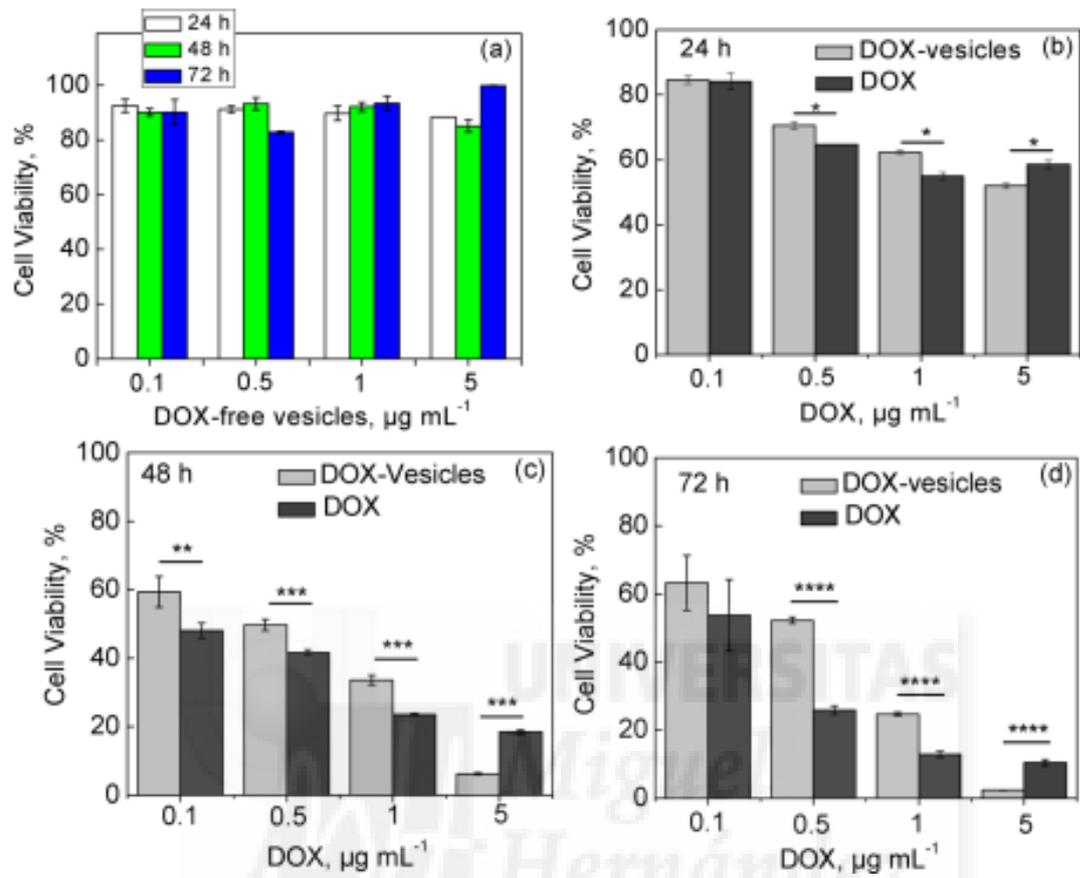


Fig. 14. Viabilidad del % de células A549 después de la incubación con diferentes concentraciones y a diferentes tiempos de incubación. (* $p < 0,008$, ** $p < 0,02$, *** $p < 0,002$, **** $p < 0,0001$).

7. Liberación de fármacos en función del potencial redox

En el estudio de C. Shi et al. se realizaron varios ensayos *in vitro* e *in vivo* para determinar la liberación, el efecto citotóxico, el consumo de fármaco por parte de las células cancerígenas, y la biodistribución y acumulación por los tejidos.

Inicialmente se realizó un ensayo para comprobar la citotoxicidad de las micelas en forma de estrella sin DOX frente a las células HeLa correspondientes a adenocarcinoma de cérvix. Dichas células se cultivaron durante 24 h con las micelas, comprobándose que podrían ser un vehículo exitoso que no produjera citotoxicidad. A continuación se comprobó la liberación del fármaco *in vitro* con el fin de confirmar si las micelas cargadas con el fármaco presentaban un perfil de liberación positivo. La Fig. 15 muestra la liberación de DOX de las micelas DOX @ star-PECLss-AF en ABS (pH 5,0) y PBS (pH 7,4) con diferentes concentraciones de GSH. En ausencia de GSH, sólo alrededor del 10% del DOX se liberaba a pH 7,4 en 72 h. Se obtuvo un resultado similar en el medio con GSH 10 mM a pH 7,4, análogo al entorno físico-químico del torrente sanguíneo.

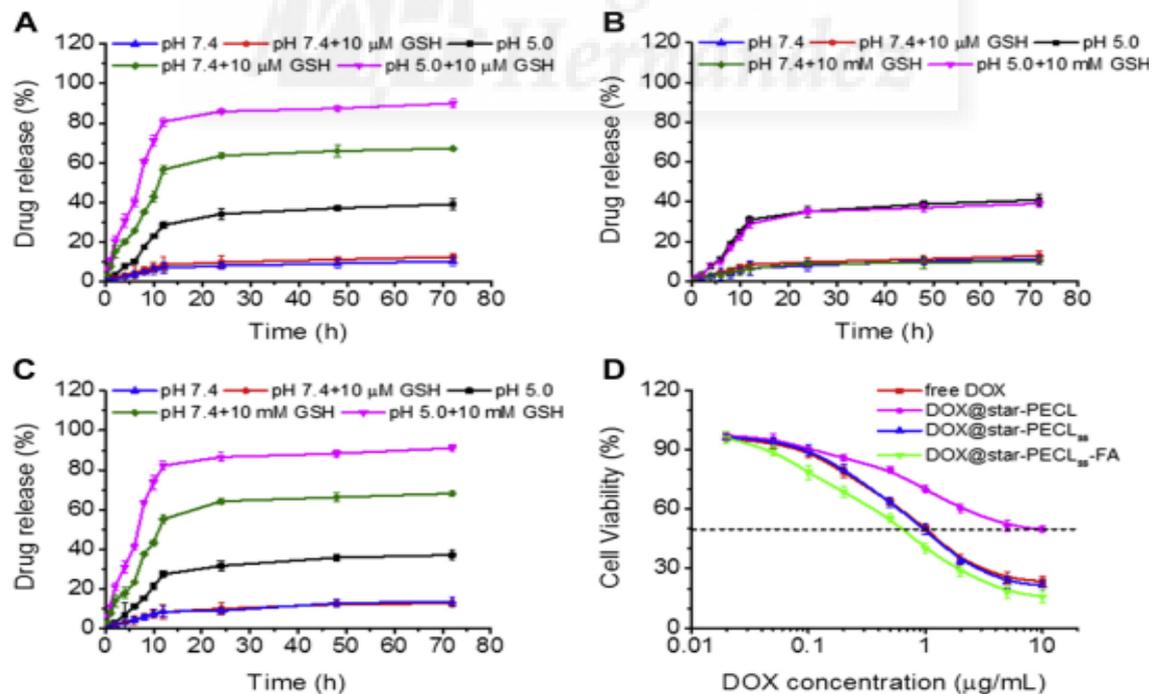


Fig. 15. Liberación *in vitro* de las micelas star-PECLss-AF(A), star-PECL (B) y star-PECLss con concentraciones de 0,10 μM, 10 mM de GSH en PBS (pH 7,4) and ABS (pH 5,0) a 37°C.

Se demostró que las micelas cargadas de DOX son altamente estables en la sangre, probablemente debido a las interacciones hidrófobas entre el núcleo de PCL y las moléculas de DOX. Al disminuir el pH hasta 5,0, la cantidad de DOX liberada aumentó sin GSH, lo cual significa que el DOX difunde desde las micelas poliméricas con mayor facilidad a un valor bajo de pH debido al aumento de la solubilidad del DOX. Del análisis de las curvas, sin embargo, se deduce que el factor dominante que desencadena la liberación del fármaco es fundamentalmente la concentración de GSH. A pH 5,0, con una concentración 10 mM de GSH, la cantidad liberada de DOX de las micelas con ácido fólico y enlace disulfuro aumentó drásticamente, alcanzando el 85,9% en las primeras 24 h, lo que demuestra que el DOX cargado en micelas podría liberarse rápidamente en la matriz ácida extracelular. Además, en el medio con GSH 10 mM a pH 7,4, la cantidad de liberación del fármaco fue de 67,2% en 72 h, acelerada en comparación con aquellos sin 10 mM GSH. La Fig. 15B muestra el comportamiento de liberación de fármaco de las micelas DOX @ star-PECL sin enlaces disulfuro ni ácido fólico (AF). Al no contener enlaces disulfuro, la concentración de GSH no tuvo efecto sobre la liberación de la DOX. A partir del perfil de liberación de las micelas DOX @ star-PECLs con enlaces disulfuro pero sin AF (Fig. 15C), podemos observar que el comportamiento es similar con la figura 15A. Estos resultados indican que la rotura de enlaces disulfuro se produce mediante la activación por GSH.

La captación celular de las diferentes formulaciones de DOX se analizó mediante microscopía de barrido láser confocal (CLSM). Las células HeLa se incubaron con micelas libres sin DOX o con DOX durante 3 h. Como se muestra en la Fig. 16, las células HeLa tratadas con micelas conjugadas con DOX y AF o las tratadas con DOX libre exhiben una captación celular significativamente mayor que las otras dos micelas sin conjugar. Sin embargo, estos resultados provienen de diferentes mecanismos internalizadores. Mientras la DOX libre entró en las células a través de la difusión pasiva y difundió hasta el núcleo, la intensa fluorescencia observada en las células incubadas con micelas

DOX @ starPECLss-AF indica que la captación celular mejora a través de un mecanismo de endocitosis mediada por el receptor de ácido fólico. El color superpuesto en la imagen fusionada sugiere que el DOX liberado de las micelas DOX @ star-PECLss-AF se distribuyó en los núcleos, mientras las micelas no dirigidas mostraron una menor captación celular sin el efecto de los ligandos de AF. Además, las micelas DOX @ star-PECL no mostraron el fenómeno de internalización por endocitosis porque las partículas eran demasiado grandes como para entrar en los poros del núcleo.

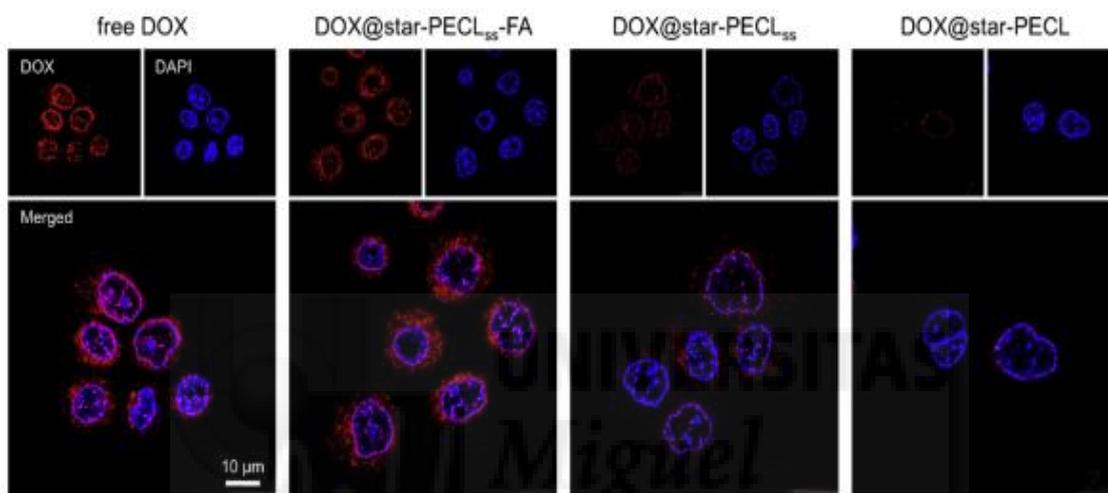


Fig. 16. Microscopía por imagen confocal.

Para verificar más a fondo la capacidad de respuesta activa y redox, se llevó a cabo la administración de fármacos *in vivo* utilizando estas micelas. Los ratones con tumor 4T1 recibieron diferentes inyecciones de micelas a través de la vena de la cola, y se monitorizó la fluorescencia de DOX a diferentes intervalos de tiempo. Como se muestra en la Fig. 17, las micelas conjugadas con AF presentaron la mejor acumulación de DOX en el tumor a lo largo de todo el período de tiempo examinado. En comparación con el grupo DOX @ star-PECL, que no tenía ni selectividad ni grupos reducibles, las micelas de DOX @ star-PECLss mostraron una fluorescencia de DOX más obvia en el tumor. Para estudiar más a fondo la biodistribución *in vivo*, se extirparon los órganos viscerales principales (hígado, corazón, bazo, pulmón, riñón) y los tumores después de la inyección de 24 h.

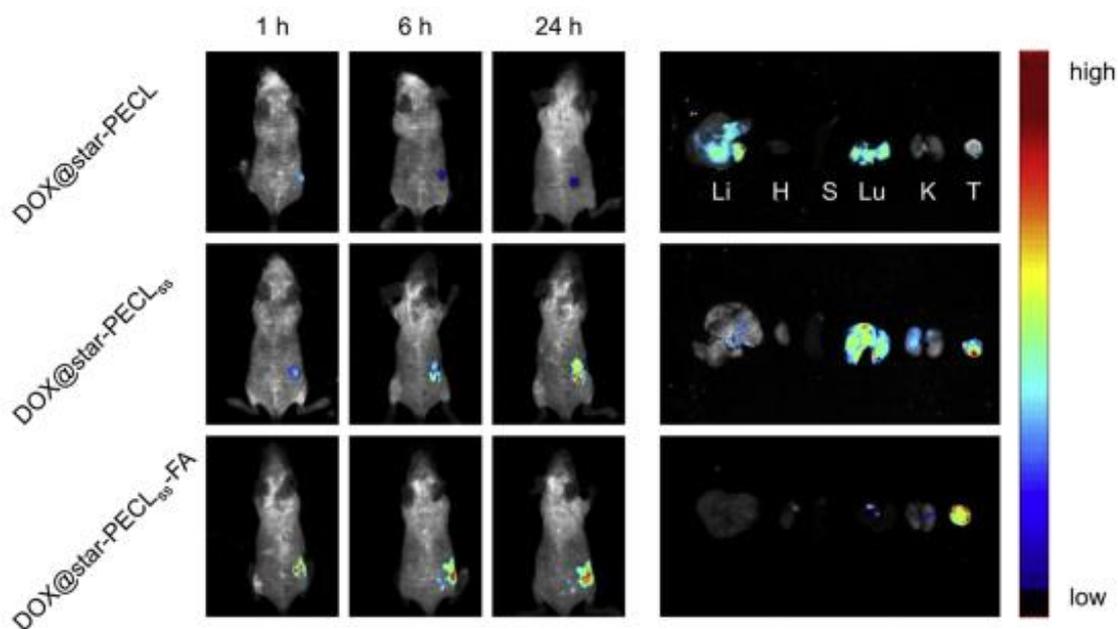


Fig. 17. Imágenes con fluorescencia *in vivo* tras 1 h, 6 h, 24 h de la inyección. El hígado, el corazón, el bazo, el pulmón, el riñón y el tumor fueron abreviados como Li, H, S, Lu, K y T.

En las imágenes anteriores, se observa que las micelas conjugadas con AF presentaron una intensa fluorescencia de DOX en el tumor. Por el contrario, la poca cantidad de DOX acumulada en los tejidos normales demuestra que esta formulación micelar exhibe una orientación eficiente y unos efectos secundarios limitados. Estos hallazgos parecen confirmar la capacidad de direccionamiento de las micelas conjugadas con AF, tanto *in vitro* como *in vivo*.

El efecto terapéutico *in vivo* de las micelas cargadas con el fármaco se estudió monitorizando el efecto antitumoral y la toxicidad sistémica de diferentes formulaciones inyectadas a ratones Balb / c. Las figuras 18A y B muestran que las micelas DOX @ star-PECL_{ss}-FA poseen el mayor efecto antitumoral entre todos los grupos, como se deduce del menor volumen de tumor tras la terapia. Los volúmenes de los tumores tratados con micelas DOX @ star-PECL_{ss} fueron únicamente 0,22 veces más pequeños que los tratados con micelas DOX @ star-PECL lo que sugiere que las micelas reductoras presentaron una mejor eficacia de inhibición. Ello podría atribuirse a la liberación

más rápida del fármaco debida a la reducción de los enlaces disulfuro. Mientras todos los grupos tratados con micelas con DOX muestran un cierto aumento en el peso corporal, (Fig. 18C), el grupo tratado con DOX libre sufrió una disminución debido obviamente a los graves efectos secundarios. Combinado con el resultado de la tasa de supervivencia (Fig. 18D), se llega a la conclusión de que mientras DOX libre tiene graves efectos secundarios durante el tratamiento, las micelas dirigidas y redox sensibles poseen un efecto antitumoral evidente con menores efectos adversos, lo que indica un mejor perfil de seguridad.

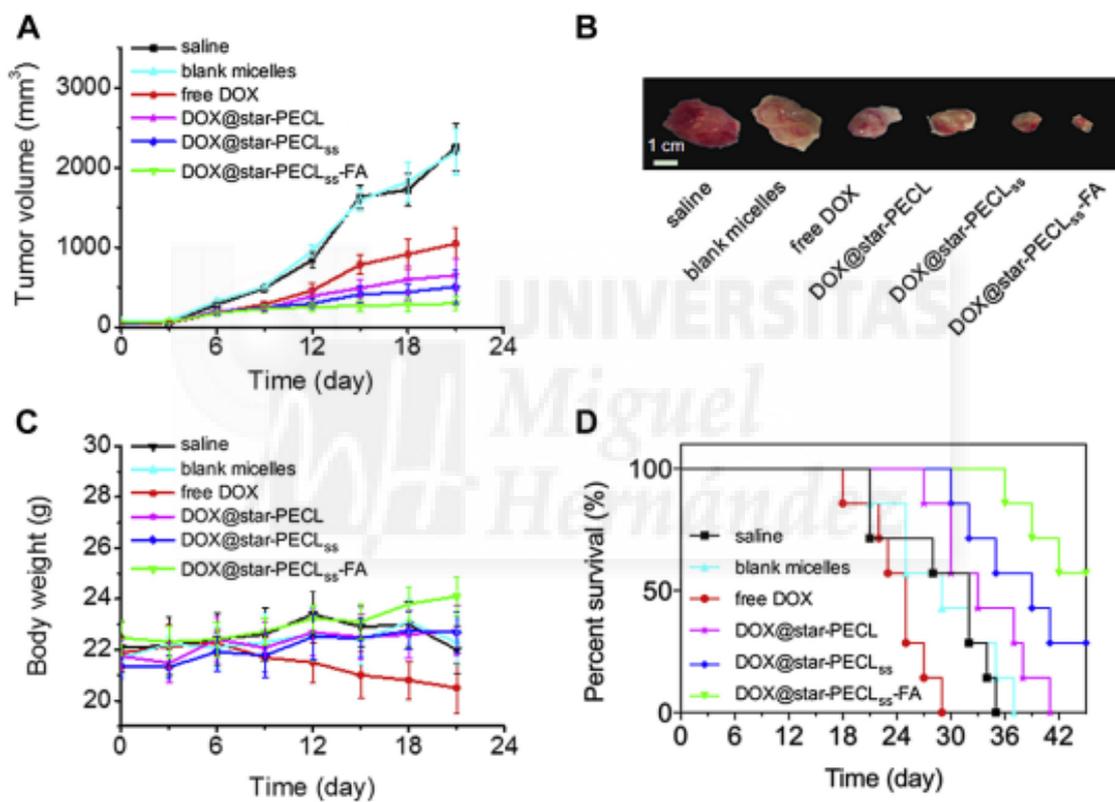


Fig. 18. Efecto antitumoral y toxicidad de los ratones tratados con DOX libre y micelas cargadas con DOX. Cambios en el volumen del tumor (A), extracción de tumores sólidos de diferentes grupos tratados durante 21 días (B), cambios en el peso corporal (C) y tasa de supervivencia.

8. Liberación de fármacos a través de múltiples estímulos

En este estudio, R. Li et al. realizaron un ensayo *in vitro* para evaluar las microesferas de P(MAA-co-BAC)/P(NIPAAm-co-GMA-co-BAC)-FA como carrier potencial para el tratamiento de los tumores. La eficiencia de las microesferas cargadas con el fármaco se determinó incubándolas durante 0,5 h con células MCF-7 de cáncer de pecho en presencia de AF-microesferas cargadas con DOX, microesferas cargadas con DOX, y DOX libre en concentración $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. En las imágenes de microscopía confocal se observa una fuerte fluorescencia dentro de las células MCF-7 tratadas con AF-microesferas con DOX, lo que indica una rápida internalización de las mismas y liberación del fármaco tras la incubación. En comparación, la intensidad de la fluorescencia del componente DOX en las células incubadas con las microesferas sin AF fue mucho más débil.

En el ensayo de citotoxicidad se buscó un polímero óptimo para transportar los medicamentos, que combinase una alta eficiencia de carga de medicamentos con una baja citotoxicidad.

En ensayos previos las microesferas sin medicamento no mostraron la toxicidad obvia incluso a una concentración de $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig 19A). Los resultados del ensayo de citotoxicidad (Fig. 19B) muestran que la citotoxicidad de las microesferas cargadas con DOX era muy similar a la de DOX libre a bajas concentraciones. Aunque la DOX libre mostró una toxicidad un poco más alta que las AF-microesferas a una concentración de DOX inferior a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, lo que pudo ser debido a una liberación parcial de DOX. A concentraciones de DOX de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ las microesferas cargadas con DOX eliminaron casi el 95% de las células MCF-7. Estos datos indicaron que las microesferas fueron absorbidas fácil y eficientemente por las células MCF-7 y se liberó la DOX en un microambiente intracelular ácido y reducido. La ventaja de las microesferas cargadas con DOX es que pueden comportar una baja citotoxicidad para las células normales debido a la menor pérdida de DOX durante la administración, y así las microesferas pueden ingresar en las células cancerosas y liberar su

carga útil de DOX mediante la reducción de GSH y los mecanismos de pH, con la consiguiente mejora de la eficiencia terapéutica.

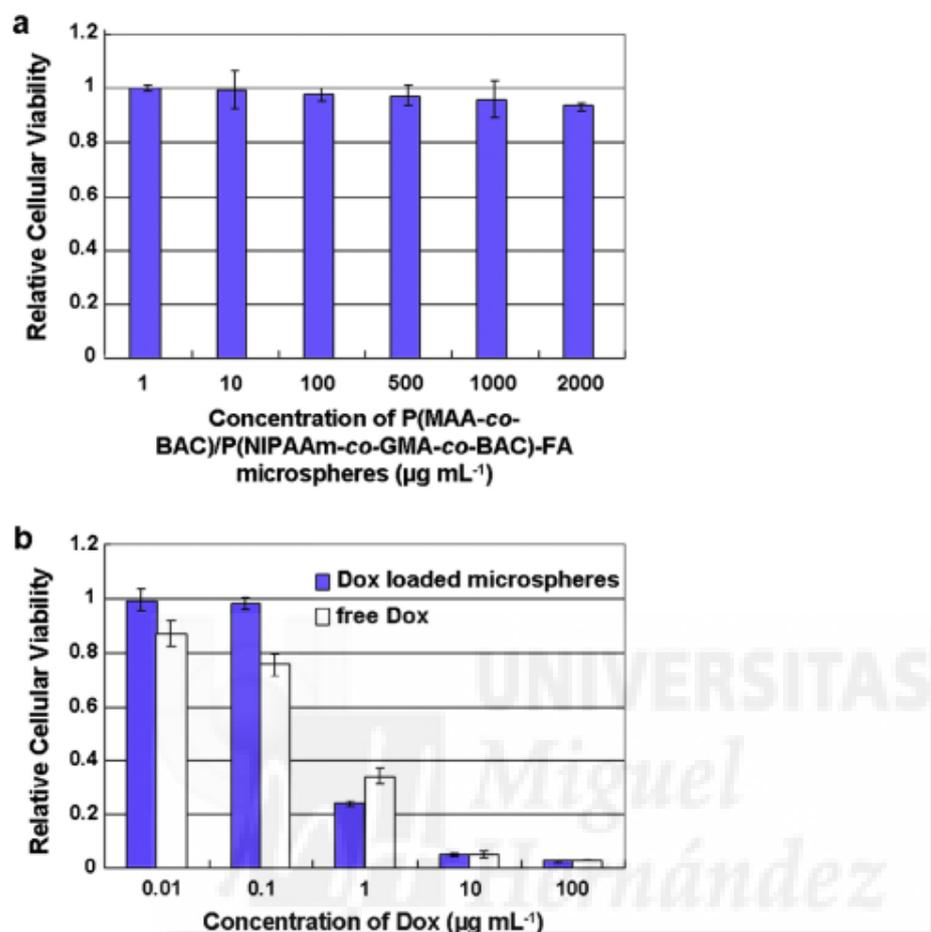


Fig. 19. Viabilidad celular relativa después del tratamiento con (A) microesferas de P(MAA-coBAC)/P(NIPAAm-co-GMA-co-BAC)-AF sin fármaco y (B) con microesferas con DOX y DOX libre.

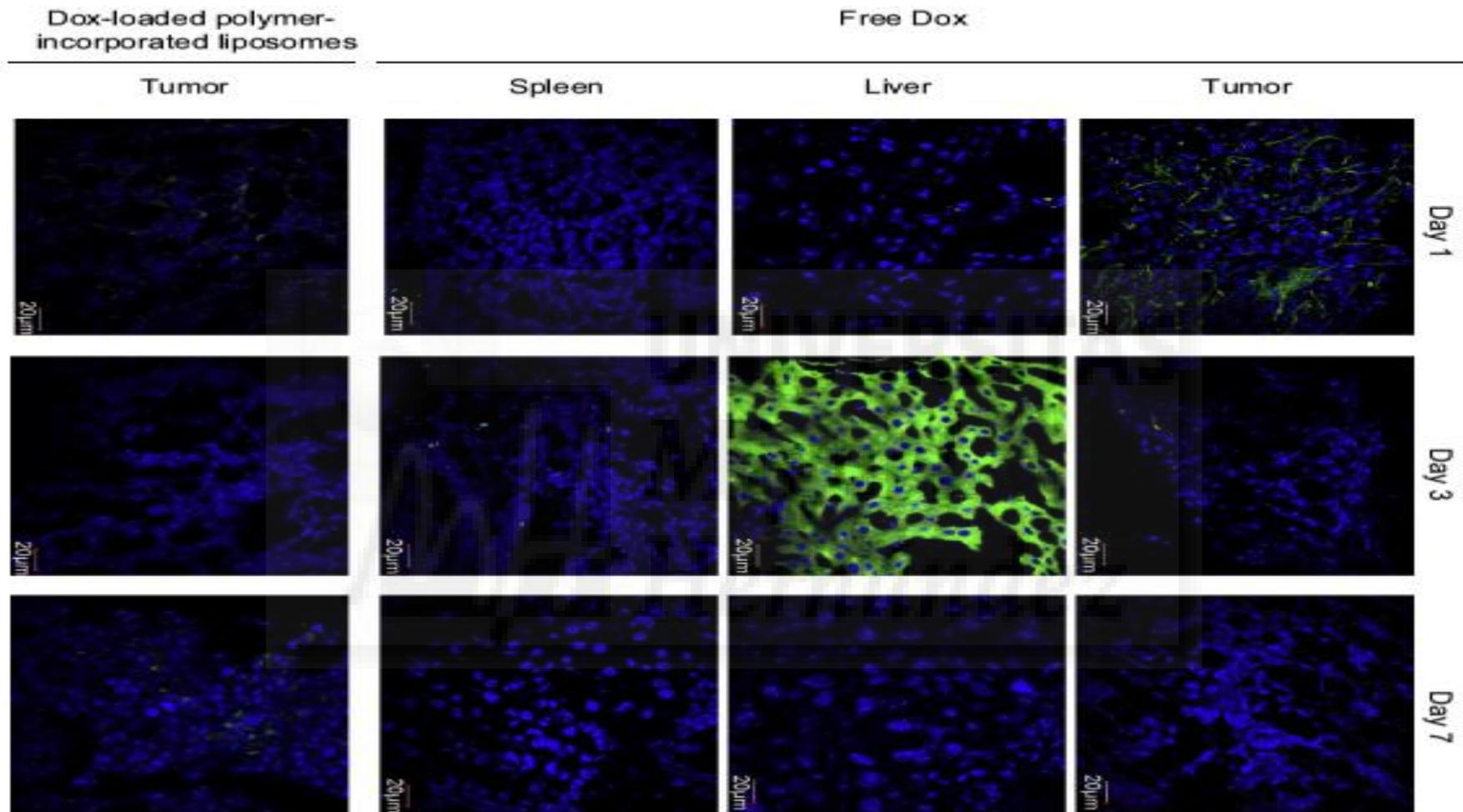
CONCLUSIONES

En los últimos años se ha descubierto información sobre las características del entorno de los tumores, que ha ayudado a abrir nuevas vías de tratamiento. Sin embargo, para poder llevar estos complicados tratamientos a la práctica clínica primero deben superarse aspectos como la complejidad en el diseño y el perfil de seguridad. El primero se traduce en la dificultad para trasladar los tratamientos a la producción industrial y que haya una relación positiva coste/beneficio; y el segundo es consecuencia de la falta de datos para validar que estos tratamientos puedan probarse en pacientes debido a la ausencia de mecanismos de degradación o biocompatibilidad insuficiente. Una de las vías que más investigación está suscitando es la utilización de nanoterapia basada en combinaciones de nanopartículas y fármacos, en las que las primeras se encargan de transportar a los segundos hasta los tumores, y una vez allí, los liberan de forma controlada, ayudando a minimizar los efectos secundarios. En resumen, estas formulaciones pueden proporcionar numerosos beneficios potenciales a los pacientes con cáncer, en base a nuevas ideas para la prevención, el diagnóstico, y el tratamiento de esta enfermedad.

Anexo

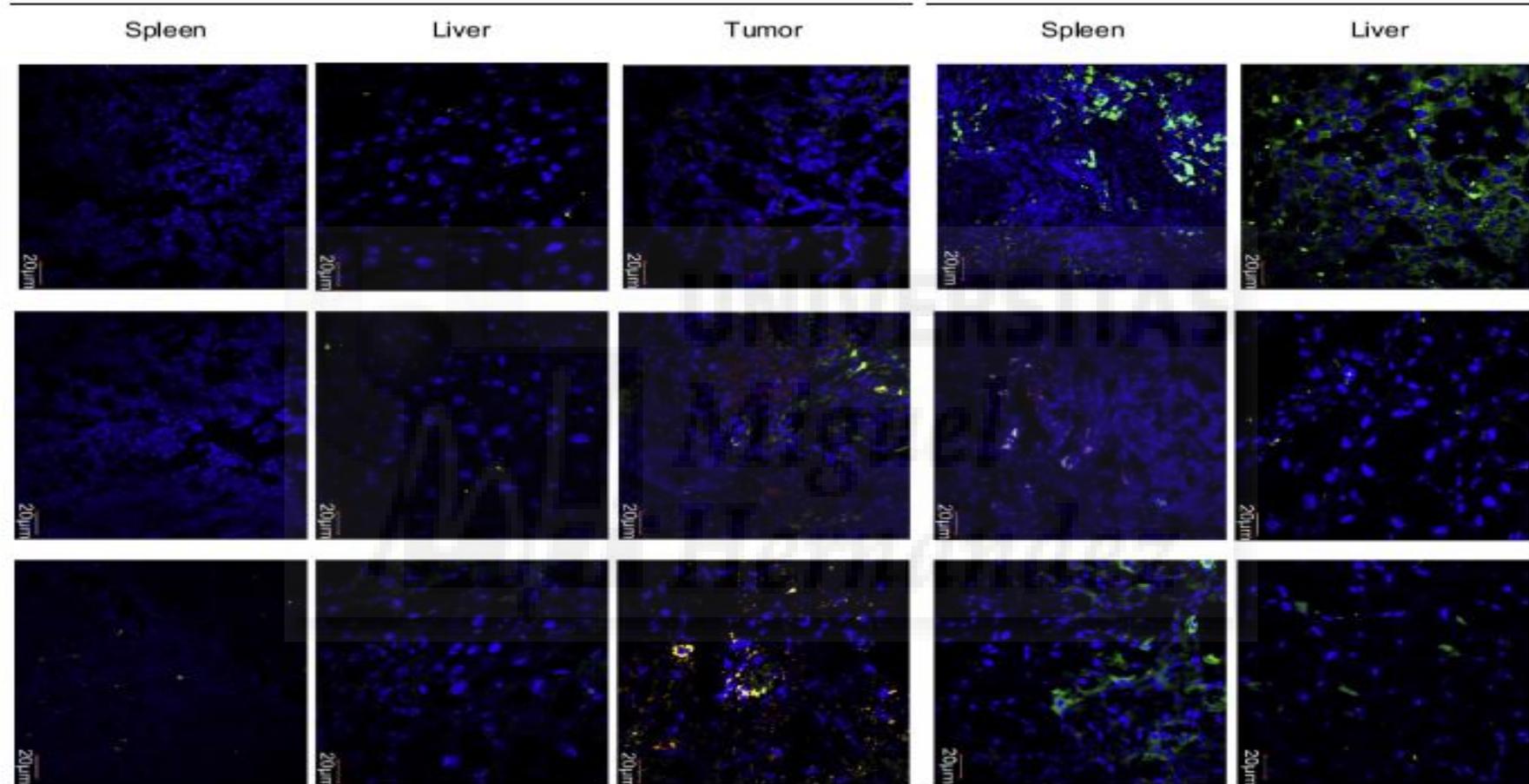
Estímulo	Tipo	Material	Modificaciones	Encapsulación	Condiciones
pH	Gel de Sílice	Nanotubos de Sílice	Polielectrolito	Carrier en contacto con HCl	25°C/10h /oscuridad/ pH= 2
	Biomoléculas	Liposomas	Lípidos nanoestructurados	Carrier en contacto con PBS	25°C/ pH= 7,4
Temperatura	Polímeros	Polivinil caprolactam	Polimerosomas	Carrier en contacto con agua	25°C/24h/
Redox	Polímeros	PCL-PEG	Ácido Fólico	Carrier en contacto con agua	25°C/5h
ROS	Nanopartículas	PLGA	Catalasa	(W/O/W) doble-emulsión	25°C/24h
Multi-estímulo	Microesferas	P(MAA-co-BAC)/P(NIPAAm-co-GMA-co-BAC)	Ácido Fólico	Carrier en contacto con acetonitrilo	37°C/ 3h/oscuridad
Enzimas	Nanopartículas	Óxido de hierro	CLIO		25°/2'5 h

Anexo 1. Ejemplos de materiales y formulaciones utilizados para la liberación retardada.



Anexo 2. Imágenes confocales del tumor, hígado y bazo a los días 1, 3 y 7 post inyección con DOX libre y liposomas con diána cargados con DOX para observar la órgano-distribución tiempo-dependiente.

Dox-loaded ECM-targeting liposomes



Anexo 2. Continuación

Bibliografía

1. Sociedad española de Oncología médica (SEOM) [Sede Web]. Madrid: SEOM; 2019, [2019]. Las cifras del cáncer en España 2019. <https://seom.org/dmccancer/wp-content/uploads/2019/Informe-SEOM-cifras-cancer-2019.pdf>
2. Organización mundial de la Salud (OMS) [Sede Web]. Ginebra: OMS; 2018, [2019]. Cáncer. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
3. Qiao Y, Wan J, Zhou L, Ma W, Yang Y, Luo W et al. Stimuli-responsive nanotherapeutics for precision drug delivery and cancer therapy: Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2019 Jan;11(1):e1527. [Doi: 10.1002/wnan.1527](https://doi.org/10.1002/wnan.1527).
4. Fang J, Nakamura H, Maeda H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. Adv Drug Deliv Rev. 2011 Mar 18;63(3):136-51. [Doi: 10.1016/j.addr.2010.04.009](https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.04.009)
5. Kim, H. C., Kim, E., Lee, S. G., Lee, S. J., Jeong, S. W., Hal, T. L. et al. Folic acid-functionalized polythiophene for targeted cellular imaging. Journal of Nanoscience and Nanotechnology. 2016; Jun16(6) 189-195. [Doi: 10.1166/jnn.2016.10683](https://doi.org/10.1166/jnn.2016.10683)
6. Minko, T. Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates. Advanced Drug Delivery Reviews, 2004; 56, 491–509. [Doi: 10.1016/j.addr.2003.10.017](https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.017)
7. David A., Kopecková P., Kopecek J., Rubinstein A. The Role of Galactose, Lactose, and Galactose Valency in the Biorecognition of N-(2-Hydroxypropyl)Methacrylamide Copolymers by Human Colon Adenocarcinoma Cells. Pharm Res. 2002 Aug;19(8):1114-22. [PMID: 12240936](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12240936/)
8. Li, Q., Tang, Q., Zhang, P., Wang, Z., Zhao, T., Zhou, J. et al. Human epidermal growth factor receptor-2 antibodies enhance the specificity and anticancer activity of light-sensitive doxorubicin-labeled liposomes. Biomaterials, 2015; 57, 1-11 [Doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.04.009](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.04.009)
9. Steinhäuser, I., Spänkuch, B., Strebhardt, K., & Langer, K. Trastuzumab-modified nanoparticles: Optimisation of preparation and uptake in cancer cells. Biomaterials, 2006; 27, 4975-4983. [Doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.05.016](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.05.016)
10. Rowinsky, E. K. The erbB family: Targets for therapeutic development against cancer and therapeutic strategies using monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. Annual Review of Medicine, 2004; 55, 433–457. [Doi: 10.1146/annurev.med.55.091902.104433](https://doi.org/10.1146/annurev.med.55.091902.104433)
11. Sugahara, K. N., Teesalu, T., Karmali, P. P., Kotamraju, V. R., Agemy, L., Girard, O. M. Ruoslahti, E. Tissue-penetrating delivery of compounds and nanoparticles into tumors. Cancer Cell, 2009; 16, 510-520 [Doi: 10.1016/j.ccr.2009.10.013](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.10.013)
12. Craik, D. J., Fairlie, D. P., Liras, S., & Price, D. The future of peptide-based drugs. Chemical Biology & Drug Design, 2013; 81, 136-147. [Doi: 10.1111/cbdd.12055](https://doi.org/10.1111/cbdd.12055).
13. Bruneau M, Bennicia S, Brendle J, Dutournie P, Limousy L, Pluchon S. Systems for stimuli-controlled release: Materials and applications Journal of Controlled Release Volume 294, 28 January 2019, Pages 355-371. [Doi: 10.1016/j.jconrel.2018.12.038](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.12.038)
14. Yang, Y.-J., Tao, X., Hou, Q., Ma, Y., Chen, X.-L., & Chen, J.-F. Mesoporous silica nanotubes coated with multilayered polyelectrolytes for pH-controlled drug release. Acta Biomaterialia, 2010; 6(8), 3092-3100. [Doi: 10.1016/j.actbio.2010.02.042](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.02.042)
15. Chiang, Y. T., & Lo, C. L. pH-responsive polymer-liposomes for intracellular drug delivery and tumor extracellular matrix switched-on targeted cancer therapy. Biomaterials, 2014; 35, 5414-5424. [Doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.03.046](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.03.046).
16. Liu, F., Kozlovskaya, V., Medipelli, S., Xue, B., Ahmad, F., Saeed, M. Kharlampieva, E. Temperature-sensitive polymersomes for controlled delivery of anticancer drugs. Chemistry of Materials, 2015; 27, 7945-7956. [Doi: 10.1021/acs.chemmater.5b03048](https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.5b03048)

17. Shi, C., Guo, X., Qu, Q., Tang, Z., Wang, Y., & Zhou, S. Actively targeted delivery of anticancer drug to tumor cells by redox-responsive star-shaped micelles. *Biomaterials*, 2014; 35, 8711-8722. [Doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.06.036](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.06.036)
18. Colaboradores de Wikipedia. Concentración Micelar Crítica 2019 [en línea]. Wikipedia, La enciclopedia libre, 2010 [fecha de consulta: 29 de mayo del 2019]. Disponible en https://es.wikipedia.org/wiki/Concentraci%C3%B3n_micelar_cr%C3%ADtica
19. Chen, H., He, W., & Guo, Z. An H₂O₂-responsive nanocarrier for dual-release of platinum anticancer drugs and O₂: Controlled release and enhanced cytotoxicity against cisplatin resistant cancer cells. *Chemical Communications*, 2014; 50, 9714-17 [Doi: 10.1039/C4CC03385J](https://doi.org/10.1039/C4CC03385J)
20. Li R, Feng F, Wang Y, Yang X, Yang X, Yang VC. Folic acid-conjugated pH/temperature/redox multi-stimuli responsive polymer microspheres for delivery of anti-cancer drug. *J Colloid Interface Sci*. 2014 Sep 1;429:34-44. [Doi: 10.1016/j.jcis.2014.05.008](https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.05.008)
21. Celina, A., Tikhomirov, G. A., Hong, S. H., Falconer, R. A., Loadman, P. M., Gill, J. H., Daldrup-Link, H. E. Development of novel tumor-targeted theranostic nanoparticles activated by membrane-type matrix metalloproteinases for combined cancer magnetic resonance imaging and therapy *Small*. 2014 Feb 12;10(3):566-75, 417 [Doi: 10.1002/smll.201301456](https://doi.org/10.1002/smll.201301456)
22. Liu X, Xue W, Liu Q, Yu W, Fu Y, Xiong X, et al. Swelling behaviour of alginate–chitosan microcapsules prepared by external gelation or internal gelation technology. *Carbohydr Polym*. 2004; 56:459-464. [Doi: 10.1016/j.carbpol.2004.03.011](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.03.011).

