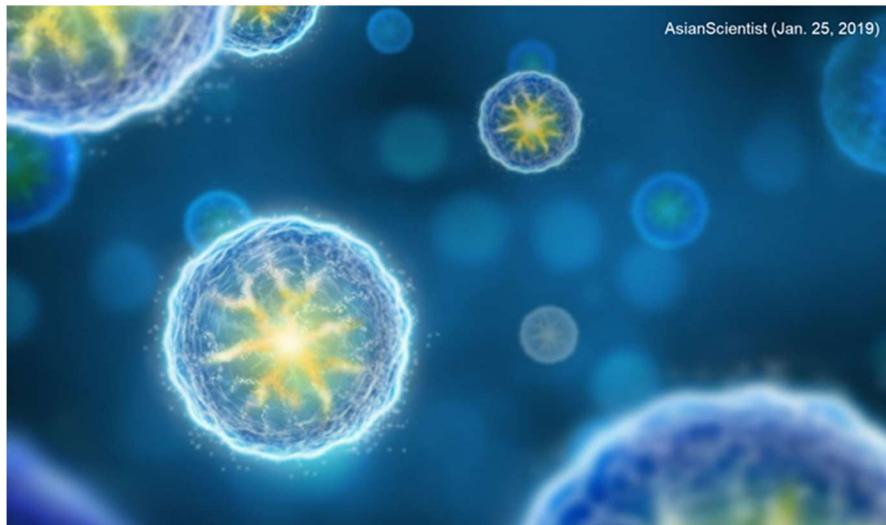


Máster en Avances en Radiología Diagnóstica y Terapéutica
y Medicina Física

Trabajo Fin de Máster

EVALUACIÓN DE LA POTENCIALIDAD DE MMP-9 MEDIANTE LA NANOTECNOLOGÍA EN EL CÁNCER DE MAMA



Cristina Forja Barbosa

Tutoras:

María Isabel Núñez Torres

Sandra Ríos Arrabal



Departamento de Radiología y Medicina Física

Facultad de Medicina

Universidad de Granada

Granada, 2019

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
1. Cáncer de mama	3
1.1. Tratamientos	3
1.1.1. Cirugía	4
1.1.2. Radioterapia	5
1.1.3. Quimioterapia	6
1.1.4. Terapia hormonal	7
1.1.5. Terapia dirigida	8
2. Metaloproteasas (MMPs)	9
2.1. Clasificación, estructura y función	9
2.2. Etapas en la carcinogénesis	11
3. Características específicas de la metaloproteasa 9 (MMP-9)	12
3.1. Estructura	12
3.2. Regulación	13
3.2.1. Regulación transcripcional	14
3.2.2. Regulación del mRNA	14
3.2.3. Regulación por compartimentalización y secreción	15
3.2.4. Activación de la proMMP-9	15
3.2.5. Inhibición de la MMP-9	15
3.3. Función	16
3.3.1. Procesos fisiológicos en los que interviene MMP-9	16
3.3.2. Procesos patológicos asociados a MMP-9	17
3.4. MMP-9 como potencial biomarcador en el cáncer de mama	17
4. Nanotecnología en medicina	18
4.1. Características de las nanopartículas	18
4.2. Tipos de nanopartículas	19
4.3. Estrategias para la liberación de fármacos	21
4.3.1. Estímulos internos	22
4.3.2. Estímulos externos	22
4.4. Nanomedicina en cáncer de mama	24
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	26
1. Hipótesis	26
2. Objetivos	26
MATERIAL Y MÉTODOS	27
1. Fuentes bibliográficas	27

2. Líneas celulares	27
3. Técnicas empleadas	28
3.1. Técnicas de visualización	28
3.2. Técnica de medición del nivel de MMP-9	28
3.3. Técnicas de citotoxicidad	29
4. Síntesis y caracterización de las nanopartículas	29
5. Análisis estadístico	31
NANOPARTÍCULAS DIRIGIDAS A LA MMP-9	32
1. Nanosensores de MMP-9	32
2. Nanotransportadores sensibles al estímulo de MMP-9 para la administración de fármacos	36
3. Tratamientos diana que regulan a MMP-9	41
3.1. Tratamientos directos	41
3.2. Tratamientos indirectos	45
CONCLUSIONES	52
PERSPECTIVAS FUTURAS	53
ABREVIATURAS	55
BIBLIOGRAFÍA	57

RESUMEN

Hoy en día, el cáncer de mama es el segundo cáncer más extendido a nivel mundial y el más frecuente en mujeres. Para este tipo de cáncer, la enzima metaloproteasa 9 (MMP-9) ha sido investigada como biomarcador en numerosos estudios, debido a que presenta una elevada expresión en el tejido mamario tumoral. Este hecho se debe a que MMP-9 está involucrada en diferentes etapas de la carcinogénesis como es la proliferación tumoral, la angiogénesis y la invasión y metástasis. Por otra parte, los diferentes tipos de tratamiento estándar para las pacientes de cáncer de mama, entre los que se encuentran la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia, la terapia con hormonas y la terapia dirigida, están evolucionando actualmente gracias a la nanomedicina.

Por tanto, este estudio se centra en analizar la potencialidad del uso de MMP-9 en las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1 del cáncer de mama mediante la nanotecnología. Para ello, se ha optado por tres enfoques diferentes. El primero utiliza la MMP-9 para dirigir a las nanopartículas hacia el tumor y, así, poder detectar y evaluar el cáncer de mama mediante técnicas de imagen. Aunque el segundo planteamiento vuelve a utilizar a esta enzima como guía, también la emplea para administrar el fármaco incorporado a la nanopartícula en el interior del tumor. Por último, se analiza la utilización de nanopartículas para inhibir la actividad de la enzima MMP-9 en las diferentes etapas de la carcinogénesis en las que participa. Para la inhibición de esta enzima no solo se ha considerado las nanopartículas que tienen a MMP-9 como diana, sino también aquellas que bloquean algún factor de la ruta metabólica en la que esté involucrada.

Se ha comprobado que tanto los nanosensores como los nanotransportadores dirigidos por MMP-9 son bastante eficaces, aunque no tienen una elevada especificidad entre las gelatinas. Por otro lado, los tratamientos con nanopartículas que regulan a MMP-9 como diana han demostrado tener una buena eficacia, considerando la citotoxicidad que produce en el organismo. La revisión realizada permite concluir que esta nueva técnica presenta resultados prometedores en la actualidad y plantea la necesidad de investigar con mayor profundidad para poder aplicarla a la práctica clínica.

Palabras claves: cáncer de mama, MMP-9, nanomedicina, nanopartículas.

ABSTRACT

Nowadays, breast cancer is the second most widespread cancer worldwide and the most frequent in women. For this type of cancer, the metalloprotease enzyme 9 (MMP-9) has been investigated as a biomarker in numerous studies, due to the facts it presents a high expression in the mammary tumor tissue. This is due to the fact that MMP-9 is involved in different stages of carcinogenesis such as tumor proliferation, angiogenesis and invasion and metastasis. Furthermore, the types of standard treatment for cancer patients, as radiotherapy, chemotherapy, hormone therapy and targeted therapy, are currently evolving thanks to nanomedicine.

Therefore, this research focuses on analyzing the potential use of MMP-9 in breast cancer cell lines MCF-7, MDA-MB-231 and 4T1 through nanotechnology. In order to do this, three different approaches have been chosen. The first uses MMP-9 to direct the nanoparticles to the tumor, and thus, to detect and evaluate breast cancer using imaging techniques. Although the second approach uses this enzyme as a guide as well, it also employs it to administer the drug incorporated into the nanoparticle into the tumor. Finally, the use of nanoparticles is analyzed to inhibit the activity of the MMP-9 enzyme in the different stages of carcinogenesis in which it participates. For the inhibition of this enzyme not only have they been considered both the nanoparticles that have MMP-9 as a target, but also those which block any factor of the metabolic pathway in which it may be involved.

It has been confirmed that both nanosensors and nanotransporters driven by MMP-9 are quite effective, in spite of not having a high specificity among gelatinases. On the other hand, the treatments with nanoparticles that regulate MMP-9 as a target have been proven to have a good efficacy, considering the cytotoxicity it produces in the organism. The review carried out allows us to conclude that this new technique presents promising results nowadays, and raises the need to investigate in greater depth to be able to apply it to clinical practice.

Key words: breast cancer, MMP-9, nanomedicine, nanoparticles.

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer de mama

El cáncer de mama es el segundo cáncer más común a nivel mundial y el más frecuente en mujeres, sobretodo en Asia con un 43.6% de incidencia. Respecto a la mortalidad, es el quinto cáncer que produce más muertes en todo el mundo con un 6.6%, por detrás del cáncer de pulmón (18.4%), colorrectal (9.2%), estómago (8.2%) e hígado (8.2%), como se puede observar en la figura 1. Tanto la incidencia como la mortalidad son únicamente de mujeres, ya que no ha habido ningún caso de cáncer de mama en hombres [1].

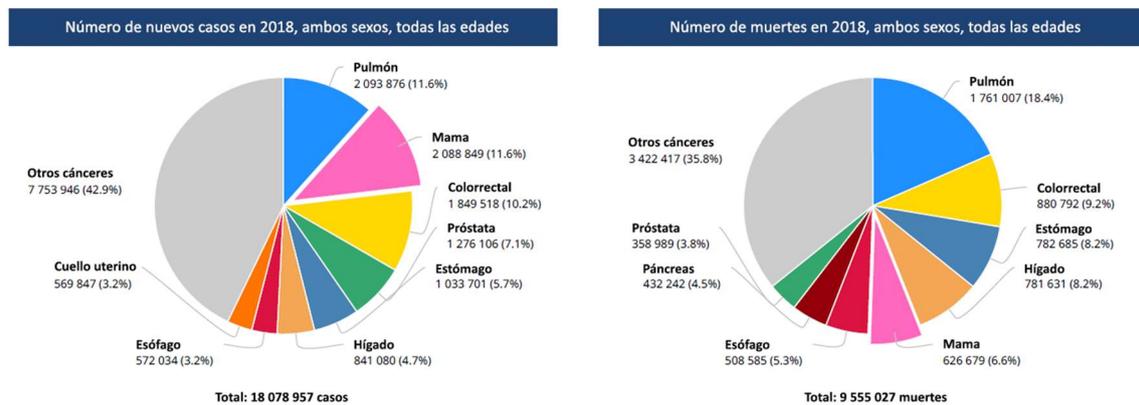


Figura 1. Número de nuevos casos y muertes causados por el cáncer en todo el mundo en 2018, independientemente del sexo y la edad [1].

Según la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC), en 2018, se diagnosticaron más de 2 millones de nuevos casos, representando el 11.6% de todos los cánceres. Por otro lado, el número de casos prevalentes en 5 años es el más elevado de todos los tipos de cáncer, con más de 6.5 millones de casos, sobretodo en Asia y Europa (38.2% y 29.9%) [1].

1.1. Tratamientos

Según el Instituto Nacional del Cáncer (NIH), las recomendaciones del plan de tratamiento son muy personalizadas y dependen de varios factores, entre ellos [2]:

- El subtipo de tumor, que incluye el estado de los receptores de hormonas (RE-receptor de estrógeno- y RP-receptor de progesterona-) y el estado del HER2.
- El estadio del tumor.
- Los marcadores genómicos.
- La edad de la paciente, el estado de salud general, el estado de la menopausia y sus preferencias.
- La presencia de mutaciones conocidas en los genes heredados del cáncer de mama (BRCA1 o BRCA2).

Los diferentes tipos de tratamiento estándar para los pacientes de cáncer de mama son la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia, la terapia con hormonas y la terapia dirigida.

Por lo general, se recomienda cirugía para extirpar el tumor cuando se trata de un caso de carcinoma ductal *in situ* (DCIS) o de un cáncer de mama invasivo en estadio temprano. Para aquellos tumores más grandes o que crecen más rápidamente, se aconseja un tratamiento sistémico con quimioterapia o terapia hormonal antes de la cirugía. Hay casos en que es imposible realizar una cirugía para extirpar el cáncer (inoperables), por lo que se recomendará otras formas de tratamiento como la quimioterapia, la terapia dirigida, la radioterapia y/o la terapia hormonal y así, poder reducir el tamaño del tumor. Por último, para los casos de cáncer recurrente, el tratamiento va a depender de cómo se trató el tumor en un principio y del subtipo molecular (RE, RP y HER2) [3].

A continuación, se presentarán las opciones de tratamiento más frecuentes para el cáncer de mama, teniendo en cuenta los síntomas y efectos secundarios que pueden causar, ya que es una parte importante de la atención del cáncer.

1.1.1. Cirugía

La cirugía es la extirpación del tumor y el tejido circundante mediante una operación. La cirugía también se utiliza para evaluar si existe diseminación a los ganglios linfáticos axilares cercanos al tumor [3].

Por lo general, los pacientes tienen más opciones quirúrgicas cuanto más pequeño es el tumor. Los tipos de cirugía incluyen los siguientes:

– Lumpectomía: consiste en la extirpación del tumor y de un pequeño margen de tejido sano alrededor del tumor, conservando la mayor parte de la mama. También se puede extirpar algunos ganglios linfáticos debajo del brazo y parte del revestimiento de la pared torácica si el cáncer se encuentra cerca. En general, después de la cirugía en los casos de tumores invasivos, se recomienda radioterapia en el tejido mamario restante. La radioterapia después de la cirugía puede ser una opción de acuerdo con el paciente y las características del tumor en el caso de DCIS. La lumpectomía también puede llamarse cirugía conservadora de la mama, mastectomía parcial, cuadrantectomía o mastectomía segmental [2,3].

– Mastectomía: es la extirpación quirúrgica de toda la mama. Existen diferentes tipos de mastectomía. La mastectomía total o simple es la cirugía para extirpar toda la mama con cáncer. También se pueden extirpar algunos de los ganglios linfáticos axilares para llevar a cabo una evaluación en busca del tumor, bien en la misma operación o de forma posterior. Este procedimiento se realiza a través de una incisión separada. La mastectomía radical modificada es la cirugía que extirpa el tumor junto con toda la mama, muchos ganglios linfáticos axilares, el revestimiento de los músculos pectorales y, a veces, parte de los músculos de la pared torácica [2,3].

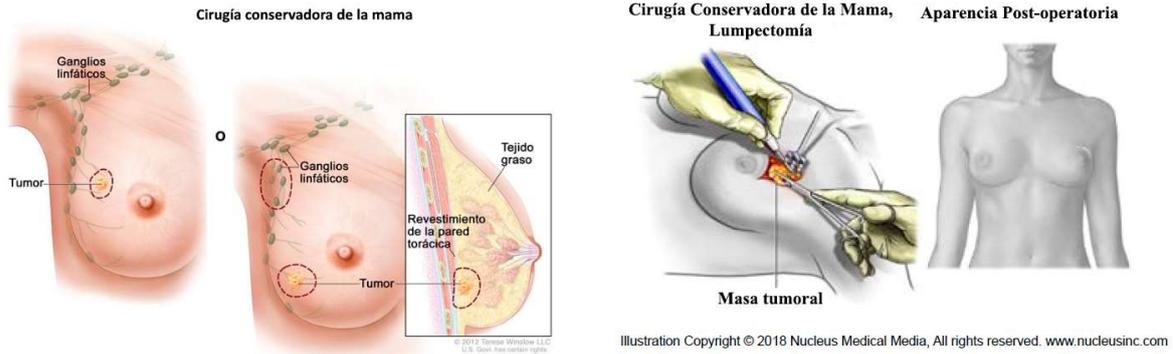


Figura 2. Lumpectomía. El cirujano realiza un corte en el seno lo suficientemente grande como para extirpar el tumor y parte del tejido. Causa una pequeña cicatriz y puede haber una deformación del seno que se puede arreglar con cirugía reconstructiva [2,4].

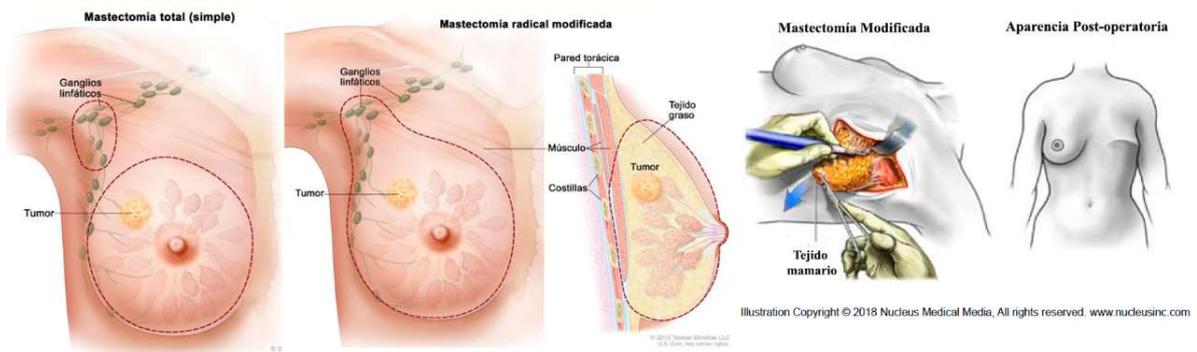


Figura 3. Mastectomía. En la mastectomía total, la línea de puntos muestra el lugar donde se extirpa toda la mama y puede que algunos ganglios linfáticos y en la mastectomía radical modificada, muestra el lugar donde se extirpa tanto toda la mama como algunos ganglios linfáticos y puede que parte de los músculos de la pared torácica. Una mastectomía causa una gran cicatriz [2,4].

La terapia neoadyuvante administrada antes de la cirugía se utiliza para reducir el tamaño del tumor y la cantidad de tejido que es necesario extirpar durante la misma. Después de la cirugía, algunos pacientes reciben tratamiento posoperatorio o terapia adyuvante para disminuir el riesgo de recaída [2].

Si el paciente se le realiza una mastectomía, tal vez sopesa la opción de reconstrucción de la mama. Ésta se puede hacer en el momento de la mastectomía o después de cierto tiempo con tejido del paciente o mediante implantes rellenos con una solución salina o un gel de silicona [2].

1.1.2. Radioterapia

La radioterapia es un tratamiento para el cáncer en el que se usan rayos X de alta energía u otros tipos de radiación para destruir células cancerosas o impedir que crezcan. Existen dos tipos de radioterapia, dependiendo de la forma en la que se administra y del estadio del tumor que se esté tratando [2]:

- Radioterapia externa: la fuente de radiación es externa al paciente. Este tipo es el más frecuente para tratar el cáncer de mama.
- Radioterapia interna (braquiterapia): se usa una sustancia radiactiva sellada en agujas, semillas, alambres o catéteres que se colocan directamente dentro del tumor o cerca de éste. Si se utiliza estroncio-89 (un radionúclido), sirve para aliviar el dolor causado por metástasis óseas del cáncer de mama.

Además, la radioterapia puede administrarse antes o después de la cirugía [3]:

- La radioterapia adyuvante se administra después de la cirugía. Después de una lumpectomía, se suele administrar radioterapia con mayor frecuencia, y después de una mastectomía, va a depender de las características del tumor. Se suele aconsejar la radioterapia después de la mastectomía cuando los tumores son grandes, muchos de los ganglios linfáticos presentan cáncer, las células cancerosas se encuentran fuera de la cápsula del ganglio linfático y el tumor ha crecido hasta afectar la piel o la pared torácica.
- La radioterapia neoadyuvante se administra antes de la cirugía para disminuir el tamaño de un tumor grande, y así facilitar su extirpación. Este método es muy poco frecuente y sólo se considera cuando un tumor no se puede extirpar mediante cirugía.

Según la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO), la radioterapia puede causar efectos secundarios como fatiga, hinchazón de la mama, enrojecimiento o decoloración/hiperpigmentación de la piel y dolor/ardor en la piel donde se aplicó la radiación, algunas veces con ampollas o descamación. Para tratar algunos de estos efectos secundarios, se puede recomendar medicación tópica para aplicar en la piel. En ocasiones muy raras, la radiación puede afectar una pequeña parte del pulmón y causar neumonitis. Este riesgo dependerá del volumen corporal que recibió la radioterapia y tenderá a desaparecer con el paso del tiempo [3].

1.1.3. Quimioterapia

La quimioterapia es un tratamiento para el cáncer en el que se utilizan medicamentos para interrumpir el crecimiento de las células cancerosas impidiendo su multiplicación así como causando la muerte de éstas. Cuando la quimioterapia se administra por vía oral, intravenosa o intramuscular, los medicamentos se incorporan al torrente sanguíneo afectando a células cancerosas de todo el cuerpo (quimioterapia sistémica) y cuando se administra directamente en el líquido cefalorraquídeo, un órgano o una cavidad corporal, los medicamentos afectan principalmente las células cancerosas de esas áreas (quimioterapia regional). El método para administrar la quimioterapia dependerá del tipo y del estadio del cáncer. Para tratar el cáncer de mama se utiliza la quimioterapia sistémica [2].

La quimioterapia puede administrarse antes de la cirugía para reducir el tamaño de un tumor grande, lo que facilita la cirugía (quimioterapia neoadyuvante) y/o después de la cirugía para reducir el riesgo de recaída (quimioterapia adyuvante) [3].

Un programa de quimioterapia consiste en la administración de un medicamento durante una cantidad específica de ciclos en un período de tiempo determinado. Según lo que haya funcionado mejor en los ensayos clínicos para ese tipo de régimen en particular, la quimioterapia puede administrarse con muchos programas diversos. Los fármacos frecuentes son:

capecitabina (Xeloda), carboplatino (Paraplatin), cisplatino (Platinol), ciclofosfamida (Neosar), docetaxel (Docefrez, Taxotere), doxorubicina (Adriamycin), doxorubicina liposomal pegilada (Doxil), epirubicina (Ellence), fluorouracilo (5-FU, Adrucil), gemcitabina (Gemzar), metotrexato (varias marcas comerciales), paclitaxel (Taxol), paclitaxel fijado a proteínas (Abraxane), vinorelbina (Navelbine), eribulina (Halaven) e ixabepilona (Ixempra) [3].

Una paciente puede recibir un único fármaco cada vez o combinaciones de diferentes fármacos administrados de forma simultánea. Se ha demostrado que, para la quimioterapia adyuvante, la combinación de determinados fármacos es más eficaz que un único fármaco. En el cáncer de mama de avance local o en estadio temprano pueden utilizarse como tratamiento adyuvante las siguientes combinaciones de fármacos: AC (doxorubicina y ciclofosfamida), AC o EC (epirubicina y ciclofosfamida) seguida de T (doxorubicina y ciclofosfamida, seguida de paclitaxel o docetaxel, o viceversa), CAF (ciclofosfamida, doxorubicina y 5-FU), CEF (ciclofosfamida, epirubicina y 5-FU), CMF (ciclofosfamida, metotrexato y 5-FU), EC (epirubicina y ciclofosfamida), TAC (docetaxel, doxorubicina y ciclofosfamida) y TC (docetaxel y ciclofosfamida) [3].

Según la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO), los efectos secundarios de la quimioterapia dependerán de la persona, de los fármacos suministrados y del programa/ dosis utilizados. Éstos pueden incluir fatiga, riesgo de infección, náuseas y vómitos, caída de cabello, pérdida del apetito y diarrea, los cuales se pueden prevenir o controlar satisfactoriamente la mayoría de las veces durante el tratamiento con medicamentos complementarios y, generalmente, desaparecen después de finalizar el tratamiento. En ocasiones muy raras pueden presentarse efectos secundarios a largo plazo, como daño cardíaco, daño en el sistema nervioso o cánceres secundarios [3].

1.1.4. Terapia hormonal

La terapia hormonal o endocrina es un tratamiento para muchos tumores donde los RE o los RP dan resultado positivo. Este tipo de tumor usa hormonas para estimular su desarrollo, por lo que, bloquearlas puede ayudar a prevenir la recaída del cáncer y la muerte por cáncer de mama, cuando se utiliza como único tratamiento o después de la quimioterapia adyuvante o neoadyuvante. La terapia hormonal se puede suministrar antes de la cirugía para reducir un tumor y facilitar la cirugía (terapia hormonal neoadyuvante) o después de la cirugía para reducir el riesgo de recaída (terapia hormonal adyuvante). La terapia con hormonas adyuvante administrada a mujeres con cáncer de mama positivo para el receptor hormonal, al menos durante 5 años, disminuye el riesgo de que el cáncer regrese. Las terapias hormonales más frecuentes son con tamoxifeno y con inhibidores de aromatasa [3].

El tamoxifeno es un medicamento de vía oral que impide que el estrógeno se adhiera a las células cancerígenas de mama. Esta terapia, frecuentemente, se administra a pacientes con cáncer de mama localizado en estadio temprano que puede extirparse mediante cirugía o con cáncer de mama metastásico. Además, puede actuar sobre las células de todo el cuerpo y aumentar la probabilidad de presentar cáncer de endometrio. Sus efectos secundarios más frecuentes son sofocos y sequedad, secreción o sangrado vaginales. Con una menor posibilidad, puede presentar riesgos de cáncer de la pared interior del útero, cataratas y coágulos sanguíneos. Sin embargo, puede mejorar la salud ósea y los niveles de colesterol [2,3].

La terapia hormonal con un inhibidor de la aromatasa (IA) se suministra por vía oral a ciertas mujeres posmenopáusicas que presentan cáncer de mama con receptores hormonales positivos. Estos inhibidores disminuyen el estrógeno en el cuerpo, ya que bloquean a la aromatasa impidiendo que convierta el andrógeno en estrógeno. Entre estos medicamentos se incluyen el anastrozol (Arimidex), el exemestano (Aromasin) y el letrozol (Femara). Se pueden utilizar como terapia adyuvante algunos de estos inhibidores para el tratamiento de cáncer de mama localizado en estadio temprano que puede extirparse mediante cirugía en lugar del uso de tamoxifeno o después de 2 o 3 años de tratamiento con tamoxifeno. Algunos de sus efectos secundarios son dolor articular y muscular, sofocos, sequedad vaginal, un mayor riesgo de osteoporosis y fracturas de los huesos, y aumentos en los niveles del colesterol [2,3].

1.1.5. Terapia dirigida

La terapia dirigida es un tratamiento en el que se utilizan medicamentos u otras sustancias para identificar y atacar células cancerosas específicas sin dañar las células normales, apuntando a los genes o a las proteínas específicas del cáncer, o a las condiciones del tejido que contribuyen al crecimiento y a la supervivencia del cáncer. Algunos tipos de terapia dirigida que se usan para el tratamiento del cáncer de mama son los anticuerpos monoclonales, los inhibidores de la tirosina quinasa, los inhibidores de las cinasas dependientes de ciclinas, los inhibidores de la diana de la rapamicina en mamíferos (mTOR) y los inhibidores de poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) [2,3].

La terapia con anticuerpos monoclonales es un tratamiento en el que se utilizan anticuerpos elaborados a partir de un tipo único de células del sistema inmunitario. Estos anticuerpos pueden reconocer sustancias en las células cancerosas o sustancias normales en el cuerpo que contribuyen al crecimiento de las células cancerosas, y así poder incorporarse a las sustancias eliminando las células cancerígenas, bloqueando su crecimiento u obstaculizando que se dispersen. Además, se pueden usar solos o para administrar medicamentos, toxinas o material radiactivo directamente a las células cancerosas o en combinación con la quimioterapia como terapia adyuvante. Los medicamentos que se utilizan en esta terapia son trastuzumab, pertuzumab y ado-trastuzumab emtansina [3].

Los inhibidores de la tirosina quinasa son medicamentos que se utilizan para impedir las señales que necesitan los tumores para desarrollarse. Entre estos inhibidores se encuentran lapatinib y neratinib, y pueden usarse con otros medicamentos anticancerígenos como terapia adyuvante.

Los inhibidores de las quinazas dependientes de ciclinas se utilizan para bloquear las quinazas dependientes de ciclina, que son responsables del crecimiento de células cancerosas. Entre estos inhibidores se encuentran el palbociclib, el ribociclib y el abemaciclib [3].

Los inhibidores de mTOR se utilizan para bloquear a mTOR, lo que puede impedir la proliferación de las células cancerígenas y la angiogénesis que necesitan los tumores para desarrollarse. El inhibidor de mTOR más utilizado es el everolimus [3].

Los inhibidores de PARP se utilizan para bloquear la reparación del ADN y puede destruir células cancerosas. Un tipo de inhibidor de esta terapia es el medicamento olaparib, que se utiliza para tratar a pacientes con mutaciones en los genes BRCA1 o BRCA2 y/o cáncer de mama HER2 negativo. La terapia con este inhibidor está en fase de estudio para el tratamiento del cáncer de mama triple negativo [3].

2. Metaloproteasas (MMPs)

2.1. Clasificación, estructura y función

Las MMPs son una gran familia de endopeptidasas zinc-dependientes, capaces de degradar las proteínas que forman la matriz extracelular (MEC) y la membrana basal, y llevar a cabo la intervención de diferentes procesos tanto fisiológicos como patológicos [5,6].

Hasta la fecha, se han descubierto 26 MMPs en humanos que se pueden clasificar en cinco subfamilias, de acuerdo a su especificidad de sustrato y localización celular. Se considera un sexto grupo de MMPs que no correspondían a ninguna de estas categorías (tabla 1) [5,7–9].

Tabla 1. Clasificación de MMPs, según su estructura, especificidad de sustrato y localización celular [9].

SUBFAMILIAS	MIEMBROS	SUSTRATO
Colagenasas	MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18	Colágeno fibrilar de triple hélice
Gelatinasas	MMP-2, MMP-9	Gelatina
Estromelisinias	MMP-3, MMP-10, MMP-11, MMP-17	Componentes de MEC, excepto para el colágeno fibrilar de triple hélice
Matrilisinias	MMP-7, MMP-26	Familia de TNF; Componentes de MEC
MMPs de tipo membrana	MMP-14 (MT1-MMP), MMP-15 (MT2-MMP), MMP-16 (MT3-MMP), MMP-17 (MT4-MMP), MMP-24(MT5-MMP), MMP-25(MT6-MMP)	Zimógenos
Otras MMPs	MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-23, MMP-28, MMP-29	

Todas las MMPs, en su región extracelular, tienen una estructura común donde cuatro dominios se conservan: un péptido señal (aminoterminal), un propéptido o pro-dominio, un dominio catalítico y un dominio hemopexina (dominio PEX), excepto MMP-7, MMP-26 y MMP-23 (A y B). Además, existen otros dominios característicos de ciertas subfamilias de las MMPs comprendidos en la Figura 4 [10,11].

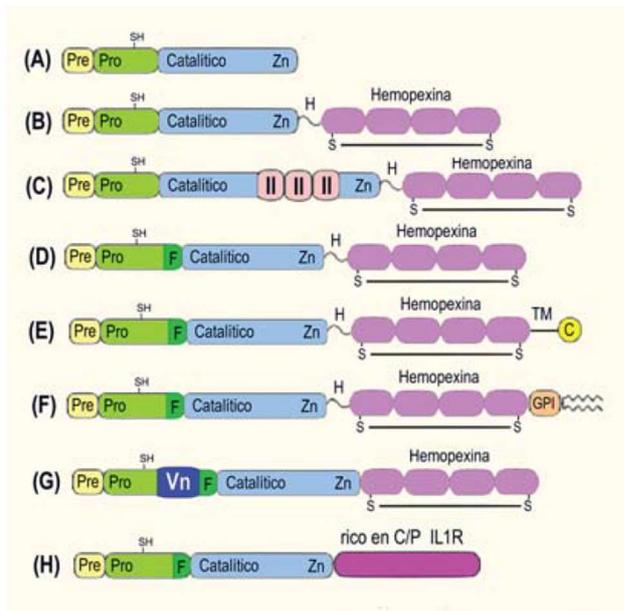


Figura 4. Estructura de las MMPs. **(A)** Dominios mínimos de las MMP (MMP-7, MMP-26). **(B)** MMP que contienen sólo un dominio hemopexina (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18, MMP-3, MMP-10, MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-22, MMP-27). **(C)** MMP que se unen a gelatina (MMP-2, MMP-9). **(D)** MMP secretadas activadas por furina (MMP-11, MMP-28). **(E)** MMP transmembrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-24). **(F)** MMP ligadas a GPI (MMP-17, MMP-25). **(G)** MMP con un dominio inserto similar a la vitronectina (MMP-21). **(H)** MMP con un dominio rico en cisteína/prolina receptor IL-1 (MMP-23).

Pre, secuencia señalizadora; **Pro**, propéptido con un zinc libre que se une al tiol (SH); **F**, sitio susceptible a la furina; **Zn**, sitio catalítico de unión al Zn; **II**, insertos de fibronectina que se unen al colágeno, **H**, región bisagra, **TM**, dominio transmembrana; **C**, cola citoplasmática; **GPI** dominio de anclaje del glicosfatidil inositol;

C/P, cisteína/prolina; **IL-1R**, receptor de la IL-1; **Vn**, dominio similar a la vitronectina. El dominio hemopexina contiene cuatro repeticiones con un enlace disulfuro entre la primera y la última [12].

Todas las MMPs son sintetizadas como zimógenos, ya que el dominio catalítico está oculto y es necesario retirar el prodominio para que sean activadas. Por tanto, se las nombra proMMPs cuando aún no se han desprendido del prodominio y MMPs cuando son activadas [10].

El equilibrio entre la activación y la inhibición de las MMPs es muy importante para conservar la homeostasis, por lo que es un proceso muy regulado fisiológicamente por una amplia gama de factores. Uno de los métodos fundamentales para regular la actividad de las MMPs son las interacciones con proteínas, que bloquean la actividad final de las MMP, como un grupo de inhibidores tisulares solubles de metaloproteasas (TIMPs) y las proteínas ricas en cisteína que inducen reversión con motivos de Kazal (RECK) [6]. Los TIMPs sirven para regular la actividad de las MMPs, uniéndose a las MMPs de manera no covalente en complejos estequiométricos (1:1) y así, poder formar un complejo reversible y de alta afinidad con dichas proenzimas [8,11]. El genoma humano codifica 4 genes de TIMP, desde el TIMP-1 hasta el TIMP-4, los cuales inhiben todas las MMPs difiriendo entre ellas en cuanto a su solubilidad, regulación y en su interacción específica con la proenzima, por lo que no actúan con la misma efectividad frente a todas ellas (tabla 2) [6].

Tabla 2. Caracterización de especificidad de sustrato de TIMPs [6].

Variable	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
Actividad contra MMPs	MMPs de tipo membrana (MT1-,MT3-, MT5-MMP) MMP-19	Actividad muy amplia (inhibición más débil de MMP-3 y MMP-7 en comparación con TIMP-1)	Actividad muy amplia (inhibición más débil de MMP-3 y MMP-7 en comparación con TIMP-1)	Activo contra la mayoría de las MMPs
Interacción con pro-MMP	Pro-MMP-9	Pro-MMP-2	Pro-MMP-2 Pro-MMP-9	Pro-MMP-2

Las RECK son inhibidores de las MMPs de la superficie celular, particularmente activas contra la MMP-9, y al igual que los TIMP solubles, desempeña un papel muy importante en la remodelación de la MEC y está involucrado en las metástasis y la invasión tumoral [6]. La actividad de las MMPs también está regulada por las histonas desacetilasas (HDACs) mediante mecanismos epigenéticos. Éstas últimas son enzimas que participan en el silenciamiento génico, mediante la eliminación de grupos aceto de la cromatina, produciendo una estructura compacta impenetrable a las polimerasas [13]. Además, hay inhibidores inespecíficos de MMPs, como la macroglobulina α_2 , que es una glucoproteína presente en plasma y fluidos celulares, o la α_1 -antitripsina (α_1 -AT), que es un inhibidor de serinproteasas producida por los hepatocitos, siendo el inhibidor de proteasa más abundante del suero humano [5].

Cuando las MMPs son activadas realizan un papel crucial en muchos procesos fisiológicos como morfogénesis tisular, invasión y migración celular, reparación de heridas, vasculogénesis o desarrollo del hueso, y patológicos como cáncer, enfermedades inflamatorias y autoinmunes, enfermedades cardiovasculares, fibróticas y cerebrovasculares. Debido a sus muchas funciones, pueden promover o inhibir diferentes procesos fisiológicos dependiendo del contexto celular en el que se encuentren (Figura 5) [10].

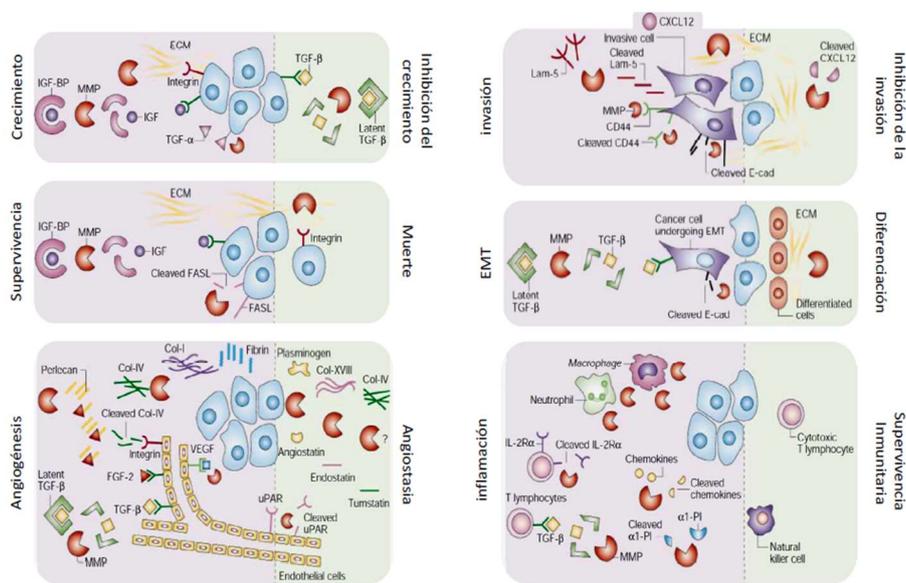


Figura 5. Regulación de diferentes procesos biológicos por MMPs [10].

Por tanto, es importante considerar que, a pesar de la rigurosa regulación de la actividad de las MMPs a nivel fisiológico, en ciertas enfermedades, como es el caso del cáncer, su actividad se encuentra mal regulada y por tanto, estas proteínas se asocian al desarrollo y la progresión de esta enfermedad [7].

2.2. Etapas en la carcinogénesis

Las MMPs juegan un papel importante durante la invasión tumoral y la metástasis a través de su capacidad para degradar las proteínas de la matriz y, además, intervienen en las primeras etapas de la carcinogénesis mamaria. Los distintos aspectos del proceso de carcinogénesis en los que están involucradas las MMPs se pueden observar en la tabla 3 [7,13].

Tabla 3. Papel de las MMPs en las diferentes etapas de la carcinogénesis.

Etapa	MMPs
Invasión y metástasis	MMP-1,-2,-8,-9,-13, -14, -15 y -16
TEM	MMP-3 y MMP-28
Crecimiento del tumor	MMP-9 y MMP-13
Evasión de la apoptosis	MMP-7
Formación vasos sanguíneos	MMP-2, MMP-9 y MMP-12
Respuesta a la inflamación	MMP-7
Formación nichos pre-metastásicos	MMP-2

La invasión y la metástasis son debidas a la degradación de la MEC que rodea al tumor y sucede en dos pasos principales mediante diferentes tipos de MMPs. Primero, actúan las colagenasas, degradando el colágeno y después, actúan las gelatinasas, degradando la gelatina formada. Por otro lado, las células epiteliales presentan cambios estructurales y funcionales cuando se desplazan a través de la membrana basal y adquieren las características de células mesenquimales, se conoce como la transición epitelio mesenquimal (TEM). La expresión de MMP-28 da lugar a una TEM estable en células de adenocarcinoma pulmonar A549 y la MMP-3 participa en la rotura de las uniones intercelulares mediadas por E-cadherina. Igualmente, las MMPs están involucradas en el crecimiento del tumor desajustando el equilibrio de las señales proliferativas y antiproliferativas en el microentorno tumoral. Además, también participan en los procesos fisiológicos de angiogénesis y vasculogénesis, siendo capaces de regularlos. Asimismo, la apoptosis se inicia por dos vías distintas que activan las caspasas, provocando la muerte celular. Cuando MMP-7 se sobreexpresa, favorece la resistencia a la apoptosis y, por esta razón, genera un efecto pro-tumoral. La inflamación es un resultado fisiológico a la producción de citoquinas y quimioquinas como el factor de necrosis tumoral y la quimioquina ligando 1, las cuales son reguladas por MMP-7. Por último, para llevar a cabo la metástasis se requiere un nicho pre-metastásico, el cual está regulado por las MMPs. La MMP-2 participa en la descomposición del colágeno gracias a la liberación de péptidos que dirigen a las células tumorales metastásicas y a las células procedentes de la médula ósea hacia los lugares predilectos de cada tipo de tumor [7,13].

3. Características específicas de la metaloproteasa 9 (MMP-9)

3.1. Estructura

La MMP-9, o gelatinasa B, tiene características estructurales propias que les permite realizar funciones particulares en comparación a las otras MMPs. El dominio hemopexina de la MMP-9 (PEX9) es crucial en la formación de multímeros de MMP-9 y en la unión de la MMP-9 a otras moléculas como TIMP-1 y a la superficie celular (Figura 6). El PEX9 sólo coincide entre un 25 y un 33% de homología con los dominios PEX de otras MMPs [10].

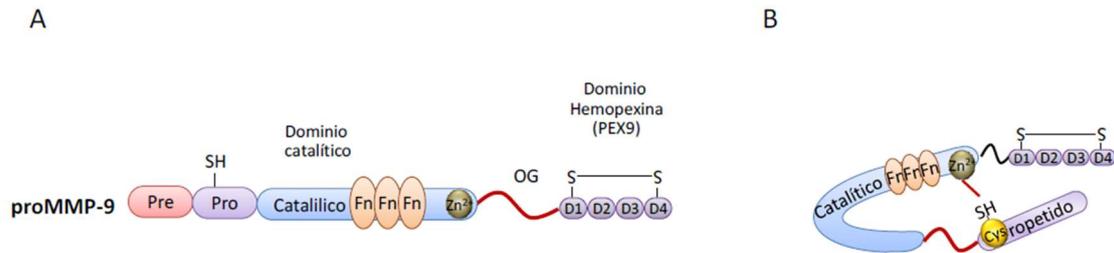


Figura 6. Estructura de proMMP-9. En esta figura se muestra un esquema con los diferentes dominios de la MMP-9 inactiva (proMMP-9) (A) y cómo se representaría de forma esquemática (B). (Pre) péptido señal, (Pro) prodominio, (Fn) dominios unión fibronectina, (OG) dominio o-glucosídico altamente glucosilado, (D1, D2, D3, D4) subdominios 1, 2, 3 y 4 del dominio hemopexina (PEX9) [10].

Las gelatinasas son capaces de unir colágeno desnaturalizado (gelatina), laminina y colágeno tipo I y IV, gracias a sus insertos de fibronectina tipo II. Adicionalmente, sólo la MMP-9 dispone de un dominio colágeno tipo V, o también llamado dominio OG, que se halla en gran medida glucosilado (figura 6 A) [14]. El dominio OG otorga una mejor flexibilidad a la MMP-9, por lo que los azúcares de esta región (de tipo N- y O-glicosídicos) dan lugar a que se forme un puente disulfuro entre el dominio catalítico y el PEX9, y así, poder adquirir configuraciones que incrementen o reduzcan su cualidad de unirse con otras moléculas de la MEC [15].

La actividad de MMP-9 y sus funciones pueden verse alterados por numerosas modificaciones post-transcripcionales. Éste dispone 17 residuos de cisteína en su secuencia de aminoácidos, no obstante sólo se crean 7 puentes disulfuro intramoleculares. Estos puentes se pueden encontrar en el dominio fibronectina, que son necesarios dos de ellos para la secreción de la MMP-9 al exterior celular y en el dominio hemopexina, entre el subdominio 1 y 4, y entre dos moléculas de MMP-9 para dar lugar a multímeros, a través de la cisteína 468 en el dominio O-glicosídico y la cisteína 674 [15].

La proMMP-9 posee un peso molecular de unos 92 kDa, pero cuando es activada por proteólisis del prodominio pasa a tener un peso molecular de 85 kDa. Sin embargo, pueden encontrarse otras formas de MMP-9 activada, así como con la activación por MMP-3, que produce una forma de unos 65 kDa que no tiene ni el propéptido aminoterminal ni PEX9. Además, es susceptible a distintos glucosilaciones puesto que esta metaloproteasa presenta O- y N-glicanos. En el retículo endoplasmático es posible modificar una forma de 85 kDa a una forma intermedia de 89 kDa por glucosilación, para que seguidamente se transforme a la configuración madura de 92 kDa que presenta proMMP-9 [15]. Cuando MMP-9 se adhiere a otras moléculas, como a la lipocalina NGAL (asociada a la gelatina de neutrófilos) posee un peso molecular de 125kDa.

3.2. Regulación

La MMP-9 está regulada en múltiples niveles: 1) la transcripción, 2) la regulación post-transcripcional (regulación de miARN), 3) la traducción, 4) la secreción de proMMP-9, 5) la regulación post-traducciona (activación de proMMP-9) y 6) la inhibición. En primer lugar, en respuesta a diferentes señales celulares como, por ejemplo, la activación de receptores celulares o la hipoxia, el gen de MMP-9 es transcrito. A continuación, se produce una regulación post-transcripcional, donde participan distintos miRNAs provocando la degradación del mRNA de la MMP-9. Tras ser traducida se acumulan en vesículas que se secretan como resultado a ciertos

estímulos. Por último, la proMMP-9 es sintetizada como zimógeno y por tanto, activada para ser enzimáticamente funcional. Una vez activa, los inhibidores pueden captarla bloqueando su acción (figura 7) [10,16].

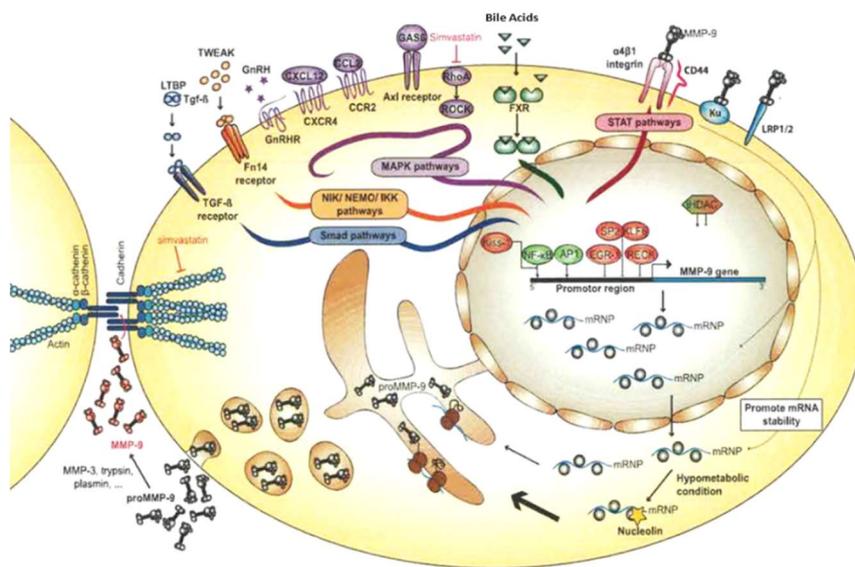


Figura 7. Regulación de MMP-9. Ilustración de los diferentes niveles de regulación de la MMP-9 y de las rutas de señalización en las que está implicada [14].

3.2.1. Regulación transcripcional

El gen de la MMP-9 humano se localiza en el cromosoma 20q13.12 y está fundamentalmente regulado por diferentes vías de activación mediante receptores X fernesioide (FXR), sensores metabólicos, integrinas, receptores de quimioquinas y receptores de proliferación celular, entre otros (figura 7) [14,17].

La activación de la MMP-9 por citoquinas es uno de los procesos más estudiados en este ámbito. La trascrición de la MMP-9 también es ocasionada por factores de crecimiento, hormonas, otras metaloproteasas como MMP-1 o MMP-3, o hasta por neurotransmisores como la adrenalina [18,19].

3.2.2. Regulación del mRNA

El RNA puede ser estabilizado o destruido mediante proteínas de unión a RNA y/o ncRNAs, procediendo como elementos cis y pudiendo conservar o alterar el mRNA de ciertas proteínas [20].

Comparando el mRNA de la MMP-9 con el de MMP-2, se ha analizado que sólo en el de MMP-9 puede interaccionar con el factor de unión a RNA nucleolina. Además, se ha demostrado que la generación de MMP-9 puede incrementar considerablemente, sin cambios en los niveles de mRNA de MMP-9, tras diversos estímulos en fibroblastos HT1080. Este proceso se produce por la unión del mRNA de MMP-9 a proteínas de unión a RNA que transportan los mRNAs al retículo endoplasmático rugoso, donde incrementa la traducción a MMP-9 [10].

3.2.3. Regulación por compartimentalización y secreción

La compartimentalización de MMP-9 se produce en distintas vesículas u orgánulos celulares que la almacenan y la secretan sólo como consecuencia a ciertos estímulos. Además, es importante mencionar que su tráfico intracelular cambia de un tipo celular a otro. En los neutrófilos, MMP-9 es almacenada en granulocitos que son secretados automáticamente tras un estímulo inflamatorio [14]. Por el contrario, es sintetizada de nuevo tras un estímulo en macrófagos, por ello su secreción es mucho más pausado.

La secreción de MMP-9 hace que pueda dispersarse entre los tejidos y la MEC o pueda fijarse a receptores de la superficie celular como CD44, LRP-1, LRP-2, Ku e integrinas [15]. La activación de MMP-9 puede darse por la unión a estos receptores y así, generar un direccionamiento de la degradación de la MEC por las células que la expresan.

3.2.4. Activación de la proMMP-9

MMP-9 se produce como zimógeno de tal forma que el propéptido que contiene la secuencia conservada PRCXXPD debe ser eliminado o retirado para que el dominio catalítico esté expuesto y la MMP-9 sea activa (figura 8). Hay numerosas proteasas que la activan como kallikreina, tripsina, plasmina y otras MMPs como MMP-3, MMP-26 o MMP-2. Además, pueden ser activadas por diversos reactivos, como el dodecilsulfato sódico, que es principal agente de activación y usado en zimografías, el acetato de 4-aminofenol mercurio, por agentes que modifican la afinidad entre los grupos thiol y por radicales de oxígeno o ante Metalotienin. Por último, también pueden activarlas los cambios en condiciones físico-químicas como la temperatura o la disminución del pH (figura 8) [14].

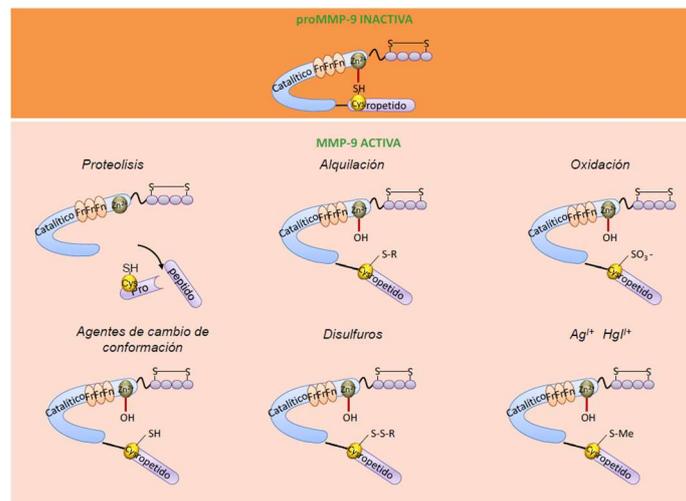


Figura 8. Activación de proMMP-9. Procesos a través de los cuales se pueden activar las MMPs [14].

3.2.5. Inhibición de la MMP-9

La actividad catalítica de MMP-9 puede ser reprimida por diversos inhibidores inespecíficos, como la α 2-macroglobulina, otros comunes para todas las MMPs, como HDACs, y otros más específicos, como las RECK o TIMP-1 que interaccionan tanto con el PEX9 como con su dominio catalítico[6,10].

Actualmente existen bastantes inhibidores químicos, como la doxiciclina, la minociclina y las tetraciclinas, con el objetivo de tratar enfermedades en las que la expresión de esta enzima es muy elevada, como ocurre en los tumores con un mayor riesgo de metástasis [10].

3.3. Función

Debido a su actividad de escisión proteolítica en el entorno extracelular, esta enzima está implicada en bastantes procesos fisiológicos y asociada a muchas patologías a causa de su gran diversidad de sustratos (figura 9).

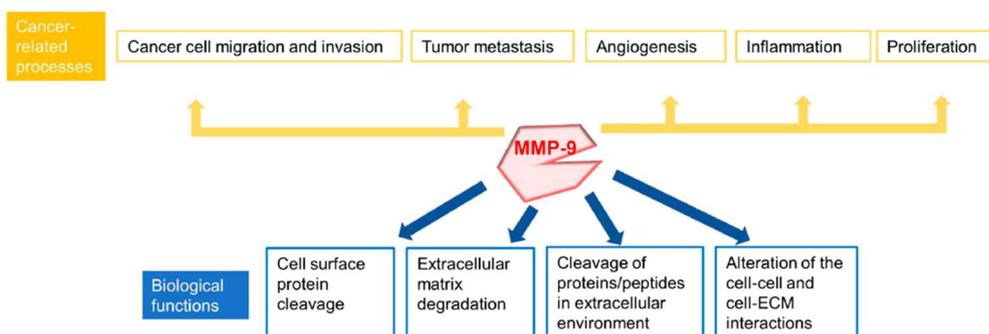


Figura 9. Funciones MMP-9. Resumen esquemático de las funciones fisiológicas de MMP-9 y algunos de los procesos relacionados con el cáncer que interviene MMP-9 [16].

MMP-9 se descubrió por su función en la de degradación de los compuestos de la MEC, al igual que las otras MMPs. Además, esta enzima es capaz de procesar otras moléculas como las implicadas en adhesión (ICAM-1), citoquinas (pro-TNF- α , IL-1 β), receptores celulares (IL-2R α), proteasas (ADAMTS-4), factores de crecimiento (HB-EGF), proteínas estructurales (Sindecan-1, MBP, $\alpha\beta$ fibrilinas) y proteínas de unión entre células (VE-Cadherina, ocludina)[14].

Desde otro punto de vista, existen otras funciones de MMP-9 independientes de su actividad catalítica, en las que participan otros dominios estructurales. En este caso, actuaría como ligando, activando o silenciando distintas vías implicadas en supervivencia celular o induciendo moléculas señaladoras que bloquean la apoptosis de células cancerígenas (figura 7) [21].

Además, MMP-9 lleva a cabo su función en todos los compartimentos y orgánulos celulares en los que se encuentra. En los lisosomas, degrada la catepsina D, E, L1 y Z, en el núcleo, regula la ubiquitinación mediante el procesamiento de la enzima conjugada a la ubiquitina E2N, y en el citoplasma celular como proteasa soluble [14]. Una pequeña parte de MMP-9 puede fijarse mediante unos complejos de unión a la membrana de diferentes tipos celulares tumorales y no tumorales, realizando varias funciones. En células tumorales, algunos ejemplos de complejos de unión son las diferentes isoformas variables de CD44, de integrinas $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, o la proteína Ku de reparación de ADN [10].

3.3.1. Procesos fisiológicos en los que interviene la MMP-9

La MMP-9 está involucrada en diferentes procesos fisiológicos como [10,14]:

- La remodelación del endometrio durante el ciclo menstrual femenino y el desarrollo embrionario.
- La angiogénesis, regulando factores tanto pro- como antiangiogénicos y en la remodelación de vasos sanguíneos y linfáticos.
- La migración de células troncales, células precursoras y células del sistema inmunológico, teniendo un papel crucial en la regeneración epitelial, la cicatrización y la plasticidad sináptica neuronal (imprescindible en los procesos de memorización y aprendizaje).
- Los procesos de inflamación, ya que está muy expresada y secretada por células del sistema inmunológico, fomentando el desplazamiento de las células troncales a la médula ósea, o de linfocitos y leucocitos como consecuencia de los factores solubles de la inflamación.

3.3.2. Patologías asociadas a la MMP-9

La mal regulación de esta proteína puede causar muchas patologías inflamatorias, autoinmunes, cardiovasculares o degenerativas. Por ello, un aumento del nivel de esta enzima y una disminución de TIMP-1 están relacionados con una ruptura prematura de las membranas amnióticas. Además, tiene un papel crucial en enfermedades inflamatorias pulmonares como el síndrome de distrés respiratorio agudo, gastrointestinal como la enfermedad de Crohn, articulares como artritis, de la piel como la dermatitis y la psoriasis, y en procesos inflamatorios de vasos sanguíneos y del sistema nervioso [7,14,16].

A causa de sus funciones en la remodelación de la MEC y la escisión de proteínas de la membrana, MMP-9 participa en algunos de los procesos tumorales como la angiogénesis, la invasión, la metástasis y la proliferación de las células cancerígenas (figura 9). Por otro lado, se ha demostrado que también puede tener un papel dual en la metástasis pudiendo bloquearla dependiendo de la concentración y de la localización celular de MMP-9 [16,22].

3.4. MMP-9 como potencial biomarcador en el cáncer de mama

La investigación de biomarcadores de cáncer es un ámbito fundamental en el estudio del cáncer, aportando información como el diagnóstico y pronóstico del cáncer, el monitoreo de la progresión de la enfermedad, la predicción de la recurrencia de la enfermedad, el monitoreo y la predicción de la eficacia del tratamiento y la detección del cáncer. Además, se ha demostrado que la MMP-9 es un biomarcador potencial para varios cánceres, como el tumor de células gigantes de hueso (GCTB), el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), el cáncer de cuello uterino, el cáncer de ovarios, el cáncer de páncreas, el osteosarcoma, el carcinoma hepatocelular relacionado con el virus de la hepatitis B y el cáncer de mama [16].

Para el cáncer de mama, MMP-9 ha sido investigado como biomarcador por bastantes estudios. En uno de ellos, un grupo de investigadores demostró que la expresión de esta enzima en tejido mamario humano normal es bajo en comparación con el tejido de cáncer de mama de diferentes subtipos moleculares, que es bastante alto. La sobreexpresión de MMP-9 es una característica de los cánceres de mama triple negativos y HER2 positivos, y también, se halló en los ganglios linfáticos metastásicos[23]. En otro estudio, los investigadores obtuvieron que los niveles de expresión de las gelatinasas en tejido tumoral de mama se correspondían con la metástasis de los ganglios linfáticos y la estadificación del tumor [24]. Además, en ambos estudios se detectaron tanto pro-MMP-9 como MMP-9 en el análisis inmunohistoquímico.

La capacidad de emplear el nivel de MMP-9 y RhoA para la valoración del riesgo de cáncer de mama a través de la estratificación del paciente fue investigada en otro estudio. Los autores explicaron una perspectiva multiparamétrica no invasiva para estratificar pacientes con cáncer de mama utilizando niveles activos de actividad de MMP-9 en suero y patrones de expresión de RhoA en leucocitos circulantes. Los resultados demostraron que este enfoque a través del uso de biomarcadores-combinación MMP-9/RhoA podría ser útil para el diagnóstico temprano del cáncer de mama, aunque los autores reconocieron que había algunas limitaciones en el sistema de estratificación [25].

Otro estudio investigó numerosos biomarcadores en pacientes con cáncer de mama metastásico, observando los niveles de enolasa específica de neuronas (NSE) y los niveles tanto de MMP-9 y pro-MMP-9 como de dominio extracelular de HER2 (ECD) en suero. Se evaluó la asociación de estos biomarcadores con la presencia de metástasis cerebrales en pacientes con cáncer de mama metastásico y se demostró que los niveles séricos de NSE, MMP-9 y HER2 ECD fueron considerablemente más altos en pacientes con metástasis cerebrales [26].

4. Nanotecnología en medicina

La nanotecnología es la ciencia del diseño, síntesis, caracterización y aplicación de materiales y dispositivos cuyo tamaño oscila entre 1 y 100 nm. A esta escala espacial, es posible manipular los materiales para que produzcan interacciones muy específicas a nivel celular y molecular. De esta forma, la nanotecnología constituye uno de los principales avances tecnológicos de la actualidad, con un enorme potencial, y que puede ser aplicada en áreas muy diferentes de la industria y la sociedad [27].

Aunque ya se utilizan los nanomateriales en numerosas aplicaciones de distinta naturaleza, es precisamente su utilización en biomedicina uno de los campos en los que está generando mayores expectativas. La nanomedicina se encarga de monitorizar, reparar, construir y controlar componentes y funciones biológicas del organismo mediante el uso de sistemas a nanoescala [27].

La nanomedicina agrupa tres áreas principales: diagnóstico (nanodiagnóstico), administración controlada de fármacos (nanoterapia) y medicina regenerativa. Además, está emergiendo un nuevo enfoque prometedor que combina el diagnóstico y la terapia llamado teranóstico, siendo capaz de mantener en el mismo sistema el agente de diagnóstico / imagen y el medicamento. Gracias a la nanomedicina, se están introduciendo nuevos medicamentos tanto para el diagnóstico como para el tratamiento en la práctica clínica, que han permitido abordar las necesidades médicas no resueltas, al incorporar moléculas eficaces que de otra forma no podrían utilizarse por culpa de su elevada toxicidad, aprovechando varios mecanismos de acción, maximizando la eficacia y minimizando la dosis y la toxicidad, ofreciendo orientación al fármaco, liberación controlada y específica del sitio, favoreciendo una distribución localizada dentro del organismo y un transporte óptimo a través de barreras biológicas [28].

4.1. Características de las nanopartículas

Las nanopartículas (NPs) es un tipo de nanomaterial que se caracteriza por tener dimensiones a escala nanométrica, y pueden estar formada por un único material o presentar estructuras más complejas, que incluye recubrimientos diseñados con diferentes fines. Las características

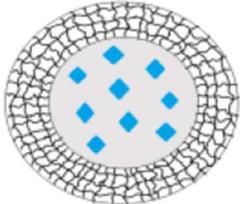
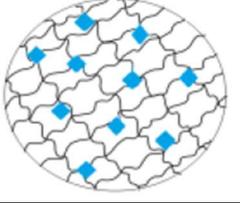
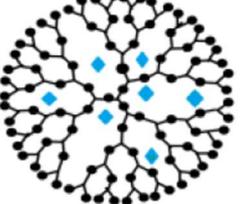
específicas de las NPs son función de su composición, que determina su tamaño, forma, grado de rigidez, su carga y conductividad eléctrica, el grado de porosidad del material y su afinidad con el organismo [27].

A este respecto, la biocompatibilidad de las NPs y su incorporación al interior celular dependen en gran medida del tipo de recubrimiento que se utilice y de la carga superficial. El tamaño de las NPs también es una cuestión fundamental que afecta a su biodistribución, al mecanismo de entrada en el interior de las células, o a la capacidad de pasar del torrente sanguíneo a los tejidos tumorales. El tamaño de las NPs utilizadas en nanomedicina debe estar comprendido entre los 5 y 200 nm para evitar que se pierdan por filtración directa a través de los riñones (< 5 nm) o que se queden fijadas por el sistema retículo-endotelial (> 200 nm). Por esta razón, el intervalo de tamaño más adecuado para una óptima distribución en el organismo está comprendido entre 10 y 100 nm. En lo que se refiere a la forma, la mayor parte de las NPs utilizadas como transportadores de fármacos antitumorales se sintetizan con simetría esférica, aunque alternativamente se han propuesto formas alternativas como cilíndrica, cúbica, elipsoidal o discoidal [27].

4.2. Tipos de nanopartículas

Atendiendo a su composición, las NPs se clasifican en orgánicas (poliméricas, dendrímeros, liposomas y micelas) o en inorgánicas (de oro, de óxidos de hierro, de sílice mesoporosa, de carbono y quantums dots (QDs)), como se recoge en las tablas 4 y 5. También existen casos en los que se combinan dos tipos de materiales, y son las llamadas NPs híbridas [27,29].

Tabla 4: Tipos de nanopartículas (NPs) orgánicas.

Tipos de NPs orgánicas	Descripción	Figura
NPs poliméricas [30]	Nanocápsulas: núcleo líquido (acuoso o lipídico) con el fármaco dispuesto en el interior y recubierta de una membrana polimérica.	
	Nanoesferas: el fármaco está uniformemente distribuido dentro de una matriz polimérica.	
Dendrímeros [31]	Polímeros sintéticos que presentan una estructura ramificada en forma de árbol. El fármaco puede introducirse en las cavidades internas o ser fijado sobre la superficie mediante interacciones covalentes o electrostáticas.	

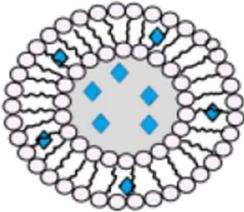
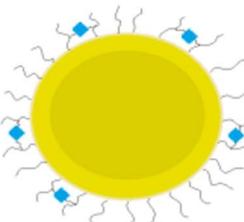
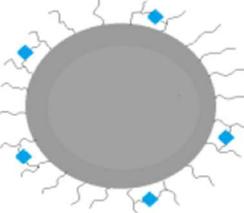
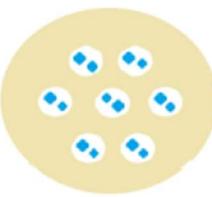
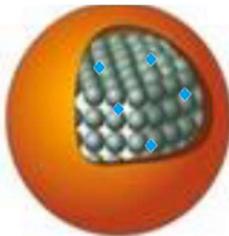
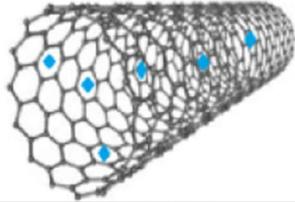
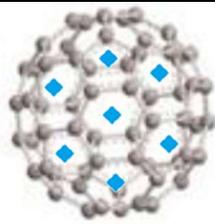
<p>Liposomas [32]</p>	<p>Núcleo acuoso recubierto de una bicapa lipídica. Según la naturaleza del fármaco pueden incorporarse al núcleo (hidrosolubles) o a la bicapa lipídica (liposolubles).</p>	
<p>Micelas [31]</p>	<p>Núcleo hidrofóbico estabilizado mediante una cubierta polimérica hidrofílica. Puede incorporar fármacos liposolubles en el interior del núcleo.</p>	

Tabla 5: Tipos de nanopartículas (NPs) inorgánicas.

Tipos de NPs inorgánicas	Descripción	Figura
<p>NPs de oro [32]</p>	<p>Partículas de oro con propiedades plasmónicas, que se activa mediante la incorporación de distintas moléculas (proteínas, polímeros) donde se fija el fármaco.</p>	
<p>NPs de óxido de hierro [31]</p>	<p>Núcleo de óxido de hierro superparamagnético. Su superficie puede modificarse para que sea capaz de fijar el fármaco.</p>	
<p>NPs de sílice mesoporosa [32]</p>	<p>Estructura porosa con forma esférica. Los fármacos se incorporan al interior de los poros. Puede recubrirse de sustancias que respondan a un estímulo, que provoca la liberación de los principios activos.</p>	
<p>QDs [33]</p>	<p>Estructura esférica con diámetro inferior a 10 nm, y naturaleza cristalina y semiconductor. Núcleo formado por elementos del grupo II-VI o del III-V. Sus propiedades ópticas se ajustan mediante un espectro molecular de energía que depende del tamaño. La señal de luminosidad puede ser hasta 100 veces mayor que proteínas o sondas orgánicas marcadas fluorescentemente.</p>	

NPs formadas por carbono [34,35]	Nanotubo de carbono: estructura tubular modificada que incorpora a los fármacos. Son partículas solubles y biocompatibles.	
	Fulerenos: estructura esférica que presenta una elevada estabilidad.	

Existen distintas formas de introducir el fármaco en la NP, entre las que se incluyen la incorporación por encapsulación, por absorción, por adsorción superficial o por conjugación (unión del fármaco con la NP por interacción covalente), y esto dependerá del método de síntesis utilizado. Aunque la finalidad más frecuente de estas NPs es la liberación de fármacos, también pueden ser empleadas como agentes de contraste sin incorporar principios activos [30,36].

4.3. Estrategias para la liberación de fármacos

Las NPs deben presentar las características adecuadas para que sean biocompatibles y puedan circular por la sangre hasta el tejido diana, pero además, deben actuar como nanotransportadores inteligentes capaces de liberar los fármacos al aplicar un determinado estímulo. De hecho, el diseño de las NPs depende en gran medida de la naturaleza de este estímulo [34]. Aunque existen ventajas en la sensibilidad de la liberación de fármacos cuando se utilizan diferentes estímulos de forma sinérgica, se van a describir de forma individual [37].

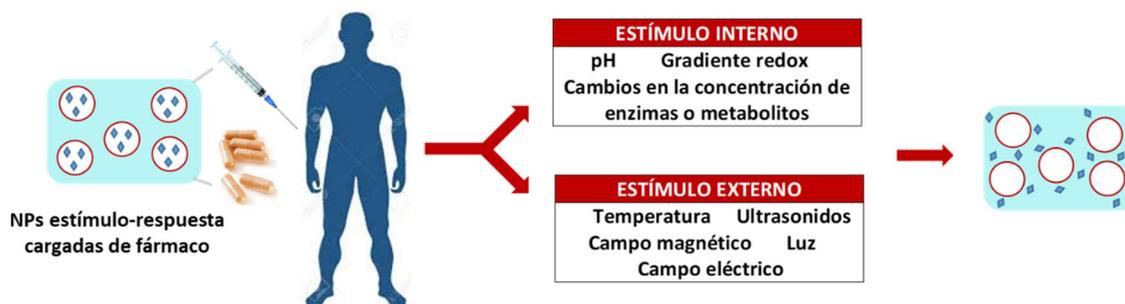


Figura 10. Esquema de la administración y liberación del fármaco de las NPs.

4.3.1. Estímulos internos

En este caso, se utilizan como estímulo características típicas de los tejidos donde se desea que se produzca la liberación del fármaco, como es el pH del medio, la presencia de enzimas o metabolitos o los gradientes de potencial redox [32].

- pH

Las NPs diseñadas deben ser sensibles a cambios sutiles del pH que se producen a nivel tisular (tejidos inflamados, isquémicos o tumorales) o en compartimentos intracelulares (endosomas o lisosomas). Se han planteado 2 estrategias para provocar la liberación de los fármacos cuando existan variaciones de pH. Una opción consiste en incorporar polímeros que contengan grupos ionizables (ácidos o bases) capaces de modificar su estructura o solubilidad con los cambios de pH. Otra opción es la fijación de los fármacos con los polímeros mediante enlaces que no sean estables a pH ácido, o bien que se produzca un cambio en la carga superficial del polímero [37].

- Concentración de enzimas y de metabolitos

En este caso, se utiliza el aumento de la concentración de ciertas enzimas que se produce en diferentes patologías como estímulo para la liberación de los fármacos. A modo de ejemplo, las proteasas se generan en los procesos tumorales y enfermedades cardiovasculares, las fosfolipasas se han asociado a diferentes tipos de cáncer, infecciones o trombosis, y las oxidorreductasas como consecuencia del estrés oxidativo en enfermedades como el cáncer o la diabetes [38]. También puede utilizarse como estímulo para la liberación de los fármacos la variación de las concentraciones de metabolitos relacionado con diferentes patologías [37].

- Potencial redox

Existen diferentes gradientes redox en nuestro organismo que pueden ser utilizados para la liberación de fármacos. En general, el medio intracelular presenta potenciales redox más bajos que el medio extracelular, y los tumores o zonas con tejidos dañados suelen ser medios más oxidantes que los tejidos sanos [39]. A este respecto, la sensibilidad para la liberación de fármacos ante gradientes redox puede conseguirse mediante la utilización de enlaces disulfuros, que poder ser rotos por el glutatión (GSH). Por otro lado, diferentes procesos patológicos pueden afectar al estrés oxidativo dando lugar a especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden ser susceptible de ser utilizado como estímulo. Distintos tipos de cáncer, procesos inflamatorios o zonas isquémicas producidas como consecuencia de infartos o ictus provocan elevados niveles de ROS [40].

4.3.2. Estímulos externos

La utilización de estímulos externos presenta ciertas ventajas con respecto a los estímulos endógenos, ya que permite una liberación de los fármacos más controlada en la zona a tratar. Además, puede conseguirse una liberación progresiva del fármaco mediante la aplicación de pulsos del estímulo a utilizar. Se puede diseñar NPs que sean sensibles a cambios de temperatura, del campo magnético, a la aplicación de ultrasonidos, o a cambio de la intensidad lumínica o de un campo eléctrico [32,37].

- **Cambios de temperatura**

Las NPs se diseñan para transportar el fármaco a la temperatura fisiológica (37 °C) y que puedan liberarlo cuando aumenta la temperatura a 40 – 45 °C. Es la estrategia más estudiada para el tratamiento del cáncer mediante nanotransportadores. Se han descrito diferentes formas de aumentar la temperatura de forma local en la zona a tratar, como la utilización de radiofrecuencias, ultrasonidos, microondas o campos magnéticos alternos [37].

- **Campo magnético**

Las NPs magnéticas pueden ser dirigidas para aumentar su concentración en el tejido diana mediante la aplicación de un campo magnético permanente. Adicionalmente, la liberación de los fármacos puede realizarse mediante la aplicación de un campo magnético alterno que genera un aumento de la temperatura. Este proceso se conoce como magnetohipertermia, y se basa en el calor generado en las relajaciones de Néel, para NPs pequeñas, y Browniana, para NPs de mayor tamaño [37].

- **Ultrasonidos**

La utilización de ultrasonidos como estímulo para la liberación de fármacos presenta importantes ventajas. Se trata de una técnica no invasiva, no produce radiaciones ionizantes y permite un adecuado control de la profundidad de penetración en el tejido mediante el ajuste de la frecuencia utilizada, el tiempo de aplicación o la secuencia de ciclos de trabajo. En este caso, el estímulo que se genera es un cambio de temperatura, efectos mecánicos (cavitación) capaces de afectar a enlaces y cambiar la estructura del polímero, o por efecto directo de la radiación [36].

- **Luz**

La luz, como estímulo para la liberación de fármacos, es una de las técnicas más utilizadas debido a su naturaleza no invasiva y al control que se puede ejercer sobre el instante en que se aplica [37]. Para hacer que una NP sea sensible a la luz es necesario incorporar, mediante un enlace covalente, algún tipo de grupo químico que sea fotosensible. Los nanotransportadores pueden liberar toda su carga de fármacos mediante la aplicación de una radiación luminosa que provoca cambios irreversibles en su estructura, o por el contrario, realizar una liberación progresiva mediante pulsos dentro de ciclos de luz-oscuridad [30]. Las NPs se diseñan para que sean sensibles a longitudes de onda específicas, dentro del intervalo correspondiente a la radiación ultravioleta, visible o infrarroja cercana (NIR). En la región de la luz ultravioleta-visible (longitud de onda entre 300 y 700 nm), la radiación presenta el inconveniente de su baja profundidad de penetración (aproximadamente unos 10 mm) debido a los procesos de dispersión que se produce en los tejidos blandos. Por esta razón, en la actualidad se está potenciando los estímulos con radiación con longitudes de onda mayores (700 – 1000 nm) dentro del NIR, que al presentar una menor dispersión consigue profundidades de penetración mayores sin que se produzcan daños importantes en los tejidos [37].

- **Campo eléctrico**

Se pueden usar campos eléctricos débiles (aproximadamente de 1 V) para lograr una liberación de fármaco pulsada o sostenida a través de una variedad de mecanismos de actuación. La electroporación es la aplicación de un voltaje transmembrana (normalmente alto) para causar la formación de poros en las membranas celulares y, por lo tanto, aumentar su permeabilidad a los medicamentos, lo que ha demostrado ser una vía eficaz para la administración

electrorrespuesta del medicamento. De forma similar, la iontoforesis, que utiliza un campo eléctrico para mejorar el suministro transdérmico de compuestos cargados, es un enfoque particularmente versátil. En general, los sistemas de respuesta eléctrica ofrecen una libertad significativa en el diseño del dispositivo que controla la señal eléctrica. Sin embargo, al igual que otros estímulos externos, la baja profundidad de penetración del tejido y la necesidad de evitar el daño no deseado al tejido pueden restringir su aplicación en la terapia [37].

4.4. Nanomedicina en cáncer de mama

A día de hoy, la quimioterapia sigue siendo una de las terapias más importantes en etapas tempranas y tardías del cáncer de mama, pero sus tasas de éxito actuales no son óptimas. La limitación de su efectividad es debido a varios obstáculos, los cuales están resumidos en la tabla 6. Estos desafíos se pueden dividir en tres categorías principales, la biodistribución subóptima del fármaco en el cuerpo (ítems 1-4), la mala respuesta al medicamento (ítems 5-7) y las propiedades inherentes del medicamento o la combinación de medicamentos en sí (ítems 7 y 8). Gracias a la nanomedicina, algunas de las limitaciones de la terapia con medicamentos contra el cáncer de mama, pueden ser solventadas (tabla 6). Aunque las ventajas de utilizar las NPs son atractivas, también tienen algunas limitaciones, que incluyen toxicidad potencial, posible inmunogenicidad y mecanismo de excreción [41].

Actualmente, sólo unos pocos productos de nanomedicina han obtenido la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE. UU., siendo Doxil y Abraxane las dos nanoformulaciones más exitosas que se utilizan ampliamente para el tratamiento del cáncer de mama en entornos clínicos. Sin embargo, es un tema que se sigue investigando en profundidad. Según la base de datos de *Clinical Trials*, hoy en día hay 68 ensayos clínicos sobre tratamientos para el cáncer de mama mediante NPs, de los cuales 2 son de fase I temprana, 12 de fase I, 8 de fase I/II, 35 de fase II, 1 de fase II/III, 4 de fase III, 2 de fase IV y 4 no son aplicables [42].

Para una mayor especificidad del cáncer y una mayor eficiencia en la administración del fármaco se elige una diana activa. Las dianas pueden incluir las células cancerosas y/o el microentorno tumoral. Las NPs están recubiertas con ciertos componentes biológicos que tienen una alta afinidad por estas dianas, de modo que pueden unirse y acumularse. Una diana molecular ideal debería cumplir los siguientes parámetros: 1) debe expresarse a un nivel relativamente más alto en el cáncer o en el microentorno tumoral que en los tejidos normales; 2) su nivel absoluto también debe ser alto para permitir una focalización eficiente; 3) debe expresarse en lugares que sean fácilmente accesibles por los nanotransportadores, por ejemplo, receptor de superficie en lugar de receptor intracelular; 4) su nivel de expresión se correlaciona preferiblemente con los comportamientos malignos, como la agresividad o la resistencia al fármaco, por lo que estos cánceres difíciles pueden dirigirse a una prioridad alta y 5) la focalización puede facilitar eventos que promuevan el proceso de administración del fármaco. En realidad, sólo un número limitado de dianas cumple todos o la mayoría de estos criterios [41].

En el microentorno tumoral hay dianas valiosas como MMP-9. La actividad de esta enzima está muy involucrada en la remodelación de la MEC y en la angiogénesis, por lo que es un factor a explotar para la liberación de fármacos. En este trabajo se va a investigar sobre ello, ya que sólo hay un ensayo clínico que regule a MMP-9 mediante NPs en el cáncer de mama [41]. Este ensayo de fase II está estudiando si los liposomas de clorhidrato de doxorubicina junto bevacizumab funcionan correctamente en el tratamiento de mujeres con cáncer de mama localmente recurrente o metastásico y sus efectos secundarios [42].

Tabla 6. Resumen de los desafíos claves para la terapia con medicamentos contra el cáncer de mama y las formas en que se puede utilizar la nanomedicina para enfrentarlos [41].

Desafíos a la terapia con medicamentos contra el cáncer de mama	¿Cómo puede ayudar la nanomedicina?
1. Especificidad insuficiente para el cáncer de mama	Aumenta el nivel de fármaco en el tumor y lo disminuye de los tejidos sanos
2. Acceso ineficiente de los medicamentos a sitios metastásicos como el tejido cerebral y óseo	Gracias a las muchas formulaciones existentes pueden mejorar la accesibilidad al tejido cerebral y óseo
3. Farmacocinética indeseable como la depuración rápida y una vida media corta	Uso de estrategias para extender el tiempo de circulación en el organismo
4. Toxicidad limitante de las dosis de los fármacos contra el cáncer o los excipientes	Aumento de la especificidad tumoral como se indica arriba; liberación controlada del fármaco desde nanotransportadores; Nanoformulación libre de disolventes y surfactante
5. Resistencia a los medicamentos a nivel celular	Puede mejorar la endocitosis; algunas nanoformulaciones pueden inhibir los mecanismos de salida de medicamentos; Co-administración de agentes que atacan los mecanismos de resistencia a los medicamentos
6. Resistencia al fármaco a nivel de microentorno del tumor	Orientación al microentorno tumoral; uso de nanoformulaciones sensibles al estímulo, como dispositivos que responden al pH
7. Dificultad para eliminar las células madre del cáncer	Pueden especializarse para ser dirigidas a las células madre del cáncer
8. Propiedades farmacéuticas indeseables de los fármacos	Pueden lograr la solubilización de los medicamentos y proteger los que sean inestables
9. Programación y secuencia de dosis subóptimas, especialmente cuando se trata de combinaciones de múltiples fármacos	Uso de nanotransportadores para la combinación y administración de múltiples medicamentos de forma cuidadosa y óptima

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

Dada la importancia que tiene la MMP-9 en el cáncer de mama sería interesante investigar y recopilar información sobre su implicación en el crecimiento e invasión tumoral. Por otra parte, el reciente desarrollo de la nanotecnología proporciona herramientas que permiten una administración más focalizada de fármacos para el tratamiento del cáncer. De esta forma, la utilización de la nanotecnología aplicada a la MMP-9 permitiría el desarrollo de una nueva línea de actuación en oncoterapia para detectar y optimizar la dosificación de fármacos o inhibir la acción de esta enzima.

2. Objetivos

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión de las diferentes estrategias de utilización de la nanotecnología asociada a la MMP-9 para el tratamiento del cáncer de mama.

Se han considerado los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar las ventajas que presenta las nanopartículas dirigidas a MMP-9 para la detección y seguimiento del cáncer de mama mediante técnicas de imagen.
2. Presentar el conocimiento actual del uso de nanotransportadores sensibles al estímulo de MMP-9 para el tratamiento del cáncer de mama.
3. Establecer la posible importancia del uso de nanopartículas para inhibir la actividad de la enzima MMP-9 en las diferentes etapas de la carcinogénesis en la que está involucrada.

Además se va a valorar los aspectos citotóxicos producidos por los nanomateriales utilizados.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Fuentes bibliográficas

Se realizó una búsqueda bibliográfica en las bases de datos *PubMed* y *Web of Science*, con un límite de 13 años de publicación, teniendo en cuenta los siguientes criterios de inclusión: estudios que examinaron la relación entre las nanopartículas y el nivel de MMP-9 en pacientes con cáncer de mama. Los artículos fueron seleccionados en relación con su originalidad y relevancia, considerando el rigor y la adecuación del diseño experimental. La búsqueda de referencias bibliográficas se llevó a cabo utilizando las siguientes palabras clave: “cáncer de mama”, “MMP”, “MMP-9”, “nanomedicina”, “nanopartícula”, “micelas”, “liposomas” y “dendrímico”. La búsqueda bibliográfica cubrió los siguientes tipos de estudios: estudios *in vitro* y revisiones bibliográficas. Adicionalmente, se ha utilizado la base de datos de *Clinical Trials* para recopilar información de los tratamientos actuales sobre el cáncer de mama, la MMP-9 y el uso de nanopartículas.

2. Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas para la realización de este estudio han sido las siguientes líneas epiteliales de adenocarcinoma humano de mama: MCF-7 y MDA-MB-231. Adicionalmente, se ha utilizado la línea celular de adenocarcinoma mamario murino 4T1.

– MCF-7

La línea celular MCF-7 se estableció del derrame pleural metastásico de una mujer de 69 años que padecía un adenocarcinoma de mama. Estas células expresan los receptores para estrógenos (RE+) y progesterona (RP+), pero no el receptor del factor de crecimiento de tipo epidérmico humano (HER2-) ni la proteína caspasa-3 activa. En esta línea celular el gen *p53* no está mutado. Los MCF-7 se usan principalmente como un modelo *in vitro* para estudiar la biología del cáncer de mama y, debido a la cantidad de variantes disponibles, tiene aplicaciones en el desarrollo de fármacos quimioterapéuticos y en la comprensión de la resistencia al fármaco [43].

– MDA-MB-231

La línea celular MDA-MB-231 es una línea celular epitelial de cáncer de mama humano que se derivó a partir de un derrame pleural metastásico de una mujer caucásica de 51 años con un adenocarcinoma mamario. Además, es bastante agresiva, invasiva y muy poco diferenciada, ya que está caracterizado por la ausencia de RE, RP y HER2 (triple negativo). De igual modo, esta línea celular expresa la proteína caspasa-3 activa. En esta línea celular el gen *p53* está mutado. El cáncer de mama triple negativo es una forma agresiva de cáncer de mama con pocas opciones de tratamiento. Por ello, es una de las más utilizadas en laboratorios de investigación médica [44].

– 4T1

El carcinoma mamario 4T1 es una línea celular tumoral mamario murino de un ratón BALB/cfC3H trasplantable. Al contrario que otros modelos tumorales, esta línea celular puede metastatizar de forma espontánea desde el tumor primario en la glándula mamaria hasta varios lugares

distantes. Este tumor tiene varias características que lo convierten en un modelo animal experimental adecuado para el cáncer de mama humano. En primer lugar, las células tumorales se trasplantan fácilmente en la glándula mamaria, de forma que el tumor primario se desarrolla en el lugar anatómicamente correcto. En segundo lugar, la enfermedad metastásica 4T1 se desarrolla espontáneamente a partir del tumor primario, como en el cáncer de mama humano. Otra ventaja de 4T1 es su resistencia a la 6-tioguanina, que permite la cuantificación precisa de las células metastásicas, incluso cuando se diseminan y en niveles sub-microscópicos en órganos distantes [45].

Este trabajo sólo contempla estudios realizados *in vitro*, aunque muchas de las investigaciones que se analizan, observan los efectos que causan la administración de fármacos en la actividad de MMP-9 mediante NPs *in vivo*.

3. Técnicas empleadas

3.1. Técnicas de visualización

– Ensayo de inmunofluorescencia

La actina-F (actina filamentosa) y la vinculina (una proteína de adhesión focal) se analizaron usando tinción de inmunofluorescencia gracias a un citoesqueleto de actina y un kit de tinción de adhesión focal (Millipore, Darmstadt, Alemania), siguiendo el protocolo del fabricante. Las células cultivadas se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos y se enjuagaron tres veces con una solución de 1xPBS. Se añadió solución de bloqueo (1xPBS, 5% de suero de caballo y 0,3% de Triton X-100) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. El primer anticuerpo (250: 1) se diluyó en solución de anticuerpo (1xPBS, BSA al 1%, Triton X-100 al 0,3%) y se incubó durante 12 horas a 4 ° C. A continuación, se lavó tres veces con una solución 1xPBS. El anticuerpo secundario conjugado con FITC (250: 1) se diluyó en solución de anticuerpo y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. El producto resultante se enjuagó tres veces con 1xPBS y la tinción de los núcleos se realizó mediante tratamiento con DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol, Sigma-Aldrich) durante 5 min [46,47].

– Ensayo ELISA

El ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) es un ensayo bioquímico analítico sensible y específico muy usado en inmunología para la detección y el análisis cuantitativo o cualitativo de un analito sin el requisito de equipos sofisticados o costosos. El analito podría ser cualquier sustancia específica, ya sea una proteína específica o una mezcla más compleja de más de una proteína. En este caso, el analito es MMP-9. En general, ELISA tiene una buena sensibilidad con un límite de detección / límite de cuantificación (LOD / LOQ) hasta la escala de nanogramos más baja [48].

3.2. Técnicas de medición del nivel de MMP-9

El análisis de transferencia Western Blot se usa para visualizar proteínas que se han separado mediante electroforesis en gel. El gel se coloca junto a una membrana de nitrocelulosa o fluoruro de polivinilideno y una corriente eléctrica hace que las proteínas migren del gel a la membrana.

La membrana puede ser analizada por anticuerpos específicos para el objetivo de interés y visualizarse utilizando anticuerpos secundarios y reactivos de detección [49].

Hay tres tipos en Western Blot en función de cómo se lleve la transferencia: húmedo, semiseco y seco. La transferencia de Western de tipo seco se puede hacer usando un kit de transferencia de Western. En la transferencia semiseca y húmeda, debe prepararse el Western Transfer Buffer. La diferencia entre la transferencia semiseca y la transferencia húmeda es la cantidad de tampón que se utilizará. Se requiere menos cantidad de tampón y, en su lugar, más cantidad de papeles de filtro absorbente en la transferencia semiseca en comparación con la transferencia húmeda, de modo que la membrana se mantendrá húmeda hasta el final de la transferencia [49].

3.3. Técnicas de citotoxicidad

– Ensayo MTT

La medición de la viabilidad y proliferación celular es crucial en la mayoría de ensayos *in vitro* para comprobar la respuesta de una población celular a factores externos. El ensayo de proliferación celular de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) mide la tasa de proliferación celular y, a la inversa, cuando los eventos metabólicos conducen a la apoptosis o necrosis, la reducción de la viabilidad celular. Cuando las células mueren, pierden la capacidad de convertir MTT en formazán, por lo que la formación de color sirve como un marcador útil y conveniente de células viables. Por tanto, este método es muy frecuente en ensayos de citotoxicidad [50].

– Ensayo CCK-8

El kit de recuento de células-8 (CCK-8) permite ensayos muy convenientes utilizando la sal de tetrazolio altamente soluble en agua de Dojindo. WST-8 [2-(2-metoxi 4 nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio, sal monosódica] produce un colorante de formazán soluble en agua tras la reducción de la presencia de un mediador de electrones. Al no ser radiactivo el CCK-8, permite realizar ensayos colorimétricos sensibles para la determinación del número de células viables en ensayos de proliferación celular y citotoxicidad. El WST-8 se reduce por deshidrogenasas en las células para dar un producto de color naranja (formazán), que es soluble en el medio de cultivo de tejidos. La cantidad de colorante de formazán generada por las deshidrogenasas en las células es directamente proporcional al número de células vivas. La sensibilidad de detección que usa CCK-8 es mayor que los ensayos que usan otras sales de tetrazolio como MTT [51].

4. Síntesis y caracterización de las nanopartículas

Los métodos de síntesis de NPs se pueden dividir en dos estrategias, las aproximaciones “de arriba hacia abajo” y las “de abajo hacia arriba”, como se puede observar en la figura 11. La primera reside en la partición del material macoscópico en proporciones pequeñas, y la segunda, en la fabricación de NPs mediante la condensación de átomos o entidades moleculares en una fase gaseosa o líquida. Adicionalmente, estas técnicas se agrupan en tres categorías, a saber, métodos físicos, métodos químicos y métodos bio-asistidos [52,53].

Algunos de los métodos físicos más utilizados para generar NPs son el molino de bolas de alta energía, la ablación por láser, la pulverización electrónica, la condensación de gas inerte, la deposición física de vapor, la pirólisis por láser, la pirólisis por rociado instantáneo y la mezcla

en fusión. Estos métodos principalmente emplean la estrategia “de arriba hacia abajo”. El método sol-gel, la técnica de microemulsión, la síntesis hidrotérmica, la síntesis de polioliol, la síntesis química de vapor y la técnica de deposición de vapor química mejorada por plasma son algunos de los métodos químicos más utilizados para la síntesis de NPs. Estas técnicas utilizan la estrategia “de abajo hacia arriba” para la síntesis de NPs. Los métodos bio-asistidos, la biosíntesis o la síntesis verde proporcionan un protocolo ambientalmente benigno, poco tóxico, económico y eficiente para sintetizar y fabricar NPs. Estos métodos utilizan sistemas biológicos como bacterias, hongos, virus, levaduras, actinomicetos, extractos de plantas, etc., para la síntesis de NPs de metal y óxido de metal. Los métodos de bio-asistencia también se pueden dividir en tres categorías según utilicen microorganismos, biomoléculas como plantillas o extractos de plantas [53].

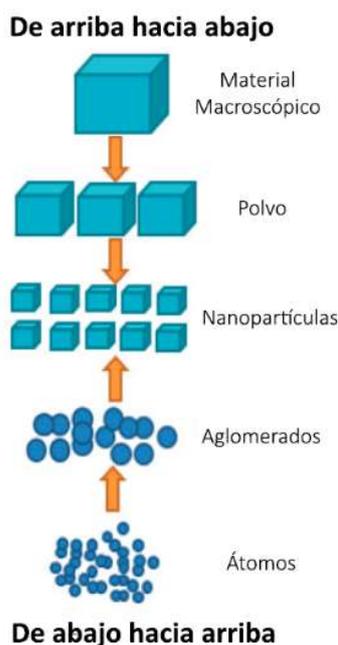


Figura 11. Estrategias de síntesis: “de arriba hacia abajo” y “de abajo hacia arriba” [53].

La caracterización de las NPs es necesaria para comprender su comportamiento en el organismo y para proporcionar una guía en el control del proceso y evaluación de la seguridad. El tamaño de partícula, la forma y distribución del tamaño, el estado de agregación y aglomeración, la estructura cristalina, el área de superficie específica, la porosidad, la composición química, la química de superficie, la carga, la actividad fotocatalítica, el potencial zeta, la solubilidad en agua, la velocidad de disolución/cinética y polvo son algunas de las características que deben tenerse en cuenta al empezar la caracterización [54].

Existen diferentes técnicas para el análisis de estos parámetros, los cuales se pueden agrupar en diferentes categorías, que incluyen métodos de conteo, ensamblaje, separación y métodos integrales. Los métodos de conteo hacen posible la individualización de las diferentes partículas que componen un nanomaterial, la medición de sus diferentes tamaños y la visualización de su morfología. La visualización de partículas se realiza preferentemente mediante métodos de microscopía, que incluyen varias variaciones de estas técnicas. Algunos de ejemplos de este tipo son la microscopía electrónica de transmisión, la TEM de alta resolución, la microscopía

electrónica de barrido, la crio-SEM, la microscopía de fuerza atómica y el análisis de seguimiento de partículas. Los métodos de fraccionamiento constan de dos pasos de tratamiento de la muestra, la separación de las partículas en una fracción monodispersa, y después, la detección de cada fracción. El fraccionamiento de flujo de campo, la centrifugación analítica y el análisis de movilidad eléctrica diferencial son algunos ejemplos de este tipo de método. Los métodos de ensamble permiten el informe de tamaños de partículas ponderados por intensidad. La variación de la señal medida a lo largo del tiempo da la distribución del tamaño de las partículas extraídas de una señal combinada. Algunos ejemplos de este tipo son la dispersión dinámica de la luz, la dispersión de rayos X de ángulo pequeño y la difracción de rayos X. Por último, los métodos integrales sólo miden una propiedad integral de la partícula y se utilizan principalmente para determinar el área de superficie específica. Brunauer Emmet Teller es el principal método utilizado y se basa en la adsorción de un gas inerte en la superficie del nanomaterial. Otra técnica relevante es la dispersión de luz electroforética utilizada para determinar el potencial zeta, que es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática (o de carga) entre las partículas, siendo uno de los parámetros fundamentales que afecta la estabilidad [54].

5. Análisis estadístico

Todos los valores se expresan como media \pm desviación estándar, y se evalúan mediante la prueba t de Student o ANOVA, utilizando los software SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*), Graph Pad Prism u Origin Pro. En todos los casos, el valor p inferior a 0.05 fue considerado como significativo, pero hay estudios que también han contemplado los valores ** p <0.01 y *** p <0.001 como niveles de significación superiores. Además, en algunos casos se ha notificado con las siglas NS el valor de no significativo.

NANOPARTÍCULAS DIRIGIDAS A LA MMP-9

A continuación, se presenta la potencialidad de MMP-9 a través de ciertos ejemplos de NPs que han sido investigados estos últimos años en el cáncer de mama. Como ya se ha demostrado que hay una sobreexpresión de MMP-9 en el tejido tumoral mamario, se analizarán diferentes estudios que utilizan a esta enzima para dirigir a las NPs al núcleo del tumor y así, o visualizar la zona afectada (nanosensores) o liberar el fármaco de forma más precisa y efectiva (nanotransportadores). Otro enfoque que se va a contemplar en este trabajo es la utilización de las NPs para regular el nivel de MMP-9 como diana terapéutica, ya sea de forma directa o indirecta.

1. Nanosensores de MMP-9

Como ya se comentó, MMP-9 es considerado un importante biomarcador para la detección temprana del cáncer de mama [16]. La zimografía es el método más utilizado para la detección de MMP-9, aunque requiere mucho tiempo y muestra una sensibilidad baja. Otros ensayos estándar para su detección son ELISA, quimioluminiscencia, etiquetado basado en la actividad, y transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). FRET es uno de los métodos más atractivos para la detección de MMP-9, presentando una alta sensibilidad y una simple fabricación. Sin embargo, su principal desventaja se debe a la longitud de onda de excitación de los fluoróforos, que se encuentran principalmente en la región de los rayos ultravioleta (UV). En esta región, el fondo fluorescente proveniente de las biomoléculas y el efecto de filtro casi interno provocado por otras especies pueden disminuir considerablemente la sensibilidad de detección. Por lo tanto, es necesario desarrollar una alternativa para estos materiales con excitación UV convencional en los bioensayos basados en FRET [46,47].

Por tanto, en este apartado se va a exponer los resultados de dos alternativas para detectar selectivamente y específicamente MMP-9 en células cancerosas usando nanosensores. Las alternativas planteadas son por un lado unas NPs de péptidos-MUA/AuN/GO (pMAG) con un tamaño medio de 4 ± 1 nm (figura 12A) [46] y, por otro lado, unas NPs de conversión ascendente – gelatina – óxido de grafeno (UCNP@gel@GO) con un tamaño medio de 150 nm (figura 12B) [47]. En ambos casos se aplicó una excitación UV para comprobar si estos materiales aumentaban su sensibilidad en esta región.

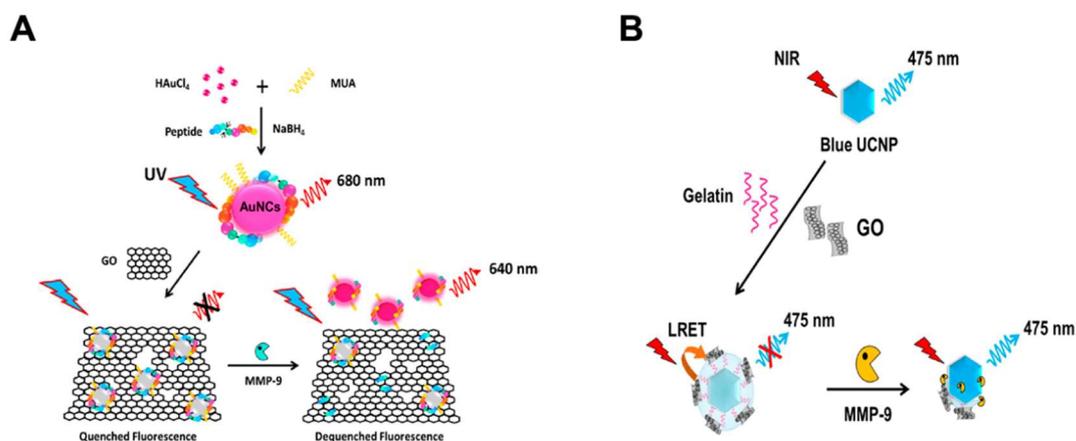


Figura 12. Diagrama esquemático de la síntesis y la aplicación de pMAG (A) [46] y UCNP@gel@GO (B) [47] para la detección de MMP-9.

Para que estas NPs detecten específicamente a MMP-9 se ha utilizado gelatina en sus cubiertas, en el caso de UCNP@gel@GO, y un péptido modificado (Gly/Leu), en el caso de pMAG, por lo que se trata de un sistema que responde ante las concentraciones de esta enzima.

En un primer lugar, la aplicación de las NPs en la detección de MMP-9 comienza al analizar el efecto de desactivación del GO con concentraciones crecientes de la enzima. Su adición indujo un significativo decremento de la intensidad de ambas NPs, como se muestra en la figura 13 A y B. La desactivación fluorescente se investigó con mayor profundidad utilizando un gráfico de Stern Volmer, en el que la intensidad de la fluorescencia se representa en función de la concentración de GO, siendo “ I_0 ” la intensidad antes de agregar GO e “ I ”, la de después. El gráfico de Stern-Volmer mostró una relación aproximadamente lineal, con una constante de extinción de $0.034 \text{ (mg mL}^{-1}\text{)}^{-1}$ en el caso de UCNP (figura 13C), lo que indica la existencia de un efecto de extinción entre GO y AuNC, y en el caso del péptido-MUA/AuNC, muestra una curvatura ascendente característica de la ecuación de Stern-Volmer con constante de la velocidad de enfriamiento se calculó para que fuera de $35 \times 10^3 \text{ (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)}^{-1}$ (figura 13D).

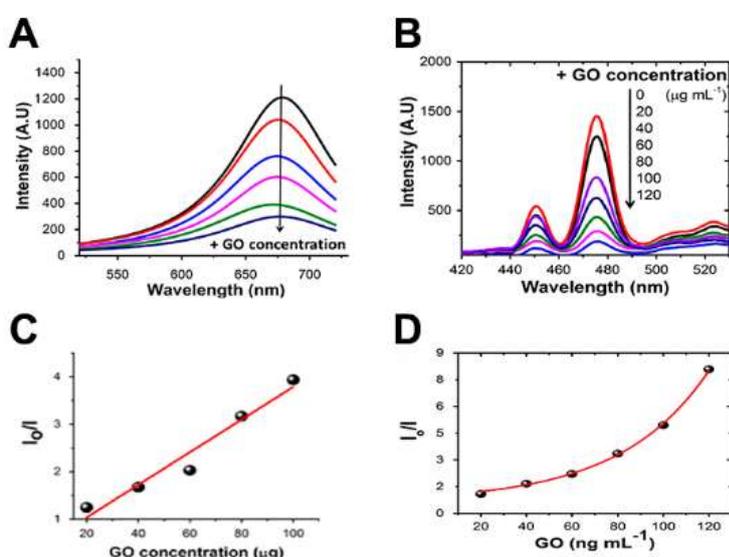


Figura 13. Los efectos de la desactivación de GO sobre las NPs. Intensidad de fluorescencia del péptido-MUA/AuNC (A) y de UCNP (B) en función de la concentración de GO. Gráfica Stern-Volmer de la intensidad del péptido-MUA/AuNC (C) y UCNP (D) frente a GO concentración [46,47].

A continuación, se va a evaluar la capacidad de estas NPs para detectar la MMP-9. En presencia de esta enzima, el péptido de la superficie de pMAG se deshizo, lo que llevó a la disminución de la proximidad entre AuNC y GO, restaurando la fluorescencia apagada. Para UCNP se registró la intensidad al irradiar la solución con una excitación de 980 nm. Ambas NPs se estimularon con concentraciones crecientes de MMP-9 en tampón Tris-HCl (50 mM, pH 7,6) a 37°C. Se observó que la luminiscencia apagada de las NPs se restauraron después de la adición de MMP-9 y la recuperación de la luminiscencia aumentó al incrementar la concentración de enzima como se muestra en la figura 14 A y B. La recuperación de la intensidad de luminiscencia (RL) se calculó en función de la intensidad de luminiscencia recuperada de la UCNP antes (I_0) y después (I) de agregar MMP-9 ($RL=I/I_0$) y la recuperación de fluorescencia (RF) en función de fluorescencia difusa de la pMAG ($RF=I/I_0-1$). Ambas recuperaciones aumentaron a medida que aumentaba la concentración de MMP-9. En el caso de pMAG, la linealidad se obtuvo de 5 a 20 ng de enzima

(figura 14C), y en el caso de UCNP@gel@GO, la mayor linealidad se obtuvo a una concentración de enzima de 12,5 a 80 ng mL⁻¹, y la saturación se obtuvo a 120 ng mL⁻¹ (figura 14D). Las respuestas tanto de luminiscencia como de fluorescencia fueron bastante estables y no se observó ninguna recuperación en el experimento de control, donde se incubó las NPs en ausencia de la enzima. Los resultados muestran que estos NPs pueden detectar el biomarcador tumoral MMP-9 a través de una respuesta de activación.

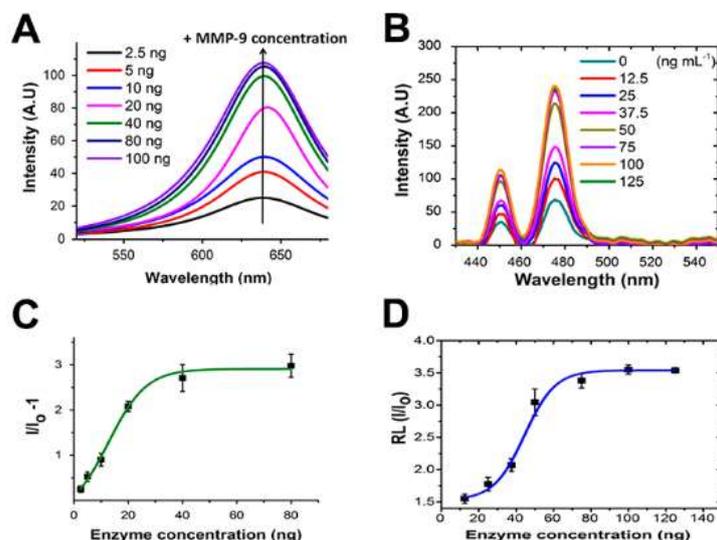


Figura 14. NPs bajo estímulos de MMP-9. Recuperación de la intensidad tras la adición de MMP-9 de pMAG (A) y de UCNP@gel@GO (B). Se recupera tanto la fluorescencia del pMAG (C) como la luminiscencia de UCNP (D) [46,47].

La detección de MMP-9 es importante para el diagnóstico clínico y el tratamiento de los cánceres en una etapa temprana. Por lo tanto, se aplicaron tanto UCNP@gel@GO como pMAG para la detección de MMP-9 secretada a partir de células MCF-7 bajo la estimulación de acetato de miristato de forbol (PMA). Se sabe que el PMA estimula fuertemente la invasión y migración de las células cancerosas al inducir la sobreexpresión de MMP-9. Las imágenes de inmunofluorescencia (figura 15) muestran los cambios morfológicos durante los procesos de adhesión y expansión celular. Después de 12 h, se observó que las células tratadas con PMA (figura 15 B y D) expresaban una notable mejora en la capacidad de formación de colonias, en particular una distribución condensada de F-actina (roja) que sobresale en los bordes de las células en comparación con las células no tratadas (figura 15 A y C). Estos resultados son consistentes con informes anteriores sobre los cambios morfológicos de MCF-7 debidos a la sobreexpresión de MMP-9 bajo estimulación con PMA.

Para obtener de forma más precisa la sensibilidad de la detección de MMP-9, se determinó la cantidad de MMP-9 secretada por células utilizando tanto en ambas NPs como en el ensayo ELISA (figura 16 A y B). En la figura 16 A y B (línea negra) se muestra que la cantidad de MMP-9 humana secretada por las células MCF-7 aumentó en función del tiempo de cultivo celular. Tanto la fluorescencia como la luminiscencia se restauraron progresivamente a medida que aumentaba el tiempo de incubación celular (figura 16 A y B, línea azul).

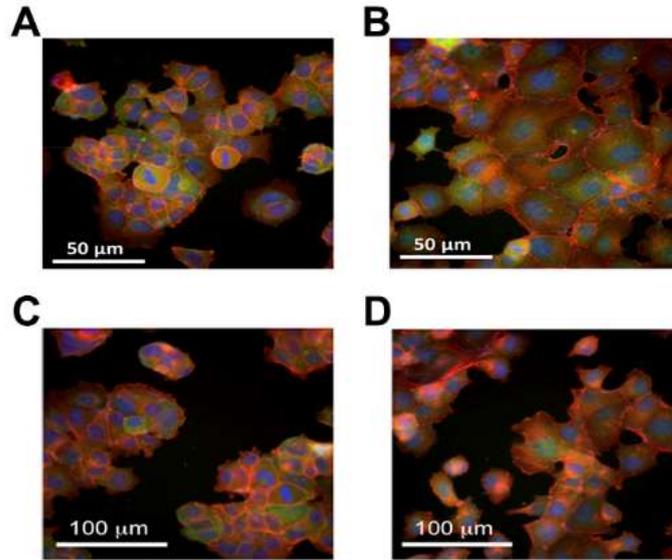


Figura 15. Imágenes de inmunofluorescencia (rojo: actina F; verde: vinculina; azul: núcleo) de células MCF-7 en la ausencia y presencia de PMA en pMAG (A y B) y UCNP@gel@gel (C y D) [46,47].

Después de 12 h de incubación celular con PMA, se secretaron 11.8 ng mL^{-1} , en el caso de pMAG, y 19 ng mL^{-1} , en el caso de UCNP@gel@GO, de MMP-9 por células MCF-7. La respuesta de activación tanto de la luminiscencia de UCNP como la fluorescencia de pMAG se correlacionó bien con la concentración de MMP-9 medida por ELISA. Por tanto, el límite de detección (LDO) de UCNP@gel@GO fue de 12 ng mL^{-1} y el de pMAG fue de 2.5 ng mL^{-1} , que es más bajo que los sensores enzimáticos previos basados en NPs.

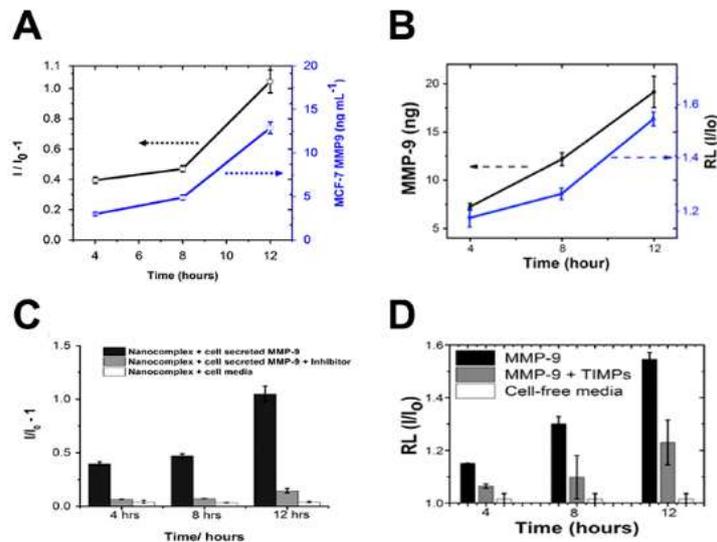


Figura 16. Sensibilidad y selectividad de las NPs para la detección de MMP-9 en células MCF-7 vivas. Activación de la respuesta de fluorescencia de pMAG (A) y la respuesta de luminiscencia de UCNP@gel@GO (B) (líneas azules) y ELISA (línea negra) para la detección *in vitro* de MMP-9 secretada de células MCF-7 en función del tiempo de cultivo celular (4h, 8h y 12h). RF de pMAG (C) y RL de UCNP@gel@GO (D) a MMP-9 secretada por células en ausencia y en presencia de TIMP, y la respuesta de luminiscencia de las NPs en un medio sin células [46,47].

Para confirmar que esta respuesta de activación fue causada por la MMP-9 secretada de las células, los medios de cultivo de células acondicionados se preincubaron con 500 μM de TIMP durante 1 h antes de la adición de la UCNP@gel@GO nanosensor y con 200 μM de TIMP durante 30 min antes de la adición de pMAG. Como se muestra en la figura 16 C y D, existe una disminución considerable en la respuesta de activación de las NPs cuando se inhibió la actividad de la MMP-9 (barra gris), lo que corrobora que la respuesta esté causada por la MMP-9 secretada sólo por las células MCF-7. Los resultados obtenidos demuestran que ambas NPs se puede usar para la detección de activación de MMP-9 secretada en células vivas con alta sensibilidad y selectividad.

Asimismo, hay otro artículo que ha planteado introducir NPs de óxido de hierro recubiertas de gelatina en el organismo permitiendo ser agentes de contraste de prolongada durabilidad en sangre (2 horas) y así, poder identificar la MMP-9 por técnicas de imagen, como la MRI, y por tanto, diagnosticar y tratar adecuadamente el cáncer de mama [55]. Por otro lado, existe otro artículo que trata de detectar la actividad de múltiples MMPs a la vez, gracias a un ensayo de fluorescencia mejorada a base de microarrays de péptidos, obteniendo resultados satisfactorios [56].

Para concluir, gracias a estas NPs se puede obtener bastante sensibilidad a la hora de medir la MMP-9 abordando el problema de que se necesitaba métodos que consiguieran estos resultados a altas longitudes de onda (región UV). Además de la sensibilidad, también se ha comprobado que las respuestas de visualización y la duración fueron bastante estables. Una desventaja de los nanosensores recubiertos con gelatina es que no hay diferenciación entre las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) por lo que las NPs son igualmente atraídas por estas dos enzimas.

2. Nanotransportadores sensibles al estímulo de MMP-9 para la administración de fármacos

Como ya se ha demostrado que hay una sobreexpresión de MMP-9 en el cáncer de mama, se han realizado diferentes estudios que la utilizan para guiar a las NPs al núcleo del tumor y así, liberar el fármaco de forma más precisa y efectiva. En este apartado, al igual que el anterior, se va a estudiar las NPs que responden ante las concentraciones de MMP-9, pero en vez de detectarlas/visualizarlas, se van a administrar fármacos específicos contra el cáncer de mama.

Hay varias investigaciones con este tipo de NPs que administran la liberación del fármaco gracias a un estímulo interno, en concreto, al de MMP-9, las cuales se verán a continuación. En todos estos estudios, se analiza la citotoxicidad que provoca las NPs a diferentes concentraciones del fármaco que llevan en su interior, y en algunos casos, se comprueba si son efectivas. Dependiendo de la investigación, se utilizará un ensayo de citotoxicidad u otro en una línea celular en concreto.

En un primer lugar, se estudia la DPM@PL, que son micelas de succinato de metoxi polietilenglicol-s-s-vitamina E (DPM) recubiertas de liposomas basados en PPV (PL) y cargadas con docetaxel (DTX) (figura 17A) [57], y un tipo de NPs basadas en micelas de péptidos que, tras la hidrólisis catalizada por MMP-9, se reconfiguran para formar nanoestructuras fibrilares y están cargadas de doxorubicina (DOX) (figura 17B) [58]. DPM@PL mostró una estructura de metralla con un tamaño promedio de 113.3 ± 2.7 nm, pero en el caso de las micelas, este estudio no proporcionó su tamaño medio.

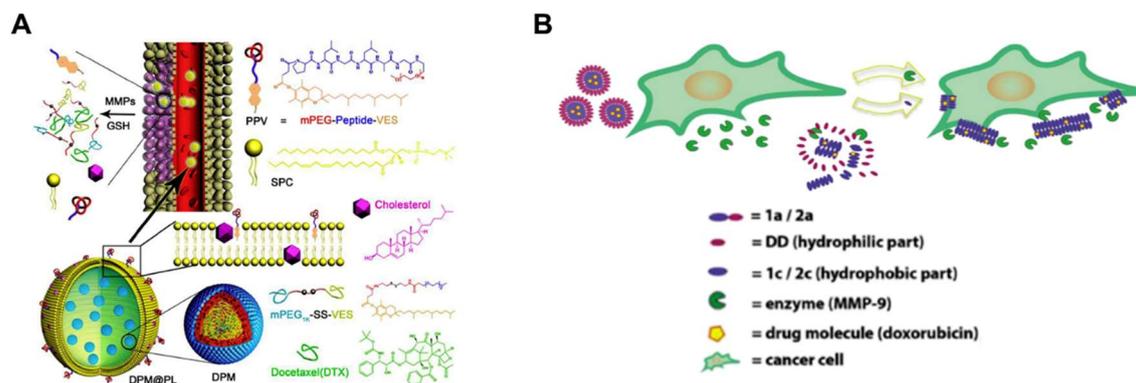


Figura 17. Representación esquemática de la síntesis y la aplicación de DPM@PL (A) y las micelas de péptidos (B) para la administración del fármaco debido al direccionamiento de MMP-9 [57,58].

La citotoxicidad en estos dos tipos de NPs se midió mediante el ensayo MTT, en el caso de las micelas de péptidos, y un ensayo estándar de tinción con sulfurodamina B, en el caso de DPM@PL. Además, hay que tener en cuenta que la línea celular que se utilizó para cada NP fue diferente, DPM@PL en células 4T1 y las micelas de péptidos en células MDA-MB-231-luc-D3H2LN. La peculiaridad de esta última línea celular es que expresa luciferasa, lo que permite realizar hacer un seguimiento exhaustivo de ésta.

Para DPM@PL, los valores de la concentración inhibitoria media máxima (IC50) de cada grupo fueron calculados y presentados en la figura 18A. Los valores de IC50 fueron 645.8 ng mL⁻¹ para el grupo DTX libre, 1111.0 ng mL⁻¹ para el grupo DPM@PL pre-tratado con PBS y 363.9 ng mL⁻¹ para el grupo DPM@PL pre-tratado con PBS, respectivamente. Estos resultados indicaron que la citotoxicidad de DPM@PL contra las células 4T1 se mejoró en gran medida después de la activación de MMP-9. Además, se demostró que esta enzima a la misma concentración con el grupo pre-tratado con MMP-9 también mostró una toxicidad insignificante contra las células 4T1, pero son datos que no se mostraron en la investigación.

Para la micela peptídica, se mostró que ambos péptidos incrementaban la efectividad de la DOX en un amplio rango de concentraciones, como se puede observar en la figura 18 B y C. Por el contrario, ninguno de los estereoisómeros D no hidrolizables expuso este aumento de los efectos del tratamiento con DOX. Con el péptido 1a(D) incluso disminuyó la efectividad del tratamiento con este fármaco, lo que coincide con el concepto de que la DOX podría quedar atrapada por las micelas de péptidos, pero no liberarse a través de la escisión enzimática. Por lo tanto, el tratamiento de combinación fue más tóxico para las células cancerosas en comparación con la DOX sola y también en comparación con la combinación de los péptidos D y la DOX, lo que confirma la importancia de la MMP-9 en la administración de fármacos mediado por micelas. Estos datos demuestran un mecanismo por el cual la transición de la morfología de la micela a la fibra produce una mayor toxicidad del tratamiento de combinación debido a la formación de depósitos fibrilares que actúan para localizar el medicamento cerca de las células cancerosas.

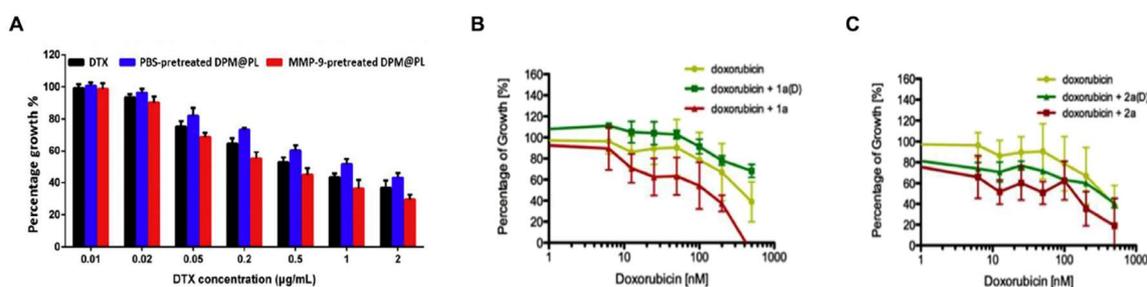


Figura 18. Determinación de citotoxicidad *in vitro* de DPM@PL libre de DTX, PBS y MMP-9 pre-tratados en células 4T1 después de 2 días de incubación (A) y de las micelas de péptidos, que fueron tratadas con los péptidos 1a y 2a utilizando DOX a 2.5 nM del péptido respectivo medido por MTT ensayo después de 3 días (B) [57,58].

En segundo lugar, está la GNP-DTX/Qu/IMA, que son NPs recubiertas de gelatina cargadas con tres fármacos diferentes, DTX, quercetina (Qu) e imatinib (IMA), como se observa en la figura 19A. Además, también se va a estudiar la opción de administrar DTX y Qu a través de una NP con estructura lipídica (NLC) [59]. Por otro lado, está el HPG-C18-PLLD, que es un copolímero anfifílico en forma de estrella que consiste en un derivado de poliglicerol hiperramificado (HPG-C18) y poli (L-lisina) dendrítica (PLLD), donde los segmentos C18 hidrófobos encapsularon el DTX, y los PLLD interactuaron con el plásmido de siRNA de MMP-9, representada en la figura 19B [60]. NLC-DTX/Qu y GNP-DTX/Qu/IMA presentaron diferentes distribuciones de tamaño con diámetros medios de aproximadamente 95 y 112 nm, y HPG-C18-PLLD mostró un gran tamaño de alrededor de 175 nm, respectivamente.

Para ambas NPs, se va a analizar, en primer lugar, la citotoxicidad que se da en el cultivo ante diferentes concentraciones de los fármacos cargados mediante el ensayo MTT, en el caso de GNP-DTX/Qu/IMA o NLC-DTX/Qu, y el ensayo CCK-8, en el caso de HPG-C18-PLLD y, en segundo lugar, el nivel de MMP-9 antes y después de administrar las NPs al cultivo mediante el análisis de western blot. Además, hay que tener en cuenta que el tipo de cultivo que se utilizó para cada NP fue diferente, GNP-DTX/Qu/IMA o NLC-DTX/Qu/IMA en células 4T1 y HPG-C18-PLLD en células MCF-7. Estos casos también entrarían en el apartado siguiente, ya que además de utilizar MMP-9 como guía para llevarlas al lugar del núcleo, la inhiben, y por eso, se mide el nivel enzimático.

Para GNP-DTX/Qu/IMA o NLC-DTX/Qu, se investigó la citotoxicidad de los fármacos libres y de las nanopartículas cargadas con esos mismos fármacos frente a las células cancerígenas. Como se muestra en la figura 20A, después de 24 h de co-incubación con diferentes fórmulas en diversas concentraciones, la tasa de crecimiento de las células 4T1 se redujo de forma dependiente de la dosis. A baja concentración ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$, calculada como concentración de DTX), no hubo una diferencia estadística significativa entre el fármaco libre y las nanopartículas. Cuando la concentración de fármaco aumentó, se presentaron diferencias. A una concentración de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (calculada como la concentración de DTX), la viabilidad celular de cada grupo fue de $62.43 \pm 4.33\%$ con IC_{50} de 14.27 ± 0.58 (DTX), $61.94 \pm 5.26\%$ con IC_{50} de 13.43 ± 0.82 (DTX + Qu), $47.85 \pm 2.78\%$ con IC_{50} de 8.923 ± 0.49 (NLC-DTX/Qu), y $39.27 \pm 3.35\%$ con IC_{50} de 6.181 ± 0.35 (GNP-DTX/Qu/IMA), respectivamente. En la concentración alta (25 y $75 \mu\text{g mL}^{-1}$), la viabilidad celular siguió el mismo orden: $\text{DTX} > \text{DTX} + \text{Qu} > \text{NLC-DTX/Qu} > \text{GNPDTX/Qu/IMA}$. El valor de IC_{50} de cada una de estas posibilidades mostró que la tasa de inhibición de las NPs en la línea celular 4T1 de cáncer de mama fue significativamente mayor que la del grupo DTX

original, y GNP-DTX/Qu/IMA mostró la mayor citotoxicidad. El IC50 de GNP-DTX/Qu/IMA fue aproximadamente 2,3 y 1,4 veces el de la solución DTX y NLC-DTX/Qu, respectivamente. No hubo diferencias significativas entre el grupo DTX y el grupo DTX + Qu ($p < 0.05$), lo que podría demostrar que Qu tiene citotoxicidad no aparente en las células 4T1. Por un lado, el aumento de la citotoxicidad de GNP DTX/Qu/IMA podría deberse al aumento de la captación celular, que fue causado por la adsorción electrostática entre el núcleo de NLC catiónico y la membrana cargada negativamente después de la degradación del recubrimiento de gelatina. Por otro lado, IMA podría hacer una contribución a la toxicidad incrementada como tratamiento adyuvante.

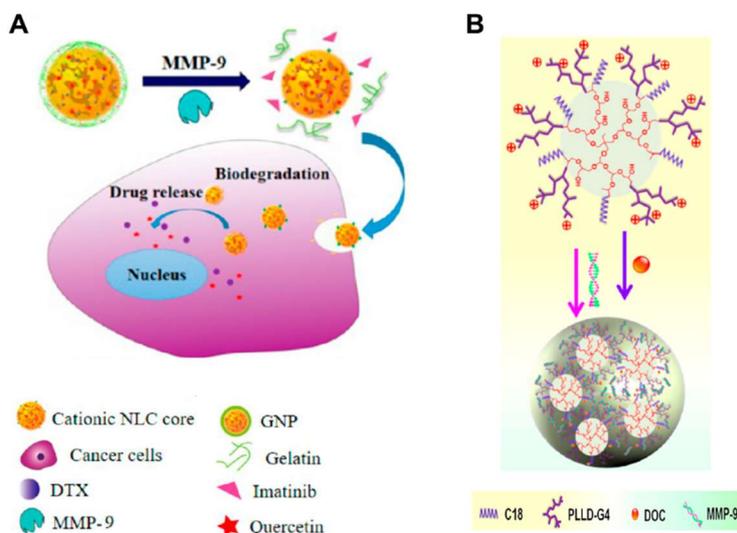


Figura 19. Representación esquemática de la síntesis y la aplicación de GNP-DTX/Qu/IMA o NLC-DTX/Qu (A) y HPG-C18-PLLD (B) para la administración del fármaco mediante al direccionamiento de MMP-9 [59,60].

En cambio, para la citotoxicidad de la HPG-C18-PLLD se utilizaron el control la polietilenimina PEI-25k y PBS y los resultados obtenidos se muestran en la figura 20B. Como se observa, por debajo de la concentración de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, el HPG-C18-PLLD en blanco mostró una citotoxicidad insignificante en comparación con el control de PBS. Por el contrario, PEI-25k mostró una citotoxicidad significativa, y no hubo más del 20% de células MCF-7 disponibles después del tratamiento con $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PEI-25k. La gran diferencia en la citotoxicidad entre HPG-C18-PLLD y PEI-25k fue que HPG-C18-PLLD tiene una mayor ventaja en el suministro de genes en la clínica. Por tanto, en este trabajo se ha observado que no ha habido una toxicidad considerable, y esto se debe a que HPG-C18-PLLD tiene una estructura química biocompatible gracias a sus segmentos (HPG, C18 y PLLD). Sus estructuras dendríticas en forma de estrella y características podrían reducir su toxicidad en comparación con los polímeros catiónicos lineales que tienen pesos moleculares similares.

Para verificar el efecto de inhibición de las NPs, se aplicó el ensayo de transferencia Western para medir el nivel de MMP-9. El análisis de transferencia Western Blot indicó que en GNP-DTX/Qu/IMA y NLC-DTX/Qu podrían inhibir efectivamente la proteína MMP-9 en comparación con fármaco libre, aunque GNP-DTX/Qu/IMA manifestó una inhibición más pronunciada de MMP-9 (figura 21A). Esto podría certificar el efecto de inhibición de GNP-DTX/Qu /IMA en la migración de células 4T1 de manera indirecta.

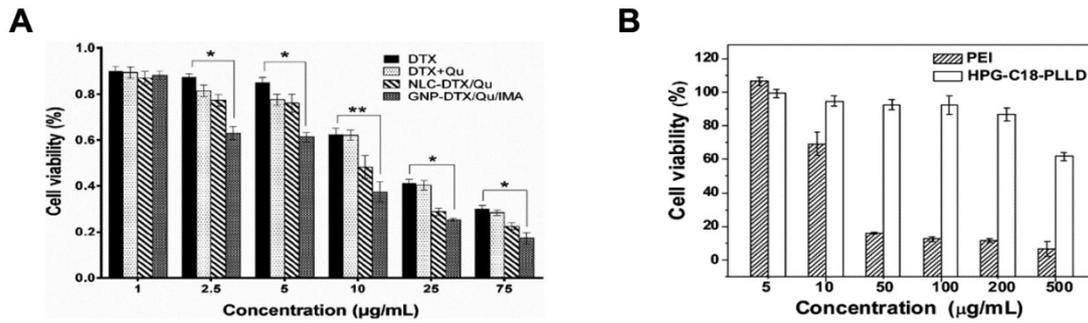


Figura 20. Determinación de citotoxicidad *in vitro*. (A) Resultados de GNP-DTX/Qu/IMA, NLC-DTX / Qu, DTX+Qu y DTX libre a diferentes concentraciones en células 4T1 a 37°C durante 24 h mediante el ensayo MTT. (B) Resultados de HPG-C18-PLLD y PEI-25k a diferentes concentraciones en células MCF-7 mediante el ensayo CCK-8 [59,60].

Por otro lado, el análisis de transferencia Western Blot mostró que el HPG-C18-PLLD no podía reducir el nivel de MMP-9, y no hubo diferencia significativa con el control de PBS (figura 21B). Mientras que después de transfectar con el plásmido de ARNip de MMP-9, la concentración de MMP-9 se redujo considerablemente. PEI-25k/MMP-9 medió más del 80% de reducción en la concentración de proteínas debido a su gran capacidad de administración de genes. El complejo HPG-C18-PLLD/MMP-9 en la relación de peso de 80 también hace que la concentración de la proteína MMP-9 se reduzca en un 75%. Estos resultados sugirieron que HPG-C18-PLLD podría administrar el ARNip de MMP-9 de manera efectiva en las células MCF-7 y reducir el nivel de MMP-9. Aunque muestra una capacidad ligeramente menor para entregar el plásmido de ARNip de MMP-9 en comparación con PEI-25k, HPG-C18-PLLD todavía se consideraba un portador de genes prometedor debido a sus ventajas en cuanto a biocompatibilidad.

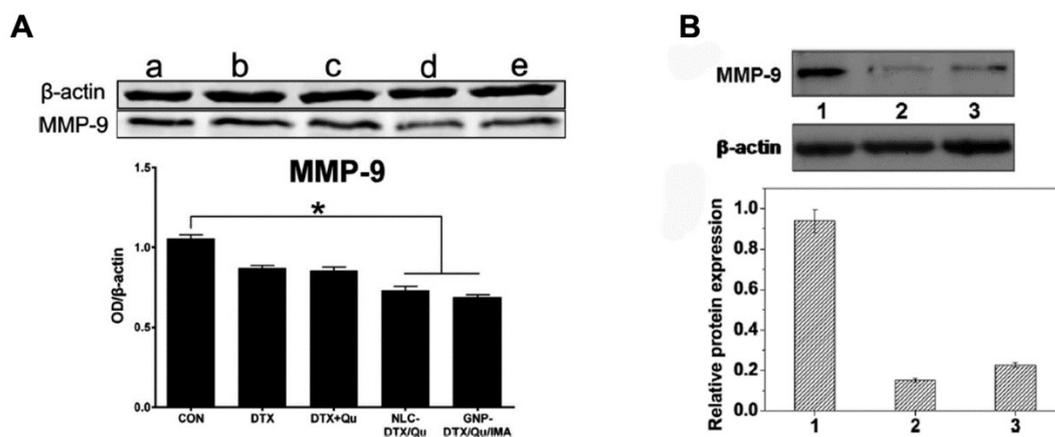


Figura 21. Ensayo Western Blot para medir el nivel de MMP-9. La parte superior de A y B representa el nivel de MMP-9, y la parte inferior, el análisis del nivel de MMP-9 como la relación de MMP-9 a β -actina. (a) Control, (b) DTX, (c) DTX + Qu, (d) NLC-DTX / Qu, (e) GNPDTX / Qu / IMA, (1) HPG-C18-PLLD, (2) PEI-25k / MMP-9 y (3) HPG-C18-PLLD / MMP-9 [59,60].

Por último, también se han encontrado otras NPs que son conducidas por MMP-9 para suministrar los fármacos cargados, comprobado su citotoxicidad en células MCF7 y 4T1. A diferencia de las anteriores NPs, estas investigaciones o mide su viabilidad con ambas gelatinasas o no se especifica el ensayo de citotoxicidad utilizado. Una de ellas es la polimersoma PDMS-PMOXA-SRL-PTX (paclitaxel) [61] y la otra es un conjugado de Janus mPEGilado péptido dendron-PVGLIG-DOX [62]. Además, es interesante comentar que en todos los casos expuestos también se han investigado el efecto de estas NPs *in vivo* (ratón y pez zebra).

En definitiva, gracias a este tipo de NPs que se estimulan mediante MMP-9, se ha podido lograr una eficaz administración del fármaco en el lugar del tumor con menos citotoxicidad que si se hubiera suministrado el fármaco libre. Sin embargo, existe el problema de diferenciación entre las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) en la mayoría de las NPs de este apartado, ya que al estar recubiertas de gelatinas, éstas son igualmente atraídas por las dos enzimas, como le sucede a los nanosensores de MMP-9 ya vistos.

3. Tratamientos diana que regulan a MMP-9

En los apartados anteriores se ha analizado la mayoría de NPs existentes que se encargan de localizar el tumor mediante la utilización de MMP-9 (nanosensores) y/o administrar fármacos (nanotransportadores), que no son capaces de llegar hasta el tumor o si llegan, lo hacen en una dosis mínima, ya que el organismo lo va degradando, y por tanto, perjudica al tejido sano. En este apartado no se va a utilizar MMP-9 como guía, sino como diana terapéutica sabiendo que está involucrada en varias etapas de la carcinogénesis, tales como la invasión, la progresión celular, la angiogénesis y la metástasis.

En este apartado, los tratamientos que inhiben a MMP-9 mediante NPs se han dividido en tratamientos directos e indirectos. Los tratamientos directos son aquellos que tienen como diana a MMP-9, y los indirectos, son aquellos que inhiben algún paso intermedio de una cierta ruta en la que está involucrada nuestra enzima. Por otro lado, se comentarán otros artículos (con la misma función) que no se han explicado con más detalle, ya sea porque la línea celular que han trabajado o la técnica que utilizan para medir la expresión de MMP-9 no se ha contemplado en esta investigación. Igualmente, hay otros estudios que aunque hayan analizado la citotoxicidad de las NPs que elaboran, la medición de nuestra diana la realizan *in vivo*. Por último, se mencionarán las ventajas y desventajas de los tratamientos diana que regulan a MMP-9.

3.1. Tratamientos directos

A continuación, se va a estudiar las diferentes NPs existentes que inhiben directamente a MMP-9, gracias a sus diferentes características, estímulos, fármacos, entre otros. En todos estos estudios, primero se analiza la citotoxicidad que provoca las NPs para diferentes concentraciones del fármaco cargado, y después, el nivel de MMP-9 tras incorporar las NPs. Dependiendo de la investigación, se utilizará un ensayo de citotoxicidad u otro en una línea celular en concreto.

Todas las NPs de este apartado se han analizado en células MCF-7, pero se diferencian en el ensayo de citotoxicidad utilizado, por lo que se aprovechará esta diferenciación para dividir los trabajos considerados y poder examinar de forma óptima los resultados.

En un primer lugar, se va a estudiar las NPs que se han analizado en células MCF-7 y su citotoxicidad se ha medido con un ensayo CCK-8. En este caso se encuentran la FA-CPSP-UA, que son NPs de polispermina quimiosensible (CPSP) dirigido gracias al ácido fólico (FA) para la administración del ácido ursólico (UA) (figura 22A) [63], la GO-PAMAM/DOX/MMP-9, que son dendrímeros de poli (amidoamina) modificado con GO cargados con DOX y/o shRNA de MMP-9 (figura 22B) [64] y la FA-PAAAs/MMP-9, que son NPs de poli (amidoamina) hiperramificada modificada (PAAAs) con folato (FA) cargadas con siRNA de MMP-9 (figura 22C) [65]. FA-CPSP-UA y FA-PAAAs/MMP-9 reaccionan al estímulo interno del potencial de redox, en concreto, al glutatión (GSH), y GO-PAMAM/DOX/MMP-9 reaccionan al estímulo interno del pH. El tamaño de FA-CPSP-UA fue de 223.3 ± 11.17 nm, respectivamente, y en los otros dos casos, no se proporcionaron. Los potenciales zeta de FA-CPSP-UA y GO-PAMAM fueron de $+27.5 \pm 1.53$ mV y $+24.1$ mV, respectivamente, pero en el caso de FA-PAAAs, no se especificó.

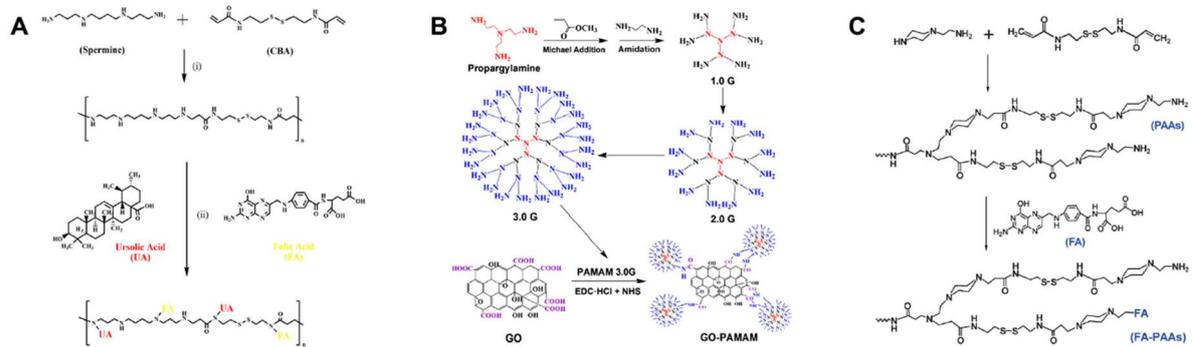


Figura 22. Esquema de síntesis de FA-CPSP-UA (A), la GO-PAMAM (B) y la FA-PAAAs (C) [63–65].

A continuación se va a estudiar la citotoxicidad de estas NPs en las células MCF-7 mediante el ensayo CCK-8. En el caso de FA-CPSP (figura 23A), se encontró casi la misma citotoxicidad que sólo CPSP (confirmación de seguridad), y la tasa de supervivencia celular fue del 74,1% cuando la concentración alcanzó los $200 \mu\text{g mL}^{-1}$. En el caso de GO-PAMAM no hubo toxicidad, mientras que las muestras que contenían shRNA de DOX y MMP-9 mostraron una citotoxicidad, cuyas tasas de supervivencia celular fueron 54.43% y 71.75% (figura 23B). Para la administración conjunta de GO-PAMAM / DOX / MMP-9, la tasa de supervivencia celular fue solo del 49,61%, que es inferior a la del shRNA DOX o MMP-9. Por lo tanto, se puede explicar que el efecto de la administración conjunta en cuanto a citotoxicidad se refiere es más evidente que el de un solo fármaco. Por último, en el caso de FA-PAAAs (figura 23C), se encontró una baja citotoxicidad, y no hubo una diferencia significativa en la viabilidad celular con el control de PBS cuando su concentración fue inferior a 200 mg mL^{-1} .

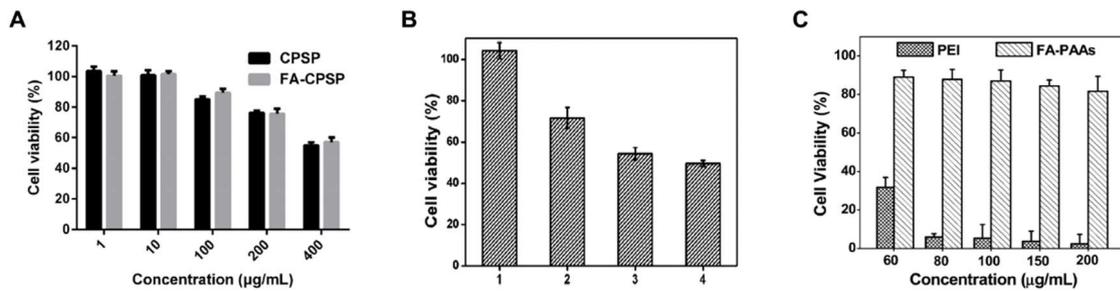


Figura 23. Viabilidad celular de MCF-7 después de la incubación con CPSP y FA-CPSP (A), con GO-PAMAM libre (1), GO-PAMAM/MMP-9 (2), GO-PAMAM/DOX (3) y GO-PAMAM/DOX/MMP-9 (4) (B) o con FA-PAA y PEI (C) a diferentes concentraciones [63–65].

Ahora se va a estudiar el nivel de MMP-9 mediante el análisis Western Blot. Los niveles de la proteína MMP-9 tratadas con FA-CPSP-UA fueron reducidos efectivamente de una manera dependiente de la dosis, en comparación con el control (figura 24A). En comparación con el control de PBS y GO-PAMAM, GO-PAMAM/MMP-9 y PEI-25k/MMP-9 puso de manifiesto bajos niveles de la proteína MMP-9 (figura 24B). El resultado mostró que, el proceso de transfección de PEI-25k y GO-PAMAM ha obstaculizado significativamente los niveles de MMP-9. Por último, en comparación con el control de FA-PAA, las demás combinaciones podrían dar como resultado una baja cantidad de esta MMP (figura 24C). Debido a la presencia de suero en el proceso de transfección, PEI medió una reducción de aproximadamente el 45% de MMP-9, que no fue tan buena como las PAA y las FA-PAA. Además, los FA-PAA mostraron el mejor efecto de regulación, con más del 60% de la cantidad de la proteína MMP-9 inhibida.

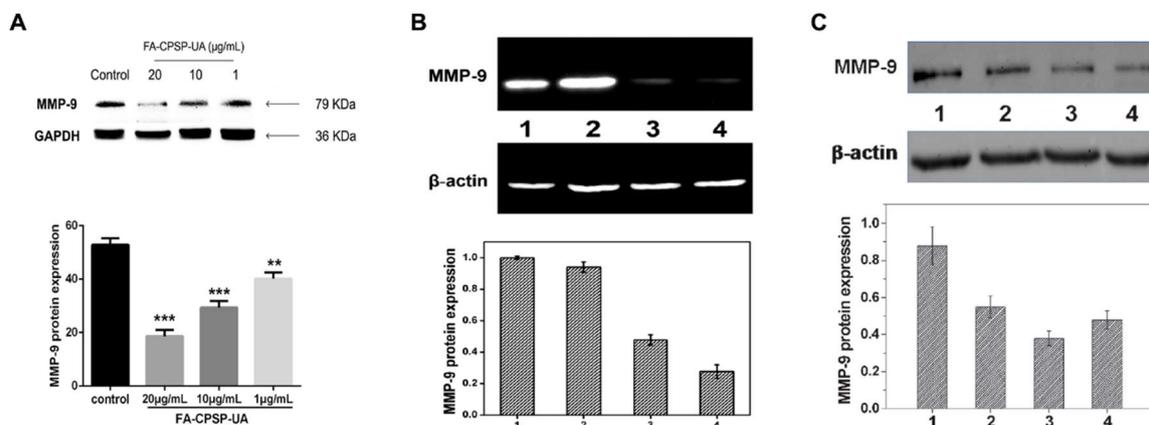


Figura 24. MMP-9 determinada por análisis de transferencia Western (partes superiores) y el análisis de las intensidades de luz de esta enzima como la relación de MMP-9 a GAPDH (A) y como la relación de MMP-9 a β-actina (B Y C) de los resultados de Western blot (partes inferiores). (B): (1) PBS; (2) GO-PAMAM; (3) GO-PAMAM / MMP-9; (4) PEI-25k / MMP-9. (C): (1) FA-PAA negros; (2) PEI / MMP-9; (3) FA PAA / MMP-9; (4) PAA / MMP-9. PBS se estableció como el control [63–65].

Para finalizar los tratamientos diana que regulan a MMP-9, se va a analizar unas NPs de oro recubiertas de resveratrol (Rev-AuNPs) [66] y unas micelas conjugadas con ácido gambóxico (GA) y PAA a través de enlaces amida cargadas con DTX y shRNA (PAG/DTX-shRNA) [67]. Esta última NP reacciona al estímulo interno del potencial de redox, en concreto, al glutatión (GSH), pero en el caso de Rev-AuNPs, no se hace mención de cuál es el estímulo que utilizan para

conducir a esta NP al centro del tumor. Los tamaños de partícula de las micelas PAG/DTX aumentaron de 109.2 a 257.5 nm y mostraron potenciales zeta similares de aproximadamente +55 mV. Las Rev-AuNPs formaron nanopartículas esféricas de 22.28 ± 2.98 nm de diámetro y un potencial zeta de -32.8 ± 2.47 mV.

La citotoxicidad en estos dos tipos de NPs se midió mediante el ensayo MTT, en el caso de Rev-AuNPs, y un ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo, en el caso de PAG/DTX-shRNA. La citotoxicidad de las células MCF-7 después del tratamiento con DTX, DTX-shRNA, PAG/DTX o PAG/DTXshRNA a diferentes concentraciones de DTX durante 48 h, se puede observar en la figura 25A. PAG/DTX y PAG/DTX-shRNA mostraron una toxicidad mucho más fuerte que la de DTX libre o la combinación de DTX-shRNA. Para confirmar aún más el efecto antitumoral de PAG/DTX-shRNA, la citotoxicidad de las células MCF-7 después del tratamiento con shRNA MMP-9, DTX-shRNA, PAG-shRNA o PAG/DTX-shRNA se detectó a diferentes concentraciones de ARNsh de MMP-9 durante 48 h, como se muestra en la figura 25B. Como es evidente, el shRNA de MMP-9 no ejerció ningún efecto tóxico en las células MCF-7, y esto es debido a la degradación lisosomal y nucleolítica. Por otro lado, se determinó que las Rev-AuNPs, a una concentración de 10 μ M, no fueron tóxicas para las células MCF-7 (figura 25C).

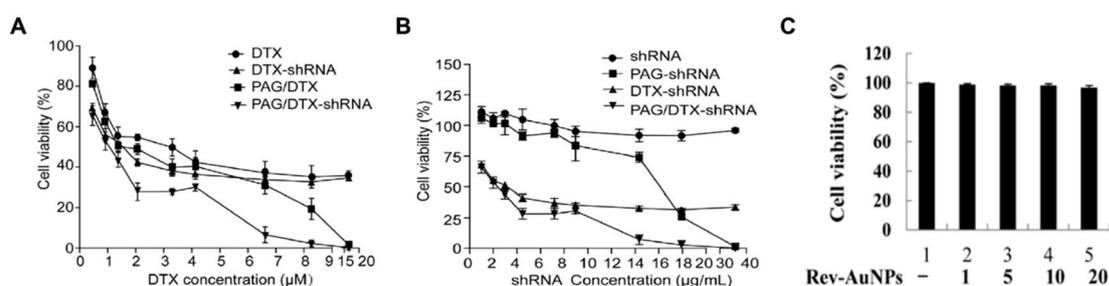


Figura 25. (A) Los efectos de DTX, DTX-shRNA, PAG/DTX y PAG/DTX shRNA sobre las células MCF-7 durante 48 h a diferentes concentraciones de DTX. (B) Los efectos del shRNA MMP-9, PAG-shRNA, DTX-shRNA y PAG/DTX- shRNA sobre las células MCF-7 durante 48 h a diferentes concentraciones de shRNA. (C) El efecto de Rev-AuNPs sobre las células MCF-7 con diferentes concentraciones de esta NP durante 24 h [66,67].

Para comprobar la efectividad de estas NPs de inhibir el nivel de MMP-9, se utilizó el análisis Western Blot. Después de exponer a las células MCF-7 a las micelas PAG-shRNA o PAG/DTX-shRNA, los resultados indicaron que podrían inhibir significativamente la concentración de la proteína MMP-9 en comparación con las micelas de PAG, que se usaron como control (figura 26A). Además, el nivel de proteína MMP-9 en células MCF-7 después del tratamiento con PAG-shRNA fue similar al de las células tratadas con PAG/DTX-shRNA. Por otro lado, el tratamiento con Rev-AuNPs suprimió la actividad de MMP-9 y fue interesante observar que su efecto inhibitorio fue más fuerte que el de Rev en la misma concentración (figura 26B).

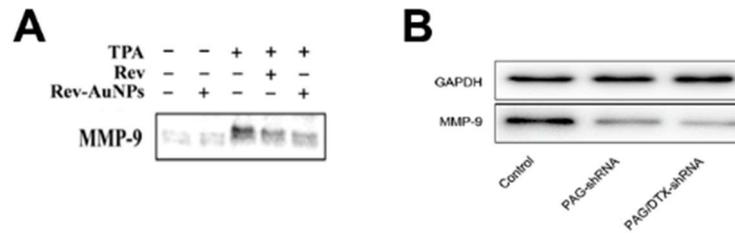


Figura 26. Análisis Western Blot de la proteína MMP-9 expresada en células MCF-7 después del tratamiento con micelas PAG, PAG-shRNA o PAG/DTX-shRNA (A) y con Rev AuNPs (B) [66,67].

Por concluir, FA-CPSP-UA mostró una alta solubilidad acuosa, degradación gracias GSH, buena biocompatibilidad y un mayor efecto de inhibición sobre la proliferación de células tumorales en comparación con la UA libre. Además, GO-PAMAM también tiene una buena biocompatibilidad y mostró una menor citotoxicidad en comparación con PEI-25k. En particular, los FA-PAA mostraron una eficiencia de administración de genes mucho mayor que la de PEI-25k en presencia de suero, lo que lleva a una disminución evidente en los niveles de MMP-9 y la muerte por apoptosis de las células MCF-7, lo que sugiere una posible aplicación en la terapia génica para los tumores. Por otro lado, PAG/DTX-shRNA mostró una liberación rápida y simultánea de DTX, GA y MMP-9 shRNA en la presencia de reactivos reductores citoplásmicos, una eficacia antitumoral más fuerte que las micelas con un solo fármaco y un gran potencial para combinar dos moléculas pequeñas de fármacos hidrófobos y un gen en un solo sistema de terapia contra el cáncer. Por último, las Rev-AuNPs inhibieron efectivamente la progresión de las células del cáncer de mama, por lo que se puede considerar como un agente terapéutico, y además, es más biocompatible, gracias al Rev, que es un fitoquímico dietético natural con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antisenescentes.

3.2. Tratamientos indirectos

No todas las NPs que han regulado a MMP-9 la han tratado como diana directa, sino que se ha inhibido indirectamente al bloquear algún paso intermedio de una cierta ruta en la que está involucrada esta enzima. Por lo que esta sección se va a dividir según la ruta que bloquee y/o al paso intermedio que inhiba. En la figura 27 se muestran algunas de las vías implicadas en la regulación de MMP-9 y los factores que han sido bloqueados por las NPs que se van a analizar en este apartado. Por tanto, se va a medir la citotoxicidad que producen estas NPs y el nivel de MMP-9 al inhibirse alguno de estos factores.

Para comenzar, se va a analizar las NPs que inhiben el factor de crecimiento epidérmico (EGF), las cuales son GA-AuNPs, que son NPs de oro cubiertas de ácido gálico (figura 28A) [68], y AuNPs-Qu-5, que son NPs de oro cargado con Qu (figura 28B) [69]. GA-AuNPs se estudió en células MDA-MB-231 y AuNPs-Qu-5 tanto en células MDA-MB-231 como en células MCF-7. El tamaño de GA-AuNPs y AuNPs-Qu-5 fue aproximadamente 50 nm y 36.3 nm, respectivamente. GA-AuNPs reacciona al estímulo interno de pH, pero en el otro caso, no se hace mención de cuál es el estímulo que utilizan para conducir a esta NP al centro del tumor.

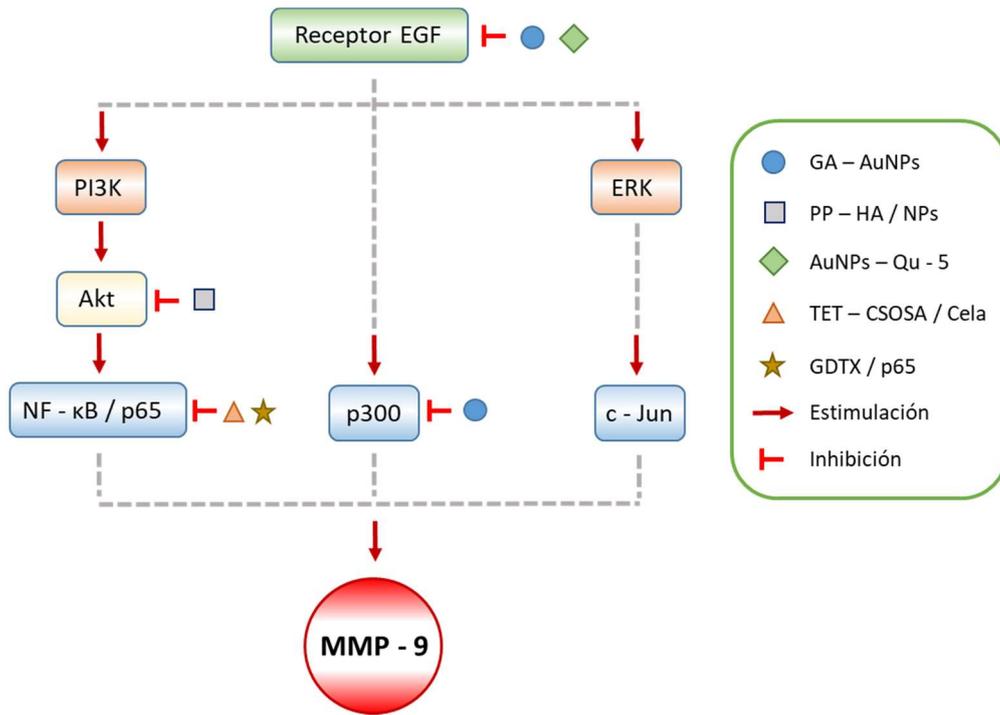


Figura 27. Esquema de las vías que regulan la expresión de MMP-9 y las diferentes NPs que van a inhibir algunos de los factores involucrados en estas vías.

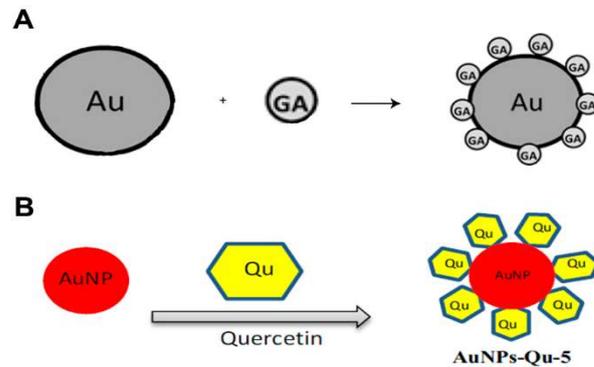


Figura 28. Esquema de síntesis GA-AuNPs (A) y AuNPs-Qu-5 (B) [68,69].

La citotoxicidad de ambas NPs fue medida mediante el ensayo MTT. Tanto AuNPs-Qu-5 como Qu libre disminuyeron la viabilidad celular, sin embargo, las AuNPs solas no mostraron ninguna citotoxicidad en las líneas celulares de cáncer. Las AuNPs-Qu-5 mostraron un valor de IC50 a 50 μm en células MCF-7 (figura 29A) y las células MDA-MB-231 tratadas con AuNPs-Qu-5 mostraron IC50 a 100 μm durante 24 horas (figura 29B). Como se muestra en la figura 29C, el tratamiento con ácido gálico o GA-AuNPs entre 1 y 1000 nM redujo de forma insignificante la viabilidad de las células MDA-MB-231.

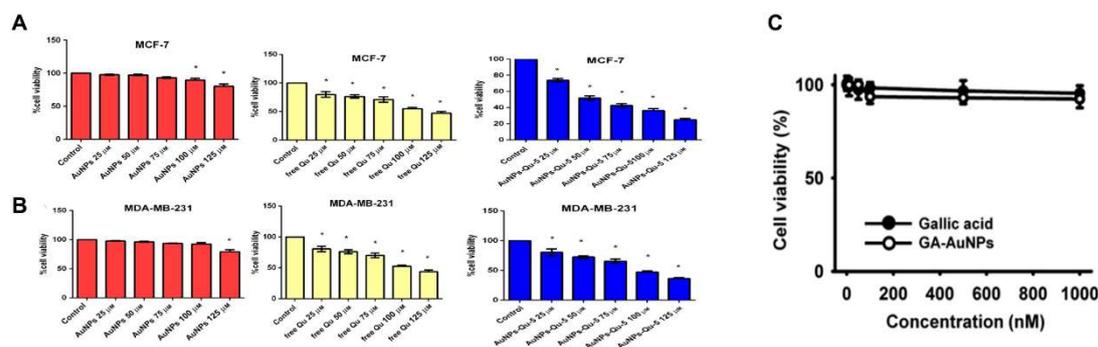


Figura 29. Citotoxicidad de AuNPs, Qu y AuNPs-Qu-5 en células MCF-7 (A) y MDA-MB-231 (B); y el efecto de las GA-AuNPs y del GA sobre la viabilidad de las células MDA-MB-231 tratadas durante 24 h (C) [68,69].

A continuación, se va a exponer la concentración que se obtuvo de MMP-9 con ambas NPs mediante el análisis de Western Blot. Las AuNPs-Qu-5 inhibieron la acción de MMP-9 en células MCF-7 y MDA-MB-231 en comparación con Qu libre (figura 30A). Como se muestra en la figura 30B complementaria, el ácido gálico 10 nM no afectó apreciablemente al nivel de MMP-9 en células MCF-7 tratadas con EGF. Por otro lado, las GA-AuNPs 10 nM y el ácido gálico 1000 nM inhibieron de manera similar la cantidad de MMP-9 en células MCF-7 tratadas con EGF, lo que nuevamente confirma que la actividad inhibitoria de las GA-AuNPs fue mayor que la del ácido gálico.

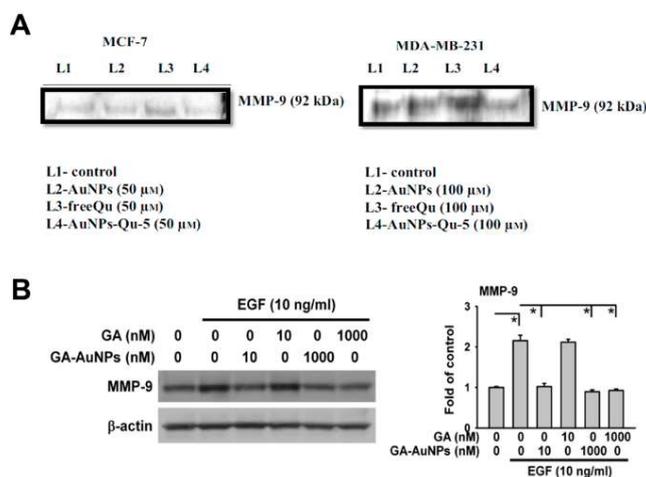


Figura 30. Efecto de Qu y AuNPs-Qu-5 sobre el nivel de MMP-9 en células MCF-7 y MDA-MB-231 (A) y el efecto de GA y GA-AuNPs (B) [68,69].

Por último, se van a analizar las NPs que bloquean alguna de las partes de la vía Akt/NF- κ B como se puede observar en la figura 31. Estas NPs son TET-CSOSA/Cela, que es un conjugado de glicolípidos cargado con celastrol y con una modificación del ácido tetraiodotiroacético ligando $\alpha v \beta 3$ (figura 31A) [70]; PP-HA/NP, que son NPs de polietilenimina de ácido hialurónico (HA)/poliláctico-co-glicólico cargados con DTX / Qu (figura 31B) [71]; y GDTX/p65, que son nanorods de oro recubiertos con polietilenimina (PEI) injertada con ciclodextrina (CD) y cargados con DTX y siRNA-p65 (figura 31C) [72]. TET-CSOSA/Cela utiliza TET para bloquear la vía de señalización del factor nuclear kappa B (NF- κ B), por lo que se trata de un sistema que

reacciona al cambio de pH. PP-HA/NP bloquea a la proteína quinasa B (Akt), utilizando el HA para llevarlo hacia el tumor, por lo que también es un sistema que reacciona al cambio de pH. En cambio, GDTX/p65 utiliza el láser NIR como estímulo externo para liberar el DTX y el siRNA-p65, y así, inhibir NF- κ B/p65. Todas fueron medidas en células 4T1, excepto TET-CSOSA/Cela, que además se midió en MDA-MB-231. En el caso de CSOSA/Cela y TET-CSOSA/Cela, el tamaño promedio fue de 84.6 ± 1.5 y 82.5 ± 3.6 nm, y el potencial zeta de 24.3 ± 0.2 y 22.9 ± 0.9 mV, respectivamente, en el caso de PP-HA/NP fue de $209,8 \pm 10,8$ nm y $+12.0 \pm 1.07$ mV, y por último, en el caso de GDTX/p65, no se especifica el tamaño y el potencial zeta es de 26.9 ± 0.9 mV.

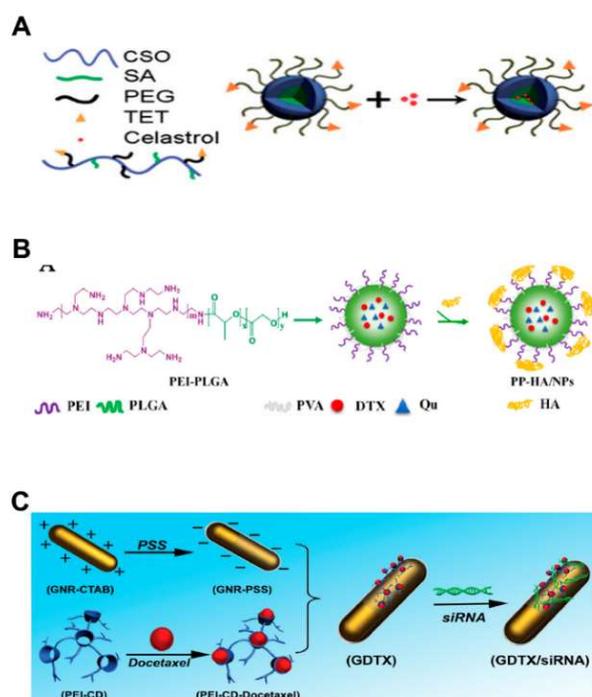


Figura 31. Esquema de síntesis de TET-CSOSA/Cela (A), PP-HA/NP (B) y GDTX/p65 (C) [70–72].

A continuación se va a medir la citotoxicidad de estas NPs mediante el ensayo MTT. Como se muestra en la figura 32 A y B, las micelas TET-CSOSA/Cela exhibieron un efecto de inhibición más fuerte que Cela libre con un valor de IC_{50} de $0.54 \pm 0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ en células 4T1 y $1.11 \mu\text{g mL}^{-1}$ en células MDA-MB-231, comparadas con Cela $0,88 \pm 0,02$ y $1,53 \pm 0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$, lo que puede deberse a la rápida captación celular de TET-CSOSA/Cela con un gradiente de concentración alto. Por otro lado, DTX libre, DTX + Qu, PLGA/NP o PP-HA/NP inhibieron la proliferación de células 4T1 de una manera dependiente de la dosis (figura 32C). El tratamiento con DTX + Qu tuvo un IC_{50} de 62.4 mg mL^{-1} , que fue más bajo que el de DTX libre (81.8 mg mL^{-1}). Además, los PP-HA/NP mostraron el valor más bajo de IC_{50} ($34,5 \text{ mg mL}^{-1}$) en comparación con DTX, DTX + Qu y PLGA/NP ($44,3 \text{ mg mL}^{-1}$). Por tanto, la administración de Qu de forma conjunta, mejora la citotoxicidad de DTX en células 4T1. Las GDTX/p65 con un DTX IC_{50} de $0.15 \mu\text{g mL}^{-1}$, mostraron una viabilidad celular de 1.4 y 2.5 veces más bajo que el de DTX solo o GDTX/NC, respectivamente. La citotoxicidad aumentada de GDTX/p65 sobre la de DTX o GDTX/NC sugirió un efecto citotóxico acumulativo entre DTX y siRNA-p65 (figura 32D).

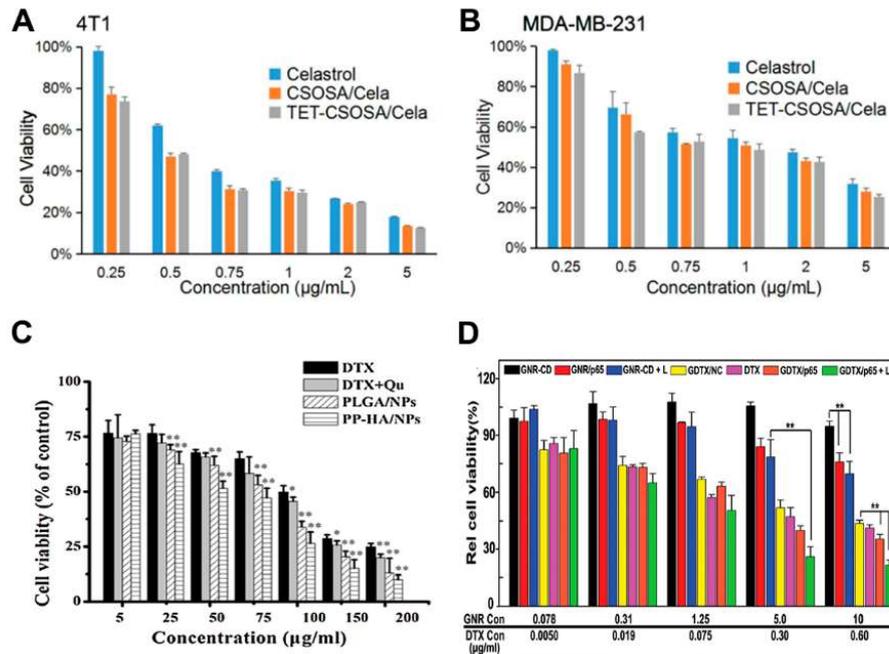


Figura 32. Citotoxicidad *in vitro* de Celastrol, CSOSA/Cela y TET-CSOSA/Cela en células 4T1 (A) y MDA-MB-231 (B) durante 48 h, de PP-HA/NPs, PLGA/NPs, DTX + Qu y DTX en células 4T1 (C) y de GDTX/p65, GDTX/NC, DTX, entre otros en células 4T1 [70–72].

La concentración de MMP-9 y de los factores que la regulan va a ser medida tras incorporar estas NPs. En la figura 33A, se muestra que tanto Cela como CSOSA/Cela disminuyeron ligeramente el nivel de NF-κB/MMP-9, mientras que TET-CSOSA/Cela los redujo significativamente mediante la mayor captación en células 4T1. Estos resultados indicaron que TET-CSOSA/Cela redujo significativamente la invasión de células tumorales de mama mediante la regulación negativa del nivel de MMP-9 controlada por NF-κB. Como se muestra en la figura 33B, los tratamientos con DTX + Qu tuvieron un efecto inhibitorio mayor en p-Akt en comparación con DTX libre. Tanto los PLGA/NP como los PP-HA/NP disminuyeron notablemente la concentración de p-Akt, mientras que los PP-HA/NP tuvieron el valor más bajo. Evidentemente, se obtuvieron resultados similares de MMP-9. Por último, en la figura 33C se muestra que las GNR/p65 suprimieron eficazmente la expresión de p65 en células 4T1 de una manera dependiente de la dosis de ARNip. Más del 70% de p65 se silenció a una concentración de siRNA-p65 de 200 nM, esto confirmó un rendimiento específico del siRNA-p65 de las GNR-CD/p65. Notablemente, la expresión de MMP-9 se silenció en un 64%, cuando se transfectaron con GNR/p65 a la misma concentración de siRNA-p65.

Por concluir, el tratamiento con GA-AuNPs suprimieron considerablemente la migración e invasión al bloquear a EGF, lo que indujo la estabilización de p300, la activación de Akt/p65 y ERK/c-Jun, y por tanto, la inhibición de MMP-9. En comparación con el GA, las GA-AuNPs tienen una capacidad superior para inhibir el nivel de esta enzima mediada por EGF/EGFR en células MDA-MB-231. Por otro lado, las AuNPs-Qu-5 mostraron una actividad anti-angiogénica mejorada en comparación con Qu libre. Por lo tanto, se concluye que las NPs de oro mejoraron el efecto terapéutico de la Qu y del GA; sin embargo, se necesitan más estudios *in vivo* para establecer la eficacia clínica de estas preparaciones. Además, los resultados de la inhibición de la metástasis 4T1 mostraron que TET-CSOSA/Cela podría suprimir la invasión del tumor de mama y el crecimiento de la metástasis pulmonar mediante la inhibición de la vía de señalización de

NF- κ B. En general, esta estrategia de administración simultánea de dianas podría abrir una nueva vía para el tratamiento de la metástasis mamaria. En particular, las PP-HA/NPs han disminuido la concentración de p-Akt y MMP-9, induciendo la apoptosis celular y bloqueando la migración e invasión celular al iniciar la ruta de la señal Akt/MMP-9. La modificación de HA mejoró la propiedad de orientación activa a través de la interacción HA-CD44 y, por lo tanto, promovió la captación celular. Por lo tanto, las PP-HA/NPs podrían ser un vector prometedor de administración conjunta para la terapia eficaz del cáncer de mama metastásico. Por último, se demostró que las GDTX/p65 inhibían significativamente la migración e invasión de células 4T1 al silenciar la expresión de la proteína p65 y la MMP-9 en sentido descendente, ya que DTX reduce el crecimiento del tumor al inhibir la mitosis de las células cancerosas y siRNA-p65 suprime la metástasis pulmonar y la proliferación de células cancerosas al bloquear la vía del NF- κ B. Se ha demostrado que GDTX/p65 en combinación con la irradiación con láser inhibe significativamente el crecimiento y la metástasis pulmonar de los tumores de mama 4T1.

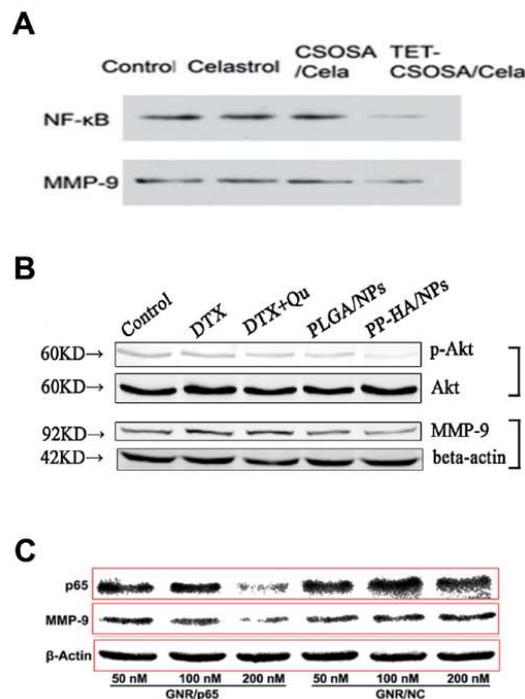


Figura 33. Análisis Western Blot en células 4T1 tras el tratamiento con (A) TET-CSOSA/Cela para medir los niveles de NF- κ B y MMP-9, (B) PP-HA/NP para medir la proteína p-Akt y MMP-9 y (C) GNR-CD/p65 para medir p65 y MMP-9 [70–72].

Aparte de estas cinco NPs, existen otras que bloquean múltiples factores a la vez como las NPs cargadas de celecoxib y Brefeldin A (CBNPs) [73], que inhiben el aparato de Golgi, los copolímeros plurónicos [74] o las NPs cargadas con DOX y recubiertas con albúmina de suero bovino y aptámero AS1411 (DOX@Apt-BSA) [75]. Aunque tengan como función bloquear múltiples factores como VEGF, Snail, Twist, E-cadherina, β -actina, entre otros, estas NPs cumplen con el objetivo de inhibir la expresión de MMP-9, y por tanto, de impedir la metástasis y la progresión tumoral.

Además, hay otras NPs que no se han incluido en el apartado de tratamientos diana que regulan a MMP-9, ya sean directos o indirectos, ya que no se han contemplado en este trabajo ciertas

líneas celulares ni técnicas de medición de esta enzima ni los estudios realizados *in vivo*. En el caso de otras técnicas de medición de MMP-9 existe la posibilidad de utilizar las NPs de trimetil quitosano (TMC) para encapsular Dox y siRNA de HMGA2 [76], a las NPs cargadas de 5-FU [77] y a las NPs cargadas con curcumina [78], que han sido medidas por las técnicas RT-PCR, qPCR y qRT-PCR, respectivamente. Además, la técnica qRT-PCR mide la expresión de MMP-9 en línea celular SKBR3, que tampoco ha sido contemplada, después de la administración de NPs de quitosán conjugadas con aptámero anti-Mucin1 cargadas de DTX y siARN de IGF-1R [79] o de cMET [80]. Por último, en el caso de los estudios que realizan la medición del nivel de esta enzima en animales se encuentra las siguientes NPs: RGD-NPVs@MNPs/DOX, que son NPs cargadas de melanina (MNP) y DOX dentro del péptido RGD (c(RGDyC)) - vesículas de plaquetas nanoescala modificadas (RGD-NPV) [81], M@BS-QE NPs, que son NPs de seleniuro de bismuto huecas cargadas con quercetina (QE) y macrófagos (M) [82], f-Dox-NE, que son nanoemulsiones (NE) cubierto con folato y cargadas con DOX [83], RGD/P-AuNPs, que son AuNPs polietilenglicolizadas que se conjugaron con péptidos Arg-Gly-Asp (RGD) [84], y ACF@MnO₂, que son NPs de óxido de manganeso cargadas con acriflavina (ACF) [85]. Estos dos últimos estudios son muy interesantes, ya que estudian si la expresión de MMP-9 varía con o sin estas NPs tras diferentes dosis de radiación.

Para concluir, gracias a los tratamientos tanto directos como indirectos que regulan a MMP-9, se ha podido lograr una alta eficiencia a la hora de liberar de forma rápida y precisa la carga de las NPs en el núcleo del tumor, inhibiendo de forma considerable el nivel de MMP-9 en el cáncer de mama y por tanto, las etapas de la carcinogénesis en la que está involucrada como la invasión y metástasis, la formación de vasos sanguíneos y la proliferación tumoral. Sin embargo, aún no hay estudios suficientes que desarrollen NPs que traten como diana terapéutica a MMP-9.

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se han obtenido en este trabajo son:

1. Las NPs dirigidas a MMP-9 han mostrado una elevada eficacia para la detección y seguimiento en líneas tumorales de cáncer de mama mediante técnicas de imagen. A este respecto, se ha aplicado con éxito para la detección de MMP-9 secretada por la línea celular de MCF-7, presentando una alta sensibilidad y selectividad. En comparación con otros materiales fluorescentes de uso común, los nanosensores se caracterizan por una excelente estabilidad frente a variables como el pH, temperatura y fondo autofluorescente en diferentes entornos fisiológicos. Además, estos nanosensores proporcionan una reducción significativa en tiempo, coste y complejidad de detección en comparación con otras técnicas convencionales.
2. Los diferentes tipos de NPs que se pueden sintetizar, la capacidad que poseen para ser dirigidas a la MMP-9 y el control en la liberación de fármacos mediante distintos impulsos, confieren a esta técnica una alta potencialidad para el tratamiento del cáncer de mama. Los estudios realizados al respecto indicaron que este tipo de nanotransportadores actúan de forma eficaz para la supresión, el crecimiento y la invasión en las tres líneas celulares estudiadas (MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1). Aunque en la actualidad estas NPs no diferencien adecuadamente entre las gelatinasas MMP-2 y MMP-9, pueden ser útiles en la práctica clínica, ya que MMP-2 también interviene en varias etapas de la carcinogénesis como la invasión y metástasis, y en la formación de vasos sanguíneos y de nichos pre-metastásicos.
3. Los estudios existentes sobre la inhibición de MMP-9 mediante NPs revelan una elevada eficacia en el control de la proliferación y progresión de las células del cáncer de mama en comparación con el uso sólo del fármaco. Esta eficiencia se encuentra asociada a la liberación rápida y simultánea de su carga, así como a su buena biocompatibilidad. No obstante hay que indicar que la mayoría de estos estudios no investigan directamente la MMP-9 como diana terapéutica, sino otros factores de la misma ruta en la que está implicada esta enzima.
4. Una de las principales ventajas que queda patente en la bibliografía consultada sobre la posible utilización de las NPs para el tratamiento del cáncer de mama es la menor citotoxicidad que presentan en las líneas celulares estudiadas. De esta forma, es previsible que también presenten una menor toxicidad en el organismo en comparación con la administración de los fármacos de forma sistémica en el tratamiento de quimioterapia. A este respecto, se requiere de una dosificación lo más exacta precisa del fármaco que se administra para reducir lo más posible su citotoxicidad. Aunque parece existir un cierto consenso sobre la potencialidad de la nanomedicina para el tratamiento del cáncer, se necesita un esfuerzo en investigación que permita la optimización de la especificidad hacia el tumor y de los estímulos empleados en la liberación de fármacos de forma previa a la realización de ensayos clínicos.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Las diferentes funciones que desempeñan las NPs dirigidas a MMP-9 pueden realizarse de forma simultánea mediante el uso de una única NP o varias de forma coordinada. Los importantes avances que se están produciendo en la nanotecnología permiten diseñarlas a medida, de forma que una NP que se dirija al tumor gracias a MMP-9 puede visualizar el tumor e inhibir la enzima mediante la liberación de fármacos. Un ejemplo de este caso podría ser una NP de óxido de hierro recubierta de gelatina y cargada con siRNA de MMP-9. Además, la estabilidad que presentan ciertas NPs en el organismo (hasta 2 horas para NPs de óxido de hierro recubiertas de gelatina) abre la posibilidad de utilizarlas como nanosensores para el pre-diagnóstico, seguimiento o, incluso, para comprobar la existencia de metástasis o la correcta erradicación del cáncer de mama mediante visualización con imágenes de resonancia magnética.

Otro aspecto a considerar en el futuro es la combinación de quimioterapia utilizando NPs y radioterapia. En los tratamientos actuales, la utilización conjunta de quimioterapia y radioterapia resulta beneficiosa para los pacientes que padecen cáncer de mama, y en muchos casos, es capaz de erradicar por completo el tumor. Por el contrario, el tratamiento exclusivo con radioterapia puede producir una expresión aumentada de MMP-9, haciendo que las células cancerosas evolucionen hacia fenotipos más agresivos. El hecho de que los fármacos empleados en etapa de quimioterapia puedan ser dirigidos mediante NPs hacia el tejido tumoral, y se pueda focalizar y controlar su liberación mediante diferentes estímulos, podría aumentar la tolerancia de los pacientes cuando se usa de forma conjunta con radioterapia. A este respecto, es importante investigar como la combinación de la quimioterapia aplicada con NPs y la radioterapia puede disminuir los niveles de MMP-9, y por tanto, ser un tratamiento más eficaz y menos tóxico contra el cáncer de mama, incluso para los más agresivos como el triple negativo y HER2 positivo [86].

Por otro lado, hay varios estudios que demuestran que el ejercicio físico ayuda a superar los efectos secundarios de la quimioterapia, y en este caso en concreto, cuando se utiliza DOX en cáncer de mama [87]. También sería interesante poder combinar el ejercicio físico a la posible quimioterapia mediante NPs, incluso con radioterapia. A este respecto, es previsible que las ventajas que presentan las NPs para la liberación local y controlada de fármacos puedan reducir estos efectos secundarios, lo que a su vez redundaría en un aumento de la capacidad de los pacientes para realizar ejercicio físico como terapia coadyuvante.

En las últimas décadas, se ha presenciado la traslación de algunas aplicaciones nanomédicas a la práctica clínica. Sin embargo, todavía hay un largo camino hacia la regulación completa de los nanofármacos, desde la creación de definiciones establecidas en toda Europa hasta el desarrollo de protocolos para la caracterización, evaluación y control de procesos con nanofármacos. Las etapas que se tienen que seguir en el desarrollo de productos de nanomedicina para poder incorporarlos al mercado incluyen, en primer lugar, la caracterización fisicoquímica, luego el estudio de biocompatibilidad y la evaluación de la nanotoxicología, posteriormente la evaluación de la farmacocinética y la farmacodinámica, y por último, el control del proceso y la producción a gran escala. Después de que un nanofármaco supera estas etapas y obtiene la autorización de comercialización, deben establecerse las bases para su distribución y uso en la práctica clínica en todos los países de la Unión Europea, ya que las decisiones de fijación de precios y reembolso de medicamentos se toman a nivel individual en cada estado miembro. Actualmente, los estudios de farmacoeconomía asumen un papel crucial previo a la comercialización de las nanomedicinas, ya que evalúan la importancia social y económica a

través del valor terapéutico añadido, utilizando indicadores como años de esperanza de vida ajustados por calidad y hospitalización [28].

A día de hoy, se han publicado numerosos estudios sobre la eficacia de la utilización de NPs dirigidas a MMP-9 como una forma alternativa de administrar la quimioterapia en modelos animales como ratas, ratones o incluso pez zebra, mediante la inhibición de diferentes etapas de la carcinogénesis como la metástasis, crecimiento celular e invasión. Pero a pesar de todos estos estudios, sólo hay un ensayo clínico que lo haya analizado, por lo que sería necesario intensificar la investigación al respecto para establecer su viabilidad en la práctica clínica, ya que se trata de una técnica con un gran potencial.

Sin embargo, el poder llevar este nuevo enfoque a la práctica clínica, y por tanto, comercializarlo, requerirá un intenso esfuerzo de desarrollo por parte de las farmacéuticas y organismos de investigación en futuro próximo.

ABREVIATURAS

Akt	Proteína quinasa B
ASCO	Sociedad Americana de Oncología Clínica
AuNPs-Qu-5	Nanopartículas de oro cargado con quercetina
CCK-8	Kit de recuento de células-8
DCIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
DOX	Doxorrubicina
DPM@PL	Micelas de succinato de metoxi polietilenglicol-s-s-vitamina E (DPM) recubiertas de liposomas basados en PPV (PL) y cargadas con DTX
DTX	Docetaxel
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
FA-CPSP-UA	Nanopartículas de polispermina quimiosensible (CPSP) dirigido gracias al ácido fólico (FA) para la administración del ácido ursólico (UA)
FA-PAA/MMP-9	Nanopartículas de poli (amidoamina) hiperramificada modificada (PAA) con folato (FA) cargadas con siRNA de MMP-9
FRET	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia
GA-AuNPs	Nanopartículas de oro cubiertas de ácido gálico
GDTX/p65	Nanorods de oro recubiertos con polietilenimina (PEI) injertada con ciclodextrina (CD) y cargados con DTX y siRNA-p65
GNP-DTX/Qu/IMA	Nanopartículas recubiertas de gelatina cargadas con tres fármacos diferentes, DTX, quercetina (Qu) e imatinib (IMA)
GO-PAMAM/DOX/MMP-9	Dendrímeros de poli(amidoamina) modificado con óxido de grafeno (GO) cargados con DOX y/o shRNA de MMP-9
GSH	Glutación
IARC	Agencia Internacional de Investigación del Cáncer
HPG-C18-PLLD	Copolímero anfifílico de poliglicerol hiperramificado (HPG-C18) y poli (L-lisina) dendrítica (PLLD) cargados con DTX y de siRNA de MMP-9
IC50	Concentración inhibitoria media máxima
LOD / LOQ	Límite de detección / límite de cuantificación
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteasas
MMP-9	Metaloproteasa 9
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NIH	Instituto Nacional del Cáncer
NIR	Región espectral de infrarrojos cercano
NLC	Estructura lipídica
NP	Nanopartícula
PAG/DTX-shRNA	Micelas conjugadas con ácido gambógico (GA) y PAA a través de enlaces amida cargadas con DTX y shRNA
PEI	Polietilenimina
PMA	Acetato de miristato de forbol
pMAG	Nanopartículas que usan un péptido y ácido mercapto-undecanoico (MUA) como ligandos de coplantación.

PP-HA/NP	Nanopartículas de polietilenimina de ácido hialurónico (HA)/poliláctico-co-glicólico cargados con DTX / Qu
QDs	Quantums Dots
Qu	Quercetina
Rev-AuNPs	Nanopartículas de oro recubiertas de resveratrol
RE	Receptor de estrógeno
RF	Recuperación de fluorescencia
RL	Recuperación de la intensidad de luminiscencia
RP	Receptor de progesterona
ROS	Especies reactivas de oxígeno
TEM	Transición epitelio mesenquimal
TET-CSOSA/Cela	Conjugado de glucolípidos cargado con celastrol y con una modificación del ácido tetraiodotiroacético ligando $\alpha v \beta 3$
TIMPs	Inhibidores tisulares de metaloproteasas
UCNP@gel@GO	Nanopartículas de conversión ascendente – gelatina – óxido de grafeno

BIBLIOGRAFÍA

1. Breast Cancer: Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2018 [Internet]. International Agency for Research on Cancer. 2018. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf>
2. Tratamiento del cáncer de seno (mama) [Internet]. National Cancer Institute. 2019. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno/paciente/tratamiento-seno-pdq>
3. Cáncer de mama - Opciones de tratamiento [Internet]. Cancer.Net. Disponible en: <https://www.cancer.net/es/tipos-de-c%C3%A1ncer/c%C3%A1ncer-de-mama/opciones-de-tratamiento>
4. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology [Internet]. Disponible en: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx#site
5. Coronato S, Laguens G, Girolamo VD. Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral. 2012;8.
6. Bałkowiec M, Maksym R, Włodarski P. The bimodal role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in etiology and pathogenesis of endometriosis (Review). *Molecular Medicine Reports*. 23 de julio de 2018;
7. Artacho-Cordón F, Ríos-Arrabal S, Lara PC, Artacho-Cordón A, Calvente I, Núñez MI. Matrix metalloproteinases: Potential therapy to prevent the development of second malignancies after breast radiotherapy. *Surgical Oncology*. septiembre de 2012;21(3):e143-51.
8. Isaacson KJ, Martin Jensen M, Subrahmanyam NB, Ghandehari H. Matrix-metalloproteinases as targets for controlled delivery in cancer: An analysis of upregulation and expression. *Journal of Controlled Release*. agosto de 2017;259:62-75.
9. Eiro N, Gonzalez LO, Fraile M, Cid S, Schneider J, Vizoso FJ. Breast Cancer Tumor Stroma: Cellular Components, Phenotypic Heterogeneity, Intercellular Communication, Prognostic Implications and Therapeutic Opportunities. *Cancers*. 13 de mayo de 2019;11(5):664.
10. Ugarte-Berzal E. Interacción de la metaloproteína de matriz 9 con células de leucemia linfocítica crónica: caracterización bioquímica y funcional. 2014.
11. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research*. 15 de febrero de 2006;69(3):562-73.
12. Angosto MC, Álvarez-Gómez JÁ. Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. 2010;76:26.
13. Olivares-Urbano MA. Expresión de metaloproteasas en células madre tumorales tras irradiación. Trabajo fin de máster, 2014.
14. Vandooren J, Van den Steen PE, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): The next decade. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. mayo de 2013;48(3):222-72.

15. Van den Steen PE, Van Aelst I, Hvidberg V, Piccard H, Fiten P, Jacobsen C, et al. The Hemopexin and O-Glycosylated Domains Tune Gelatinase B/MMP-9 Bioavailability via Inhibition and Binding to Cargo Receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 7 de julio de 2006;281(27):18626-37.
16. Huang H. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) as a Cancer Biomarker and MMP-9 Biosensors: Recent Advances. *Sensors*. 27 de septiembre de 2018;18(10):3249.
17. Clark I, Swingler T, Sampieri C, Edwards D. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. junio de 2008;40(6-7):1362-78.
18. Steenport M, Khan KMF, Du B, Barnhard SE, Dannenberg AJ, Falcone DJ. Matrix Metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 Induce Macrophage MMP-9: Evidence for the Role of TNF- and Cyclooxygenase-2. *The Journal of Immunology*. 15 de diciembre de 2009;183(12):8119-27.
19. Wong HPS, Ho JWC, Koo MWL, Yu L, Wu WKK, Lam EKY, et al. Effects of adrenaline in human colon adenocarcinoma HT-29 cells. *Life Sciences*. junio de 2011;88(25-26):1108-12.
20. Wu X, Brewer G. The regulation of mRNA stability in mammalian cells: 2.0. *Gene*. mayo de 2012;500(1):10-21.
21. Kunigal S, Lakka SS, Joseph P, Estes N, Rao JS. MMP-9 Inhibition Downregulates Radiation-induced NF- κ Activity Leading to Apoptosis in Breast Tumors. 2009;19.
22. Redondo-Munoz J, Escobar-Diaz E, Hernandez del Cerro M, Pandiella A, Terol MJ, Garcia-Marco JA, et al. Induction of B-Chronic Lymphocytic Leukemia Cell Apoptosis by Arsenic Trioxide Involves Suppression of the Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Survival Pathway via c-jun-NH2 Terminal Kinase Activation and PTEN Upregulation. *Clinical Cancer Research*. 1 de septiembre de 2010;16(17):4382-91.
23. Yousef EM, Tahir MR, St-Pierre Y, Gaboury LA. MMP-9 expression varies according to molecular subtypes of breast cancer. *BMC Cancer*. diciembre de 2014;14(1).
24. Li H, Qiu Z, Li F, Wang C. The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis. *Oncology Letters*. 13 de septiembre de 2017;
25. Golubnitschaja O, Yeghiazaryan K, Abraham J-A, Schild HH, Costigliola V, Debald M, et al. Breast cancer risk assessment: a non-invasive multiparametric approach to stratify patients by MMP-9 serum activity and RhoA expression patterns in circulating leucocytes. *Amino Acids*. febrero de 2017;49(2):273-81.
26. Darlix A, Lamy P-J, Lopez-Crapez E, Braccini AL, Firmin N, Romieu G, et al. Serum NSE, MMP-9 and HER2 extracellular domain are associated with brain metastases in metastatic breast cancer patients: predictive biomarkers for brain metastases?: NSE, MMP-9 and HER2 Extracellular Domain in Breast Cancer Brain Metastases. *International Journal of Cancer*. 15 de noviembre de 2016;139(10):2299-311.
27. Calero MC. CELLULAR STUDIES OF MAGNETIC NANOPARTICLES FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS. noviembre de 2015;232.

28. Soares S, Sousa J, Pais A, Vitorino C. Nanomedicine: Principles, Properties, and Regulatory Issues. *Front Chem*. 20 de agosto de 2018;6:360.
29. Xing Y, Zhao J, Conti PS, Chen K. Radiolabeled Nanoparticles for Multimodality Tumor Imaging. *Theranostics*. 2014;4(3):290-306.
30. Crucho CIC. Stimuli-Responsive Polymeric Nanoparticles for Nanomedicine. *ChemMedChem*. enero de 2015;10(1):24-38.
31. Bamrungsap S, Zhao Z, Chen T, Wang L, Li C, Fu T, et al. Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Nanomedicine*. agosto de 2012;7(8):1253-71.
32. Liu D, Yang F, Xiong F, Gu N. The Smart Drug Delivery System and Its Clinical Potential. *Theranostics*. 2016;6(9):1306-23.
33. Nazir S, Hussain T, Ayub A, Rashid U, MacRobert AJ. Nanomaterials in combating cancer: Therapeutic applications and developments. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. enero de 2014;10(1):19-34.
34. Safari J, Zarnegar Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. *Journal of Saudi Chemical Society*. abril de 2014;18(2):85-99.
35. Schwerdtfeger P, Wirz LN, Avery J. The topology of fullerenes. *WIREs Comput Mol Sci*. enero de 2015;5(1):96-145.
36. Ganta S, Devalapally H, Shahiwala A, Amiji M. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. *Journal of Controlled Release*. marzo de 2008;126(3):187-204.
37. Mura S, Nicolas J, Couvreur P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nature Mater*. noviembre de 2013;12(11):991-1003.
38. Hu Q, Katti PS, Gu Z. Enzyme-responsive nanomaterials for controlled drug delivery. *Nanoscale*. 24 de septiembre de 2014;6(21):12273-86.
39. Phillips DJ, Gibson MI. Redox-Sensitive Materials for Drug Delivery: Targeting the Correct Intracellular Environment, Tuning Release Rates, and Appropriate Predictive Systems. *Antioxidants & Redox Signaling*. 10 de agosto de 2014;21(5):786-803.
40. Chen H, Liu D, Guo Z. Endogenous Stimuli-responsive Nanocarriers for Drug Delivery. *Chem Lett*. 5 de marzo de 2016;45(3):242-9.
41. Wu D, Si M, Xue H-Y, Wong HL. Nanomedicine applications in the treatment of breast cancer: current state of the art. *IJN*. agosto de 2017;Volume 12:5879-92.
42. Clinical Trials [Internet]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/>
43. MCF-7 [Internet]. Disponible en: https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=86012803&collection=ecacc_gc

44. MDA-MB-231 [Internet]. Disponible en: https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=92020424&collection=ecacc_gc
45. 4T1 Mammary Carcinoma [Internet]. Disponible en: <https://imanolife.com/collections/cell-lines/4t1-cells/>
46. Nguyen P-D, Cong VT, Baek C, Min J. Fabrication of peptide stabilized fluorescent gold nanocluster/graphene oxide nanocomplex and its application in turn-on detection of metalloproteinase-9. *Biosensors and Bioelectronics*. marzo de 2017;89:666-72.
47. Nguyen P-D, Cong VT, Baek C, Min J. Self-assembly of an upconverting nanocomplex and its application to turn-on detection of metalloproteinase-9 in living cells. *Nanotechnology*. 7 de octubre de 2016;27(40):405101.
48. Konstantinou GN. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). En: Lin J, Alcocer M, editores. *Food Allergens*. New York, NY: Springer New York; 2017. p. 79-94.
49. Hirano S. Western Blot Analysis. En: Reineke J, editor. *Nanotoxicity*. Totowa, NJ: Humana Press; 2012. p. 87-97.
50. MTT Cell Proliferation Assay. ATCC® 30-1010K; 2011.
51. Cell Counting Kit-8. Dojindo; 2009.
52. Zanella R. Metodologías para la síntesis de nanopartículas controlando forma y tamaño. *MN*. 6 de marzo de 2014;5(1).
53. Dhinakar KG. STRUCTURAL AND ELECTRICAL PROPERTIES OF TRANSITION METAL DOPED METAL OXIDE SEMICONDUCTOR NANOCRYSTALS BY SOLVOTHERMAL METHOD. mayo de 2016;
54. Soares S, Sousa J, Pais A, Vitorino C. Nanomedicine: Principles, Properties, and Regulatory Issues. *Front Chem*. 20 de agosto de 2018;6:360.
55. Rodríguez BS. SÍNTESIS Y FUNCIONALIZACIÓN COVALENTE DE NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS PARA IMAGEN BIOMÉDICA. 2014;183.
56. Lei Z, Zhang H, Wang Y, Meng X, Wang Z. Peptide Microarray-Based Metal Enhanced Fluorescence Assay for Multiple Profiling of Matrix Metalloproteinases Activities. *Anal Chem*. 20 de junio de 2017;89(12):6749-57.
57. Xu P, Meng Q, Sun H, Yin Q, Yu H, Zhang Z, et al. Shrapnel nanoparticles loading docetaxel inhibit metastasis and growth of breast cancer. *Biomaterials*. septiembre de 2015;64:10-20.
58. Kalafatovic D, Nobis M, Son J, Anderson KI, Ulijn RV. MMP-9 triggered self-assembly of doxorubicin nanofiber depots halts tumor growth. *Biomaterials*. agosto de 2016;98:192-202.
59. Gao X, Zhang J, Huang Z, Zuo T, Lu Q, Wu G, et al. Reducing Interstitial Fluid Pressure and Inhibiting Pulmonary Metastasis of Breast Cancer by Gelatin Modified Cationic Lipid Nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces*. 6 de septiembre de 2017;9(35):29457-68.

60. Zhou X, Zheng Q, Wang C, Xu J, Wu J-P, Kirk TB, et al. Star-Shaped Amphiphilic Hyperbranched Polyglycerol Conjugated with Dendritic Poly(L-lysine) for the Codelivery of Docetaxel and MMP-9 siRNA in Cancer Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces*. 25 de mayo de 2016;8(20):12609-19.
61. Porta F, Ehram D, Lengerke C, Meyer zu Schwabedissen HE. Synthesis and Characterization of PDMS–PMOXA-Based Polymersomes Sensitive to MMP-9 for Application in Breast Cancer. *Mol Pharmaceutics*. 5 de noviembre de 2018;15(11):4884-97.
62. Li N, Guo C, Duan Z, Yu L, Luo K, Lu J, et al. A stimuli-responsive Janus peptide dendron–drug conjugate as a safe and nanoscale drug delivery vehicle for breast cancer therapy. *J Mater Chem B*. 2016;4(21):3760-9.
63. Ji X, Tang Q, Pang P, Wu J, Kirk TB, Xu J, et al. Redox-responsive chemosensitive polyspermine delivers ursolic acid targeting to human breast tumor cells: The depletion of intracellular GSH contents arouses chemosensitizing effects. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. octubre de 2018;170:293-302.
64. Gu Y, Guo Y, Wang C, Xu J, Wu J, Kirk TB, et al. A polyamidoamine dendrimer functionalized graphene oxide for DOX and MMP-9 shRNA plasmid co-delivery. *Materials Science and Engineering: C*. enero de 2017;70:572-85.
65. Li M, Zhou X, Zeng X, Wang C, Xu J, Ma D, et al. Folate-targeting redox hyperbranched poly(amido amine)s delivering MMP-9 siRNA for cancer therapy. *J Mater Chem B*. 2016;4(3):547-56.
66. Park SY, Chae SY, Park JO, Lee KJ, Park G. Gold-conjugated resveratrol nanoparticles attenuate the invasion and MMP-9 and COX-2 expression in breast cancer cells. *Oncology Reports*. junio de 2016;35(6):3248-56.
67. Kang Y, Lu L, Lan J, Ding Y, Yang J, Zhang Y, et al. Redox-responsive polymeric micelles formed by conjugating gambogic acid with bioreducible poly(amido amine)s for the co-delivery of docetaxel and MMP-9 shRNA. *Acta Biomaterialia*. marzo de 2018;68:137-53.
68. Chen Y-J, Lee Y-C, Huang C-H, Chang L-S. Gallic acid-capped gold nanoparticles inhibit EGF-induced MMP-9 expression through suppression of p300 stabilization and NFκB/c-Jun activation in breast cancer MDA-MB-231 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. noviembre de 2016;310:98-107.
69. Balakrishnan S, Bhat FA, Raja Singh P, Mukherjee S, Elumalai P, Das S, et al. Gold nanoparticle-conjugated quercetin inhibits epithelial-mesenchymal transition, angiogenesis and invasiveness *via* EGFR/VEGFR-2-mediated pathway in breast cancer. *Cell Prolif*. diciembre de 2016;49(6):678-97.
70. Zhao Y, Tan Y, Meng T, Liu X, Zhu Y, Hong Y, et al. Simultaneous targeting therapy for lung metastasis and breast tumor by blocking the NF-κB signaling pathway using Celastrol-loaded micelles. *Drug Delivery*. enero de 2018;25(1):341-52.
71. Li J, Zhang J, Wang Y, Liang X, Wusiman Z, Yin Y, et al. Synergistic inhibition of migration and invasion of breast cancer cells by dual docetaxel/quercetin-loaded nanoparticles *via* Akt/MMP-9 pathway. *International Journal of Pharmaceutics*. mayo de 2017;523(1):300-9.

72. Wang D, Wang T, Xu Z, Yu H, Feng B, Zhang J, et al. Cooperative Treatment of Metastatic Breast Cancer Using Host-Guest Nanoplatfom Coloaded with Docetaxel and siRNA. *Small*. enero de 2016;12(4):488-98.
73. Yu R-Y, Xing L, Cui P-F, Qiao J-B, He Y-J, Chang X, et al. Regulating the Golgi apparatus by co-delivery of a COX-2 inhibitor and Brefeldin A for suppression of tumor metastasis. *Biomater Sci*. 2018;6(8):2144-55.
74. Sun H, Meng Q, Tang S, Su J, Yin Q, Chen L, et al. Inhibition of Breast Cancer Metastasis by Pluronic Copolymers with Moderate Hydrophilic–Lipophilic Balance. *Mol Pharmaceutics*. 8 de septiembre de 2015;12(9):3323-31.
75. Xu L, He X-Y, Liu B-Y, Xu C, Ai S-L, Zhuo R-X, et al. Aptamer-functionalized albumin-based nanoparticles for targeted drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. noviembre de 2018;171:24-30.
76. Eivazy P, Atyabi F, Jadidi-Niaragh F, Aghebati Maleki L, Miahipour A, Abdolalizadeh J, et al. The impact of the codelivery of drug-siRNA by trimethyl chitosan nanoparticles on the efficacy of chemotherapy for metastatic breast cancer cell line (MDA-MB-231). *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 4 de julio de 2017;45(5):889-96.
77. Zhu W, Lee S-J, Castro NJ, Yan D, Keidar M, Zhang LG. Synergistic Effect of Cold Atmospheric Plasma and Drug Loaded Core-shell Nanoparticles on Inhibiting Breast Cancer Cell Growth. *Sci Rep*. abril de 2016;6(1):21974.
78. Hashemzahi M, Behnam-Rassouli R, Hassanian SM, Moradi-Binabaj M, Moradi-Marjaneh R, Rahmani F, et al. Phytosomal-curcumin antagonizes cell growth and migration, induced by thrombin through AMP-Kinase in breast cancer. *J Cell Biochem*. julio de 2018;119(7):5996-6007.
79. Jafari R, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran;, Majidi Zolbanin N, Pharmacology and Toxicology Department, School of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran, Majidi J, Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran, et al. Anti-Mucin1 Aptamer-Conjugated Chitosan Nanoparticles for Targeted Co-Delivery of Docetaxel and IGF-1R siRNA to SKBR3 Metastatic Breast Cancer Cells. *ibj*. 1 de enero de 2019;23(1):21-33.
80. Majidi Zolbanin N, Jafari R, Majidi J, Atyabi F, Yousefi M, Jadidi-Niaragh F, et al. Targeted Co-Delivery of Docetaxel and cMET siRNA for Treatment of Mucin1 Overexpressing Breast Cancer Cells. *Adv Pharm Bull*. 29 de agosto de 2018;8(3):383-93.
81. Jing L, Qu H, Wu D, Zhu C, Yang Y, Jin X, et al. Platelet-camouflaged nanococktail: Simultaneous inhibition of drug-resistant tumor growth and metastasis via a cancer cells and tumor vasculature dual-targeting strategy. *Theranostics*. 2018;8(10):2683-95.
82. Zhao H, Li L, Zhang J, Zheng C, Ding K, Xiao H, et al. C–C Chemokine Ligand 2 (CCL2) Recruits Macrophage-Membrane-Camouflaged Hollow Bismuth Selenide Nanoparticles To Facilitate Photothermal Sensitivity and Inhibit Lung Metastasis of Breast Cancer. *ACS Appl Mater Interfaces*. 19 de septiembre de 2018;10(37):31124-35.
83. Tripathi CB, Parashar P, Arya M, Singh M, Kanoujia J, Kaithwas G, et al. QbD-based development of α -linolenic acid potentiated nanoemulsion for targeted delivery of

doxorubicin in DMBA-induced mammary gland carcinoma: in vitro and in vivo evaluation. *Drug Deliv and Transl Res.* octubre de 2018;8(5):1313-34.

84. Wu P-H, Onodera Y, Ichikawa Y, Rankin E, Giaccia A, Watanabe Y, et al. Targeting integrins with RGD-conjugated gold nanoparticles in radiotherapy decreases the invasive activity of breast cancer cells. *IJN.* julio de 2017;Volume 12:5069-85.
85. Meng L, Cheng Y, Tong X, Gan S, Ding Y, Zhang Y, et al. Tumor Oxygenation and Hypoxia Inducible Factor-1 Functional Inhibition *via* a Reactive Oxygen Species Responsive Nanoplatfom for Enhancing Radiation Therapy and Abscopal Effects. *ACS Nano.* 28 de agosto de 2018;12(8):8308-22.
86. Kwatra D, Venugopal A, Anant S. Nanoparticles in radiation therapy: a summary of various approaches to enhance radiosensitization in cancer. *Translational Cancer Research.* 2013;2(4):13.
87. Kirkham AA, Shave RE, Bland KA, Bovard JM, Eves ND, Gelmon KA, et al. Protective effects of acute exercise prior to doxorubicin on cardiac function of breast cancer patients: A proof-of-concept RCT. *International Journal of Cardiology.* octubre de 2017;245:263-70.