

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Desarrollo de una terapia innovadora para cáncer de mama y pulmón mediante el uso de nanoplateformas de tripalmitina y poli(4-vinilpiridina) asociadas a paclitaxel.

Memoria presentada por Dña María del Carmen Leiva Arrabal para optar al grado de Doctora Internacional por la Universidad de Granada

Granada, 8 de febrero de 2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autora: María del Carmen Leiva Arrabal

ISBN: 978-84-9163-360-0

URI: <http://hdl.handle.net/10481/47629>

El doctorando, **María del Carmen Leiva Arrabal**, y los directores de la tesis, **José Carlos Prados Salazar, Consolación Melguizo Alonso y Raúl Ortiz Quesada**, Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

GRANADA A 26/01/2017

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.: **José Carlos Prados Salazar
Leiva Arrabal**

Fdo.: **María del Carmen**

Fdo.: **Consolación Melguizo Alonso**

Fdo.: **Raúl Ortiz Quesada**

Dr. JOSÉ CARLOS PRADOS SALAZAR,
CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO ANATOMÍA Y EMBRIOLGÍA HUMANA DE LA
FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

HACE CONSTAR:

Que D^a **María del Carmen Leiva Arrabal** ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: **“Desarrollo de una terapia innovadora para cáncer de mama y pulmón mediante el uso de nanoplataformas de tripalmitina y poli(4-vinilpiridina) asociadas a paclitaxel”**.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí, se corresponde fielmente con los resultados obtenidos y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 26 de Enero de 2017.

Fdo: Dr. D. José Carlos Prados Salazar
Catedrático de Universidad

Dra. CONSOLACIÓN MELGUIZO ALONSO,
CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO ANATOMÍA Y EMBRIOLGÍA HUMANA DE LA
FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

HACE CONSTAR:

Que D^a **María del Carmen Leiva Arrabal** ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: **“Desarrollo de una terapia innovadora para cáncer de mama y pulmón mediante el uso de nanoplataformas de tripalmitina y poli(4-vinilpiridina) asociadas a paclitaxel”**.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí, se corresponde fielmente con los resultados obtenidos y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 26 de Enero de 2017.

Fdo: Dra. Dña. Consolación Melguizo Alonso
Catedrática de Universidad

Dr. RAÚL ORTIZ QUESADA,
PROFESOR CONTRATADO DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA
SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE JAÉN.

HACE CONSTAR:

Que D^a **María del Carmen Leiva Arrabal** ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: **“Desarrollo de una terapia innovadora para cáncer de mama y pulmón mediante el uso de nanoplataformas de tripalmitina y poli(4-vinilpiridina) asociadas a paclitaxel”**.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí, se corresponde fielmente con los resultados obtenidos y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 26 de Enero de 2017.

Fdo: Dr. D. Raúl Ortiz Quesada
Profesor Contratado Doctor

Índice

ÍNDICE

ÍNDICE	13
ABREVIATURAS	3
RESUMEN	9
SUMMARY.....	15
I. INTRODUCCIÓN	21
I.1. CÁNCER DE MAMA	21
<i>I.1.1. Epidemiología</i>	<i>21</i>
<i>I.1.2. Factores de riesgo</i>	<i>21</i>
<i>I.1.3. Clasificación del cáncer de mama</i>	<i>26</i>
I.1.3.1. Clasificación según patrón molecular y genético	26
I.1.3.2. Clasificación según estadio.....	27
I.1.3.3. Sistema de clasificación TNM.....	30
<i>I.1.4. Tratamiento del cáncer de mama.....</i>	<i>31</i>
I.1.4.1. Tratamiento locoregional	31
I.1.4.1.1. Cirugía	31
I.1.4.1.2. Radioterapia	33
I.1.4.2. Tratamiento sistémico adyuvante.....	33
I.1.4.2.1. Hormonoterapia.....	34
I.1.4.2.2. Quimioterapia	35
I.2. CÁNCER DE PULMÓN	36
<i>I.2.1. Epidemiología</i>	<i>36</i>
<i>I.2.2. Factores de riesgo</i>	<i>37</i>
<i>I.2.3. Clasificación del cáncer de pulmón</i>	<i>39</i>
I.2.3.1. Clasificación histológica del cáncer de pulmón.....	40
I.2.3.1.1. Cáncer de pulmón de células pequeñas.....	40
I.2.3.1.2. Cáncer de pulmón de células no pequeñas.....	41
I.2.3.2. Clasificación TNM.....	42
I.2.3.3. Estadios del cáncer de pulmón.....	43
<i>I.2.4. Tratamiento</i>	<i>44</i>
I.2.4.1. Tratamiento del SCLC.....	44
I.2.4.2. Tratamiento del NSCLC.....	45
I.3. MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DEL CÁNCER	47
<i>I.3.1. Esferoides tumorales multicelulares</i>	<i>47</i>
<i>I.3.2. Células madre tumorales</i>	<i>48</i>
I.4. EL PACLITAXEL.....	50
<i>I.4.1. Mecanismo de acción.....</i>	<i>52</i>

I.4.2.	<i>Limitaciones de la quimioterapia con PTX</i>	53
I.4.2.1.	Mecanismos de resistencia a fármacos	55
I.4.2.1.1.	MDR mediada por P-glicoproteína	55
I.5.	NANOPARTÍCULAS EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER	57
I.5.1.	<i>Efecto permeabilidad y retención aumentadas</i>	59
I.5.2.	<i>Funcionalización de las nanopartículas</i>	61
I.5.2.1.	Direccionamiento activo	61
I.5.2.1.1.	Nanopartículas pH-dependientes	62
I.5.2.2.	Incorporación de PEG	63
I.5.2.3.	Ciclodextrinas	65
I.5.2.4.	Macelignano	66
I.5.3.	<i>Tipos de nanopartículas</i>	67
I.5.3.1.	Micelas poliméricas	68
I.5.3.2.	Liposomas	69
I.5.3.3.	Polimersomas o vesículas poliméricas	70
I.5.3.4.	Dendrímeros	71
I.5.3.5.	Nanotubos de carbono	72
I.5.3.6.	Nanogeles	73
I.5.3.7.	Quantum dots	74
I.5.3.8.	Nanopartículas magnéticas	75
I.5.3.9.	Nanopartículas poliméricas	76
I.5.3.10.	Nanopartículas sólidas lipídicas	78
I.5.4.	<i>Nanopartículas con paclitaxel</i>	80
I.5.4.1.	Nanopartículas poliméricas con paclitaxel	80
I.5.4.2.	Nanopartículas sólidas lipídicas con paclitaxel	82
II.	OBJETIVOS	87
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	91
III.1.	SÍNTESIS DE PTX@P4VP	91
III.2.	SÍNTESIS DE TRIPALM-NPS-PTX	92
III.3.	CARACTERIZACIÓN DE PTX@P4VP	93
III.4.	CARACTERIZACIÓN DE TRIPALM-NPS-PTX	94
III.5.	EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN Y LIBERACIÓN DE PTX POR LAS NPS	94
III.6.	CULTIVOS CELULARES	95
III.7.	ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD	97
III.8.	ENSAYOS DE HEMOCOMPATIBILIDAD	98
III.9.	ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR	99
III.10.	ESTUDIO DE LA INTERNALIZACIÓN CELULAR	100
III.11.	CITOTOXICIDAD EN LOS MTS	101

III.12.	ANÁLISIS DEL FENÓMENO DE RESISTENCIA A DROGAS	102
III.13.	CITOTOXICIDAD EN CSCS	103
III.14.	CARACTERIZACIÓN DE LAS CSCS	104
III.15.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	106
IV.	RESULTADOS.....	110
IV.1.	CAPÍTULO I: NANOPARTÍCULAS DE p4VP-PACLITAXEL (PTX@p4VP) PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA Y PULMÓN	110
IV.1.1.	<i>Síntesis y caracterización de PTX@p4VP</i>	<i>110</i>
IV.1.2.	<i>Estudio de biocompatibilidad de las hollow-p4VP.....</i>	<i>112</i>
IV.1.3.	<i>Estudio de citotoxicidad de las PTX@p4VP.....</i>	<i>114</i>
IV.1.4.	<i>Estudio de la modulación del ciclo celular</i>	<i>115</i>
IV.1.5.	<i>Análisis de la internalización celular.....</i>	<i>116</i>
IV.1.6.	<i>Ensayos en esferoides multicelulares (MTS).....</i>	<i>118</i>
IV.2.	CAPÍTULO II: NANOPARTÍCULAS DE TRIPALMITINA-PACLITAXEL (TRIPALM-NPs-PTX) PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA Y PULMÓN	123
IV.2.1.	<i>Síntesis y caraterización de las Tripalm-NPs-PTX</i>	<i>123</i>
IV.2.2.	<i>Estudio de la biocompatibilidad de las Tripalm-NPs y sus modificaciones.....</i>	<i>125</i>
IV.2.3.	<i>Estudio de la citotoxicidad de Tripalm-NPs-PTX</i>	<i>129</i>
IV.2.4.	<i>Estudio de la citotoxicidad de Tripalm-NPs-PTX modificadas.....</i>	<i>133</i>
IV.2.5.	<i>Estudio de la modulación del ciclo celular</i>	<i>135</i>
IV.2.6.	<i>Análisis de la internalización celular.....</i>	<i>139</i>
IV.2.7.	<i>Análisis de la citotoxicidad de las Tripalm-NPs-PTX en esferoides multicelulares (MTS)</i>	<i>142</i>
IV.2.8.	<i>Estudio de inhibición de P-glicoproteína mediante Tripalm-NPs-PTX y Tripalm-NPs-MAC-PTX.</i>	<i>145</i>
IV.2.9.	<i>Estudios de citotoxicidad de las Tripalm-NPs-PTX en células madre tumorales.....</i>	<i>150</i>
V.	DISCUSIÓN.....	155
V.1.	LOS SISTEMAS TRIPALM-NPs Y HOLLOW-p4VP MOSTRARON UNA ALTA BIOCMPATIBILIDAD.....	157
V.2.	DOS SISTEMAS PARA INCREMENTAR LA TOXICIDAD DE PTX FRENTE A CÉLULAS TUMORALES: TRIPALM-NPs-PTX Y PTX@p4VP.....	161
V.3.	ASOCIACIÓN DE PTX A NPs Y MODULACIÓN DEL CICLO CELULAR	164
V.4.	MEJORA DE LA INTERNALIZACIÓN CELULAR DE PTX MEDIANTE EL USO DE LOS SISTEMAS TRIPALM-NPs-PTX Y PTX@p4VP	165
V.5.	LAS NANOFORMULACIONES TRIPALM-NPs-PTX Y PTX@p4VP INCREMENTAN LA EFECTIVIDAD DE PTX EN SISTEMAS QUE IMITAN TUMORES IN VIVO: ESTUDIO EN MTS	167
V.6.	RESISTENCIA MEDIADA POR P- GLICOPROTEÍNA.....	170

V.7. ACTIVIDAD DE LAS TRIPALM-NPS-PTX SOBRE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES DE LÍNEAS DERIVADAS DE CÁNCER DE MAMA Y PULMÓN.....	171
VI. CONCLUSIONES.....	177
VII. CONCLUSIONS.....	181
BIBLIOGRAFÍA.....	185

Abreviaturas

ABREVIATURAS

5

5-FU 5-fluorouracilo

A

AFM Microscopía de fuerza atómica

AH Ácido hialurónico

AI Inhibidor de la aromatasa

ALK Genes de fusión de quinasa de linfoma anaplásico

Au@p4VP Nanopartículas de poli(4-vinilpiridina) con núcleo de oro

B

bFGF Factor de crecimiento de fibroblastos

BrDU Bromodesoxiuridina

C

CCK-8 Kit de recuento celular

CD Ciclodextrinas

CDIS Carcinoma ductal in situ

CSCs Células madre tumorales

CYP450 Citocromo P450

D

DLS Dispersión dinámica de la luz

DMEM Medio de cultivo celular: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DO Densidad óptica

E

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético

EF Estado funcional

EGF Factor de crecimiento epidérmico

EGFR Receptor del factor de crecimiento epidérmico

EPR Efecto de permeabilidad y retención aumentada

ABREVIATURAS

ER Receptores de estrógeno

F

FBS Suero bovino fetal

FDA Food and Drug Administration

FITC Isotiocianato de fluoresceína

FRET Método de transferencia de energía de resonancia de Förster

G

GR Glóbulos rojos, eritrocitos

I

IC₅₀ Concentración inhibitoria del 50%

IT Índice terapéutico

L

LHRH Hormona estimulante de la producción de estrógenos, o hormona luteinizante

M

MAC Macelignano

MDR Fenómeno de resistencia a multidrogas

mRNA ARN mensajero

MTS Esferoides tumorales multicelulares

N

NCI Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos

NPs Nanopartículas

NPs-PTX Nanopartículas cargadas con paclitaxel

NR Rojo nilo

NR@p4VP Nanopartículas de p4VP marcadas con rojo nilo

NSCLC Cáncer de pulmón de células no pequeñas

O

OEG Oligoetilenglicol

P

PBCA	Poli(n-butil-cianoacrilato)
PBS	Tampón fosfato salino (pH= 7,4)
PCL	Poli-ε-caprolactona
PEG	Polietilenglicol
PEO	Poli(óxido de etileno)
PI	Yoduro de propidio
PLA	Ácido poliláctico
PLGA	Ácido poli(láctico-co-glicólico)
PMA	Polimetacrilato
PR	Receptor de progesterona
PTX	Paclitaxel
p4VP	Poli(4-vinilpiridina)
P-gp	P-glicoproteína

R

Rh	Rodamina
RQ	Expresión relativa de un gen en el análisis mediante RT-PCR
RT-PCT	PCR a tiempo real

S

SCLC	Cáncer de pulmón de células pequeñas
SD	Desviación estándar
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SLNs	Nanopartículas sólidas lipídicas
SPIONs	Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro
SRB	Sulforrodamina B

T

TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TKI	Inhibidor de la tirosina quinasa
TPGS	Alfatocoferol polietilenglicol 100 succinato
Tripalm-NPs	Nanopartículas de tripalmitina
Tripalm-NPs-PTX	Nanopartículas de tripalmitina cargadas con paclitaxel

ABREVIATURAS

V

VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
-------------	--

Z

ZP	Potencial zeta
-----------	-----------------------

Resumen

RESUMEN

Los tumores de mama y pulmón son de los cánceres que tienen mayor incidencia en la población, el de pulmón es el más prevalente (con 1,8 millones de nuevos casos cada año) y el de mama es el más frecuente en mujeres (representando un 12% de todos los tumores diagnosticados). Por otro lado, cabe destacar la elevada mortalidad que provoca el cáncer de pulmón, siendo la principal causa de muerte por cáncer en el mundo y causando una de cada cinco de las muertes que se producen por esta enfermedad. Sin embargo, el cáncer de mama a pesar de su alta incidencia presenta una mortalidad más reducida, debido al buen pronóstico de la enfermedad cuando se produce un diagnóstico precoz.

El paclitaxel (PTX), uno de los fármacos de elección para el tratamiento de estos dos tipos de tumores, presenta múltiples inconvenientes en la práctica clínica como su baja solubilidad y vida media, inespecificidad por el tumor y gran cantidad de efectos adversos entre los que destacan la mielosupresión, cardiotoxicidad y neurotoxicidad. Además, una de las formulas farmacéuticas de PTX más ampliamente usada en clínica incluye Cremophor® EL, un disolvente muy tóxico, que es necesario debido a la escasa solubilidad del PTX en compuestos acuosos, y que provoca reacciones de hipersensibilidad que llevan a una pre-medicación de los pacientes con corticoides e histaminas. Otro de los problemas derivados del uso de este fármaco es que puede provocar el desarrollo, en las células tumorales, de mecanismos de resistencia (fenómeno de resistencia a multidroga o MDR), responsables del fallo terapéutico ante el tratamiento. El mecanismo más común de este tipo de resistencia se basa en la expresión de una proteína de membrana llamada P-glicoproteína (P-gp), capaz de expulsar el fármaco del interior de la célula, mediante un mecanismo dependiente de ATP, reduciendo así su efecto en la misma.

El uso de nanopartículas (NPs) que encapsulen PTX puede ser una nueva estrategia terapéutica para superar estas limitaciones, al incrementar su estabilidad y solubilidad, biocompatibilidad y especificidad por el tejido tumoral, evitando así la aparición de toxicidad inespecífica. Asimismo, algunos tipos de NPs suman a estas propiedades la capacidad de escapar o inhibir la acción de las proteínas responsables del fenómeno MDR, especialmente del transportador P-gp.

RESUMEN

El objetivo del trabajo de investigación a partir del cual se ha elaborado esta tesis doctoral es la realización un amplio estudio de la actividad antitumoral de dos sistemas novedosos de NPs para la encapsulación del PTX, en modelos *in vitro*, en monocapa y tridimensionales, para el cáncer de pulmón y mama.

El primer sistema de encapsulación de PTX se ha realizado con NPs huecas de poli(4-vinilpiridina) (hollow-p4VP). Estas NPs se han sintetizado por medio de una novedosa técnica y presentan una cinética de liberación de fármaco pH dependiente, lo cual supone una ventaja para mejorar la selectividad frente a un entorno tumoral ácido. Los resultados obtenidos en ensayos de hemocompatibilidad y con células de estirpe normal de mama y pulmón muestran que estas hollow-p4VP son sistemas biocompatibles no tóxicos. Además, la incorporación de PTX en estas NPs (PTX@p4VP) mejora su citotoxicidad sobre modelos *in vitro* de células tumorales humanas, tanto de mama como de pulmón, disminuyendo significativamente la concentración de PTX necesaria para reducir al 50% la población tumoral (IC₅₀).

Respecto a la modulación del ciclo celular, la encapsulación del PTX no modifica el mecanismo de acción del fármaco, observándose una acumulación de células en las fases SubG1 y G2/M y una disminución del porcentaje de células en fase G0/G1. Además, se ha demostrado la internalización de las hollow-p4VP cargadas con rojo nilo (NR) en estas líneas tumorales.

Por último, este sistema de NPs ha sido ensayado también en un modelo de transición *in vitro* - *in vivo*, como es un cultivo tridimensional de esferoides multicelulares tumorales (MTS) procedente de líneas celulares de cáncer de mama y pulmón, lo que ha permitido demostrar que el tratamiento con PTX@p4VP es más efectivo que el de PTX libre, reduciendo en mayor medida el volumen del esferoide e incrementando la apoptosis celular.

El segundo sistema de encapsulación se ha llevado a cabo con NPs sólidas lipídicas (SLNs) de tripalmitato de glicerilo (tripalmitina) cargadas con PTX (Tripalm-NPs-PTX), que han demostrado tener propiedades tan interesantes como poseer un pequeño tamaño, buen ratio de encapsulación del fármaco y una liberación controlada. A partir del sistema lipídico inicial se han llevado a cabo algunas modificaciones mediante la incorporación de hexa(etilen glicol) (OEG), β-ciclodextrina (βCD) y macelignano (MAC), con objeto de añadir nuevas ventajas al tratamiento con

las NPs cargadas con PTX. Ninguna de estas NPs lipídicas, sin carga de fármaco presentan actividad hemolítica en la sangre, así como tampoco citotoxicidad en células no tumorales de mama y pulmón humanas, lo que cual es prueba de su biocompatibilidad. Además, las Tripalm-NPs-PTX aumentan la citotoxicidad provocada por el PTX en un amplio rango de líneas tumorales humanas, tanto de mama (MCF7, MDAMB231, SKBR3 and T47D), como de pulmón (A549, NCI-H520 and NCI-H460). Las modificaciones realizadas a estas NPs también provocan un aumento en la muerte celular respecto al uso aislado del PTX, aunque ninguna de ellas proporciona ventajas notables respecto a la NPs no modificadas.

El análisis del ciclo celular presenta resultados similares a los obtenidos con PTX@p4VP, comprobándose de nuevo que el uso de estas nanoplataformas no altera el mecanismo de acción del PTX. También se obtuvieron similares resultados a las hollow-p4VP en las pruebas de internalización celular con las Tripalm-NPs marcadas, presentando todas las líneas celulares estudiadas una internalización dependiente del tiempo de exposición.

Las Tripalm-NPs-PTX también han conseguido una reducción significativa del volumen de los MTS de A549 y MCF7, en comparación con el PTX libre, un aumento de la apoptosis y también una disminución en la IC50 en las células madre tumorales (CSCs) presentes en ambas líneas tumorales de mama y pulmón y responsables del fracaso del tratamiento antitumoral. Finalmente, se ha analizado la capacidad de las Tripalm-NPs-PTX y Tripalm-NPs-PTX-MAC para eludir la resistencia a multidroga mediada por P-gp. En este sentido se ha demostrado que ambos tipos de NPs provocan la inhibición de P-gp y un incremento de la acumulación de PTX en el interior celular.

RESUMEN

Summary

SUMMARY

Lung and breast cancer are two of the most common types of cancer, being lung cancer the most prevalent, with 1.8 million of new cases every year. In addition, breast cancer is the most common in women, and represents the 12% of all tumor diagnosed. When it comes to mortality, lung cancer is the main cause of death by cancer worldwide, causing one out of five. However, breast cancer presents low mortality despite its high incidence, due to their good prognostics when early diagnosis happens.

Paclitaxel (PTX) is one of the drugs of choice for the treatment of both breast and lung tumors. However, this chemotherapeutic presents some drawbacks in the clinical practice as low solubility, poor bioavailability, no specificity for tumor tissue and appearance of a wide range of side effects such as myelosuppression, cardiotoxicity and neurotoxicity. Therefore, the commercial PTX pharmaceutical formulation implies the use of Cremophor® EL, a very toxic solvent which is necessary due to the low drug solubility. This diluent provokes hypersensitivity reactions and makes it necessary the premedication with corticosteroids and histamines. In addition, some tumor cells develop a phenomenon of multidrug resistance (MDR), causing treatment failure. The most common MDR mechanism is P-glycoprotein (P-gp), which ejects the drug out of the cell through an ATP-dependent mechanism, reducing its effect.

The use of nanoparticles (NPs) to encapsulate PTX may overcome some of those limitations, by increasing drug stability, solubility and biocompatibility of the formulation and treatment specificity, thus decreasing unspecific toxicity. In addition, some types of NPs have been reported to inhibit the proteins involved in the MDR mechanisms, especially P-gp efflux pump.

The aim of the work included in this Thesis is a comprehensive study of the antitumoral activity of two novel types of PTX-loaded NPs over monocapa and tridimensional *in vitro* models for the treatment of breast and lung cancer.

The first PTX delivery system has been made of hollow poly(4-vinylpyridine) NPs (hollow-p4VP). These NPs have been synthesized by a novel technique, and present a pH-responsive drug release kinetics, which may be advantageous to improve

SUMMARY

selectivity for the tumor acid environment. The results obtained from hemolocompatibility assays and with breast and lung normal cells show that hollow-p4VP display excellent biocompatibility. Further, incorporation of PTX into these NPs (PTX@p4VP) improves its cytotoxicity over *in vitro* models of human breast and lung tumor cells, being significantly reduced the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀). When it comes to cell cycle modulation, PTX encapsulation into these NPs does not modify the drug mechanism of action, being observed an accumulation of cells in SubG1 and G2/M phases, with a reduction of the percentage of cells in G0/G1 phase. In addition, cell uptake of Nile red (NR)-loaded hollow-p4VP has been proved in both lung and breast tumor cell lines. Finally, this nanoparticulate system has also been assayed in a *in vitro- in vivo* transition model, as a tridimensional culture of multicellular tumor spheroids (MTS) from breast and lung tumor cells, which proves that PTX@p4VP is more effective than free PTX, decreasing the spheroid volume and increasing cell apoptosis.

- **The second PTX delivery system** has been carried out with PTX-loaded glyceril tripalmitate (tripalmitin) solid lipid NPs (SLNs) (Tripalm-NPs-PTX), which are characterized by some interesting properties as a small size, good drug encapsulation rate and controlled drug release. Some modifications of these systems have been performed by the addition of hexa(ethylene glycol) (OEG), β -cyclodextrin (β CD) and macelignan (MAC) to the formulation, in order to provide some advantages to the PTX-loaded NPs therapy. None of these plain SLNs show hemolysis with human blood, or cytotoxicity in breast and lung normal cells, proving their good biocompatibility. Moreover, Tripalm-NPs-PTX enhance PTX cytotoxicity in a wide range of human tumor cells from breast (MCF7, MDAMB231, SKBR3 and T47D) and lung (A549, NCI-H520 and NCI-H460). Tripalm-NPs-PTX modifications also improve PTX cytotoxicity, though any of them provide any antitumoral advantage in comparison with non modified NPs. Cell cycle analysis presents similar results to those obtained with the PTX@p4VP, proving again that the use of NPs do not alter PTX mechanism of action. In addition, similar results to PTX@p4VP were obtained in the cell internalization study with Tripalm-NPs-PTX marked with a fluorophor, presenting all the cell lines a time-dependent behavior. Further, Tripalm-NPs-PTX have also achieved a significant reduction of A549 and MCF7 MTS volume in comparison to free PTX, so as a greater apoptosis, and induced a

significant decrease in the PTX IC_{50} of cancer stem cells (CSCs) from both lung and breast cancer cell lines, which are responsible for treatment failure. Finally, Tripalm-NPs-PTX and Tripalm-NPs-PTX-MAC capacity to inhibit the MDR mediated by P-gp have also been tested. Both NPs have proved the inhibition of P-gp and the increase of drug accumulation into the cells.

SUMMARY

Introducción

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Cáncer de mama

I.1.1. Epidemiología

El cáncer de mama es el segundo tipo de cáncer más frecuente en la población, siendo el primero en el caso de la mujer, representando más del 25% del total de casos de cáncer diagnosticados en el género femenino al año. Prueba de su importancia es que en el año 2012 se diagnosticaron 1,7 millones de nuevos casos, lo cual representa un 12% de todos los tumores. La incidencia del mismo depende de factores geográficos, siendo más alta en Estados Unidos, Canadá y países de Europa septentrional.

Sin embargo, a pesar del elevado índice de incidencia de este tipo de tumores, según los datos registrados por el último estudio GLOBOCAN hasta 2012 (Figura 1), el cáncer de mama causó la muerte a 522.000 personas durante el año 2012, lo cual supone solamente un 6% de las muertes producidas por cáncer, y un 15% de las muertes por cáncer en mujeres. Esto lo sitúa en el ranking de mortalidad en el quinto puesto, debido a que tras la detección precoz su pronóstico suele ser favorable (International, 2012; (WHO), 2015; Ferlay y cols., 2015). La supervivencia relativa de estos pacientes tras 5 años, varía según el estadio de la enfermedad. Si el cáncer se diagnostica en estadio 0 ó 1 la supervivencia es cercana al 100%. Sin embargo, en estadios más avanzados esta supervivencia disminuye a un 72%, siendo en los tumores metastásicos de solamente un 22% (Society, 2016).

I.1.2. Factores de riesgo

La etiología del cáncer de mama no es conocida, sin embargo se han conseguido detectar algunos factores que influyen en la aparición del cáncer de mama. Estos factores afectan solamente a un 20-30% de los casos, siendo en la mayoría de ellos factores esporádicos (McPherson y cols., 2000; Bonilla, 2016; Breastcancer.org, 2016).

INTRODUCCIÓN

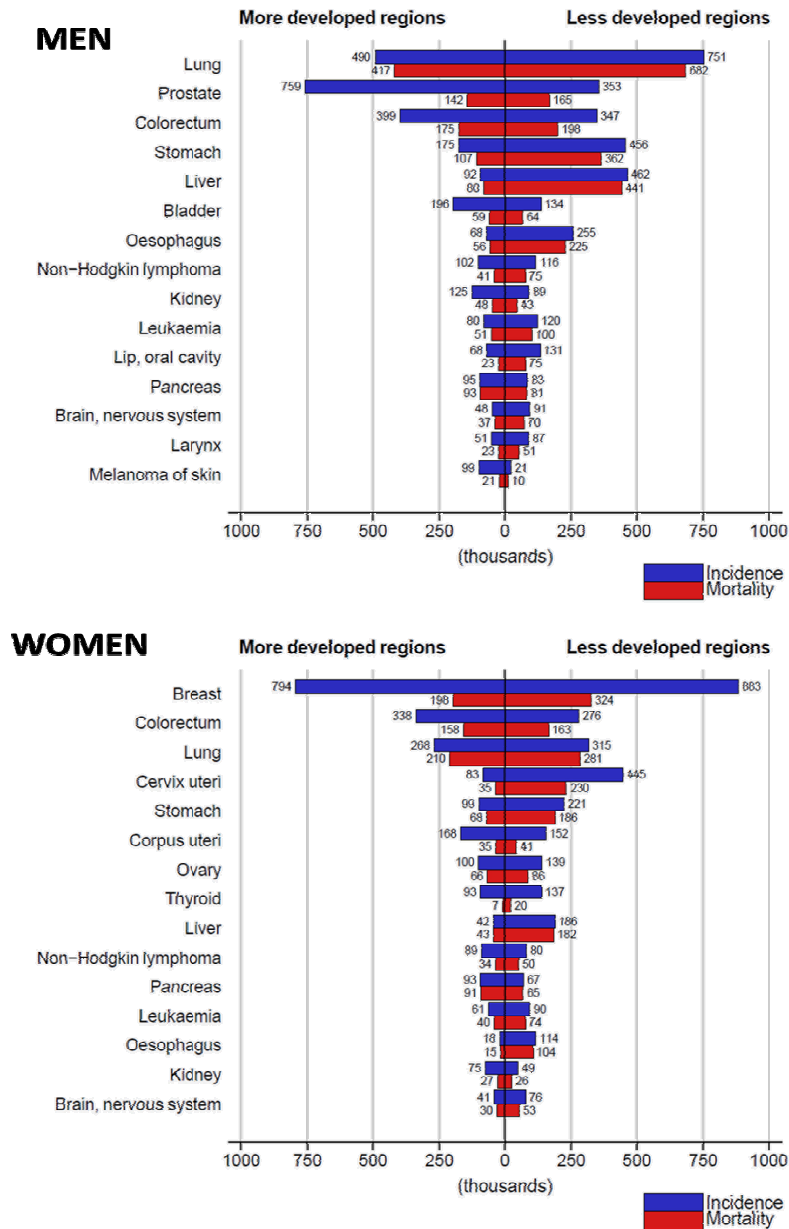


Figura 1. Numero estimado, expresado en miles, de nuevos casos de cáncer (incidencia) y muertes (mortalidad) en hombres y mujeres de regiones más desarrolladas y menos desarrolladas del mundo en 2012 (Ferlay y cols., 2015).

Los factores influyentes en el desarrollo de un cáncer de mama son los siguientes:

***Sexo:** El cáncer de mama tiene una mayor prevalencia en mujeres, suponiendo más del 99% de los casos diagnosticados.

***Edad:** Las posibilidades de padecer cáncer de mama son muy bajas en mujeres menores de 30 años, y aumentan con la edad hasta el momento de la menopausia donde decrecen drásticamente. El 75% de los casos se diagnostican a partir de los 50 años.

***Peso:** El sobrepeso, sobre todo en mujeres postmenopáusicas, incrementa el riesgo de cáncer de mama, debido a la acumulación de tejido graso, principal fuente de estrógenos después de la menopausia.

***Antecedentes personales:** La aparición previa de algún proceso de hiperplasia benigna en el pecho, así como haber sido previamente diagnosticada y tratada de un cáncer de mama, supone de 3 a 4 veces más riesgo, que la población general, de padecer otro tumor contralateral o en una parte diferente del mismo. El riesgo incrementa aún más en las pacientes diagnosticadas tratadas previamente de menos de 50 años.

***Antecedentes familiares y genéticos:** Las mujeres con antecedentes familiares de cáncer de mama tienen mayores posibilidades de desarrollarlo de forma que, en el caso de familiares de primer grado, el riesgo de padecer la enfermedad se duplica. Por otro lado, aunque la mayor parte de los tumores de mama son espontáneos, se ha visto que aproximadamente en un 10% de los casos los pacientes presentan una predisposición genética a la aparición del mismo.

Existen varios genes implicados en el desarrollo del cáncer de mama, siendo los más importantes el *BRCA1* y *BRCA2*. Se trata de genes supresores de tumores o protooncogenes, en los cuales se ha visto que la aparición de determinadas mutaciones está relacionada con una alta probabilidad de padecer este tipo de tumor, ya que un 80% de las personas que presentan mutaciones en estos genes y múltiples casos familiares acaban desarrollando este tipo de tumor a lo largo de su vida. La mutación en *BRCA1* es la responsable del 50% de los tumores de mama hereditarios, mientras que la mutación de *BRCA2* es menos frecuente y se relaciona con la aparición

INTRODUCCIÓN

de cáncer de mama en mujeres jóvenes y varones (Zamora y cols., 2001; King y cols., 2003).

Otro gen marcador de susceptibilidad al cáncer de mama es el *ATM*, que codifica para una proteína quinasa con un papel en la monitorización y reparación de las roturas de la doble hélice de ADN. Una mutación homocigótica en este gen es la causante de la enfermedad conocida como la “Ataxia-Teleangiectasia”, una rara enfermedad neurológica con un patrón de herencia autosómico recesivo. Sin embargo, diversos estudios han probado que los individuos con mutaciones heterocigóticas en este gen, si bien no muestran síntomas de la enfermedad, presentan una mayor susceptibilidad al desarrollo del cáncer de mama, concretamente, aumentan de 2 a 5 veces el riesgo de padecer este tumor (Renwick y cols., 2006).

Además, existen otros genes asociados a la susceptibilidad al cáncer de mama, como *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *MRE11A*, *NBN*, *PALB2*, *PTEN*, *RAD50*, *RAD51C*, *STK11* o *TP53*. Las mutaciones en algunos de los genes anteriores están también relacionadas con la anemia de Falconi, siendo las personas que la padecen más vulnerables a la hora de desarrollar tumores de mama y otros como el de hígado o cerebro (breastcancer.org, 2016).

Actualmente, existen tests genéticos para determinar mutaciones en muchos de los genes citados anteriormente, aunque los más frecuentes son los realizados sobre los genes *BRCA1* y *BRCA2*. En el caso de presentar mutaciones en estos genes en personas con un alto riesgo de desarrollo de cáncer de mama, existe la posibilidad de someterse a una mastectomía bilateral preventiva con la posterior reconstrucción de la mama. Esta intervención preventiva reduce en un 90%-95% tanto el riesgo de incidencia como la mortalidad por el cáncer de mama.

***Hormonales:** Otro elemento implicado en la susceptibilidad a desarrollar esta enfermedad son los altos niveles de estrógenos, los cuales se han visto relacionados con la aparición de cáncer de mama, influyendo por tanto en estos elementos hormonales los factores relacionados con la vida fértil de la mujer o la nuliparidad, así como el uso de estrógenos, anovulatorios o terapias hormonales de sustitución a lo largo de la vida del paciente (Zamora y cols., 2001). Por tanto, las mujeres con un tiempo de vida fértil más largo también serán más susceptibles de padecer este cáncer

(quien experimenta la menopausia por debajo de los 45 años tiene la mitad de riesgo de padecerlo que las que lo hacen a los 55 años). Además, las mujeres que tienen su primer hijo después de los 30 años presentan el doble de riesgo de desarrollar tumores de mama que las que lo tienen antes de los 20 años, siendo favorable a prevenir esta enfermedad también el prolongar el periodo de lactancia hasta un año.

***Estilo de vida:** Algunos de los factores relacionados con el cáncer de mama son fruto de los hábitos de vida (McPherson y cols., 2000; Breastcancer.org, 2016). La falta de ejercicio, el tabaco, la ingesta de alcohol o alimentarse con una dieta poco equilibrada con alto consumo de grasas son factores de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad. Por ejemplo, se ha visto que la obesidad está asociada con un riesgo dos veces mayor de sufrir la enfermedad en mujeres postmenopáusicas (Group, 2003). Pero otros factores se deben a la exposición a elementos ambientales, como la exposición a radiación, la exposición prolongada a la luz artificial (que influye en poseer niveles bajos de vitamina D, relacionado con padecer la enfermedad) o a productos químicos (como pesticidas, antibióticos o hormonas presentes en los alimentos). De hecho, se ha demostrado que la presencia en sangre de determinados organoclorados aumenta hasta 4 veces el riesgo a padecer cáncer de mama (Wolff y cols., 1993).

***Radiación:** Otro elemento que puede influir es la radiación, pero no solo como factor ambiental, está demostrado que la exposición a dosis moderadas o altas de radiaciones ionizantes, antes de los 40 años, aumenta el riesgo de cáncer de mama. El tratamiento con radioterapia de tumores primarios previos de mama o linfomas como el de Hodgkin también incrementa el riesgo de padecer cáncer de mama, sobre todo si éste hecho se produjo antes de la edad de 30 años. El riesgo es superior en pacientes jóvenes, de menos de 20 años y disminuye después de los 35 años.

INTRODUCCIÓN

I.1.3. Clasificación del cáncer de mama

Los tumores de mama son muy heterogéneos, y pueden clasificarse en base a diferencias histológicas, moleculares y clínicas.

I.1.3.1. Clasificación según patrón molecular y genético

En los últimos años, el avance en los estudios sobre la genómica del cáncer nos ha proporcionado la información necesaria para establecer una clasificación de estos tumores en base al patrón molecular y genético que presentan. Este tipo de clasificación permite asociar cada tipo tumoral con el pronóstico de la enfermedad, desarrollo de metástasis y respuesta clínica (Subik y cols., 2010; Holliday y Speirs, 2011; Guiu y cols., 2012). Según esta clasificación, los tumores de mama se dividen en: **luminal A, luminal B, HER-2positivo, basal, claudin-low y normal**, produciéndose algunas variaciones según el sistema de clasificación.

***Luminal A y luminal B:** representan el 70% del total de cánceres de mama y son denominados como tumores hormonossensibles o luminales. Son tumores con presencia de receptores de estrógeno (ER) y/o progesterona (PR), lo cual permite que puedan ser tratados por medio de terapia hormonal, lo que supone un valor añadido a su tratamiento. La diferencia entre ambos subtipos es su capacidad de proliferación determinada mediante Ki67 y el nivel de expresión de receptores hormonales. El luminal A presenta bajos niveles de Ki67 y altos niveles de receptores hormonales por lo que son tumores mejor diferenciados, de buen pronóstico y que responden adecuadamente al tratamiento hormonal. El subtipo luminal B, por el contrario presenta elevados niveles de expresión de Ki67 y bajos niveles de PR, tratándose de tumores indiferenciados de mal pronóstico cuando son sometidos únicamente a tratamiento hormonal (Cheang y cols., 2009).

***HER-2positivo:** representan el 10% de los cánceres de mama y son tumores que presentan amplificación del gen *HER-2* (receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano) o sobreexpresión de la proteína HER-2. Estos tumores son de mal pronóstico y se asocian a mutaciones en p53 y metástasis en los nódulos linfáticos

axilares. Su tratamiento actual se basa en Trastuzumab, un anticuerpo específico para el bloqueo de los receptores HER-2 de las células cancerígenas, que impide que dichos receptores reciban señales de crecimiento y proliferación implicadas en la metastasis tumoral (Neve y cols., 2006).

***Subtipo basal:** caracterizado por ser negativo para receptores de estrógeno y progesterona y de HER-2, por lo que se le denomina como triple negativo. Se caracteriza por la sobreexpresión de citokeratinas como CK5/6, CK17 y la expresión de genes relacionados con la proliferación celular. En la mayoría de los casos está asociado a mutaciones del gen *BRCA1* y son los tumores de mama con mayor agresividad. Dentro del grupo basal se ha establecido recientemente una nueva subclase, la “**claudin-low**”, que además de poseer las características anteriores, presenta una baja expresión de claudina-3 y claudina-4, así como del marcador de proliferación Ki-67 (un marcador de agresividad que también se usa como pronóstico en este tipo tumoral). Además, posee características relacionadas con el fenotipo de las células madre, como por ejemplo la expresión de $CD44^+/CD24^{-/low}$, así como una gran facilidad para su crecimiento en cultivo celular (Prat y cols., 2010).

I.1.3.2. Clasificación según estadio

El estadio del cáncer de mama se establece en base a cuatro factores, relacionados fundamentalmente con el tamaño del tumor y su capacidad de diseminación, que nos permiten establecer el pronóstico y el tratamiento del tumor (Breastcancer.org, 2016). Estos factores nos permiten establecer cuatro estadios en función de:

1. El **tamaño** del tumor.
2. La **capacidad de invasión del tumor**, es decir, si permanece dentro de los conductos lácteos o lobulillos de la mama, o por el contrario se ha extendido fuera de ellos.
3. Si el cáncer se **ha extendido a los nódulos o ganglios linfáticos cercanos**.
4. Si el tumor se **ha propagado fuera de la mama, llegando a otras partes del cuerpo**.

INTRODUCCIÓN

Estos factores permiten definir como tumor **local** a aquel que está restringido a la mama, **regional** en el caso de que haya afectado a los ganglios linfáticos, especialmente los ubicados en la región axilar, y **distante** si se ha dispersado por otras partes del cuerpo. Los conceptos "**localmente avanzado**" o "**regionalmente avanzado**", quiere decir que éste tumor es grande en extensión y afecta también a estructuras adyacentes a la mama, como por ejemplo la piel o estructuras torácicas, o incluso que modifica visiblemente la forma de la mama o los ganglios linfáticos axilares.

Los diferentes estadios que se pueden establecer son:

***Estadio 0:** los tumores de mama en estadio 0 son tumores no invasivos, sin indicios de células tumorales ni células anómalas ni cancerosas fuera del lugar de origen tumoral. Un ejemplo de este tipo es el **CDIS (carcinoma ductal in situ)**, que es un tipo de carcinoma que se genera en el interior de los conductos lácteos, permaneciendo en su lugar original (Figura 2). Este tipo de tumor es benigno aunque sí que puede aumentar el riesgo del paciente a padecer otro tipo de tumores en el futuro.

Carcinoma ductal in situ (CDIS)

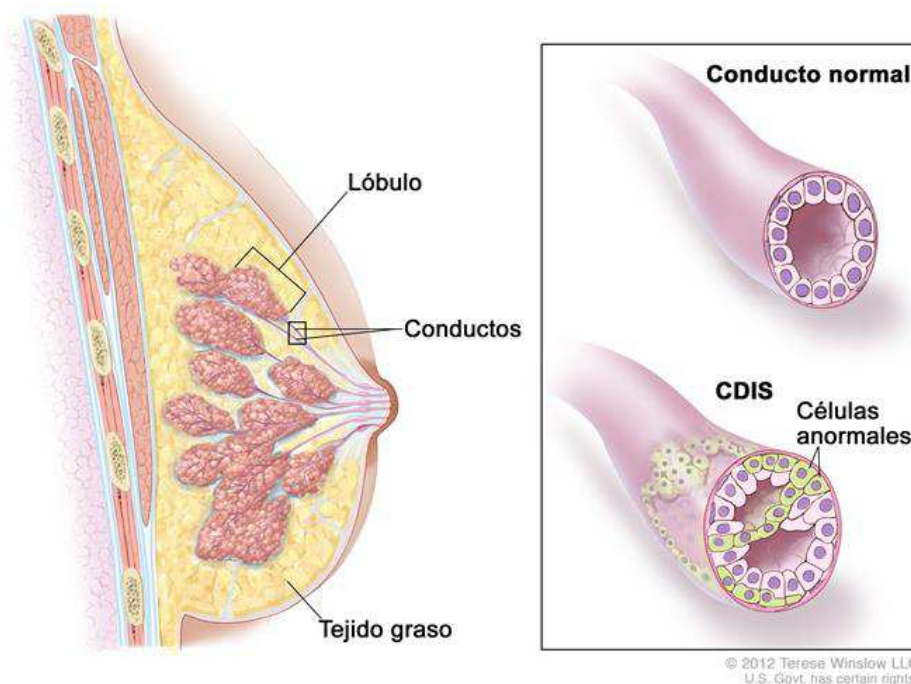


Figura 2. Imagen representativa de la localización del CDIS (Winslow, 2012).

***Estadio I:** se trata de tumores invasivos en los que las células tumorales se han dispersado por el tejido mamario circundante. Se divide en dos subestadios:

***Estadio IA:** se trata de un cáncer invasivo que no se ha extendido más allá de la mama ni afecta a los ganglios linfáticos, y cuyo tumor mide hasta 2 cm de diámetro.

***Estadio IB:** en este caso el tumor en la mama o no se observa o tiene un tamaño menor a 2 cm, pero observan pequeños grupos de células tumorales en los ganglios linfáticos ($> 0,2$ mm; < 2 mm de diámetro).

***Estadio II:** los tumores que se encuentran en este estadio son de mayor tamaño o se han propagado a los ganglios linfáticos cercanos. Se divide asimismo en dos categorías:

***Estadio IIA:** se caracteriza por

- No hay tumor en la mama pero sí hay invasión de 1 a 3 de los ganglios linfáticos axilares o cercanos al esternón, con células cancerígenas >2 mm.
- Un tumor <2 cm que se ha propagado a los ganglios linfáticos axilares.
- El tumor mide entre 2 - 5 cm pero no se ha propagado hacia los ganglios.

***Estadio IIB:**

- Presenta un tumor de 2 a 5 cm, con pequeños grupos de células cancerígenas en los ganglios linfáticos (con un tamaño de la infiltración tumoral en estos nódulos $>0,2$ mm y <2 mm).
- El tumor presenta las características anteriores y se ha propagado a 1-3 de los ganglios linfáticos axilares o cercanos al esternón, lo que aparece durante la biopsia del ganglio centinela.
- El tumor mide > 5 cm pero no se ha extendido a los ganglios adyacentes.

***Estadio III:** este estadio se divide en tres subcategorías:

***Estadio IIIA:**

- Cuando se han encontrado células cancerígenas en 4- 9 de los ganglios linfáticos axilares o cercanos al esternón.

INTRODUCCIÓN

- Si el tumor mide > 5 cm y se observan pequeños grupos de células tumorales en los ganglios linfáticos (>0,2 mm; < 2 mm).

- Cuando el tumor mide > 5 cm y se ha propagado a 1- 3 de los ganglios axilares o cercanos al esternón.

***Estadio IIIB:** cuando el cáncer se ha extendido por la pared torácica o la piel de la mama provocando inflamación o ulceración y además se encuentra en 9 ganglios linfáticos axilares o se ha propagado a los ganglios cercanos al esternón. Un ejemplo de un tipo de cáncer que presenta estas características es el cáncer de mama inflamatorio, un tipo de tumor muy agresivo que se propaga muy rápidamente, provocando un empeoramiento de los síntomas del paciente en días o incluso horas.

***Estadio IIIC:** se trata de un tumor que puede tener cualquier tamaño o incluso no detectarse, y haberse propagado a la piel o pared torácica, y además:

- Haber infectado al menos 10 ganglios linfáticos axilares.

- Se ha extendido a los ganglios situados encima o debajo de la clavícula.

***Estadio IV:** a este estadio se le denomina también cáncer de mama avanzado o **metastásico**. Se trata de un cáncer de mama distante que se ha propagado hacia otros órganos, que pueden ser los pulmones, ganglios linfáticos distantes, la piel, los huesos, el hígado o el cerebro. También puede darse como **una fase recurrente o recidiva** de un cáncer de mama anterior.

I.1.3.3. Sistema de clasificación TNM

Otro sistema alternativo de estadiaje o estadificación del cáncer de mama es el llamado TNM, que se basa en el **tamaño del tumor (T)**, el grado de **afectación de los nódulos linfáticos (N)** y la presencia de **metástasis** en otras partes del organismo (**M**). En la Tabla 1 se explican las características de esta clasificación.

Tabla 1. Clasificación de los estadios del cáncer de mama según el sistema TNM.

Categoría	Subdivisión	Características
T (tamaño del tumor)	TX	No es posible medirlo o hallarlo
	T0	No hay indicio del tumor original
	Tis	El tumor se encuentra "in situ" sin infiltración en el tejido mamario normal
	T1, T2, T3, T4	Según el tamaño del tumor y la expansión a tejidos adyacentes, siendo mayor cuanto más alto es el número
N (afectación ganglios linfáticos)	NX	No se pueden medir o hallar los ganglios cercanos
	N0	Cuando no hay presencia de células tumorales en los ganglios linfáticos
	N1, N2, N3	Según la cantidad de ganglios linfáticos afectados y el nivel de afectación, siendo mayor cuanto más alto es el número
M (metástasis)	MX	No es posible medir o hallar la metástasis
	M0	No hay metástasis
	M1	Hay metástasis

I.1.4. Tratamiento del cáncer de mama

La elección del tratamiento se basa en las características biológicas del tumor (tamaño, expresión de biomarcadores, localización, extensión a los nódulos linfáticos...) así como en factores relativos al paciente como su edad, estado de salud y hábitos. El abordaje del tratamiento de este tipo de tumor no se circunscribe únicamente a la acción farmacológica, sino que también incluye tratamientos radiológicos y quirúrgicos, por lo que la intervención clínica se realiza por parte de un equipo multidisciplinar (Senkus y cols., 2015).

I.1.4.1. Tratamiento locorregional

I.1.4.1.1. Cirugía

Según las características del tumor, la cirugía puede implicar la resección completa de la mama o mastectomía, aunque actualmente entre el 60% y el 80% de

INTRODUCCIÓN

los cánceres de mama diagnosticados en Europa occidental permiten la conservación de la misma (lumpectomía) (Figura 3). Además, puede ser necesaria la sustracción de los ganglios linfáticos axilares en el caso de que estos estén afectados. Este procedimiento se asocia con la aparición de angioedemas en las articulaciones superiores en un 25% de los casos, y que llega hasta un 40% en los casos en que esta cirugía se ha combinado con radioterapia. Por ello, últimamente se aboga por la biopsia del ganglio linfático centinela en vez de la extirpación de los nódulos axilares cuando no haya pruebas de su infestación.

En el caso de los tumores irresecales u operables de gran tamaño, puede procederse primero a un tratamiento neoadyuvante (que se realiza con anterioridad al tratamiento principal) sistémico, y/o radioterápico, para intentar disminuir su tamaño y poder proceder posteriormente a la cirugía menos extensa. (Senkus y cols., 2015)

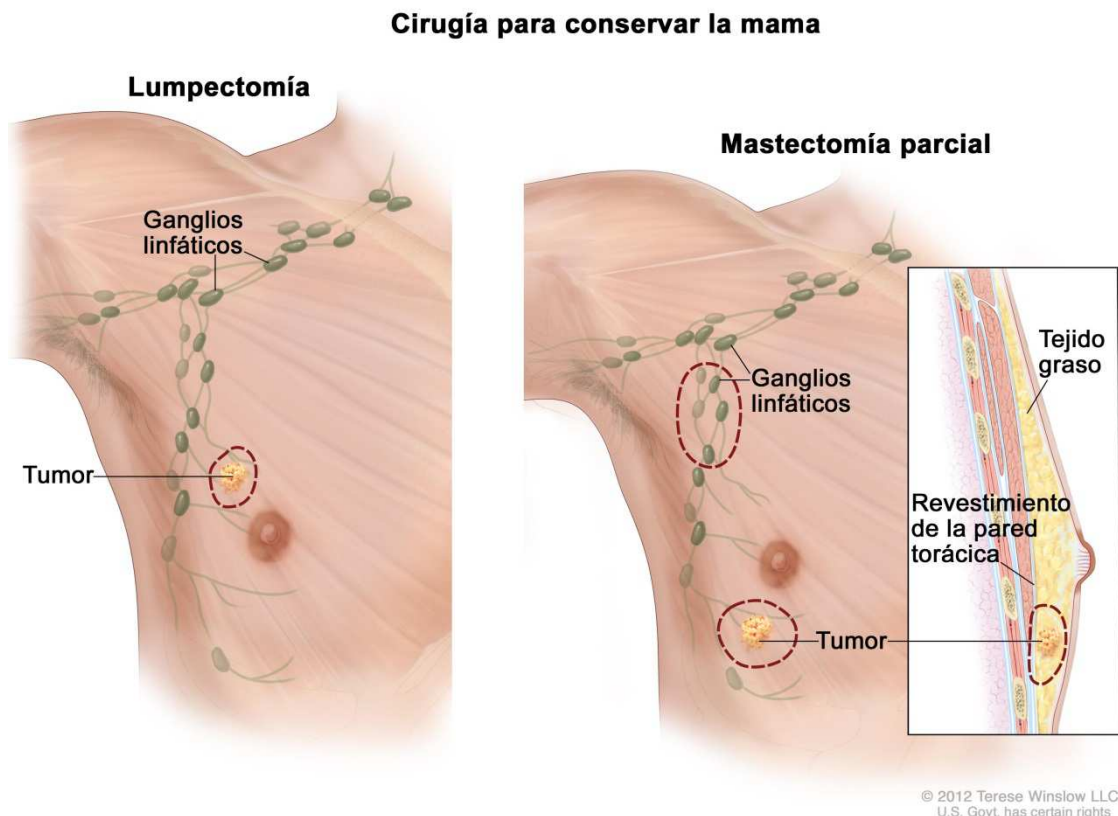


Figura 3. Imagen representativa de dos tipos de cirugía con conservación de la mama: lumpectomía y mastectomía parcial (Winslow, 2012).

I.1.4.1.2. Radioterapia

La irradiación de la mama completa tras la cirugía con conservación de la misma ha demostrado una reducción del riesgo de recurrencia en 10 años (en un 15%) y del riesgo de mortalidad en 15 años, hasta en un 4%. También se puede aplicar solamente en la zona cercana al tumor primario, lo que supone un tratamiento más rápido pero que aumenta el riesgo de recurrencias o recidivas, por lo que sólo puede ser aplicado a pacientes cuyo riesgo sea mínimo. Por otro lado, también es favorable la aplicación de radioterapia tras la mastectomía, sobre todo en pacientes con ganglios axilares afectados o tumores T3 o T4.

Además de las irradiaciones en los tejidos afectados inicialmente, se recomienda la irradiación de los ganglios linfáticos en los casos en que estos estén implicados. Tal y como hemos comentado anteriormente, la radioterapia también puede ser administrada antes de la resección de tumores no resecables o de gran tamaño para intentar disminuir su extensión.

Las pautas de administración de la radioterapia suelen componerse por 15-16 sesiones de una sola dosis de 2,5 a 2,67 grays (Senkus y cols., 2015).

I.1.4.2. Tratamiento sistémico adyuvante

La decisión de aplicar terapia sistémica tras la cirugía se basa en una serie de factores, como es la sensibilidad del tumor a determinados fármacos, el riesgo de recaída que presente el paciente así como sus características biológicas. Para ello hay que basarse en un análisis del fenotipo intrínseco del tumor, incluyendo la expresión de biomarcadores como el ER, PR, HER-2 o Ki-67, y el subtipo genético, de lo que ya hemos hablado anteriormente (ver apartado "1.3. Clasificación según patrón molecular y genético"). En este sentido, el cáncer de mama es pionero en el uso de tratamientos personalizados teniendo en cuenta la presencia de estos biomarcadores en las células tumorales, que pueden ser utilizados como diana y permiten un tratamiento individualizado según las características del tumor para optimizar la respuesta al tratamiento.

El tratamiento debe empezar de 2 a 6 semanas tras la cirugía, ya que su eficacia disminuye si este tiempo se extiende a más de 12 semanas. Todas las modalidades de

INTRODUCCIÓN

tratamiento sistémico pueden utilizarse también en un tratamiento preoperatorio en tumores avanzados para disminuir la extensión de la cirugía a realizar (Senkus y cols., 2015).

1.1.4.2.1. Hormonoterapia

La terapia hormonal consiste en la inhibición de la acción de los estrógenos en el organismo, ya sea mediante una disminución de sus niveles o mediante el bloqueo de su acción sobre los receptores de estrógeno. Está indicada en pacientes con tumores que expresan ER, y se suele administrar en combinación con otras terapias como la cirugía, la radioterapia o la quimioterapia, aunque en el caso de las mujeres la elección del tratamiento depende también del estado menopáusico de la paciente:

***Antiestrógenos:** Son los más utilizados en pacientes, constituyendo la primera línea en el tratamiento hormonal del cáncer de mama. Estos fármacos compiten con los estrógenos por los receptores, impidiendo que los segundos ejerzan su acción sobre los distintos órganos. El más comúnmente utilizado en pacientes premenopáusicas y postmenopáusicas es el **tamoxifeno**, administrado a una dosis estándar de 20 mg al día durante 5–10 años.

El uso de este fármaco conlleva múltiples efectos secundarios como son bochornos, náuseas, fatiga, depresión, debilitamiento capilar, sequedad vaginal y de la piel o pérdida del deseo sexual. Además, incrementan el riesgo de tromboembolia e hiperplasia endometrial en pacientes con susceptibilidad a esta complicación, por lo que es necesario un diagnóstico y supervisión adecuados. Con objeto de asegurar la eficacia del tamoxifeno, y puesto que para convertir el tamoxifeno en su forma activa es necesaria la enzima CYP2D6, se recomienda evitar su combinación con inhibidores de la CYP2D6. Si esto no pudiera evitarse se recomienda su sustitución por un inhibidor de las aromatasas y la supresión ovárica en pacientes premenopáusicas.

En el caso del **cáncer de mama masculino**, suele tratarse de carcinomas ductales invasivos de tipo luminal, siendo el tamoxifeno el fármaco hormonal de elección.

***Inhibidores de la aromatasa (AI):** Son utilizados fundamentalmente en pacientes postmenopáusicas, puesto que en estos casos los estrógenos se producen en la grasa del organismo por la acción de un complejo denominado aromatasa. Estos fármacos impiden que este complejo actúe, por lo que se bloquea la producción de estrógenos. Los inhibidores de la aromatasa pueden administrarse desde el principio del tratamiento, o tras años de terapia con tamoxifeno. En el caso de tamoxifeno, se han reportado ventajas al alargar su tratamiento de 5 a 10 años, mientras que los AIs no han mostrado beneficios al prolongar al tratamiento más de 5 años.

***Análogos de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH):** Estos compuestos tienen la capacidad de reducir la producción de la hormona estimulante de la producción de estrógenos (LHRH), dando como resultado la disminución de los mismos en el organismo. Su efecto es similar a la supresión ovárica mediante su extirpación, pero con la ventaja de que sus efectos pueden revertir al suspender el tratamiento.

1.1.4.2.2. Quimioterapia

La quimioterapia consiste en una terapia sistémica por medio de fármacos cuya función es matar o debilitar las células tumorales. Sin embargo, debido a que se distribuye por todo el organismo puede provocar efectos adversos, por lo que no está aconsejada en todos los casos. Se recomienda la quimioterapia en la mayoría de los tumores de mama triple negativo (las células del tumor no contienen ER ni PR, así como no tienen exceso de HER-2) y HER-2 positivos, siendo generalmente más efectiva en tumores ER negativos. En el caso de los cánceres con fenotipo luminal A (ER positivos, HER-2 negativos) no suele administrarse quimioterapia a no ser que haya un elevado riesgo de recurrencias o afectación de los ganglios linfáticos.

Los fármacos más utilizados son antraciclinas y taxanos, y en algunos casos una combinación de ciclofosfamida/metotrexato/fluorouracilo.

La combinación de antraciclinas y taxanos presenta mejores resultados que la combinación de varias antraciclinas, disminuyendo la mortalidad hasta en una tercera parte, siendo los 8 años de un 21,1% frente a un 23,9% con antraciclinas; y disminuyendo las recurrencias de un 34,8% a 30,2%, a pesar del riesgo que conlleva

INTRODUCCIÓN

este tratamiento por un aumento de la toxicidad cardiaca (Group, 2012). Otra alternativa para personas con riesgo de padecer complicaciones cardiacas es la administración de combinaciones libres de antraciclinas, como es el docetaxel más la ciclofosfamida.

La quimioterapia suele administrarse en 4-8 ciclos con una duración de 12 a 24 semanas, dependiendo de las características individuales de cada paciente, del riesgo de recurrencia y del régimen terapéutico seleccionado por el oncólogo.

En tumores HER-2 positivos puede administrarse la quimioterapia convencional junto al trastuzumab, un anticuerpo monoclonal específico para HER-2, disminuyendo esta combinación a la mitad el riesgo de recurrencias, y aumentando la supervivencia de los pacientes respecto a la quimioterapia sola. El Trastuzumab suele administrarse durante un año como tratamiento estándar y suele ser bien tolerado, a excepción de una posible disfunción cardiaca reversible, por lo que es necesaria la monitorización de la función cardiaca durante el tratamiento. Debido a esta toxicidad, no es recomendable su uso concomitante con antraciclinas, mientras que su uso junto con taxanos es más seguro y efectivo. También puede combinarse este fármaco con radioterapia o terapia hormonal en el caso de los tumores luminales tipo B (Pinto y cols., 2013).

I.2. Cáncer de pulmón

I.2.1. Epidemiología

El cáncer de pulmón representa el cáncer más frecuente a nivel mundial. Durante el año 2012 se diagnosticaron 1,8 millones de nuevos casos, lo que supone cerca del 13% de todos los tumores. De todos estos, el 58% se produjeron en las regiones menos desarrolladas (Figura 1). En cuando a las diferencias entre sexos, los tumores de pulmón suponen el cáncer más frecuente en hombres, con 1,2 millones de nuevos casos diagnosticados cada año, y cerca del 17% del total de tumores en el hombre, siendo mayor el ratio en el centro y este de Europa. En las mujeres supone el tercer tipo de cáncer más frecuente, siendo diagnosticados 583.000 casos al año, un

8,8% del total. Las mujeres de Norteamérica y norte de Europa son las que más comúnmente desarrollan este tipo tumoral.

La mortalidad por cáncer de pulmón es muy alta, siendo la primera causa de muerte por cáncer en el mundo. Una de cada cinco muertes por el proceso canceroso son provocadas por el cáncer de pulmón, siendo el índice de mortalidad muy similar a los valores de incidencia de la enfermedad (1,6 millones de muertes al año) (International, 2012; (WHO), 2015; Ferlay y cols., 2015).

La supervivencia a los 5 años es por tanto muy baja, de un 17,7%, aunque aumenta hasta un 55% cuando el tumor se encuentra localizado y no se ha expandido más allá de los pulmones, lo que ocurre solamente en un 16% de los casos cuando son diagnosticados. En los tumores distantes la supervivencia a los 5 años disminuye hasta un 4%. Además, según estadísticas recientes, la mitad de las personas diagnosticadas de cáncer de pulmón mueren en menos de un año (Institute, 2016).

I.2.2. Factores de riesgo

***Tabaco:** De entre todos los factores de riesgo existentes, el tabaco es el principal implicado en el cáncer de pulmón, estando asociado a un 80% de las muertes por este tipo de cáncer. Este riesgo aumenta con la cantidad de cigarrillos que se fumen diariamente y el tiempo que la persona lleve fumando, pero también se extiende a personas no fumadoras que estén expuestas al tabaco. Además, la probabilidad de sufrir un tumor en el pulmón debido al tabaco es igual para ambos sexos, no habiéndose visto diferencias tampoco entre etnias. Aunque el riesgo disminuye considerablemente en el caso de los fumadores pasivos, se estima en un 20%-25%, provoca unas 7.000 muertes al año. Asimismo, todos los tipos de cáncer de pulmón están asociados al tabaco, aunque destaca el caso de los carcinomas de células escamosas, seguido del cáncer de pulmón de células pequeñas y el adenocarcinoma (Parkin y cols., 2004; Society, 2016).

El humo del tabaco contiene más de 60 carcinógenos, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos o las nitrosaminas que se forman a partir de la nicotina. Estos compuestos pueden provocar mutaciones en genes tan importantes como *RAS* o *TP53*, provocando la aparición del tumor. Además, el tabaco contiene radicales libres y

INTRODUCCIÓN

oxidantes como el anión superóxido, el radical hidroxilo y el H_2O_2 , que además de provocar broncoconstricción e hiperreactividad de las vías aéreas, produce daño oxidativo en el ADN de las células del epitelio bronquial, lo que contribuye a su transformación neoplásica (Ilundáin, 2011).

***Exposición a radón:** El radón es un gas radioactivo natural, incoloro, inodoro e insípido, que procede de la descomposición del uranio 238 y el radio 226 presentes en suelo y rocas y que es capaz de dañar el epitelio respiratorio por la emisión de partículas alpha. Aunque al aire libre no supone ningún problema, suele acumularse en el interior de edificios, dependiendo sus niveles de la composición de subsuelo, el tipo de construcción y la ventilación de la vivienda. De hecho, está demostrado un incremento de cáncer de pulmón en los trabajadores de las minas de uranio (Darby y cols., 2005). Constituye la principal causa de cáncer de pulmón entre el grupo de no fumadores, la segunda después del tabaco en muchos países, y se ha visto que su combinación con el tabaco aumenta notablemente el riesgo de padecerlo (Organization, 2016).

***Exposición a asbestos:** Llamamos asbestos o amianto a un grupo de minerales de origen natural de naturaleza fibrosa y compuestos por silicatos. Se planteó la relación de estos materiales con el cáncer de pulmón al ver que era más frecuente en personas que trabajan en minas, molinos, plantas textiles, astilleros o elaborando aislamientos y que están expuestos a estos asbestos. Si además estas personas fuman, el riesgo se ve multiplicado. Las personas expuestas a grandes cantidades de asbestos también tienen tendencia a desarrollar mesotelioma, un tipo de cáncer que comienza en la pleura. En los últimos años se ha reducido notablemente su uso en industria y productos comerciales, pero sigue estando presente en muchos edificios (Society, 2016).

***Riesgos ambientales:** Se estima que un 5% de las muertes por cáncer de pulmón puede deberse a la contaminación ambiental, especialmente frecuente en las grandes ciudades y junto a vías con alta afluencia de tráfico. También influye la exposición a minerales radiactivos como el uranio, o la inhalación de arsénico, berilio,

cadmio, sílice, compuestos de níquel y cromo, cloruro de vinilo, gas mostaza, productos del carbón, éteres de clorometilo o escapes de combustible diesel. En los últimos años se está intentando evitar su exposición en la medida de lo posible a los trabajadores que están en contacto con estos productos. Por otro lado, la presencia de arsénico en el agua potable supone un problema en países del sur de Asia y Sudamérica, donde se han detectado niveles muy elevados y se relacionan con la incidencia de esta enfermedad (Luque, 2009; Society, 2016).

***Antecedentes personales y familiares:** Las personas que han sufrido un cáncer de pulmón anteriormente también tienen más posibilidades de desarrollar otro. La presencia de un familiar directo con este tipo de tumor aumenta el riesgo, especialmente si fue a una edad temprana. Sin embargo, no está claro si este riesgo se debe a genes compartidos o a una exposición similar a factores de riesgo en el entorno y hogar (como al tabaco o radón). Las personas que han recibido anteriormente un tratamiento de radioterapia en el pecho por el diagnóstico previo de otro tumor, también presentan un riesgo mayor de padecer cáncer de pulmón, así como ocurre en el caso del cáncer de mama, por ejemplo en pacientes de linfoma de Hodgking, o cáncer de mama tras mastectomía (Society, 2016).

***Radiaciones ionizantes:** La relación entre la exposición a radiaciones ionizantes y el desarrollo de cáncer de pulmón parece depender de la intensidad y la duración de la exposición según los estudios realizados por Gilbert (Gilbert, 2009), Si bien se ha observado que el riesgo es mínimo en pacientes con enfermedades que necesitan de múltiples exploraciones radiológicas, incrementa en gran medida en pacientes afectos de linfomas o cáncer de mama que reciben radioterapia en la región axilar, mediastínica o fosa supraclavicular.

I.2.3. Clasificación del cáncer de pulmón

Al igual que en el cáncer de mama la clasificación de los tumores de pulmón se puede realizar en base a diferentes criterios. De esta forma podemos distinguir entre la clasificación histológica y la clasificación en función del estadio.

INTRODUCCIÓN

I.2.3.1. Clasificación histológica del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón primario, según la Organización Mundial de la Salud, puede ser de dos grandes tipos en base a sus características histológicas, su curso clínico y su respuesta al tratamiento: cáncer de pulmón de células pequeñas o microcítico (SCLC) , y cáncer de pulmón de células no pequeñas o no microcítico (NSCLC).

I.2.3.1.1. *Cáncer de pulmón de células pequeñas*

El SCLC representa un 12% de los tumores de pulmón, caracterizado por células pequeñas, con citoplasma escaso, cromatina granular sin nucléolos visibles en su núcleo y límites celulares poco definidos (Figura 4). Estas células tienen diferenciación neuroendocrina y presentan gránulos de neurosecreción en su citoplasma. Se trata de un tipo de tumor desarrollado principalmente por personas fumadoras, que se disemina rápidamente. Es el tipo más agresivo, y suele presentar metástasis en otros órganos, así como recidivas y resistencia a los tratamientos, siendo la supervivencia a los 5 años tan solo de un 1-5% de los casos diagnosticados (Ilundáin, 2011; UK, 2014).

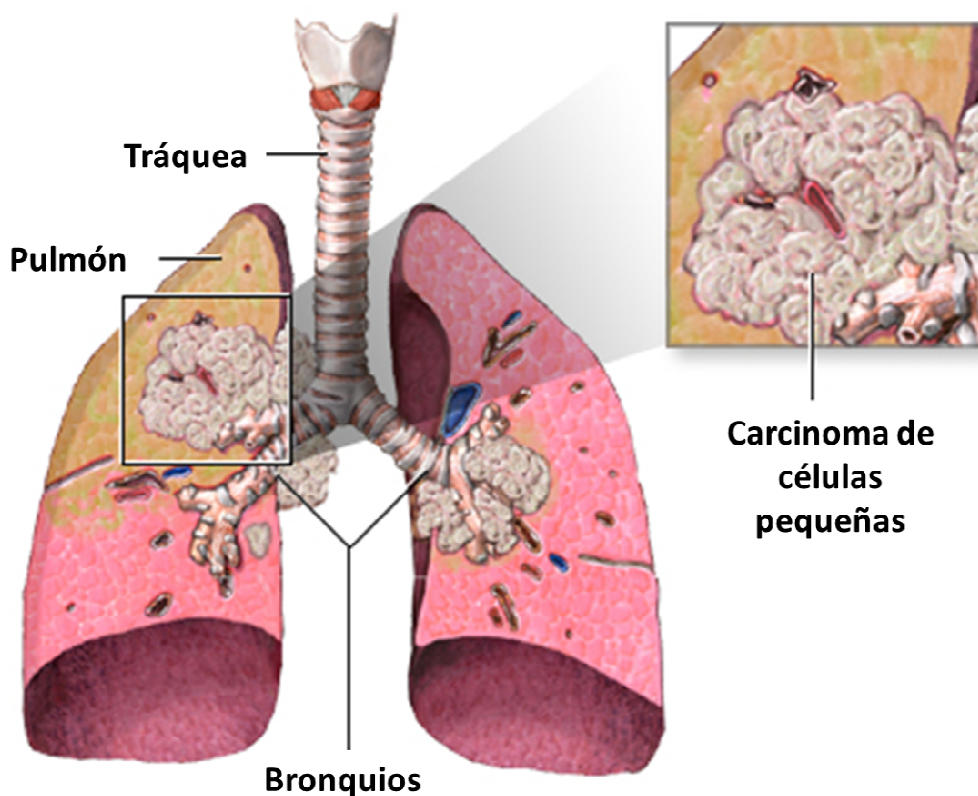


Figura 4. Imagen representativa de un SCLC. Derechos de imagen: A.D.A.M.

1.2.3.1.2. Cáncer de pulmón de células no pequeñas

Por otro lado, el NSCLC engloba el 87% de los tumores de pulmón, y sus células son más grandes que las del SCLC, con un citoplasma mayor, núcleo grande y nucléolos marcados. Se divide en tres tipos histológicos: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células grandes (Ilundáin, 2011; UK, 2014).

- **Adenocarcinoma:** es el cáncer de pulmón más frecuente y está asociado al epitelio alveolar o a las glándulas mucosas, por lo que se sitúa en áreas externas del pulmón y en el revestimiento de las vías respiratorias. Es de tipo epitelial con diferenciación granular y se divide en cuatro subtipos según su histología celular: papilar, acinar, bronquioalveolar y sólido con producción de mucina; o puede presentar un patrón mixto. Es el tipo de cáncer de pulmón más común en los no fumadores y especialmente en mujeres, y suele presentar metástasis en un 20% de los casos. Para su diagnóstico se utiliza el factor de transcripción tiroideo 1 como marcador inmunohistoquímico.

- **Cáncer de células escamosas:** aparece frecuentemente en la zona central del pulmón ya que se origina en las células epiteliales de los bronquios. Está asociado con procesos inflamatorios y presenta zonas queratinizadas o puentes intercelulares. Es un tumor relacionado con la adicción al tabaco, por lo que su incidencia ha disminuido en las últimas décadas siendo superado por el adenocarcinoma. Para su diagnóstico pueden usarse como marcadores algunas citoqueratinas de alto peso molecular, diferenciándose del adenocarcinoma en que no presenta el factor de transcripción tiroideo 1 como marcador inmunohistoquímico.

- **Carcinoma de células grandes:** llamado así porque las células son grandes y redondeadas, sin diferenciación granular ni escamosa, aunque en aproximadamente un tercio de los casos presentan diferenciación neuroendocrina. Son tumores que crecen rápidamente, aunque su incidencia es baja (un 9% de los casos de cáncer de pulmón).

INTRODUCCIÓN

En algunos casos, cuando las células están poco diferenciadas es difícil establecer el tipo de tumor, y se hace llamar NSCLC indiferenciado. Esto no supone ninguna modificación a la hora de establecer el tratamiento, ya que todos los NSCLC tienen un tratamiento similar, y un comportamiento similar, aunque su respuesta al tratamiento sí es diferente a la que presentan los SCLC.

I.2.3.2. Clasificación TNM

Al igual que el cáncer de mama, el cáncer de pulmón también puede ordenarse según el sistema de clasificación TNM (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación del cáncer de pulmón según el sistema TNM (Lababede y cols., 2011).

Categoría	División	Subdivisión	Características
T (tamaño del tumor)	TX		Citología positiva, no es posible medirlo o hallarlo
	T1	T1a	≤ 2 cm
		T1b	>2 cm; <3 cm
	T2	T2a	En bronquio a ≥ 2 cm de la carina traqueal, invade la pleura visceral, atelectasia parcial. > 3 cm; < 5 cm
		T2b	En bronquio principal a ≥ 2 cm de la carina traqueal, invade la pleura visceral, atelectasia parcial. > 5 cm; < 7 cm
	T3	En pared torácica, diafragma, pericardio, pleura mediastínica o bronquio principal a <2 cm desde la carina traqueal, atelectasia total. Nódulo/s tumorales separados en el mismo lóbulo	
	T4	Invasión de cavidad mediastínica, corazón, grandes vasos, carina, traquea, esófago, vértebras. Nódulo/s tumorales separados en diferentes lóbulos ipsilaterales	

Tabla 3 (Continuación). Clasificación del cáncer de pulmón según el sistema TNM (Lababede y cols., 2011).

Categoría	División	Subdivisión	Características
N (afectación ganglios linfáticos)	N1		Afectación de ganglios peribronquiales ipsilaterales, hilares ipsilaterales.
		N2	Ganglio subcarinal, mediastínico ipsilateral
		N3	Ganglio mediastínico contralateral, hilar, escaleno, supraclavicular
M (metástasis)	M1	M1a	Metástasis distante. Nódulo/s tumorales separados en un lóbulo contralateral; nódulos pleurales o pleura maligna, o efusión pericárdica
		M1b	Metástasis distante

I.2.3.3. Estadios del cáncer de pulmón

Según las características de la clasificación TNM, y al igual que el cáncer de mama, en el NSCLC también podemos establecer cuatro estadios en función del tamaño e invasión de tejidos vecinos, invasión ganglionar o diseminación del tumor tal y como queda representado en la Tabla 3. El estadio más bajo sería el IA, en el cual el tamaño del tumor es inferior a 2 cm, sin ganglios afectados ni metástasis, y el más agresivo el estadio IV, caracterizado por cualquier tamaño, cualquier ganglio puede estar afectado y presenta metástasis distante.

INTRODUCCIÓN

Tabla 4. Estadios del cáncer de pulmón (Lababede y cols., 2011).

Estadio	T	N	M
Carcinoma oculto	TX	N0	M0
0	Tumor in situ	N0	M0
IA	T1 a, b	N0	M0
IB	T2 a	N0	M0
IIA	T2 b	N0	M0
	T1 a, b	N1	M0
	T2 a	N1	M0
IIB	T2 b	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T1 a, b; T2 a, b	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
	T4	N0, N1	M0
IIIB	T4	N2	M0
	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

I.2.4. Tratamiento

I.2.4.1. Tratamiento del SCLC

Para el tratamiento de los SCLC localizados suele usarse una combinación de quimioterapia y radioterapia, que resulta en un aumento de la supervivencia a 5 años en un 20%- 25% de los casos. Se ha visto que 30 fracciones de radioterapia, dos veces al día a 1,5 grays concurrentemente con 4 ciclos de cisplatino y etopósido es la combinación más beneficiosa (Pijls-Johannesma y cols., 2007). Si este régimen no fuera posible para el paciente, puede administrarse radioterapia una vez al día, y 4-6 ciclos de quimioterapia. La radioterapia debe iniciarse con el primer o segundo ciclo de quimioterapia. Un 5% de los pacientes con SCLC presentan un tipo T1, 2 N0 M0 con pronóstico más favorable, siendo la supervivencia de más de 5 años en el 50% de los casos (Yu y cols., 2010). Estos pacientes son tratados con cirugía, y reciben 4 ciclos de

quimioterapia adyuvante y radioterapia torácica postoperatoria en el caso de encontrar ganglios linfáticos afectados (N1 o N2). Todos los pacientes con un buen estado funcional (EF), se evaluarán además para recibir un tratamiento profiláctico mediante irradiación craneal para evitar la aparición de metástasis cerebrales.

En el caso de los SCLC metastásicos, el tratamiento es paliativo, y se utilizan combinaciones de quimioterápicos. Sin embargo, las recurrencias aparecen rápidamente y el tratamiento de segunda línea tiene una eficacia limitada, por lo que la supervivencia no suele superar los 10 meses. El tratamiento de primera línea comprende 4-6 ciclos de etopósido junto con cisplatino o carboplatino. En el caso de que etopósido esté contraindicado, se administra alguna opción alternativa, como las combinaciones cisplatino- irinotecán, gemcitabina- carboplatino o topotecán (oral o intravenoso)- cisplatino. En estos casos no se suele aplicar radioterapia en el torax, y al igual que en los tumores localizados, los pacientes con buen EF serán evaluados para recibir irradiación craneal. En pacientes que presenten resistencia al tratamiento, o recaídas en un periodo inferior a 6 semanas, se aconseja su participación en algún ensayo clínico disponible. En estos casos se suele administrar topotecán (oral o intravenoso), o ciclofosfamida, doxorubicina y vincristina. También pueden reintroducirse en el tratamiento de primera línea, que suele ser platino-etopósido (Fruh y cols., 2013).

I.2.4.2. Tratamiento del NSCLC

En los tumores en **estadio I o II** se lleva a cabo en primer lugar la cirugía, que depende de la extensión de la enfermedad y de la capacidad cardiopulmonar del paciente, siendo preferible la lobectomía que la neumonectomía. En el caso de pacientes con función cardiopulmonar muy reducida se utiliza la segmentectomía y la resección en cuña. En el caso de que la enfermedad sea irresecable se administra radioterapia radical. El proceso quirúrgico permite obtener una supervivencia a los 5 años que supera el 50% en los pacientes en estadios I y IIA y del 38% en el estadio IIB.

Se recomienda quimioterapia adyuvante en los tumores en estadio II y III, así como en estadio IB si el tumor primario tenía un tamaño > 4 cm. Se aconseja la combinación de dos quimioterápicos, siendo uno de ellos cisplatino, durante 3- 4 ciclos de quimioterapia. Se han visto los resultados más favorables en la combinación de

INTRODUCCIÓN

cisplatino con vinorelbina. Además, en tumores en estadio temprano con localización periférica, se recomienda llevar a cabo un tratamiento con radioterapia estereotáctica ablativa en vez de la cirugía. Esta opción se asocia a una baja toxicidad en pacientes de edad avanzada o que presenten enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Si el tumor tuviera un tamaño > 5 cm o localización central, la radioterapia será diaria. Sin embargo, en los tumores en estadio temprano en los que se haya llevado a cabo la resección completa del tumor, la radioterapia adyuvante está desaconsejada, aunque sí se recomienda si la resección fuera incompleta.

Los **tumores localmente avanzados (estadio III)**, constituyen un grupo muy heterogéneo en los que se realizan abordajes personalizados y multidisciplinares para establecer su tratamiento.

El tratamiento más favorable implica quimioterapia y radioterapia concurrentes. Se recomiendan los regímenes con cisplatino, como cisplatino-etopósido o cisplatino- vinorelbina, durante 2- 4 ciclos. También se pueden administrar combinaciones con carbomicina como carbomicina- PTX, aunque la eficacia en estos casos es menor, o una administración secuencial de 2 fármacos de platino, durante 2- 4 ciclos. Si la concurrencia de radioterapia y quimioterapia no fuera posible, se aconseja una aproximación secuencial como alternativa. Además, se recomienda la cirugía en tumores reseccables en los que se pueda realizar una resección completa mediante lobotomía. Especialmente en tumores N2 se ofrece también una quimioterapia de inducción previa a la operación (Vansteenkiste y cols., 2013).

Los **tumores metastásicos (estadio IV)** requieren de un grupo multidisciplinar que evalúe cada caso y tome las decisiones más adecuadas. En todos los casos, y siempre que el paciente presente un EF adecuado, se ofrece terapia sistémica siendo el tratamiento de primera línea quimioterapia combinada de dos fármacos de platino. En el caso de los tumores de células no escamosas se recomienda el uso de cisplatino o pemetrexed, aunque otras opciones incluyen bevacizumab + PTX- carboplatino, o bevacizumab + otros fármacos basados en platino. Se establecen de 4 - 6 ciclos de quimioterapia. En los pacientes con un peor EF también se han visto mejoras con la quimioterapia, aunque suele usarse un solo fármaco como gemcitabina, vinorelbina o

taxanos, o combinaciones basadas en carboplatino. También se han visto aumentos de la supervivencia de pacientes mayores (70- 89 años) al usar carboplatino. En EFs muy deteriorados se recomienda obviar la quimioterapia y administrar fármacos paliativos.

Para tumores con mutaciones activadoras del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), se usan también inhibidores de tirosina quinasa (TKI) como erlotinib, gefitinib y afatinib, incluso en casos de bajo EF. Además los tumores que presenten los genes de fusión de quinasa de linfoma anaplásico (ALK) recibirán tratamiento con crizotinib.

En pacientes con un progreso de la enfermedad tras el tratamiento de primera línea, se utiliza premetrexed en NSCLC no escamosos, o docetaxel. También TKI o crizonitib en su caso. Además, en todos los NSCLC está altamente recomendado dejar de fumar, ya que esto ayuda a mejorar el pronóstico de la enfermedad (Reck y cols., 2014).

I.3. Modelos experimentales para el estudio del cáncer

I.3.1. Esferoides tumorales multicelulares

En el estudio del cáncer, el modelo *in vitro* más utilizado son los cultivos celulares. Se trata de un crecimiento celular en 2 dimensiones y es un método muy útil para estudiar las características específicas de cada tipo celular. Además, sobre estos cultivos bidimensionales se realiza la primera aproximación de la valoración de los efectos antitumorales de los diferentes agentes farmacológicos.

Sin embargo, este modelo posee una serie de limitaciones, siendo la principal que no es capaz de reflejar la estructura del crecimiento de los tumores *in vivo*, el cual se produce en forma de una masa celular tridimensional. Es por ello que cada vez cobra más importancia el uso de estructuras tridimensionales capaces de mimetizar el ambiente de crecimiento de los tumores en el organismo, como paso previo a los ensayos *in vivo*, además este modelo resulta más económico y sencillo. Estas estructuras celulares tridimensionales son los llamados esferoides tumorales multicelulares (MTS). Su arquitectura reflejaría factores presentes en los tumores *in vivo* como el gradiente de oxígeno y nutrientes al interior, cambios en la expresión de

INTRODUCCIÓN

proteínas y la aparición de diferentes regiones: proliferación, senescencia y necrosis, además de una mayor complejidad en la distribución del fármaco al interior del esferoide. Por esta razón, algunos fármacos que son efectivos en los cultivos en monocapa luego resultan ineficaces en los posteriores ensayos *in vivo*. Los MTS incorporan una mayor complejidad al análisis de fármacos o NPs y suponen un método intermedio entre los cultivos celulares en 2 dimensiones y los ensayos *in vivo*, con algunas menos limitaciones que las que estos últimos ensayos presentan a la hora de llevarlos a cabo (problemas éticos, coste, seguridad...) (Jamieson y cols., 2015).

I.3.2. Células madre tumorales

En los últimos años ha cobrado importancia la teoría de las “células madre tumorales” (cáncer stem cells o CSCs). Los tumores están formados por una población celular heterogénea, entre las que además de las células tumorales en distintos estadios de diferenciación, que forman el mayor porcentaje del volumen celular, se encuentran las CSCs, responsables en gran medida de la formación del tumor y su progresión (Ponti y cols., 2005). Estas CSCs son células indiferenciadas, y comparten características de las células madres, como genes, rutas de señalización y capacidad de auto-renovación. De hecho, se barajan dos teorías sobre su procedencia: que provengan de las células madre normales del tejido mediante un proceso de desregulación, o que se hayan originado mediante un proceso de transición epitelio-mesenquima (Velasco-Velazquez y cols., 2012).

En los cultivos *in vitro*, las CSCs presentan la habilidad de generar células diferenciadas, esferoides tumorales y crecer en suspensión, mientras que el resto de células del cultivo tumoral precisan de una superficie adherente. Además, estas células presentan una alta tumorigenicidad y resistencia tanto a radioterapia como a quimioterapia, siendo responsables de la aparición de recidivas y metástasis por el fracaso del tratamiento antitumoral en este tipo celular (Figura 5). Por ello, es necesario desarrollar nuevas aproximaciones terapéuticas capaces de eliminar no sólo las células tumorales normales sino también las CSCs, ya que estas células son capaces

de volver a generar el tumor tras el tratamiento (Ponti y cols., 2005; Velasco-Velazquez y cols., 2012; Iglesias y cols., 2013).

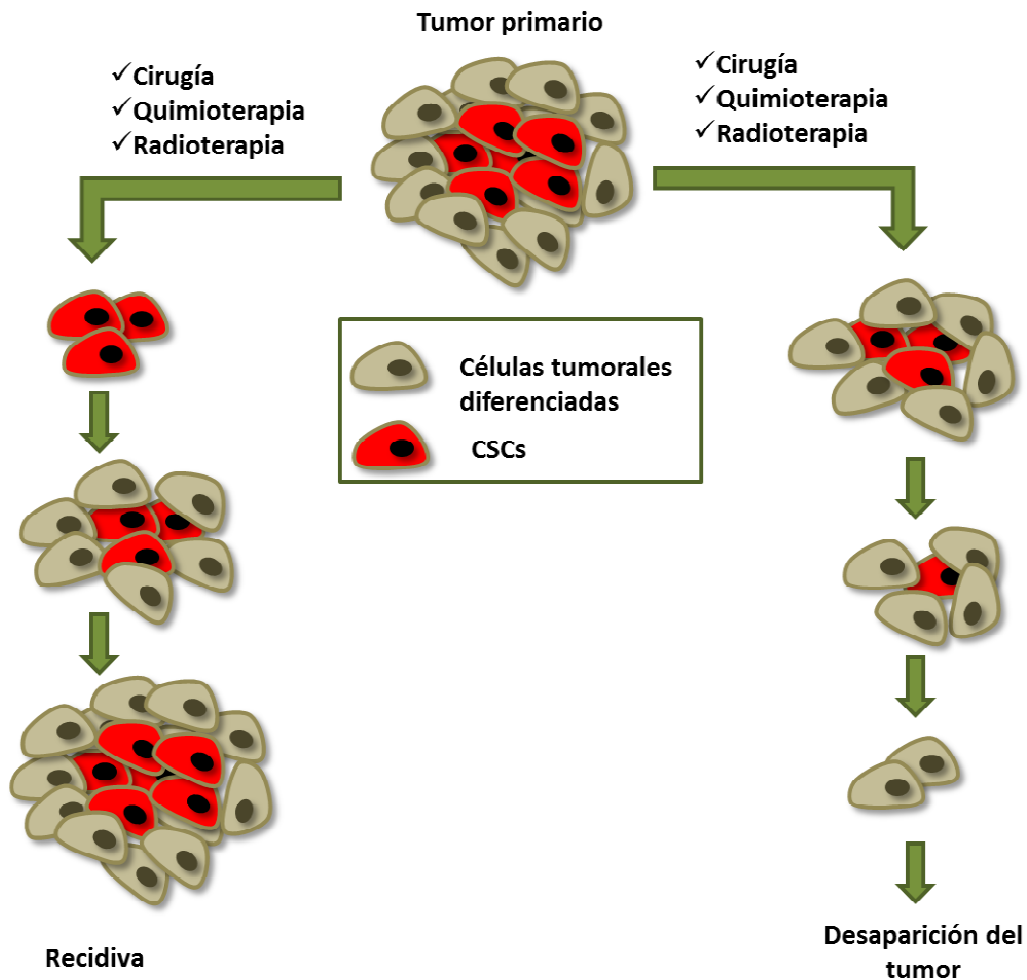


Figura 5. Imagen representativa de la resistencia de las CSCs al tratamiento antitumoral.

Las tres características principales de las CSCs son su capacidad de autorrenovarse de forma indefinida, de generar todos los tipos celulares que forman el tumor y la presencia de marcadores específicos propios. En relación a la capacidad de autorenovación, está demostrado que pueden tener divisiones tanto asimétricas como simétricas, generando en este último caso dos CSCs que se encuentran en fase G₀ del ciclo celular y que por tanto se mantienen de forma quiescente (Boman y cols., 2007). Además, las CSCs se caracterizan por presentar alteraciones en los mecanismos antiapoptóticos y de reparación del ADN, así como sobreexpresión de mecanismos que favorecen la quimiorresistencia (Pantic, 2011). Por último, las CSCs se caracterizan por

INTRODUCCIÓN

presentar una serie de marcadores que permiten diferenciarlas del resto de células del tumor. Por ejemplo, las de mama expresan marcadores asociados con las células madre como $CD44^+ / CD24^{-/low}$, $ALDH^+$, y una alta expresión de *e-cadherina* (Iglesias y cols., 2013). También la expresión de *Oct4* y *Sox2* está relacionada con las CSCs, así como con la progresión de los tumores de mama (Apostolou y cols., 2015). Además, las CSCs de mama presentan sobreexpresión del gen *CD133*, lo que en algunos casos se ha utilizado para incrementar la especificidad del tratamiento por ese tipo tumoral (Swaminathan y cols., 2013). Se han aislado CSCs a partir de un amplio rango de líneas celulares de mama entre las que se encuentran MCF7, T47D, BT474 o MDAMB231, mediante su cultivo en condiciones de no adherencia, en un medio libre de suero y con varios factores de diferenciación (Iglesias y cols., 2013; Sun y cols., 2014). Las CSCs de pulmón han sido menos estudiadas siendo utilizadas mayormente las líneas celulares A549 y NCI-H460, y también presentan expresión de genes relacionados con las células mesenquimales como *CD44*, *CD133* o *ALDH1* (Luanpitpong y cols., 2014; Zhang y cols., 2015). Una mayor expresión de *Oct4*, *Sox2* o *DNMT1* se ha observado en CSCs de pulmón, relacionándose con una mayor supervivencia de este tipo de células (Yu y cols., 2012). Por otro lado, Lundholm y cols., (Lundholm y cols., 2013) aislaron las CSCs a partir de 4 líneas celulares de NSCLC (H125, A549, H1299 and H23) y comprobaron que había una sobreexpresión de *CD133* respecto a las líneas celulares origen en 3 de las 4 líneas estudiadas.

I.4. El paclitaxel

El paclitaxel (PTX) es un taxano extraído de la corteza del tejo del pacífico (*Taxus brevifolia*, familia Taxaceae) que fue descubierto tras un cribado de plantas para identificar componentes antitumorales organizado por el Instituto Nacional de Cáncer (NCI) y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Los extractos del tejo del pacífico (nombre común) fueron obtenidos por el botánico Arthur Barclay en 1962, y los científicos Mansukh Wani y Monroe Wallen en colaboración con el NCI analizaron y aislaron el compuesto responsable de la actividad antitumoral, al que denominaron "Taxol". En 1971 se publicó su estructura y se incorporó en el programa de desarrollo de fármacos que lleva a cabo el NCI (Figura 6).

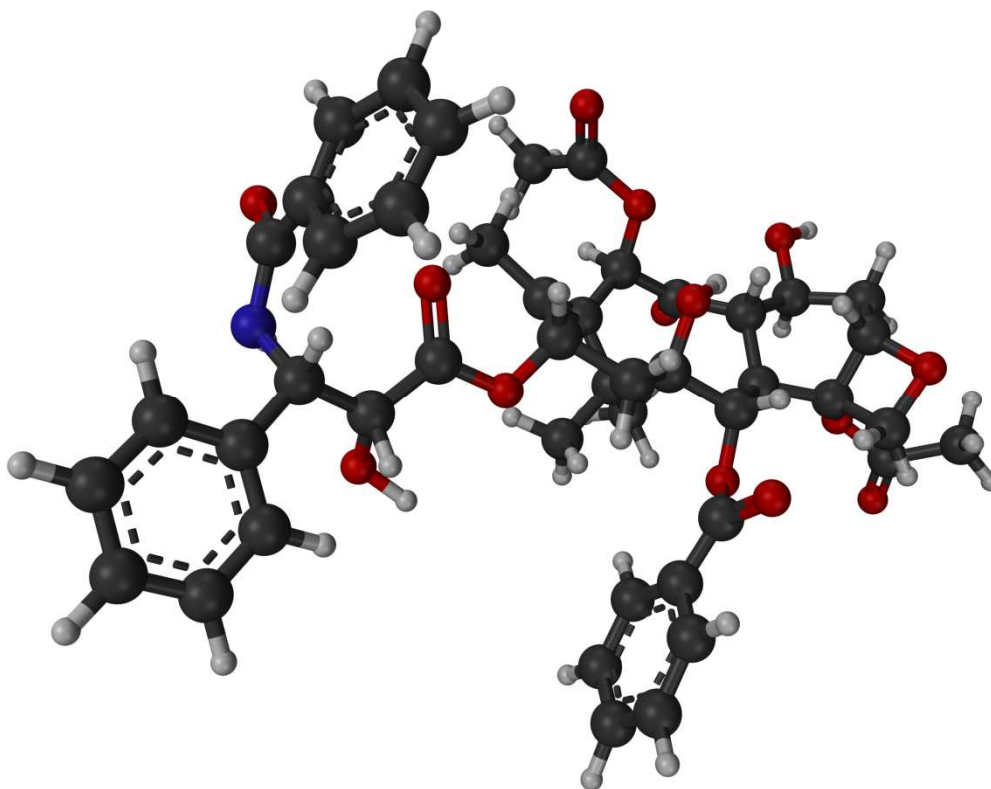


Figura 6. Representación tridimensional de la fórmula química del PTX.

A pesar de su escasa solubilidad, lo que hizo necesario incluir el aceite de castor ricino en la formulación con la toxicidad que ello implicaba, los prometedores resultados en ratones con un modelo de leucemia hicieron que en 1984 se llevaran a cabo los primeros ensayos clínicos con este compuesto. Sin embargo, la escasez de árboles de esta especie y los elevados costes de producción hicieron que se planteara la síntesis química de este compuesto, altamente demandado en aquel momento. No fue hasta 1994 cuando se consiguió la síntesis total de esta molécula de gran complejidad que requería 40 pasos de reacción para su obtención, por lo que actualmente se utiliza un proceso de semisíntesis para su obtención. En 1992 la compañía farmacéutica Bristol-Myers Squibb adquirió el compuesto, registrando la marca comercial como "Taxol", y dándole el nombre genérico de PTX, convirtiéndose en ese momento en el quimioterápico más rentable de la historia.

El Taxol fue primeramente aprobado por la FDA para el tratamiento de cáncer de ovario en 1992. En 1994 se aprobó su uso en cáncer de mama, y en 1999 en NSCLC, pero este fármaco ha mostrado también propiedades antitumorales frente al cáncer

INTRODUCCIÓN

de cabeza y cuello, gastroesofágico, endometrial, cervical, vejiga, páncreas, linfoma, leucemia y sarcoma de Kaposi (Weaver, 2014).

I.4.1. Mecanismo de acción

Existen varios fármacos que actúan como agentes antimitóticos mediante mecanismos relacionados con la alteración de los microtúbulos. Los vinca alcaloides se unen al extremo final + del microtúbulo forzando su despolimerización, y la colchicina se une al dominio entre las subunidades α y β , condicionando la dinámica tubular (McGrogan y cols., 2008). En el caso del PTX, su mecanismo de acción se basa en su unión a la subunidad β de la tubulina que forma parte de los microtúbulos (Figura 7).

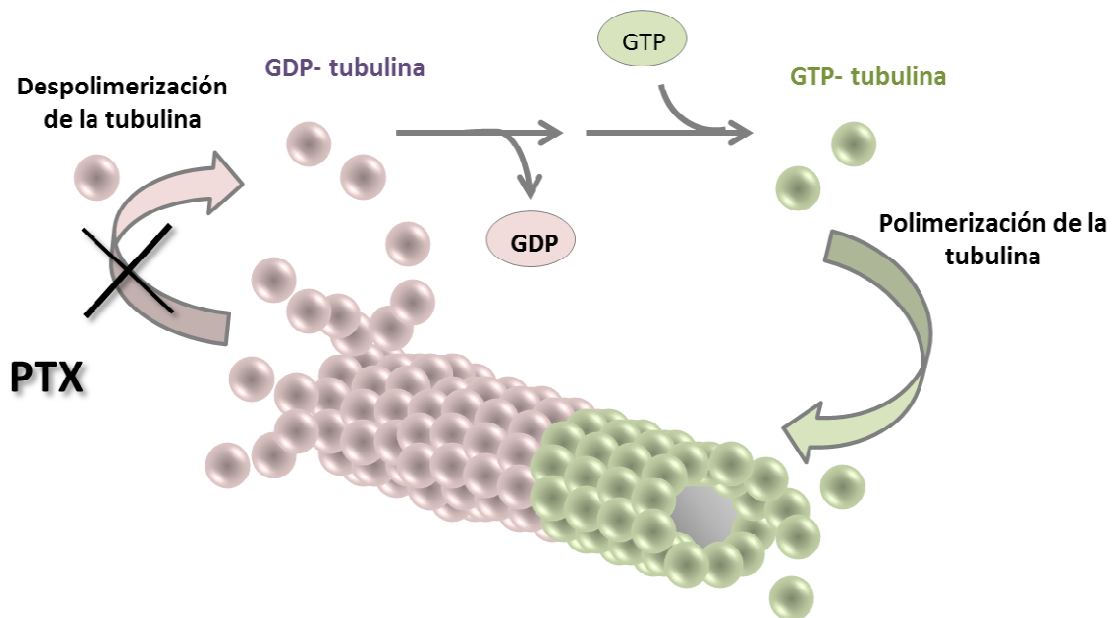


Figura 7. Imagen representativa del mecanismo de acción del PTX

Durante el proceso de la mitosis, la tubulina polimeriza formando estos microtúbulos, que forman el huso mitótico, llevando a cabo posteriormente un proceso de despolimerización para dividir cada una de las copias del material genético y llevar a cabo la división celular. La unión de los taxanos a la subunidad β de la tubulina, estabiliza los microtúbulos e impide su despolimerización. Por tanto, el proceso de mitosis se detiene en las fases G2/M del ciclo celular, produciéndose la muerte celular mediante la activación de la ruta de proteasas que promueven el

proceso de apoptosis celular (Rowinsky, 1997; Hernandez-Vargas y cols., 2007; Impens y cols., 2008).

I.4.2. Limitaciones de la quimioterapia con PTX

A pesar de la efectividad de este fármaco, su administración presenta múltiples inconvenientes: en primer lugar, provoca la aparición de diversos efectos adversos como la neutropenia, mielosupresión, cardiotoxicidad y otros efectos relacionados con la neurotoxicidad como la neuropatía periférica y reacciones de hipersensibilidad (Rowinsky, 1997; Gornstein y Schwarz, 2014). Los dos tipos de toxicidad crónica clínicamente más relevantes son la neuropatía periférica y la hematológica por depresión de la médula ósea. Ambos son efectos indeseables dosis-dependientes que afectan a más del 60% de las personas tratadas y que interfieren en el tratamiento, obligando a menudo a suspenderlo (generalmente de forma temporal y a veces definitivamente) o a reducir la dosis administrada, con la consiguiente reducción de la eficacia antineoplásica.

La aparición de neuropatía periférica en los pacientes tratados con PTX es un factor limitante de la dosis de fármaco a utilizar. Se trata de una neurotoxicidad profunda, con parestesia dolorosa en las extremidades, así como entumecimiento, hormigueo y pérdida del sentido del tacto. Suele darse a partir del tercer al sexto día tras la administración del tratamiento, persistiendo generalmente durante otros 3-6 días, y frecuentemente requiere el uso de analgésicos. Otro efecto secundario que limita la dosis de Taxol a 200-250 mg/m² es la mielosupresión, especialmente la neutropenia, que puede ser bastante severa (grado 3 y 4) y dar lugar a una septicemia fatal. Sin embargo, en la mayoría de los casos se produce una recuperación rápida tras unos 15- 21 días del inicio del tratamiento.

La toxicidad hematológica se manifiesta especialmente por leucopenia y neutropenia, aunque también incluye anemia y trombocitopenia (Conlin y cols., 2010; Mauri y cols., 2010; Mirtsching y cols., 2011). Esta toxicidad puede ser controlada o reducida con la administración de factores hematopoyéticos (G-CSF o GM-CSF) o análogos de la eritropoyetina, los cuales a menudo se incluyen en las pautas

INTRODUCCIÓN

estándares de tratamiento intensivo, y es fácilmente evaluable en animales de experimentación (Zhou y cols., 2010; Aapro y cols., 2011).

En cuanto a la toxicidad cardiaca, un gran porcentaje de los pacientes tratados con Taxol presentan bradicardia asintomática, siendo menos frecuente la aparición de un bloqueo cardiaco o trastornos en la conducción del impulso cardiaco. Por otro lado, la hipersensibilidad es un fenómeno serio que puede llegar a ser fatal. Se calcula que en un 81% de los casos presenta disnea, que puede ir acompañada de broncoespasmos, el 74% urticaria, enrojecimiento y erupciones cutáneas, el 41% hipotensión y un 15% aumento de la presión arterial (Guchelaar y cols., 1994).

El Taxol se compone de dos disolventes orgánicos: un 50% de aceite de ricino polioxihidratado (Cremophor® EL) y otro 50% de etanol deshidratado. El Cremophor® EL es altamente tóxico y aunque es el responsable, en parte, de las reacciones de hipersensibilidad se utiliza debido a la escasa solubilidad del PTX en agua (~0,4 µg/ml), haciendo necesaria la premedicación de los pacientes con corticoides e histaminas. Además, se ha visto que el Cremophor® EL modifica la farmacocinética del PTX haciéndola impredecible, lo cual es otra razón más que limita su uso clínico (Guchelaar y cols., 1994; Gelderblom y cols., 2001; Ma y Mumper, 2013).

Por otro lado, desde el punto de vista clínico, el tiempo de infusión del Taxol es muy largo (unas 3 horas), presenta una escasa biodisponibilidad en el organismo debido a su rápida eliminación y una baja especificidad por el tejido tumoral (Surapaneni y cols., 2012).

Por último, se han observado mecanismos de resistencia al PTX en los diferentes tumores, que provocan el fallo del tratamiento antitumoral. La importancia de estos mecanismos de resistencia se ha demostrado *in vitro*, ya que líneas celulares derivadas de cáncer de mama con diferente expresión de HER2/neu (líneas MDA-MB-435 y MCF-7) muestran distinta sensibilidad a la acción antiproliferativa del PTX (Tan y cols., 2002; Knuefermann y cols., 2003). Por otra parte, diferentes estudios *in vivo* e *in vitro* han establecido una relación directa entre la presencia de transportadores de fármacos de la familia ABC, como P-gp, y la resistencia a PTX en cáncer de mama (Leonessa y Clarke, 2003). Chen y cols. (Chen y cols., 2013) llevaron a cabo un ensayo *in vivo* con ratones inmunodeprimidos que se dividieron en dos grupos experimentales, uno al que se le inocularon células tumorales de mama MCF7 sensibles a PTX, y otro

con células MCF7 que habían desarrollado resistencia a este fármaco. El grupo sensible al tratamiento mostró una inhibición tumoral significativamente mayor que el grupo resistente, siendo de un 52.46% y un 14.58%, respectivamente. Además, el análisis inmunohistoquímico de los tumores mostró un aumento de la expresión de P-gp en el primer grupo, así como de otras proteínas relacionadas con el fenotipo MDR, así como una desregulación del receptor estrogénico.

I.4.2.1. Mecanismos de resistencia a fármacos

Las células tumorales son capaces de expresar o desarrollar una serie de mecanismos de resistencia a fármacos, el denominado fenotipo MDR, el cual puede ser intrínseco o adquirido tras la exposición al fármaco. Estos mecanismos de resistencia a fármacos son muy diversos y dependen del fármaco antitumoral. Un ejemplo de los MDR es el caso de la expulsión de los fármacos incorporados a las células mediante proteínas transmembrana o vesículas, y su inactivación, degradación o metabolización a metabolitos inactivos. Otros mecanismos implican la inhibición del mecanismo apoptótico, la reparación del daño producido por el fármaco en el ADN celular, o la alteración de las moléculas diana para la actuación del fármaco, pero todos tienen en común la reducción del efecto del fármaco antitumoral (Cabeza y cols., 2016).

Concretamente en el caso de PTX, la resistencia puede deberse a mutaciones producidas en los microtúbulos de las células tumorales, que disminuyen su capacidad de polimerizar haciendo en muchos casos incluso necesaria la presencia de PTX para estabilizar el sistema. Otros mecanismos se basan en la expresión diferencial de diferentes isotipos de tubulina, una disminución en la formación del huso mitótico o de la expresión de bcl-2. También puede deberse a la presencia de transportadores o bombas de eflujo en la membrana celular que expulsan el fármaco contra gradiente impidiendo su acción, siendo la más común de ellas la P-glicoproteína (P-gp) (Rowinsky, 1997).

I.4.2.1.1. MDR mediada por P-glicoproteína

Dentro de los transportadores ABC el más estudiado es la P-gp (Figura 8). Se trata de una proteína de la membrana plasmática cuyo mecanismo de acción es

INTRODUCCIÓN

dependiente de energía en forma de ATP y que fue descrita por primera vez en 1976 en células de ovario murinas expuestas a colchicina (Juliano y Ling, 1976). Posee una masa de 170 kDa y es codificada por el gen *MDR-1*. Su función en tejidos normales es la de expulsar toxinas y xenobióticos de las células del organismo en contra de gradiente, pero en las últimas décadas se ha demostrado también su implicación en la resistencia que presentan algunas células tumorales a determinados fármacos. El número de moléculas que son sustrato de la P-gp ha ido incrementándose a lo largo de los años, y abarca un amplio espectro que comprende vinca alcaloides, antraciclinas, taxanos, agentes antitumorales de diferente naturaleza, fluoróforos o fármacos anti-VIH (Litman y cols., 2001).

El PTX ha demostrado también ser sustrato de P-gp y se ha visto que este transportador juega un importante papel en las resistencias al fármaco. Un estudio realizado por Guo y cols. (Guo y cols., 2004) demostró una mayor expresión del gen *MDR-1*, y una mayor cantidad de P-gp en la membrana de células de cáncer de mama resistentes tanto a PTX como a docetaxel, demostrando su implicación en el fallo del tratamiento con estos fármacos. Por otro lado, se realizó un estudio en 6 líneas celulares diferentes: dos de carcinoma de epitelio pulmonar (A549 y A427), una de carcinoma pulmonar metastásico (NODO), y otras de cáncer gástrico (GAS), seminoma (SEM) y cáncer de mama (MCF7). Tras la administración de PTX todas ellas mostraron un aumento de la expresión del gen *MDR-1*, implicado en el fenómeno MDR mediado por P-gp. Así mismo, la administración de carboplatino en estas líneas celulares produjo un aumento de la expresión de MRP-3, una proteína asociada también al fenómeno MDR. Sin embargo, la administración conjunta de ambos no desarrolló nuevos mecanismos de resistencia, pero sí incrementó aún más la expresión de *MDR-1*, mejorando el mecanismo de resistencia inducido por cada uno de estos fármacos individualmente (Gonzalez y cols., 2012; Melguizo y cols., 2012).

Diversas moléculas han mostrado actividad como inhibidores de la P-gp. Esta proteína posee varios sitios de unión del sustrato, así como dos dominios de unión a ATP, por lo que los mecanismos responsables de su inhibición pueden ser muy variados, pudiendo deberse a mecanismos de competición o a la inhibición del proceso de hidrólisis del ATP. Por ejemplo, el vanadato se une a los dominios de ATP inhibiendo la hidrólisis de P-gp y la ciclosporina interviene tanto en la actividad como en el

reconocimiento del sustrato por parte del transportador (Lin y Yamazaki, 2003). Uno de los inhibidores de P-gp más estudiados es el verapamilo (Tsuruo y cols., 1981). Su mecanismo de inhibición se debe a la competición por el sitio de unión del sustrato, sin interrumpir la actividad del transportador. A pesar de la existencia de inhibidores de P-gp, los resultados de la coadministración con PTX no han sido muy favorables debido a su toxicidad y a la alteración de la farmacocinética de PTX en el organismo. Por ello, una estrategia que está cobrando fuerza es el uso de NPs capaces de inhibir P-gp para revertir este proceso (Figura 8) (Ma y Mumper, 2013).

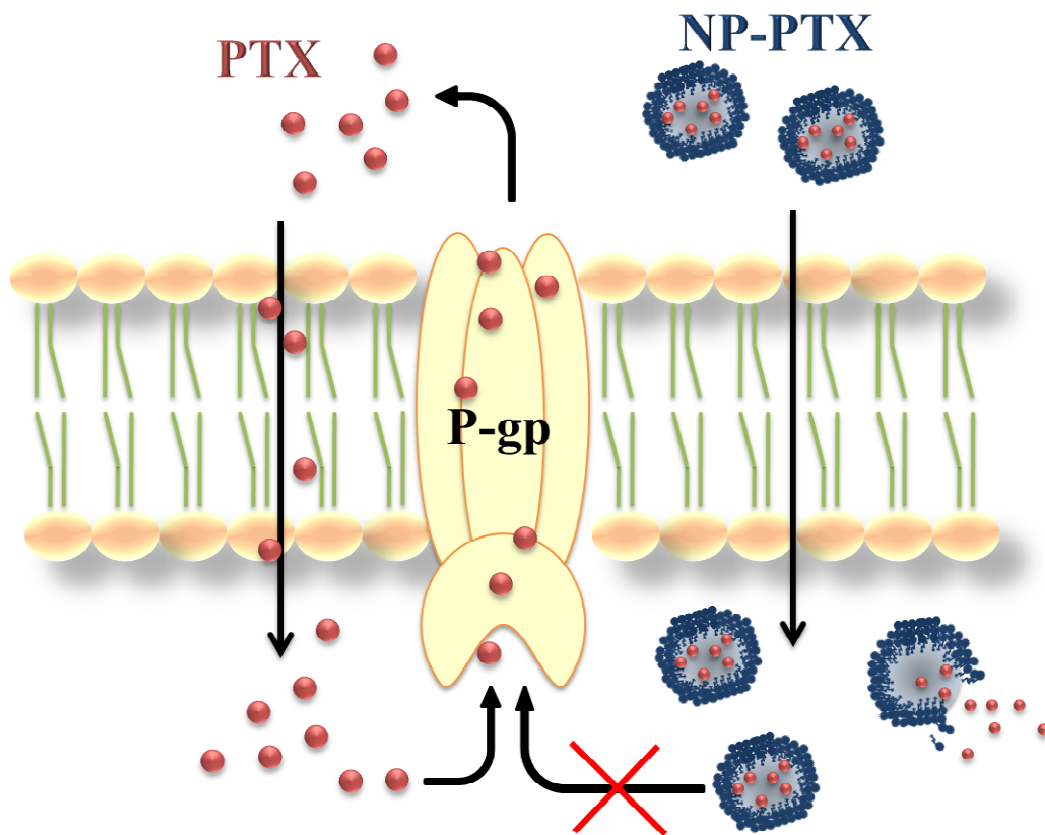


Figura 8. Mecanismo de resistencia a PTX mediante el transportador P-gp.

I.5. Nanopartículas en el tratamiento del cáncer

La nanotecnología puede definirse como la ciencia e ingeniería implicada en el diseño, síntesis, caracterización y aplicación de materiales y dispositivos cuya pequeñísima organización funcional en al menos una dimensión se encuentra en la escala nanométrica (la billonésima parte de un metro). Es una ciencia emergente que

INTRODUCCIÓN

mezcla la ingeniería, química, física, biología y medicina. Sus beneficios han sido probados en diversos campos como la descontaminación de aguas, tecnologías de la comunicación e información, desarrollo de materiales, agricultura, energía y ciencias de la salud (Sahoo y cols., 2007; Elersawi, 2010). En el campo de las ciencias de la salud, la nanotecnología está adquiriendo vital importancia en la detección, diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Y dentro de este campo, determinados productos derivados de la investigación nanotecnológica como son las nanopartículas (NPs) presentan utilidad para la liberación de fármacos, técnicas de imagen y para la superación de barreras biológicas. Estas NPs están formadas por diferentes materiales y presentan un tamaño de unos cientos de nanómetros. A nivel biológico son capaces de interaccionar a escala subcelular, pudiendo ejercer su actividad en tejidos o células específicos (Jabir y cols., 2012).

En la última década el auge de la nanotecnología ha permitido que el uso de NPs para el tratamiento de tumores esté siendo ampliamente estudiado. Mayoritariamente, se están usando las NPs para el transporte de fármacos, aunque también se está estudiando su aplicación para el tratamiento del cáncer a nivel de otras estrategias terapéuticas, como son la terapia génica o la hipertermia (Jabir y cols., 2012).

Los fármacos antitumorales presentan una serie de limitaciones que reducen su eficacia y producen toxicidad inespecífica que afecta a tejidos sanos del paciente. El principal objetivo de su incorporación en NPs se basa en producir una acumulación de fármaco en el tejido tumoral, evitando su diseminación por el resto del organismo (Brigger y cols., 2002). Para promover la eficacia en el tratamiento de los tumores, el uso de NPs como transportadores de fármacos antitumorales presenta un gran número de ventajas:

- En primer lugar, el uso de NPs proporciona protección al fármaco frente a la metabolización y excreción, ya que retrasa la acción que sobre el fármaco ejercen los mecanismos de detoxificación del paciente, lo que aumenta su tiempo de circulación y su biodisponibilidad, características ventajosas en el tratamiento antitumoral.

- En segundo lugar, aumentan su acumulación en el tejido tumoral gracias al efecto de permeabilidad retención aumentada (EPR), que será ampliado más adelante,

o a mecanismos de direccionamiento activo mediante la funcionalización de las NPs con moléculas que son específicamente reconocidas por las células tumorales (Wicki y cols., 2015).

- La capacidad de transportar moléculas poco hidrosolubles, que en muchos casos habían sido anteriormente abandonadas por este motivo, a pesar de poseer buenas propiedades antitumorales. Esto es posible gracias a las propiedades físico-químicas de algunas NPs que son capaces de solubilizar estos compuestos a altas concentraciones (Williams y cols., 2013).

- Otra ventaja de la incorporación de fármacos en NPs es la posibilidad de modificar la farmacocinética de los mismos, controlando así su liberación. Ejemplos de esta estrategia son hacer que la liberación del fármaco se produzca en determinadas condiciones de pH, temperatura, por la presencia de alguna molécula específica, o debido a estímulos externos (Wicki y cols., 2015).

- Capacidad de inhibir o escapar a los sistemas MDR, entre ellos a la P-gp, mediante mecanismos que aún están por esclarecer, pero que tendrían relación con el proceso de endocitosis, la alteración de la viscosidad de la membrana, o el agotamiento de las moléculas de ATP para evitar la actividad del transportador (Xiao y cols., 2011).

- Por último, la gran versatilidad que presentan estos sistemas posibilita la incorporación conjunta de varios agentes activos, consiguiendo así una sinergia entre estos agentes o la posibilidad de ejercer varios efectos diferentes al mismo tiempo, con todas las ventajas además que implicaría su transporte por medio de las NPs (Feng y Mumper, 2013).

I.5.1. Efecto permeabilidad y retención aumentadas

Una de las ventajas que presenta el uso combinado del fármaco con la NP es el llamado “efecto permeabilidad-retención aumentadas” (EPR) (Figura 9). Este es el principal mecanismo de direccionamiento pasivo de las NPs hacia el tumor. Se basa en las anomalías presentes en la neovascularización tumoral, las cuales se generan mediante el proceso de angiogénesis, y que tiene por objetivo aumentar el flujo de nutrientes hacia el tumor para permitir así su mantenimiento y rápida proliferación.

INTRODUCCIÓN

Entre estas anomalías circulatorias encontramos en primer lugar que los vasos sanguíneos poseen unos espacios entre las células endoteliales más anchos de lo normal (100- 600 nm frente a los 1-20nm que presenta el epitelio vascular normal), lo que favorece la extravasación de moléculas específicamente en estos espacios (Fourcade, 2008; Gullotti y Yeo, 2009). Además, el drenaje linfático se encuentra disminuido en el tejido tumoral, por lo que el tiempo de retención de sustancias (como por ejemplo las NPs) en estas zonas del tumor es mayor, promoviendo así que el fármaco sea liberado en el lugar de acción. Por último, la producción aumentada de mediadores vasculares como bradiquinina o el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) fomentan una mayor permeabilidad sanguínea en la zona.

Para que este fenómeno EPR sea efectivo en el direccionamiento pasivo de las NPs es necesario que éstas cumplan una serie de requisitos, como es el permanecer en circulación el mayor tiempo posible para permitir la mayor acumulación en el tumor. Para esto, es necesario que las NPs eviten su eliminación mediante el sistema retículo endotelial, lo que provocaría una disminución de la cantidad de las NPs circulantes y por tanto una menor concentración de NPs en el sitio tumoral. La modulación de las características fisicoquímicas de las NPs es fundamental en este aspecto, siendo más favorable un tamaño de NP situado entre 100 y 200 nm, y una carga superficial aniónica o neutral. El tamaño es importante, ya que tamaños mayores son captados por hígado y bazo, mientras que NPs de un menor tamaño o carga positiva son filtrados por el riñón y retirados de la circulación. La PEGilación en la síntesis de la NP también es otro proceso que favorece el escape de este sistema reticuloendotelial. Hablaremos en más profundidad de ello en el apartado "5.1.2.2. Incorporación de PEG" (Gullotti y Yeo, 2009; Ernsting y cols., 2013; Cabeza y cols., 2016).

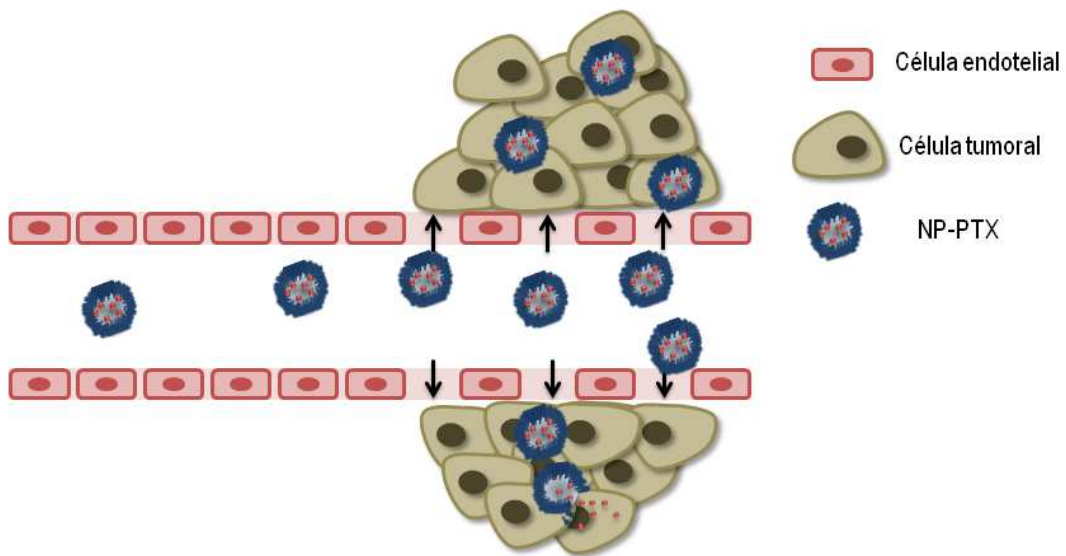


Figura 9. Imagen representativa del efecto permeabilidad-retención aumentadas que permite direccionar las NPs hacia el tejido tumoral

I.5.2. Funcionalización de las nanopartículas

Una de las grandes potencialidades de las NPs es que presentan una gran versatilidad a la hora de ser diseñadas, lo que le permite aportarles las características deseadas mediante lo que se conoce como “funcionalización”. La funcionalización puede deberse a las características fisicoquímicas de la formulación, a la presencia de un determinado componente o a la adición de moléculas con propiedades específicas en su superficie. En esta tesis doctoral las NPs utilizadas han sido funcionalizadas para incorporar determinadas características que aumenten su efectividad y reduzcan los efectos secundarios frente al fármaco sin encapsular.

I.5.2.1. Direccionamiento activo

El direccionamiento activo de las NPs es una de las estrategias más ampliamente utilizadas para incrementar la especificidad de la quimioterapia (Brown y cols., 2010). Como ya hemos dicho anteriormente, el direccionamiento de las NPs puede ocurrir de forma pasiva mediante el efecto EPR, pero esta especificidad puede fomentarse mediante la incorporación de ligandos específicos a la superficie de las NPs. Estas moléculas pueden ser anticuerpos monoclonales, aptámeros, polisacáridos, folatos o

INTRODUCCIÓN

peptidos, que aseguren la acumulación de los sistemas específicamente en las células tumorales. Para que esta técnica sea efectiva, el ligando debe reconocer a proteínas específicas presentes en las células tumorales pero con una baja expresión en las células sanas. También pueden estar presentes en un determinado tipo celular, y promover su interacción específicamente con esas células o incluso con una localización subcelular determinada. Un ejemplo es la expresión aumentada de marcadores en las CSCs, de la que ya hemos hablado anteriormente en el apartado I.3.2.

Para llevar a cabo este direccionamiento activo también pueden utilizarse materiales que respondan a estímulos como el pH, la temperatura (hipertermia), actividad enzimática, potencial redox, ultrasonido, luz o campos magnéticos o eléctricos (Singh y Lillard, 2009). De entre estos mecanismos uno de los más estudiados es la hipertermia, que se basa en la sensibilidad aumentada que presentan las células tumorales a los aumentos de temperatura respecto a las células normales (Huff y cols., 2007). Utilizando esta estrategia, se están desarrollando nuevas terapias basadas en la ablación fototérmica del tumor mediante el uso del láser de infrarrojo cercano. Sin embargo, el tejido tumoral absorbe muy poca luz de este tipo, por lo que es necesario aumentar la energía, lo que puede dañar también a las células sanas. Por tanto, el uso de NPs puede ayudar a focalizar la hipertermia e intensificarla en el tejido tumoral, provocando el mínimo daño a los tejidos sanos circundantes (Lu y cols., 2010).

I.5.2.1.1. Nanopartículas pH-dependientes

El uso de NPs pH-dependientes, es decir que liberan el compuesto encapsulado a un pH determinado, supone una gran ventaja en el tratamiento del cáncer. Esto es debido a que el medio extracelular en el tejido tumoral presenta un pH más ácido que el pH del resto de tejidos sanos, por la presencia del lactato, que es un metabolito anaeróbico de glucosa. Se ha observado que esta modulación del pH en los tumores favorece el crecimiento tumoral, la aparición de metástasis y angiogénesis, y está relacionada con la respuesta clínica a la quimioterapia y radioterapia, reduciendo la efectividad de los tratamientos (Leeper y cols., 1994; Kato y cols., 2013).

Las NPs sensibles al pH serían por tanto capaces de liberar el fármaco específicamente en el tejido tumoral en respuesta a ese estímulo, aumentando la concentración terapéutica del fármaco en el tumor y por tanto la eficacia del tratamiento, y a su vez reducirían los efectos secundarios del fármaco, ya que disminuye la concentración del mismo en los tejidos sanos al no liberar la NP su contenido al pH del tejido sano (Gao y cols., 2010). Diversos sistemas nanoparticulares ya han explotado esta habilidad para aumentar la especificidad del tratamiento antitumoral y mejorar su eficiencia, por ejemplo Lee y cols. (Lee y cols., 2007) desarrollaron micelas con un tipo de polihistidina que se ioniza a pH ácido, provocando la deformación del núcleo micelar y liberando el fármaco en este ambiente. También se han diseñado NPs de sílice cuyos poros están cubiertos de un material que lo protege y evita la salida del fármaco. Frente a determinados estímulos, como el pH ácido o una elevada concentración de glutatión, la cubierta se elimina liberando el fármaco en el tumor (Wang y cols., 2015).

I.5.2.2. Incorporación de PEG

El polietilenglicol (PEG) es un polímero hidrofílico que aplicado en la superficie de las NPs produce un impedimento estérico que evita su unión a proteínas de la sangre. Su aplicación con este fin comenzó en la década de los 70 cuando el profesor Frank F. Davis se interesó por la administración de proteínas no humanas con fines terapéuticos. Descubrió entonces que la unión de estas proteínas a un polímero hidrofílico disminuía su inmunogenicidad a la vez que aumentaba su tiempo de circulación en sangre, siendo el polímero más adecuado para esta aplicación el PEG (Davis, 2002).

Posteriormente, se ha extendido el uso de la pegilación al campo de la nanotecnología para conseguir que las NPs sean "invisibles" al sistema inmune, y la incorporación de PEG, o de sus derivados, como el oligoetilenglicol (OEG), a la superficie de las NPs es una estrategia de funcionalización ampliamente utilizada actualmente.

Durante el tránsito natural tras su administración, las NPs que se encuentran en sangre interactúan con las proteínas del suero responsables de la opsonización, es decir, se produce la unión de opsoninas a la superficie de las NPs. Esta interacción

INTRODUCCIÓN

provoca el posterior reconocimiento por parte de los macrófagos, que forman parte del sistema retículo endotelial, y son las células inmunitarias responsables de reaccionar frente a elementos “extraños” dando lugar a una respuesta inmunitaria. Los macrófagos son capaces de fagocitar las NPs, para proceder posteriormente a su eliminación, un proceso que se produce principalmente en hígado y bazo, y es un factor limitante en cuanto a que disminuye el tiempo de circulación del fármaco en el organismo.

El recubrimiento de las NPs con PEG previene su opsonización mediante un proceso de impedimento estérico, que evita el reconocimiento por parte del sistema retículo endotelial. Esta modulación tiene como consecuencia el aumento del tiempo de circulación de las NPs y su biodisponibilidad, por tanto, facilita que alcancemos una concentración terapéutica de fármaco en el tumor, aumentando la eficacia del tratamiento (Gullotti y Yeo, 2009; Park, 2010; Ernsting y cols., 2013).

Debido a las posibles ventajas que ofrece este proceso, diferentes tipos de NPs han sido funcionalizadas con PEG para aumentar su eficacia antitumoral. Es el caso de Martin-Banderas y cols. (Martin-Banderas y cols., 2015), que consiguieron aumentar el efecto antiproliferativo del D9-Tetrahidrocannabinol 1,4 veces en células tumorales de pulmón gracias a su incorporación en NPs de PLGA pegiladas, disminuyendo la IC_{50} de este fármaco de 61 μM a 42 μM , mientras que las NPs sin PEG apenas consiguieron una mejora del efecto. Otro ejemplo son las NPs sólidas lipídicas (SLNs) de monoestearina, que al ser modificadas con PEG en su superficie han conseguido aumentar la internalización de PTX en células de cáncer de pulmón desde la primera hora de incubación, y mejorar la IC_{50} del PTX pasando de 2,36 $\mu g/ml$ a 1,86 $\mu g/ml$. En este caso, sin embargo, no se consiguió mejorar la citotoxicidad producida por las NPs sin pegilar (Yuan y cols., 2008). Por otro lado, también se ha utilizado la pegilación como un proceso de estabilización de las NPs durante su síntesis química, promoviendo su estabilidad en almacenamiento durante un periodo de tiempo más largo (Lee y cols., 2007).

Sin embargo, a pesar de las ventajas que hemos visto, el uso del PEG puede afectar negativamente a la captación de las NPs por parte de las células, por lo que este proceso debería no ser permanente para que las NPs se deshagan de las moléculas de PEG al alcanzar su sitio de acción y puedan penetrar en las células

tumorales. Con este objetivo, existen diversos mecanismos para regular la pegilación, como de cambios en el pH o en la temperatura, pero también se puede aprovechar estos mecanismos de regulación como una oportunidad para incorporar a las NPs moléculas que son degradadas por enzimas sobreexpresadas en las células tumorales, y así incrementar la especificidad de estos sistemas. Es el caso de las metaloproteasas, que son enzimas de la matrix extracelular y que están sobreexpresadas en las células tumorales, y que según se ha visto están relacionadas con procesos de metástasis, invasión y angiogénesis. Aprovechando la presencia diferencial de estas proteínas en los tejidos tumorales, Zheng y cols. (Zheng y cols., 2014) incorporaron a sus SLNs con PTX moléculas de PEG que tenían la capacidad de separarse del resto de la NP mediante la actividad de estas metaloproteasas, facilitando de esta forma que la NP liberase su contenido en el tejido tumoral e incorporándose estos sistemas de NPs a las células que forman parte del tumor al perder el PEG que contenían. Sin embargo, al mantenerse las NPs pegiladas en contacto con el resto de células sanas del organismo evitaría su entrada en ellas y por tanto la aparición de toxicidad inespecífica.

I.5.2.3. Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas (CD) son oligosacáridos, comúnmente utilizados como excipiente en formulaciones farmacéuticas comercializadas actualmente (Figura 10). A partir de estas moléculas se pueden sintetizar un tipo de NPs que tienen por un lado una cavidad lipófila en la que se incorporan los fármacos hidrófobos formando complejos de inclusión, mientras que su cubierta mantiene un comportamiento hidrófilo, lo que fomenta su solubilidad en medio acuoso (Messner y cols., 2010; Kurkov y Loftsson, 2013). Por estas propiedades, las NPs de CD se han usado para aumentar la solubilidad de fármacos poco hidrosolubles, como es el caso de dexametasona, piroxicam, indometacina, itraconazol o PTX, entre otros. Bilensoy y cols. (Bilensoy y cols., 2008) incorporaron PTX en NPs que presentaban β -CD en su síntesis y consiguieron aumentar su estabilidad, biocompatibilidad y actividad antitumoral en células tumorales de mama, en comparación con la forma farmacéutica de PTX comúnmente usada.

Existen estudios de combinación de CD con otros tipos de NPs mediante la formación de complejos terciarios. Es el caso de las SLNs conjugadas con 2-

INTRODUCCIÓN

hidroxipropil- β -CD, que aumentaron la internalización de PTX en células resistentes de cáncer de mama (MCF-7/ADR), mejorando la muerte celular tanto en la línea resistente como en la no resistente (Baek y Cho, 2013).

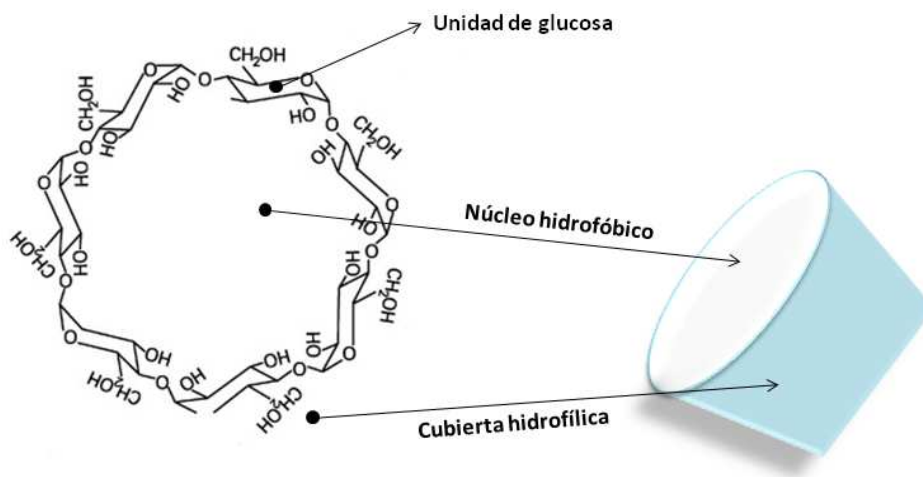


Figura 10. Representación de la estructura de las CDs.

I.5.2.4. Macelignano

El macelignano (MAC) es un lignano natural que se extrae de la cobertura carnosa que rodea la semilla de la nuez moscada procedente del árbol *Myristica fragrans*, comúnmente llamado el árbol de la nuez moscada. Este compuesto ha demostrado su implicación en la inhibición de la P-gp y del citocromo P450 (CYP450), moléculas que están implicadas en el fenotipo MDR de los tumores resistentes a la quimioterapia (Im y cols., 2009; Paul y cols., 2013). La administración conjunta del PTX y MAC ha sido estudiada por Qiang y cols. (Qiang y cols., 2010), demostrando una mayor internalización de fármaco en células de adenocarcinoma ovárico con sobreexpresión de P-gp (Adriamicina resistente) de hasta 1,7 veces, mientras que en la línea celular original, la OVCAR-8, esta incorporación no se vio alterada por la presencia de MAC.

Sin embargo, a pesar de los interesantes resultados previos del MAC como inhibidor de la P-gp, hasta el momento no se han estudiado los efectos que puede tener la incorporación de este compuesto en NPs, por lo que en esta tesis doctoral se

muestra el primer trabajo en el que se analiza la actividad antitumoral de NPs unidas a MAC.

I.5.3. Tipos de nanopartículas

Existe una amplia variedad de NPs que se están estudiando actualmente para el transporte de fármacos antitumorales, como son los liposomas, las NPs lipídicas, las NPs de oro, los nanodiamantes, las NPs magnéticas, los nanotubos de carbono, los quantum dots, las NPs poliméricas, los dendrímeros, o las NPs basadas en virus, entre otras (Figura 11).

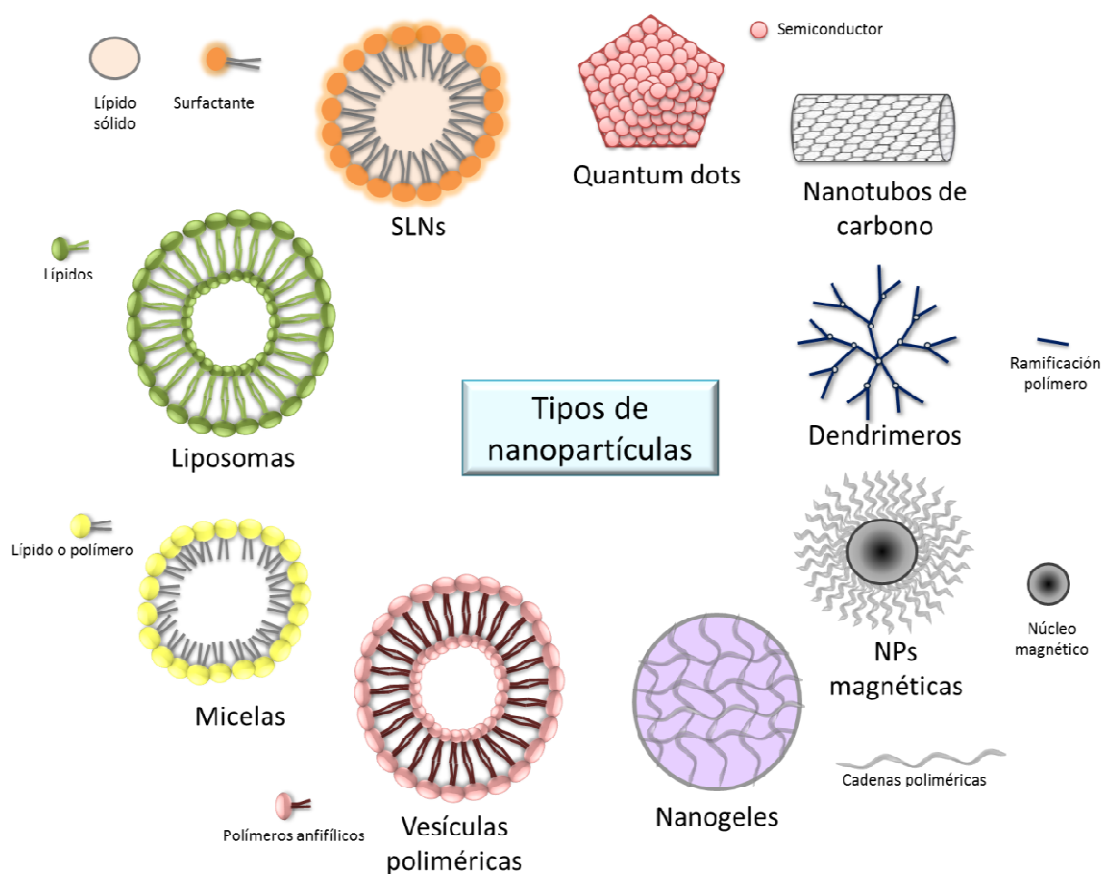


Figura 11. Imagen representativa de diferentes tipos de NPs utilizadas para el transporte de fármacos

De entre todo este abanico de nanoplataformas, para llevar a cabo este trabajo de tesis doctoral nos hemos centrado, concretamente, en el uso de dos tipos diferentes de NPs: NPs poliméricas huecas y NPs sólidas lipídicas (SLNs).

INTRODUCCIÓN

I.5.3.1. Micelas poliméricas

Se trata de NPs poliméricas sintetizadas mediante el autoensamblaje de polímeros anfifílicos, y se compone de una estructura formada por un núcleo hidrófobo y una cubierta hidrófila. Se han utilizado para el transporte no solo de fármacos, sino también de genes y nutraceuticos, y presentan propiedades ventajosas como el incremento de la solubilidad, permeabilidad y biodisponibilidad, la reducción de la dosis de fármaco administradas, y de los efectos adversos (Thipparaboina y cols., 2015).

Recientemente, micelas de monometoxipolietilenglicol-PCL han demostrado una buena eficiencia de encapsulación del fármaco quercetín, una molécula hidrófoba con propiedades antiinflamatorias y antioxidantes utilizada para el tratamiento del cáncer de colon. En este estudio, ratones con un tumor de colon producido mediante la inoculación de células CT26 fueron tratados con estas micelas, presentando una mayor inhibición del tumor y de la angiogénesis que el fármaco libre (Xu y cols., 2015). Oxaliplatino también ha sido incorporado en micelas poliméricas, en este caso complejadas con un metal. Los resultados obtenidos a partir de los ensayos *in vitro* no mostraron un aumento de la citotoxicidad con estos sistemas, pero sí que fueron prometedores los resultados de inhibición del tumor *in vivo*. Sin embargo, lo más llamativo fue que los ratones tratados con estas micelas no desarrollaron la hipersensibilidad aguda al frío que es habitual en el tratamiento con oxaliplatino (Ueno y cols., 2014).

En otros casos, las micelas poliméricas se han usado para el transporte conjunto de dos fármacos, alojados en diferentes compartimentos de la partícula, con el fin de lograr una sinergia en el efecto antitumoral. Scarano y cols. (Scarano y cols., 2015) desarrollaron micelas de un tamaño aproximado de 38 nm, compuestas de PCL y PEG, para el transporte de oxoplatino y curcumina. Se demostró el efecto sinérgico con la incorporación conjunta de estos dos fármacos en la misma NP, en células humanas de cáncer de ovario A2780. Este efecto era mayor que el obtenido por las micelas con uno de los fármacos solamente, la combinación de ambos fármacos en solución, o incluso frente al tratamiento combinado con dos micelas, cada una de ellas transportando uno de estos dos fármacos.

I.5.3.2. Liposomas

Los liposomas son vesículas esféricas formada por al menos una bicapa lipídica similar a la membrana celular, con un núcleo y la superficie de naturaleza hidrosoluble, mientras que el interior de la membrana es lipófilo. Por tanto, se trata de sistemas anfifílicos con capacidad para incorporar tanto moléculas hidrosolubles como liposolubles.

Su principal ventaja frente a las micelas (con solo una capa lipídica) consiste en su mayor espacio y posibilidades para la incorporación de moléculas. Además, presentan un gran interés por su habilidad para reducir la toxicidad de los fármacos y sus efectos adversos, incrementar su tiempo de acción mediante una aumentada vida media, y controlar su liberación (Bozzuto y Molinari, 2015). Otra ventaja de este tipo de NPs es su elevada biocompatibilidad, lo que hace que sea uno de los sistemas de liberación de fármacos más estudiados. También aumentan la solubilidad de los fármacos poco solubles en medio acuoso, como el PTX. Por ejemplo, Hong y cols. (Hong y cols., 2015) incorporaron PTX en liposomas de fosfatidilcolina y estudiaron su efecto frente a células tumorales de pulmón H460 y mama MCF-7/ADR, y los resultados mostraron una disminución del efecto del PTX libre de hasta 10 veces.

Aparte de PTX, muchos otros fármacos antitumorales han sido encapsulados por liposomas, como son la doxorubicina, oxiplatino, cisplatino, irinotecán, daunorrubicina, citarabina o vincristina (Prados y cols., 2016). Además, no solo se han llevado a cabo múltiples ensayos *in vitro* e *in vivo* con estos sistemas, sino que además muchas formulaciones se encuentran en fases avanzadas de ensayos clínicos, o incluso han sido aprobadas para su uso clínico, como los liposomas pegilados con doxorubicina (Doxil®/Caelyx®), liposomas no pegilados con doxorubicina (Myocet®), liposomas con daunorubicin (DaunoXome®) y liposomas con citarabina (DepoCyte®) (Slingerland y cols., 2012).

Por otro lado, los liposomas pueden ser funcionalizados para mejorar sus características fisicoquímicas e incrementar el éxito del tratamiento. Un ejemplo es el desarrollo de liposomas pH-sensibles, cuya bicapa lipídica se desestabiliza mediante la protonación, lo que promueve la liberación del fármaco en ambientes ácidos como puede ser el tejido tumoral, o tras ser internalizados por los endosomas-lisosomas

INTRODUCCIÓN

(pH= 5,5) (Banerjee y cols., 2012). Otra estrategia desarrollada por estos sistemas consiste en la liberación del fármaco mediante mecanismos de hipertermia. Clares y cols. (Clares y cols., 2013) sintetizaron magnetoliposomas, es decir, liposomas que contenían un núcleo magnético, que promovían la liberación del 5-FU a elevadas temperaturas. Además, estas NPs eran direccionadas magnéticamente al tejido tumoral mediante el uso de un imán. Su administración en células humanas de fibroblasto de colon CCD-18 y células tumorales de colon T84 no produjo ningún tipo de citotoxicidad, ni se observó hemólisis en contacto con sangre, lo que probó la elevada biocompatibilidad de estos liposomas.

I.5.3.3. Polimersomas o vesículas poliméricas

Los polimersomas son vesículas poliméricas, ensambladas mediante copolímeros sintéticos en bloque, y cuya estructura en bicapa es muy similar a la de los liposomas. Debido al carácter anfifílico de los copolímeros, estas NPs sirven para el transporte de moléculas tanto hidrosolubles como liposolubles, pero además, poseen una elevada estabilidad coloidal, buena biocompatibilidad, tiempos prolongados en circulación sanguínea, y propiedades de membrana fácilmente modificables.

En los últimos años estos sistemas se han utilizado para la liberación de agentes terapéuticos y como herramienta de diagnóstico no invasivo por imagen (Guan y cols., 2015; Prados y cols., 2016). Zhu y cols.(Zhu y cols., 2015) han desarrollado polimersomas biodegradables de combretastatin A4 fostato y doxorubicina para inhibir tanto la angiogénesis como la proliferación celular. Los resultados de citotoxicidad en células humanas de carcinoma epidérmico nasofaríngeo (KB) mostraron una importante sinergia. Además, ensayos *in vivo* con ratones inmunodeprimidos a los que se les había inducido un tumor revelaron una reducción significativa del volumen y la vasculatura tumoral.

Por otro lado, se han sintetizado polimersomas que responden a variaciones de pH, como es el caso de Lale y cols. (Lale y cols., 2015), que han desarrollado polimersomas de PEG-PLA con doxorubicina, funcionalizados con ácido fólico y trastuzumab. Estas NPs presentaron un 90% de liberación del fármaco a pH=5, mientras que a pH neutro la liberación era tan solo de un 20%. Además, se vio un aumento en el porcentaje de células apoptóticas, y de internalización celular en las

líneas de cáncer de mama MCF7 y BT474. Por otro lado, los ensayos *in vivo* mostraron una mejora del efecto de en torno al 50% con estas vesículas poliméricas frente a la doxorrubicina libre tras 72 horas de tratamiento, en ratones suizos albinos inoculados con un carcinoma de Ehrlich (Kumar y cols., 2015). Otros polimersomas, en este caso de poliéster y PEG, han incorporado PTX y doxorrubicina para el tratamiento del cáncer de mama. Ensayos *in vivo* en ratones inoculados con las células tumorales humanas de mama MDAMB231 mostraron una importante reducción del volumen tumoral, así como un incremento de la dosis máxima tolerada, en comparación con la administración de los fármacos en solución (Ahmed y cols., 2006). Todos estos estudios muestran el alto potencial de estos sistemas para la mejora del tratamiento antitumoral.

I.5.3.4. Dendrímeros

Los dendrímeros son macromoléculas poliméricas compuestas de ramificaciones repetitivas con un patrón geométrico de numerosos brazos que se extienden desde el núcleo. Estas NPs han sido diseñadas para incrementar la eficacia de los fármacos antitumorales, dirigiendo el fármaco hacia el tejido tumoral, o evitando los mecanismos de MDR mediante P-gp. Otra de sus ventajas consiste en la presencia de un gran número de brazos terminales para el ensamblaje de moléculas como fármacos o anticuerpos, así como su buena biocompatibilidad, baja inmunogenicidad y facilidad de ser funcionalizados (Jabir y cols., 2012).

La doxorrubicina se ha conjugado con dendrímeros pegilados mediante enlaces hidrazona, que presentan una rotura dependiente de pH, liberándose el fármaco rápidamente al alcanzar el medio un pH de 5,0. Además, estos dendrímeros fueron direccionados hacia las células de cáncer de hígado HepG2 mediante restos de galactosa, mostrando un alta captación celular, una disminución de la IC₅₀ y especificidad por el tejido tumoral (She y cols., 2015). Se han sintetizado también dendrímeros de poliamidoamina para el transporte de cisplatino, mediante una doble funcionalización: liberación pH-dependiente y direccionamiento activo mediante herceptin. Estos sistemas se probaron en diferentes células humanas de cáncer de ovario SKOV-3 que sobreexpresaban o no el receptor HER-2, y mostraron una importante mejora del efecto en las células HER-2 positivas, lo que demostró la

INTRODUCCIÓN

selectividad de estas NPs. Así mismo, se demostró la eficacia de estos dendrímeros en ensayos in vivo mediante su administración a ratones inmunodeprimidos inoculados con SKOV-3, que experimentaron una mayor regresión del tumor que con el fármaco libre. Estos resultados probaron la eficacia de HER-2 como mecanismo de direccionamiento activo, debido a la acumulación del fármaco preferentemente en el tumor (Kesavan y cols., 2015).

I.5.3.5. Nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono son cilindros huecos de tamaño nanométrico sintetizados a partir de carbono en una construcción hexagonal, que puede presentar una estructura con una sola capa o con múltiples capas.

Se usan frecuentemente en la detección del cáncer mediante dos mecanismos diferentes: como un electrodo en una reacción electroquímica de oxidación-reducción, o como un transistor de efecto de campo capaz de detectar cambios en la carga de superficie. En el primer caso, el proceso es más específico, ya que el antígeno es reconocido de forma dual, mientras que en el segundo caso se requiere solamente un anticuerpo para emitir la señal (Kierny y cols., 2012). Los nanotubos de carbono se han utilizado para la detección del cáncer de próstata o del cáncer de cabeza y cuello de células escamosas, entre otros (Malhotra y cols., 2010; Lerner y cols., 2012).

En cuanto a la terapia antitumoral, los nanotubos de carbono presentan numerosas propiedades, como una mejora de la internalización celular, o alta eficacia de incorporación de fármaco (Melita y cols., 2015). Además, se han asociado a múltiples fármacos antitumorales, como doxorubicina (Anbarasan y cols., 2015), docetaxel (Arora y cols., 2014), oxaliplatino (Wu y cols., 2013) o PTX (Naderi y cols., 2015), mejorando el efecto de los fármacos en solución en todos los casos.

Otro ejemplo de nanotubos de carbono multicapa con PEG ha mejorado la solubilidad de oxiplatino, manteniendo una liberación sostenida del fármaco, lo que propició un aumento de la muerte celular en células de adenocarcinoma de colon HT-29 (Wu y cols., 2013). Esto se consiguió mediante la pegilación, que retardó la liberación del oxiplatino, a la vez que mejoró su biodisponibilidad. La funcionalización de los nanotubos de carbono también ha llevado a una mejora del efecto del fármaco y un aumento de la especificidad del tratamiento. Naderi y cols. (Naderi y cols., 2015)

sintetizaron nanotubos de carbono monocapa que incorporaron PTX, y se asociaron a Tn218, un anticuerpo frente a antígenos que se encuentran en las células sanguíneas neoplásicas, esenciales en la invasión y metástasis de las células tumorales. La citotoxicidad de estos sistemas sobre células tumorales de colon HT-29 y mama MCF7 no mostró diferencias significativas respecto al PTX libre, aunque queda por estudiar la posibilidades de direccionamiento activo de estos sistemas en futuros ensayos *in vivo*.

I.5.3.6. Nanogeles

Los nanogeles son nanopartículas de gel con un tamaño menor de 200 nm, sintetizadas a partir de una red de cadenas de polímeros tridimensionales entrelazados. Entre esa red polimérica hay poros donde el fármaco queda atrapado y protegido de la degradación. Además de fármacos, estas NPs también pueden incorporar oligonucleótidos o moléculas para imagen, y su liberación depende de la interacción de la estructura del nanogel con el fármaco, que puede ser dependiente de algún tipo de estímulo (Yallapu y cols., 2011).

Un ejemplo son los nanogeles que responden a variaciones de pH, como los de quitosano y carboximetilo, desarrollados para la administración de doxorubicina mediante vía oral, lo que supone una gran ventaja en su aplicación (Feng y cols., 2013; Feng y cols., 2015). En este caso, la liberación del fármaco se producía a pH neutro equivalente al pH intestinal en un 38,2%, frente al 12,6% liberado a pH ácido. Los ensayos *in vivo* corroboraron que la absorción del fármaco se producía principalmente en el intestino delgado, lo que demostró que estos sistemas son adecuados para la administración oral de fármacos. Ashwanikumar y cols. (Ashwanikumar y cols., 2012) también desarrollaron nanogeles pH-dependientes de copolímeros de ácido metacrílico y 2-etilhexil acrilato para la liberación de 5-FU. Estas NPs mejoraron la citotoxicidad del fármaco libre en células HCT-116 de adenocarcinoma de colon, con una inhibición del 56,27% a las 48 horas, lo que supone dos veces el efecto del fármaco libre. Estos resultados sugieren que los nanogeles se acumulan en el ambiente tumoral, liberando allí el fármaco y llevando a cabo el proceso de muerte celular y apoptosis.

Por otro lado, los nanogeles pueden presentar también un comportamiento dependiente de la temperatura, mediante un cambio en las fases del gel cuando la

INTRODUCCIÓN

temperatura aumenta. Es el caso de los nanogeles de p(N-isopropilacrilamida-co-butil methilacrilato), diseñados para la terapia de quimioembolización transarterial y la liberación de doxorubicina en cáncer de hígado. La quimioembolización transarterial consiste en el bloqueo del vaso sanguíneo tumoral, causando la necrosis, y la posterior liberación del agente quimioterápico en el sitio de acción. Para ello, es necesario que el sistema posea un mecanismo de liberación sostenida del fármaco y una buena biocompatibilidad. La biocompatibilidad de estos sistemas fue demostrada en arterias renales de conejos normales, aumentando el efecto embólico y la regresión del crecimiento tumoral en comparación con la doxorubicina libre (Qian y cols., 2015).

I.5.3.7. Quantum dots

Los quantum dots son nanocristales fluorescentes de un tamaño entre 1 y 20 nm, compuestos por elementos semiconductores inorgánicos. Presentan mejores propiedades ópticas que los colorantes tradicionales, como una vida media de la fluorescencia mas larga, un pico de emisión más estrecho, mayor intensidad de fluorescencia, mayor fotoestabilidad, fotoluminiscencia cambiante mediante variaciones en el tamaño de partícula, y una mayor resistencia a la decoloración y degradación. Estos sistemas pueden modificarse mediante polímeros de carácter anfifílico para mejorar su solubilidad y funcionalidad, facilitando la conjugación de ARNs silenciadores, fármacos y anticuerpos. Por todo ello, los quantum dots son herramientas muy prometedoras para la detección de biomarcadores, el tratamiento de diferentes tipos de tumores, el diagnóstico mediante imagen y la monitorización de técnicas *in vivo* (Mashinchian y cols., 2014; Wang y cols., 2015).

Sin embargo, el potencial de los quantum dots no solo se aprecia en las técnicas de imagen, sino también como sistema de liberación de fármacos. Chen y cols. (Chen y cols., 2015) desarrollaron un tipo de quantum dots de grafeno cubierto de PEG, y unido covalentemente al péptido TAT de señalización nuclear. Los resultados de citotoxicidad en células de cancer de ovario HeLa tras la administración de estas NPs cargadas con doxorubicina, mostraron una mejora de la eficacia antitumoral de un 40% frente al fármaco libre. Además, se monitorizó la incorporación del fármaco a tiempo real mediante el uso de estos sistemas con un método llamado transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET). Por tanto, los quantum dots son unas NPs

de especial interés tanto para el diagnóstico del cáncer mediante técnicas e imagen, como para la liberación de fármacos.

I.5.3.8. Nanopartículas magnéticas

Las NPs magnéticas se sintetizan a partir de un elemento metálico, como puede ser el hierro, cobalto o níquel. Las más ampliamente estudiadas dentro de este grupo son las NPs superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONs), debido a que poseen un gran número de propiedades para su uso en terapia fototérmica, resonancia magnética o como agente de contraste en diagnóstico por imagen, como son una buena biocompatibilidad, biodegradabilidad y compartimiento superparamagnético. Así mismo, presentan una buena capacidad para modificar su superficie mediante anticuerpos u otros elementos que permitan su direccionamiento activo (Gobbo y cols., 2015; Santhosh y cols., 2015).

Las SPIONs se componen de un núcleo de hierro que puede ser recubierto con lípidos, polisacáridos o polímeros para conferirles estabilidad. Actualmente, un gran número de SPIONs han sido estudiadas como agentes de contraste en resonancia magnética nuclear (Tietze y cols., 2015). Pero además, estas NPs pueden diseñarse para realizar múltiples funciones, lo que se llama "NPs terapéuticas" (Gobbo y cols., 2015). Por ejemplo, Maeng y cols. (Maeng y cols., 2010) desarrollaron un tipo de SPIONs cargado con doxorubicina con una gran sensibilidad como agente de contraste en resonancia magnética nuclear. Al mismo tiempo, ensayos *in vivo* con ratas y conejos a los que se les había inducido un tumor de hígado, que fueron tratados con estos sistemas, mostraron un descenso significativo del volumen tumoral en comparación con el fármaco libre. En otro caso, Smejkalová y cols. (Smejkalova y cols., 2014) diseñaron unas SPIONs cargadas con micelas poliméricas de ácido hialurónico (HA), con una citotoxicidad selectiva por células humanas de cáncer de colon HT-29 en un cocultivo con otras células humanas de fibroblasto dérmico. Además, los ensayos *in vivo* con ratas inoculadas con un glioblastoma confirmaron la acumulación de las SPIONs en el tejido tumoral mediante imágenes de resonancia magnética en las que se usaba estos sistemas como agente de contraste.

INTRODUCCIÓN

I.5.3.9. Nanopartículas poliméricas

Las NPs poliméricas se basan en la agregación o autoensamblaje de polímeros de determinadas sustancias, mediante un proceso de separación de fases, generando NPs con un tamaño que va desde unos 100 nm hasta unos pocos micrómetros (Figura 12). Las NPs poliméricas presentan una gran variedad, y su uso para el transporte de fármacos está muy extendido. Pueden estar formadas por conjugados de polímeros con moléculas pequeñas o proteínas, vesículas, esferas o geles, micelas o dendrímeros, entre otros (Tong y Cheng, 2007).

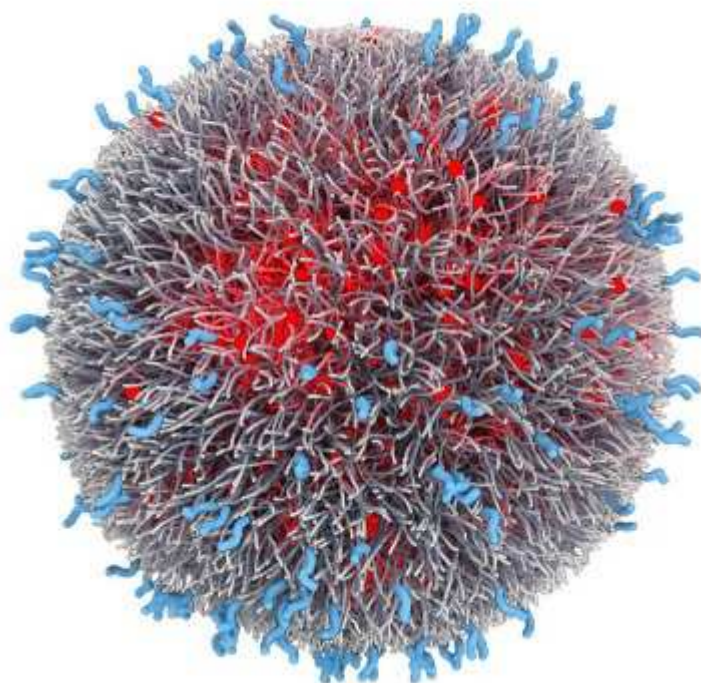


Figura 12. Imagen representativa de una NP polimérica: en gris aparece la capa externa formada por un polímero, en rojo el fármaco encapsulado, y en azul moléculas superficiales para el direccionamiento activo de las NPs. Derechos de imagen: Bind Therapeutics.

Existe una amplia variedad de polímeros que se han utilizado para el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos, como PEG, poli- ϵ -caprolactona (PCL), ácido poliláctico (PLA), ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), polimetacrilato (PMA) y pluronic, entre otros muchos. Para este fin, adquiere especial importancia que estos polímeros sean biodegradables, cuyos metabolitos no presentan toxicidad en el

paciente y que sean lo suficientemente pequeños para ser eliminados naturalmente, lo cual los convierte en candidatos ideales para su uso clínico (Liechty y cols., 2010). Además, algunos de los polímeros usados en la síntesis de NPs poliméricas son capaces de responder a cambios en las condiciones ambientales, como la temperatura o el pH, sufriendo modificaciones químicas o físicas que cambian su conformación y permiten controlar la liberación de su contenido. Estos polímeros se utilizan para la síntesis de NPs pH-dependientes, que suponen una gran ventaja en los tratamientos contra el cáncer, ya que aportan cierta especificidad por el microambiente tumoral (ver sección "5.1.2.1. Nanopartículas pH-dependientes" para profundizar sobre este mecanismo).

Por otro lado, las NPs huecas son otro subtipo dentro de este grupo que despiertan un gran interés. Esto es debido a que tienen una buena capacidad para encapsular un amplio rango de moléculas diferentes, y además permiten una elevada carga de fármaco en su interior, algo que es muy útil para compuestos con baja solubilidad (Kozlovskaya y cols., 2006).

Para realizar el trabajo que se expone en esta tesis doctoral se ha incorporado PTX en **NPs poliméricas de poli(4-vinilpiridina) huecas (hollow-p4VP)**, el cual es un polímero biocompatible, biodegradable y con propiedades pH-sensibles. Este polímero no se ha utilizado hasta el momento, para la elaboración de NPs que incorporen fármacos antitumorales, por lo que las hollow-p4VP son relativamente novedosas en su síntesis. Recientemente, han sido sintetizadas NPs fosforescentes de p4VP, con potencial para ser utilizadas en el diagnóstico por imagen y el tratamiento mediante terapia fotodinámica del cáncer, comprobándose su biocompatibilidad y su capacidad para ser internalizadas por células de cáncer cérvico-uterino humanas (HeLa) (Lu y cols., 2014). Sin embargo, su principal aplicación hasta el momento se debe a su capacidad antibacteriana, ya que estas NPs son capaces de actuar mediante la interacción de la carga positiva de este polímero con la carga negativa de la pared bacteriana, desestabilizando la misma y provocando la muerte celular. Este comportamiento se ha visto además potenciado al incorporar en estas NPs algunos metales, como la plata, o mediante modificaciones químicas como la adición de grupos finales $-NH_2$ o $-OH$ (Ozay y cols., 2010; Silan y cols., 2012; Sahiner y Yasar, 2013).

INTRODUCCIÓN

I.5.3.10. Nanopartículas sólidas lipídicas

Las SLNs son sistemas nanoparticulares compuestos por una matriz de lípidos que son sólidos a temperatura ambiente y corporal, y que está estabilizada mediante una serie de surfactantes. Presentan múltiples ventajas, como por ejemplo buena estabilidad física (que incrementa la protección de los fármacos lábiles), permiten una liberación controlada, el direccionamiento activo y la utilización de varias vías de administración (no solo la intravenosa). Además, son bien toleradas por el organismo, el coste de los materiales es bajo y muestran una gran versatilidad, lo que le permite poder combinarla con un amplio espectro de moléculas durante sus síntesis. Las SLNs se han presentado como una alternativa a los liposomas (otro tipo de formulación lipídica que tiene la misma estructura que la membrana celular) y a las NPs poliméricas, ya que solventan algunos de sus inconvenientes. Si las comparamos con los liposomas, las SLNs presentan una mayor estabilidad física, impiden el escape de fármaco de los sistemas nanoparticulares, tienen más especificidad por el tumor, más posibilidades de modulación y no son eliminados específicamente por el sistema reticuloendotelial. Las ventajas de las SLNs frente a las NPs poliméricas se centran en que tienen una menor toxicidad que los polímeros y permiten una mayor producción a gran escala (Wissing y cols., 2004; Cirri y cols., 2012; Jabir y cols., 2012).

La buena biocompatibilidad de las SLNs, mucho mayor que otras NPs como las NPs poliméricas o las NPs magnéticas, depende de la naturaleza de las SLNs y de la cantidad utilizada de los diferentes componentes que la conforman. Los lípidos utilizados para la síntesis de las SLNs pueden ser triglicéridos (como la tripalmitina o triestearina), monoalcilgliceroles (como la monoestearina), ácidos grasos (como el ácido esteárico), esteroides (como el colesterol) y ceras (como el palmitato de cetilo). Pero además de estos elementos, es necesaria la presencia de surfactantes para estabilizar la formulación, que pueden ser polímeros, lecitinas, polisorbatos y monoglicéridos polioxietilenados, los cuales pueden aportar toxicidad a la NP. (Pizzol y cols., 2014) Un ejemplo de la influencia del surfactante en la toxicidad de la formulación son las SLNs que usan dodecilsulfato sódico, que han demostrado ser más tóxicas que las SLNs sintetizadas con otros surfactantes diferentes (Silva y cols., 2012). También las SLNs formuladas con ácido esteárico han presentado una mayor toxicidad

que las que contenían otros lípidos como tripalmitina o monoestearina (Pizzol y cols., 2014). El tamaño de las NPs, su forma o el estado físico del núcleo sólido lipídico también podrían estar relacionados con este fenómeno. Para estudiar *in vitro* la biocompatibilidad de las SLNs blancas o sin carga, se utilizan técnicas como ensayos de citotoxicidad, estudios de la función mitocondrial, del ciclo celular, o técnicas de análisis de la generación de especies reactivas de oxígeno. Asimismo, el análisis de la hemólisis de los eritrocitos o glóbulos rojos (GR) procedentes de sangre humana está alcanzando cada vez más importancia como técnica de estudio de la biocompatibilidad de las NPs, especialmente debido a que las SLNs se están usando cada vez más para la administración intravenosa de compuestos. Más allá de ser un método de chequeo de la toxicidad de las NPs, el estudio de la hemólisis nos permite también estimar el daño que estas SLNs pueden causar en la membranas tras su administración *in vivo* (Silva y cols., 2012; Pizzol y cols., 2014).

A pesar de todas las ventajas que presentan las SLNs, estas NPs también presentan una serie de limitaciones. Entre los inconvenientes de las SLNs está la limitada capacidad de carga de fármaco, que depende en gran medida de la estructura del lípido utilizado y su estado polimórfico (cuanto más imperfecciones tenga el cristal que forma el lípido al solidificar mayor será la carga de fármaco). Este hecho no solo limita la carga inicial del fármaco, sino que también puede provocar un escape de fármaco si se produce la transición polimórfica al estado más ordenado durante el almacenamiento. Otro inconveniente es el alto contenido en agua de las dispersiones (70%- 99,9%) (Wissing y cols., 2004; Cirri y cols., 2012; Jabir y cols., 2012).

Las SLNs utilizadas para este trabajo de tesis doctoral son **SLNs formadas a partir del gliceril tripalmitato (Tripalm-NPs)**, también llamado tripalmitina, que es un triglicérido sólido a temperatura ambiente. Estas SLNs han sido estudiadas ampliamente para la liberación de varios fármacos antitumorales, como es el caso de 5-fluorouracilo (5-FU), mediante sistemas de tipo aerosol para tratar el cáncer de pulmón (Hitzman y cols., 2006), el citrato de tamoxifeno (Reddy y cols., 2006) y la curcumina (Ucisik y cols., 2013). Otro fármaco incorporado en SLNs de tripalmitina es el sorafenib, que consiguió aumentar su actividad antitumoral frente a células de hepatocarcinoma en comparación con el fármaco libre (Bondi y cols., 2015).

INTRODUCCIÓN

I.5.4. **Nanopartículas con paclitaxel**

Como hemos visto anteriormente, el PTX, a pesar de su eficacia antitumoral, presenta múltiples inconvenientes en su administración a los pacientes con cáncer. En este contexto, se ha demostrado que la incorporación del PTX en NPs mejora sus propiedades fisicoquímicas a nivel de la solubilidad, aumentando su eficacia y disminuyendo su toxicidad (Surapaneni y cols., 2012; Feng y Mumper, 2013). Las ventajas que esto conlleva, se deben a diferentes factores.

En primer lugar, el uso de NPs permite la solubilización de PTX sin necesidad de utilizar disolventes tóxicos como el Cremophor® EL, principal responsable de la toxicidad aguda provocada en los pacientes por el tratamiento con este fármaco, sustituyéndolos por componentes biocompatibles que permiten obtener formulaciones acuosas que disminuyen el tiempo necesario para la perfusión del medicamento en el paciente, debido a una mayor concentración del fármaco en la solución. Además, formulaciones como el Genexol han conseguido solubilizar hasta ~1,7 veces más PTX que el Taxol, llegando a concentraciones de hasta 10 mg/ml (Williams y cols., 2013). Por otro lado, el PTX presenta una corta vida media que se ve aumentada con su incorporación en las NPs, ya que estos sistemas proporcionan protección al fármaco permitiendo que se mantengan durante mayor tiempo en el torrente sanguíneo y que escapen del proceso de claramiento renal y hepático y del sistema retículo endotelial.

I.5.4.1. Nanopartículas poliméricas con paclitaxel

En la última década se han venido utilizando varias NPs poliméricas para el transporte del PTX. El polímero más usado es el PLGA, debido a su alta biocompatibilidad. Autores como Sun y cols. (Sun y cols., 2014) han desarrollado NPs de PLGA estabilizadas mediante vitamina E + alfatocoferol-polietilenglicol 100-succinato (TPGS), que presentaron buena encapsulación del fármaco (> 80%), y un potenciamiento del efecto antitumoral del PTX en modelos de cáncer de pulmón. Otros autores, mediante NPs de PLGA con PTX también han presentado buenos resultados en el tratamiento del cáncer de mama o de pulmón (Fonseca y cols., 2002; Jin y cols., 2009; Yu y cols., 2016). Fonseca y cols. (Fonseca y cols., 2002) compararon el

efecto de NPs de PLGA-PTX con el de su formulación comercial en células NCI-H69 de SCLC, demostrando que gran parte de la citotoxicidad producida por el PTX se debía a la toxicidad del Cremophor® EL, mientras que las NPs PLGA-PTX consiguieron una disminución de la viabilidad celular de un 55% tras 72 horas de exposición al fármaco, sin presentar las NPs blancas ningún tipo de toxicidad.

Otro polímero empleado en la síntesis de NPs poliméricas con PTX es el PLA, un polímero biodegradable aprobado por la FDA para su uso en humanos. Estas NPs se han probado en células de cáncer de ovario y mama y han demostrado su biocompatibilidad, así como niveles de citotoxicidad similares a los del PTX libre en MCF7, MDAMB231 y SKOV-3, tras 72 horas. Además, estudios preliminares de biodistribución en ratones con un tumor de mama xenografiado han demostrado su acumulación en el tumor desde las 48 horas de su administración. (Adesina y cols., 2014) Actualmente existen unas micelas poliméricas de PLA (Genexol PM) que están siendo estudiadas en ensayos clínicos de fase IV en pacientes de cáncer de mama metastásico, y en ensayos de fase II en pacientes con cáncer de pulmón y que muestran resultados muy prometedores (Lee y cols., 2008; Ahn y cols., 2014). En el caso de ensayos clínicos en pacientes de cáncer de mama metastásico, los resultados obtenidos demostraron una respuesta global al tratamiento con estas NPs del 58,5%, a una dosis de 300 mg/m² administrada cada 3 semanas. Estos resultados son muy positivos, teniendo en cuenta los mostrados por Abraxane (47,6%) o la respuesta obtenida por el PTX convencional (21-54%) (Lee y cols., 2008). El ensayo clínico realizado en 43 pacientes de NSCLC avanzado ha mostrado una respuesta global del 46,5% al administrar conjuntamente Genexol PM con gemcitabina. Sin embargo, aunque la mielotoxicidad y los vómitos se redujeron, el elevado riesgo de aparición de efectos adversos no hematológicos de grado 3/4 hace necesario llevar a cabo más estudios para establecer su posible toxicidad (Ahn y cols., 2014).

Otras NPs poliméricas empleadas en combinación con el PTX son las de PCL. Estas NPs han mostrado una mejora del efecto antitumoral frente al que presenta el PTX libre en tumores de ovario, pulmón y melanoma (Devalapally y cols., 2007; van Vlerken y cols., 2007; Shahin y cols., 2011; Zhang y Zhang, 2015). La administración conjunta de PTX con ceramida en NPs de PCL modificadas con poli(óxido de etileno) (PEO) se ha llevado a cabo como un intento de inhibir la resistencia a fármacos que se

INTRODUCCIÓN

produce mediante una alteración de la señal apoptótica. Estas NPs consiguieron resensibilizar las células resistentes de adenocarcinoma ovárico a una dosis de PTX igual a la IC_{50} del PTX en la línea sensible, Además, estas NPs han mostrado resultados muy prometedores en ratones con tumores xenográficos de adenocarcinoma ovárico humano generados a partir de las líneas SKOV-3 y SKOV-3(TR) resistentes, con una supresión significativa del crecimiento tumoral en ambos casos (Devalapally y cols., 2007; van Vlerken y cols., 2007). En este sentido, Zhang y Zhang (Zhang y Zhang, 2015) también han desarrollado micelas de metoxi-PEG-PCL-TPGS, que han aumentado la muerte celular en células de cáncer de pulmón humanas A549, con una disminución de la IC_{50} del PTX de 5,84 μ g/ml a 1,25 μ g/ml tras 24 horas de exposición. Además, estas NPs han mejorado la internalización celular del PTX, han aumentado su tiempo de vida media en sangre, y han suprimido los tumores inducidos por células A549 resistentes a PTX en ratones inmunodeprimidos.

Por último, He y cols. (He y cols., 2009) han desarrollado NPs de poli(n-butilcianoacrilato) (PBCA) mediante un recubrimiento de ácido hialurónico (AH), que ha permitido una alta incorporación en células de sarcoma-180 y una reducción del volumen tumoral, mayor que el que presentaban las NPs originales sin este recubrimiento.

I.5.4.2. Nanopartículas sólidas lipídicas con paclitaxel

Las SLNs son una buena estrategia para encapsular moléculas poco hidrosolubles como el PTX, por lo que han sido ampliamente utilizadas. En este contexto, el efecto de SLNs de trilaurina con PTX ha sido analizado en la línea celular SKOV-3 obteniendo resultados de internalización, citotoxicidad y volumen tumoral en ratones similares al PTX libre (Xu y cols., 2013). Sin embargo, SLNs-PTX sintetizadas a partir de una mezcla de triglicéridos de cadena media mediante un método de ultrasonificación y fundionalizadas con un péptido reconocido específicamente por las células tumorales han presentando largos tiempos de circulación en sangre, una mayor acumulación en el tejido tumoral y supervivencia *in vivo*. En comparación con PTX, esta formulación presentó una menor acumulación en órganos como el corazón, el hígado y los pulmones, limitando la aparición de efectos adversos tras la exposición al fármaco. Además, se ha comprobado que la asociación reversible al péptido mejora

sustancialmente el efecto de las NPs unidas permanentemente al péptido (Zheng y cols., 2014). Otro sistema de funcionalización, ha sido la unión a AH como estrategia de direccionamiento hacia células de melanoma con fenotipo de CSCs y sobreexpresión de CD44, observándose un aumento de la liberación de PTX en las células B16F10-CD44+, así como un aumento de la apoptosis. Resultados *in vivo* han mostrado una mayor acumulación de estas NPs en el tejido tumoral, promoviendo un aumento de la supervivencia a bajas dosis de PTX, sin aparición de efectos adversos.(Shen y cols., 2015)

Dentro de las SLNs, un tipo muy importante son las de Tripalmitina. Son pocos los trabajos que presentan la incorporación de PTX en SLNs de tripalmitina, y ninguno de ellos se encuentra focalizado en el tratamiento de tumores como el de mama o pulmón. Cavalli y cols. (Cavalli y cols., 2000) encapsularon PTX en SLNs de tripalmitina y fosfatidilcolina recubiertas de PEG 2000 para conseguir SLNs invisibles, que tuvieran un largo tiempo de biodisponibilidad en el organismo. La efectividad de este sistema fue determinada en líneas celulares de adenocarcinoma colorectal (HT-29) sin conseguir un aumento de la citotoxicidad del fármaco. Sin embargo, la ausencia del excipiente principal del PTX, el Cremophor® EL, en la formulación supone una ventaja en cuanto a la seguridad del tratamiento y la reducción de efectos secundarios (Serpe y cols., 2004).

INTRODUCCIÓN

Objetivos

II. OBJETIVOS

Objetivo principal (general):

*Sintetizar y caracterizar Tripalm-NPs-PTX y PTX@p4VP que permitan incrementar el efecto antineoplásico y disminuir la toxicidad del PTX libre en líneas de cáncer de mama y pulmón.

Objetivos concretos (específicos):

- 1) Determinar la hemotoxicidad y citotoxicidad de las NPs blancas, para confirmar la biocompatibilidad de estas formulaciones.
- 2) Determinar la actividad antiproliferativa y el mecanismo de acción de las Tripalm-NPs-PTX y PTX@p4VP en dos sistemas in vitro: cultivos en monocapa y MTS generados a partir de líneas celulares de cáncer de mama y pulmón
- 3) Determinar si la funcionalización con β CD y OEG modifica la actividad antiproliferativa y el mecanismo de acción de las Tripalm-NPs-PTX
- 4) Determinar si la funcionalización con MAC de las Tripalm-NPs permite evadir la resistencia a multidrogas de las líneas celulares tumorales mediada por P-gp
- 5) Determinar la actividad antiproliferativa de las Tripalm-NPs-PTX sobre CSCs aisladas y caracterizadas a partir de líneas celulares tumorales de mama y pulmón

OBJETIVOS

Materiales y métodos

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Síntesis de PTX@p4VP

La síntesis y la caracterización de las PTX@p4VP fue llevada a cabo por el Grupo de Investigación FQM-209: Síntesis Orgánica y Nanotecnología de la Universidad de Málaga, dirigido por el Dr. Juan Manuel López. El proceso llevado a cabo se resume esquemáticamente en la Figura 13.

En primer lugar, la síntesis de las hollow-p4VP comenzó por la encapsulación de una NP de oro de un diámetro aproximado de 50 nm, sintetizada mediante un método de crecimiento en sembrado, en una cubierta de p4VP (Au@p4VP). Para ello, se calentó una dispersión coloidal de estas esferas de oro con terminaciones de vinilo (10 mL, 5 mM, $0,9848 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) a 70 °C bajo un flujo de N₂, y se añadió 4-vinilpiridina (100 mM, 161,7 µL) y *N,N'*-metilénbisacrilamida (10 mM, 23,4 mg) bajo agitación magnética suave. Tras 15 min a 70 °C se inició la polimerización mediante la adición de 2,2'-azobis(2-metilpropionamidene) dihidroclorido (150 µL, 0,1 M en agua), que se incubó durante 7-10 min, hasta que la solución rojiza quedó turbia. Se paró el flujo de N₂ y la reacción procedió durante 3 horas a 70 °C, tras lo cual se enfrió la mezcla a 20 °C bajo agitación. Finalmente, para separar las Au@p4VP del p4VP libre, la solución se diluyó en 50 ml de agua, se centrifugó (30 min a 4500 rpm), y el pellet resultante se volvió a dispersar en agua (10 ml). Este paso se repitió 5 veces para asegurar la máxima purificación de las NPs.

Posteriormente, para conseguir las hollow-p4VP se procedió a la oxidación del núcleo de oro en presencia de una mezcla de CTAB/HAuCl₄ (Figura 13A). Para ello, 0,5 ml de Au@p4VP con una concentración de oro de 5 mM se sumergieron en 4,5 ml de agua. A su vez, esta dispersión se añadió a una solución acuosa (5 ml) de CTAB (50 mM) y HAuCl₄ (0,250 mM) a 28°C, bajo agitación magnética suave, durante 4 horas. Entonces, se centrifugó la solución dos veces a 7000 rpm 1 hora para retirar los productos generados por la reacción anterior. Se tiró el sobrenadante, y el precipitado que contenía las hollow-p4VP (10 mg) se dispersó en 10 ml de agua para formar una dispersión coloidal de NPs.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para incorporar el PTX a estos sistemas se añadió PTX (0.5 mg) a la dispersión anterior de hollow-p4VP (3 mL, 3 mg of NPs). Tras 30 min, se sonicó la mezcla durante 5 min a 20 °C, y se redujo el pH mediante la adición de 0,1 M de HCl (aprox. 200 µL) hasta superar el pK_a del polímero 4-vinilpiridina (~4,8) (Figura 13B). En ese estado, el polímero se protonó, y las cargas positivas de los grupos amino provocaron la expansión del microgel, permitiendo la difusión del PTX a través de su red. Después de una agitación suave durante 30 minutos, se añadió una solución acuosa de 0,1 M de NaOH (200 µL) para deprotonar los grupos piridina y causar el colapso hidrofóbico. De esta forma, las moléculas de PTX quedaron atrapadas en el microgel, obteniendo las PTX@p4VP con una concentración de PTX de 0,195 mM

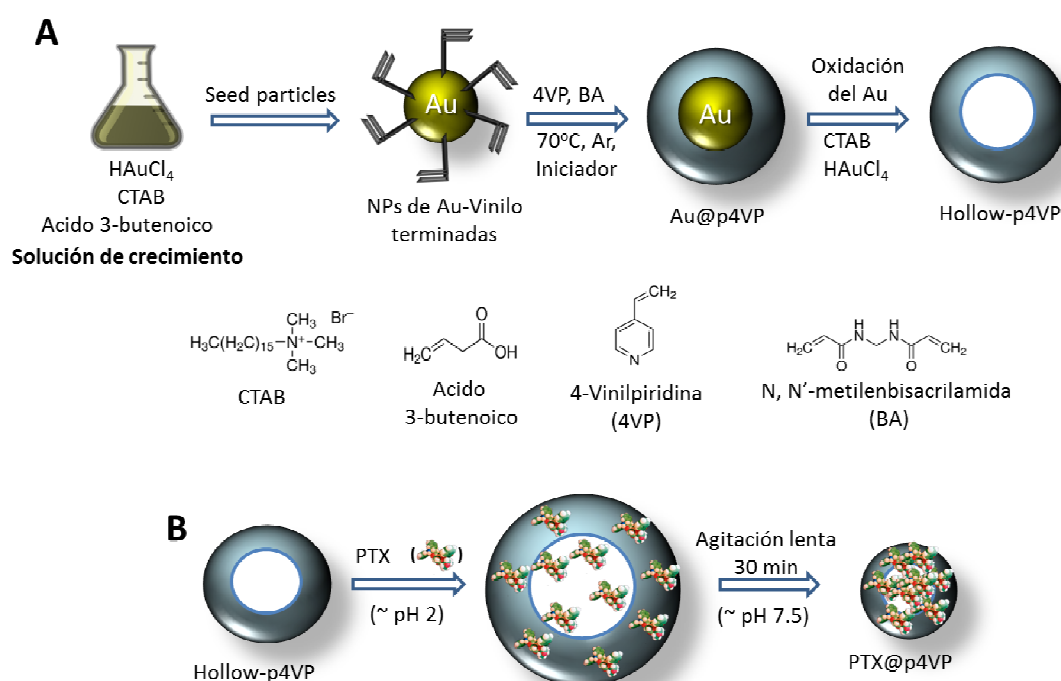


Figura 13. Representación esquemática de la preparación de hollow-p4VP (A) y la incorporación de PTX dando lugar a las PTX@p4VP (B).

III.2. Síntesis de Tripalm-NPs-PTX

La síntesis y la caracterización de las Tripalm-NPs-PTX y sus variantes fue llevada a cabo por el Grupo de Investigación FQM-209: Síntesis Orgánica y Nanotecnología de la Universidad de Málaga, dirigido por el Dr. Juan Manuel López.

Las Tripalm-NPs-PTX se prepararon mediante un método de homogenización a velocidad ultrarrápida. Para ello, una mezcla precalentada a 70°C de Tween[®] 80 (0,85 g, 5,7 %) y *n*-butane (0,17 g, 1,1 %) se añadió a una mezcla líquida (70°C) de tripalmitina (0,3 g, 2,0 %) y L- α -fosfatidilcolina (0,15 g, 1,0 %) bajo agitación magnética, seguida de 8 ml de agua. Se continuó la agitación durante 5 minutos más, y se añadió PTX (0,004 g) y el agente modificador (MAC, OEG, β CD o FITC) a la mezcla. Tras 5 min de agitación a 70°C la mezcla se dispersó en agua (7 mL, 20 °C), y se obtuvo la nanoemulsión mediante homogenización a velocidad ultrarrápida (SilentCrusher-M Homogenizer, Heidolph, Berlin, Alemania), entre 15 y 30 minutos. Después de este periodo, la suspensión lechosa se transfirió a un vial protegido de la luz, y se almacenó a 5°C.

III.3. Caracterización de PTX@p4VP

La caracterización de las PTX@p4VP se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), dispersión dinámica de la luz (DLS), espectro de Raman, y Zeta Potencial (ZP).

En primer lugar, la morfología de las hollow-p4VP y de sus precursores Au@p4VP se estudió mediante TEM, con un microscopio JEM 1400 (JEOL), que opera a un voltaje de 80 kV. La preparación de las muestras consistió en el secado de una gota de 10 μ L de la suspensión coloidal en una cuadrícula recubierta de carbón. Las medidas de DLS y ZP se realizaron en un Zetasizer Nano S (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido), con un ángulo de detección de 173°. Este instrumento usa un láser de 4 mW He-Ne que opera a una longitud de onda de 633 nm. La función de correlación se utilizó para calcular la intensidad media y el diámetro hidrodinámico a diferentes pH, que se modularon mediante la adición de una solución de HCl o NaOH. Ambos tests se realizaron por triplicado.

La composición química de los sistemas se estudió mediante espectro Raman, usando un láser de diodo del infrarrojo cercano a 785 nm (Renishaw inVia Raman spectroscope). El aparato estaba equipado con un objetivo 50x (apertura numérica 0,75), con una potencia de salida de 2 mW sobre la muestra. Cada espectro se adquirió usando un 10% del poder máximo del láser y añadiendo 5 escáneres de 50 segundos

de exposición. La resolución se estableció a 4 cm^{-1} , y la geometría de las medidas a 180° . Para obtener los espectros, una pequeña porción de las NPs centrifugadas se añadió a un portaobjetos de cristal, calibrando el instrumento previamente con una muestra estándar de Si (520 cm^{-1}).

III.4. Caracterización de Tripalm-NPs-PTX

En el caso de las Tripalm-NPs-PTX, la morfología de las NPs se estudió mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía de fuerza atómica (AFM) y ZP. Para el análisis mediante SEM, las NPs secadas se cubrieron de oro durante 3 minutos mediante pulverización catódica (JEOL JCC-1100, JEOL Ltd., Madrid, España), para proceder a las mediciones con un voltaje de aceleración fue de 5-15 kV.

La topografía superficial se estudió mediante AFM (Veeco Instruments, Multimode AFM con Nanoscope V controller), equipado con un escáner-EV de $12\text{ }\mu\text{m}$. Para escanear la superficie se usó una punta Tapping ModeTM (42 N/m , 320 kHz), y el software WSxM 4.0 (Nanotec Electronic S.L.) para el procesamiento de las imágenes. Las muestras de NPs se diluyeron en agua destilada y se extendieron en una hoja de mica.

Además, se realizaron las medidas de ZP y espectro de raman mediante los mismo métodos utilizados para las hollow-p4VP.

III.5. Eficiencia de encapsulación y liberación de PTX por las NPs

El estudio de la capacidad de encapsulación y liberación de PTX por las Tripalm-NPs-PTX y PTX@p4VP se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Para ello se usó un aparato Thermo Spectra system equipado con un detector de fotodiodo, llevándose a cabo la separación mediante una columna Phenomenex C18 ($250\text{ mm} \times 4,6\text{ mm}$; $5\text{ }\mu\text{m}$, Varian) a 25°C . La fase móvil, consistía en agua:acetonitrilo, con un volumen de inyección de $10\text{ }\mu\text{L}$. El PTX se detectó a 227 nm , y la curva de liberación se preparó de acuerdo con Sadeghi-aliabadi y cols. (Sadeghi-aliabadi y cols., 2009)

Para analizar la capacidad de encapsulación de PTX, 2 ml de NPs fueron centrifugadas (3000 rpm, 5 min), y la capa acuosa se decantó para extraer el residuo sólido con etanol (7 mL a 80 °C) durante 5 min. Este extracto se centrifugó de nuevo para eliminar los sólidos, y el sobrenadante se filtró y se inyectó en el sistema HPLC para determinar la cantidad de PTX en el etanol, y a partir de estos datos estimar la concentración de PTX en el interior de las NPs (Hou y cols., 2003; Vazquez y cols., 2011). Este proceso fue similar para ambas NPs, aunque en el caso de PTX@p4VP la fase orgánica consistió en cloroformo en vez de etanol.

Para determinar la liberación de PTX a partir de las NPs, se centrifugó una muestra de NPs (2 ml) a 3000 rpm durante 5 min, y se decantó la fase acuosa, se volvió a añadir agua y se centrifugó de nuevo otras dos veces. Tras este proceso se obtuvieron 2 muestras de aprox. 0,150 mg cada una, que se resuspendieron en PBS (5 mL, pH \approx 7,5) y Tween[®] 80 (0,02 mL), y se colocaron en un baño a 37 °C en agitación a 100 rpm. A intervalos de tiempo específicos, el medio que contenía el PTX liberado se tomó y se extrajo con etanol (2 x 3 mL), volviendo a añadir medio fresco a la muestra. Estos extractos de etanol se dejaron evaporar, y el residuo se reconstituyó en agua: acetonitrilo (3 mL, 60:40), para proceder al análisis mediante HPLC. El procedimiento fue similar para las PTX@p4VP, excepto porque la fase de extracción estaba constituida por cloroformo en vez de etanol, y que algunas de las muestras se resuspendieron en una solución de buffer citrato (5 mL, pH \approx 3,5) para proceder a la medida de liberación de PTX a diferentes valores de pH.

III.6. Cultivos celulares

Para determinar la eficacia antitumoral y la toxicidad de las nanoplataformas sintetizadas para vehicular PTX se han utilizado las siguientes líneas celulares (Tabla 4):

- 1.-Líneas celulares humanas de cáncer de mama: MCF7, MDAMB231, SKBR3 y T47D.
2. Líneas celulares humanas de cáncer de pulmón: A549, NCI-H520 y NCI-H460.
3. Líneas celulares humanas normales: las líneas celulares de mama (MCF10A) y pulmón (L132) han sido utilizadas como control.

MATERIALES Y MÉTODOS

4. Líneas celulares humanas de cáncer de colon: Las líneas HCT-15 y T84, utilizadas para determinar la capacidad de evasión del fenómeno de resistencia a drogas de las NPs sintetizadas.

Tabla 5. Líneas celulares de mama, pulmón y colon utilizadas en el presente estudio

Líneas celulares de mama	
Línea celular	Descripción
MCF7	Luminal A
T47D	Luminal A
SKBR3	HER-2
MDAMB321	Basal B o claudin-low
MCF10A	Normal
Líneas celulares de pulmón	
Línea celular	Descripción
A549	Adenocarcinoma pulmonar
NCI-H460	Carcinoma pulmonar de células grandes
NCI-H520	Carcinoma de células escamosas
L132	Epitelio pulmonar embrionario (línea normal)
Líneas celulares de colon	
Línea celular	Descripción
HCT-15	Carcinoma colorrectal resistente
T84	Carcinoma colorrectal sensible

Todas las líneas celulares se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA), a excepción de la L132, NCI-H520 y NCI-H460, que se adquirieron del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Las líneas MCF7, SKBR3, A549, L132, NCI-H520, NCI-H460, T84 y HCT-15 se cultivaron en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% y penicilina-estreptomicina al 1%. Las líneas MDAMB231 y T47D fueron cultivadas en DMEM/ Nutrient Mixture F-12 Ham, y la línea MCF10A en DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham suplementado con suero de caballo al 5%, toxina colérica (100 ng/ml), factor de crecimiento epidérmico (EGF) (20 ng/ml), insulina (10

$\mu\text{g/ml}$) e hidrocortisona ($0,5 \mu\text{g/ml}$). Tanto el FBS como el suero de caballo fueron obtenidos de la casa comercial Gibco (España), mientras que los demás productos se adquirieron de Sigma Aldrich (España). Para evitar la contaminación de los cultivos se usó en todas las líneas objeto de estudio una mezcla de penicilina/estreptomicina (Sigma Aldrich) al 1x.

El mantenimiento de las células en cultivo se realizó en un incubador (Steri-Cult CO₂ Incubator, Thermo Electron Corporation, USA) a $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura, 5% de CO₂ y 90% de humedad. Todos los cultivos celulares se realizaron en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar vertical (Aura Vertical S.D.4, Bio Air Instruments, Italy), utilizando siempre materiales y soluciones estériles.

III.7. Ensayos de citotoxicidad

Para llevar a cabo los ensayos de citotoxicidad se sembraron las células en placas de 24 pocillos con una determinada densidad condicionada para cada una de las líneas celulares. Para ello, las células adheridas al plástico del frasco de cultivo se despegaron incubando con una solución de PBS-EDTA 0,02% durante 10 min a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. El conteo celular fue llevado a cabo con azul tripán al 0,4% en una celda de conteo o cámara de Neubauer. La densidad utilizada en cada una de las líneas celulares fue la siguiente: 5×10^3 cels/pocillo en las líneas A549 y NCI-H460, 4×10^4 cels/pocillo en la línea NCI-H520, 7×10^3 cels/pocillo en la línea L132, $1,1 \times 10^3$ cels/pocillo en MCF7, $1,2 \times 10^4$ cels/pocillo en MCF10A, 8×10^3 cels/pocillo en T47D y $1,6 \times 10^4$ cels/pocillo en las líneas MDAMB231 y SKBR3. En todos los casos, las células se sembraron en 400 μl del medio de cultivo correspondiente e incubaron durante la noche para permitir que las células se adhiriesen al plástico. A las 24 horas se administraron los distintos tratamientos objeto de estudio: PTX, NPs blancas (o sin carga) y NPs con carga de PTX. Se utilizó una serie de concentraciones crecientes tanto de PTX libre como incorporado en las NPs, así como la concentración de NPs blanca equivalente a la utilizada para alcanzar esas concentraciones de fármaco con las NPs cargadas. Tras las primeras 48 horas de exposición, se procedió a la renovación del medio junto con el tratamiento, y tras 96 horas totales se analizó la citotoxicidad producida mediante un ensayo colorimétrico basado en la técnica de la sulforrodamina B (SRB). Para ello, las células se fijaron con

MATERIALES Y MÉTODOS

300 μ l de ácido tricloroacético al 10%, durante 20 min a 4 °C, para ser después lavadas 3 veces con agua destilada. Posteriormente, una vez que las placas se habían secado, se tiñeron las células durante 20 min en agitación con SRB al 0,4% en una solución de ácido acético al 1%. Tras esto, se lavaron 3 veces con una solución acuosa de ácido acético al 1% y se dejaron secar. Para resuspender la SRB se adicionó 200 μ l de Trizma® (10 mM, pH 10.5) y se traspasó a una placa de 96 pocillos de fondo plano 100 μ l de la resuspensión, para medir la densidad óptica (DO) en un lector de placas Titertek multiscan colorimeter (Flow, Irvine, California) a 492 nm.

El porcentaje de viabilidad celular se calculó con la siguiente fórmula:

$$Viabilidad\ celular\ (\%) = \frac{DO\ muestra}{DO\ control\ negativo} \times 100$$

Todos los resultados representan la media de cuatro réplicas \pm la desviación estándar (SD) de esos valores. A partir de estos datos calculamos la IC₅₀ para los distintos tratamientos. Llamamos IC₅₀ a la concentración de fármaco capaz de matar al 50% de las células, y se calcula a partir de los datos de viabilidad celular (%) con el programa GraphPad Prism 6. Además, para comparar los tratamientos utilizamos el índice terapéutico (IT), que es una medida de la mejora que produce un tratamiento frente a otro, generalmente las NPs-PTX frente al PTX, indicando las veces que disminuye la IC₅₀ mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$IT\ (veces) = \frac{IC_{50}\ PTX}{IC_{50}\ NPs - PTX}$$

III.8. Ensayos de hemocompatibilidad

La hemocompatibilidad de las Tripalm-NPs, Tripalm-NPs-MAC, Tripalm-NPs-OEG, Tripalm-NPs- β CD y hollow-p4VP se analizó siguiendo el protocolo utilizado por Evans y cols. (Evans y cols., 2013) Para ello se tomaron muestras de sangre de individuos sanos (25 ml) en tubos con EDTA, que se centrifugaron a 2113 rpm durante 5 min. Se retiró el plasma para obtener los glóbulos rojos (GR), que fueron lavados con PBS, centrifugados y resuspendidos en el mismo volumen que el plasma aspirado con

NaCl 150 mM, y por último se mezcló y centrifugó de nuevo en las mismas condiciones. Después, se retiró el sobrenadante y se reemplazó, esta vez por PBS, diluyendo los GR hasta obtener una solución con un hematocrito del 2% (V/V). A partir de esta solución se tomaron 190 µl que se añadieron a los pocillos de una placa de 96. Una vez repartidos en la placa, se añadieron las NPs blancas a diferentes concentraciones en un volumen total de 10 µl por pocillo para alcanzar un volumen final de 200 µl por pocillo. Tras esto se incubó la placa a 37 °C en agitación (15 rpm durante 2 horas), 1 hora en el caso de hollow-p4VP, para posteriormente centrifugarla (2113 rpm durante 5 min) y transferir 100 µl de sobrenadante a una nueva placa de 96 pocillos. A partir de esta placa se pudo determinar la hemoglobina liberada por los GR, midiendo la absorbancia de las muestras en un lector de placas Titertek multiscan colorimeter (450 nm) (Flow, Irvine, California). Como control positivo y negativo usamos Triton X-100 (10 µL; 20 %) y PBS pH 7,4 (10 µl), respectivamente.

El porcentaje de hemolisis se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Hemolisis (\%)} = \frac{DO \text{ muestra} - DO \text{ control negativo}}{DO \text{ control positivo}} \times 100$$

Los datos representados indican el valor medio de cuatro réplicas \pm SD. Además, se recogieron imágenes mediante microscopio óptico de los GR tras la incubación con la concentración más elevada de NPs, lo cual permitió valorar la presencia de alteraciones morfológicas en los mismos.

III.9. Análisis del ciclo celular

El estudio del ciclo celular se realizó en diferentes líneas celulares de mama y pulmón, expuestas a todos los tipos nanoparticulares estudiados, usando para ello la técnica de citometría de flujo.

Para llevarlo a cabo, se sembraron las células, a diferentes densidades, como en el estudio de citotoxicidad (ver apartado anterior) dependiendo de la línea celular ($4,5 \times 10^4$ cels/pocillo en la línea A549, 6×10^4 en NCI-H460, $2,5 \times 10^5$ cels/pocillo en la línea NCI-H520, 6×10^4 cels/pocillo en L132, $2,5 \times 10^4$ cels/pocillo en MCF7, 1×10^5 cels/pocillo en MCF10A, 8×10^4 cels/pocillo en T47D y $1,5 \times 10^5$ cels/pocillo en las líneas

MATERIALES Y MÉTODOS

MDAMB231 y SKBR3), en placas de 6 pocillos con 1,8 ml del medio de cultivo correspondiente. Una vez que las células se encontraron adheridas a la superficie de la placa, se reemplazó el medio de cultivo por medio sin suero, para inhibir el ciclo celular durante 24 horas y así sincronizar las células en la misma fase del ciclo celular. Una vez hecho esto, se volvió a reemplazar por medio con suero y con el correspondiente tratamiento a una dosis igual a la IC_{50} del PTX libre obtenida en los ensayos de citotoxicidad para cada línea celular, y se dejó incubar durante 48 horas. Posteriormente se centrifugaron (4000 rpm durante 3 min) y resuspendieron las células en 100 μ l de PBS para fijarlas con 900 μ l de etanol al 70% en agitación. Tras 15 min de incubación en hielo se centrifugó de nuevo, en las mismas condiciones, para eliminar el etanol, y el pellet obtenido se incubó con una solución de extracción de ADN 10 min a 4 °C. A continuación, centrifugamos e incubamos con una solución de yoduro de propidio (PI) y RNAsa (PI/RNAsa) (Immunostep, Salamanca, España), a temperatura ambiente durante 15 min, para inmediatamente después proceder al análisis de las células mediante FACScan (Becton Dickinson, San Jose, EEUU).

III.10. Estudio de la internalización celular

Para estudiar la internalización celular de las Tripalm-NPs y las hollow-p4VP se incorporó a las NPs un marcador fluorescente, el isotiocianato de fluoresceína (FITC) (λ emisión = 520nm) en el primer caso (Tripalm-NPs-FITC), y Rojo nilo (NR) (λ emisión = 636nm) en el segundo (NR@p4VP). Se sembraron las líneas tumorales de mama y pulmón MCF7 y A549 respectivamente, a diferentes densidades dependiendo de la línea celular, en un portaobjetos con 8 cámaras separadas (8-chamber Falcon™ Culture Slides). A continuación se incubaron durante la noche y se añadió Tripalm-NPs-FITC (21,6 μ M), NR@p4VP (1 μ M), y los correspondientes marcadores fluorescentes libres en solución, a la misma concentración de la NP marcada. Los análisis se realizaron a diferentes tiempos para ambas NPs, teniendo como referencia los tiempos necesarios para la incorporación del fluoróforo libre: NR@p4VP a 0,5, 1 y 2 horas, Tripalm-NPs-FITC a 4, 24 y 48 horas. Los núcleos celulares se tiñeron con Hoechst (Sigma Aldrich, España), para poder identificar las células en fluorescencia. Antes de la visualización al microscopio las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4%, durante 20 min a

temperatura ambiente, y posteriormente se lavaron 3 veces con PBS, en agitación por 5 min. Para visualizar las muestras y tomar las imágenes se utilizó un microscopio Nikon Eclipse 50i (Nikon Instruments Inc, Melville, NY).

En los estudios con las Tripalm-NPs-FITC, el análisis de la internalización celular también se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Las líneas MCF7, MCF10A, A549 y L132 se sembraron en una placa de 6 pocillos, y se añadieron los tratamientos de Tripalm-NPs-FITC y FITC a la misma concentración y tiempos de incubación que en el ensayo anterior. Las células se despegaron y centrifugaron para después resuspender el botón en 200 μ l de PBS. Sobre esta muestra se procedió al análisis de la intensidad de fluorescencia del FITC en las células mediante el uso del citómetro de flujo FACSCanto II (Becton Dickinson, San Jose, EEUU).

III.11. Citotoxicidad en los MTS

Para poder determinar la eficacia antitumoral del PTX asociado a las NPs en sistemas que imitan los tumores *in vivo* se procedió a generar MTS. Los MTS se generaron a partir de las líneas celulares A549 y MCF7, siguiendo el procedimiento descrito por Ho y cols. (Ho y cols., 2012) Para ello se sembraron 250 y 4×10^3 células por pocillo de ambas líneas respectivamente, en una placa de 96 pocillos previamente recubierta con agarosa al 1% (V/V). Para promover la agregación de las células, la placa se centrifugó a 2673 rpm durante 5 min, y después se dejó incubar durante 4 días en una atmósfera a 37°C y 5% CO₂, realizando un seguimiento diario de su formación. Cuando se completó su formación se procedió a administrar PTX, NPs blancas y NPs-PTX a una concentración equivalente a la IC₅₀ del PTX en cada línea celular, mediante la retirada de 100 μ l de medio y la adición del mismo volumen de medio con fármaco. Este proceso se llevó a cabo de nuevo a las 48 horas, y a las 96 horas el medio se reemplazó por medio fresco sin tratamiento. Algunos MTS no recibieron tratamiento alguno, por lo que fueron utilizados como control positivo. El volumen de los MTS se monitorizó desde la primera administración, por medio de la adquisición de imágenes en un microscopio invertido de contraste de fases (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), a partir de las cuales se midió el diámetro mayor y menor cada 2 días, mediante el uso del software ImageJ (National Institute of Health, USA). De acuerdo

MATERIALES Y MÉTODOS

con los datos recopilados, el volumen medio relativo (V , mm^3) se calculó siguiendo la siguiente fórmula:

$$V = \frac{a \cdot b^2 \cdot \pi}{6}$$

Siendo a el diámetro mayor y b el menor. Los datos representados muestran la media del volumen de 8 réplicas \pm SD.

Además, para comparar la apoptosis inducida por las NPs-PTX y el PTX libre se realizó la técnica del TUNEL (TUNEL kit, Roche, Mannheim, Alemania). Los MTS fueron sometidos al mismo tratamiento utilizado en el ensayo de citotoxicidad y a las 96 horas fueron recogidos y fijados con paraformaldehído al 4% durante 3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó el ensayo de TUNEL siguiendo el protocolo indicado por el fabricante (Roche, Mannheim, Germany), los núcleos celulares se tiñeron con Hoechst. Los MTS fueron analizados mediante microscopio confocal (Nikon A1, Nikon Corporation, Tokyo, Japan). Una vez tomadas las imágenes, se comparó el grado de apoptosis en las distintas muestras mediante el software ImageJ (National Institute of Health, USA).

III.12. Análisis del fenómeno de resistencia a drogas

La capacidad para eludir la resistencia al tratamiento mediada por P-gp se determinó utilizando dos líneas de cáncer colorrectal caracterizadas por presentar una expresión diferencial de P-gp: la línea HCT-15 con alta expresión de P-gp y la línea T84 con baja expresión de P-gp (Baek y Cho, 2015). Para analizar la modulación de la resistencia de las Tripalm-NPs-PTX y Tripalm-NPs-MAC-PTX se utilizaron 2 métodos:

En primer lugar, se analizó la citotoxicidad en HCT-15 y T84 de las Tripalm-NPs-PTX y Tripalm-NPs-MAC-PTX, siguiendo el protocolo de la SRB descrito en el apartado II.7. Se sembraron 5×10^3 células por pocillo y se trataron con concentraciones crecientes de PTX y NPs-PTX. Paralelamente, estos tratamientos se combinaron con:

a) Verapamilo (Sigma Aldrich, España), inhibidor de P-gp. Se administró a una dosis de $14,3 \mu\text{M}$.

b) NPs blancas (a dosis que se correspondía con 50 nM de PTX), para analizar su efecto inhibitorio sobre la P-gp.

En ambos casos, el tratamiento se realizó 24 horas antes de la adición de PTX o NPs-PTX. Células tratadas únicamente con el inhibidor correspondiente se utilizaron como control positivo (100% viabilidad celular). Los resultados representan el valor medio de cuatro réplicas \pm SD.

En segundo lugar, se llevó a cabo un ensayo de retención de rodamina (Rh), un sustrato fluorescente de P-gp, mediante citometría de flujo, partiendo de la premisa de que cualquier sustancia que actúe bloqueando P-gp provocaría una retención de este marcador en el interior celular. Para ello se sembró la línea celular HCT-15 en una placa de 6 pocillos a una concentración de 7×10^4 células por pocillo, y tras ser incubada durante la noche, las Tripalm-NPs, Tripalm-NPs-MAC y el verapamilo se añadieron a las mismas concentraciones que en el ensayo anterior. A las 24 horas se administró la Rh 123 (Sigma Aldrich, España), a una concentración de $1,3 \mu\text{M}$, se incubó durante 30 min y se reemplazó por DMEM. Los análisis para establecer la liberación de Rh se llevaron a cabo tras 30, 60 y 90 min de su retirada. Los datos representados indican la media de las muestras por triplicado \pm SD. También se tomaron imágenes con microscopio de fluorescencia a los 30 min de liberación, bajo las mismas condiciones que el ensayo de citometría de flujo.

III.13. Citotoxicidad en CSCs

Para determinar si el PTX vehiculizado mediante nuestras NPs tiene la capacidad de actuar sobre las CSCs, responsables de las recidivas tumorales, hemos aislado este tipo celular a partir de las líneas MCF7 y A549, siguiendo el protocolo de Hu y cols. (Hu y cols., 2015) Para ello, las células se sembraron en una placa de 6 pocillos con baja adherencia, en un medio libre de suero, compuesto por DMEM/ Nutrient Mixture F-12 Ham suplementado con EGF (20 ng/ml), factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF) (20 ng/ml), heparina (4 $\mu\text{g/ml}$) (Sigma Aldrich, Spain), B27 (1X) (Gibco, Spain) y un 1% de penicilina- estreptomina. Las tumoroesferas fueron observables desde los primeros días del experimento, y para su mantenimiento cada 2-3 días una tercera parte del medio se reemplazó por medio fresco.

Para llevar a cabo el ensayo de citotoxicidad, las CSCs se recogieron tras 13 días de aislamiento, se centrifugaron a 1600 rpm durante 10 min y posteriormente se

MATERIALES Y MÉTODOS

disgregaron con una mezcla de tripsina/EDTA. A continuación, se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad de 1×10^3 células/ml, en un volumen de 100 μ l de DMEM suplementado como en el cultivo de la línea celular adherente. Transcurridas 24 horas se añadió 10 μ l de medio con el tratamiento (PTX o Tripalm-NPs-PTX a diferentes concentraciones) y se dejó actuar por 72 horas. Posteriormente, se realizó el análisis de la viabilidad celular mediante el kit de conteo celular CCK-8 (Dojindo, Japón), poniendo en contacto 10 μ l de la solución que contiene la sal de tetrazolio por pocillo e incubando durante 3 horas en una estufa de cultivo. Esta sal se reduce y cambia de color por la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales de las células sanas, lo cual puede ser valorado mediante la absorbancia de la muestra. Finalmente, se determinó la DO de la muestra mediante el Titertek multiscan colorimeter (Flow, Irvine, California) a 450 nm, tomándose también los valores de DO a 620 nm para ser sustraídos a los anteriores y eliminar posibles errores de fondo. El porcentaje de viabilidad celular se calculó con la misma fórmula que aparece en el apartado II.7, y los resultados representados fueron obtenidos a partir de la media de cinco réplicas \pm SD.

III.14. Caracterización de las CSCs

Con objeto de determinar si la población obtenida de CSCs presenta las características propias de este tipo celular se realizó una PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR) al final de la fase de aislamiento. Para ello se extrajo el RNA de las células mediante el RNeasy Mini Kit (Qiagen, MD, EEUU) En primer lugar, se añadió trizol a las células como agente de lisis, y se mantuvieron las muestras a -80°C hasta el momento de la extracción. Entonces, se homogeneizaron las muestras con una jeringa de 25 g y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos, para llevar a cabo la disociación de los complejos nucleoprotéicos. Pasado ese tiempo se añadió cloroformo (100 μ l por cada 500 μ l de trizol), se agitó mediante un vortex durante unos 5 minutos, se dejó incubar otros 15 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente se centrifugaron las muestras a 4°C y 10351 rpm durante 15 minutos. De las 3 fases formadas, se retiró la fase acuosa y se depositó en un nuevo tubo eppendorf al que se añadió el mismo volumen de etanol que el volumen de la muestra. Se mezclaron ambos líquidos por inversión y se aplicaron 700 μ l de la muestra a una columna Mini

Columna Rneasy Qiagen, se centrifugó 1 minuto a 4°C y 9449 rpm y después se eliminó el sobrenadante. Este proceso se repitió tantas veces como fue necesario hasta que toda la muestra pasó por la columna, se añadieron 500 uL de buffer RPE y se volvió a centrifugar y eliminar el sobrenadante. Después se llevó a cabo un segundo lavado con este buffer y entonces se centrifugó durante 2 minutos repitiendo este proceso. En ese momento se cambió la muestra a una nueva columna y se volvió a centrifugar para eliminar los restos de alcohol, y se dejó otros 2 minutos con la tapa abierta para proceder a la evaporación de los posibles restos que pudieran quedar. Por último, se añadió 35 uL de agua libre de RNasa, se dejó incubar durante 5 minutos y se volvió a centrifugar. Este proceso se repitió 2 veces, y entonces se recogió el ARN, que se mantuvo a -80°C.

Utilizando el ARN obtenido previamente se realizó la transcripción inversa utilizando 2 µg de RNA total y el kit M-MLV Reverse Transcriptase (Sigma - Aldrich, Sant Louise, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante. Primero se realizó un primer ciclo a 70 °C en el que se mezclaron los DNTPs (10mM), el oligo(dT) (5 µM) y la muestra de mRNA (2µg), completando hasta 10 µl con agua libre de RNAsas, para desnaturalizar el mRNA. Tras esto se realizó un segundo ciclo de PCR a 37°C durante 50 minutos añadiendo al volumen anterior el buffer (1X), la enzima (0,5µL) y un inhibidor de RNAsas (20 unidades) completando hasta 20µl con agua libre de RNAsas. Una vez completado el programa de retrotranscripción este cDNA se almacenó a -20°C hasta su utilización.

El cDNA obtenido por retrotranscripción se amplificó mediante RT-PCR usando placas de 96 pocillos en el termociclador AppliedBiosystem 7500 (Applied Biosystems, Life Technologies). El volumen total de reacción fue de 20 µl que contenían: 20ng de cDNA, 1xSYBR green PCR Mastermix (Takara, Clontech Laboratories, Inc. EEUU) y 100nM de primers específicos para SYBR green (Sigma Aldrich, EEUU). Se usaron secuencias específicas para amplificar el mRNA de los genes *SOX2*, *OCT4*, *DNMT1*, *CD133*, *CD44* y *HPRT* (como gen endógeno) (Tabla 5). El ciclo de PCR utilizado fue de 2 minutos a 50°C seguido de 10 minutos a 95°C, y 40 ciclos a 95°C durante 15 s y 60°C durante 60 s. Los datos obtenidos se referenciaron al log₂ de la expresión relativa (RQ) del mRNA de ese gen en las CSCs respecto a la expresión en la línea celular de la que

MATERIALES Y MÉTODOS

proviene (línea basal), representando los resultados obtenidos como la media de 4 replicas \pm SD.

Tabla 6. Secuencia de los primers empleados para la determinación del fenotipo de las CSCs mediante Real-Time

Gen		Secuencia del primer (5' \rightarrow 3')	Bases
SOX2	Forward	ATA ATA ACA ATC ATC GGC GG	20
	Reverse	AAA AAG AGA GAG GCA AAC TG	20
OCT4	Forward	GAT CAC CCT GGG ATA TAC AC	20
	Reverse	GCT TTG CAT ATC TCC TGA AG	20
DNMT1	Forward	CGT AAA GAA GAA TTA TCC GAG G	22
	Reverse	GTT TTC TAG ACG TCC ATT CAC	21
CD133	Forward	AAG CAT TGG CAT CTT CTA TG	20
	Reverse	TTT GCT CTG GAG TTT CAT TC	20
CD44	Forward	TTA TCA GGA GAC CAA GAC AC	20
	Reverse	ATC AGC CAT TGT GGA ATT TG	20
HPRT	Forward	TGA CAC TGG CAA AAC AAT GCA	21
	Reverse	GGT CCT TTT CAC CAG CAA GCT	21

III.15. Análisis estadísticos

Para los análisis estadísticos se usó el software SPSS 7,5 (SPSS, Chicago, IL), mediante la aplicación de los tests estadísticos de t de Student y ANOVA. Los datos fueron expresados como media \pm SD, y las diferencias se consideraron como significativas con un valor de $p < 0,001$ o $p < 0,05$, dependiendo del ensayo.

Resultados

IV. RESULTADOS

IV.1. Capítulo I: Nanopartículas de p4VP-paclitaxel (PTX@p4VP) para el tratamiento del cáncer de mama y pulmón

IV.1.1. Síntesis y caracterización de PTX@p4VP

La síntesis y la caracterización de las PTX@p4VP fue llevada a cabo por el Grupo de Investigación FQM-209: Síntesis Orgánica y Nanotecnología de la Universidad de Málaga, dirigido por el Dr. Juan Manuel López. A continuación se realiza una breve exposición de los resultados obtenidos.

Los análisis mediante TEM mostraron que las hollow-p4VP estaban formadas a partir de un núcleo esférico de oro de unos 50 nm encapsulado en una cubierta de microgel de p4VP, con un tamaño de NP estimado en $125,8 \pm 3.2$ nm (Figura 14Ai y ii). La inmersión de estos sistemas en una solución de HAuCl_4 y CTAB (Ver Materiales y Métodos) produjo la oxidación del núcleo de Au_0 a Au_+ y su total eliminación, dando lugar a los sistemas huecos (hollow-p4VP) (Figura 14Aiii y iv). Por otro lado, para demostrar el comportamiento dependiente de pH de estas NPs, se llevaron a cabo ensayos mediante DLS y ZP (Figura 14B y C) para medir el diámetro hidrodinámico de estas NPs y su carga superficial, respectivamente, en función del pH. Como se puede observar en la Figura X b, en el estado expandido del gel a un pH ácido de 2,75, el tamaño de las hollow-p4VP fue de ~ 300 nm. Al aumentar este pH, el gel se contrajo y se produjo una disminución de tamaño hasta unos 100 nm a pH 7,5. El proceso contrario de reducción del pH dio lugar a resultados similares. En cuanto a la carga superficial de las hollow-p4VP (Figura 14C), a pH 2,75 era de +47 mV, pero al aumentar el pH hasta 7,5 disminuyó acercándose a la neutralidad (2 mV). En este caso también el proceso contrario dio lugar a resultados similares. Estos resultados confirman el comportamiento pH-dependiente de las hollow-p4VP, y la expansión del gel en contacto con un medio ácido.

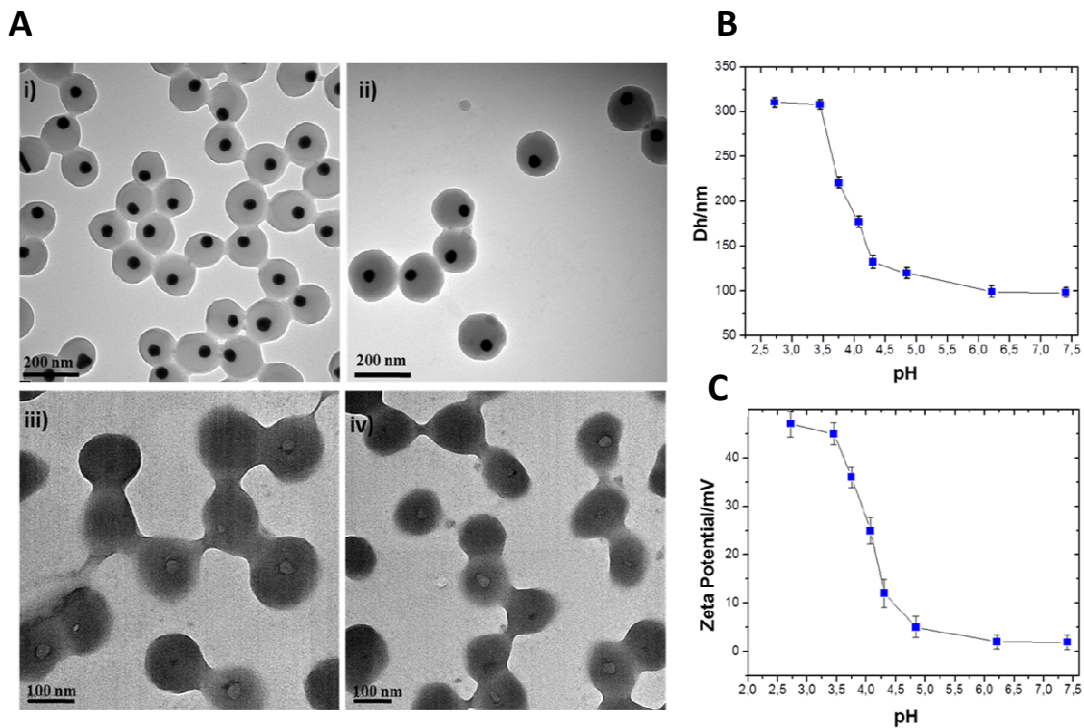


Figura 14. A) Imágenes representativas mediante TEM de Au@p4VP (i y ii) y hollow-p4VP (iii y iv). B) Propiedades eléctricas de la superficie de las partículas: variación del diámetro hidrodinámico (B) y la carga superficial (C) de las hollow-p4VP, en función del pH del medio. Los datos muestran la media \pm SD de tres réplicas.

Por otro lado, se analizó la incorporación de PTX en estos sistemas mediante un espectro de Raman para PTX, hollow-p4VP y PTX@p4VP (Figura 15A). El espectro correspondiente con PTX y las PTX@p4VP mostró picos en varias regiones espectrales que se corresponden con el espectro esperado para una muestra que contenga PTX. Además, se cuantificó la presencia de PTX en las PTX@p4VP mediante HPLC, descartando la presencia de PTX en el sobrenadante, y confirmando por tanto una eficiencia de encapsulación de \sim 100% del fármaco en estos sistemas.

Por último, se analizó la liberación del fármaco *in vitro*, en ambientes ácidos y básicos (Figura 15B), mostrando una liberación más rápida en ambiente ácido, y una liberación sostenida a pH básico. A pH 7,6 se liberó tan solo un 15% en el primer día, llegando al 70% tras 8 días. Sin embargo, a pH 3,5 ya se había liberado el 70% del PTX en el primer día, y prácticamente el 100% tras 4 días. Estos resultados demuestran que la liberación de PTX es dependiente del pH del medio, aumentando a pH ácido.

RESULTADOS

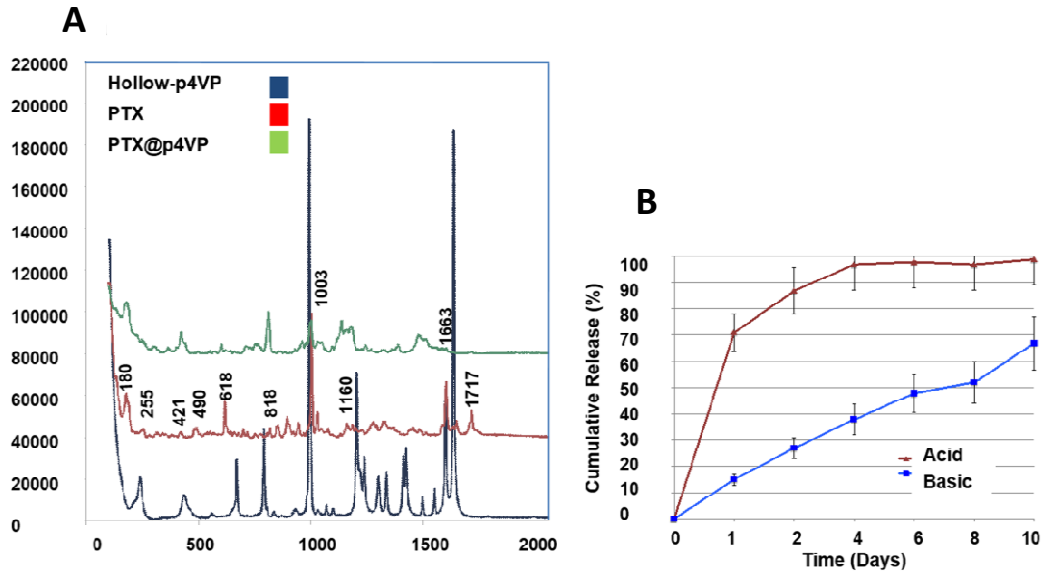


Figura 15. Análisis de la composición química: espectro Raman de una muestra de PTX@p4VP (línea verde), PTX libre (línea roja) y hollow-p4VP (línea azul) (A). Liberación in vitro de PTX desde las PTX@p4VP a pH básico (pH= 7,6) y a pH ácido (3,5) (B).

IV.1.2. Estudio de biocompatibilidad de las hollow-p4VP

Para determinar la posible toxicidad de las hollow-p4VP se realizaron pruebas utilizando células sanguíneas humanas y líneas celulares humanas tumorales y no tumorales derivadas de mama y pulmón.

Los estudios en muestras de sangre permitieron determinar el grado de hemólisis originado por las NPs y, por tanto, su hemocompatibilidad. Como se puede observar en la Figura 16, las hollow-p4VP no provocaron hemólisis incluso a concentraciones tan altas como 1,8 mg/ml tras 1 hora de exposición, no observándose en ninguna de las concentraciones testadas un porcentaje de hemólisis superior al 0,8%.

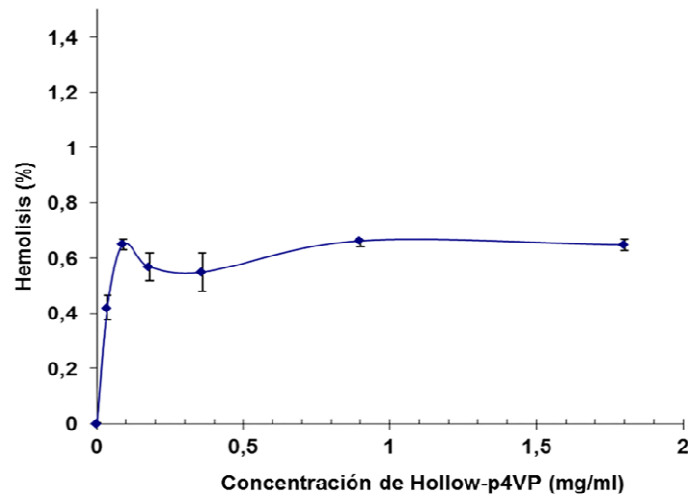


Figura 16. Hemocompatibilidad de las hollow-p4VP. La hemólisis (%) producida en GR de sangre humana fue determinada para un amplio rango de concentraciones de NPs (desde 0,04 hasta 1,8 mg/ml). Los datos representados indican el valor medio de cuatro réplicas \pm SD.

Por otra parte, los estudios de toxicidad de las hollow-p4VP en las líneas celulares humanas (tumorales y normales) demostraron la no existencia, en ninguno de los casos, de inhibición del crecimiento celular a las concentraciones de NPs utilizadas, lo que claramente indica su alto grado biocompatibilidad (Figura 17).

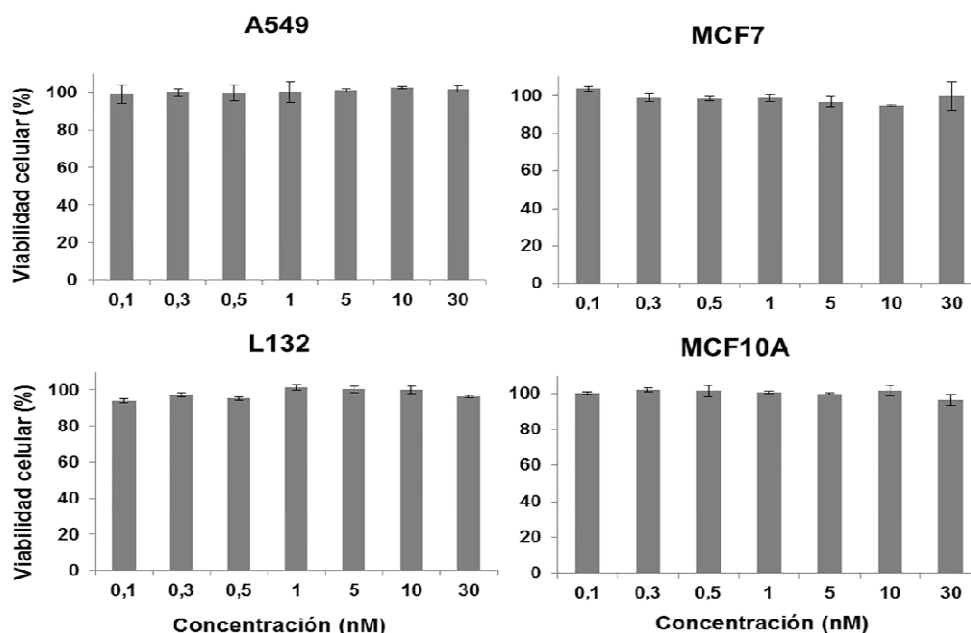


Figura 17. Estudio de la viabilidad celular (%) de líneas celulares humanas tumorales y normales derivadas mama y pulmón expuestas a hollow-p4VP. Las NPs fueron utilizadas a concentraciones equivalentes a las usadas en las experiencias de citotoxicidad de PTX@p4VP. Los resultados se expresan como la media \pm SD de cuatro réplicas.

RESULTADOS

IV.1.3. Estudio de citotoxicidad de las PTX@p4VP

El análisis comparativo de la viabilidad celular de líneas tumorales y no tumorales de mama y pulmón tratadas con dosis crecientes de PTX y PTX@p4VP, mostró diferencias significativas ($p < 0,05$). Como se puede observar en la Figura 18, el tratamiento de la línea tumoral de mama MCF7 con PTX@p4VP indujo una notable disminución de la IC_{50} de PTX (2,9 veces) pasando de un valor de $13,75 \pm 1,1$ nM a $4,71 \pm 0,3$ nM. Por el contrario, la modulación de la IC_{50} de PTX por el uso de PTX@p4VP fue mucho menor en la línea de mama no tumoral MCF10A, en la que la reducción de dicha IC_{50} fue de tan solo 1,7 veces, con valores que pasaron de $6,17 \pm 0,8$ nM a $3,6 \pm 0,4$ nM.

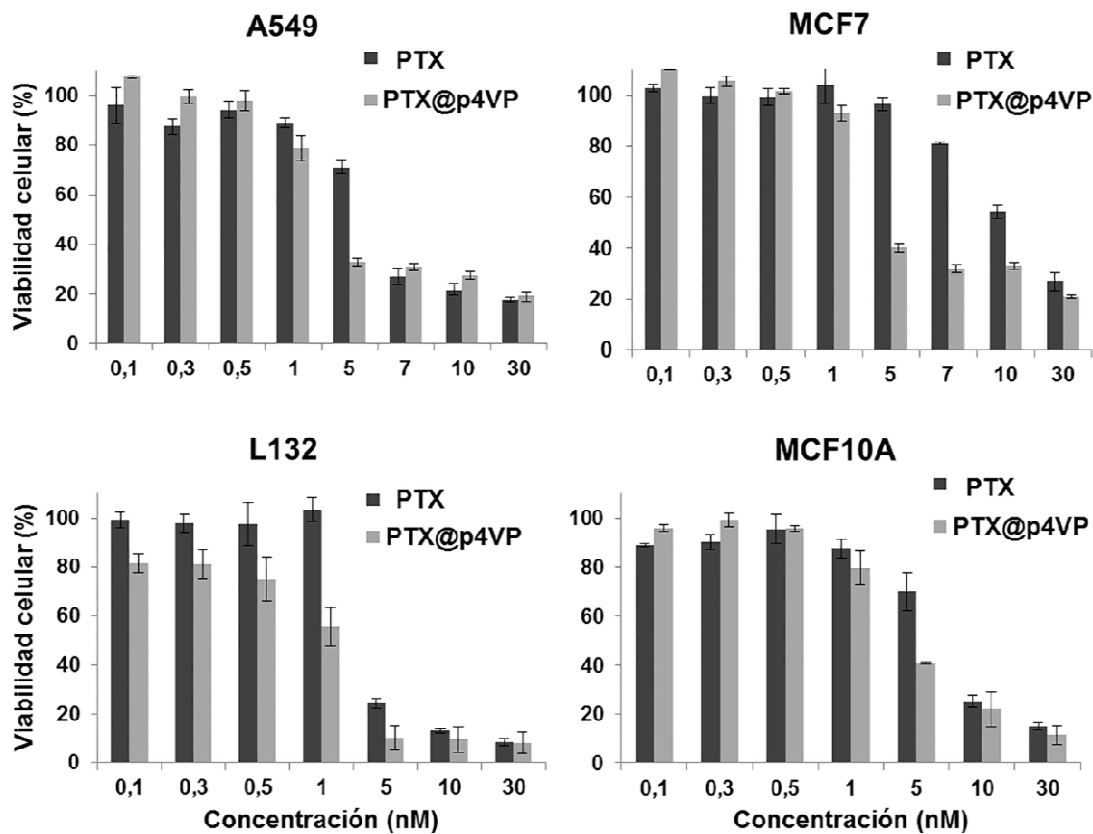


Figura 18. Estudio de citotoxicidad de PTX@p4VP en células humanas de pulmón y mama. Células tumorales y no tumorales derivadas de pulmón y mama fueron tratadas con diferentes concentraciones de PTX (0,1 nM a 30 nM) y su equivalente de PTX@p4VP durante 96 horas. Los resultados se expresan como la media \pm SD de cuatro réplicas.

Por otra parte, la mejora en el efecto de PTX fue significativamente menor en la línea tumoral de pulmón A549, en la que se apreció una reducción de la IC₅₀ de PTX de 1,6 veces pasando su valor de $5,9 \pm 0,4$ nM a $3,6 \pm 0,4$ nM. En este caso, el tratamiento con PTX@p4VP no tuvo una especial selectividad por el tipo tumoral (cáncer de pulmón), a diferencia de lo observado para cáncer de mama, ya que, como se puede observar en la Figura 8, la línea de pulmón L132 también redujo de forma notable la IC₅₀ de PTX pasando de $3,5 \pm 0,5$ nM a $1,1 \pm 0,6$ nM.

IV.1.4. Estudio de la modulación del ciclo celular

Con el objetivo de comprobar que la encapsulación del PTX en las hollow-p4VP no modifica el mecanismo de acción de este fármaco, se realizó un estudio de ciclo celular para determinar el porcentaje de células que se encuentran en cada fase tras 48 horas de incubación con los diferentes tratamientos. El tratamiento con PTX libre fue usado como control, observándose un incremento del número de células en la fase SubG1 y G2/M, patrón característico tras la acción de este agente sobre el huso mitótico (Tabla 6). Sin embargo, la exposición de las células tumorales y no tumorales a PTX@p4VP indujo un aumento del número de células en la fase SubG1 y G2/M más notable. Así, en las líneas MCF7 y MCF10A, el porcentaje de células en esta fase tras el tratamiento con PTX@p4VP fue de un 20,28% y un 15,64%, respectivamente, en relación al 11,25% y 7,70% detectado en los controles sin tratar (Tabla 6). En las líneas celulares de pulmón, el mayor porcentaje celular tras el tratamiento con PTX@p4V se observó en la fase SubG1, siendo de un 34,31% en A549 y de 39,32% en L132. El tratamiento con PTX libre no produjo modificaciones importantes respecto a los valores control. En la línea normal de mama aumentaron las células en fase G2/M de un 7,70% a un 11,29%, y en SubG1 de un 0,71% a un 1,61%. Concretamente, en MCF7 se produjo un aumento de células en fase S tras el tratamiento con PTX en relación a los valores obtenidos en el control (18,38% y 10,64% respectivamente).

RESULTADOS

Tabla 7. Distribución del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular tras la exposición a los diferentes tipos de tratamientos. La dosis utilizada fue la IC₅₀ de cada línea celular. El estudio fue realizado tras 48 horas de tratamiento.

Línea celular	Tratamiento	SubG1	G1	S	G2/M
MCF7	Control	0,81	77,28	10,64	11,25
	PTX	1,02	70,58	18,38	10,01
	PTX@p4VP	1,43	66,80	11,47	20,28
	Hollow-p4VP	0,71	76,60	11,39	11,29
MCF10A	Control	0,71	82,14	9,30	7,70
	PTX	1,61	82,15	4,93	11,29
	PTX@p4VP	10,39	68,21	5,75	15,64
	Hollow-p4VP	1,60	89,90	1,20	7,30
A549	Control	0,50	60,08	20,36	19,05
	PTX	0,70	65,32	18,04	15,92
	PTX@p4VP	34,31	26,74	22,74	16,21
	Hollow-p4VP	0,91	67,23	17,29	14,56
L132	Control	0,91	74,29	11,74	13,05
	PTX	1,52	69,97	13,99	14,50
	PTX@p4VP	39,32	19,49	27,60	13,58
	Hollow-p4VP	0,60	73,96	12,66	12,76

IV.1.5. Análisis de la internalización celular

El seguimiento del tránsito de la NP del medio extracelular al intracelular se realizó mediante microscopía de fluorescencia. El uso de hollow-p4VP cargadas con NR (NR@p4VP), que posee un típico patrón de emisión en rojo, permitió visualizar su incorporación al interior de la célula (Figura 19). El estudio demostró una mayor internalización del PTX vehiculizado por la NPs que del PTX libre tanto en la línea A549 de cáncer de pulmón como en la línea MCF7 de cáncer de mama, lo que se reflejó en un incremento de la intensidad de la fluorescencia. Esta intensidad de fluorescencia alcanzó su mayor nivel tras 2 horas de exposición. Además, se pudo observar que, tanto en mama como en pulmón, el patrón de internalización de NR y de NR@p4VP

fue distinto, existiendo una incorporación más lenta en el segundo caso. Sin embargo, la comparación de la intensidad de fluorescencia entre ambas líneas demostró que esta fue mayor en las células A549 que en MCF7, indicando una mayor capacidad de captación de la NR@p4VP por parte de la línea celular de pulmón.

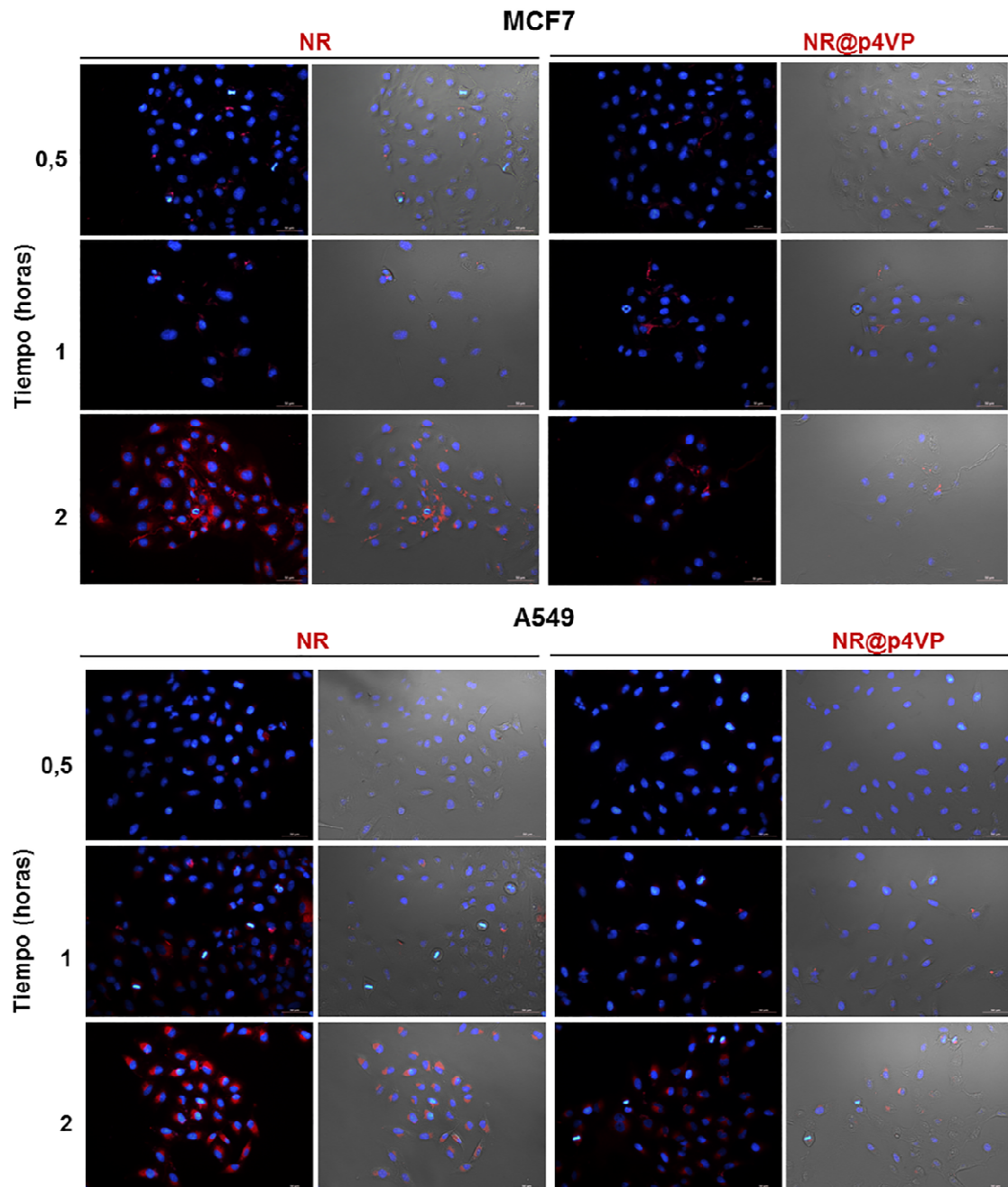


Figura 19. Análisis mediante microscopía de fluorescencia de la internalización de NR@p4VP. Las líneas celulares MCF7 y A549 fueron tratadas con NR y NR@p4VP (rojo) a diferentes tiempos (0,5, 1 y 2 horas). Los núcleos celulares fueron teñidos con Hoechst (azul). Magnificación=20X.

RESULTADOS

Por último, y en cuanto a la localización de la fluorescencia, ambas líneas celulares presentaron un patrón de acúmulo en el citoplasma celular, no existiendo predilección por ninguna organela celular. El núcleo no mostró fluorescencia, no existiendo co-localización con el colorante Hoechst.

IV.1.6. Ensayos en esferoides multicelulares (MTS)

Para determinar el efecto de las PTX@p4VP sobre un sistema que imita fielmente la estructura de un masa tumoral *in vivo*, se realizaron experiencias de citotoxicidad sobre MTS obtenidos de las líneas celulares tumorales MCF7 y A549 (ver Materiales y Métodos), que fueron monitorizados a lo largo del tiempo de tratamiento.

El crecimiento de los MTS, observables a partir de los 3 días, se caracterizó por no seguir el mismo comportamiento en ambos tipos celulares. Así, mientras que los MTS de MCF7 presentaron un tamaño estable, los de A549 crecieron de una forma constante generando esferoides de mayor tamaño. Además, estos últimos pudieron ser monitorizados hasta el día 9, mientras que los generados a partir de MCF7 comenzaron a disgregarse a partir del día 4, hasta el que se mantuvieron las experiencias.

La exposición de ambos tipos de MTS (de MCF7 y A549) a las hollow-p4VP no produjo ninguna modificación en cuanto a su volumen indicando la falta de toxicidad y, por tanto, la biocompatibilidad de la NPs (Figura 20). Así, los MTS de MCF7 control y tratados con las NPs sin carga desarrollaron un volumen similar que fue de $\sim 7 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$ a los 4 días de seguimiento. Los MTS de A549, con un volumen inicial de $\sim 2 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$ (menor que los MTS de MCF7), incrementaron su tamaño para llegar a superar el volumen de los MTS anteriores. Sin embargo, tanto los MTS control como los tratados con hollow-p4VP alcanzaron un volumen similar ($\sim 3 \times 10^{-2} \text{ mm}^3$), sin diferencias significativas entre ellos.

Por el contrario, el tratamiento con PTX y PTX@p4VP provocó una disminución significativa ($p < 0,05$) del volumen de ambos MTS respecto a los controles que, además, se acompañó de un aumento en la desorganización de la estructura multicelular de su cubierta (Figura 10). No obstante, el resultado más relevante fue la

demostración de que la reducción de volumen de ambos MTS con el tratamiento de PTX@p4VP fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que con el PTX libre (Figura 20B), lo que claramente indicó un incremento de la actividad de PTX sobre el esferoide tumoral. Así, las diferencias en el volumen tumoral pudieron ser apreciadas a partir del día 2 de tratamiento, en el caso de MCF7, y a partir del día 4, para A549.

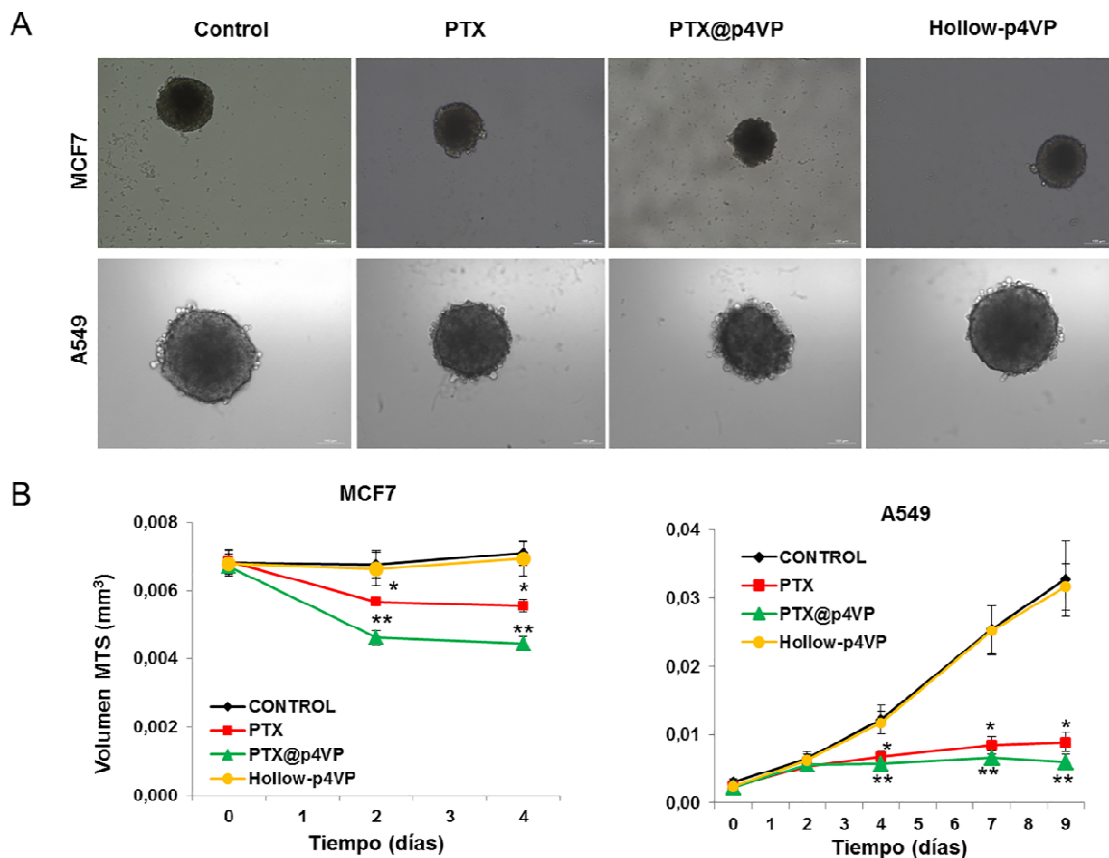


Figura 20. Análisis de la modulación del volumen de los MTS de MCF7 y A549 tratados con PTX y PTX@p4VP. A) Imágenes representativas de los MTS derivados de ambas líneas celulares tras 4 de exposición a los tratamientos (barra = 100 μm). B) Representación gráfica de la evolución de los volúmenes de los MTS (mm^3) expuestos a los diferentes tratamientos a lo largo del tiempo. Los tratamientos se basaron en la IC_{50} de cada una de las líneas celulares adherentes (5,9 nM y 13,75 nM para A549 y MCF7, respectivamente). MTS tratados con hollow-p4VP y sin tratamiento fueron usados como control. Los datos representados muestran la media de 8 réplicas \pm SD. *Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los MTS tratados con PTX y los controles. **Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los volúmenes de los MTS tratados con PTX y PTX@p4VP.

RESULTADOS

El estudio realizado en los MTS de MCF7 demostró un descenso brusco del volumen a los 2 días de tratamiento, que fue mayor con el tratamiento del PTX encapsulado ($\sim 4,5 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$) que el PTX libre ($\sim 6 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$). A los 4 días, este tamaño no se modificó. A la vista de estos resultados se puede concluir que en la línea de mama MCF7 la reducción del volumen del MTS es mucho mayor con las PTX@p4VP (aprox. 35%) que con el PTX libre (aprox. 15%).

En el caso de los MTS de A549, es a partir del cuarto día cuando empiezan a apreciarse diferencias entre los MTS control y tratados con hollow-p4VP ($\sim 1,2 \times 10^{-2} \text{ mm}^3$) y los tratados con PTX ($\sim 6 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$) y PTX@p4VP ($\sim 5 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$). Además, las diferencias de volumen entre los tratamientos con PTX y PTX@p4VP fueron significativas ($p < 0,05$), indicando el incremento de actividad del fármaco cuando se incorporó a las NPs. Esta diferencia también pudo ser detectada tras 9 días de registro de los tamaños ($\sim 8 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$ y $\sim 6 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$, respectivamente), indicando que el volumen de los MTS disminuye respecto a los controles en torno a un 73% para PTX y un 80% para PTX@p4VP.

Por otra parte, y para determinar el nivel de apoptosis inducida por las PTX@p4VP en comparación el PTX libre sobre los MTS, se llevaron a cabo ensayos de TUNEL. Así, tras 4 días de exposición de los MTS a los tratamientos, la presencia de un proceso apoptótico fue visualizada mediante inmunofluorescencia (marcaje rojo) (Figura 21). Los núcleos fueron teñidos con Hoechst (marcaje azul). Los resultados obtenidos demostraron claramente un mayor nivel de apoptosis en los MTS tratados con PTX y PTX@p4VP en relación a los controles y MTS tratados con hollow-p4VP, en donde el nivel de apoptosis fue reducido. Además, mientras que el marcaje en estos últimos fue fundamentalmente periférico, los MTS tratados con PTX (libre o asociado a NPs) mostraron también un marcaje central. No obstante, el resultado más relevante fue el mayor nivel de apoptosis inducida por el el tratamiento con PTX@p4VP en relación al PTX libre. Este incremento en la actividad de PTX cuando se incorporó a las NPs fue muy evidente en los MTS de A549, en los cuales se pudo detectar un incremento de células apoptóticas prácticamente en la totalidad del esferoide, a diferencia de lo observado tras el tratamiento con el PTX libre, en el que el marcaje no apareció apenas en el centro del MTS. Esta diferencia de apoptosis entre PTX@p4VP y

PTX libre fue menos evidente en el caso de los MTS de MCF7, aunque también se pudo observar una ligera mayor distribución de la apoptosis en los tratados PTX@p4VP.

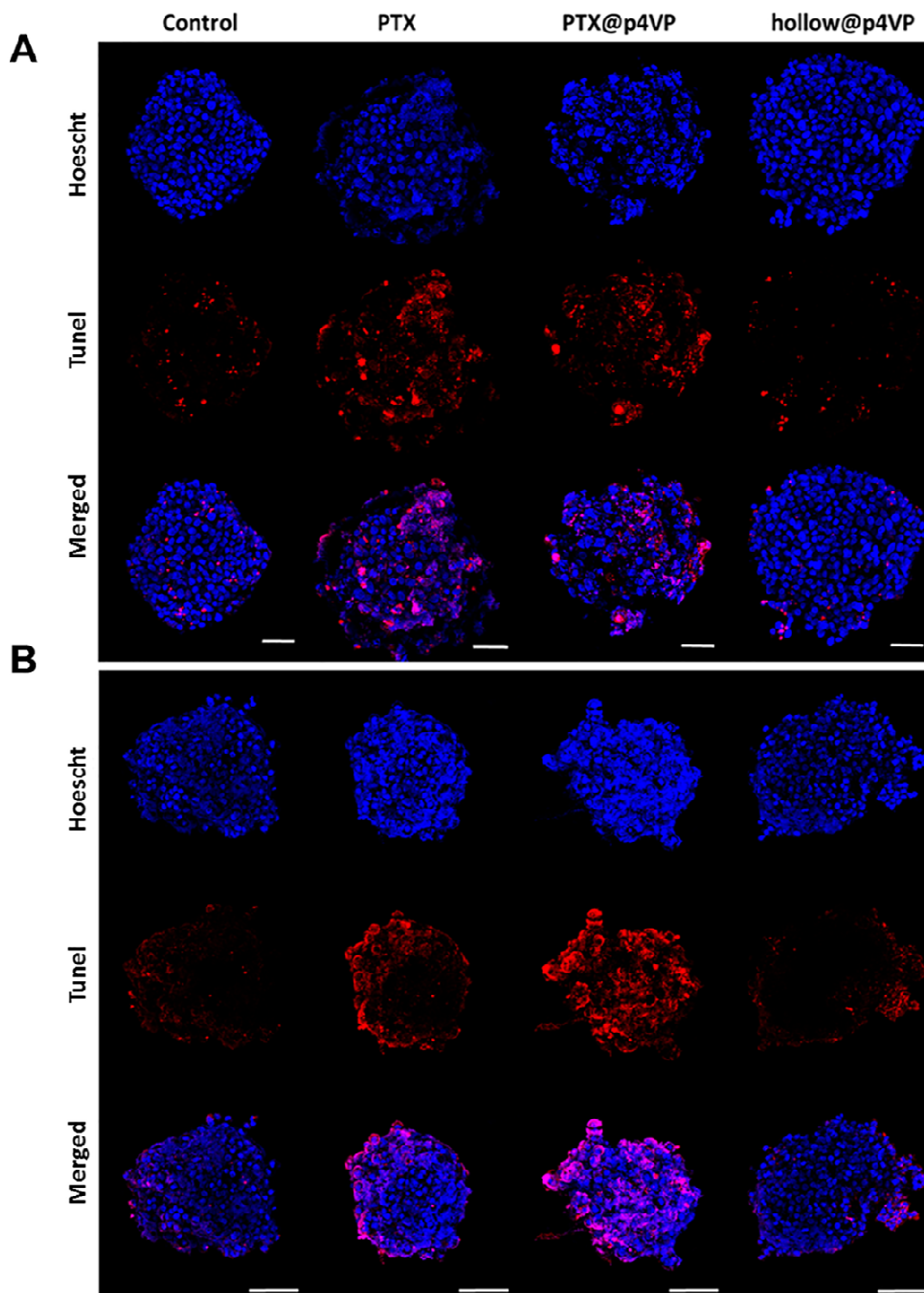


Figura 21. Imagen representativa de la apoptosis inducida en MTS de MCF7 (A) y A549 (B) por el tratamiento con PTX y PTX@p4VP. Los tratamientos se basaron en la IC_{50} de cada una de las líneas celulares adherentes. La apoptosis fue valorada tras cuatro días de exposición a los tratamientos. La tinción con TUNEL (rojo) indica la apoptosis. La tinción con Hoechst (azul) indica la presencia de los núcleos. Magnificación=40X. Barra = 100 μ m.

RESULTADOS

Finalmente, ambos MTS, tanto de mama como de pulmón, presentaron una menor compactación y una estructura más desordenada tras haber estado expuestos al tratamiento con PTX@p4VP (Figura 21). Por tanto, nuestros resultados demuestran la mayor efectividad del PTX incorporado en PTX@p4VP frente a los MTS, sugiriendo que estos sistemas podrían presentar un mayor efecto en la reducción de los tumores en futuros ensayos *in vivo*.

IV.2. Capítulo II: Nanopartículas de tripalmitina-paclitaxel (Tripalm-NPs-PTX) para el tratamiento del cáncer de mama y pulmón

IV.2.1. Síntesis y caracterización de las Tripalm-NPs-PTX

La síntesis y la caracterización de las Tripalm-NPs-PTX y sus modificaciones fueron llevadas a cabo por el Grupo de Investigación FQM-209: Síntesis Orgánica y Nanotecnología de la Universidad de Málaga, dirigido por el Dr. Juan Manuel López. A continuación se realiza una breve exposición de los resultados obtenidos.

En primer lugar, las Tripalm-NPs-PTX se sintetizaron mediante un método de emulsión de solventes con ultra agitación, presentando una buena incorporación de PTX y estabilidad de los sistemas. Mostraron un tamaño de partícula revelado por el análisis mediante SEM fue de 210-220 nm (Figura 22A). Por otro lado, las imágenes de AFM mostraron diámetros de unos 250 nm. Además, no mostraron asperezas en la superficie, y las NPs modificadas y las marcadas con FITC presentaron una morfología similar, así como las que fueron homogenizadas durante 15 o 30 minutos.

Los resultados de espectroscopía de Raman mostraron las bandas correspondientes al PTX en las Tripalm-NPs-PTX y el PTX libre, así como las de la tripalmitina en las NPs blancas y con carga (Figura 22C). Así mismo, el análisis por HPLC demostró una incorporación del PTX en las Tripalm-NPs en torno al 100%, siendo esto posible por la baja carga de fármaco, entre 0,4-0,03%

RESULTADOS

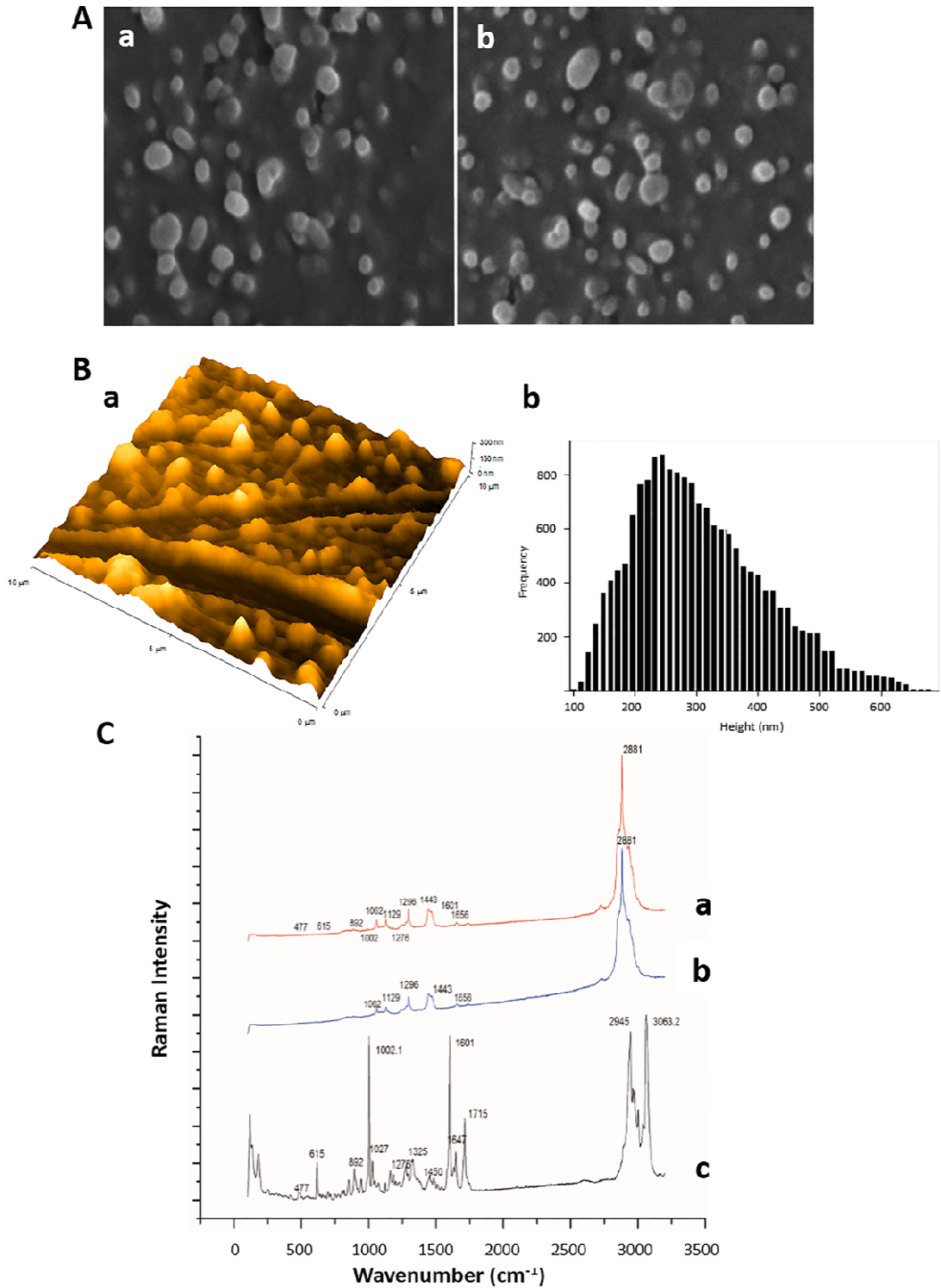


Figura 22. Morfología, tamaño y caracterización química de las Tripalm-NPs-PTX. A) Análisis por SEM del tamaño de partícula: a) micrografía a 30.000x de magnificación, b) micrografía a 20.000x de magnificación. B) Análisis por AFM: a) imagen topográfica en 3D, b) histograma de distribución de altura. C) Espectro Raman de una muestra de Tripalm-NPs-PTX (a), Tripalm-NPs (b) y PTX puro (c).

Por último, los ensayos de liberación del fármaco mostraron una liberación rápida en las primeras 5 horas, en las que se liberó el 50% del PTX, y que se mantuvo más lenta hasta llegar a un 90% de liberación a las 25 horas, y un 100% tras 50 horas (Figura 23). Este proceso fue similar tanto en Tripalm-NPs-PTX como en sus modificaciones.

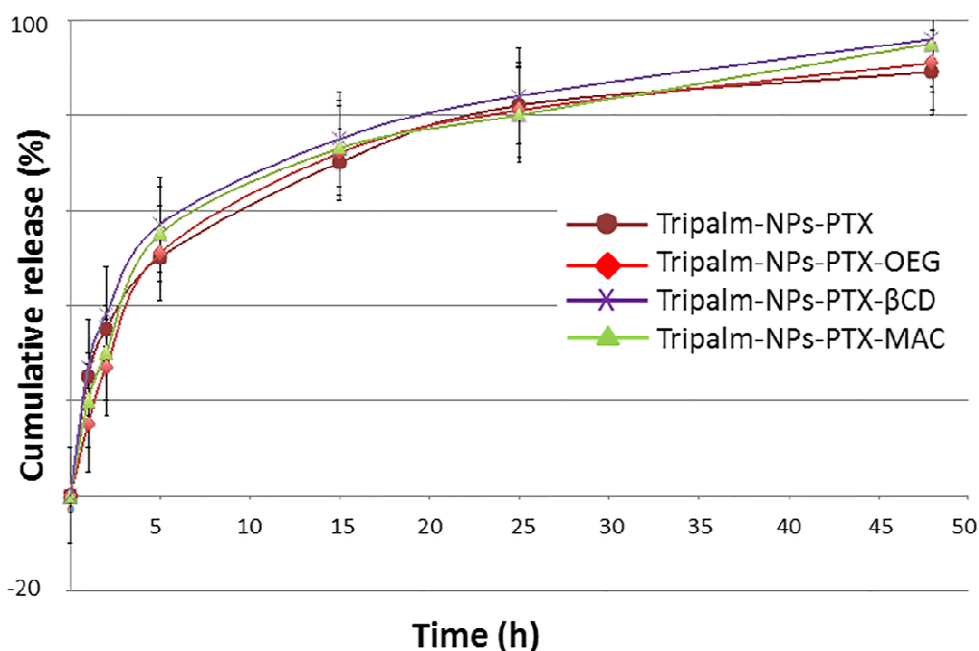


Figura 23. Liberación del PTX de las Tripalm-NPs y sus modificaciones. Se resuspendieron las muestras en una solución de PBS a 37 °C, y posteriormente se extrajeron con etanol. Se midió la cantidad de PTX en el medio mediante HPLC. Los datos representan la media ± SD de cuatro experiencias.

IV.2.2. Estudio de la biocompatibilidad de las Tripalm-NPs y sus modificaciones

La biocompatibilidad de las Tripalm-NPs y de sus modificaciones denominadas Tripalm-NPs-MAC, Tripalm-NPs-OEG y Tripalm-NPs-βCD (ver Materiales y Métodos) fue testada, como en el caso de las hollow-p4VP, mediante análisis de hemólisis en sangre y ensayos de citotoxicidad en células normales y tumorales de mama y pulmón. Los ensayos de hemólisis demostraron que ninguna de las formulaciones ensayadas produjeron una hemólisis superior a un 7,5% al entrar en contacto con GR de sangre

RESULTADOS

humana (Figura 24). Sólo el uso de NPs a las más altas concentraciones (2% V/V) alcanzaron este nivel de hemólisis. Además, el estudio pudo determinar que las formulaciones Tripalm-NPs y Tripalm-NPs-MAC indujeron un nivel de hemólisis significativamente menor ($p < 0,001$) que el resto, no superando el 4% a ninguna de las concentraciones utilizadas.

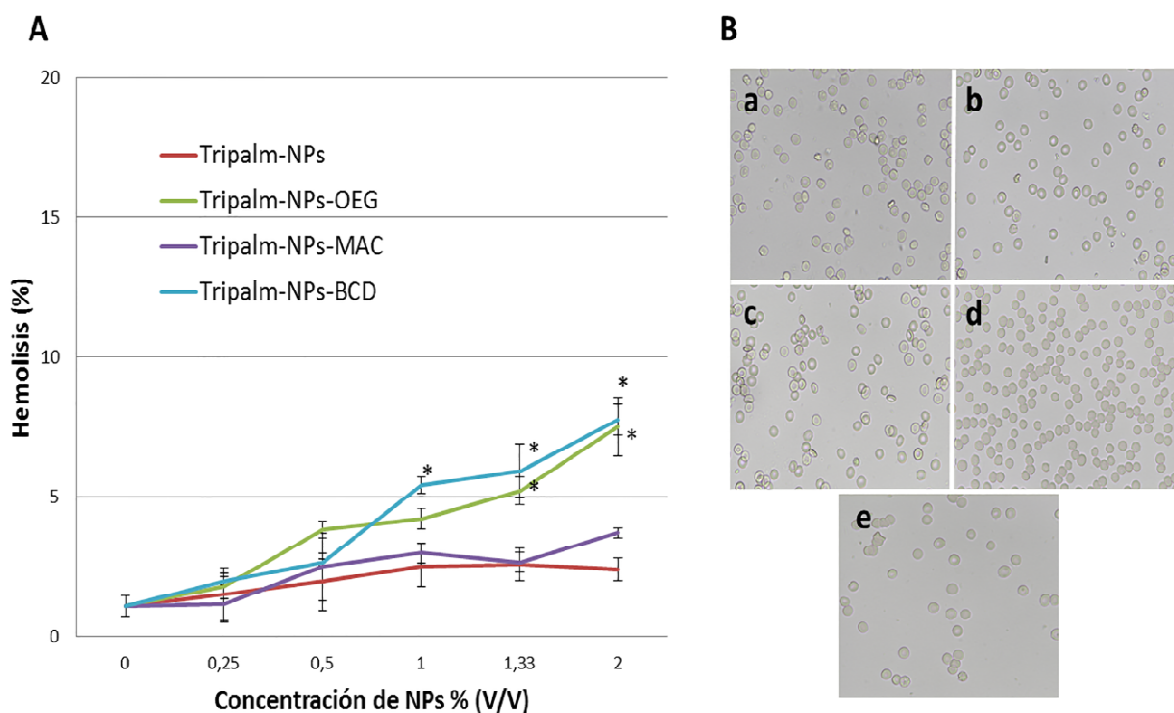


Figura 24. Análisis de la hemólisis (%) y alteraciones morfológicas inducidas por NPs de tripalmitina. A) Diferentes NPs de tripalmitina fueron ensayadas en GR de sangre humana a concentraciones crecientes durante 2 horas. Los datos representados indican el valor medio de cuatro réplicas \pm SD. *Diferencias significativas ($p < 0,001$) entre las Tripalm-NPs modificadas y Tripalm-NPs. B) Morfología de los GR humanos tras la exposición a una concentración del 2% (V/V) de (a) PBS; (b) Tripalm-NPs; (c) Tripalm-NPs-MAC; (d) Tripalm-NPs- β CD; (e) Tripalm-NPs-OEG. Magnificación = 40X.

El estudio de hemólisis fue completado con el análisis de la morfología de los GR de sangre periférica expuestos a la dosis más alta de las distintas nanoformulaciones. Como se puede observar en la Figura 24Bb y d), los tratamientos con Tripalm-NPs y Tripalm-NPs- β CD indujeron un escaso porcentaje de GR con conformación equinocítica (pliegues en su membrana), mientras que Tripalm-NPs-MAC y Tripalm-NPs-OEG (Figura

24Bc y e) provocaron pocas alteraciones entre las que se encontraron la presencia de estromatocitos (morfología de copa). Por tanto, de los resultados obtenidos se concluye que las nanoformulaciones no sólo no producen hemolisis, sino que además no alteran de forma significativa la morfología de los GR de la sangre.

Por otra parte, la toxicidad de las Tripalm-NPs fue ensayada en un amplio rango de líneas celulares tumorales y normales humanas derivadas de mama y pulmón. Las concentraciones utilizadas para los tratamientos fueron las equivalentes a las utilizadas en los ensayos de citotoxicidad con Tripalm-NPs-PTX. Como se observa en la Figura 25, la viabilidad de todas las células se mantuvo cercana al 100% tras el tratamiento, indicando la falta de toxicidad celular. Solo en la línea de cáncer de mama MDAMB231 y en su contrapartida celular normal, la línea MCF10A, se observó toxicidad (disminución de la proliferación del ~55% y ~80%, respectivamente) con la última dosis utilizada.

Para completar los ensayos de toxicidad, se estudió la viabilidad celular tras la exposición a las distintas modificaciones de las Tripalm-NPs sin carga, con resultados similares. En este caso, la toxicidad de las Tripalm-NPs-MAC, Tripalm-NPs-OEG y Tripalm-NPs- β CD blancas fue testada en las líneas de pulmón A549 y L132 (tumoral y no tumoral respectivamente), y en las líneas de mama MCF7 y MCF10A (tumoral y no tumoral respectivamente). Todas las líneas presentaron una viabilidad prácticamente del 100% para todas las nanoformulaciones (Figura 26). Solo Tripalm-NPs-MAC mostró cierta toxicidad en las líneas de mama MCF7 y MCF10A (~15% y ~20%, respectivamente).

RESULTADOS

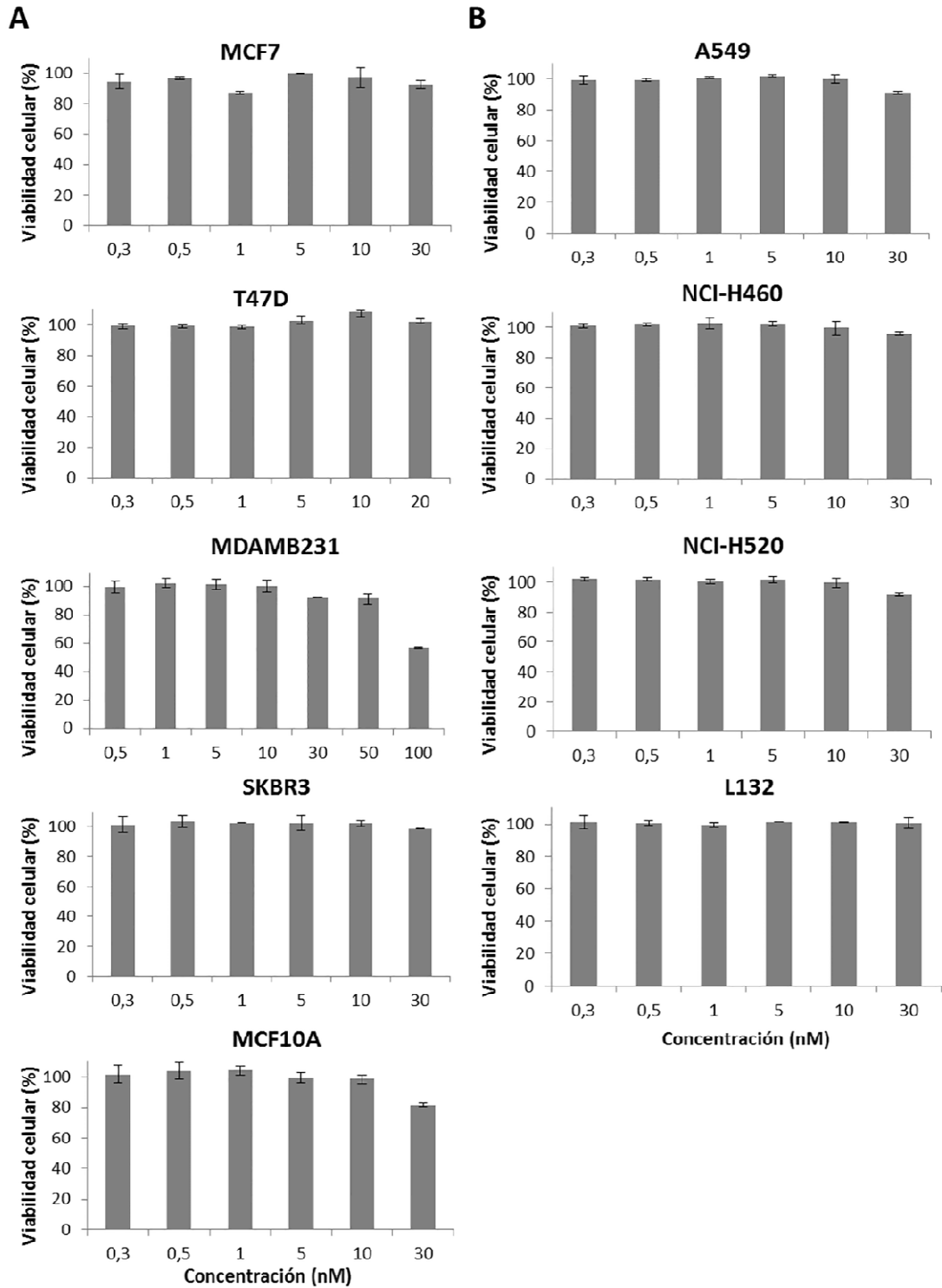


Figura 25. Estudio de la viabilidad celular de líneas celulares de mama (A) y pulmón (B) tratadas con Tripalm-NPs. Las células fueron tratadas con dosis crecientes de Tripalm-NPs. Los datos representan la media \pm SD de cuatro réplicas.

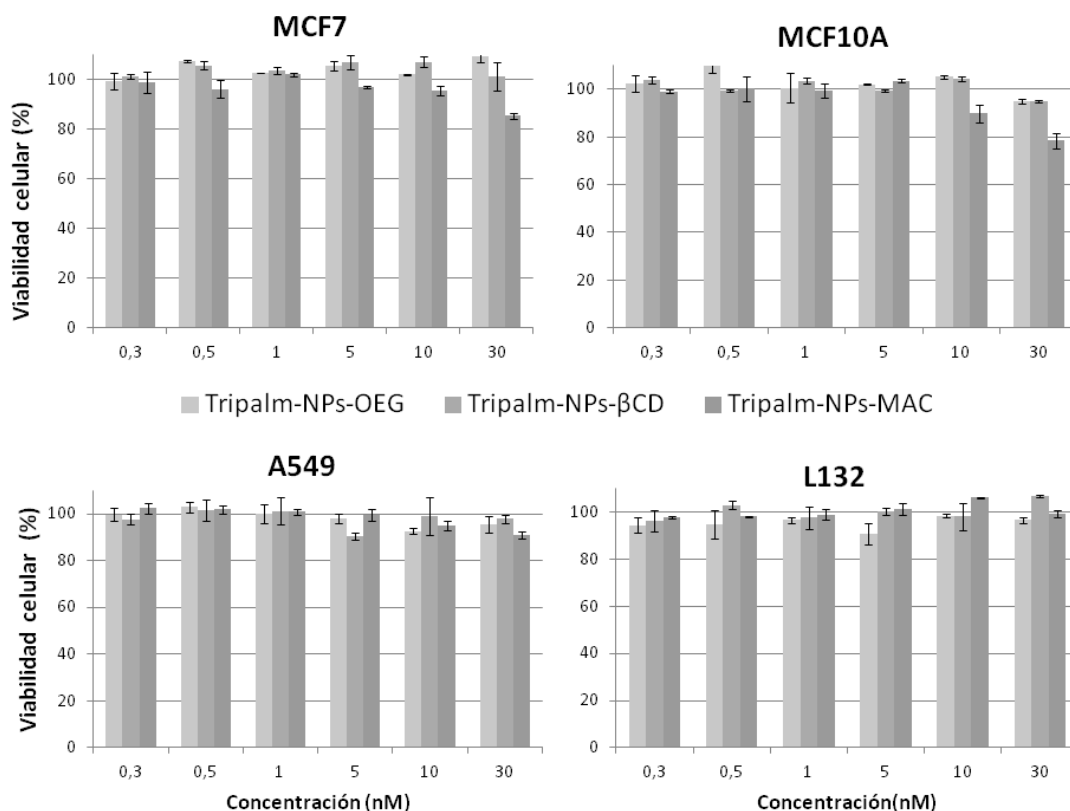


Figura 26. Estudio de la viabilidad celular (%) de líneas celulares de mama y pulmón tratadas con NPs modificadas de Tripalm-NPs. Las líneas tumorales y normales de mama (MCF7 y MCF10A) y de pulmón (A549 y L132) fueron tratadas con Tripalm-NPs-MAC, Tripalm-NPs-OEG y Tripalm-NPs-βCD a dosis crecientes. Los datos representan la media \pm SD de cuatro réplicas.

IV.2.3. Estudio de la citotoxicidad de Tripalm-NPs-PTX

Los resultados de los ensayos de proliferación sobre las diferentes líneas objeto de estudio mostraron que la incorporación de PTX en Tripalm-NPs produjo una disminución significativa ($p < 0,001$) de la viabilidad celular respecto al PTX libre en un amplio rango de líneas celulares humanas de cáncer de mama y pulmón expuestas al tratamiento durante 96 horas (Tabla 7 y 8; Figura 27).

En las líneas celulares tumorales de mama, la reducción de la IC_{50} del PTX estuvo en un rango de 18,5 veces en MCF7 (de $11,1 \pm 1,0$ a $0,6 \pm 0,1$ nM) hasta 40,5 veces en T47D ($8,1 \pm 1,5$ a $0,2 \pm 0,0$ nM) (Tabla 7). La única línea celular sin diferencias significativas entre el tratamiento con PTX libre y Tripalm-NPs-PTX fue la línea tumoral de mama MDAMB231 (1,2 veces de disminución de la IC_{50}). No obstante, esta línea sí

RESULTADOS

mostró diferencias significativas a concentraciones bajas del fármaco (1-30nM) (Figura 27). Por otra parte, la línea normal de mama MCF10A también mostró una reducción de la IC₅₀ del PTX con el uso de Tripalm-NPs-PTX (11,2 veces) pasando de 29,2 ± 4,9 nM a 2,6 ± 0,8 nM. No obstante, esta disminución fue mucho menor que la encontrada para líneas tumorales como MCF7 y T47D (Tabla 7).

Tabla 8. Citotoxicidad (IC₅₀) del PTX y Tripalm-NPs-PTX en líneas celulares normales y tumorales de mama.

Línea celular	IC ₅₀ PTX (nM)	IC ₅₀ Tripalm-PTX-NPs (nM)	IT	Sig.
MCF7	11,1 ± 1,0	0,6 ± 0,1	18,5	p<0,001
MDAMB231	69,3 ± 8,2	60,3 ± 21,5	1,2	p>0,05
T47D	8,1 ± 1,5	0,2 ± 0,0	40,5	p<0,001
SKBR3	23,9 ± 1,1	0,6 ± 0,1	39,8	p<0,001
MCF10A (normal)	29,2 ± 4,9	2,6 ± 0,8	11,2	p<0,001

Tabla 9. Citotoxicidad (IC₅₀) del PTX y Tripalm-NPs-PTX en líneas celulares normales y tumorales de pulmón.

Línea celular	IC ₅₀ PTX (nM)	IC ₅₀ Tripalm-PTX-NPs (nM)	IT	Sig.
A549	7,9 ± 0,9	0,4 ± 0,1	19,8	p<0,001
NCI-H460	15,5 ± 1,1	0,4 ± 0,0	38,8	p<0,001
NCI-H520	50,5 ± 3,4	2,7 ± 0,8	18,7	p<0,001
L132 (normal)	7,8 ± 0,7	0,2 ± 0,0	39	p<0,001

Los resultados en las líneas tumorales de pulmón mostraron una reducción de la IC_{50} tras el uso del PTX encapsulado, desde 18,7 veces para la línea NCI-H520 hasta 38,8 veces para la línea NCI-H460, en comparación con la IC_{50} del PTX libre (Tabla 8; Figura 27). Estos rangos de variación se asemejan a los descritos para las líneas de cáncer de mama. Todas las líneas celulares de pulmón mostraron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los tratamientos con PTX y Tripalm-NPs-PTX. La línea no tumoral de pulmón L132 presentó un alto valor de IT con una reducción de la IC_{50} mayor que en la línea normal de mama (de $7,8 \pm 0,7$ nM a $0,2 \pm 0,0$ nM), lo que sugiere una también menor selectividad para este tipo de células tumorales.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en ambos tipos celulares podemos concluir que las Tripalm-NPs-PTX mejoran significativamente el efecto del PTX libre en células tumorales de mama y pulmón, induciendo la muerte del 50% de las células a concentraciones mucho menores (de orden de 10 a 40 veces menos) que las necesarias con el fármaco libre. Además, nuestros resultados sugieren una cierta selectividad de Tripalm-NPs-PTX frente a las células tumorales de mama, selectividad que no pudo ser observada en la línea de pulmón.

RESULTADOS

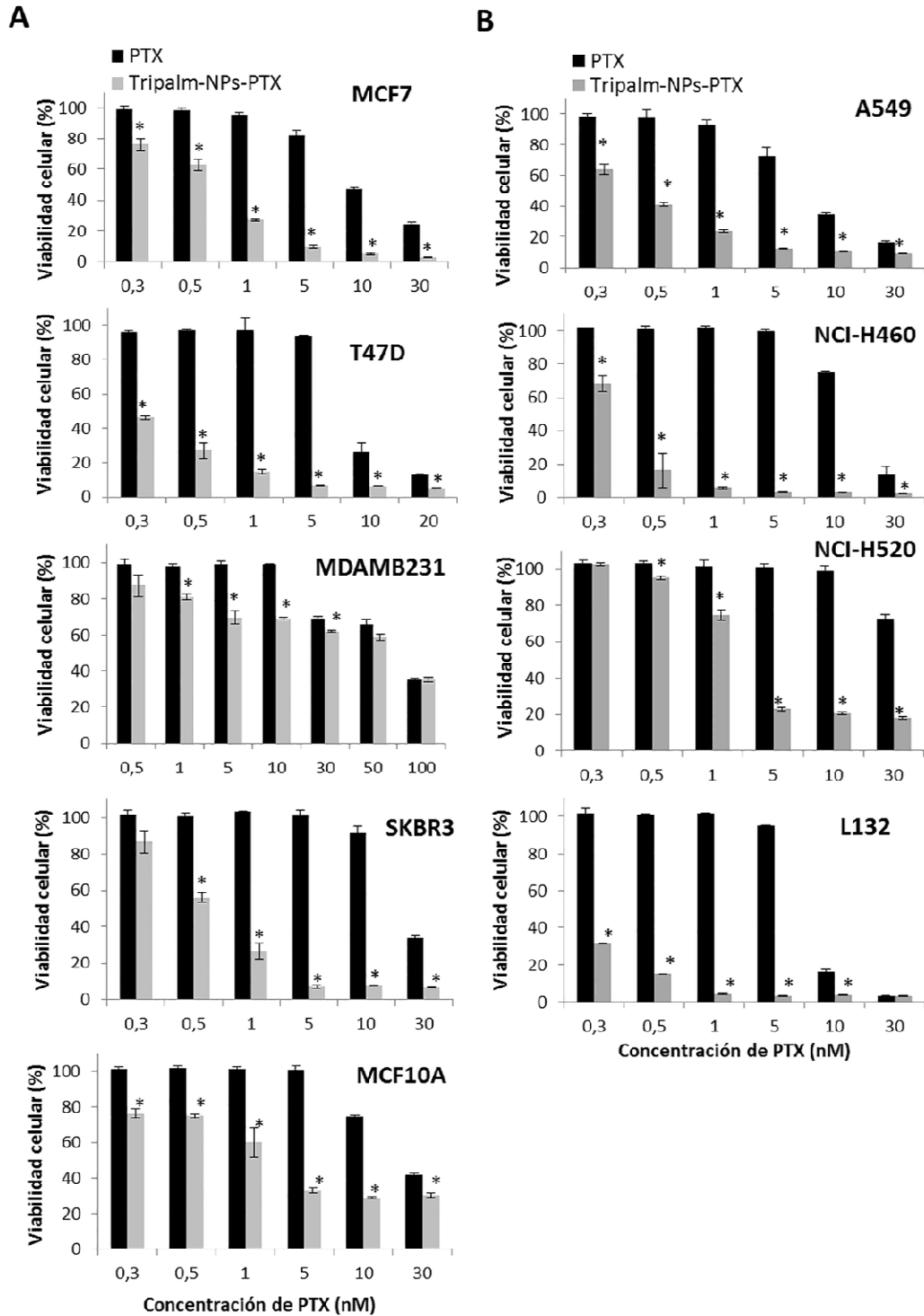


Figura 27. Análisis de la viabilidad celular (%) de las líneas celulares de mama (A) y pulmón (B) tras la incubación con PTX y Tripalm-NPs-PTX. Las células fueron sometidas a concentraciones crecientes de PTX y su equivalente de Tripalm-NPs-PTX durante 96 horas. Los datos representan la media \pm SD de cuatro réplicas. *Diferencias significativas ($p < 0,001$) entre PTX y Tripalm-NPs-PTX.

IV.2.4. **Estudio de la citotoxicidad de Tripalm-NPs-PTX modificadas**

La citotoxicidad con las Tripalm-NPs-PTX modificadas mediante MAC, OEG y β CD también se estudió en las líneas celulares de mama MCF7 (tumoral) y MCF10A (normal) y de pulmón A549 (tumoral) y L132 (normal), en las mismas condiciones que en las experiencias anteriores (Tabla 9 y 10; Figura 28), siendo su efecto, en todos los casos, menor que el de las Tripalm-NPs-PTX. Así, en la línea MCF7 los IT fueron desde 5,6 para Tripalm-NPs- β CD-PTX (de $11,1 \pm 1,0$ a $2,0 \pm 0,2$) hasta 15,9 para Tripalm-NPs-OEG-PTX (de $11,1 \pm 1,0$ a $0,7 \pm 0,1$) (Tabla 9). Esta última nanoformulación fue la más efectiva en este tipo de tumores, mostrando además una selectividad por las células tumorales de mama superior a la NP original de tripalmitina. De hecho, MCF10A presentó el IT más bajo con un valor de 3,7 (de $29,2 \pm 4,9$ a $7,9 \pm 1,5$). El resto de NPs-PTX no presentó selectividad tumoral, siendo los valores de IT de la línea tumoral y no tumoral muy parecidos. Además el IT de las NPs modificadas con MAC y β CD en la línea tumoral MCF7 siempre fue menor (en torno a 3 veces menos) que el de las NPs no modificadas.

Tabla 10. Citotoxicidad (IC_{50}) del PTX y Tripalm-NPs-PTX, Tripalm-NPs-MAC-PTX, Tripalm-NPs-OEG-PTX y Tripalm-NPs- β CD-PTX en líneas normales y tumorales de mama.

Línea celular	IC_{50} PTX (nM)	IC_{50} Tripalm-NPs-PTX (nM)	IC_{50} Tripalm-NPs-MAC-PTX (nM)	IC_{50} Tripalm-NPs-OEG-PTX (nM)	IC_{50} Tripalm-NPs- β CD-PTX (nM)
MCF7	$11,1 \pm 1,0$	$0,6 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,2$
MCF10A (normal)	$29,2 \pm 4,9$	$2,6 \pm 0,8$	$3,7 \pm 1,1$	$7,9 \pm 1,5$	$7,6 \pm 1,4$
Índice terapéutico					
MCF7		18,5	6,9	15,9	5,6
MCF10A (normal)		11,2	7,9	3,7	3,8

RESULTADOS

En la línea tumoral de pulmón los resultados obtenidos muestran que las Tripalm-NPs-MAC-PTX fueron las más efectivas con un IT de 11,3 (de $7,9 \pm 0,9$ a $0,7 \pm 0,1$) (Tabla 10). La mejora de la IC_{50} en L132 fue también elevada con las NPs modificadas, disminuyendo entre 11,1 veces con el uso de Tripalm-NPs- β CD-PTX y 13 veces con Tripalm-NPs-OEG-PTX y Tripalm-NPs-MAC-PTX.

Tabla 11. Citotoxicidad (IC_{50}) del PTX y Tripalm-NPs-PTX, Tripalm-NPs-MAC-PTX, Tripalm-NPs-OEG-PTX y Tripalm-NPs- β CD-PTX en líneas normales y tumorales de pulmón.

Línea celular	IC_{50} PTX (nM)	IC_{50} Tripalm-NPs-PTX (nM)	IC_{50} Tripalm-NPs-MAC-PTX (nM)	IC_{50} Tripalm-NPs-OEG-PTX (nM)	IC_{50} Tripalm-NPs- β CD-PTX (nM)
A549	$7,9 \pm 0,9$	$0,4 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$1,21 \pm 0,32$	$1,6 \pm 0,3$
L132 (normal)	$7,8 \pm 0,7$	$0,2 \pm 0,0$	$0,6 \pm 0,0$	$0,6 \pm 0,0$	$0,7 \pm 0,0$
Índice terapéutico					
A549		19,8	11,3	6,53	4,94
L132 (normal)		39	13	13	11,1

En base a estos resultados, podemos concluir que las Tripalm-NPs-MAC-PTX, Tripalm-NPs-OEG-PTX y Tripalm-NPs- β CD-PTX no suponen una mejora de la citotoxicidad de PTX en relación a las NPs no modificadas (Tripalm-NPs-PTX) en ninguna de las líneas celulares estudiadas. Sin embargo, la demostrada selectividad de Tripalm-NPs-OEG-PTX por células tumorales de mama podría ser una ventaja terapéutica especialmente en el diseño de experiencias *in vivo*.

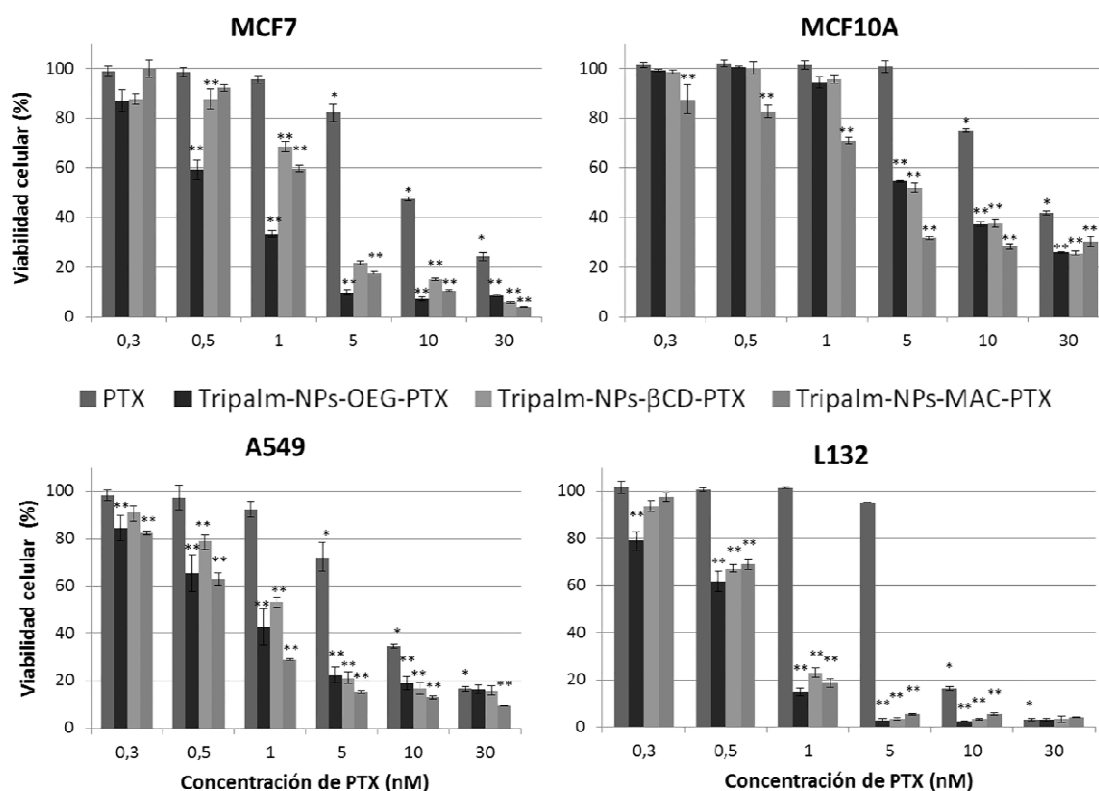


Figura 28. Viabilidad celular (%) de líneas celulares de mama y pulmón tras la incubación con PTX, Tripalm-NPs-MAC-PTX, Tripalm-NPs-OEG-PTX y Tripalm-NPs-βCD-PTX. Las células fueron sometidas a concentraciones crecientes de PTX y su equivalente de Tripalm-NPs-PTX modificadas durante 96 horas. Los datos representan la media ± SD de cuatro réplicas. *Diferencias significativas ($p < 0,001$) entre PTX y controles sin tratar. **Diferencias significativas ($p < 0,001$) entre PTX y las diferentes Tripalm-NPs-PTX.

IV.2.5. Estudio de la modulación del ciclo celular

El estudio del ciclo celular con Tripalm-NPs-PTX, Tripalm-NPs-MAC-PTX, Tripalm-NPs-OEG-PTX y Tripalm-NPs-βCD-PTX demostró que estas nanoformulaciones no alteran la funcionalidad del PTX en ninguna de las líneas celulares analizadas de mama y pulmón. Además, pudimos observar cómo el efecto producido por el PTX incorporado en estas NPs fue mayor que el que ejerce en su forma libre.

Concretamente, las Tripalm-NPs-PTX (Tablas 11 y 12) produjeron un aumento del porcentaje de células en fase subG1 en las líneas de cáncer de mama T47D (90,8% frente al 2%), MCF7 (61,2% frente al 0,8%) y las líneas de pulmón A549 (37,5% frente a 2,4) y NCI-H460 (35% frente a 1,1%), siempre muy superior al producido por PTX libre.

RESULTADOS

Por otra parte, las Tripalm-NPs-PTX indujeron un aumento del porcentaje de células, en vez de en fase subG1, en fase G2/M en las líneas MDAMB231 (31,7% frente al 22,8%), SKBR3 (32,5% frente al 15,9%) y NCH-H520 (49,4% frente al 22,9%) respecto a las células sin tratar. Este comportamiento fue semejante al que ejerce el PTX, salvo en el caso de SKBR3 en la que PTX libre indujo un efecto ligeramente mayor sobre el ciclo celular. La acumulación en fase G2/M tras el tratamiento con Tripalm-NPs-PTX respecto a las células control también pudo verse en las líneas celulares normales, como MCF10A (49,6%, frente a 19,4%) y L132 (25,8% frente a 17,7%) (Tablas 11 y 12).

Tabla 12. Modulación del ciclo celular en líneas celulares de mama tratadas con PTX y Tripalm-NPs-PTX. Las células fueron expuestas a los diferentes tratamientos (IC₅₀) durante 48 horas.

Línea celular	Tratamiento	SubG1	G1	S	G2/M
MCF7	Control	0,3	45,6	25,7	28,3
	PTX	0,8	44,9	23,3	31,0
	Tripalm-NPs-PTX	61,2	5,9	5,9	27,1
	Tripalm-NPs	0,6	46,4	24,3	28,7
T47D	Control	1,5	43,7	32,9	21,9
	PTX	2,0	45,0	33,3	19,7
	Tripalm-NPs-PTX	90,8	2,5	3,2	3,4
	Tripalm-NPs	1,8	43,5	34,5	20,2
MDAMB231	Control	18,6	30,1	28,4	22,8
	PTX	29,6	13,7	19,6	37,1
	Tripalm-NPs-PTX	23,2	17,2	27,9	31,7
	Tripalm-NPs	24,4	25,2	28,6	21,9
SKBR3	Control	1,8	64,8	17,5	15,9
	PTX	5,1	26,5	17,0	51,3
	Tripalm-NPs-PTX	3,4	46,6	17,6	32,5
	Tripalm-NPs	2,5	66,9	17,0	13,4
MCF10A	Control	2,7	65,8	12,1	19,4
	PTX	35,0	16,2	11,5	37,4
	Tripalm-NPs-PTX	20,7	22,6	7,2	49,6
	Tripalm-NPs	2,5	74,4	9,2	13,9

Tabla 13. Modulación del ciclo celular en líneas celulares de pulmón tratadas con PTX y Tripalm-NPs-PTX. Las células fueron expuestas a los diferentes tratamientos (IC_{50}) durante 48 horas.

Línea celular	Tratamiento	SubG1	G1	S	G2/M
A549	Control	0,1	59,7	24,3	16,0
	PTX	2,4	73,9	16,6	7,1
	Tripalm-NPs-PTX	37,5	24,5	31,7	6,3
	Tripalm-NPs	0,5	69,0	20,7	9,7
NCI-H460	Control	1,8	51,7	26,9	19,6
	PTX	1,1	45,9	29,6	23,4
	Tripalm-NPs-PTX	35,0	11,2	23,1	30,7
	Tripalm-NPs	1,2	44,4	30,6	23,7
NCI-H520	Control	14,3	46,7	16,2	22,9
	PTX	25,4	16,4	11,8	46,4
	Tripalm-NPs-PTX	27,8	13,7	9,1	49,4
	Tripalm-NPs	13,6	47,5	17,1	21,8
L132	Control	1,0	65,0	16,3	17,7
	PTX	6,9	61,9	16,8	14,4
	Tripalm-NPs-PTX	55,6	4,9	13,7	25,8
	Tripalm-NPs	1,0	63,9	16,3	18,8

El estudio del efecto de las modificaciones de Tripalm-NPs-PTX con OEG, β CD y MAC sobre el ciclo celular demostró efectos similares a los descritos previamente tanto en las líneas celulares de mama como de pulmón (Tabla 13). Todas las modificaciones provocaron una fuerte parada del ciclo celular en fase G2/M en la línea MCF7 con un porcentaje celular del 63,8%, 63,5% y 73,2% para Tripalm-NPs-MAC-PTX, - OEG-PTX y β CD-PTX, respectivamente, y en relación al obtenido con PTX libre (31,0%). No obstante, en el caso de A549, el mayor porcentaje celular se detectó en fase subG1 tras el tratamiento con las Tripalm-NPs-OEG-PTX (46,5%), Tripalm-NPs- β CD-PTX (46,3%) y Tripalm-NPs-MAC-PTX (41,1%). Datos similares se obtuvieron con las líneas celulares normales, incrementándose el porcentaje de células en fase subG1 tras el tratamiento con las diferentes Tripalm-NPs-PTX modificadas. Concretamente, en la línea normal de mama MCF10A el porcentaje de células en fase SubG1 aumentó

RESULTADOS

con el uso de Tripalm-NPs-OEG-PTX (49,2%), Tripalm-NPs- β CD-PTX (49,0%) y Tripalm-NPs-MAC-PTX (57,3%), respecto a PTX libre (35,0%).

Tabla 14. Modulación del ciclo celular en líneas celulares de mama y pulmón tratadas con PTX y Tripalm-NPs-PTX modificadas. Las células fueron expuestas a los diferentes tratamientos (IC50) durante 48 horas.

Línea celular	Tratamiento	SubG1	G1	S	G2/M
MCF7	Control	0,3	45,6	25,7	28,3
	PTX	0,8	44,9	23,3	31,0
	Tripalm-NPs-OEG-PTX	4,8	21,5	9,9	63,8
	Tripalm-NPs-OEG	0,2	53,9	25,9	20,0
	Tripalm-NPs- β CD-PTX	3,3	22,9	10,3	63,5
	Tripalm-NPs- β CD	0,3	55,1	23,7	20,9
	Tripalm-NPs-MAC-PTX	4,1	14,3	8,4	73,2
	Tripalm-NPs-MAC	0,2	53,8	24,2	21,8
MCF10A	Control	2,7	65,8	12,1	19,4
	PTX	35,0	16,2	11,5	37,4
	Tripalm-NPs-OEG-PTX	49,2	30,2	13,8	6,9
	Tripalm-NPs-OEG	1,7	55,8	18,6	24,0
	Tripalm-NPs- β CD-PTX	49,0	25,5	16,4	9,0
	Tripalm-NPs- β CD	2,8	56,5	16,9	23,7
	Tripalm-NPs-MAC-PTX	57,3	23,4	10,6	8,7
	Tripalm-NPs-MAC	1,8	61,0	16,3	20,9
A549	Control	0,1	59,7	24,3	16,0
	PTX	2,4	73,9	16,6	7,1
	Tripalm-NPs-OEG-PTX	46,5	15,0	22,0	16,5
	Tripalm-NPs-OEG	0,7	53,2	24,6	21,5
	Tripalm-NPs- β CD-PTX	46,3	14,8	21,7	17,3
	Tripalm-NPs- β CD	0,7	53,8	25,0	19,5
	Tripalm-NPs-MAC-PTX	41,1	15,5	23,0	20,5
	Tripalm-NPs-MAC	0,6	54,1	24,9	20,4

Tabla 15. (continuación) Modulación del ciclo celular en líneas celulares de mama y pulmón tratadas con PTX y Tripalm-NPs-PTX modificadas. Las células fueron expuestas a los diferentes tratamientos (IC50) durante 48 horas.

Línea celular	Tratamiento	SubG1	G1	S	G2/M
L132	Control	1,0	65,0	16,3	17,7
	PTX	6,9	61,9	16,8	14,4
	Tripalm-NPs-OEG-PTX	42,4	14,3	29,2	14,2
	Tripalm-NPs-OEG	1,4	65,3	16,8	16,5
	Tripalm-NPs- β CD-PTX	50,3	10,6	25,2	13,9
	Tripalm-NPs- β CD	1,3	66,4	16,7	15,6
	Tripalm-NPs-MAC-PTX	50,3	9,9	22,4	17,3
	Tripalm-NPs-MAC	1,6	64,6	16,4	17,3

Similares resultados fueron obtenidos en la línea normal de pulmón L132 en donde Tripalm-NPs-OEG-PTX, - β CD-PTX y -MAC-PTX indujeron un 42,4%, 50,3% y 50,3% de acúmulo celular, respectivamente, en relación al inducido por PTX libre (6,9%).

IV.2.6. Análisis de la internalización celular

Para los estudios de internalización celular de las Tripalm-NPs se sintetizaron las Tripalm-NPs-FITC (ver Materiales y Métodos). Tras exponer las células a una dosis de estas NPs correspondiente a una concentración de FITC de 21,6 μ M, y a la misma concentración de FITC libre (control) durante 4, 24 y 48 horas, se llevó a cabo citometría de flujo para determinar la modificación en la intensidad de fluorescencia (Figura 29). Los resultados obtenidos mostraron comportamientos similares en todas las líneas celulares testadas tanto tumorales como normales de pulmón y de mama (A549, L132, MCF7 y MCF10A). Así, el patrón de internalización fue tiempo-dependiente en todas las líneas celulares. En MCF7, MCF10A y A549 pudimos observar un significativo incremento de la incorporación de FITC al interior celular cuando estaba asociado a NPs (Tripalm-NPs-FITC), incremento que fue más intenso a las 4 horas de exposición y que se mantuvo a las 24 y 48 horas. En el caso de la línea normal

RESULTADOS

de pulmón L132, la diferencia de intensidad de fluorescencia entre el FITC libre y encapsulado fue menor, incrementándose sólo tras 24 y 48 horas de exposición.

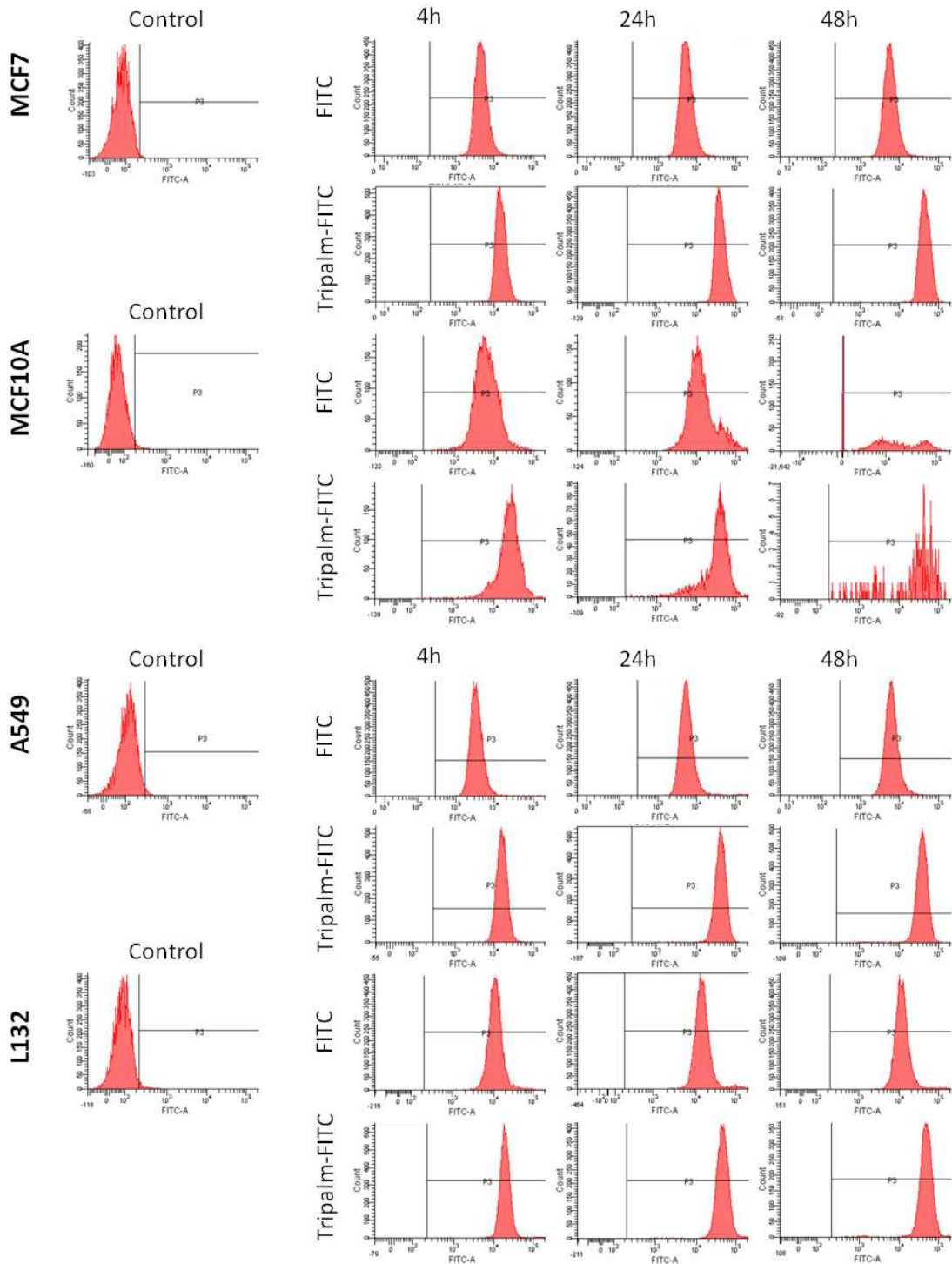


Figura 29. Estudio de la internalización celular de Tripalm-NPs-FITC en las líneas celulares de mama (MCF7 y MCF10A) y pulmón (A549 y L132) mediante FACScan. Las células fueron tratadas con Tripalm-NPs-FITC y FITC libre a diferentes tiempos de exposición (4, 24 y 48h). Células sin tratar fueron usadas como control.

En cualquier caso, el uso de Tripalm-NPs-FITC indujo una mayor internalización celular del fluoróforo que el FITC libre, lo que sugiere que nuestra NPs facilita la entrada del mismo a través de la membrana citoplasmática.

Estos resultados fueron corroborados mediante microscopía de fluorescencia. El estudio realizado a los mismos tiempos que el ensayo de citometría de flujo confirmó el modelo de internalización tiempo-dependiente. Como se observa en Figura 30, MCF7 y A549 presentaron un marcaje muy débil (verde) cuando FITC no estuvo incorporado en las Tripalm-NPs y mucho más intenso con el uso de Tripalm-NPs-FITC. Respecto al patrón de distribución del fluorocromo en el interior celular, se observó fluorescencia sólo en el citoplasma celular con el uso de Tripalm-NPs-FITC pero no en el núcleo. Sin embargo, se pudo demostrar marcaje nuclear con el FITC libre. Además, la distribución de la fluorescencia fue homogénea con el uso del FITC libre, mientras que el FITC encapsulado provocó una distribución no uniforme apareciendo zonas más intensas con patrón punteado. En concreto, en el caso de las células MCF7, apareció un claro patrón de marcaje más intenso en la periferia nuclear.

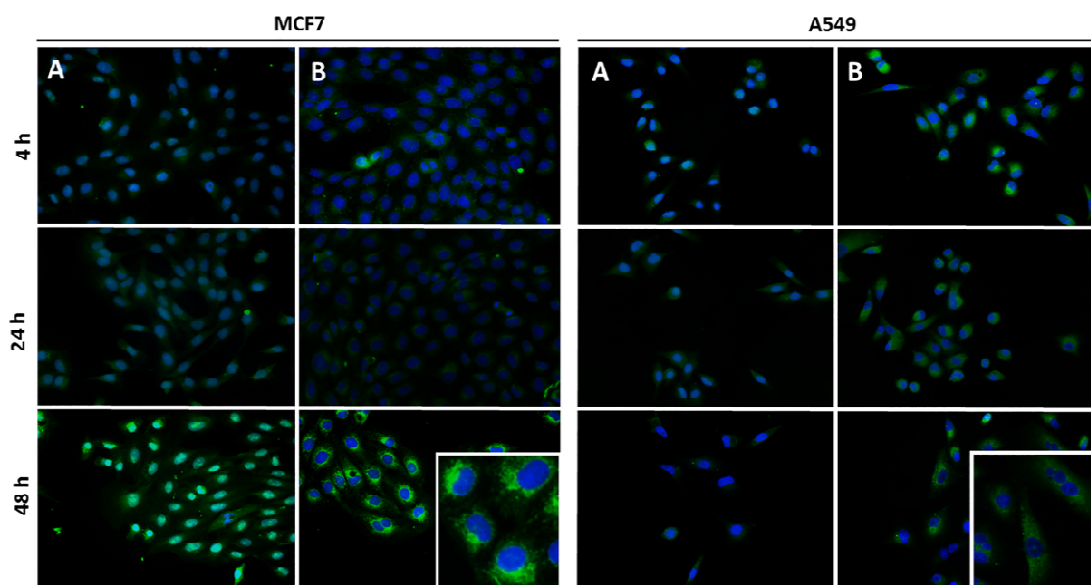


Figura 30. Imágenes de microscopía de fluorescencia representativas de la internalización celular de FITC en las líneas MCF7 y A549. Las células fueron tratadas con FITC (A) y Tripalm-NPs-FITC (B) ($21,6 \mu\text{M}$) (verde) a diferentes tiempos (4, 24 y 28h). Los núcleos celulares están marcados en azul. Magnificación = 40X.

RESULTADOS

IV.2.7. Análisis de la citotoxicidad de las Tripalm-NPs-PTX en esferoides multicelulares (MTS)

Para determinar la efectividad de las Tripalm-NPs-PTX sobre un sistema experimental que imita a las masas tumorales *in vivo*, se seleccionaron dos líneas celulares representativas de cáncer pulmón y mama (A549 y MCF7, respectivamente), y se generaron MTS para someterlos al tratamiento.

Las Tripalm-NPs blancas no indujeron modificaciones significativas del volumen de los MTS respecto a los controles sin tratar, indicando la biocompatibilidad de las NPs blancas sobre los MTS. Tal y como se describió en las hollow-p4VP (Capítulo I), los MTS de células de mama no tratados o tratados con las NPs blancas presentaron un volumen estable a lo largo del tiempo ($\sim 4 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$) y sin diferencias significativas entre ellos (Figura 31C).

Por otra parte, los MTS derivados tanto de la línea A549 como MCF7 tratados con PTX y Tripalm-NPs-PTX, mostraron diferencias significativas de volumen ($p < 0,001$) en relación a los controles sin tratar y tratados con Tripalm-NPs blancas. No obstante, el resultado más interesante fue que el tratamiento con Tripalm-NPs-PTX produjo una disminución significativamente mayor ($p < 0,001$) del volumen de los MTS respecto al tratamiento con el PTX libre en todos los casos, disminución que pudo ser detectada a partir del día 2 de la experiencia, con volúmenes de $3,5 \times 10^{-3}$ y $2,7 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$ para MTS de A549 y MCF7, respectivamente (Figura 31C y D). Los análisis realizados el día 4 de tratamiento determinaron que los MTS de MCF7 disminuyeron su volumen tan solo ligeramente ($\sim 3,4 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$ para PTX; y $\sim 2,4 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$ para Tripalm-NPs-PTX), provocando una disminución del volumen de las masas tumorales respecto a los controles de aproximadamente un 25% y un 47%, respectivamente.

El crecimiento de los MTS de A549 mostró un comportamiento diferente, con un volumen inicial ($\sim 2,5 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$) que aumentó a lo largo del tiempo ($\sim 2,7 \times 10^{-2} \text{ mm}^3$). Tal y como muestra la Figura 31D, el día 2 se apreciaron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los volúmenes de los MTS control y tratados con Tripalm-NPs ($\sim 6 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$) y los MTS tratados con PTX ($\sim 5 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$) y Tripalm-NPs-PTX ($\sim 3,5 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$). Como en el caso del cáncer de mama, el resultado más interesantes fue la demostración de diferencias significativas entre la reducción del volumen de los MTS

tratados con PTX libre y Tripalm-NPs-PTX ($p < 0,001$). Así, tras 9 días de tratamiento (ver Materiales y Métodos), los volúmenes de los MTS tratados con PTX y Tripalm-NPs-PTX se mantuvieron estables, mientras que en los MTS control y tratados con Tripalm-NPs aumentaron hasta $\sim 2,6 \times 10^{-2} \text{ mm}^3$.

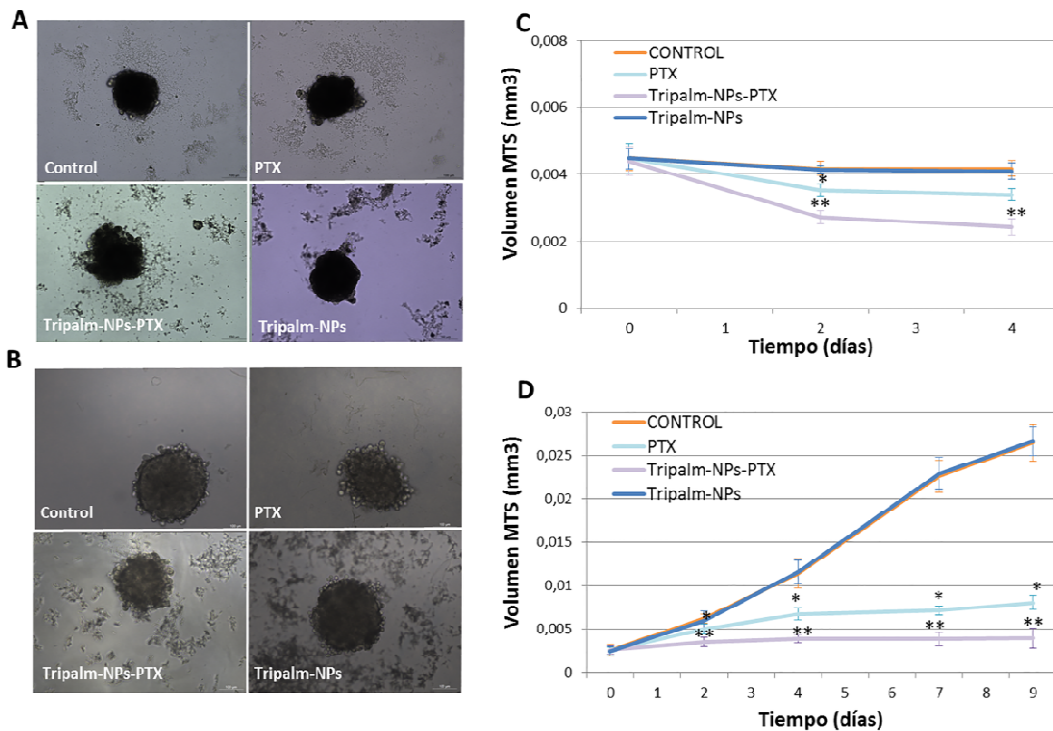


Figura 31. Análisis de la modulación del volumen de MTS tratados con Tripalm-NPs-PTX. Imágenes representativas de los esferos de A) MCF7 y B) A549 al día 4 de la experiencia tratados con PTX y Tripalm-NPs-PTX. MTS expuestos a Tripalm-NPs y sin tratamiento fueron usados como control. Barra = 100 μm . Representación gráfica del volumen de los MTS a los distintos tiempos en C) MCF7 y D) A549. Los datos representan la media \pm SD de 8 réplicas. *Diferencias significativas ($p < 0,001$) entre MTS tratados con PTX y controles. **Diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los MTS tratados con Tripalm-NPs-PTX y PTX.

En el caso de tratamiento con PTX, la disminución de volúmenes en los MTS fue de $\sim 70\%$ mientras que con Tripalm-NPs-PTX fue de $\sim 85\%$. Las Figuras 31A y B muestran los MTS de MCF7 y A549 en el día 4 de tratamiento, observándose una diferencia de tamaño entre los controles tratados con PTX y Tripalm-NPs-PTX y los MTS sin tratar o tratados con las Tripalm-NPs blancas, y también entre los tratados con PTX

RESULTADOS

y Tripalm-NPs-PTX. Las diferencias fueron más evidentes en los MTS de A549 (Figura 31B) porque los esferos de MCF7 mostraron una menor integridad.

El mayor efecto del PTX encapsulado que el PTX libre sobre los MTS fue confirmado mediante experiencias de determinación de apoptosis mediante la técnica de TUNEL. Así, en la Figura 32 se puede apreciar cómo tras 4 días de exposición a los diferentes tratamientos, el área apoptótica en la superficie de los MTS de mama y pulmón tratados con Tripalm-NPs-PTX y la pérdida de la integridad del esferoide fue mayor que en los tratados con PTX libre. No obstante, esta diferencia pudo ser apreciada de una forma más evidente en los MTS generados a partir de la línea tumoral de pulmón A549, tal y como se puede apreciar al comparar la intensidad en la fluorescencia de ambas imágenes. Estos resultados sugieren que la incorporación de PTX en las Tripalm-NPs promueve la actividad antitumoral de este fármaco frente a masas tumorales, lo que podría ser trasladado a futuros ensayos *in vivo*.

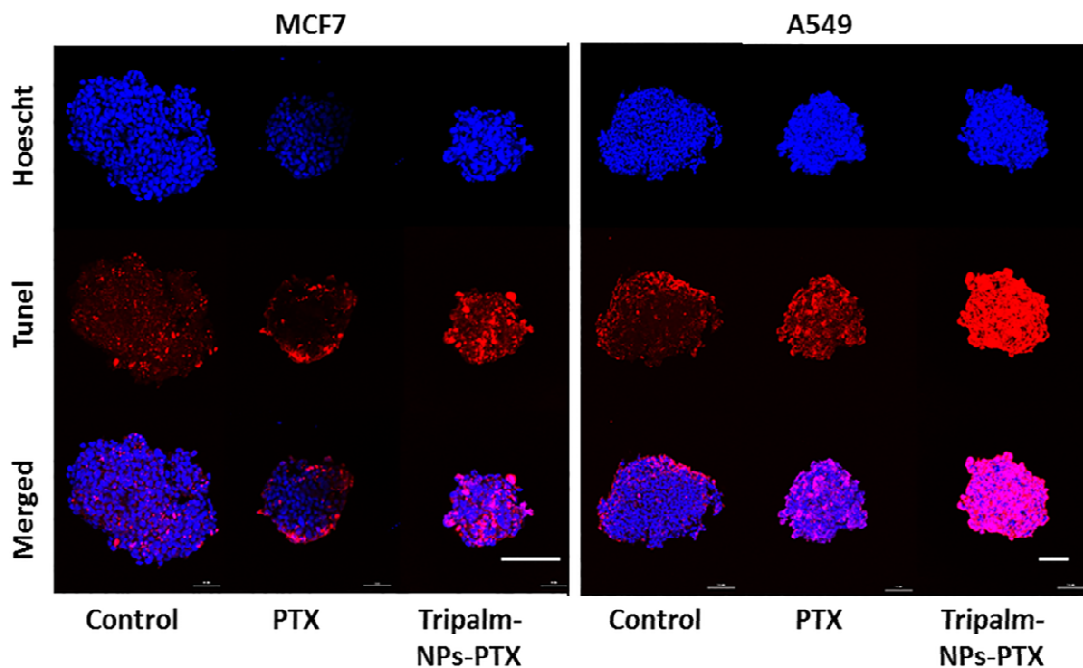


Figura 32. Imágenes representativas de la apoptosis producida por PTX y Tripalm-NPs-PTX en MTS de MCF7 y A549. La apoptosis fue detectada mediante TUNEL (rojo). Los MTS fueron tratados con PTX y Tripalm-NPs-PTX durante 4 días. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul). Magnificación= 40X. Barra = 100 μ m.

IV.2.8. Estudio de inhibición de P-glicoproteína mediante Tripalm-NPs-PTX y Tripalm-NPs-MAC-PTX.

La capacidad de inhibir los mecanismos de resistencia a fármacos mediados por el transportador P-gp se estudió a través de ensayos de citotoxicidad, citometría de flujo y microscopía de fluorescencia, utilizando como modelo la línea tumoral HCT-15 que sobreexpresa P-gp y la línea tumoral T84 que carece de dicha expresión. Ambas líneas tumorales proceden de cáncer de colon. Para el estudio se seleccionaron las Tripalm-NPs-PTX y las Tripalm-NPs-MAC-PTX comparándolas, por un lado, con PTX libre sólo y asociado a verapamilo (inhibidor de P-gp) (Figura 33 y 34 A) y, por otro, con la administración conjunta de las NPs blancas y el PTX libre (Figura 33 y 34 B).

Los ensayos de citotoxicidad realizados sobre HCT-15 mostraron diferencias significativas entre los tratamientos con y sin verapamilo en todos los casos (Tabla 14; Figura 33A).

Tabla 16. Citotoxicidad (IC_{50}) de Tripalm-NPs-PTX y las Tripalm-NPs-MAC-PTX asociadas o no a verapamilo, en la línea celular resistente HCT-15 y la sensible T84. Los tratamientos combinados incluyeron el uso de PTX libre y Tripalm-NPs blancas.

Tratamiento	HCT-15		T84	
	IC_{50} (nM)	IT	IC_{50} (nM)	IT
PTX			4,6 ± 1,0	
PTX + V	52,0 ± 3,1		4,3 ± 0,7	1,1
Tripalm-NPs-PTX	7,4 ± 1,0		1,7 ± 0,2	2,7
Tripalm-NPs-PTX + V	0,5 ± 0,1	14,8	1,5 ± 0,2	1,1
Tripalm-NPs-MAC-PTX	14,2 ± 0,6		2,3 ± 0,3	2
Tripalm-NPs-MAC-PTX + V	1,4 ± 0,3	10,1	2,4 ± 0,4	1
Tripalm-NPs + PTX	7,7 ± 0,7		3,9 ± 0,5	1,2
Tripalm-NPs-MAC + PTX	11,1 ± 0,9		4,2 ± 0,7	1,1

RESULTADOS

Mientras que PTX apenas presentó efecto en esta línea celular (no alcanzó el 10% de citotoxicidad con la dosis más alta), la administración conjunta de PTX y verapamilo consiguió disminuir la IC_{50} de PTX hasta $52,0 \pm 3,1$ nM. Por otro lado, tanto las Tripalm-NPs-PTX como las Tripalm-NPs-MAC-PTX consiguieron una reducción significativa de la IC_{50} del PTX I junto con el verapamilo ($p < 0,001$), llegando hasta $7,4 \pm 1,0$ nM y $14,2 \pm 0,6$ nM, respectivamente. Al comparar estos resultados con la administración conjunta de estas NPs y verapamilo, se observó que esta combinación aumentó aún más su efecto: 14,8 veces para Tripalm-NPs-PTX + verapamilo y 10,1 veces para Tripalm-NPs-MAC-PTX + verapamilo. Sin embargo, las Tripalm-NPs-MAC-PTX no mostraron mejores resultados que las Tripalm-NPs-PTX sin modificar, lo que implicaría que el MAC no induce ninguna ventaja terapéutica respecto a las NPs originales en cuanto a la inhibición de P-gp.

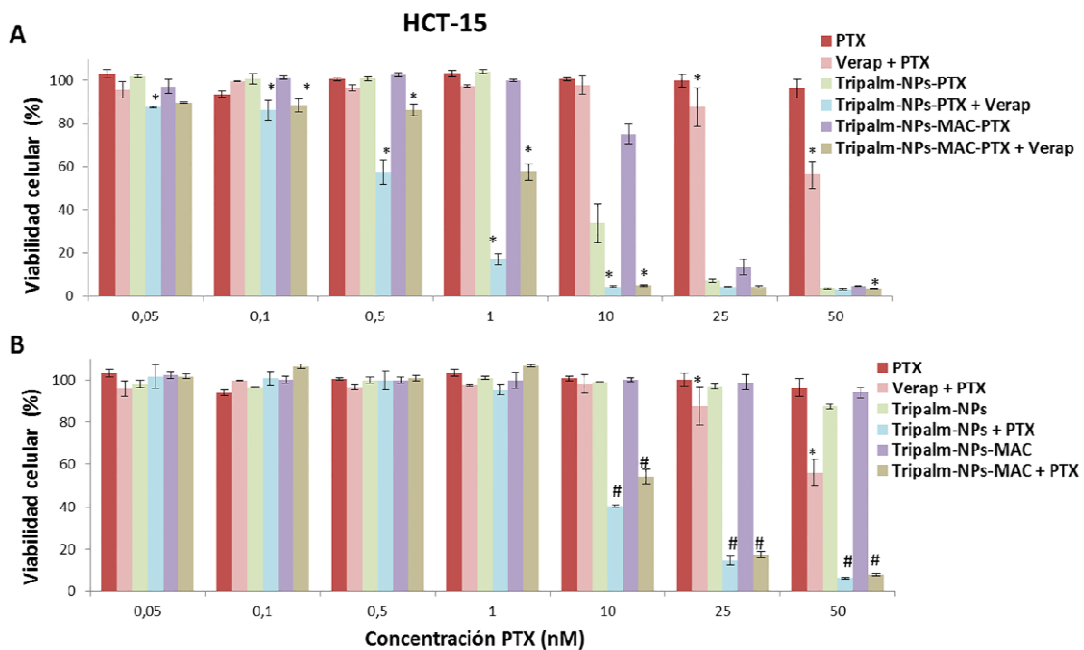


Figura 33. Estudio de la viabilidad celular (%) de la línea celular resistente HCT-15 tras el tratamiento con Tripalm-NPs-PTX y Tripalm-NPs-MAC-PTX. Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de A) PTX, Tripalm-NPs-PTX y Tripalm-NPs-MAC-PTX y sus combinaciones con verapamilo y B) NPs blancas Tripalm-NPs y Tripalm-NPs-MAC y sus combinaciones con PTX libre. Los datos representan la media \pm SD de cuatro réplicas. *Diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los tratamientos con y sin verapamilo. #Diferencias significativas ($p < 0,001$) entre PTX y NPs blancas + PTX.

Por otra parte, mientras que las NPs blancas no presentaron toxicidad alguna en esta línea celular, la administración conjunta de las NPs blancas + PTX libre dio lugar a valores de IC₅₀ similares a los obtenidos con las NPs-PTX (7,7 ± 0,7 nM para Tripalm-NPs + PTX; 11,1 ± 0,9 para Tripalm-NPs-MAC + PTX). Esto indicaría la capacidad de estas NPs para bloquear las resistencias mediante P-gp *per se* (Tabla 14; Figura 33B). La administración de estos mismos tratamientos en la línea celular sensible T84 indujeron resultados muy diferentes (Tabla 14; Figura 34).

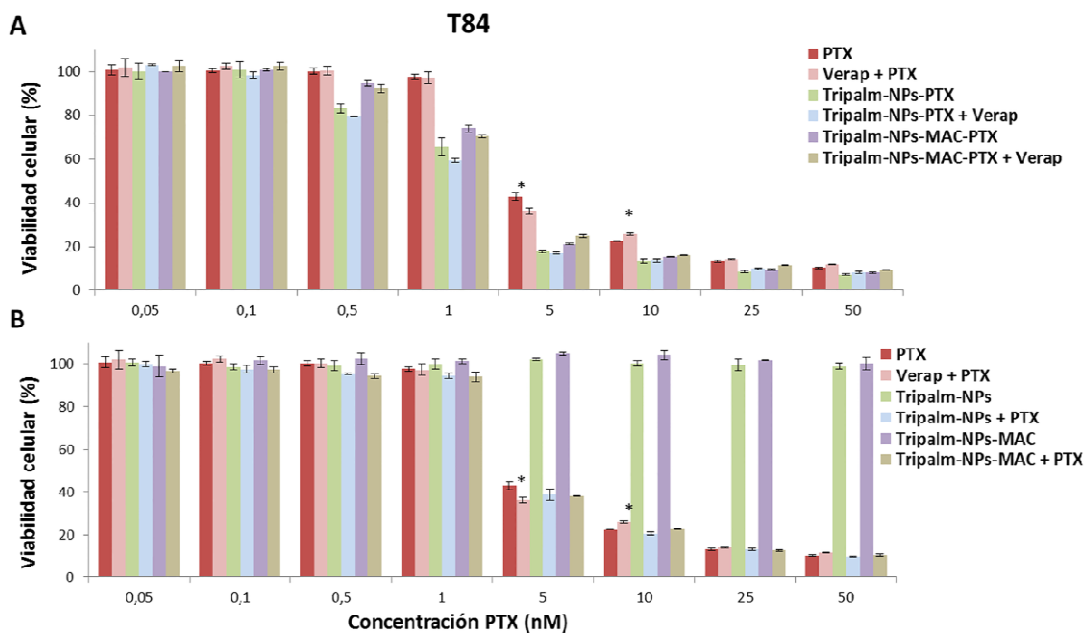


Figura 34. Estudio de la viabilidad celular (%) de la línea celular sensible T84 tras el tratamiento con Tripalm-NPs-PTX y Tripalm-NPs-MAC-PTX. Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de A) PTX, Tripalm-NPs-PTX y Tripalm-NPs-MAC-PTX y sus combinaciones con verapamilo y B) NPs blancas Tripalm-NPs y Tripalm-NPs-MAC y sus combinaciones con PTX libre. Los datos representan la media ± SD de cuatro réplicas. *Diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los tratamientos con y sin verapamilo. #Diferencias significativas ($p < 0,001$) entre PTX y NPs blancas + PTX.

RESULTADOS

El PTX libre alcanzó un valor de IC_{50} de $4,6 \pm 1,0$ nM, similar al obtenido por PTX + verapamilo. Tanto Tripalm-NPs-PTX como Tripalm-NPs-MAC-PTX redujeron la viabilidad celular significativamente ($p < 0,001$) 2,7 veces y 2 veces, respectivamente, en relación al PTX. Sin embargo, en los dos casos, la incorporación de verapamilo no consiguió modificar su efecto, y tampoco la incubación con NPs blancas + PTX mostró un aumento de la citotoxicidad respecto al PTX solo, muy al contrario de lo que ocurrió en HCT-15. Cabe destacar que en T84 también fueron las Tripalm-NPs-PTX las que presentaron un mayor efecto en la reducción de la IC_{50} , en detrimento de las Tripalm-NPs-MAC-PTX ($1,7 \pm 0,2$ frente a $2,3 \pm 0,3$ nM). Por último, las NPs blancas no afectaron a la viabilidad celular en todas las concentraciones testadas en esta línea celular.

Para corroborar los resultados anteriormente expuestos se analizó la retención de la Rh (sustrato de la P-gp) en las células HCT-15 mediante técnicas de citometría de flujo y microscopía de fluorescencia (Figura 35). Mientras que la Rh por sí misma fue liberada inmediatamente al medio, no dando apenas valores de fluorescencia por citometría, la incubación previa de las células con verapamilo aumentó su retención, manteniéndose en el interior celular a lo largo de los tiempos de la experiencia. El tratamiento con Tripalm-NPs y Tripalm-NPs-MAC aumentó la acumulación de Rh más que con la exposición a verapamilo (hasta 2 veces más). No obstante, ambas NPs presentaron comportamientos diferentes. Tras 30 minutos de experiencia, la intensidad de marcaje de Rh en el interior celular fue mayor con el uso de Tripalm-NPs. No obstante, tras 1 hora, las Tripalm-NPs-MAC fueron más efectivas que las Tripalm-NPs. Finalmente, a los 90 minutos, se observó una mayor acumulación de Rh con Tripalm-NPs que con Tripalm-NPs-MAC. Estos resultados fueron confirmados mediante microscopía de fluorescencia, observándose una mayor fluorescencia en el interior de las células sometidas al tratamiento previo con las NPs vacías (Figura 35Bc y d). Esta fluorescencia fue también mayor que la detectada sólo con el tratamiento de verapamilo (Figura 35Bb).

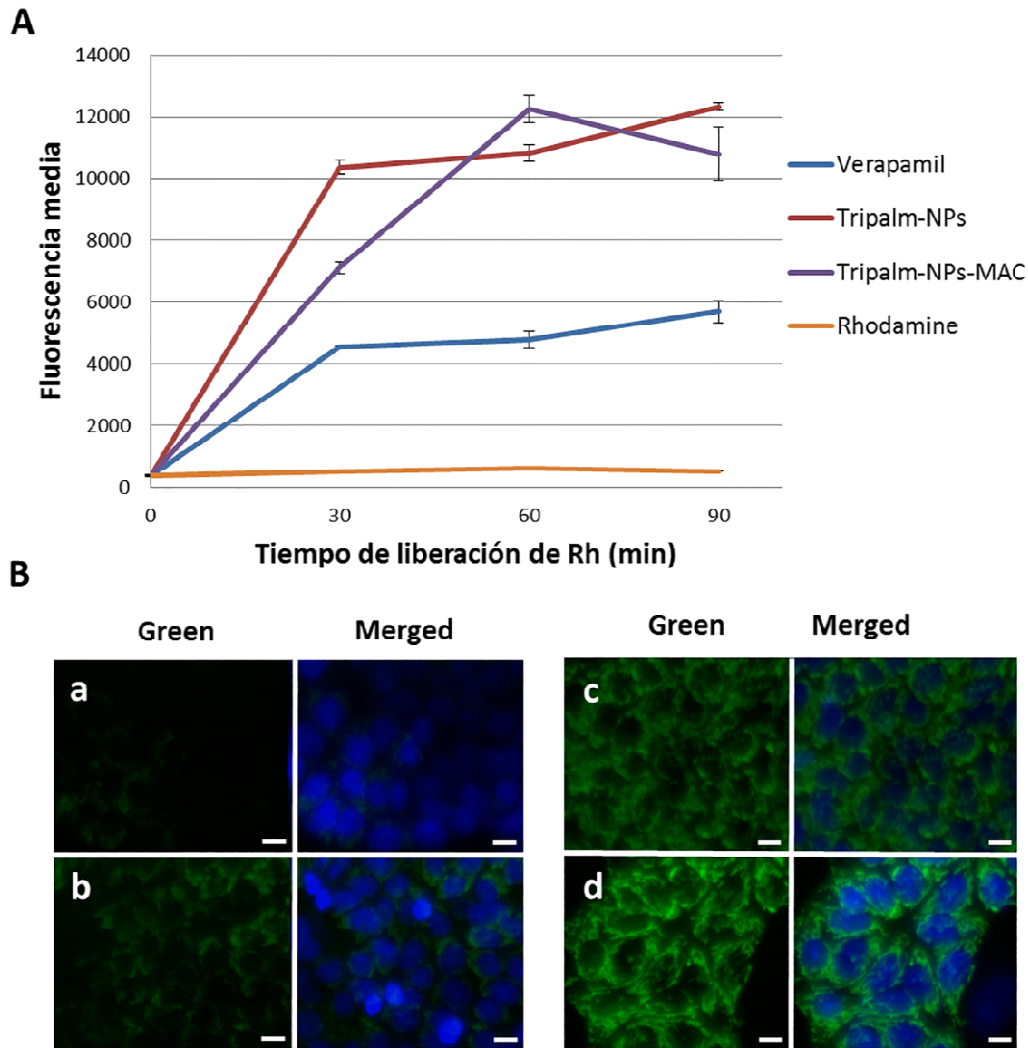


Figura 35. Ensayo de retención de Rh en células resistentes HCT-15. A) Estudio mediante citometría de flujo de la Rh presente en el interior celular tras la exposición a Rh, y a un pretratamiento 24 horas antes con verapamilo, Tripalm-NPs, Tripalm-NPs-MAC, o sin pretratamiento. Los datos muestran la fluorescencia presente en el interior celular a diferentes tiempos tras la exposición a Rh. Los datos representan la media \pm SD de cuatro experiencias. B) Imágenes de microscopía de fluorescencia representativas de la Rh presente en el interior celular (verde) en células resistentes HCT-15 a) sin pretratamiento, o pretratadas con b) verapamilo, c) Tripalm-NPs o d) Tripalm-NPs-MAC. Los núcleos se observan en azul. Barra de escala =10 μ m.

RESULTADOS

IV.2.9. Estudios de citotoxicidad de las Tripalm-NPs-PTX en células madre tumorales

Para demostrar la actividad de Tripalm-NPs-PTX frente a las CSCs, se seleccionaron las líneas MCF7 y A549 de cáncer de mama y pulmón, respectivamente, se aislaron las CSCs, se caracterizaron y se llevaron a un ensayo de citotoxicidad.

Las líneas celulares se incubaron con un medio de inducción (Ver Materiales y Métodos) por un periodo de unas 2 semanas, observándose la formación de tumoroesferas desde los primeros días de incubación (Figura 37A). Su caracterización como CSCs fue realizada mediante RT-PCR, demostrando que tanto las tumoroesferas de MCF7 como de A549 presentaron sobrepresados los marcadores específicos del fenotipo de célula madre *SOX2*, *OCT4*, *DNMT1*, *CD133* y *CD44* (Figura 36).

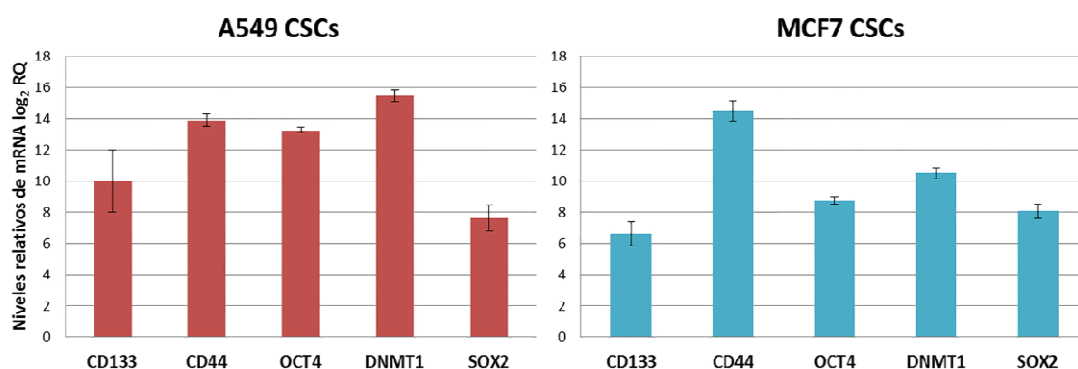


Figura 36. Representación gráfica de la expresión relativa de algunos mRNA en las CSCs respecto a las líneas celulares de origen A549 y MCF7. Estos mRNA han sido validados mediante transcripción inversa y RT-PCR, y están relacionados con el fenotipo de las CSCs: *CD133*, *CD44*, *OCT4*, *DNMT1* y *SOX2*. Los datos representan la media de 4 replicas \pm SD.

Las CSCs seleccionadas y caracterizadas fueron usadas para realizar un ensayo de citotoxicidad usando PTX y Tripalm-NPs-PTX a concentraciones crecientes durante 72 horas. Los resultados obtenidos demostraron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre ambos tratamientos, presentando las Tripalm-NPs-PTX una mayor actividad antitumoral frente a las CSCs, tanto en mama como de pulmón, y en relación al PTX libre. Así, el uso Tripalm-NPs-PTX en las CSCs de MCF7 disminuyó la IC_{50} del PTX 6,7 veces en relación a PTX libre (de $35,3 \pm 4,9$ a $5,3 \pm 0,7$ nM). Mejores resultados fueron

obtenidos en las CSCs de A549, en donde la reducción de la IC₅₀ del PTX fue de 14,9 veces (de 11,9±2,7 a 0,8±1,0). Sin embargo, es de destacar que en las CSCs de A549 a partir de la dosis de 30 nM hasta 100 nM, la viabilidad celular fue muy parecida para ambos tratamientos, permaneciendo constante en torno al 25-30% (Figura 37). Estos resultados sugieren que, Tripalm-NPs-PTX no solo promueve el efecto antitumoral del PTX frente a células tumorales y MTS de mama y pulmón e inhibe las MDR, sino que además es capaz de reducir en crecimiento de las células precursoras del tumor.

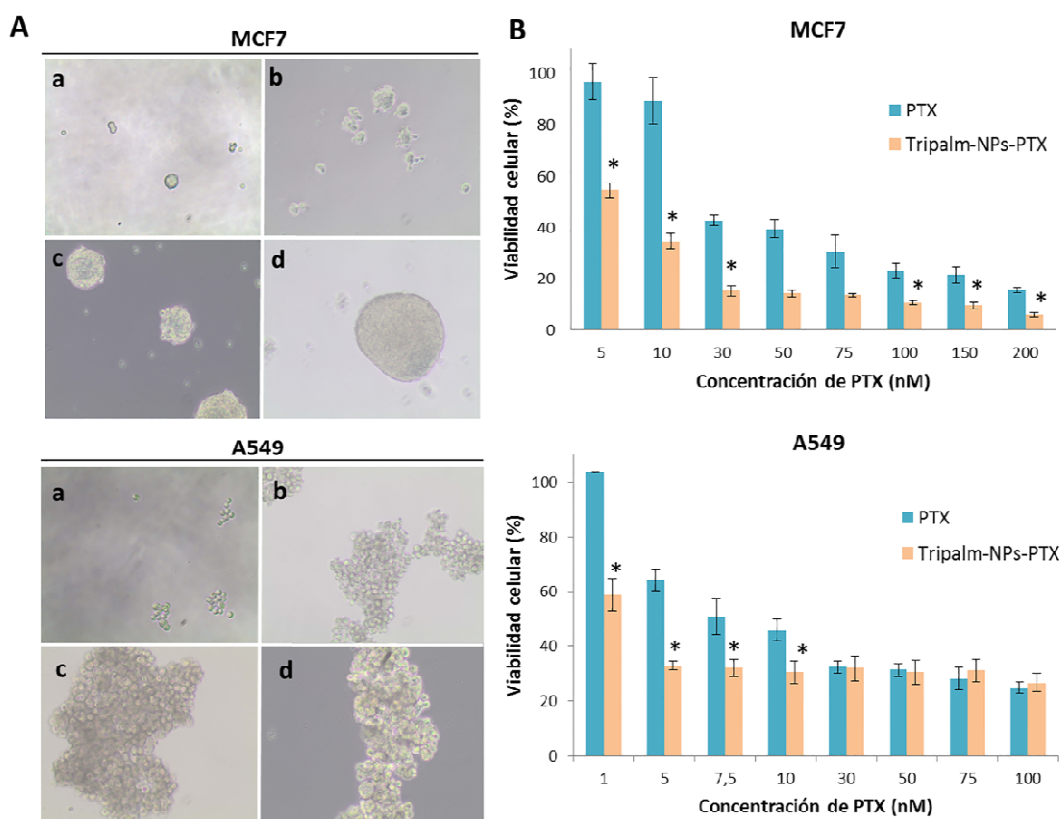


Figura 37. Ensayo de citotoxicidad de Tripalm-NPs-PTX en CSCs obtenidas de células MCF7 y A549. (A) Imágenes representativas de la formación de tumorosferas (ver Materiales y Métodos). Las fotografías se tomaron en los días 1 (a), 3 (b), 6 (c) y 13 (d) de inducción (10X). (B) Citotoxicidad de PTX y Tripalm-NPs-PTX sobre CSCs de MCF7 y A549 a concentraciones crecientes del fármaco. Los datos representan el valor medio \pm SD de cinco réplicas. (*) Diferencias significativas ($p \leq 0,001$) al comparar Tripalm-NPs-PTX y PTX.

RESULTADOS

Discusión

V. DISCUSIÓN

La aprobación del paclitaxel (Taxol) por la FDA y su introducción en el mercado en 1994 supuso un gran avance en el tratamiento del cáncer. Un estudio retrospectivo durante un periodo de 20 años en pacientes con cáncer de mama metastásico mostró cómo a partir de esa fecha se produce una mejora significativa de su supervivencia global, pasando de 17,2-19,2 a 23,6-26,1 meses (Gradishar, 2012). Sin embargo, actualmente, la administración de PTX en pacientes con cáncer presenta muchos inconvenientes debidos en gran medida, a su elevada toxicidad sistémica, su falta de selectividad, la resistencia generada por el tumor frente al fármaco y, en algunas ocasiones, su falta de efectividad que da lugar a un porcentaje de pacientes no respondedores.

En el caso de los tumores de mama, la aparición de resistencia a PTX es la causante del fallo terapéutico en el 90% de los casos y solamente un 20%-30% de los pacientes tratados con taxanos responden a un segundo tratamiento con estos mismos fármacos (Gradishar, 2012). Además, y en cuanto a la aparición de efectos adversos, un ensayo clínico de fase III realizado en pacientes de cáncer de mama metastásico mostró que un 2% de los pacientes tratados con PTX presentaron reacciones de hipersensibilidad de grado 3, un 22% neutropenia de grado 4, y un 2% neuropatía periférica de grado 3 (Gradishar y cols., 2005). Por último, numerosos estudios indican la intensa neuropatía periférica que el paclitaxel puede inducir en pacientes y que puede ser la causa del abandono del tratamiento (Scripture y cols., 2006).

En este contexto, el uso de nanopartículas y el desarrollo de estrategias de nanomedicina se han propuesto como un sistema para reducir estos efectos secundarios en el paciente y mejorar, por tanto, la eficacia del tratamiento antitumoral (Jabir y cols., 2012; Kundranda y Niu, 2015). Administradas vía intravenosa, las NPs cargadas con PTX se pueden acumular en el tumor de forma pasiva mediante el fenómeno ya descrito y denominado EPR y ser captadas por las células tumorales mediante mecanismos de internalización celular aumentando su citotoxicidad. Además, determinadas NPs son capaces de inhibir los mecanismos MDR mediados por P-gp lo que supone una ventaja terapéutica al evitar que las células tumorales escapen de los tratamientos a través de la expulsión de la droga del interior celular. A esto

DISCUSIÓN

debemos sumar el hecho de que ciertos sistemas de NPs pueden eliminar con más efectividad las CSCs que la farmacoterapia tradicional evitando la aparición de recidivas generadas por estas células. Por último, las NPs se diseñan como sistemas biocompatibles que evitan los efectos adversos de los disolventes tóxicos usados para solubilizar el PTX y disminuyen los tiempos de infusión, pudiendo mejorar por tanto el tratamiento del paciente.

El uso de NPs para mejorar el efecto del PTX es una realidad como demuestra el uso comercial autorizado en 2008 por la FDA del fármaco Abraxane[®], una formulación de PTX que incluye NPs de albúmina, indicada en el tratamiento en monoterapia del cáncer de mama metastásico en pacientes adultos en los que la administración de antraciclinas esté contraindicado o en los que el tratamiento de primera línea no haya sido efectivo. Este agente es también, en combinación con gemcitabina, tratamiento de primera línea para el cáncer de páncreas metastásico en pacientes adultos y, en combinación con carboplatino, tratamiento de primera línea en pacientes de cáncer de pulmón no microcítico adultos no candidatos a cirugía ni radioterapia ((EMA), 2015). Su utilización supone múltiples ventajas respecto al Taxol[®] ya que reduce su toxicidad, posee una administración más cómoda e induce una mayor efectividad y selectividad del tratamiento. Sin embargo, el Abraxane[®] sigue presentando algunos inconvenientes importantes entre los que destaca la aparición de neuropatía periférica de grado 3 (~10%) (Gradishar y cols., 2005). Además, el comportamiento de Abraxane[®] respecto a la MDR sigue siendo incierto. Un reciente estudio realizado en células tumorales de pulmón (línea A549) demostró que Abraxane contribuyó a generar MDR por la sobreexpresión de P-gp. Además, las células resistentes a Abraxane[®] presentaron también resistencia cruzada a fármacos como el PTX libre, docetaxel y doxorubicina (Zhao y cols., 2015).

En este contexto, el desarrollo de nuevas nanoformulaciones que permitan mejorar la actividad de PTX, reducir sus inconvenientes y efectos secundarios y evitar el uso de solventes tóxicos es esencial para la mejora del efecto terapéutico del fármaco en los tumores en los que se usa habitualmente así como en aquellos en los, tras la mejora de su formulación, se propone su uso. En el presente trabajo se evalúan dos nuevos sistemas para encapsular el PTX, NPs lipídicas de tripalmitina y NPs poliméricas de p4VP, con objeto de mejorar la actividad antitumoral del PTX libre en

tumores de mama y pulmón y disminuir su toxicidad, describiéndose los resultados preliminares obtenidos en cuanto a su comportamiento *in vitro* utilizando diferentes modelos tumorales. Tanto los sistemas de Tripalm-NPs como los de hollow-p4VP han demostrado ser altamente biocompatibles, aumentando de forma significativa el efecto antitumoral del PTX libre. Además, en el caso de Tripalm-NPs-PTX se ha demostrado que son capaces de inhibir la MDR mediadas por P-gp y de producir una mayor lesión en las CSCs en relación al PTX libre, lo que supone una ventaja adicional al tratamiento. El análisis de tres modificaciones de este sistema mediante la adición de MAC, OEG y β CD a la nanoformulación, ha permitido mejorar algunos aspectos de su funcionamiento. Por otro lado, hollow-p4VP han demostrado tener propiedades pH-sensibles que pueden ser explotadas para aumentar la especificidad del tratamiento hacia el tejido tumoral. Nuestro trabajo en la primera aproximación al uso de NPs huecas de p4VP para el transporte de fármacos antitumorales, habiendo sido sintetizadas mediante una novedosa técnica que incorpora un núcleo de oro, oxidado posteriormente para generar la NP hueca (Contreras-Cáceres y cols., 2017). Este trabajo también representa el primer estudio de los efectos de NPs de tripalmitina con PTX en modelos tumorales de mama y pulmón.

V.1. Los sistemas Tripalm-NPs y hollow-p4VP mostraron una alta biocompatibilidad

Uno de los aspectos más destacables del presente estudio es la alta biocompatibilidad demostrada por los sistemas Tripalm-NPs y hollow-p4VP tanto en los ensayos de toxicidad en líneas celulares normales como en los estudios de hemólisis y morfología de los GR de sangre humana, lo que garantiza su utilización como tratamiento farmacológico en humanos. Su falta de citotoxicidad implica que el efecto tumoral detectado en las nanoformulaciones desarrolladas con paclitaxel se debe exclusivamente al efecto de fármaco y no a ningún otro componente de la formulación. Las variantes de Tripalm-NPs mediante el uso OEG, el MAC y el β CD tampoco indujeron ningún tipo de toxicidad incluso a la máxima dosis de NPs necesaria para alcanzar una dosis de PTX de 30nM. En algunos casos, como en la línea tumoral

DISCUSIÓN

de mama MDAMB231, en donde fue necesaria una dosis de 100 nM debido a su elevado valor de IC_{50} , sí fue detectada toxicidad.

Aunque algunos estudios han determinado la no existencia de toxicidad de las hollow-p4VP sin fármaco en líneas celulares derivadas de cáncer como HeLa ovárico (Lu y cols., 2014), es la primera vez que se demuestra que esta nanoformulación es completamente hemocompatible no provocando ningún tipo de hemólisis y por tanto asegurando su posible utilización incluida la administración vía intravenosa. En este sentido, las hollow-p4VP se enmarcan dentro de los sistemas de NPs candidatos al transporte de fármacos que no inducen lesión de elementos formes de la sangre. Así, sistemas de NPs de PLGA ensayadas en sistemas *in vitro* han dado lugar a una hemólisis de menos del 2,5% de los GR, no afectando al sistema del complemento, al sistema de activación plaquetaria ni a los tiempos de coagulación del plasma (Martin-Banderas y cols., 2015). La asociación de estas NPs a caseína (NPs híbridas de PLGA-caseína) ha dado lugar a resultados muy parecidos a concentraciones de hasta 1000 $\mu\text{g/ml}$ (Narayanan y cols., 2014). Por otra parte, Lu y cols. (Lu y cols., 2014) estudiaron la incorporación PEG a NPs de PTX, y fue capaz de disminuir notablemente la toxicidad hematológica del PTX de forma que mientras PTX libre (0,2 mg/ml) indujo más del 50% de hemólisis, la asociación del fármaco a este tipo de NPs indujo una destrucción de GR prácticamente despreciable. Como han demostrado Zhou y cols. (Zhou y cols., 2014) utilizando NPs de sílice mesoporosas, el grosor de la cubierta de las NPs huecas puede ser un factor decisivo en cuanto a la toxicidad frente a células tanto tumorales como normales ya sean hemáticas o de otro tipo celular. Así, las NPs con un grosor de cubierta de ~ 46 nm no superaron el 5% de hemólisis a la concentración más alta ensayada (0,8 mg/ml) mientras que una cubierta de unos 82 nm indujo un aumento de tasa de hemólisis de hasta 10 veces. Además, la citotoxicidad en células de cáncer de ovario HeLa también se modificó, siendo la viabilidad de más del 84% en el primer caso, pero disminuyendo hasta un 60% con las NPs de mayor grosor. Estos resultados concuerdan con la hemocompatibilidad presentada por las hollow-p4VP, cuya cubierta se estima de unos 25 nm, y que presentan una hemólisis inferior al 0,8% a dosis incluso superiores al doble de las estudiadas en el ensayo anterior (1,8 mg/ml). Por otra parte, las hollow-p4VP mantuvieron una viabilidad celular en torno a un 100% en todas las líneas estudiadas.

Por otra parte, las NPs de Tripalmitina han sido ensayadas en relación a su biocompatibilidad en otros estudios, demostrándose, en general, su falta de toxicidad. Así, Bondi y cols. (Bondi y cols., 2015) han determinado una hemólisis para NPs formadas por tripalmitina de menos del 1%. Cuando fueron cargadas con el agente sorafenib, la toxicidad sanguínea de este agente disminuyó 4 veces. Por otro lado, los estudios de citotoxicidad con estas NPs en célula de hepatocarcinoma celular humano no mostraron muerte celular con los sistemas que utilizaban además de tripalmitina el lípido Captex 355 EP/NF. Por el contrario, la adición del lípido Miglyol 812 sí indujo un incremento de la toxicidad. Ensayos con nanoemulsiones de colesterol que incluían tripalmitina asociadas a PTX no han mostrado toxicidad en pacientes con enfermedad cardiovascular. Además, la falta de reacciones adversas propias de este fármaco a nivel hematológico (sólo se observó una leve leucopenia) fue un signo de mejora terapéutica en estos pacientes a pesar de las alteraciones cardíacas que padecían (Shiozaki y cols., 2016).

Estudios de toxicidad de las SLNs asociadas a diferentes tipos de lípidos en células de fibroblastos de ratón (línea celular NIH/3T3) han demostrado modificaciones en la IC_{50} que parecen estar relacionadas con del lípido utilizado. Así, las SLNs con participación de tripalmitina demostraron ser las de mayor biocompatibilidad frente al resto de los lípidos testados (tripalmitina > monoestearina > ácido esteárico). Un hallazgo relevante del estudio fue la determinación de que las distintas concentraciones de surfactante empleadas para la síntesis de las SLNs modulaban su toxicidad, lo que claramente indica la relevancia del proceso y de los componentes usados en la formulación. Así, cuando se procedió a testar la hemólisis se comprobó que ninguna de la SLNs de tripalmitina provocaba disrupción de los GR, independientemente de la concentración de surfactante. Lo mismo ocurría con las SLNs de monoestearina, pero no así con las de ácido esteárico, cuya hemólisis ascendía a un 50%-60% (Pizzol y cols., 2014). Estos resultados concuerdan con los obtenidos con nuestras Tripalm-NPs y sus modificaciones, que mostraron una hemólisis que no superaban el 7,5%, y una viabilidad celular $\geq 80\%$ en las líneas celulares normales de mama y pulmón incluso a la mayor concentración testada (30 nM). Los surfactantes utilizados para la síntesis de nuestras Tripalm-NPs y a las concentraciones utilizadas

DISCUSIÓN

(Tween® 80 al 5.7 % y n-butanol al 1.1 %) no parecen tener ninguna influencia en la toxicidad de estos sistemas.

No obstante, diferentes estudios avalan que la hemólisis inducida con NPs en general, y con SLNs de tripalmitina en particular, puede no generar una hemólisis visible pero sí una disfunción en la membrana de los eritrocitos que, sin llegar a romperlos, los altere funcionalmente siendo este un claro signo de toxicidad (Ran y cols., 2015). Morfológicamente, los GR sanos presentan una configuración de disco cóncavo o discocito, mientras que los GR tratados con NPs pueden presentar morfología de equinocito, con pliegues en la membrana que forman un contorno irregular, drepanocito con forma de hoz o media luna, o estomatocito con forma de copa o grano de café, alteraciones todas que pueden reflejar alteraciones de su funcionalidad (Wrobel y cols., 2015; Zhou y cols., 2015). Para determinar estas posibles alteraciones con el uso de Tripalm-NPs y sus modificaciones, realizamos un estudio morfológico de la sangre tras el contacto con las NPs, que demostró que aunque en algunos casos aparecieron modificaciones en la morfología de los GR, la mayoría permanecieron con su forma normal de disco biconcavo, ratificando, por tanto, el análisis morfológico, el resto de ensayos de hemólisis realizados.

Por tanto, la biocompatibilidad demostrada en el caso de las hollow-p4VP es un resultado novedoso en tanto en cuanto son muy escasos los trabajos que analizan la biocompatibilidad de las NPs sintetizadas a partir de este polímero. Por otra parte, nuestros resultados confirman la biocompatibilidad de las Tripalm-NPs, previamente analizada en otros estudios, pero aportan cómo las modificaciones de estas nanoformulaciones, no modulan dicha toxicidad, a excepción de un ligero y no significativo aumento de la hemólisis con el uso de OEG y β CD. La falta de toxicidad de estos sistemas supone una enorme ventaja en relación al uso de Cremophor® EL en la formulación, evitando los problemas de reacciones adversas, modificaciones en la farmacocinética del PTX y largos tiempos de infusión que este agente genera (Leeper y cols., 1994). Todo esto contribuye a considerar estas NPs apropiadas para continuar los ensayos en animales de experimentación.

V.2. Dos sistemas para incrementar la toxicidad de PTX frente a células tumorales: Tripalm-NPs-PTX y PTX@p4VP

Nuestros resultados de ensayos de citotoxicidad de las NPs-PTX utilizadas demostraron, en todos los casos, un aumento del porcentaje de muerte celular frente al PTX libre. Así, las PTX@p4VP produjeron una importante mejora del efecto del PTX en las líneas celulares tumorales testadas, derivadas de cáncer de mama y pulmón. El IT, que refleja las veces que mejoran las PTX@p4VP el efecto del PTX libre, fue de 1,6 veces en A549 y 2,9 veces en MCF7. Estos resultados indican que el uso de esta nanoformulación casi dobló y triplicó el efecto del PTX en los tumores ensayados. Es la primera vez que estas NPs son unidas a este agente antitumoral frente a células en cultivos, por lo que no tenemos ninguna referencia previa de su actividad, si bien podemos considerar el resultado como muy esperanzador tanto para incrementar la eficiencia del fármaco como para usarlo como una nanoplataforma que pueda ser direccionada hacia diferentes tipos tumorales.

En relación a los resultados obtenidos con las Tripalm-NPs-PTX, el efecto citotóxico de PTX@p4VP es menor. Hemos podido comprobar como con Tripalm-NPs-PTX los IT se sitúan hasta en 40,5 para la línea tumoral de mama T47D y 38,8 para la línea tumoral de pulmón NCI-H460. A la luz de estos resultados, la mejora producida por las Tripalm-NPs-PTX son similares en ambos tipos de cáncer, aunque en el caso de las líneas de mama estas NPs presenta más especificidad por las células tumorales, con un IT bajo en la línea normal MCF10A (IT= 11,2), mientras que en la línea normal de pulmón L132 la IC_{50} disminuye hasta 39 veces. Esta especificidad por las células tumorales de mama también se observó con PTX@p4VP aunque en menor medida (IT=2,9 en MCF7; IT=1,7 en MCF10A). De entre las líneas celulares analizadas, MDAMB231 fue la que presentó una mejora más leve de la IC_{50} de PTX cuando fue ensayada con Tripalm-NPs-PTX (IT= 1,1). Dado que esta línea celular representa un patrón molecular correspondiente al subtipo basal y claudin-low que se asocia con un pronóstico negativo y un comportamiento similar al de las CSCs, se podría explicar el efecto menos notable de Tripalm-NPs-PTX (Neve y cols., 2006; Subik y cols., 2010). En este contexto, NPs de oro recubiertas de oligosacáridos de quitosano cargadas con PTX también indujeron una disminución de la viabilidad celular de células MDAMB231,

DISCUSIÓN

pero, sin embargo, no consiguieron reducir los valores de IC_{50} alcanzados con el PTX (Manivasagan y cols., 2016).

La falta de estudios de NPs de p4VP cargadas con fármacos frente a células tumorales impide la comparación de nuestros resultados con otros autores. No obstante, otras NPs poliméricas también han mostrado mejoras de la citotoxicidad del PTX. Es el caso de nanosistemas de PLGA y PCL con PTX, que presentaron una citotoxicidad dependiente de la dosis utilizada y el tiempo de exposición sobre células tumorales humanas de mama MCF7. Los resultados con NPs de PLGA fueron más prometedores, ya que disminuyeron la viabilidad celular del PTX de un 90% a un 66% tras la administración de una dosis de 30 μ M durante 24 horas (Lopez-Gasco y cols., 2011; Lopez-Gasco y cols., 2012). NPs de AH con PTX presentaron resultados de citotoxicidad similares a los del fármaco libre en ensayos sobre la línea MCF7. Sin embargo, ensayos con un modelo de metástasis cerebral en ratones demostraron un aumento de la supervivencia global en comparación con el control (Mittapalli y cols., 2013). También se ha comparado la citotoxicidad sobre MCF7 de NPs de PCL y TPGS con PTX respecto a Abraxane[®], siendo el primero 10 veces más potente (Bernabeu y cols., 2014). Sum y cols. (Sun y cols., 2014) demostraron un aumento de la citotoxicidad de PTX de hasta un 40% frente a la línea A549 al incorporarlo en NPs de TPGS-PLGA.

En cuanto a los sistemas lipídicos, el uso de SLNs de triestearina asociada a PTX aumentó la muerte celular en relación a la inducida por PTX libre en la línea A549, pasando de un 54,4% a un 42,8% de supervivencia a una dosis de 40 mg/ml de fármaco (48 horas). Por otro lado, respecto a la funcionalización de las NPs, la incorporación de manosa a estas SLNs de triestearina, mejoró su efecto debido a un aumento del direccionamiento activo, llegando hasta un 66,8% de inhibición celular (Sahu y cols., 2015). Otro buen ejemplo son las SLNs asociadas a la mezcla de lípidos tripalmitina, monoestearina y trimiristina, que redujeron la IC_{50} del PTX en A549 de 164,56 ng/ml a 100,26 ng/ml, pero esta cifra se mejoraba cuando se modificaba la NP original llegando hasta 41,04 ng/ml cuando estas SLNs eran funcionalizadas con una aglutinina del germen de trigo que aumentaba la especificidad por células tumorales de pulmón (Pooja y cols., 2016). Como podemos ver en estos trabajos, los mecanismos de funcionalización suponen una estrategia muy efectiva para mejorar el efecto de las

NPs que transportan PTX a los tumores, siendo uno de los mecanismos más utilizados el direccionamiento activo mediante moléculas que reconocen específicamente las células tumorales.

En este contexto, nosotros hemos llevado a cabo la funcionalización de las Tripalm-NPs-PTX mediante MAC, OEG y β CD, con el objetivo (ver apartados I.5.2.2, I.5.2.3 y I.5.2.4) de aumentar la solubilidad del PTX, inhibir MDR y aumentar el tiempo de circulación de las SLNs *in vivo*. Nuestros resultados demostraron que la funcionalización no produjo mejoras en la citotoxicidad respecto a las Tripalm-NPs-PTX, no observando mejora el IT de estas NPs en las líneas celulares estudiadas. De entre ellas, el subtipo más efectivo fue las Tripalm-NPs-OEG-PTX (IT=15,9 en MCF7). Estos resultados concuerdan con lo obtenidos por otros autores que utilizan compuestos similares para la funcionalización. Así, Baek y cols. (Baek y Cho, 2013) incorporaron β CD a las SLNs, lo que produjo una citotoxicidad parecida a la obtenida con las SLNs sin funcionalizar. Sin embargo, estas SLNs aumentaron la incorporación de PTX hasta 1,5 veces respecto a los sistemas no modificados. En el caso de las SLNs funcionalizadas con OEG tampoco se vieron mejoras en la citotoxicidad respecto a los sistemas originales. No obstante, en este caso ha sido demostrado el beneficio de la pegilación en ensayos *in vivo*, reduciendo el volumen tumoral de masas inducidas con células de Lewis en ratones C57BL/6N y aumentando su supervivencia global significativamente más que las SLNs no funcionalizadas (hasta 39 días). Además, en este último estudio si fue mejorada la citotoxicidad con una mejora de la IC_{50} del PTX que disminuyó de 2,77 hasta 0,83 μ g/ml (Zheng y cols., 2014). Nuestros resultados muestran un efecto mayor de Tripalm-NPs-OEG-PTX en las células tumorales de mama MCF7 (IT = 14) que en su contrapartida normal MCF-10A (IT = 4), lo que podría implicar cierta especificidad de estos sistemas por las células tumorales. Será necesaria la realización de estudios *in vivo* para profundizar sobre las ventajas de la pegilación en estas NPs reduciendo su degradación por parte de los macrófagos.

Finalmente, los ensayos con Tripalm-NPs-MAC no mejoraron la citotoxicidad en ninguna de las líneas celulares testadas. No obstante, la incorporación de MAC en ciertas NPs ha sido relacionada con la inhibición de P-gp, promoviendo la acumulación de PTX en las células que sobreexpresan esta proteína. Así, un pretratamiento con MAC (20 mg/kg) fue capaz de aumentar la absorción intestinal de PTX

DISCUSIÓN

incrementándose su biodisponibilidad hasta 1,8 veces (Qiang y cols., 2010). Esto nos hace pensar en la posibilidad que quizás este tipo de modificación podría suponer la base para el desarrollo de una NP para la administración oral del fármaco. En cualquier caso, los resultados obtenidos con Tripalm-NPs-MAC sobre líneas celulares resistentes y sensibles a fármacos se comentaran y discutirán posteriormente.

V.3. Asociación de PTX a NPs y modulación del ciclo celular

El tratamiento con PTX, al igual que otros taxanos, produce una parada del ciclo celular en la fase de mitosis o G2/M, lo que desemboca en un proceso de apoptosis celular. La estabilización de los microtubulos y la incapacidad de desensamblarse de los mismos (ver apartado II.4.1) son hechos fundamentales en el mecanismo de este efecto. A altas concentraciones de fármaco es posible observar un fenómeno de tetraploidía, al sobrevivir la célula al proceso de mitosis y no producirse la citoquinesis (Hernandez-Vargas y cols., 2007; McGrogan y cols., 2008). Nuestros resultados demuestran que el tratamiento de todas las NPs asociadas a PTX provocan una acumulación de células en fase G2/M en un amplio rango de líneas celulares, lo que indicaría que el mecanismo del PTX no se afecta por su incorporación en las NPs. El hecho de que en algunos casos esta parada se observe con las NPs-PTX y no con el PTX, como por ejemplo en L132 (14,4% con PTX vs 25,8% con Tripalm-NPs-PTX en fase G2/M), se puede deber a que a la dosis utilizada (IC_{50} del PTX a 96h), el PTX libre presenta una actividad muy leve (48h), mientras que el efecto de las NPs-PTX es mucho mayor por la mejora que ejerce la encapsulación sobre el fármaco libre. Aunque se seleccionó esa dosis para observar el efecto de las NPs-PTX en el ciclo celular sin provocar un alto porcentaje de muerte celular, en muchos casos no fue posible evitar que se produjera acumulación en fase SubG1, por la gran mejora que producían las NP sobre el PTX. Un claro ejemplo de este hecho, se observa en T47D que presenta un 90,8% de las células en fase SubG1 con Tripalm-NPs-PTX, o en A549 en la que se detectó un 46,5% con Tripalm-NPs-OEG-PTX.

Los resultados de otros estudios usando otros tipos de NPs asociadas a PTX coinciden con los nuestros. Tal es el caso de las NPs de PCL-PTX que produjeron un

aumento del número de células MCF7 en fase G2/M (72%) respecto a los controles con PTX libre (42%) (Lopez-Gasco y cols., 2012). El uso de otros agentes ha corroborado este hallazgo, como se ha podido demostrar en ratones tratados con nanoemulsiones lipídicas con PTX + etopósido, en los que el estudio de las células procedentes de un tumor generado con células B16F10, mostró una mayor parada del ciclo celular en fase G2/M que cuando se usó la combinación de los análogos comerciales de ambos fármacos (Kretzer y cols., 2012). También se ha determinado que NPs de AH-PTX producen una parada de la mitosis (fase G2/M) en un 56% de células tumorales de mama MDAMB231 mientras que los controles presentaban sólo un 17% (Mittapalli y cols., 2013). La incorporación de PTX en NPs de albúmina ha conseguido incrementar el porcentaje de células en fase SubG1 y G2/M en la línea tumoral de mama MCF7. Además, la incorporación de estas NPs en liposomas aumentó más aún el número de células apoptóticas respecto al PTX (10,5% de células en fase subG1 con PTX, 17% en fase SubG1 con NPs, 36% en SubG1 con NPs+liposoma) (Ruttala y Ko, 2015). Finalmente, el uso de NPs de alginato-PTX dio lugar a resultados similares de ciclo celular en células obtenidas mediante biopsias de tumores primarios de pacientes de cáncer de mama. El tratamiento con PTX de estas células mostró un aumento de células en fase G2/M y de detritos celulares respecto a las células sin tratar, que se incrementó con su incorporación en las NPs de alginato (Markeb y cols., 2016).

V.4. Mejora de la internalización celular de PTX mediante el uso de los sistemas Tripalm-NPs-PTX y PTX@p4VP

En base a los resultados obtenidos, podemos afirmar que tanto las hollow-p4VP como las Tripalm-NPs promueven la internalización de marcadores fluorescentes en las células tumorales, intensificándose la fluorescencia con el transcurso del tiempo. Además, en ambos casos el marcaje se ha observado en el citoplasma celular, lo que sugiere que no presentan capacidad para atravesar la membrana nuclear y penetrar en el núcleo. Con el FITC libre sí que se observó en el interior del núcleo celular, por lo que la presencia de fluorescencia en el citoplasma cuando se usó Tripalm-NPs-FITC podría indicar que el fluorocromo permanece unido a las NPs tras atravesar la membrana celular. Serán necesarios estudios más prolongados en el tiempo para

DISCUSIÓN

demostrar si FITC se libera de la estructura de las Tripalm-NPs. En el caso de las hollow-p4VP, su internalización fue más lenta que el NR libre, lo que sugiere mecanismos de entrada más complejos asociados a la endocitosis de las NPs. Sin embargo, es difícil asegurar que no se ha producido una liberación del fluoróforo en el medio y su posterior difusión a través de la membrana, por lo que serían necesarios más estudios para confirmar esta teoría.

Los mecanismos implicados en la internalización de las NPs pueden ser muy variados, dependiendo de su tamaño, forma y carga superficial (Iversen y cols., 2011). Las SLNs como Tripalm-NPs podrían ser captadas mediante mecanismos de intercambio de membrana, endocitosis o endocitosis mediada por clatrina. (Rivolta y cols., 2011; Martins y cols., 2012). Concretamente en el caso de NPs de tripalmitina se ha visto que en la internalización están implicados mecanismos activos de endocitosis dependiente de clatrina y caveolas. Los investigadores que demostraron este mecanismo de entrada consiguieron aumentar la internalización de calcitonina de salmón en un co-cultivo de células Caco-2/HT29-MTX de cáncer de colon, siendo este aumento directamente dependiente de la dosis utilizada y del tiempo de exposición (Fan y cols., 2014).

Pooja y cols. (Pooja y cols., 2016) usaron SLNs formadas por diferentes lípidos con incorporación de cumarina 6 para monitorizar su internalización celular. Estas NPs mostraron una elevada incorporación por parte de las células tumorales de pulmón A549, que se vio aumentada por el marcaje con una aglutinina de germen de trigo que reconoce activamente la membrana enterocítica de células tumorales. Estos resultados demuestran una mayor penetración de fármaco en las células es directamente responsable del aumento de la citotoxicidad. Asimismo, nanocápsulas de lípido vinilsulfona unidas a complejos inmunoestimuladores fomentaron la internalización de NR por células tumorales de mama MCF7 y HCC1954 tras 30 minutos de exposición. La conjugación de estas NPs con trastuzumab aumentó su incorporación en la línea HER-2 + (Rodríguez-Serrano y cols., 2016). El trabajo de Laquintana y cols. (Laquintana y cols., 2014) mostró una escasa internalización de FITC por células C6 de glioma de rata, mientras que su incorporación en NPs de PLGA supuso un incremento tiempo-dependiente de la fluorescencia en el citoplasma celular, algo similar a lo que pudimos observar en nuestras experiencias.

En cuanto al principal mecanismo de internalización de NR@p4VP, puede estar relacionado con procesos de endocitosis mediada por clatrina debido a la carga positiva del polímero (Yameen y cols., 2014). Harush-Frenkel y cols. (Harush-Frenkel y cols., 2007) apoyan esta hipótesis, sugiriendo que otros mecanismos como la macropinocitosis o la endocitosis mediada por caveolas, también pueden estar implicados en el proceso. A esta conclusión se llegó tras realizar un estudio en células de cáncer de ovario HeLa, en el que se comparaba la endocitosis de NPs con carga superficial negativa y positiva, demostrando que la carga a la que se expone la célula interfiere tanto en la habilidad para internalizar las NPs como en el mecanismo por el cuál se lleva a cabo este proceso.

Para profundizar sobre los resultados obtenidos se podrían llevar a cabo ensayos para determinar si el marcador es liberado en el medio celular, o profundizar en el mecanismo de internalización, el proceso de endocitosis y la cinética de las NPs, mediante el uso de inhibidores de las distintas vías de internalización celular (Iversen y cols., 2011; Salvati y cols., 2011; Bannunah y cols., 2014; Snipstad y cols., 2014). La mayor incorporación de fármaco en las células al formar parte de las NPs puede ser un elemento clave para aumentar su eficacia, y puede estar implicado en la mejora de la citotoxicidad que hemos visto anteriormente.

V.5. Las nanoformulaciones Tripalm-NPs-PTX y PTX@p4VP incrementan la efectividad de PTX en sistemas que imitan tumores in vivo: estudio en MTS

Con la intención de acercarnos al comportamiento que presentarían las Tripalm-NPs-PTX y PTX@p4VP *in vivo*, llevamos a cabo experimentos con esferos tumorales (MTS) procedentes de dos de las líneas celulares tumorales utilizadas: MCF7 derivada de mama y A549 derivada de pulmón. La elección de estas líneas no fue casual, sino que se debió a los resultados previos obtenidos en relación a la capacidad de formar esferoides y a nuestra experiencia en ensayos sobre estructuras celulares en 3D. De hecho, nuestro grupo de investigación ha demostrado previamente una disminución en el volumen de los MTS de A549 tratados con PTX (hasta un 87,4% tras

DISCUSIÓN

96 horas de exposición en comparación con los controles) y también de MTS de MCF7, cuyo volumen experimentó un decrecimiento de entre un 30%-40%, utilizando el PTX en terapia combinada con genes suicidas (Prados y cols., 2008; Prados y cols., 2010). Al igual que en los resultados que se presentan en estos artículos, en nuestro caso las diferencias de volumen entre los MTS control y los tratados con PTX y NPs-PTX fueron más acusadas en A549 que en MCF7. Además, ambos MTS presentaron patrones diferentes de crecimiento, permaneciendo el volumen constante en MCF7 a lo largo del tiempo y disminuyendo solo en los MTS tratados. Por el contrario, los MTS de A549 experimentaron un aumento gradual muy significativo y los esferos tratados permanecieron estables. Por otro lado, los MTS tratados con PTX y sobre todo con NPs-PTX, presentaron una estructura menos compacta con modificación de su morfología, que en el caso de MCF7 incluso llegaron a disgregarse. De hecho, a partir del día 4 incluso los MTS control presentaron cierta separación celular (disgregación), motivo por el cual los ensayos fueron realizados con este límite de tiempo. Esto nos hace pensar que las NPs empleadas no solo mejoran la entrada a nivel celular sino que también incrementan la capacidad de penetración y difusión del fármaco al interior del MTS.

Los resultados obtenidos de la experiencias con MTS de A549 demuestran que el tratamiento con PTX libre produce una disminución de volumen de un ~70%. Mientras que el uso de PTX@p4VP alcanza un ~80% y el tratamiento Tripalm-NPs-PTX un ~85%. Sin embargo, en los MTS de MCF7 el tratamiento con PTX libre disminuyó en mucha menor medida dicho volumen (~15-25%) mientras que PTX@p4VP lo redujo en un ~35% y Tripalm-NPs-PTX en un ~47%. Como podemos comprobar, los MTS procedentes de A549 son los que presentaron mejores resultados, aunque debe tenerse en cuenta la monitorización más prolongada del ensayo. Además, los MTS tratados con Tripalm-NPs-PTX redujeron más el volumen en ambos tipos de esferos respecto en relación a la exposición a las PTX@p4VP, presentando volúmenes entre un 5-12% menores.

Otros autores han trabajado previamente con NPs de PTX en modelos tridimensionales. Así, NPs de PEG-co-poli(trietilen carbonato) funcionalizadas con D-glutamina, en base a la sobreexpresión de transportadores de glucosa en las células tumorales, han sido estudiadas para el transporte de PTX en MTS, mejorando el efecto

de fármaco y de las NPs sin funcionalizar (Jiang y cols., 2014). También, nanomicelas con PTX han producido una disminución del volumen de MTS de MCF7 disminuyendo un 61,9% el volumen inicial tras 5 días de tratamiento, mientras que con el PTX libre el volumen se redujo tan sólo al 85,9%. Además, en MTS generados a partir de MCF7/ADR y caracterizados por poseer MDR, PTX no produjo ningún efecto terapéutico, mientras que nanomicelas con PTX provocaron una reducción significativa de su volumen (Yao y cols., 2011). Estos resultados concuerdan con los obtenidos con nuestras NPs en los MTS de MCF7, los cuales, tras 4 días de tratamiento, presentaron aproximadamente un 65% del volumen inicial tras la exposición a PTX@p4VP, y un aproximadamente 53% tras la exposición a Tripalm-NPs-PTX. En base a estos resultados, nuestras NPs basadas en tripalmitina son más eficaces que las nanomicelas descritas.

Para determinar si la incorporación de PTX a nuestras nanoformulaciones era capaz de modular los niveles de apoptosis inducidos en un sistema en el que la interconexión celular se asemeja a la descrita en masas tumorales *in vivo*, realizamos estudios mediante la técnica de TUNEL. Esta técnica nos ha proporcionado información sobre la viabilidad de las células que conforman el MTS, observándose cómo las superficiales van entrando en apoptosis al ser tratadas. Los resultados obtenidos con ambas NPs son parecidos, pudiéndose decir que, en ambos casos, la presencia de una mayor fluorescencia tras el tratamiento con las NPs-PTX y una distribución más amplia por todo el esfero y no solo por la superficie, indica un mayor grado de apoptosis que el inducido mediante PTX libre. Además, la fluorescencia fue más notable en los MTS de A549 que en los de MCF7, a pesar de que en el momento de la realización de este ensayo ambos MTS habían sido expuestos a los tratamientos por el mismo periodo de tiempo. Para reforzar estos datos y profundizar sobre el comportamiento de las NPs en MTS se podrían realizar otros ensayos que estudien la actividad enzimática de las células que conforman el MTS como han hecho otros autores (Yang y cols., 2009; Lovitt y cols., 2015). En definitiva, los resultados en los MTS son un paso previo y muy importante para asegurarnos que nuestras NPs pueden comportarse de manera exitosa en ensayos *in vivo*

V.6. Resistencia mediada por P- glicoproteína

Uno de los principales mecanismos de MDR en las células tumorales se basa en la sobreexpresión de P-gp. La inhibición de este mecanismo de resistencia fue analizada tras el uso de las Tripalm-NPs y Tripalm-NPs-MAC, siendo MAC, como ya se ha descrito, un potencial inhibidor de P-gp. Los resultados obtenidos, tanto en cuanto a la internalización como a la citotoxicidad de estos sistemas en células que sobreexpresan P-gp, implican que nuestra nanoformulación inhibe la resistencia a drogas, que la inhibición de este transportador se debe a elementos presentes en la formulación original o al conjunto de la NP y que parece no existir influencia de la presencia de MAC en este fenómeno. Además la inhibición producida por ambas NPs es mucho más potente que la producida por verapamilo.

La administración conjunta de PTX con un inhibidor de P-gp (verapamilo) ha sido estudiada por Baek y Cho (Baek y Cho, 2015), consiguiendo aumentar la internalización en células resistentes de mama MCF7/ADR y disminuyendo la viabilidad celular de un 65% a un 36,5%. Esta reducción de aproximadamente un 30% en la viabilidad celular concuerda con nuestros resultados en la línea celular HCT-15, en los que la administración conjunta de PTX con verapamilo a una dosis de 50 nM consiguió reducir la viabilidad de un ~90% a un ~60%. Por otra parte, la administración conjunta de PTX y MAC ha demostrado aumentar su internalización hasta 1,7 veces en células resistentes NCI/ADR-RES, mientras que en las células que no sobreexpresaban P-gp esta permaneció inalterada (Qiang y cols., 2010). Otros inhibidores de P-gp están siendo estudiados recientemente en combinación con PTX, como es el caso de HZ08. Su administración conjunta mediante NPs de lipoproteína de alta densidad reconstituida es capaz de disminuir la IC_{50} en células MCF7 resistentes a PTX hasta un 39% respecto a las NPs que sólo presentaban PTX (Zhang y cols., 2016). En nuestro caso, la administración conjunta de las Tripalm-NPs-PTX y Tripalm-NPs-MAC-PTX con verapamilo produce reducciones de la IC_{50} en HCT-15 de un ~93% y un ~90%, respectivamente, respecto a las NPs-PTX solas, por lo que nuestras NPs serían mucho más ventajosas a la hora de favorecer el efecto inhibitorio del verapamilo en células resistentes. Además, podemos comprobar que este efecto se debe a la inhibición de la

P-gp, ya que en la línea sensible T84 la administración conjunta con verapamilo no modifica el efecto de ninguno de estos sistemas.

Otras NPs han demostrado inhibir por ellas mismas P-gp. Es el caso de NPs de acetilalcohol/ polisorbato, que han reducido la IC_{50} de PTX en HCT-15 más de 2,7 veces. También han conseguido disminuir el volumen tumoral en ratones con un xenoinjerto de esta línea celular (Koziara y cols., 2006). SLNs consiguieron reducir la IC_{50} de PTX en MCF-7/ADR hasta 97,8 veces, mientras que en la línea no resistente MCF7 esta mejora era solamente de 2,3 veces (Miao y cols., 2013). En nuestros resultados no podemos calcular la disminución de la IC_{50} del PTX con nuestros sistemas en la línea resistente HCT-15, porque el efecto del PTX a la dosis más alta (50 nM) no llega a un 10% de inhibición celular. Pero, sin embargo, hemos podido observar que a esa dosis ambas NPs disminuyeron la viabilidad alrededor de un 90%. En la línea celular no resistente T84 Tripalm-NPs-PTX y Tripalm-NPs-MAC-PTX también provocaron la disminución de la IC_{50} del PTX 2,7 y 2 veces, respectivamente.

Asimismo, diferentes variedades de NPs de latex han mostrado una acumulación de Rh en las células que sobreexpresaban P-gp (Salomon y Ehrhardt, 2011), resultados muy similares a los obtenidos con Tripalm-NPs y Tripalm-NPs-MAC en HCT-15, en los que se aprecia una acumulación de Rh en las células mucho mayor a la experimentada tras la exposición a verapamilo. Por último, NPs de oro conjugadas con β CD y PEG han promovido una reducción de la IC_{50} del PTX en células H460 resistentes de hasta 17 veces, y mantener una elevada concentración de PTX en el interior celular, tanto en células resistentes como no resistente (Li y cols., 2016).

V.7. Actividad de las Tripalm-NPs-PTX sobre las células madre tumorales de líneas derivadas de cáncer de mama y pulmón.

El estudio del efecto de nuestras NPs sobre las CSCs mostraron que las Tripalm-NPs-PTX son capaces de inhibir la viabilidad de CSCs obtenidas a partir de las líneas celulares tumorales de mama y pulmón, MCF7 y A549 respectivamente. Concretamente, las Tripalm-NPs-PTX reducen la IC_{50} del PTX libre 6,7 veces en MCF7 y 14,9 veces en A549. Esta notable disminución de la viabilidad celular demuestra que

DISCUSIÓN

nuestras NPs tienen capacidad para inhibir el crecimiento no solo de las líneas celulares tumorales de mama y pulmón, sino también de las CSCs aisladas a partir de ellas. Esto supone una ventaja muy importante en el tratamiento de estos tumores, ya que la supervivencia de las CSCs al tratamiento quimioterápico supone una de las principales causas de fallo de la terapia antitumoral, junto con el desarrollo de MDR.

Sin embargo, más ensayos son necesarios para analizar la interacción de Tripalm-NPs-PTX con este tipo de células y su mejora para conseguir un mayor efecto. Una de las estrategias más comúnmente utilizadas para aumentar la captación de NPs por las CSCs consiste en decorar las NPs con marcadores que localicen los receptores presentes en las CSCs. Por ejemplo, NPs de PLGA-PTX se han funcionalizado con un anticuerpo monoclonal anti-CD133, marcador de CSCs, para aumentar su efecto en las células que sobreexpresan este receptor. Estas NPs provocaron una disminución en el número de mamoesferas formadas a partir de MCF7 de un 70% respecto a los controles, mientras que el PTX libre sólo consiguió una reducción de un 10%. Además, ensayos *in vivo* con ratones que recibieron un xenoinjerto de células MDAMB231 de cáncer de mama demostraron que el tratamiento con estas NPs disminuía significativamente el repunte del crecimiento del tumor una vez terminado el tratamiento (Swaminathan y cols., 2013). Muntimadugu y cols. (Muntimadugu y cols., 2016) han utilizado AH para direccionar NPs de PLGA hacia las células CD44+, otro marcador de CSCs. Estas NPs incorporaron saliomicina, un fármaco selectivo frente a las CSCs, y presentaron una mayor inhibición de las células con alta expresión del receptor CD44 respecto a las NPs sin marcar y el fármaco libre. La combinación de estos sistemas con NPs de PLGA-PTX incrementó aún más el efecto sobre las CSCs. El recubrimiento de SLNs con AH además de *in vitro* también ha demostrado su eficacia *in vivo*, en un modelo murino de metástasis pulmonar mediante la inoculación de células B16F10-CD44⁺ (CSCs de melanoma) direccionando las NPs hacia el tejido tumoral y promoviendo su liberación tejido-específica. Asimismo, la supervivencia de los ratones se vio aumentada sin comprometer la seguridad del fármaco, desarrollando los ratones unos niveles mínimos de hepatotoxicidad y respuesta inflamatoria (Shen y cols., 2015).

En los ensayos presentados en nuestro trabajo, la selección de las CSCs se ha basado en el crecimiento de las células en medios selectivos de CSCs. Una vez

seleccionadas estas células se han caracterizado y se ha demostrado que cumple con los criterios para considerarlas CSCs (Yu y cols., 2012; Gao y cols., 2014; Apostolou y cols., 2015). Los resultados han sido buenos y dan pie a la realización de experimentos *in vivo* para estudiar el efecto sobre tumores derivados de estas CSCs y compararlos con el uso del PTX libre.

DISCUSIÓN

Conclusiones

VI. CONCLUSIONES

1. Las NPs hollow-p4VP y Tripalm-NPs han mostrado ser biocompatibles y aptas para su administración *in vivo*, lo que supone una gran ventaja respecto a la formulación comercial Taxol que presenta una gran toxicidad.

2. Ambos sistemas nanoparticulares cargados con PTX han reducido significativamente la viabilidad celular en líneas celulares humanas de cáncer de mama y pulmón en comparación con el PTX libre, mejorando la eficacia de este fármaco.

3. La modificación de las Tripalm-NPs mediante β CD, MAC o OEG no supone mejoras en cuanto a la citotoxicidad de estos sistemas, aunque podrían presentar ventajas en posteriores ensayos *in vivo*.

4. Además, la incorporación de PTX en hollow-p4VP y Tripalm-NPs no modifica su mecanismo de acción, que se lleva a cabo mediante una parada del proceso de mitosis.

5. La internalización del fármaco en las células se ve acentuada por su administración en estas NPs de un modo directamente dependiente del tiempo de exposición.

6. Por otro lado, PTX@p4VP y Tripalm-NPs-PTX disminuyen significativamente el volumen de MTS tanto de mama como de pulmón en comparación con el efecto del PTX.

7. En el caso de Tripalm-NPs-PTX, han demostrado además su eficacia frente a células tumorales resistentes mediante la inhibición de P-gp, y CSCs de mama y pulmón, siendo ambos tipos celulares responsables de la aparición de recidivas y del fallo del tratamiento.

CONCLUSIONES

Conclusions

VII. CONCLUSIONS

1. Hollow-p4VP and Tripalm-NPs have proved their biocompatibility, being suitable for *in vivo* administration. This means a great advantage respect to Taxol, which presents a high toxicity.

2. Both NPs loaded with PTX have significantly reduced cell viability in breast and lung human tumor cells in comparison with free PTX, improving the drug antitumor efficacy.

3. Functionalization of Tripalm-NPs with β CD, MAC and OEG have not implied any enhancement of the cytotoxicity respect to the unmodified NPs. However, they may suppose a benefit in further *in vivo* assays.

4. Moreover, encapsulation of PTX into hollow-p4VP and Tripalm-NPs do not change its mechanism of action, which is carried out by means of a mitosis arrest.

5. Cell internalization of the drug is enhanced by its administration into these NPs, being the uptake time-dependent.

6. On the other hand, PTX@p4VP and Tripalm-NPs-PTX are able to significantly decrease breast and lung MTS volume in comparison to the effect of PTX in solution.

7. Concretely, Tripalm-NPs-PTX have demonstrated their ability to kill resistant tumor cells with overexpress P-gp, and also breast and lung CSCs, being both cell types responsible for the development of recurrences and treatment failure.

CONCLUSIONS

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- (EMA), E. M. A. (2015, 11/05/2015). "Ficha técnica paclitaxel." Retrieved 18/10/2016, from http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000778/WC500020435.pdf.
- (WHO), W. H. O. (2015). "Cancer (Fact sheet N°297)." from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
- Aapro, M. S., J. Bohlius, et al. (2011). "2010 update of EORTC guidelines for the use of granulocyte-colony stimulating factor to reduce the incidence of chemotherapy-induced febrile neutropenia in adult patients with lymphoproliferative disorders and solid tumours." *Eur J Cancer* **47**(1): 8-32.
- Adesina, S. K., A. Holly, et al. (2014). "Polylactide-based paclitaxel-loaded nanoparticles fabricated by dispersion polymerization: characterization, evaluation in cancer cell lines, and preliminary biodistribution studies." *J Pharm Sci* **103**(8): 2546-2555.
- Ahmed, F., R. I. Pakunlu, et al. (2006). "Biodegradable polymersomes loaded with both paclitaxel and doxorubicin permeate and shrink tumors, inducing apoptosis in proportion to accumulated drug." *J Control Release* **116**(2): 150-158.
- Ahn, H. K., M. Jung, et al. (2014). "A phase II trial of Cremophor EL-free paclitaxel (Genexol-PM) and gemcitabine in patients with advanced non-small cell lung cancer." *Cancer Chemother Pharmacol* **74**(2): 277-282.
- Anbarasan, B., S. V. Babu, et al. (2015). "pH Responsive Release of Doxorubicin to the Cancer Cells by Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotubes." *J Nanosci Nanotechnol* **15**(7): 4799-4805.
- Apostolou, P., M. Toloudi, et al. (2015). "Identification of genes involved in breast cancer and breast cancer stem cells." *Breast Cancer : Targets and Therapy* **7**: 183-191.
- Arora, S., R. Kumar, et al. (2014). "Translocation and toxicity of docetaxel multi-walled carbon nanotube conjugates in mammalian breast cancer cells." *J Biomed Nanotechnol* **10**(12): 3601-3609.

BIBLIOGRAFÍA

- Ashwanikumar, N., N. A. Kumar, et al. (2012). "Methacrylic-based nanogels for the pH-sensitive delivery of 5-fluorouracil in the colon." Int J Nanomedicine **7**: 5769-5779.
- Baek, J. S. and C. W. Cho (2013). "2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin-modified SLN of paclitaxel for overcoming p-glycoprotein function in multidrug-resistant breast cancer cells." J Pharm Pharmacol **65**(1): 72-78.
- Baek, J. S. and C. W. Cho (2015). "Controlled release and reversal of multidrug resistance by co-encapsulation of paclitaxel and verapamil in solid lipid nanoparticles." Int J Pharm **478**(2): 617-624.
- Banerjee, S., K. Sen, et al. (2012). "Poly(styrene-co-maleic acid)-based pH-sensitive liposomes mediate cytosolic delivery of drugs for enhanced cancer chemotherapy." Int J Pharm **436**(1-2): 786-797.
- Bannunah, A. M., D. Vllasaliu, et al. (2014). "Mechanisms of nanoparticle internalization and transport across an intestinal epithelial cell model: effect of size and surface charge." Mol Pharm **11**(12): 4363-4373.
- Bernabeu, E., G. Helguera, et al. (2014). "Paclitaxel-loaded PCL-TPGS nanoparticles: in vitro and in vivo performance compared with Abraxane(R)." Colloids Surf B Biointerfaces **113**: 43-50.
- Bilensoy, E., O. Gurkaynak, et al. (2008). "Safety and efficacy of amphiphilic beta-cyclodextrin nanoparticles for paclitaxel delivery." Int J Pharm **347**(1-2): 163-170.
- Boman, B. M., M. S. Wicha, et al. (2007). "Symmetric division of cancer stem cells--a key mechanism in tumor growth that should be targeted in future therapeutic approaches." Clin Pharmacol Ther **81**(6): 893-898.
- Bondi, M. L., C. Botto, et al. (2015). "Lipid nanocarriers containing sorafenib inhibit colonies formation in human hepatocarcinoma cells." Int J Pharm **493**(1-2): 75-85.
- Bonilla, J. A. M. (2016). Consideraciones sobre diagnóstico, tratamiento y estadificación del cáncer de mama en función de su procedencia: programa poblacional de cribado o consultas médicas., Universidad de Zaragoza.
- Bozzuto, G. and A. Molinari (2015). "Liposomes as nanomedical devices." Int J Nanomedicine **10**: 975-999.

- breastcancer.org. (2016). "Breast cancer. Genetics." Retrieved 11-07-2016, from <http://www.breastcancer.org/risk/factors/genetics>.
- Breastcancer.org. (2016). "Breast cancer. Risk factors." Retrieved 19/07/2016, from <http://www.breastcancer.org/risk/factors>.
- Breastcancer.org. (2016). "Estadios del cáncer de mama." Retrieved 12-07-2016, from <http://www.breastcancer.org/es/sintomas/diagnostico/estadios>.
- Brigger, I., C. Dubernet, et al. (2002). "Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis." *Adv Drug Deliv Rev* **54**(5): 631-651.
- Brown, S. C., M. Palazuelos, et al. (2010). "Nanoparticle characterization for cancer nanotechnology and other biological applications." *Methods Mol Biol* **624**: 39-65.
- Cabeza, L., G. Perazzoli, et al. (2016). *Nanomaterials and Cancer Therapy. Nanotechnology and Drug Delivery, Volume Two: Nano-Engineering Strategies and Nanomedicines against Severe Diseases*. C. Press, CRC Press: 228-256.
- Cavalli, R., O. Caputo, et al. (2000). "Preparation and characterization of solid lipid nanospheres containing paclitaxel." *Eur J Pharm Sci* **10**(4): 305-309.
- Cirri, M., M. Bragagni, et al. (2012). "Development of a new delivery system consisting in "drug--in cyclodextrin--in nanostructured lipid carriers" for ketoprofen topical delivery." *Eur J Pharm Biopharm* **80**(1): 46-53.
- Clares, B., R. A. Biedma-Ortiz, et al. (2013). "Nano-engineering of 5-fluorouracil-loaded magnetoliposomes for combined hyperthermia and chemotherapy against colon cancer." *Eur J Pharm Biopharm* **85**(3 Pt A): 329-338.
- Conlin, A. K., A. D. Seidman, et al. (2010). "Phase II trial of weekly nanoparticle albumin-bound paclitaxel with carboplatin and trastuzumab as first-line therapy for women with HER2-overexpressing metastatic breast cancer." *Clin Breast Cancer* **10**(4): 281-287.
- Contreras-Cáceres, R., M. C. Leiva, et al. (2017). "Paclitaxel-loaded hollow-poly(4-vinylpyridine) nanoparticles enhance drug chemotherapeutic efficacy in lung and breast cancer cell lines." *Nano Research*: 1-20.
- Cheang, M. C., S. K. Chia, et al. (2009). "Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer." *J Natl Cancer Inst* **101**(10): 736-750.

BIBLIOGRAFÍA

- Chen, H., Z. Wang, et al. (2015). "A graphene quantum dot-based FRET system for nuclear-targeted and real-time monitoring of drug delivery." Nanoscale **7**(37): 15477-15486.
- Chen, S. Y., S. S. Hu, et al. (2013). "Establishment of paclitaxel-resistant breast cancer cell line and nude mice models, and underlying multidrug resistance mechanisms in vitro and in vivo." Asian Pac J Cancer Prev **14**(10): 6135-6140.
- Darby, S., D. Hill, et al. (2005). "Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies." BMJ **330**(7485): 21.
- Davis, F. F. (2002). "The origin of pegnology." Adv Drug Deliv Rev **54**(4): 457-458.
- Devalapally, H., Z. Duan, et al. (2007). "Paclitaxel and ceramide co-administration in biodegradable polymeric nanoparticulate delivery system to overcome drug resistance in ovarian cancer." Int J Cancer **121**(8): 1830-1838.
- Elsersawi, A. (2010). World of Nanobioengineering: Potential Big Ideas for the Future.
- Ernsting, M. J., M. Murakami, et al. (2013). "Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles." J Control Release **172**(3): 782-794.
- Evans, B. C., C. E. Nelson, et al. (2013). "Ex Vivo Red Blood Cell Hemolysis Assay for the Evaluation of pH-responsive Endosomolytic Agents for Cytosolic Delivery of Biomacromolecular Drugs." (73): e50166.
- Fan, T., C. Chen, et al. (2014). "Design and evaluation of solid lipid nanoparticles modified with peptide ligand for oral delivery of protein drugs." Eur J Pharm Biopharm **88**(2): 518-528.
- Feng, C., J. Li, et al. (2015). "Surface charge effect on mucoadhesion of chitosan based nanogels for local anti-colorectal cancer drug delivery." Colloids Surf B Biointerfaces **128**: 439-447.
- Feng, C., Z. Wang, et al. (2013). "Chitosan/o-carboxymethyl chitosan nanoparticles for efficient and safe oral anticancer drug delivery: in vitro and in vivo evaluation." Int J Pharm **457**(1): 158-167.
- Feng, L. and R. J. Mumper (2013). "A critical review of lipid-based nanoparticles for taxane delivery." Cancer Lett **334**(2): 157-175.

- Ferlay, J., I. Soerjomataram, et al. (2015). "Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012." International Journal of Cancer **136**(5): E359-E386.
- Fonseca, C., S. Simoes, et al. (2002). "Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity." J Control Release **83**(2): 273-286.
- Fourcade, M. G. (2008). "EL ENDOTELIO VASCULAR." Flebología y Linfología / Lecturas Vasculares **9**: 508-513.
- Fruh, M., D. De Ruyscher, et al. (2013). "Small-cell lung cancer (SCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up." Ann Oncol **24**(6): 27.
- Gao, F., Y. Zhang, et al. (2014). "Hes1 is involved in the self-renewal and tumourigenicity of stem-like cancer cells in colon cancer." Sci Rep **4**(3963).
- Gao, W., J. M. Chan, et al. (2010). "pH-Responsive Nanoparticles for Drug Delivery." Molecular Pharmaceutics **7**(6): 1913-1920.
- Gelderblom, H., J. Verweij, et al. (2001). "Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation." Eur J Cancer **37**(13): 1590-1598.
- Gilbert, E. S. (2009). "Ionizing Radiation and Cancer Risks: What Have We Learned From Epidemiology?" International journal of radiation biology **85**(6): 467-482.
- Gobbo, O. L., K. Sjaastad, et al. (2015). "Magnetic Nanoparticles in Cancer Theranostics." Theranostics **5**(11): 1249-1263.
- Gonzalez, A., J. Soberino, et al. (2012). "Drug resistance induced by paclitaxel and carboplatin plasmatic concentrations in lung cancer cell lines." J Clin Oncol **30**(30_suppl): 97.
- Gornstein, E. and T. L. Schwarz (2014). "The paradox of paclitaxel neurotoxicity: mechanisms and unanswered questions." Neuropharmacology **76**: 175-183.
- Gradishar, W. J. (2012). "Taxanes for the treatment of metastatic breast cancer." Breast Cancer **6**: 159-171.
- Gradishar, W. J., S. Tjulandin, et al. (2005). "Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer." J Clin Oncol **23**(31): 7794-7803.

BIBLIOGRAFÍA

- Group, E. B. C. T. C. (2012). "Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials." Lancet **379**(9814): 432-444.
- Group, E. H. B. C. C. (2003). "Body Mass Index, Serum Sex Hormones, and Breast Cancer Risk in Postmenopausal Women." Journal of the National Cancer Institute **95**(16): 1218-1226.
- Guan, L., L. Rizzello, et al. (2015). "Polymersomes and their applications in cancer delivery and therapy." Nanomedicine **10**(17): 2757-2780.
- Guchelaar, H. J., C. H. ten Napel, et al. (1994). "Clinical, toxicological and pharmaceutical aspects of the antineoplastic drug taxol: a review." Clin Oncol **6**(1): 40-48.
- Guiu, S., S. Michiels, et al. (2012). "Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement." Ann Oncol **23**(12): 2997-3006.
- Gullotti, E. and Y. Yeo (2009). "Extracellularly activated nanocarriers: a new paradigm of tumor targeted drug delivery." Mol Pharm **6**(4): 1041-1051.
- Guo, B., D. J. Villeneuve, et al. (2004). "Cross-resistance studies of isogenic drug-resistant breast tumor cell lines support recent clinical evidence suggesting that sensitivity to paclitaxel may be strongly compromised by prior doxorubicin exposure." Breast Cancer Res Treat **85**(1): 31-51.
- Harush-Frenkel, O., N. Debotton, et al. (2007). "Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway." Biochemical and Biophysical Research Communications **353**(1): 26-32.
- He, M., Z. Zhao, et al. (2009). "Hyaluronic acid coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles as anticancer drug carriers." International Journal of Pharmaceutics **373**(1-2): 165-173.
- Hernandez-Vargas, H., J. Palacios, et al. (2007). "Telling cells how to die: docetaxel therapy in cancer cell lines." Cell Cycle **6**(7): 780-783.
- Hitzman, C. J., W. F. Elmquist, et al. (2006). "Development of a respirable, sustained release microcarrier for 5-fluorouracil II: In vitro and in vivo optimization of lipid coated nanoparticles." J Pharm Sci **95**(5): 1127-1143.

- Ho, W. Y., S. K. Yeap, et al. (2012). "Development of multicellular tumor spheroid (MCTS) culture from breast cancer cell and a high throughput screening method using the MTT assay." PLoS One **7**(9): 6.
- Holliday, D. L. and V. Speirs (2011). "Choosing the right cell line for breast cancer research." Breast Cancer Res **13**(4).
- Hong, S. S., S. H. Kim, et al. (2015). "Effects of triglycerides on the hydrophobic drug loading capacity of saturated phosphatidylcholine-based liposomes." Int J Pharm **483**(1-2): 142-150.
- Hou, D., C. Xie, et al. (2003). "The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs)." Biomaterials **24**(10): 1781-1785.
- Hu, K., H. Zhou, et al. (2015). "Hyaluronic acid functional amphipathic and redox-responsive polymer particles for the co-delivery of doxorubicin and cyclophosphamide to eradicate breast cancer cells and cancer stem cells." Nanoscale **7**(18): 8607-8618.
- Huff, T. B., L. Tong, et al. (2007). "Hyperthermic effects of gold nanorods on tumor cells." Nanomedicine **2**(1): 125-132.
- Iglesias, J. M., I. Belouqui, et al. (2013). "Mammosphere formation in breast carcinoma cell lines depends upon expression of E-cadherin." PLoS One **8**(10).
- Ilundáin, M. L. (2011). Relevancia funcional de VEGFA y sus receptores en cáncer de pulmón. Universidad de Navarra.
- Im, Y. B., I. Ha, et al. (2009). "Macelignan: a new modulator of P-glycoprotein in multidrug-resistant cancer cells." Nutr Cancer **61**(4): 538-543.
- Impens, F., P. Van Damme, et al. (2008). "Mechanistic insight into taxol-induced cell death." Oncogene **27**(33): 4580-4591.
- Institute, U. S. N. I. o. H. N. C. (2016, 04/2016). "SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013." Retrieved 12/12/2016, 2016, from http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/.
- International, W. C. R. F. (2012). "Cancer facts and figures. Worldwide data." from <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/worldwide-data>.
- Iversen, T.-G., T. Skotland, et al. (2011). "Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies." Nano Today **6**(2): 176-185.

BIBLIOGRAFÍA

- Jabir, N. R., S. Tabrez, et al. (2012). "Nanotechnology-based approaches in anticancer research." Int J Nanomedicine **7**: 4391-4408.
- Jamieson, L. E., D. J. Harrison, et al. (2015). "Chemical analysis of multicellular tumour spheroids." Analyst **140**(12): 3910-3920.
- Jiang, X., H. Xin, et al. (2014). "Enhanced antitumor efficacy by d-glucosamine-functionalized and paclitaxel-loaded poly(ethylene glycol)-co-poly(trimethylene carbonate) polymer nanoparticles." J Pharm Sci **103**(5): 1487-1496.
- Jin, C., L. Bai, et al. (2009). "Cytotoxicity of paclitaxel incorporated in PLGA nanoparticles on hypoxic human tumor cells." Pharm Res **26**(7): 1776-1784.
- Juliano, R. L. and V. Ling (1976). "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants." Biochim Biophys Acta **455**(1): 152-162.
- Kato, Y., S. Ozawa, et al. (2013). "Acidic extracellular microenvironment and cancer." Cancer Cell International **13**(1): 1-8.
- Kesavan, A., P. Ilaiyaraja, et al. (2015). "Tumor targeting using polyamidoamine dendrimer-cisplatin nanoparticles functionalized with diglycolamic acid and herceptin." Eur J Pharm Biopharm **96**: 255-263.
- Kierny, M. R., T. D. Cunningham, et al. (2012). "Detection of biomarkers using recombinant antibodies coupled to nanostructured platforms." Nano Rev **3**(10): 23.
- King, M. C., J. H. Marks, et al. (2003). "Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2." Science **302**(5645): 643-646.
- Knuefermann, C., Y. Lu, et al. (2003). "HER2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells." Oncogene **22**(21): 3205-3212.
- Koziara, J. M., T. R. Whisman, et al. (2006). "In-vivo efficacy of novel paclitaxel nanoparticles in paclitaxel-resistant human colorectal tumors." J Control Release **112**(3): 312-319.
- Kozlovskaya, V., E. Kharlampieva, et al. (2006). "Poly(methacrylic acid) Hydrogel Films and Capsules: Response to pH and Ionic Strength, and Encapsulation of Macromolecules." Chemistry of Materials **18**(2): 328-336.

- Kretzer, I. F., D. A. Maria, et al. (2012). "Drug-targeting in combined cancer chemotherapy: tumor growth inhibition in mice by association of paclitaxel and etoposide with a cholesterol-rich nanoemulsion." Cell Oncol **35**(6): 451-460.
- Kumar, A., S. V. Lale, et al. (2015). "Synthesis and biological evaluation of dual functionalized glutathione sensitive poly(ester-urethane) multiblock polymeric nanoparticles for cancer targeted drug delivery." Polymer Chemistry **6**(43): 7603-7617.
- Kundranda, M. N. and J. Niu (2015). "Albumin-bound paclitaxel in solid tumors: clinical development and future directions." Drug Des Devel Ther **9**: 3767-3777.
- Kurkov, S. V. and T. Loftsson (2013). "Cyclodextrins." Int J Pharm **453**(1): 167-180.
- Lababede, O., M. Meziane, et al. (2011). "Seventh edition of the cancer staging manual and stage grouping of lung cancer: quick reference chart and diagrams." Chest **139**(1): 183-189.
- Lale, S. V., A. Kumar, et al. (2015). "Folic Acid and Trastuzumab Functionalized Redox Responsive Polymersomes for Intracellular Doxorubicin Delivery in Breast Cancer." Biomacromolecules **16**(6): 1736-1752.
- Laquintana, V., N. Denora, et al. (2014). "Translocator protein ligand-PLGA conjugated nanoparticles for 5-fluorouracil delivery to glioma cancer cells." Mol Pharm **11**(3): 859-871.
- Lee, E. S., K. T. Oh, et al. (2007). "Tumor pH-responsive flower-like micelles of poly(l-lactic acid)-b-poly(ethylene glycol)-b-poly(l-histidine)." Journal of Controlled Release **123**(1): 19-26.
- Lee, K. S., H. C. Chung, et al. (2008). "Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, in patients with metastatic breast cancer." Breast Cancer Research and Treatment **108**(2): 241-250.
- Lee, M.-K., S.-J. Lim, et al. (2007). "Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity of paclitaxel-loaded sterically stabilized solid lipid nanoparticles." Biomaterials **28**(12): 2137-2146.
- Leeper, D. B., K. Engin, et al. (1994). "Human tumor extracellular pH as a function of blood glucose concentration." International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics **28**(4): 935-943.

BIBLIOGRAFÍA

- Leonessa, F. and R. Clarke (2003). "ATP binding cassette transporters and drug resistance in breast cancer." Endocr Relat Cancer **10**(1): 43-73.
- Lerner, M. B., J. D'Souza, et al. (2012). "Hybrids of a genetically engineered antibody and a carbon nanotube transistor for detection of prostate cancer biomarkers." ACS Nano **6**(6): 5143-5149.
- Li, F., X. Zhou, et al. (2016). "Reducing Both Pgp Overexpression and Drug Efflux with Anti-Cancer Gold-Paclitaxel Nanoconjugates." PLoS One **11**(7).
- Liechty, W. B., D. R. Kryscio, et al. (2010). "Polymers for Drug Delivery Systems." Annual review of chemical and biomolecular engineering **1**: 149-173.
- Lin, J. H. and M. Yamazaki (2003). "Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications." Clin Pharmacokinet **42**(1): 59-98.
- Litman, T., T. E. Druley, et al. (2001). "From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance." Cell Mol Life Sci **58**(7): 931-959.
- Lopez-Gasco, P., I. Iglesias, et al. (2012). "Characterization and in-vitro bioactivity evaluation of paclitaxel-loaded polyester nanoparticles." Anticancer Drugs **23**(9): 947-958.
- Lopez-Gasco, P., I. Iglesias, et al. (2011). "Paclitaxel-loaded polyester nanoparticles prepared by spray-drying technology: in vitro bioactivity evaluation." J Microencapsul **28**(5): 417-429.
- Lovitt, C. J., T. B. Shelper, et al. (2015). "Evaluation of chemotherapeutics in a three-dimensional breast cancer model." J Cancer Res Clin Oncol **141**(5): 951-959.
- Lu, J., X. Chuan, et al. (2014). "Free paclitaxel loaded PEGylated-paclitaxel nanoparticles: preparation and comparison with other paclitaxel systems in vitro and in vivo." Int J Pharm **471**(1-2): 525-535.
- Lu, W., G. Zhang, et al. (2010). "Tumor site-specific silencing of NF-kappaB p65 by targeted hollow gold nanosphere-mediated photothermal transfection." Cancer Res **70**(8): 3177-3188.
- Lu, Y., F. Xue, et al. (2014). "Phosphorescent polymeric nanoparticles by coordination cross-linking as a platform for luminescence imaging and photodynamic therapy." Chemistry **20**(49): 16242-16247.

- Luanpitpong, S., L. Wang, et al. (2014). "Induction of stem-like cells with malignant properties by chronic exposure of human lung epithelial cells to single-walled carbon nanotubes." Part Fibre Toxicol **11**(22): 1743-8977.
- Lundholm, L., P. Haag, et al. (2013). "Resistance to DNA-damaging treatment in non-small cell lung cancer tumor-initiating cells involves reduced DNA-PK/ATM activation and diminished cell cycle arrest." Cell Death Dis **31**(4): 211.
- Luque, R. (2009). Resistencia a drogas inducida por concentraciones plasmáticas de paclitaxel y carboplatino. Determinación del Gen MDR1 en sangre periférica como marcador de respuesta al tratamiento en pacientes con cáncer de pulmón, Universidad de Granada.
- Ma, P. and R. J. Mumper (2013). "Paclitaxel Nano-Delivery Systems: A Comprehensive Review." J Nanomed Nanotechnol **4**(2): 1000164.
- Maeng, J. H., D. H. Lee, et al. (2010). "Multifunctional doxorubicin loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for chemotherapy and magnetic resonance imaging in liver cancer." Biomaterials **31**(18): 4995-5006.
- Malhotra, R., V. Patel, et al. (2010). "Ultrasensitive electrochemical immunosensor for oral cancer biomarker IL-6 using carbon nanotube forest electrodes and multilabel amplification." Anal Chem **82**(8): 3118-3123.
- Manivasagan, P., S. Bharathiraja, et al. (2016). "Paclitaxel-loaded chitosan oligosaccharide-stabilized gold nanoparticles as novel agents for drug delivery and photoacoustic imaging of cancer cells." International Journal of Pharmaceutics **511**(1): 367-379.
- Markeb, A. A., N. A. El-Maali, et al. (2016). "Synthesis, Structural Characterization, and Preclinical Efficacy of a Novel Paclitaxel-Loaded Alginate Nanoparticle for Breast Cancer Treatment." Int J Breast Cancer **7549372**(10): 30.
- Martin-Banderas, L., I. Munoz-Rubio, et al. (2015). "In vitro and in vivo evaluation of Delta(9)-tetrahydrocannabinol/PLGA nanoparticles for cancer chemotherapy." Int J Pharm **487**(1-2): 205-212.
- Martins, S., S. Costa-Lima, et al. (2012). "Solid lipid nanoparticles as intracellular drug transporters: an investigation of the uptake mechanism and pathway." Int J Pharm **430**(1-2): 216-227.

BIBLIOGRAFÍA

- Mashinchian, O., M. Johari-Ahar, et al. (2014). "Impacts of quantum dots in molecular detection and bioimaging of cancer." Bioimpacts **4**(3): 149-166.
- Mauri, D., K. Kamposioras, et al. (2010). "Overall survival benefit for weekly vs. three-weekly taxanes regimens in advanced breast cancer: A meta-analysis." Cancer Treat Rev **36**(1): 69-74.
- McGrogan, B. T., B. Gilmartin, et al. (2008). "Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer." Biochim Biophys Acta **2**: 96-132.
- McPherson, K., C. M. Steel, et al. (2000). "Breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics." BMJ **321**(7261): 624-628.
- Melguizo, C., J. Prados, et al. (2012). "Modulation of MDR1 and MRP3 gene expression in lung cancer cells after paclitaxel and carboplatin exposure." Int J Mol Sci **13**(12): 16624-16635.
- Melita, E. D., G. Purcel, et al. (2015). "Carbon nanotubes for cancer therapy and neurodegenerative diseases." Rom J Morphol Embryol **56**(2): 349-356.
- Messner, M., S. V. Kurkov, et al. (2010). "Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles." Int J Pharm **387**(1-2): 199-208.
- Miao, J., Y. Z. Du, et al. (2013). "Drug resistance reversal activity of anticancer drug loaded solid lipid nanoparticles in multi-drug resistant cancer cells." Colloids Surf B Biointerfaces **110**: 74-80.
- Mirtsching, B., T. Cosgriff, et al. (2011). "A phase II study of weekly nanoparticle albumin-bound paclitaxel with or without trastuzumab in metastatic breast cancer." Clin Breast Cancer **11**(2): 121-128.
- Mittapalli, R. K., X. Liu, et al. (2013). "Paclitaxel-hyaluronic nanoconjugates prolong overall survival in a preclinical brain metastases of breast cancer model." Mol Cancer Ther **12**(11): 2389-2399.
- Muntimadugu, E., R. Kumar, et al. (2016). "CD44 targeted chemotherapy for co-eradication of breast cancer stem cells and cancer cells using polymeric nanoparticles of salinomycin and paclitaxel." Colloids Surf B Biointerfaces **143**: 532-546.
- Naderi, N., S. Y. Madani, et al. (2015). "Octa-ammonium POSS-conjugated single-walled carbon nanotubes as vehicles for targeted delivery of paclitaxel." Nano Rev **6**(28297).

- Narayanan, S., M. Pavithran, et al. (2014). "Sequentially releasing dual-drug-loaded PLGA-casein core/shell nanomedicine: design, synthesis, biocompatibility and pharmacokinetics." Acta Biomater **10**(5): 2112-2124.
- Neve, R. M., K. Chin, et al. (2006). "A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes." Cancer Cell **10**(6): 515-527.
- Organization, W. H. (2016). "El radón y sus efectos en la salud." from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs291/es/>.
- Ozay, O., A. Akcali, et al. (2010). "P(4-VP) based nanoparticles and composites with dual action as antimicrobial materials." Colloids Surf B Biointerfaces **79**(2): 460-466.
- Pantic, I. (2011). "Cancer stem cell hypotheses: impact on modern molecular physiology and pharmacology research." J Biosci **36**(5): 957-961.
- Park, K. (2010). "To PEGylate or not to PEGylate, that is not the question." J Control Release **142**(2): 147-148.
- Parkin, M., J. E. Tyczynski, et al. (2004). Lung cancer epidemiology and etiology. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. . B. E. Travis W.D., Muller-Hermelink H.K., Harris C.C. Lyon, IARC Press. **7**: 12-15.
- Paul, S., J. K. Hwang, et al. (2013). "Multiple biological properties of macelignan and its pharmacological implications." Arch Pharm Res **36**(3): 264-272.
- Pijls-Johannesma, M., D. De Ruyscher, et al. (2007). "Timing of chest radiotherapy in patients with limited stage small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials." Cancer Treat Rev **33**(5): 461-473.
- Pinto, A. C., F. Ades, et al. (2013). "Trastuzumab for patients with HER2 positive breast cancer: delivery, duration and combination therapies." Breast **22**(2): 029.
- Pizzol, C. D., F. B. Filippin-Monteiro, et al. (2014). "Influence of surfactant and lipid type on the physicochemical properties and biocompatibility of solid lipid nanoparticles." Int J Environ Res Public Health **11**(8): 8581-8596.
- Ponti, D., A. Costa, et al. (2005). "Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties." Cancer Res **65**(13): 5506-5511.

BIBLIOGRAFÍA

- Pooja, D., H. Kulhari, et al. (2016). "Improving Efficacy, Oral Bioavailability, and Delivery of Paclitaxel Using Protein-Grafted Solid Lipid Nanoparticles." Molecular Pharmaceutics.
- Prados, J., C. Melguizo, et al. (2008). "Combined therapy using suicide gef gene and paclitaxel enhances growth inhibition of multicellular tumour spheroids of A-549 human lung cancer cells." Int J Oncol **33**(1): 121-127.
- Prados, J., C. Melguizo, et al. (2010). "Gef gene therapy enhances the therapeutic efficacy of doxorubicin to combat growth of MCF-7 breast cancer cells." Cancer Chemother Pharmacol **66**(1): 69-78.
- Prados, J. C., R. Ortiz, et al. (2016). "Nanomaterial Platform For Drug Delivery In Cancer." Current Organic Chemistry **20**: 1-1.
- Prat, A., J. S. Parker, et al. (2010). "Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer." Breast Cancer Research : BCR **12**(5): R68-R68.
- Qian, K., Y. Ma, et al. (2015). "The studies about doxorubicin-loaded p(N-isopropylacrylamide-co-butyl methylacrylate) temperature-sensitive nanogel dispersions on the application in TACE therapies for rabbit VX2 liver tumor." J Control Release **212**: 41-49.
- Qiang, F., B. J. Lee, et al. (2010). "Effect of maceligan on the systemic exposure of paclitaxel: in vitro and in vivo evaluation." Eur J Pharm Sci **41**(2): 226-231.
- Ran, Q., Y. Xiang, et al. (2015). "Eryptosis Indices as a Novel Predictive Parameter for Biocompatibility of Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles on Erythrocytes." Sci Rep **5**(16209).
- Reck, M., S. Popat, et al. (2014). "Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up." Ann Oncol **25**(3): 11.
- Reddy, L. H., K. Vivek, et al. (2006). "Tamoxifen citrate loaded solid lipid nanoparticles (SLN): preparation, characterization, in vitro drug release, and pharmacokinetic evaluation." Pharm Dev Technol **11**(2): 167-177.
- Renwick, A., D. Thompson, et al. (2006). "ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles." Nat Genet **38**(8): 873-875.

- Rivolta, I., A. Panariti, et al. (2011). "Cellular uptake of coumarin-6 as a model drug loaded in solid lipid nanoparticles." J Physiol Pharmacol **62**(1): 45-53.
- Rodriguez-Serrano, F., N. Mut-Salud, et al. (2016). "Functionalized immunostimulating complexes with protein A via lipid vinyl sulfones to deliver cancer drugs to trastuzumab-resistant HER2-overexpressing breast cancer cells." Int J Nanomedicine **11**: 4777-4785.
- Rowinsky, E. K. (1997). "The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents." Annu Rev Med **48**: 353-374.
- Ruttala, H. B. and Y. T. Ko (2015). "Liposome encapsulated albumin-paclitaxel nanoparticle for enhanced antitumor efficacy." Pharm Res **32**(3): 1002-1016.
- Sadeghi-aliabadi, H., G. Asghari, et al. (2009). "Solvent optimization on Taxol extraction from *Taxus baccata* L., using HPLC and LC-MS." DARU **17**(3): 192-198.
- Sahiner, N. and A. O. Yasar (2013). "The generation of desired functional groups on poly(4-vinyl pyridine) particles by post-modification technique for antimicrobial and environmental applications." J Colloid Interface Sci **402**: 327-333.
- Sahoo, S. K., S. Parveen, et al. (2007). "The present and future of nanotechnology in human health care." Nanomedicine **3**(1): 20-31.
- Sahu, P. K., D. K. Mishra, et al. (2015). "Mannosylated solid lipid nanoparticles for lung-targeted delivery of Paclitaxel." Drug Dev Ind Pharm **41**(4): 640-649.
- Salomon, J. J. and C. Ehrhardt (2011). "Nanoparticles attenuate P-glycoprotein/MDR1 function in A549 human alveolar epithelial cells." Eur J Pharm Biopharm **77**(3): 392-397.
- Salvati, A., C. Aberg, et al. (2011). "Experimental and theoretical comparison of intracellular import of polymeric nanoparticles and small molecules: toward models of uptake kinetics." Nanomedicine **7**(6): 818-826.
- Santhosh, P. B., B. Drašler, et al. (2015). "Effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticles on fluidity and phase transition of phosphatidylcholine liposomal membranes." International Journal of Nanomedicine **10**: 6089-6104.
- Scarano, W., P. de Souza, et al. (2015). "Dual-drug delivery of curcumin and platinum drugs in polymeric micelles enhances the synergistic effects: a double act for the treatment of multidrug-resistant cancer." Biomater Sci **3**(1): 163-174.

BIBLIOGRAFÍA

- Scripture, C. D., W. D. Figg, et al. (2006). "Peripheral Neuropathy Induced by Paclitaxel: Recent Insights and Future Perspectives." Current Neuropharmacology **4**(2): 165-172.
- Senkus, E., S. Kyriakides, et al. (2015). "Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up." Annals of Oncology **26**(suppl 5): v8-v30.
- Serpe, L., M. G. Catalano, et al. (2004). "Cytotoxicity of anticancer drugs incorporated in solid lipid nanoparticles on HT-29 colorectal cancer cell line." Eur J Pharm Biopharm **58**(3): 673-680.
- Shahin, M., S. Ahmed, et al. (2011). "Decoration of polymeric micelles with cancer-specific peptide ligands for active targeting of paclitaxel." Biomaterials **32**(22): 5123-5133.
- She, W., D. Pan, et al. (2015). "PEGylated Dendrimer-Doxorubicin Cojugates as pH-Sensitive Drug Delivery Systems: Synthesis and In Vitro Characterization." J Biomed Nanotechnol **11**(6): 964-978.
- Shen, H., S. Shi, et al. (2015). "Coating Solid Lipid Nanoparticles with Hyaluronic Acid Enhances Antitumor Activity against Melanoma Stem-like Cells." Theranostics **5**(7): 755-771.
- Shiozaki, A. A., T. Senra, et al. (2016). "Treatment of patients with aortic atherosclerotic disease with paclitaxel-associated lipid nanoparticles." Clinics **71**(8): 435-439.
- Silan, C., A. Akcali, et al. (2012). "Novel hydrogel particles and their IPN films as drug delivery systems with antibacterial properties." Colloids Surf B Biointerfaces **89**: 248-253.
- Silva, A. H., F. B. Filippin-Monteiro, et al. (2012). "In vitro biocompatibility of solid lipid nanoparticles." Sci Total Environ **432**: 382-388.
- Singh, R. and J. W. Lillard, Jr. (2009). "Nanoparticle-based targeted drug delivery." Exp Mol Pathol **86**(3): 215-223.
- Slingerland, M., H. J. Guchelaar, et al. (2012). "Liposomal drug formulations in cancer therapy: 15 years along the road." Drug Discov Today **17**(3-4): 160-166.

- Smejkalova, D., K. Nesporova, et al. (2014). "Selective in vitro anticancer effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticles loaded in hyaluronan polymeric micelles." Biomacromolecules **15**(11): 4012-4020.
- Snipstad, S., S. Westrom, et al. (2014). "Contact-mediated intracellular delivery of hydrophobic drugs from polymeric nanoparticles." Cancer Nanotechnol **5**(1): 6.
- Society, A. C. (2016). "Breast cancer survival rates, by stage." from <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-survival-by-stage>.
- Society, A. C. (2016, 18/02/2016). "Lung cancer risk factors." from <http://www.cancer.org/cancer/lungcancer-non-smallcell/moreinformation/lungcancerpreventionandearlydetection/lung-cancer-prevention-and-early-detection-risk-factors>.
- Subik, K., J. F. Lee, et al. (2010). "The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines." Breast Cancer **4**: 35-41.
- Sun, T. M., Y. C. Wang, et al. (2014). "Cancer stem cell therapy using doxorubicin conjugated to gold nanoparticles via hydrazone bonds." Biomaterials **35**(2): 836-845.
- Sun, Y., B. Yu, et al. (2014). "Enhanced antitumor efficacy of vitamin E TPGS-emulsified PLGA nanoparticles for delivery of paclitaxel." Colloids Surf B Biointerfaces **123**: 716-723.
- Surapaneni, M. S., S. K. Das, et al. (2012). "Designing Paclitaxel drug delivery systems aimed at improved patient outcomes: current status and challenges." ISRN Pharmacol **623139**(10): 12.
- Swaminathan, S. K., E. Roger, et al. (2013). "CD133-targeted paclitaxel delivery inhibits local tumor recurrence in a mouse model of breast cancer." J Control Release **171**(3): 280-287.
- Tan, M., T. Jing, et al. (2002). "Phosphorylation on tyrosine-15 of p34(Cdc2) by ErbB2 inhibits p34(Cdc2) activation and is involved in resistance to taxol-induced apoptosis." Mol Cell **9**(5): 993-1004.
- Thipparaboina, R., R. B. Chavan, et al. (2015). "Micellar carriers for the delivery of multiple therapeutic agents." Colloids Surf B Biointerfaces **135**: 291-308.

BIBLIOGRAFÍA

- Tietze, R., J. Zaloga, et al. (2015). "Magnetic nanoparticle-based drug delivery for cancer therapy." Biochem Biophys Res Commun **468**(3): 463-470.
- Tong, R. and J. Cheng (2007). "Anticancer Polymeric Nanomedicines." Polymer Reviews **47**(3): 345-381.
- Tsuruo, T., H. Iida, et al. (1981). "Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil." Cancer Res **41**(5): 1967-1972.
- Ucisik, M. H., S. Kupcu, et al. (2013). "Characterization of CurcuEmulsomes: nanoformulation for enhanced solubility and delivery of curcumin." J Nanobiotechnology **11**(37): 1477-3155.
- Ueno, T., K. Endo, et al. (2014). "Assessment of antitumor activity and acute peripheral neuropathy of 1,2-diaminocyclohexane platinum (II)-incorporating micelles (NC-4016)." Int J Nanomedicine **9**: 3005-3012.
- UK, C. R. (2014). "Types of lung cancer." from <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/type/lung-cancer/about/types-of-lung-cancer>.
- van Vlerken, L. E., Z. Duan, et al. (2007). "Modulation of intracellular ceramide using polymeric nanoparticles to overcome multidrug resistance in cancer." Cancer Res **67**(10): 4843-4850.
- Vansteenkiste, J., D. De Ruysscher, et al. (2013). "Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up." Ann Oncol **24**(6): 16.
- Vazquez, M. I., L. Pelaez, et al. (2011). "Functionalized lipid nanoparticles-cellophane hybrid films for molecular delivery: preparation, physicochemical characterization, and stability." J Pharm Sci **100**(11): 4815-4822.
- Velasco-Velazquez, M. A., N. Homsí, et al. (2012). "Breast cancer stem cells." Int J Biochem Cell Biol **44**(4): 573-577.
- Wang, L. W., C. W. Peng, et al. (2015). "Quantum dots-based tissue and in vivo imaging in breast cancer researches: current status and future perspectives." Breast Cancer Res Treat **151**(1): 7-17.

- Wang, Y., Y. Cui, et al. (2015). "Redox and pH dual-responsive mesoporous silica nanoparticles for site-specific drug delivery." Applied Surface Science **356**: 1282-1288.
- Weaver, B. A. (2014). "How Taxol/paclitaxel kills cancer cells." Mol Biol Cell **25**(18): 2677-2681.
- Wicki, A., D. Witzigmann, et al. (2015). "Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications." J Control Release **200**: 138-157.
- Williams, H. D., N. L. Trevaskis, et al. (2013). "Strategies to address low drug solubility in discovery and development." Pharmacol Rev **65**(1): 315-499.
- Winslow, T. (2012). from <https://www.cancer.gov/espanol>.
- Wissing, S. A., O. Kayser, et al. (2004). "Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery." Adv Drug Deliv Rev **56**(9): 1257-1272.
- Wolff, M. S., P. G. Toniolo, et al. (1993). "Blood Levels of Organochlorine Residues and Risk of Breast Cancer." Journal of the National Cancer Institute **85**(8): 648-652.
- Wrobel, D., A. Janaszewska, et al. (2015). "Interactions of dendritic glycopolymer with erythrocytes, red blood cell ghosts and membrane enzymes." Int J Pharm **496**(2): 475-488.
- Wu, L., C. Man, et al. (2013). "PEGylated multi-walled carbon nanotubes for encapsulation and sustained release of oxaliplatin." Pharm Res **30**(2): 412-423.
- Xiao, L., X. Xiong, et al. (2011). "Role of cellular uptake in the reversal of multidrug resistance by PEG-b-PLA polymeric micelles." Biomaterials **32**(22): 5148-5157.
- Xu, G., H. Shi, et al. (2015). "Enhancing the anti-colon cancer activity of quercetin by self-assembled micelles." Int J Nanomedicine **10**: 2051-2063.
- Xu, W., S. J. Lim, et al. (2013). "Cellular uptake and antitumour activity of paclitaxel incorporated into trilaurin-based solid lipid nanoparticles in ovarian cancer." J Microencapsul **30**(8): 755-761.
- Yallapu, M. M., M. Jaggi, et al. (2011). "Design and engineering of nanogels for cancer treatment." Drug Discov Today **16**(9-10): 457-463.
- Yameen, B., W. I. Choi, et al. (2014). "Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting." J Control Release **190**: 485-499.

BIBLIOGRAFÍA

- Yang, T. M., D. Barbone, et al. (2009). "Bcl-2 family proteins contribute to apoptotic resistance in lung cancer multicellular spheroids." Am J Respir Cell Mol Biol **41**(1): 14-23.
- Yao, H.-J., R.-J. Ju, et al. (2011). "The antitumor efficacy of functional paclitaxel nanomicelles in treating resistant breast cancers by oral delivery." Biomaterials **32**(12): 3285-3302.
- Yu, J. B., R. H. Decker, et al. (2010). "Surveillance epidemiology and end results evaluation of the role of surgery for stage I small cell lung cancer." J Thorac Oncol **5**(2): 215-219.
- Yu, K., J. Zhao, et al. (2016). "Enhanced delivery of Paclitaxel using electrostatically-conjugated Herceptin-bearing PEI/PLGA nanoparticles against HER-positive breast cancer cells." Int J Pharm **497**(1-2): 78-87.
- Yu, Y. H., G. Y. Chiou, et al. (2012). "Network biology of tumor stem-like cells identified a regulatory role of CBX5 in lung cancer." Sci Rep **2**(584): 16.
- Yuan, H., J. Miao, et al. (2008). "Cellular uptake of solid lipid nanoparticles and cytotoxicity of encapsulated paclitaxel in A549 cancer cells." International Journal of Pharmaceutics **348**(1-2): 137-145.
- Zamora, P., E. Espinosa, et al. (2001). "Cáncer de mama. Clasificación y concepto." Medicine **8**(57): 3041-3049.
- Zhang, F., X. Wang, et al. (2016). "Reconstituted high density lipoprotein mediated targeted co-delivery of HZ08 and paclitaxel enhances the efficacy of paclitaxel in multidrug-resistant MCF-7 breast cancer cells." Eur J Pharm Sci **92**: 11-21.
- Zhang, X., Y. Lou, et al. (2015). "Wnt blockers inhibit the proliferation of lung cancer stem cells." Drug Des Devel Ther **9**: 2399-2407.
- Zhang, X. Y. and Y. D. Zhang (2015). "Enhanced antiproliferative and apoptosis effect of paclitaxel-loaded polymeric micelles against non-small cell lung cancers." Tumour Biol **36**(7): 4949-4959.
- Zhao, M., C. Lei, et al. (2015). "Abraxane, the Nanoparticle Formulation of Paclitaxel Can Induce Drug Resistance by Up-Regulation of P-gp." PLoS One **10**(7): e0131429.
- Zheng, J., Y. Wan, et al. (2014). "Targeted paclitaxel delivery to tumors using cleavable PEG-conjugated solid lipid nanoparticles." Pharm Res **31**(8): 2220-2233.

- Zhou, R., R. V. Mazurchuk, et al. (2010). "Differential pharmacodynamic effects of paclitaxel formulations in an intracranial rat brain tumor model." J Pharmacol Exp Ther **332**(2): 479-488.
- Zhou, X., X. Cheng, et al. (2014). "Synthesis of hollow mesoporous silica nanoparticles with tunable shell thickness and pore size using amphiphilic block copolymers as core templates." Dalton Transactions **43**(31): 11834-11842.
- Zhou, Y., J. Li, et al. (2015). "A study on the hemocompatibility of dendronized chitosan derivatives in red blood cells." Drug Des Devel Ther **9**: 2635-2645.
- Zhu, J., X. Xu, et al. (2015). "Co-Encapsulation of Combretastatin-A4 Phosphate and Doxorubicin in Polymersomes for Synergistic Therapy of Nasopharyngeal Epidermal Carcinoma." J Biomed Nanotechnol **11**(6): 997-1006.

BIBLIOGRAFÍA

ANEXO:
PUBLICACIONES

Paclitaxel-loaded hollow-poly(4-vinylpyridine) nanoparticles enhance drug chemotherapeutic efficacy in lung and breast cancer cell lines

Rafael Contreras-Cáceres¹, María C. Leiva^{2,3,4}, Raúl Ortiz^{2,5}, Amelia Díaz¹, Gloria Perazzoli², Miguel A. Casado-Rodríguez¹, Consolación Melguizo^{2,3,4} (✉), Jose M. Baeyens⁶, Juan M. López-Romero^{1,§}, and Jose Prados^{2,3,4,§}

¹ Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Málaga, 29071 Málaga, Spain

² Institute of Biopathology and Regenerative Medicine (IBIMER), Center of Biomedical Research (CIBM), University of Granada, 18100 Granada, Spain

³ Department of Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine, University of Granada, 18071 Granada, Spain

⁴ Biosanitary Institute of Granada (IBS. GRANADA), SAS-Universidad de Granada, 18014 Granada, Spain

⁵ Department of Health Science, University of Jaén, 23071 Jaén, Spain

⁶ Department of Pharmacology, Institute of Neuroscience, Biomedical Research Center (CIBM), University of Granada, 18100 Granada, Spain

[§] These authors contributed equally to this work.

Received: 28 June 2016

Revised: 18 October 2016

Accepted: 19 October 2016

© Tsinghua University Press and Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

KEYWORDS

paclitaxel,
poly(4-vinylpyridine)
(p4VP) nanoparticles,
lung cancer,
breast cancer,
cytotoxicity,
multicellular tumor
spheroids

ABSTRACT

Paclitaxel (PTX), one of the most effective cytotoxins for the treatment of breast and lung cancer, is limited by its severe side effects and low tumor selectivity. In this work, hollow-poly(4-vinylpyridine) (hollow-p4VP) nanoparticles (NPs) have been used for the first time to generate PTX@p4VP NPs, employing a novel technique in which a gold core in the center of the NP is further oxidized to produce the hollow structure into which PTX molecules can be incorporated. The hollow-p4VP NPs exhibit good physicochemical properties and displayed excellent biocompatibility when tested on blood (no hemolysis) and cell cultures (no cytotoxicity). Interestingly, PTX@p4VP NPs significantly increased PTX cytotoxicity in human lung (A-549) and breast (MCF-7) cancer cells with a significant reduction of PTX IC₅₀ (from 5.9 to 3.6 nM in A-549 and from 13.75 to 4.71 nM in MCF-7). In addition, PTX@p4VP caused a decrease in volume of A-549 and MCF-7 multicellular tumor spheroids (MTS), an *in vitro* system that mimics *in vivo* tumors, in comparison to free PTX. This increased antitumoral activity is accompanied by efficient cell internalization and increased apoptosis, especially in lung cancer MTS. Our results offer the first evidence that hollow-p4VP NPs can improve the antitumoral activity of PTX. This system can be used as a new nanoplatform to overcome the limitations of current breast and lung cancer treatments.

Address correspondence to melguizo@ugr.es

1 Introduction

Paclitaxel (PTX), which is one of the most effective cytotoxic agents currently available, is mainly used in chemotherapeutic regimens for lung and breast cancer [1]. PTX induces mitotic arrest by blocking β tubulin subunits, thus inducing apoptosis in cancer cells. However, its low water solubility ($\sim 0.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), high toxicity, and non-specificity are major limitations for cancer chemotherapy [2]. Although organic solvents, including polyoxyethylated castor oil (Cremophor EL) and ethanol, have been used to increase the solubility of PTX, these formulations produce serious side-effects, such as hypersensitivity reactions, including anaphylaxis, and peripheral neuropathy, which can lead to therapy being discontinued. In addition, Cremophor EL may alter PTX pharmacokinetics and requires special administration devices [3]. Nanoformulations developed with PTX show numerous advantages over current standard chemotherapy. For example, albumin nanoparticles (NPs) associated with PTX (Abraxane) were able to reduce PTX toxicity and drug resistance, compared to free PTX, and have been approved by the U. S. Food and Drug Administration (FDA) for treating patients with various cancers, including metastatic breast cancer [4]. In this context, new PTX formulations that could be used to improve the prognosis of cancer patients are still of great therapeutic interest.

The water solubility of PTX can be greatly enhanced in two main ways: 1) encapsulation in colloidal systems, or 2) conjugating the drug with water-soluble polymers. The small size of the NPs, which range from one hundred to several hundreds of nanometers in diameter, enables the preferential delivery of PTX into the tumor site due to the enhanced permeability and retention (EPR) effect [5]. Moreover, NPs that escape from the tumor can be recognized by the reticuloendothelial system (RES) in healthy tissue, thereby reducing the side effects of the drug.

However, hollow particles may be of even more significant interest due to their ability to encapsulate molecules such as polysaccharides, enzymes, nucleic acids, or even cells [6, 7]. These microcontainers have also been used to encapsulate drugs by exploiting different approaches, such as free radical polymerization

in the presence of comonomers (N-isopropylacrylamide or acrylic acid), which can be degraded by acids or bases [8]. The polymerization of colloidal particles with gold, SiO_2 , or polycaprolactone acting as a core and a stimuli-responsive polymer shell, and subsequent elimination of the solid core has also been reported for the encapsulation of several chemotherapeutic drugs [9–11]. In fact, doxorubicin (DOX) has been loaded into hollow nanoparticles, and showed an increase in drug cytotoxicity even in drug-resistant cells [12, 13].

Several approaches have been investigated for delivering PTX via polymer-based nanoformulations, such as magnetic- and thermo-responsive poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)-L-lysine-D-galactose (PTX-MNP-PLGA-Lys-Gal) NPs that interact with tumor cells in specifically acidic conditions [14]. More recently, PTX has been linked to biocompatible amino-terminated poly(ethylene glycol), followed by covalent introduction into the surface of graphene oxide (GO) sheets, affording the drug delivery system, GO-PEG-PTX [15]. Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) is the most widely used vehicle for PTX because its hydrolysis produces non-toxic products (lactic and glycolic acid) that are rapidly metabolized. It has been demonstrated that PLGA-based NPs enhance *in vitro* PTX cytotoxicity compared to free PTX in lung (A-549) and breast cancer cell lines (MCF-7 and BT474), amongst others [16, 17]. Poly(lactide) (PLA), another biodegradable polymer that can be prepared as a PLGA copolymer (methoxy poly(ethylene glycol)-poly(lactide) copolymer, mPEG-PLA), is able to extend the serum half-life of PTX and to maintain high PTX antitumoral activity in breast cancer cells [18]. A polymeric micelle composed of monomethoxy PEG-block-poly(D,L-lactide) block copolymer (mPEG-b-PDLLA) (Genexol-PM) is currently being tested for metastatic breast cancer (phase IV clinical trial) and lung cancer (phase II clinical trial), although it appears to exhibit dose-limiting toxicities, including neutropenia and neuropathy [19, 20]. Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) NPs with PTX, and their modifications with poly(ethylene oxide) [21, 22], poly(ethylene glycol) [23, 24], or poly(vinyl pyrrolidone) (PVP) [25], have been reported to exhibit better antitumoral activity than free PTX. Similarly, biodegradable poly(alkyl cyanoacrylate) (PACA) and

poly(butyl cyanoacrylate) (PBCA) NPs have been used to improve PTX properties [26]. Furthermore, it has been shown that the activity of PTX depends on the surfactant used, with pluronic F127, dextran 70, cholesterol, PVA, and lecithin providing the best results in terms of PTX incorporation, particle size, and stability. Importantly, hybrid PTX-loaded hyaluronic acid-PBCA NPs enhanced cellular uptake in Sarcoma-180 cells and showed more potent antitumoral activity than non-hyaluronic acid-coated PTX PBCA NPs [27]. Finally, other non-polymeric NPs have been assayed with regard to PTX vehiculization, although without exceptional results. For example, chitosan-based (CH) NPs increased *in vivo* PTX efficacy against 4T1 mouse breast cancer cells [28]. These NPs were modified with hydrophobic acetyl histidine, which is pH sensitive [29], and with glutaraldehyde, which enhanced the solubility of PTX and slowed drug release [30]. Hyaluronic acid (HA), a biodegradable polysaccharide, is an alternative to chitosan and has been widely used as a targeting agent since most malignant solid tumors can overexpress HA receptors [31].

PTX-loaded liposomes have also been fabricated for chemotherapeutic applications. These NPs were modified with a multifunctional tandem peptide, R8-c(RGD), for the treatment of glioma. Drug-loaded R8-c(RGD)-Lip exhibited an efficient antiproliferation effect on brain cancer stem cells [32]. PTX-loaded silk fibroin (SF) NPs (PTX-SF-NPs), a biocompatible and biodegradable natural polymer, formed in aqueous solution at room temperature by self-assembly of SF protein, showed *in vivo* antitumor effects against gastric cancer in a nude mouse xenograft model [33].

Despite the wide variety of NPs developed to transport PTX, very few have been approved by the FDA because of their low biocompatibility, toxicity, or *in vivo* instability, amongst other reasons. As mentioned above, Abraxane, a PTX-protein derived NP, has been approved for treating breast cancer and, more recently, non-small-cell lung cancer (NSCLC) [34]. In this paper, we report the incorporation of PTX into a new polymeric carrier based on hollow poly(4-vinylpyridine) (p4VP) NPs and its *in vitro* activity against lung and breast cancer cells. To the best of our knowledge, there are no previous studies that report the entrapment of PTX into this biocompatible, biodegradable, and

pH-sensitive polymeric microgel. NPs were prepared *in situ* by free radical polymerization of 4-vinylpyridine monomers, using *N,N'*-methylenebisacrylamide as a cross-linker, on vinyl-terminated spherical gold seeds. Subsequent oxidation of the Au core produced a hollow structure, herein denoted hollow-p4VP. 4-Vinylpyridine exhibits pH-responsive behavior: At pH 2, the pyridine groups of the polymer networks are highly protonated, and an increase in the electrostatic repulsions between the positive charges causes the polymer chain to stretch, thus resulting in microgel swelling. As the pH of the solution increases, however, deprotonation of the pyridine groups causes p4VP to undergo hydrophobic collapse, thus altering its swollen state to one of collapse. Consequently, PTX entrapment was carried out in an aqueous basic emulsion of hollow NPs. Dynamic light scattering (DLS) and zeta potential measurements (ZP) were used to monitor the hydrodynamic diameter and surface charge of the hollow-p4VP particles. Raman spectroscopy and transmission electron microscopy (TEM) measurements were used to chemically and morphologically characterize the hollow NPs, respectively. This engineering process enabled us to obtain a new PTX@p4VP NP that significantly enhanced the antiproliferative efficacy of PTX *in vitro* compared to that of the free drug. In addition, hollow-p4VP NPs did not show *in vitro* toxicity and there was no evidence of hemolysis. The increased antitumoral activity induced by PTX@p4VP NPs was accompanied by an intense apoptosis, which was observed in multicellular tumor spheroids (MTS), a system that mimics *in vivo* tumors. This (nano) formulation may therefore be a promising candidate for improving the efficacy of PTX therapy against breast cancer, and minimizing the toxicity associated with this antitumor agent's activity. The most innovative novelty of this work is the possibility to fabricate stimuli-responsive hollow microgels by easy and reproducible free radical polymerization with drug encapsulation capabilities. These colloidal systems provide four important benefits: i) By modifying the amount of cross-linker (*N,N'*-methylenebisacrylamide), the microgel swelling ratio can be controlled [35]. This parameter is directly associated with the loading efficiency of the microgel; a higher swelling ratio means a higher loading capability. ii) The final particle size

can be modulated by the concentration of monomer (*N*-vinylpyridine) during the polymerization process [36]. iii) Hollow core size can be modified by altering the diameter of the initial Au seed [37], which also increases the loading capacity of the final hollow-p4VP system. iv) The pH-responsive ability of p4VP can be exploited to trap and accumulate drugs within the polymer.

2 Experimental

2.1 Materials

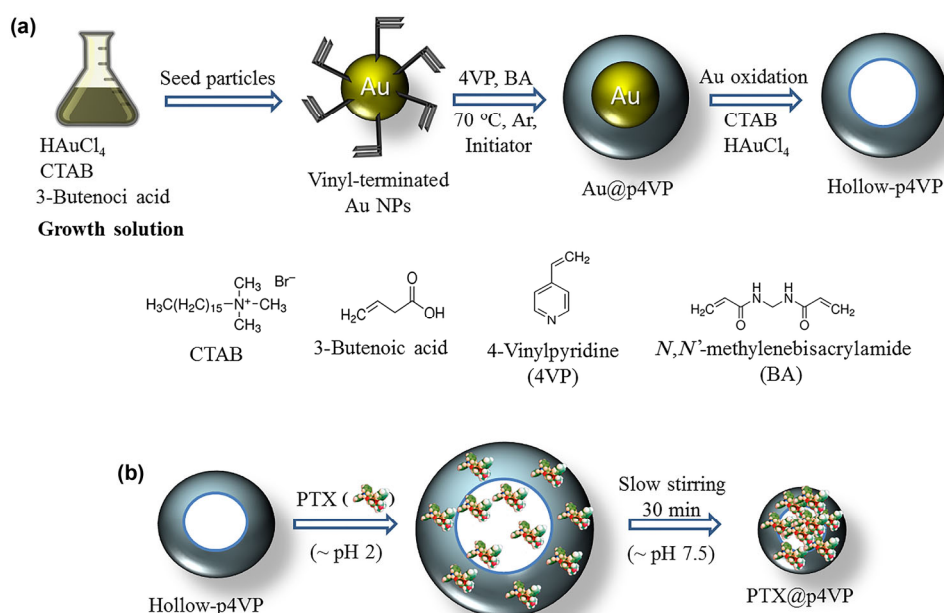
Paclitaxel was purchased from Tocris Bioscience. 4-Vinylpyridine (#V3204), gold (III) chloride trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, #G4022), 3-butenic acid (#134716), hexadecyltrimethylammonium bromide cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) (#H6269), *N,N'*-methylenebisacrylamide (#146072), and 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (#440914) were purchased from Aldrich and used without further purification.

2.2 Synthesis of core@shell Au@p4VP nanoparticles

To carry out the encapsulation of gold NPs with p4VP, gold NPs with a diameter of approximately

50 nm were first prepared using a modified seeded growth method [38] and subsequently coated with a p4VP polymer shell. To encapsulate the gold NPs with 4-vinylpyridine, a vinyl-terminated 50-nm spherical Au colloidal dispersion (10 mL, 5 mM, $0.9848 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) was heated to 70°C under N_2 flow. Then, 4-vinylpyridine (100 mM, $161.7 \mu\text{L}$) and *N,N'*-methylenebisacrylamide (10 mM, 23.4 mg) were added under mild magnetic stirring. After 15 min at 70°C , polymerization was initiated by addition of 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride ($150 \mu\text{L}$, 0.1 M in water). After 7–10 min, the reddish solution became turbid, the nitrogen flow was stopped and the reaction was allowed to proceed for 3 h at 70°C . After this period, the mixture was allowed to cool to 20°C under stirring. Finally, with the aim of separating Au@p4VP particles from free p4VP microgels, the solution was diluted with water (50 mL), centrifuged (30 min at 4,500 rpm), and the resulting pellet dispersed in water (10 mL). In order to ensure maximum separation between Au@p4VP and free p4VP microgels the centrifugation step was repeated 5 times. TEM images confirm a purification yield >95%. Scheme 1 presents the synthesis of Au@p4VP NPs schematically.

In this scheme, Au15@CTAB and Au50@p4VP denote spherical 15 nm Au NPs coated with CTAB, which are



Scheme 1 Schematic representations of the preparation of hollow-p4VP microgels (a) and the trapping of PTX within hollow-p4VP NPs (PTX@p4VP) (b).

used as seeds to be grown until spherical, and 50 nm Au NPs encapsulated with p4VP, respectively [38].

2.3 Gold core oxidation for fabrication of hollow-p4VP nanoparticles

Hollow-p4VP spheres were produced by oxidizing Au NPs in the presence of a CTAB/HAuCl₄ mixture [39]. Briefly, 0.5 mL of the previously synthesized Au@p4VP NPs at [Au] = 5 mM (0.9848 g·mL⁻¹) were immersed in 4.5 mL water. This dispersion was added to an aqueous solution (5 mL) of CTAB (50 mM) and HAuCl₄ (0.250 mM) at 28 °C under mild magnetic stirring. The final solution was allowed to react for 4 h. Then, to remove the excess CTAB and any possible products generated during the oxidation process, the solution was centrifuged twice at 7,000 rpm for 1 h. The supernatant was removed and the precipitate, consisting of hollow-p4VP NPs (10 mg), was dispersed in water (10 mL) to produce a clear colloidal dispersion that was used for loading PTX. Scheme 1(a) shows the general procedure for the fabrication of hollow-p4VP particles.

2.4 Loading paclitaxel into the hollow-p4VP nanoparticles

In a typical procedure, PTX (0.5 mg) was added to the previously prepared hollow-p4VP colloidal dispersion in water (3 mL, 3 mg of NPs). After an average of 30 min stirring no white solid remained. The mixture was sonicated for 5 min at 20 °C, and then the pH of the dispersion was reduced by adding 0.1 M HCl (approximately 200 μL). By exploiting the pK_a of 4-vinylpyridine (~4.8), the positive charge of the protonated amino groups causes the microgel to remain in a swollen state; in this state the PTX molecules diffuse through the microgel network. After slow stirring for 30 min, which is sufficient time to permit the entry of PTX into the hollow structure, an aqueous 0.1 M solution of NaOH (200 μL) was added to deprotonate the nitrogen atoms. This pH increase resulted in deprotonation of the pyridine groups and caused the hollow-p4VP microgels to undergo hydrophobic collapse from a swollen to a nearly solvent-free state of the pyridine moieties.

The PTX molecules were trapped within the microgel

and PTX@p4VP NPs were obtained with a PTX concentration of 0.195 mM (HPLC, Scheme 1(b)).

2.5 Characterization of hollow-p4VP and PTX@p4VP nanoparticles

NP morphology and composition were studied using Raman and TEM techniques. The Raman spectra were acquired using a near-infrared (NIR) diode laser at 785 nm (Renishaw inVia Raman spectroscope). The apparatus was equipped with a 50× objective (numerical aperture of 0.75). To avoid excessive heating during the measurement of Raman spectra, the output power of the diode laser was 2 mW on the sample surface. For the Raman measurements, each spectrum was acquired using 10% of the maximum laser power and co-adding 5 scans of 50 s exposure. The resolution was set at 4 cm⁻¹ and the geometry of micro-Raman measurements was 180°. A small portion of the centrifuged PTX@p4VP sample was placed on a glass slide. Prior to each measurement, the instrument was calibrated with a standard Si sample (520 cm⁻¹).

TEM micrographs of Au@p4VP and hollow-p4VP NPs were acquired using a JEM 1400 (JEOL) microscope operating at an acceleration voltage of 80 kV. The samples were prepared by drying a drop of 10 μL of colloidal suspension on a carbon-coated grid.

DLS and ZP measurements were performed using a Zetasizer Nano S (Malvern Instruments, Malvern UK) with a detection angle of 173°. The Nano S uses a 4 mW He–Ne laser operating at a wavelength of 633 nm. For DLS measurements, accumulation times for each sample were determined automatically, at selected pH values. The correlation function was used to calculate the z-average (intensity mean) and hydrodynamic diameter (D_h) using the Einstein–Stokes equation. These results were calculated by selecting the multimodal analysis method of the DTS software (5.0) provided by Malvern. For ZP measurements, a diluted aqueous solution of hollow-p4VP NPs adjusted to the desired pH with 0.1 M HCl or NaOH was used. Both tests were performed in triplicate.

2.6 Trapping efficiency

The efficiency of PTX trapping after hollow-p4VP preparation was assessed by determining the amount

of PTX in chloroform extracts of known weights of centrifuged and dried NPs. This value was then subtracted from the amount of PTX used to prepare the nanospheres to obtain the amount of PTX incorporated into the hollow-p4VP NPs (PTX@p4VP). The trapping efficiency (TE), expressed as a percentage, was calculated according to Eq. (1) [40]

$$\text{TE (\%)} = \frac{W_{\text{initial drug}} - W_{\text{free drug}}}{W_{\text{initial drug}}} \times 100 \quad (1)$$

The quantity of PTX in the samples was measured by HPLC analysis Thermo Spectra System equipped with a photodiode array detector. Separation was achieved on a Phenomenex C18 column (250 mm × 4.6 mm; 5 μm, Varian) operating at 25 °C. The mobile phase was acetonitrile:water (70:30, v/v), at a flow rate of 1 mL·min⁻¹, with detection at 227 nm. The calibration curve was prepared according to Sadeghi et al. [41].

To determine the amount of drug incorporated into the PTX@p4VP emulsion, 3 mL was centrifuged (7,000 rpm) for 1 h. The aqueous layer was decanted and then exhaustively extracted with chloroform (3 × 3 mL). The chloroform extracts were dried over MgSO₄ and concentrated to dryness. The residue was reconstituted in water:acetonitrile (1 mL, 50:50) and injected into the HPLC system for quantitatively determining the amount of PTX.

2.7 *In vitro* PTX release

Two samples of PTX@p4VP were centrifuged (7,000 rpm) in capped test tubes to give two samples of NPs (3 mg each). One sample was suspended in phosphate buffered saline (PBS, 5 mL, pH ≈ 7.5 or 6.6) containing 0.1% Tween 80, and the other was suspended in citrate buffer solution (5 mL, pH ≈ 3.5) containing 0.1% Tween 80. Surfactant was used to increase the wettability of the microgel obtained after centrifugation, and to improve the PTX solubility. The tubes were placed in a water bath at 37 °C, with shaking at 100 rpm. At specific intervals, the release medium containing the drug was transferred out and extracted with chloroform (3 × 3 mL). Fresh release medium (acid or basic, 5 mL) was added to the test tube for the continuous-release studies. The chloroform extract was treated as described in section 2.6 for HPLC

analysis. Measurements were performed in triplicate.

2.8 Cell culture

Two human breast (MCF-7) and lung (A-549) cancer cell lines, and the complementary non-tumor breast (MCF-10A) and lung (L132) cell lines were used. MCF-7, MCF-10A, and A-549 were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA), and L132 was obtained from the Scientific Instrumentation Center (Granada University). MCF-7, A-549, and L132 were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin-streptomycin. MCF-10A was grown in DMEM/nutrient mixture F-12 Ham supplemented with 5% horse serum, and cholera toxin (100 ng·mL⁻¹), epidermal growth factor (EGF) (20 ng·mL⁻¹), insulin (10 μg·mL⁻¹), hydrocortisone (0.5 μg·mL⁻¹), and 1% penicillin-streptomycin. FBS and horse serum were provided by Gibco (Spain), and the other reagents were purchased from Sigma Aldrich (Spain). The cell lines were maintained in an incubator at 37 ± 0.5 °C, in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

2.9 Hemolysis assay

A hemolysis assay was performed following a modified version of the protocol reported by Evans et al. [42]. Briefly, human blood (25 mL) from a healthy donor was recovered into collection tubes with EDTA to avoid coagulation and centrifuged (500g for 5 min). The plasma was aspirated and discarded. The erythrocytes were washed twice with 150 mM NaCl (same volume as the aspirate), mixed by inversion, and centrifuged at 500g for 5 min. The supernatant was then aspirated and replaced with PBS at pH 7.4. The erythrocytes were diluted (1:50), and the absence of sediments caused by erythrocyte disruption during the previous process was verified. Samples (190 μL) of the non-lysed, diluted erythrocytes (pH 7.4) were added to each well of a V-bottomed 96-well plate. Hollow-p4VP NPs at different concentrations (0.04, 0.09, 0.18, 0.36, 0.90, and 1.80 mg·mL⁻¹) were added in a volume of 10 μL per well. Positive and negative controls were 20% Triton X-100 (10 μL) and PBS, pH 7.4 (10 μL), respectively. The plate was

incubated for 1 h at 37 °C under stirring (15 rpm), centrifuged at 500g for 5 min, and then 100 μ L supernatant was transferred into a flat-bottomed 96-well plate. The percentage of hemoglobin released from the erythrocytes was determined at a wavelength of 492 nm using a Titertek multiscan colorimeter (Flow, Irvine, California). This assay was performed in triplicate and the percentage hemolysis was calculated using Eq. (2)

$$\text{Hemolysis (\%)} = \frac{\text{Abs. of the sample} - \text{abs. of the negative control}}{\text{Abs. of the positive control}} \times 100 \quad (2)$$

2.10 Proliferation assay

Cells were seeded in 24-well plates at densities of 1.5×10^3 for MCF-7, 5×10^3 for A-549, 20×10^3 for MCF-10A, and 5×10^3 for L132 in 400 μ L of their respective culture medium and incubated overnight. Cells were treated with PTX@p4VP, hollow-p4VP, and free PTX at drug concentrations ranging from 0.1 to 30 nM, as well as the equivalent concentration of blank NPs over a 4-day period, with a renewal of culture medium and treatments at 48 h. After this exposure time, a colorimetric assay was performed using sulforhodamine B (SRB) [43, 44]. The cells were fixed (20 min, 4 °C) with 300 μ L trichloroacetic acid (TCA, 10%), washed three times with distilled water, dried overnight, and stained with 300 μ L 0.4% SRB in 1% acetic acid solution (20 min, under stirring). Three washes with an aqueous solution of 1% acetic acid were carried out, the plates were dried overnight, and then the SRB was resuspended in 200 μ L of Trizma[®] (10 mM, pH 10.5). The optical density (OD) of the dye was measured using a Titertek multiscan colorimeter (Flow, Irvine, California) at 492 nm. The percentage proliferation (Pf%) and cytotoxicity (Ct%) were calculated according to Eqs. (3) and (4)

$$\text{Pf\%} = \frac{\text{Sample OD}}{\text{Negative control OD}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{Ct\%} = 100 - \text{Pf\%} \quad (4)$$

2.11 Hollow-p4VP Nile red NP assays

Briefly, the hollow-p4VP colloidal sample (3 mg NPs)

was dispersed in 3 mL Nile red (NR) solution to give a final concentration of 83 μ M NR and sonicated for 10 min at 20 °C. The pH of the dispersion was then reduced by adding 0.1 M HCl (ca. 200 μ L). After 30 min the pH of the colloidal solution was increased by adding an aqueous 0.1 M solution of NaOH (200 μ L) under slow magnetic stirring. After centrifugation at 7,000 rpm (5 min), samples (3 mg each) of labeled NPs were dispersed in 2 mL water (5 min), and ultracentrifuged (5 min) to study dye incorporation and stability. UV analysis of the supernatant water did not show presence of the dye, indicating complete incorporation of the dye into the NPs.

Cells were seeded in 6-well plates at densities of 1.5×10^3 for MCF-7 and 5×10^3 for A-549 in 2 mL DMEM culture medium and incubated overnight. The cells were then incubated with NR and hollow-p4VP-NR at a concentration of 1 μ M for 0.5, 1, and 2 h. Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (blue). After the incubation time, the cells were observed by fluorescence microscopy (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

2.12 Cell cycle analysis

Cells were seeded at a density of 1×10^5 cells/well in 6-well plates in 2 mL serum-free culture medium to arrest the cell cycle. After incubation for 24 h, the serum-free culture medium was replaced with 2 mL complete culture medium and treated with an IC₅₀ dose (48 h) of free PTX and PTX@p4VP (5.9 nM for A549 and 13.75 nM in MCF7). Cell cycle analysis was performed using flow cytometry with a propidium iodide (PI) and RNase solution (PI/RNase) from Immunostep (Salamanca, Spain). The cells were collected and fixed with 70% ethanol-PBS for 30 min at 4 °C. The cells were centrifuged (5,000 rpm, 5 min) and the pellet was resuspended and incubated in 500 μ L PI/RNase solution for 15 min at room temperature. The suspension was then analyzed using a FACScan (Becton Dickinson, San Jose, USA).

2.13 Analysis of multicellular tumor spheroids

MTS were generated using a modification of our previously described protocol [45]. First, a 96-well plate was coated with 1% (w/v) agar and left to dry for 30 minutes. Then, MCF-7 and A-549 monolayer

cultures were harvested by trypsinization and 250 and 4,000 cells, respectively, were loaded into each well with 150 μL DMEM. To promote cell aggregation, the plates were centrifuged at 800g for 5 min. The plates were then incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ in a 5% CO_2 atmosphere incubator for 4 days. MTS were treated with PTX@p4VP, hollow-p4VP, and free PTX (PTX IC_{50} 5.9 nM for A549 and 13.75 nM in MCF7 cells), and the equivalent quantity of NPs. An untreated MTS group was used as a control. Treatments were added again after 2 days. The medium was replaced on day 4. MTS growth was monitored every 2 days and measured using an inverted phase-contrast microscope to obtain a median relative volume (V , μm^3) using Eq. (5) [46]

$$V = (a \times b^2 \times \pi) / 6 \quad (5)$$

Where a is the longest diameter and b is the shortest diameter.

In addition, we used a TUNEL assay to compare the apoptosis induced by PTX@p4VP and free PTX in MTS for both MCF-7 and A-549 cells. The treatment of MTS was similar to that described above. MTS, both untreated and treated with hollow-p4VP, were

used as a control. All samples were evaluated after fixation for 20 min with 4% paraformaldehyde at room temperature using a TUNEL kit (Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. Cell nuclei were counterstained with Hoechst, a fluorescent dye commonly used to stain DNA, and fluorescence images were captured using confocal microscopy (Nikon A1, Nikon Corporation, Tokyo, Japan).

2.14 Statistical analysis

For statistical analysis, the results were compared using Student's t -test with SPSS 7.5 software (SPSS, Chicago, IL). The data are expressed as means \pm standard deviation (SD), and differences are considered to be statistically significant at a p -value of <0.05 .

3 Results and discussion

3.1 Au@p4VP and hollow-p4VP nanoparticle engineering and analysis

TEM micrographs were used to study the morphology

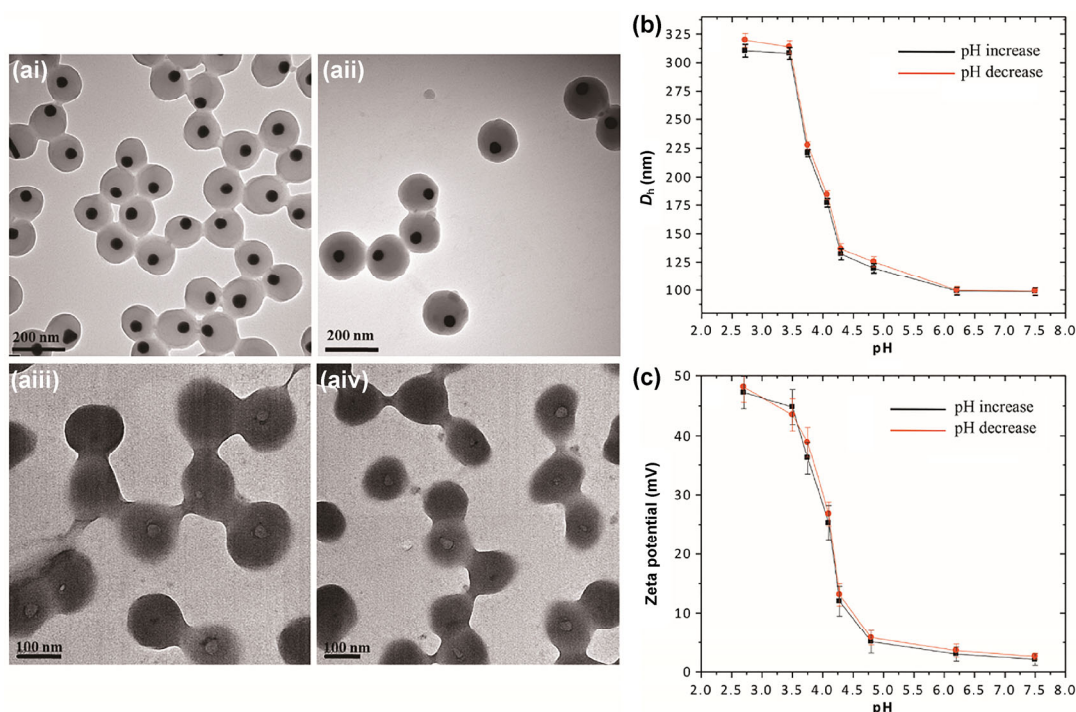


Figure 1 Representative TEM images of (a) core@shell Au@p4VP particles ((ai) and (aii)) and the hollow-p4VP system ((aiii) and (aiv)). Particle surface electrical properties: variation of the hollow-p4VP NP hydrodynamic diameter as a function of medium pH (b) and zeta potential representation of the surface charge density as a function of pH (c).

of the prepared NPs. Figures 1(ai) and 1(aii) show representative TEM images of the core@shell Au@p4VP NPs, which comprise a 50-nm spherical gold core encapsulated by a p4VP microgel shell. It can be clearly observed that all particles were coated and there was no sign of aggregation. The different electron density of the metal core compared with the organic shell allows the core@shell morphology to be observed. The external size of the NPs was measured, showing an average diameter of 125.8 ± 3.2 nm. It is important to note that TEM observations cannot provide the real diameter of the NPs in stimuli-responsive microgels as the external shells spread when dehydrated on the TEM grid. Cryo-TEM studies are necessary to obtain the actual size of the core@shell particles [47, 48]. After immersion of the colloidal dispersion in a solution comprising a mixture of HAuCl_4 and CTAB, the oxidation of Au^0 to Au^+ led to total elimination of the gold core, thus resulting in a hollow final structure, as can be observed in Figs. 1(aiii) and 1(aiv). Diffusion of the Au^{3+} /CTAB complex through the p4VP network until it reached the surface of the gold core led to the oxidation of Au^0 to Au^+ [36]. The elimination of the Au^0 core is the consequence of an oxidation-reduction mechanism where the Au^0 is oxidized to Au^I (resulting in metal removal) and the Au^{3+} (from HAuCl_4) is reduced to Au^I , in the presence of CTAB, which reduces the redox potential of both species [36]. It is important to note that the morphology of the hollow-p4VP NPs is not observed in all microgels shown in Figs. 1(aiii) and 1(aiv). This microgel is considered as “soft matter”, as in the previous reported work [47]. This study demonstrated that in conventional TEM investigations, the hole can be distinguished only in some microgels. In order to demonstrate the real presence of the hole as well as its real size, the authors provided cryo-TEM images. Theoretically all particles with an Au core will have a hole after Au oxidation, however, as the microgel is not a “hard sphere”, when the colloidal solution dries on the TEM grid, the hollow structure can totally or partially collapse during this drying process, which depends on the amount of residual water in the microgel prior to TEM investigations [47].

As conventional TEM images cannot demonstrate the true morphology of stimuli-responsive microgels,

cryo-TEM has recently been used to characterize the structure of hollow-pNIPAM particles [47]. Conventional TEM images showed that the microgel dehydrates on the TEM grid during drying, which causes a decrease in hole size. p4VP is a pH-responsive microgel with a swelling–deswelling behavior that depends on the local proton concentration. This property has been exploited to achieve the effective and stable incorporation of PTX into the NPs. Given the pK_a of 4-vinylpyridine and its polymer p4VP, the p4VP microgel remains in a swollen state at a pH below 4.7 due to the mutual repulsion of the positively charged protonated nitrogen atoms in the pyridine ring. When the pH is increased above the pK_a , deprotonation of the pyridine groups causes the microgel to undergo hydrophobic collapse from a swollen to a nearly solvent-free state [49].

Figures 1(b) and 1(c) show one cycle (black line for pH increase and red line for pH decrease) of DLS measurements of the hydrodynamic diameter of the hollow system as a function of pH. As can be seen, the microgel presents a swollen state with a hydrodynamic diameter of about 300 nm at pH 2.75. When the pH is increased and, in consequence, the number of protonated nitrogen atoms is reduced, the hollow-p4VP microgel undergoes a deswelling process and the hydrodynamic diameter is reduced to ~100 nm at pH 7.5. When the pH is decreased, the inverse behavior (red line) is produced, from pH 7.5 to pH 2.75 the hollow colloidal system progresses from a collapsed state ($D_h \sim 100$ nm) to a swollen state ($D_h \sim 300$ nm). This variation in the hydrodynamic diameter measured by DLS agrees with the decrease in the surface charge resulting from ZP measurements, as shown in Fig. 1(c).

The surface charge density of the hollow-p4VP NPs is +47 mV at pH 2.75, decreasing to almost +2 mV at pH 7.5 (black line). The inverse behavior is again observed by an increase in the surface charge when the pH is reduced (red line). Both results (DLS and ZP) confirm the reversibility of the phase transition. This significant reduction in the surface charge density also reveals the deprotonation of the pyridine groups within the microgel network, and the consequent size decrease. It is important to note that the particles are not stable for a long time at this high pH value, and

colloidal aggregation is observed after 4 h. However, when the pH is again reduced, the colloidal particles return to being stable and well-dispersed.

3.2 PTX@p4VP nanoparticles: PTX loading

In order to demonstrate the incorporation of PTX molecules into the hollow-p4VP NPs, we performed Raman measurements for pure PTX and the hollow-p4VP before and after treatment with PTX. As before, the pH of the colloidal solution was reduced to 2 to allow the diffusion of PTX molecules throughout the microgel network, then raised to around 7 with the aim of producing microgel deswelling and effectively trapping the PTX. Figure 2(a) shows the Raman spectrum of an aliquot of colloidal solution containing hollow-p4VP particles loaded with PTX (green line), the Raman spectrum of a pure sample of PTX was used as a reference (red line), and the Raman spectrum for free hollow-p4VP NPs (blue line). In the Raman spectrum corresponding to the PTX@p4VP NPs, clear Raman peaks of pure PTX, including peaks at 180, 255, 421, 490, 618, 818, 1,003, 1,160, 1,663, and 1,717 cm^{-1} , within the spectral region from 0 to 2,000 cm^{-1} are displayed, agreeing closely with previously published findings [50].

The presence and quantification of PTX in PTX@p4VP NPs was also confirmed by HPLC. This is a versatile, safe, and convenient technique for separating and quantifying drugs in polymeric nano- and microparticles. As described in 2.6, an aliquot of the aqueous colloidal solution of PTX@p4VP was centrifuged, exhaustively extracted with chloroform, dried over MgSO_4 , and concentrated to dryness. HPLC analysis of the residue dissolved in methanol confirmed the absence of PTX in the supernatant water and a trapping efficiency of PTX into the hollow NPs (PTX@p4VP) of around 100%. These results agree with published findings [3].

3.3 PTX@p4VP NPs: PTX release

In vitro release of PTX was studied under acidic and basic conditions using suspensions in citrate and phosphate buffers, respectively (Fig. 2(b)). A fast release rate during the first day, followed by a slow and uniform release, was observed in acidic media. As expected, slow release was observed under basic conditions. In both cases, the initial drug release can be ascribed to those drug molecules located on or near the external particle surface, whereas the slow and uniform release could be caused by diffusion

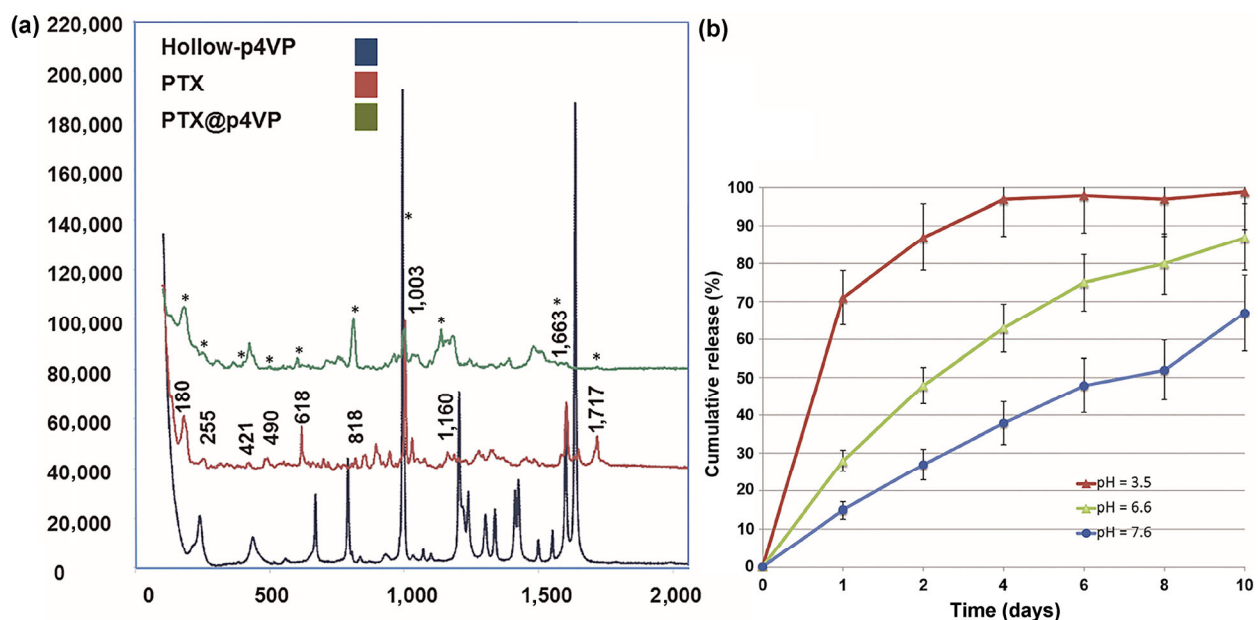


Figure 2 Analysis of chemical composition: Raman spectra of a sample of PTX@p4VP nanoparticles (green line), of a pure sample of PTX (red line), and of free hollow-p4VP nanoparticles (blue line) (a). *In vitro* liberation of PTX from PTX@p4VP in basic (pH = 7.6) and acidic conditions (pH = 3.5 and 6.6) (b).

forces. About 70% of the loaded PTX was released from the NPs under acidic conditions (pH = 3.5) in the first 24 h, reaching 99% after six days. Under basic conditions (pH = 7.6) only 15% of PTX was released during the first 24 h, and only 67% had been released after 10 days. It is important to note that, even when the release speed is slower than that in strong acidic media (around 30% in 24 h), slightly acidic conditions (pH = 6.6) produce an almost complete liberation of PTX after 8 days. This fact can be explained by a slow but effective protonation of nitrogen atoms in the polymer.

One of the advantages of hollow-p4VPs over other formulations (such as Abraxane) is their pH-responsive behavior as, in contrast to healthy tissue, the extracellular tumor environment presents an acid pH [51]. As a result, we can take advantage of this pH-responsive behavior in order to target the activity of such systems specifically at the tumor site, thereby decreasing overall systemic exposure, avoiding side effects, and increasing the therapeutic efficiency [52].

3.4 Hemolysis assay and *in vitro* cytotoxicity of the hollow-p4VP NPs

The compatibility of the hollow-p4VP NPs with human erythrocytes was tested using a hemolysis assay. As can be seen in Fig. 3(a), hollow-p4VP did not produce lysis in erythrocyte membranes at any of the concentrations tested, even the highest concentrations.

Percentage hemolysis was less than 1% for all samples and was very similar to the negative control (PBS). In contrast, the positive control (20% Triton X-100) produced remarkable erythrocyte lysis and consequent release of hemoglobin.

As such, hollow-p4VP exhibits excellent biocompatibility with human erythrocytes. As far as we are aware, this is the first time that the hemocompatibility of p4VP NPs, which is an essential characteristic for developing new nanodrugs for use *in vivo*, has been demonstrated.

This hemocompatibility, which is not always tested in new nanocarriers, has been observed in some polymeric NPs developed to load PTX. For example, Narayanan et al. [53], showed the hemocompatibility of a PLGA-protein hybrid nanocarrier developed to

entrap PTX. Some authors proposed PEGylation as a strategy for increasing the hemocompatibility of NP systems, including those carrying PTX [54]. Thus, Lu et al. showed that PEGylated-NPs loaded with PTX display no hemolysis at concentrations of up to $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ [55].

In addition, as shown in Fig. 3(b), hollow-p4VP NPs did not exhibit any toxicity in either tumoral or non-tumoral cell lines. These results prove the lack of *in vitro* toxicity of these vehicles, making it clear that cell death (see below) only occurs as a consequence of the action of the drug and is not influenced by other components of the formulation.

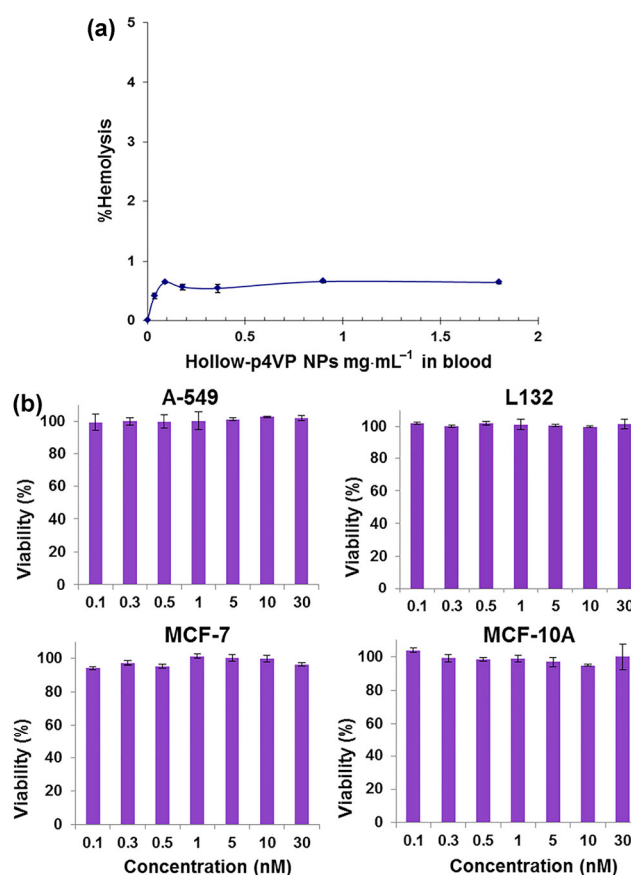


Figure 3 *In vitro* assay to evaluate the toxicity of hollow-p4VP NPs. (a) Hemolytic properties were evaluated *in vitro* in blood at different concentrations (from 0.04 to $1.80 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). (b) Cytotoxicity in culture cells was evaluated using tumoral and non-tumoral lung (A549 and L132, respectively) and breast (MCF7 and MCF-10A, respectively) cell lines. Cells were exposed to a wide range (from 0.1 to 30 nM) of hollow-p4VP NP concentrations, equivalent to those used in the proliferation assay, for 96 h. Results are expressed as cell viability (%). The data represent the mean value \pm SD of triplicate cultures.

3.5 Internalization of hollow-p4VP-NR (nile red) by NPs

After conducting NP internalization tests, NR was observed in both cell lines using a fluorescence microscope (Fig. 4). The results confirm that NR@p4VP internalization depends on exposure time, with the most intense labeling occurring after 2 h. The NPs displayed a cytoplasmic location in both cell lines. A-549 lung cancer cells showed a greater capacity for hollow-p4VP-NR internalization than MCF-7 breast cancer cells. The internalization of these NPs may be explained by the endocytic pathway leading to high accumulation in the cells. This fact could increase the therapeutic action of a drug associated with them. In

addition, the small size of the NPs and the positive charge of the polymer may enhance NR@p4VP internalization, thereby facilitating both the endocytic process and subsequent delivery of the content into the cell cytoplasm. However, the NP internalization mechanism is not totally clear, and a combination of different internalization routes may also be involved [53–58].

3.6 *In vitro* cytotoxicity study of PTX@p4VP NPs

p4VP NPs enhanced by way of chemical modifications or by adding metals to the formulation (e.g., silver) have previously been used as antibacterial systems thanks to the interaction between the positive charge

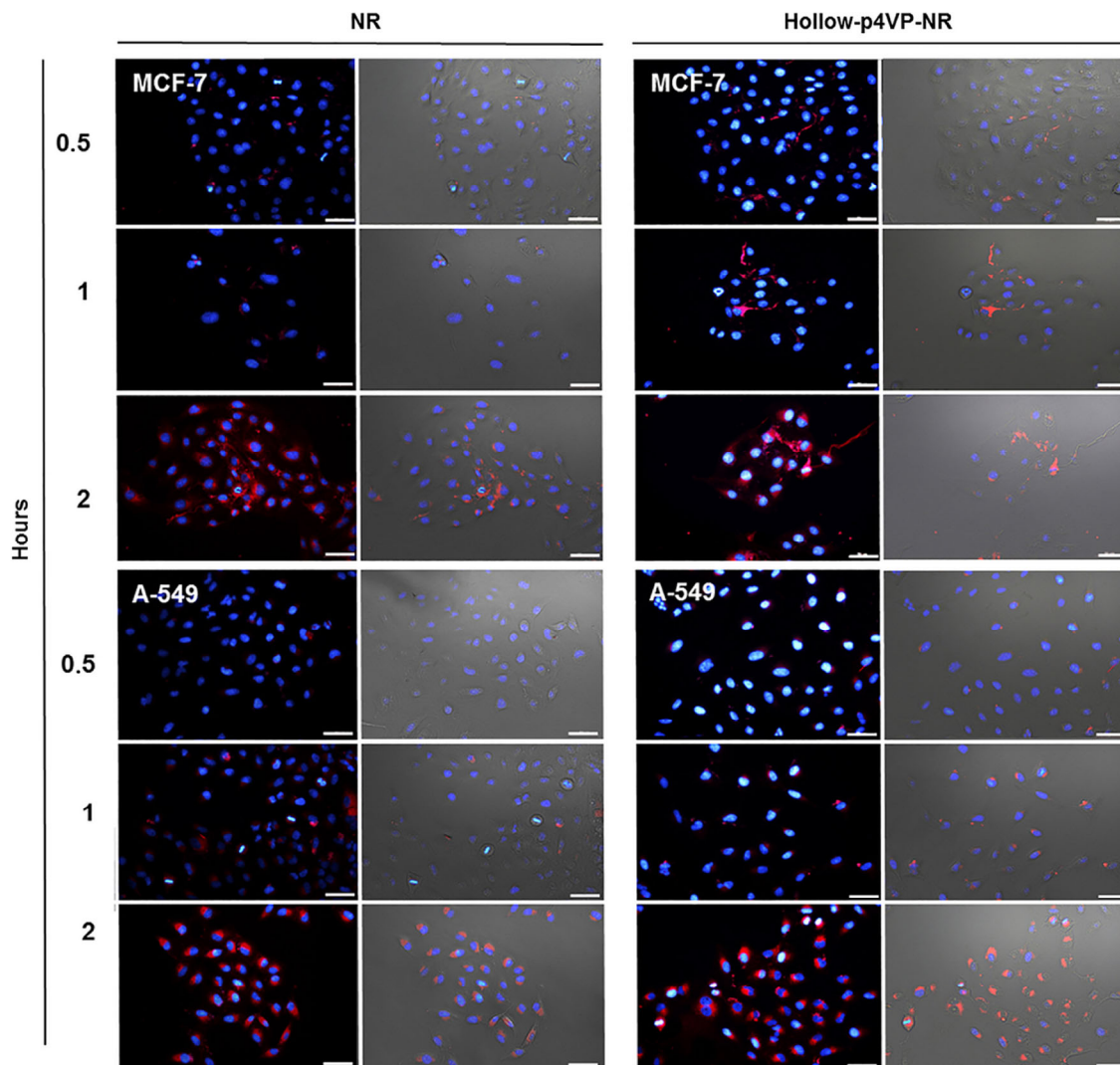


Figure 4 Fluorescence microscopy analysis of the internalization of hollow-p4VP-NR (1 μ M) in breast and lung cancer cell lines (after 0.5, 1, and 2 h exposure) (scale bar = 50 μ m). Nuclei were stained with DAPI (blue). Original magnification: 20 \times .

of the polymer and the negative charge of the bacterial wall [59–61]. To date, however, few studies have used p4VP NPs as drug vehicles for a medical purpose [62].

Our results show that free PTX and PTX@p4VP NPs induce a dose-dependent response in both the tumoral and non-tumoral cell lines tested. However, as shown in Fig. 5, the percentage proliferation was significantly lower when PTX was loaded into the NPs compared with the free drug ($p < 0.05$). Interestingly, PTX@p4VP NPs tripled the antiproliferative activity of the drug in MCF-7 breast cancer cells. Thus, PTX loaded into NPs induced a significant decrease in PTX IC_{50} (from 13.75 ± 1.1 to 4.71 ± 0.3 nM), although the effect of PTX@p4VP NPs in the non-tumoral breast cell line (MCF-10A) was smaller, inducing a reduction in PTX IC_{50} from 6.17 ± 0.8 to 3.6 ± 0.4 nM. In addition, PTX@p4VP NPs also improved PTX cytotoxicity in A-549 lung cancer cells, which showed a significant decrease in PTX IC_{50} (from 5.9 ± 0.4 to 3.6 ± 0.4 nM), whereas L132 lung cells exhibited a decrease in PTX IC_{50} from 3.5 ± 0.5 to 1.1 ± 0.6 nM. Numerous PTX nanoconjugates have been tested to analyze IC_{50} modulation in tumoral cells. Recently, HA PTX-NPs showed IC_{50} , apoptosis, and cell-cycle arrest values similar to those obtained with free PTX in MCF-7 cells.

However, they have been assayed successfully for treating breast cancer brain metastases [63]. PTX-loaded solid NPs also showed a similar IC_{50} to the free drug in MCF-7 cells [64], whereas PLGA and PCL NPs loaded with PTX improved drug cytotoxicity in breast cancer cells [65, 66].

Recently, Bernabeu et al. [67], developed a PTX-loaded PCL NP associated with alphotocopheryl polyethylene glycol 1,000 succinate (TPGS), which produced a significant decrease in PTX IC_{50} when tested on MCF-7 cells. Interestingly, these NPs were effective in the estrogen-independent MDA-MB-231 cancer cell line. PLGA-NPs associated with PTX also enhanced drug cytotoxicity in A-549 cells in comparison to free PTX [16]. Some polymer NP systems (e.g., PEGylated PTX/PTX) have already shown significantly higher antitumoral PTX activity *in vivo* [55]. In our case, the improvement in cell death with PTX@p4VP may be due to enhanced cellular uptake (see section 3.5) or the protection of PTX by the NPs, which may preserve its stability for longer [68]. Further, the inhibition of some resistance mechanisms may also be related to the enhanced cytotoxicity, since some NPs have been demonstrated to avoid them [69]. However, further studies would be needed to test

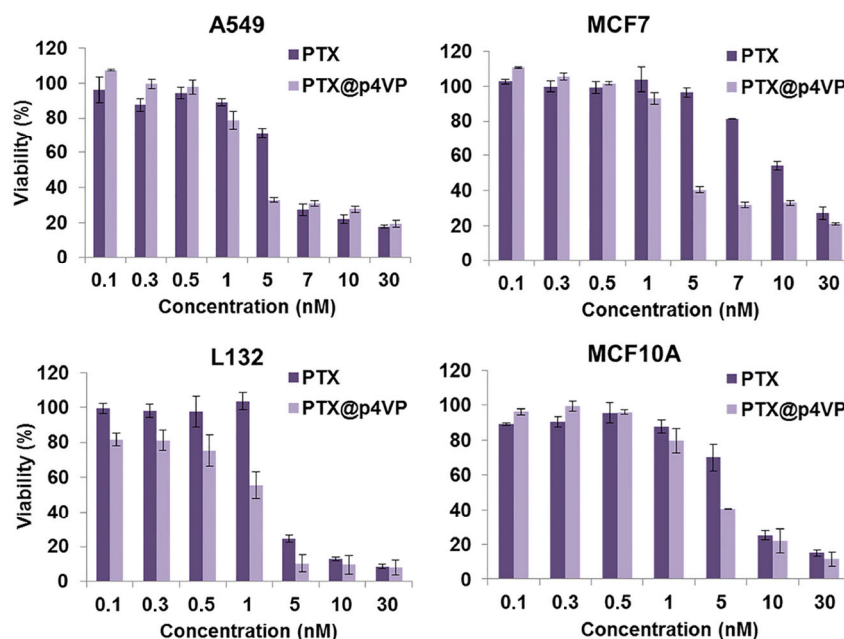


Figure 5 *In vitro* assay to evaluate PTX@p4VP cytotoxicity in lung and breast (tumoral and non-tumoral) cells. Growth of cell lines was evaluated after exposure (96 h) to a wide range (0.1–30 nM PTX) of PTX@p4VP concentrations or free PTX. Results are expressed as relative proliferation (viability (%)). Data represent the mean value \pm SD of triplicate cultures.

these hypotheses.

The demonstrated *in vitro* activity of PTX@p4VP NPs suggests that this system is a good candidate for improving *in vivo* PTX efficacy.

3.7 Cell cycle modulation upon treatment with PTX@p4VP NPs

Taxanes disrupt microtubule dynamics, leading to an arrest in mitosis with an accumulation of cells in the G2/M phase of the cell cycle [2]. To understand how PTX@p4VP affects mitosis modulation in lung and breast cancer cells, we analyzed the cell cycle. A-549 and L132 lung cancer cells showed similar values in the S and G2/M phases after PTX@p4VP treatment compared to those treated with free PTX (Fig. 6).

3.8 Analysis of MTS

To determine the effectiveness of PTX@p4VP in a system mimicking the limitations of tumor drug penetration, we generated MTS from MCF-7 and A-549 tumoral cells (Fig. 7). MTS were exposed to free

PTX and PTX associated with NPs. This experimental system resembles tumor morphology and has demonstrated its utility for screening anticancer drug-loaded NPs [70, 71]. We showed that PTX can induce dose-dependent modulation of A-549 MTS volume, with the greatest effect seen after treatment for 96 h. Interestingly, we also found that breast cancer MTS treated with PTX@p4VP showed a significant volume decrease compared with MTS treated only with free PTX ($p < 0.05$) (Fig. 7). The greater effect of PTX@p4VP in comparison to PTX was clearly demonstrated in A-549 MTS, which were monitored until day 9. This effect was also observed in MCF-7 MTS, although data recording stopped on day 4 due to the spread of the cells forming the MTS. The volume of MCF-7 MTS after exposure to hollow-p4VP was similar to that of MTS without treatment (control), confirming the absence of NP-related toxicity.

These results may be relevant when using PTX-NPs to increase drug penetration into the tumoral mass. In similar studies, D-glutamine-conjugated NPs associated with PTX also induced a larger volume

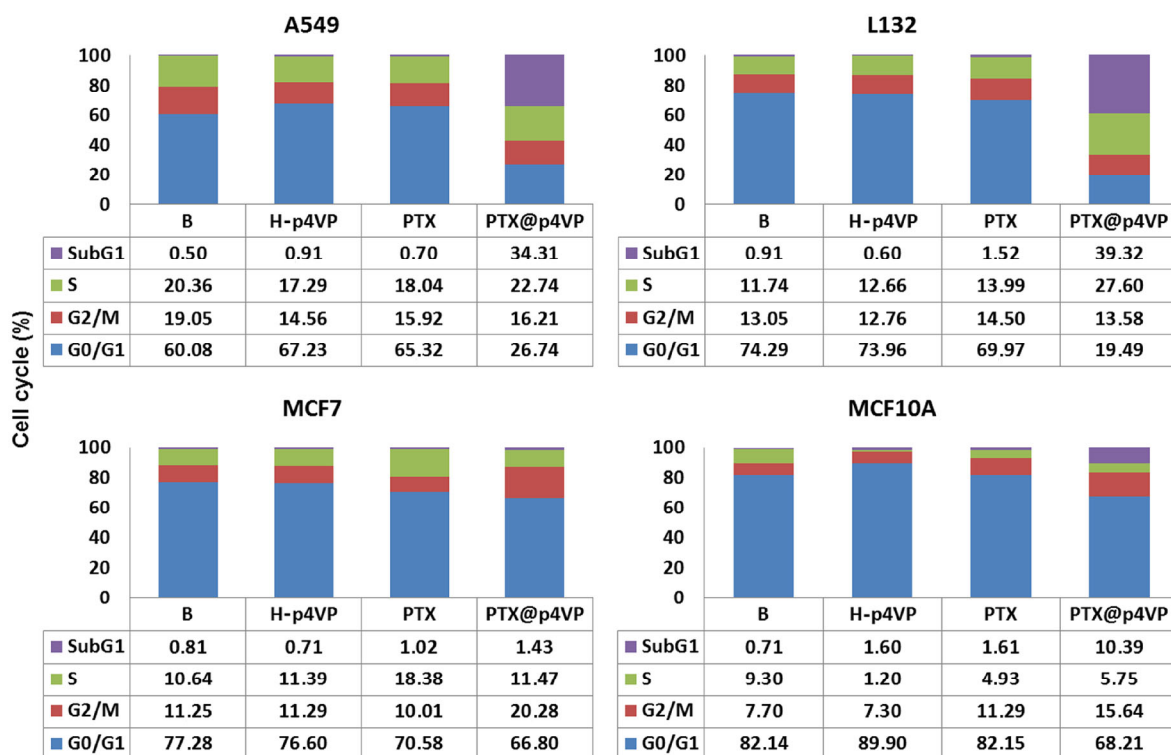


Figure 6 Modulation of the cell cycle (subG1, S, G2/M, G0/G1) in lung and breast (tumoral and non tumoral) cells. The number of cells in each phase is given as a percentage of the total cell population. B, basal cell line; H-p4VP, hollow-p4VP. Data represent the mean value \pm SD of triplicate cultures.

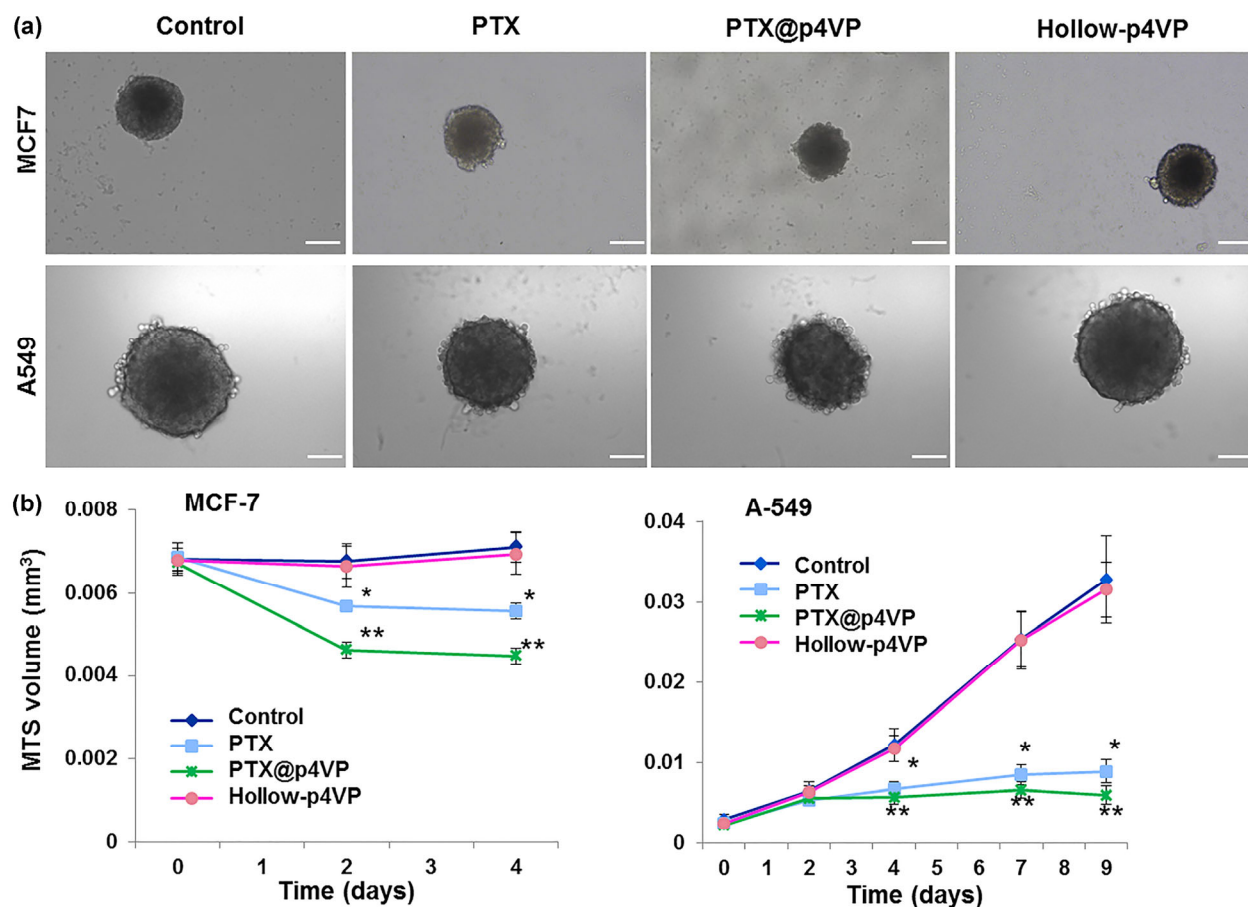


Figure 7 Analyses of MTS from MCF-7 and A549 cancer cells. (a) Multicellular tumor spheroids from MCF-7 and A-549 were generated using 250 and 4,000 cells, respectively (see Experimental). The figure shows representative images of MCF-7 and A549 MTS non-treated, and treated with free PTX, PTX@p4VP, and hollow-p4VP at a dose equivalent to the IC₅₀ value of PTX (5.9 nM for A549 and 13.75 nM for MCF7) in the adherent cell line at day 4 of the experiment (scale bar = 100 μ m). (b) Volume growth of MTS (mm³) was monitored by measurement of their longest and shorter diameter (see Experimental). A549 MTS were monitored until day 9, whereas data recording for MCF7 MTS stopped on day 4 due to the spread of the cells forming the MTS. Values represent means \pm SD of seven replicates. *Modulation of MTS volumes statistically significant ($p < 0.05$) in comparison to the control. **Modulation of MTS volumes statistically significant ($p < 0.05$) in comparison to free PTX.

decrease in MTS from glioma cells (rat RG-2 cells) than free PTX, and a nanomicelle-PTX system was able to penetrate deeply into the central region of MTS of both sensitive and resistant breast cancer cells (MCF-7 and MCF-7/Adr, respectively) [72, 73]. These NPs induced a significant reduction in the volume of the MTS. Further studies to detect enzymatic activity in treated MTS could provide additional information [72, 74, 75]. In order to demonstrate the apoptosis induced by PTX@p4VP in MTS, we performed a TUNEL assay (Fig. 8). MCF-7 and A-549 cells were treated with PTX and PTX@p4VP, with non-treated spheroids and spheroids treated with hollow-p4VP

as controls. Our results showed that apoptosis was clearly more pronounced in the MTS treated with PTX and PTX@p4VP than in the controls. Interestingly, the number of TUNEL-positive cells (apoptotic cells) in A-549 MTS treated with PTX@p4VP was higher than in those treated with PTX, suggesting an increase in the effectiveness of PTX when associated with p4VP NPs. In contrast, this staining difference was difficult to assess in MCF-7 MTS (Fig. 8).

In any case, the structure of both A-549 and MCF-7 MTS after PTX@p4VP treatment was less compact and less organized than those treated with free PTX. Other authors have demonstrated a significant increase

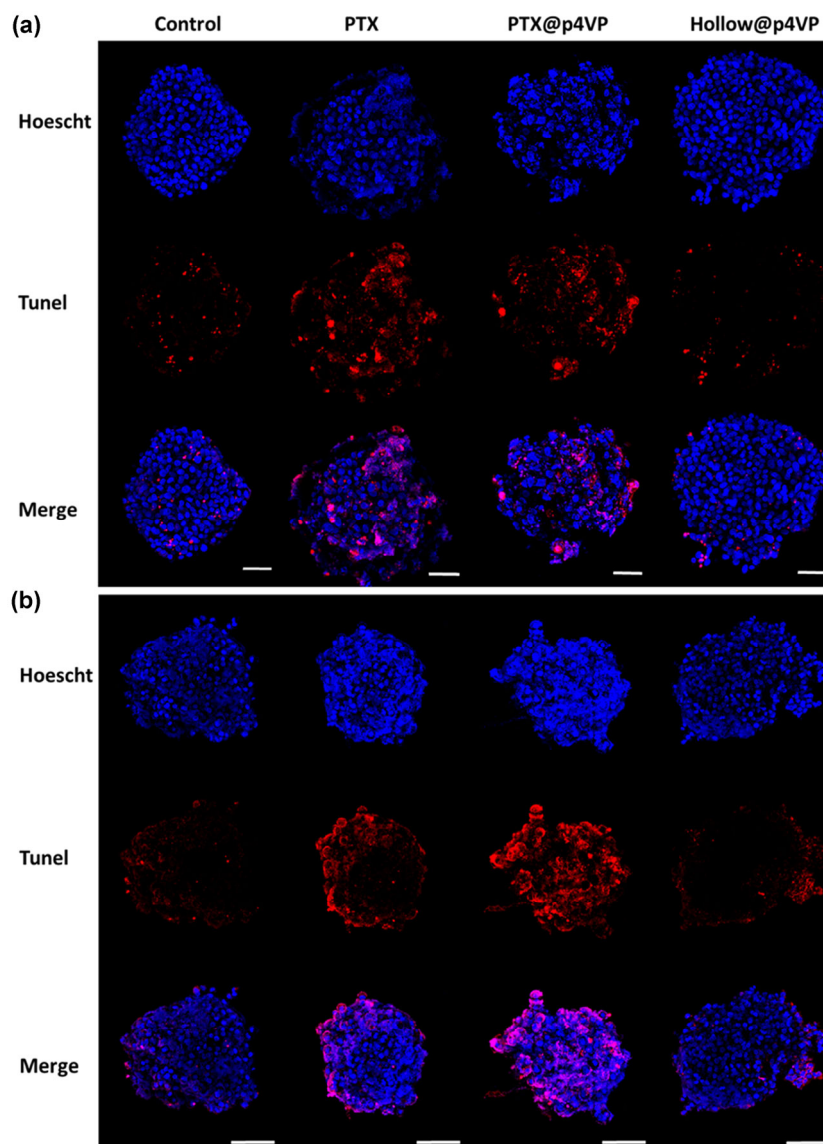


Figure 8 Representative image of the apoptosis induced by PTX@p4VP and free PTX in MTS from MCF7 (a) and A549 (b) cells. Apoptosis (in red) was detected using a TUNEL assay. MCF7 MTS were treated with free PTX and PTX@p4VP at a dose equivalent to the IC_{50} value of PTX (13.75 nM for MCF7 and 5.9 nM for A549) for 5 days; MTS non-treated and treated with hollow-p4VP were used as controls. Nuclei were stained with DAPI (blue). Original magnification: 40 \times , bar = 100 μ m.

in cell apoptosis using PTX-loaded NPs (albumin-bound PTX) in hepatocellular carcinoma cells but not in MTS [76]. Our results support the fact that PTX@p4VP could be more effective than the free drug for treating solid tumor masses, as represented by MTS in culture. Studies to functionalize the surface of PTX NPs using active ligands to increase the specificity for tumor tissues, enhance tumoral uptake, and decrease the side effects of the drug are underway.

4 Conclusions

To the best of our knowledge, this is the first study to use hollow-p4VP NPs as a vehicle for a cytotoxic agent (PTX) with the objective of increasing its antitumoral effect and preventing or decreasing any side effects. PTX@p4VP NPs have been synthesized using a novel technique employing a gold core that is subsequently oxidized to produce the hollow structure into which PTX can be incorporated. These PTX@p4VP

NPs have good physical and chemical properties and exhibit pH-dependent behavior, a very advantageous characteristic for enhancing specific drug delivery at the tumor site. Hollow-p4VP NPs did not induce either *in vitro* toxicity or hemolysis in contact with blood, thus proving their biocompatibility. Moreover, hollow-p4VP NPs showed efficient cell internalization. *In vitro* assays using human lung and breast cancer cells demonstrated that PTX@p4VP significantly improved the cytotoxic effect of PTX. In addition, the efficacy of PTX@p4VP in MTS from lung and breast cancer cells was demonstrated; this system was able to induce greater volume decreases and increased apoptosis than a system employing free PTX. These results suggest that hollow-p4VP NPs can be exploited as a new drug delivery system and that the incorporation of PTX (PTX@p4VP NPs) makes them an interesting option for improving current breast and lung cancer treatments.

Acknowledgements

This research was funded by FEDER, Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+i), by the Consejería de Salud de la Junta de Andalucía through projects (Nos. PI-0476-2016 and P11-CTS-7649). We also thank the financial support of CICYT, Spain, Project CTQ13-48418-P, FEDER funds. R. C.-C. acknowledges the Andalucía Tech program “U-mobility” co-financed by the University of Málaga and the European Community’s Seventh Framework Program (No. 246550). We thank the research grant (FPU) from Ministerio de Educación Cultura y Deporte.

References

- Jordan, M. A.; Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 253–265.
- Weaver, B. A. How taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol. Biol. Cell* **2014**, *25*, 2677–2681.
- Gelderblom, H.; Verweij, J.; Nooter, K.; Sparreboom, A. Cremophor EL: The drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur. J. Cancer* **2001**, *37*, 1590–1598.
- Kundranda, M. N.; Niu, J. Albumin-bound paclitaxel in solid tumors: Clinical development and future directions. *Drug Des. Devel. Ther.* **2015**, *9*, 3767–3777.
- Cerqueira, B. B. S.; Lasham, A.; Shelling, A. N.; Al-Kassas, R. Nanoparticle therapeutics: Technologies and methods for overcoming cancer. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *97*, 140–151.
- Pan, Y.; Gao, J. H.; Zhang, B.; Zhang, X. X.; Xu, B. Colloidosome-based synthesis of a multifunctional nanostructure of silver and hollow iron oxide nanoparticles. *Langmuir* **2010**, *26*, 4184–4187.
- Wang, X. J.; Feng, J.; Bai, Y. C.; Zhang, Q.; Yin, Y. D. Synthesis, properties, and applications of hollow micro-/nanostructures. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 10983–11060.
- Chen, Y.; Chen, Y. B.; Nan, J. Y.; Wang, C. P.; Chu, F. X. Hollow poly(*N*-isopropylacrylamide)-*co*-poly(acrylic acid) microgels with high loading capacity for drugs. *J. Appl. Polym. Sci.* **2012**, *124*, 4678–4685.
- Xing, Z. M.; Wang, C. L.; Yan, J.; Zhang, L.; Li, L.; Zha, L. S. pH/temperature dual stimuli-responsive microcapsules with interpenetrating polymer network structure. *Colloid Polym. Sci.* **2010**, *288*, 1723–1729.
- Singh, N.; Lyon, L. A. Au nanoparticle templated synthesis of pNIPAm nanogels. *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 719–726.
- Zhang, Y.; Jiang, M.; Zhao, J.; Ren, X.; Chen, D.; Zhang, G. A novel route to thermosensitive polymeric core-shell aggregates and hollow spheres in aqueous media. *Adv. Funct. Mater.* **2005**, *15*, 695–699.
- Yu, J.; Hao, R.; Sheng, F. G.; Xu, L. L.; Li, G. J.; Hou, Y. L. Hollow manganese phosphate nanoparticles as smart multifunctional probes for cancer cell targeted magnetic resonance imaging and drug delivery. *Nano Res.* **2012**, *5*, 679–694.
- Xing, R. J.; Bhirde, A. A.; Wang, S. J.; Sun, X. L.; Liu, G.; Hou, Y. L.; Chen, X. Y. Hollow iron oxide nanoparticles as multidrug resistant drug delivery and imaging vehicles. *Nano Res.* **2013**, *6*, 1–9.
- Shen, J. M.; Yin, T.; Tian, X.-Z.; Gao, F.-Y.; Xu, S. Surface charge-switchable polymeric magnetic nanoparticles for the controlled release of anticancer drug. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 7014–7024.
- Xu, Z. Y.; Zhu, S. J.; Wang, M. W.; Li, Y. J.; Shi, P.; Huang, X. Y. Delivery of paclitaxel using PEGylated graphene oxide as a nanocarrier. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 1355–1363.
- Sun, Y. B.; Yu, B.; Wang, G. Y.; Wu, Y. S.; Zhang, X. M.; Chen, Y. M.; Tang, S. Q.; Yuan, Y.; Lee, R. J.; Teng, L. S. et al. Enhanced antitumor efficacy of vitamin E TPGS-emulsified PLGA nanoparticles for delivery of paclitaxel. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2014**, *123*, 716–723.

- [17] Yu, K. T.; Zhao, J. L.; Zhang, Z. K.; Gao, Y.; Zhou, Y. L.; Teng, L. S.; Li, Y. X. Enhanced delivery of paclitaxel using electrostatically-conjugated herceptin-bearing PEI/PLGA nanoparticles against HER-positive breast cancer cells. *Int. J. Pharm.* **2016**, *497*, 78–87.
- [18] Adesina, S. K.; Holly, A.; Kramer-Marek, G.; Capala, J.; Akala, E. O. Polylactide-based paclitaxel-loaded nanoparticles fabricated by dispersion polymerization: Characterization, evaluation in cancer cell lines, and preliminary biodistribution studies. *J. Pharm. Sci.* **2014**, *103*, 2546–2555.
- [19] Lee, K. S.; Chung, H. C.; Im, S. A.; Park, Y. H.; Kim, C. S.; Kim, S. B.; Rha, S. Y.; Lee, M. Y.; Ro, J. Multicenter phase II trial of genexol-PM, a cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2008**, *108*, 241–250.
- [20] Ahn, H. K.; Jung, M.; Sym, S. J.; Shin, D. B.; Kang, S. M.; Kyung, S. Y.; Park, J. W.; Jeong, S. H.; Cho, E. K. A phase II trial of cremophor EL-free paclitaxel (Genexol-PM) and gemcitabine in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Chemoth. Pharm.* **2014**, *74*, 277–282.
- [21] Shahin, M.; Ahmed, S.; Kaur, K.; Lavasanifar, A. Decoration of polymeric micelles with cancer-specific peptide ligands for active targeting of paclitaxel. *Biomaterials* **2011**, *32*, 5123–5133.
- [22] Shahin, M.; Lavasanifar, A. Novel self-associating poly(ethylene oxide)-b-poly(ϵ -caprolactone) based drug conjugates and nano-containers for paclitaxel delivery. *Int. J. Pharm.* **2010**, *389*, 213–222.
- [23] Zhang, L. H.; Zhu, D. W.; Dong, X.; Sun, H. F.; Song, C. X.; Wang, C.; Kong, D. L. Folate-modified lipid-polymer hybrid nanoparticles for targeted paclitaxel delivery. *Int. J. Nanomedicine* **2015**, *10*, 2101–2114.
- [24] Zhang, X. Y.; Zhang, Y. D. Enhanced antiproliferative and apoptosis effect of paclitaxel-loaded polymeric micelles against non-small cell lung cancers. *Tumor Biol.* **2015**, *36*, 4949–4959.
- [25] Zhu, Z. S.; Xie, C.; Liu, Q.; Zhen, X.; Zheng, X. C.; Wu, W.; Li, R. T.; Ding, Y.; Jiang, X. Q.; Liu, B. R. The effect of hydrophilic chain length and iRGD on drug delivery from poly(ϵ -caprolactone)-poly(N-vinylpyrrolidone) nanoparticles. *Biomaterials* **2011**, *32*, 9525–9535.
- [26] Huang, C.-Y.; Chen, C.-M.; Lee, Y.-D. Synthesis of high loading and encapsulation efficient paclitaxel-loaded poly(*n*-butyl cyanoacrylate) nanoparticles via miniemulsion. *Int. J. Pharm.* **2007**, *338*, 267–275.
- [27] He, M.; Zhao, Z. M.; Yin, L. C.; Tang, C.; Yin, C. H. Hyaluronic acid coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles as anticancer drug carriers. *Int. J. Pharm.* **2009**, *373*, 165–173.
- [28] Rezazadeh, M.; Emami, J.; Hasanzadeh, F.; Sadeghi, H.; Minaiyan, M.; Mostafavi, A.; Rostami, M.; Lavasanifar, A. *In vivo* pharmacokinetics, biodistribution and anti-tumor effect of paclitaxel-loaded targeted chitosan-based polymeric micelle. *Drug Deliv.* **2016**, *23*, 1707–1717.
- [29] Park, J. S.; Han, T. H.; Lee, K. Y.; Han, S. S.; Hwang, J. J.; Moon, D. H.; Kim, S. Y.; Cho, Y. W. N-acetyl histidine-conjugated glycol chitosan self-assembled nanoparticles for intracytoplasmic delivery of drugs: Endocytosis, exocytosis and drug release. *J. Control. Release* **2006**, *115*, 37–45.
- [30] Hu, F.-Q.; Ren, G.-F.; Yuan, H.; Du, Y.-Z.; Zeng, S. Shell cross-linked stearic acid grafted chitosan oligosaccharide self-aggregated micelles for controlled release of paclitaxel. *Colloid Surf. B Biointerfaces* **2006**, *50*, 97–103.
- [31] Tripodo, G.; Trapani, A.; Torre, M. L.; Giammona, G.; Trapani, G.; Mandracchia, D. Hyaluronic acid and its derivatives in drug delivery and imaging: Recent advances and challenges. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *97*, 400–416.
- [32] Liu, Y. Y.; Mei, L.; Yu, Q. W.; Xu, C. Q.; Qiu, Y.; Yang, Y. T.; Shi, K. R.; Zhang, Q. Y.; Gao, H. L.; Zhang, Z. R. et al. Multifunctional tandem peptide modified paclitaxel-loaded liposomes for the treatment of vasculogenic mimicry and cancer stem cells in malignant glioma. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 16792–16801.
- [33] Wu, P. Y.; Liu, Q.; Li, R. T.; Wang, J.; Zhen, X.; Yue, G. F.; Wang, H. Y.; Cui, F. B.; Wu, F. L.; Yang, M. et al. Facile preparation of paclitaxel loaded silk fibroin nanoparticles for enhanced antitumor efficacy by locoregional drug delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 12638–12645.
- [34] Socinski, M. A.; Bondarenko, I.; Karaseva, N. A.; Makhson, A. M.; Vynnychenko, I.; Okamoto, I.; Hon, J. K.; Hirsh, V.; Bhar, P.; Zhang, H. et al. Weekly nab-paclitaxel in combination with carboplatin versus solvent-based paclitaxel plus carboplatin as first-line therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer: Final results of a phase III trial. *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 2055–2062.
- [35] Flory, P. J. *Principles of Polymer Chemistry*; Cornell University Press: Ithaca, NY, 1953.
- [36] Contreras-Cáceres, R.; Pacífico, J.; Pastoriza-Santos, I.; Pérez-Juste, J.; Fernández-Barbero, A.; Liz-Marzán, L. M. Au@pNIPAM thermosensitive nanostructures: Control over shell cross-linking, overall dimensions, and core growth. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 3070–3076.
- [37] Rodríguez-Fernández, J.; Pérez-Juste, J.; García de Abajo, F. J.; Liz-Marzán, L. M. Seeded growth of submicron Au colloids with quadrupole plasmon resonance modes. *Langmuir* **2006**, *22*, 7007–7010.
- [38] Contreras-Cáceres, R.; Pastoriza-Santos, I.; Álvarez-Puebla, R. A.; Pérez-Juste, J.; Fernández-Barbero, A.; Liz-Marzán,

- L. M. Growing Au/Ag nanoparticles within microgel colloids for improved surface-enhanced Raman scattering detection. *Chem.—Eur. J.* **2010**, *16*, 9462–9467.
- [39] Rodríguez-Fernández, J.; Pérez-Juste, J.; Mulvaney, P.; Liz-Marzán, L. M. Spatially-directed oxidation of gold nanoparticles by Au(III)-CTAB complexes. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 14257–14261.
- [40] Hou, D. Z.; Xie, C. S.; Huang, K. J.; Zhu, C. H. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). *Biomaterials* **2003**, *24*, 1781–1785.
- [41] Sadeghi-Aliabadi, H.; Asghari, G.; Mostafavi, S. A.; Esmaili, A. Solvent optimization on Taxol extraction from *Taxus baccata* L., using HPLC and LC-MS. *DARU* **2009**, *17*, 192–198.
- [42] Evans, B. C.; Nelson, C. E.; Yu, S. S.; Beavers, K. R.; Kim, A. J.; Li, H. M.; Nelson, H. M.; Giorgio, T. D.; Duvall, C. L. *Ex vivo* red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. *J. Vis. Exp.* **2013**, e50166.
- [43] Melguizo, C.; Cabeza, L.; Prados, J.; Ortiz, R.; Caba, O.; Rama, A. R.; Delgado, Á. V.; Arias, J. L. Enhanced antitumoral activity of doxorubicin against lung cancer cells using biodegradable poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles. *Drug Des. Devel. Ther.* **2015**, *9*, 6433–6444.
- [44] Ortiz, R.; Cabeza, L.; Arias, J. L.; Melguizo, C.; Álvarez, P. J.; Vélez, C.; Clares, B.; Aranega, A.; Prados, J. Poly(butylcyanoacrylate) and poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles loaded with 5-fluorouracil increase the cytotoxic effect of the drug in experimental colon cancer. *AAPS J.* **2015**, *17*, 918–929.
- [45] Prados, J.; Melguizo, C.; Rama, A. R.; Ortiz, R.; Segura, A.; Boulaiz, H.; Vélez, C.; Caba, O.; Ramos, J. L.; Aranega, A. Gef gene therapy enhances the therapeutic efficacy of doxorubicin to combat growth of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2010**, *66*, 69–78.
- [46] Ho, W. Y.; Yeap, S. K.; Ho, C. L.; Rahim, R. A.; Alitheen, N. B. Development of multicellular tumor spheroid (MCTS) culture from breast cancer cell and a high throughput screening method using the MTT assay. *PLoS One* **2012**, *7*, e44640.
- [47] Contreras-Cáceres, R.; Schellkopf, L.; Fernández-López, C.; Pastoriza-Santos, I.; Pérez-Juste, J.; Stamm, M. Effect of the cross-linking density on the thermoresponsive behavior of hollow PNIPAM microgels. *Langmuir* **2015**, *31*, 1142–1149.
- [48] Crassous, J. J.; Ballauff, M.; Drechsler, M.; Schmidt, J.; Talmon, Y. Imaging the volume transition in thermosensitive core-shell particles by cryo-transmission electron microscopy. *Langmuir* **2006**, *22*, 2403–2406.
- [49] Tokareva, I.; Minko, S.; Fendler, J. H.; Hutter, E. Nanosensors based on responsive polymer brushes and gold nanoparticle enhanced transmission surface plasmon resonance spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15950–15951.
- [50] Ling, J.; Weitman, S. D.; Miller, M. A.; Moore, R. V.; Bovik, A. C. Direct Raman imaging techniques for study of the subcellular distribution of a drug. *Appl. Opt.* **2002**, *41*, 6006–6017.
- [51] Kato, Y.; Ozawa, S.; Miyamoto, C.; Maehata, Y.; Suzuki, A.; Maeda, T.; Baba, Y. Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell Int.* **2013**, *13*, 89.
- [52] Gao, W. W.; Chan, J. M.; Farokhzad, O. C. pH-responsive nanoparticles for drug delivery. *Mol. Pharm.* **2010**, *7*, 1913–1920.
- [53] Narayanan, S.; Pavithran, M.; Viswanath, A.; Narayanan, D.; Mohan, C. C.; Manzoor, K.; Menon, D. Sequentially releasing dual-drug-loaded PLGA-casein core/shell nanomedicine: Design, synthesis, biocompatibility and pharmacokinetics. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 2112–2124.
- [54] Jain, V.; Swarnakar, N. K.; Mishra, P. R.; Verma, A.; Kaul, A.; Mishra, A. K.; Jain, N. K. Paclitaxel loaded PEGylated glyceryl monooleate based nanoparticulate carriers in chemotherapy. *Biomaterials* **2012**, *33*, 7206–7220.
- [55] Lu, J. K.; Chuan, X. X.; Zhang, H.; Dai, W. B.; Wang, X. L.; Wang, X. Q.; Zhang, Q. Free paclitaxel loaded PEGylated-paclitaxel nanoparticles: Preparation and comparison with other paclitaxel systems *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Pharm.* **2014**, *471*, 525–535.
- [56] Jones, A. T.; Gumbleton, M.; Duncan, R. Understanding endocytic pathways and intracellular trafficking: A prerequisite for effective design of advanced drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55*, 1353–1357.
- [57] Harush-Frenkel, O.; Debotton, N.; Benita, S.; Altschuler, Y. Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *353*, 26–32.
- [58] Iversen, T.-G.; Skotland, T.; Sandvig, K. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. *Nano Today* **2011**, *6*, 176–185.
- [59] Ozay, O.; Akcali, A.; Otkun, M. T.; Silan, C.; Aktas, N.; Sahiner, N. P(4-VP) based nanoparticles and composites with dual action as antimicrobial materials. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2010**, *79*, 460–466.
- [60] Sahiner, N.; Yasar, A. O. The generation of desired functional groups on poly(4-vinyl pyridine) particles by post-modification technique for antimicrobial and environmental applications. *J. Colloid Interf. Sci.* **2013**, *402*, 327–333.
- [61] Silan, C.; Akcali, A.; Otkun, M. T.; Ozbey, N.; Butun, S.; Ozay, O.; Sahiner, N. Novel hydrogel particles and their IPN

- films as drug delivery systems with antibacterial properties. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2012**, *89*, 248–253.
- [62] Wu, C. L.; Wang, X.; Zhao, L. Z.; Gao, Y. H.; Ma, R. J.; An, Y. L.; Shi, L. Q. Facile strategy for synthesis of silica/polymer hybrid hollow nanoparticles with channels. *Langmuir* **2010**, *26*, 18503–18507.
- [63] Mittapalli, R. K.; Liu, X. L.; Adkins, C. E.; Nounou, M. I.; Bohn, K. A.; Terrell, T. B.; Qhattal, H. S.; Geldenhuys, W. J.; Palmieri, D.; Steeg, P. S. et al. Paclitaxel-hyaluronic nanoconjugates prolong overall survival in a preclinical brain metastases of breast cancer model. *Mol. Cancer Ther.* **2013**, *12*, 2389–2399.
- [64] Zhuang, Y. G.; Xu, B.; Huang, F.; Wu, J. J.; Chen, S. Solid lipid nanoparticles of anticancer drugs against MCF-7 cell line and a murine breast cancer model. *Pharmazie* **2012**, *67*, 925–929.
- [65] López-Gasco, P.; Iglesias, I.; Benedí, J.; Lozano, R.; Teijón, J. M.; Blanco, M. D. Paclitaxel-loaded polyester nanoparticles prepared by spray-drying technology: *In vitro* bioactivity evaluation. *J. Microencapsul.* **2011**, *28*, 417–429.
- [66] López-Gasco, P.; Iglesias, I.; Benedí, J.; Lozano, R.; Blanco, M. D. Characterization and *in-vitro* bioactivity evaluation of paclitaxel-loaded polyester nanoparticles. *Anticancer Drugs* **2012**, *23*, 947–958.
- [67] Bernabeu, E.; Helguera, G.; Legaspi, M. J.; Gonzalez, L.; Hocht, C.; Taira, C.; Chiappetta, D. A. Paclitaxel-loaded PCL-TPGS nanoparticles: *In vitro* and *in vivo* performance compared with Abraxane[®]. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2014**, *113*, 43–50.
- [68] Sahoo, S. K.; Parveen, S.; Panda, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine* **2007**, *3*, 20–31.
- [69] Iyer, A. K.; Singh, A.; Ganta, S.; Amiji, M. M. Role of integrated cancer nanomedicine in overcoming drug resistance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1784–1802.
- [70] Jamieson, L. E.; Harrison, D. J.; Campbell, C. J. Chemical analysis of multicellular tumour spheroids. *Analyst* **2015**, *140*, 3910–3920.
- [71] Kang, A.; Seo, H. I.; Chung, B. G.; Lee, S. H. Concave microwell array-mediated three-dimensional tumor model for screening anticancer drug-loaded nanoparticles. *Nanomedicine* **2015**, *11*, 1153–1161.
- [72] Jiang, X. Y.; Xin, H. L.; Gu, J. J.; Du, F. Y.; Feng, C. L.; Xie, Y. K.; Fang, X. L. Enhanced antitumor efficacy by D-glucosamine-functionalized and paclitaxel-loaded poly(ethylene glycol)-co-poly(trimethylene carbonate) polymer nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* **2014**, *103*, 1487–1496.
- [73] Yao, H. J.; Ju, R. J.; Wang, X. X.; Zhang, Y.; Li, R. J.; Yu, Y.; Zhang, L.; Lu, W. L. The antitumor efficacy of functional paclitaxel nanomicelles in treating resistant breast cancers by oral delivery. *Biomaterials* **2011**, *32*, 3285–3302.
- [74] Yang, T.-M.; Barbone, D.; Fennell, D. A.; Broaddus, V. C. Bcl-2 family proteins contribute to apoptotic resistance in lung cancer multicellular spheroids. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2009**, *41*, 14–23.
- [75] Lovitt, C. J.; Shelper, T. B.; Avery, V. M. Evaluation of chemotherapeutics in a three-dimensional breast cancer model. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2015**, *141*, 951–959.
- [76] Zhou, Q.; Ching, A. K.; Leung, W. K.; Szeto, C. Y.; Ho, S. M.; Chan, P. K.; Yuan, Y. F.; Lai, P. B.; Yeo, W.; Wong, N. Novel therapeutic potential in targeting microtubules by nanoparticle albumin-bound paclitaxel in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Oncol.* **2011**, *38*, 721–731.