

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

Programa de Doctorado en Biomedicina



TESIS DOCTORAL

**Evaluación biológica de nanoformulaciones asociadas a paclitaxel
para el tratamiento del cáncer de pulmón: mejora de la actividad
antitumoral y reducción de los efectos secundarios.**

Memoria presentada por Dña. Julia Jiménez López para optar al grado de
Doctora Internacional por la Universidad de Granada

Granada, 28 de junio de 2019

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Julia Jiménez López
ISBN: 978-84-1306-356-0
URI: <http://hdl.handle.net/10481/57802>

*El futuro tiene muchos nombres.
Para los débiles es lo inalcanzable.
Para los temerosos, lo desconocido.
Para los valientes es la oportunidad.*

VÍCTOR HUGO

ÍNDICE

ÍNDICE

Abreviaturas	3
Resumen	9
Summary	17
Introducción	25
1. El cáncer	25
2. Cáncer de pulmón	36
2. 1. Incidencia, mortalidad y supervivencia	36
2. 2. Etiología y factores de riesgo	37
2. 3. Clasificación del cáncer de pulmón	39
2. 3. 1. Clasificación histológica del cáncer de pulmón	39
2. 3. 2. Estadificación del cáncer de pulmón. Clasificación TNM	41
2. 4. Tratamiento del cáncer de pulmón	45
2. 4. 1. Cáncer de pulmón de células pequeñas o microcítico	45
2. 4. 2. Cáncer de pulmón de células no pequeñas o no microcítico	48
3. Taxanos en el tratamiento del cáncer de pulmón: paclitaxel	54
3. 1. Introducción	54
3. 2. Mecanismo de acción	55
3. 3. Limitaciones del tratamiento con paclitaxel	56
4. Nanotecnología aplicada al cáncer	59
4. 1. Ventajas terapéuticas de las nanoformulaciones	62
4. 1. 1. Direccionamiento de las nanopartículas	63
4. 1. 1. 1. Direccionamiento pasivo	63
4. 1. 1. 2. Direccionamiento activo	65
4. 1. 1. 3. Direccionamiento desencadenado por estímulos	69
4. 1. 2. Resistencia a múltiples drogas	71
4. 2. Tipos de nanoformulaciones	72
4. 2. 1. Liposomas	73
4. 2. 2. Nanopartículas sólidas lipídicas	76
4. 2. 3. Polimersomas	78
4. 2. 4. Micelas poliméricas	79
4. 2. 5. Nanopartículas poliméricas	80
4. 2. 6. Nanopartículas magnéticas	81
4. 3. Nanoformulaciones con paclitaxel	83
4. 3. 1. Nanopartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico)	84
4. 3. 2. Liposomas catiónicos	85

Objetivos	89
Materiales y métodos	93
1. Síntesis de NPs de PLGA	93
2. Caracterización de las NPs de PLGA	93
3. Análisis de la liberación <i>in vitro</i> del PTX de las NPs de PLGA	94
4. Síntesis de liposomas catiónicos	94
5. Caracterización de los liposomas catiónicos	95
6. Cultivos celulares	96
7. Animales de experimentación	96
8. Ensayos de hemocompatibilidad	97
9. Ensayo de citotoxicidad en células blancas sanguíneas	97
10. Ensayos de proliferación	98
11. Análisis de ciclo celular	99
12. Ensayos de inmunofluorescencia	100
13. Análisis de apoptosis	100
14. Ensayos de internalización celular	101
15. Estudios de farmacocinética intracelular del PTX	101
16. Aislamiento y caracterización de CSCs	102
17. Ensayos de proliferación en CSCs	104
18. Estudio de fenómenos de resistencia a fármacos	104
19. Ensayos en MTS	105
20. Ensayos <i>in vivo</i>	106
21. Estudios farmacocinéticos y de biodistribución en tejidos	106
22. Ensayos de comportamiento de dolor neuropático	107
23. Análisis de los DRGs por microscopía electrónica de transmisión	108
24. Análisis estadísticos	109
Resultados	113
1. Síntesis y caracterización de las nanoformulaciones	113
2. Análisis de la liberación <i>in vitro</i> del PTX de las NPs de PLGA	116
3. Ensayos de hemocompatibilidad	117
3. 1. NPs de PLGA	117
3. 2. Liposomas catiónicos	117
4. Ensayos de proliferación	119
4. 1. NPs de PLGA	119
4. 2. Liposomas catiónicos	121
5. Análisis de ciclo celular	125
5. 1. NPs de PLGA	125
5. 2. Liposomas catiónicos	127

6.	Ensayo de inmunofluorescencia	129
6.1.	NPs de PLGA	129
6.2.	Liposomas catiónicos	130
7.	Análisis de apoptosis con NPs de PLGA	133
8.	Ensayos de internalización celular con NPs de PLGA.....	134
9.	Estudio de la farmacocinética intracelular del PTX	136
9.1.	NPs de PLGA	136
9.2.	Liposomas catiónicos	138
10.	Estudio de caracterización de CSCs	139
11.	Ensayo de proliferación en CSCs	140
11.1.	NPs de PLGA	140
11.2.	Liposomas catiónicos	141
12.	Estudio de fenómenos de resistencia a fármacos con NPs de PLGA	142
13.	Ensayos en MTS.....	143
13.1.	NPs de PLGA	143
13.2.	Liposomas catiónicos	147
14.	Ensayos <i>in vivo</i>	149
14.1.	NPs de PLGA	149
14.2.	Liposomas catiónicos	152
15.	Estudios farmacocinéticos y de biodistribución en tejidos	154
15.1.	NPs de PLGA	154
15.2.	Liposomas catiónicos	156
16.	Ensayos de comportamiento de dolor neuropático con los liposomas catiónicos.....	158
17.	Análisis de los DRGs por microscopía electrónica de transmisión	159
	Discusión	163
1.	Las nanoformulaciones de PLGA y los liposomas catiónicos presentan una alta biocompatibilidad.....	166
2.	Las NPs de PLGA y los liposomas catiónicos potencian el efecto antitumoral del PTX en líneas tumorales.....	167
3.	Los sistemas de PLGA y los liposomas catiónicos asociados a PTX modulan el ciclo celular	169
4.	Las NPs de PLGA y los liposomas catiónicos facilitan la internalización celular del PTX	171
5.	Los dos sistemas de encapsulación mejoran la actividad antitumoral frente a las CSCs	173
5.	Las NPs de PLGA y los liposomas catiónicos reducen el volumen de los MTS.....	175
6.	Los sistemas de PLGA y liposomas catiónicos disminuyen el volumen de los tumores <i>in vivo</i>	177
7.	Los sistemas poliméricos y lipídicos mejoran la biodisponibilidad <i>in vivo</i> del PTX	179
8.	Los liposomas catiónicos de mayor tamaño protegen de la neuropatía periférica inducida por el PTX	183
	Conclusiones	187

Conclusions	191
Bibliografia	195

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

A

AIS: Adenocarcinoma *in situ*

AJCC: *American Joint Committee on Cancer*

ATCC: *American Type Culture Collection*

ATP: Adenosín trifosfato

C

CCK-8: *Cell Counting Kit-8*

CPCNP: Cáncer de pulmón de células no pequeñas o no microcítico

CPCP: Cáncer de pulmón de células pequeñas o microcítico

CSCs: Células madre cancerígenas

CV: Coeficiente de variación

D

DL: Capacidad de carga

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DO: Densidad óptica

DOX: Doxorrubicina (DOX)

DRGs: Ganglios de la raíz dorsal

DS: Desviación estándar

DSL: Dispersión dinámica de la luz

E

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EE: Eficiencia de encapsulación

EMA: European Medicines Agency

EMT: Transición epitelio-mesenquimal

EPR: Efecto de permeabilidad y retención aumentada

F

FDA: Food and Drug Administration

G

G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos

GDP: Guanosín difosfato

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

GTP: Guanosín trifosfato

GUV: Vesículas unilamelares gigantes

H

HA: Ácido hialurónico

HIF: Factores de transcripción inducibles por hipoxia

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia

I

IC₅₀: Concentración inhibitoria al 50%

IMA: Adenocarcinoma invasivo

IP: Yoduro de propidio

IRM: Imagen de resonancia magnética

IT: Índice terapéutico

ABREVIATURAS

L

LUV: Vesículas unilamelares grandes

M

MAPs: Proteínas asociadas a microtúbulos

MDR: Resistencia a múltiples drogas

MET: Transición mesenquimal-epitelial

MIA: Adenocarcinoma mínimamente invasivo

MLV: Liposomas multilamelares

MMPs: Metaloproteinasas de la matriz

MTBE: Éter metil tert-butílico

MTS: Esferoides tumorales multicelulares

N

NCI: Instituto Nacional del Cáncer

NLCs: Transportadores lipídicos nanoestructurados

NPs: Nanopartículas

O

OMS: Organización mundial de la salud

P

PBCA: Poli(butilcianoacrilato)

PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica

PBS: Tampón fosfato salino

PCL: Poli(ϵ -caprolactona)

SRB: Sulforrodamina B

PE: Ficoeritrina

PEG: Polietilenglicol

PET: Tomografía por emisión de positrones

P-gp: P-glicoproteína

PLA: Ácido poliláctico

PLGA: Ácido poli(láctico-co-glicólico)

PMA: Polimetacrilato

PTX: Paclitaxel

Q

qPCR: Real-Time PCR

R

RN: Rojo nilo

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RP-HPLC: Cromatografía de fase inversa

RQ: Expresión relativa

RT: Radioterapia

S

SABR: Radioterapia estereotáctica ablativa

SCIS: Carcinoma de células escamosas *in situ*

SRE: Sistema retículo endotelial

SLNs: Nanopartículas sólidas lipídicas

SPIONs: Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro

SUV: Vesículas unilamelares pequeñas

T

TCA: Ácido tricloroacético

THC: Tetrahidrocannabinol

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

TPGS: d- α -Tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate o vitamina E

U

ULV: Liposomas unilamelares

UPLC-MS/MS: cromatógrafo de líquidos de alta resolución acoplado a un espectrómetro de masas

V

VC: Viabilidad celular

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VPH: Virus del papiloma humano

RESUMEN

RESUMEN

El cáncer de pulmón es actualmente la principal causa de muerte por cáncer en el mundo, seguido por el de hígado, estómago y colon. Su incidencia se ha incrementado desde los años 30 debido al aumento en el consumo de tabaco, el principal factor etiológico de este tipo de cáncer. Concretamente, en 2012 se registraron 1.8 millones de nuevos casos diagnosticados en el mundo, lo que supuso un 13% de los tumores detectados. Asimismo, representa el tipo de cáncer con mayor índice de mortalidad, con 1.6 millones de casos mortales registrados en 2012, con una supervivencia a 5 años de un 18,1%.

Actualmente, la quimioterapia es una de las principales estrategias terapéuticas para el tratamiento del cáncer, junto con la resección quirúrgica y la radioterapia. En las últimas décadas, los fármacos quimioterápicos han conseguido aumentar significativamente la supervivencia de los pacientes y reducir los índices de mortalidad de muchos tipos de cáncer. El paclitaxel (PTX), es un fármaco quimioterápico de elección en clínica para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, entre los que se encuentra el cáncer de pulmón. Sin embargo, al igual que la mayoría de compuestos antitumorales, presenta numerosas limitaciones que impiden en muchos casos la recuperación de los pacientes debido principalmente a la toxicidad sistémica inducida por el fármaco, que obliga a menudo a suspender el tratamiento (generalmente de forma temporal y, a veces, definitiva) o a reducir la dosis administrada, con la consiguiente disminución de la eficacia antineoplásica. Una de estas limitaciones es su baja solubilidad en agua, lo que requiere el uso de excipientes orgánicos como el Cremophor® EL, empleado en la formulación comercial de PTX, conocida como Taxol®. Este excipiente presenta una elevada toxicidad y ha sido relacionado con algunos de los principales efectos secundarios derivados del tratamiento con PTX, como son la hipersensibilidad aguda, neutropenia o neurotoxicidad. Concretamente, la neuropatía periférica dolorosa es uno de los efectos más indeseados del tratamiento con Taxol®, que afecta a más de un 60% de los pacientes tratados. Otra de las principales limitaciones que presenta es su rápida eliminación del organismo, siendo la vida media de unas 5.8 horas, lo que reduce la biodisponibilidad del fármaco en el tejido tumoral y, por tanto, la efectividad del tratamiento. Asimismo, el PTX puede inducir en las células tumorales el desarrollo de mecanismos de resistencia frente a diferentes agentes quimioterápicos, lo que reduce la respuesta al tratamiento de los pacientes. Uno de estos mecanismos es el basado en la sobreexpresión de la proteína de membrana P-glicoproteína (P-gp), que reconoce diversos fármacos de estructura y función no relacionada, entre ellos el PTX, y los expulsa fuera de la célula tumoral mediante una reacción dependiente de ATP. Este tipo de resistencia a

multidroga, observado en diversos tipos de tumores, minimizan el efecto de los fármacos quimioterápicos, reduciendo las opciones de tratamiento para estos pacientes.

En este contexto, la nanotecnología se presenta como una herramienta potencial para solventar muchas de las limitaciones de la quimioterapia convencional. La encapsulación de fármacos en nanoformulaciones ha demostrado mejorar la efectividad antitumoral a través de diferentes mecanismos: i) incrementando la biodisponibilidad de los quimioterápicos mediante la protección frente a la rápida eliminación o degradación; ii) aumentando la solubilidad de los fármacos, lo que evita el uso de excipientes tóxicos; iii) permitiendo el direccionamiento específico hacia las células tumorales y; iv) reduciendo los efectos secundarios al disminuir la toxicidad sistémica. En los últimos años se han desarrollado diversas estrategias terapéuticas basadas en nanopartículas (NPs) para el tratamiento del cáncer gracias a sus propiedades físico-químicas, siendo las más utilizadas las basadas en liposomas, NPs lipídicas sólidas (SLNs), micelas poliméricas, polimersomas, NPs poliméricas y NPs magnéticas.

El presente trabajo de investigación se centra en el estudio de la actividad antitumoral de dos sistemas de nanoformulaciones cargadas con el fármaco PTX en modelos *in vitro* e *in vivo* de cáncer de pulmón. El principal objetivo de este estudio es mejorar el efecto antitumoral del PTX, potenciando su internalización celular, aumentando su biodisponibilidad *in vivo* y reduciendo su toxicidad sistémica asociada, con el fin de evitar el desarrollo de efectos secundarios tan severos como la neuropatía periférica dolorosa.

En primer lugar, se han utilizado **NPs poliméricas de ácido poli(láctico-co-glicólico)** para la encapsulación de PTX, denominadas NPs de PLGA. El polímero de PLGA no solo presenta una alta biocompatibilidad y biodegradabilidad, sino que además está aceptado por la *Food and Drug Administration* de EEUU (FDA) y la *European Medicines Agency* (EMA) para su uso clínico en humanos, lo que lo convierte en un transportador ideal para los fármacos quimioterápicos. Estas NPs se sintetizaron y caracterizaron en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Sevilla, y presentan un diámetro menor de 250 nm y un potencial eléctrico de -30 mV, lo que las hace apropiadas para la administración intravenosa. Además, muestran un perfil de liberación bifásico, con una liberación inicial rápida del 25% en la primera hora, seguida de una liberación más sostenida durante los siguientes 15 días.

En segundo lugar, se emplearon **liposomas catiónicos** comerciales sintetizados por la empresa Nanovex Biotechnologies a partir de formulaciones comerciales *ready-to-use*. Concretamente, en este estudio se han empleado dos liposomas catiónicos con diferentes tamaños para la encapsulación del PTX: MLV, con un tamaño de 180-200 nm (MLV-PTX),

y SUV, con un tamaño de 80-100 nm (SUV-PTX). Paralelamente, se sintetizaron estas formulaciones con una cubierta de polietilenglicol (PEG) para mejorar el tiempo de circulación *in vivo* de los liposomas (MLV-PEG-PTX y SUV-PEG-PTX).

Previo a la realización de los estudios con PTX, y con el fin de evaluar la toxicidad de ambas formulaciones sin fármaco, se realizaron ensayos de hemocompatibilidad con eritrocitos humanos. Los resultados muestran una elevada biocompatibilidad tanto para las NPs de PLGA, como para los liposomas catiónicos en sus diferentes formulaciones, con una hemólisis inferior al 2% en todos los casos. Estos estudios de biocompatibilidad se completaron con ensayos de citotoxicidad en líneas tumorales de pulmón y en una línea de pulmón humana no tumoral, en los que la viabilidad celular se mantuvo por encima del 95% con los dos tipos de nanosistemas. Posteriormente, se llevaron a cabo ensayos de proliferación para evaluar el efecto antitumoral de las formulaciones cargadas con PTX, en comparación con el PTX libre, en las distintas líneas celulares de pulmón. Las NPs de PLGA mostraron una reducción de la IC_{50} del PTX de hasta 3.63 y 3.79 veces en las líneas tumorales humanas A549 y NCI-H460, respectivamente. Por su parte, las formulaciones lipídicas también lograron reducir significativamente la IC_{50} del fármaco. Concretamente, la formulación MLV-PTX fue la que presentó un mayor efecto antitumoral, con reducciones de 3.75 y 4.96 veces de la IC_{50} del PTX en las líneas tumorales A549 y la línea tumoral murina LL2. En estos estudios se observó que la adición de PEG a las formulaciones redujo el efecto antitumoral de los liposomas debido a que la envuelta polimérica dificulta la internalización celular *in vitro*. Sin embargo, en la línea no tumoral L132 no se observaron diferencias significativas en la IC_{50} del fármaco con el uso de las formulaciones lipídicas. Además, se realizó un análisis del efecto antitumoral de las formulaciones en células madre tumorales aisladas de la línea A549. En este contexto, las NPs de PLGA lograron aumentar el efecto del fármaco a las dosis más bajas, mientras que, de las formulaciones lipídicas, solo MLV-PEG-PTX consiguió aumentar el efecto del PTX en estas células.

Una vez demostrada su eficacia antitumoral, se realizó un análisis de la modulación del ciclo celular producida por las formulaciones en las distintas líneas celulares para comprobar si la encapsulación provoca alguna alteración en el mecanismo de acción del PTX. Los resultados muestran que los dos tipos de nanoformulaciones inducen una acumulación de células en las fases G_2/M del ciclo celular, del mismo modo que el fármaco libre. Del mismo modo, la determinación de α -tubulina mediante inmunofluorescencia muestra una multipolarización del huso mitótico en el núcleo de las células tratadas con las nanopartículas con PTX, característico del arresto mitótico producido por el fármaco.

Posteriormente, se realizaron estudios de internalización celular para determinar si la mejora del efecto antitumoral de los nanosistemas con fármaco se debe a un incremento de la cantidad de fármaco internalizado en las células. Las NPs de PLGA muestran un incremento significativo de la concentración intracelular de PTX con las nanoformulaciones frente al fármaco libre desde tiempos muy corto de exposición (30 minutos), con una acumulación de PTX hasta 30 veces superior en la línea tumoral A549. Los liposomas catiónicos presentan resultados similares, aunque las diferencias con el fármaco libre fueron menos pronunciadas que con las NPs de PLGA. Por otra parte, en la línea no tumoral no se observan diferencias en la incorporación del fármaco con los liposomas respecto al fármaco libre, lo que explicaría que no se produjeran diferencias en la IC_{50} del fármaco en los ensayos de proliferación, mientras que sí se observaron con las NPs de PLGA.

Para finalizar los estudios *in vitro*, se determinó la actividad antitumoral de las nanoformulaciones en modelos de esferoides tumorales de A549 y LL2, que remedan a los tumores *in vivo*. Para ello, se evaluó el volumen tumoral de estos esferoides tras la administración de los distintos tratamientos. Los resultados muestran que las NPs de PLGA ralentizan el crecimiento de los esferoides en mayor medida que los liposomas catiónicos, además de producir un aumento en el porcentaje de apoptosis.

Los ensayos *in vivo* se llevaron a cabo en ratones de la cepa C57BL/6, en los que se indujeron tumores subcutáneos mediante la inoculación de células tumorales de la línea LL2. Los ratones fueron sometidos a tratamiento con las diferentes NPs de PLGA y los liposomas catiónicos pegilados, vacíos y asociados a PTX. Los resultados obtenidos demuestran que los tratamientos no incrementan la toxicidad sistémica inducida por el PTX libre y que las tres formulaciones provocan una disminución del crecimiento de los tumores, superior al obtenido con el fármaco libre. Concretamente, los tumores de los ratones tratados con PLGA-PTX, MLV-PEG-PTX y SUV-PEG-PTX presentaron un volumen un 20% menor que los tratados con PTX. Además, los ensayos de biodistribución muestran que las NPs de PLGA con PTX mejoran la biodisponibilidad sistémica del fármaco, especialmente en el tejido pulmonar, además de aumentar la penetrabilidad del fármaco en el tejido cerebral, una importante ventaja para el tratamiento de las metástasis cerebrales. No obstante, los niveles de PTX en el tumor fueron menores que con el PTX libre, salvo a las 24 horas, cuando alcanzaron niveles similares, lo que sugiere que las NPs tardan más tiempo en acumularse en este tumor subcutáneo. En cuanto a los liposomas catiónicos, solo la formulación SUV-PEG-PTX mejoró significativamente la biodisponibilidad sistémica del PTX, mientras que MLV-PEG-PTX presentó un patrón más similar al PTX libre. Al igual que ocurre con las NPs de PLGA, la acumulación en el tumor fue mayor con el fármaco libre, aunque a las 24 horas se observó una mayor acumulación de fármaco con SUV-PEG-PTX.

Los estudios de neuropatía periférica dolorosa inducidos por PTX se realizaron mediante la determinación de alodinia mecánica e hiperalgesia por dolor en ratones tratados con PTX y con los liposomas catiónicos pegilados (MLV-PEG-PTX y SUV-PEG-PTX) en modelos de ratón CD-1. Estos estudios se realizaron en colaboración con el grupo de Neurofarmacología del dolor dirigido por el Dr. José Manuel Baeyens de la Facultad de Medicina de Granada. El desarrollo de esta neuropatía periférica dolorosa está asociada a la acumulación de PTX en los ganglios de la raíz dorsal (DRGs), donde se encuentran los somas de las neuronas sensoriales periféricas. Esta acumulación se debe posiblemente a que el PTX puede atravesar las grandes fenestraciones endoteliales típicas de la red de capilares que vascularizan los DRGs. Los resultados mostraron que los liposomas de mayor tamaño protegían a los ratones del desarrollo de la hiperalgesia por calor y la alodinia mecánica, mientras que las formulaciones de menor tamaño y el PTX libre indujeron el desarrollo de la neuropatía. Estos resultados se corroboraron con los ensayos de biodistribución en los que también se analizó la cantidad de PTX presente en los DRGs, demostrando ausencia de PTX en los DRGs de los ratones tratados con MLV-PEG-PTX y una acumulación similar de fármaco en los ratones tratados con PTX libre y los liposomas SUV-PEG-PTX.

En conclusión, los resultados de este trabajo de investigación demuestran que las NPs de PLGA y los liposomas catiónicos cargados con PTX son nanoformulaciones adecuadas y potenciales herramientas para la mejora del tratamiento del cáncer de pulmón, ya que presentan una alta biocompatibilidad, aumentan el efecto antitumoral del fármaco *in vivo* y pueden reducir algunos de los efectos secundarios más indeseados del PTX, como es la neuropatía periférica dolorosa.

SUMMARY

SUMMARY

Currently, lung cancer is the first cause of death of cancer in the world, followed by liver, stomach and colon cancer. Its incidence has increased since the 1930s due to the increase in tobacco consumption, the main etiological factor of this type of cancer. Specifically, in 2012 there were 1.8 million new cases diagnosed in the world, representing 13% of the detected tumors. It also represents the type of cancer with the highest mortality rate with 1.6 million deaths recorded in 2012, with a 5-year survival rate of 18.1%.

Chemotherapy is one of the main therapeutic strategies for the current treatment of cancer, along with surgical resection and radiotherapy. In recent decades, chemotherapeutic drugs have been able to significantly increase patient survival and reduce the death rates of many types of cancer. Paclitaxel (PTX) is a chemotherapy drug of choice in clinical practice for the treatment of various types of cancer as lung cancer. However, as a high percent of antitumor compounds, it has numerous limitations that avoid recovery of the treated patients in many cases, mainly due to the systemic toxicity induced, which often forces treatment to be suspended (usually temporarily and, sometimes, definitely) or to reduce the dose administered, with the consequent decrease in antineoplastic efficacy. One of these limitations is its low solubility in water, which leads to the use of organic excipients such as Cremophor® EL, employed in the commercial formulation of PTX, known as Taxol®. This excipient has a high toxicity and has been related to some of the main secondary effects derived from treatment with PTX, such as acute hypersensitivity, neutropenia or neurotoxicity. Specifically, painful peripheral neuropathy is one of the most undesirable effects of Taxol® treatment that affects more than 60% of treated patients. In addition, another of the main limitations is its rapid elimination of the organism, with a half-life of about 5.8 hours, which reduces the bioavailability of the drug in the tumor tissue, and, therefore, the effectiveness of the treatment. Likewise, PTX can induce in the tumor cells the development of resistance mechanisms against different chemotherapeutic agents, which reduces the response to the treatment of patients. One of these mechanisms is based on the overexpression of the membrane protein P-glycoprotein (P-gp), which recognizes various drugs of unrelated structure and function, including PTX, and drive them out of the tumor cell, through an ATP-dependent reaction. This type of multidrug resistance, observed in various types of tumors, minimizes the effect of chemotherapy drugs, reducing the treatment options for these patients.

In this context, nanotechnology is presented as a potential tool to solve many of the limitations of conventional chemotherapy. The encapsulation of drugs in nanoformulations has been shown to improve the antitumor effectiveness through different mechanisms: i)

SUMMARY

increasing the bioavailability of the drug, by protecting against rapid elimination or degradation; ii) increasing the solubility and so avoiding the use of toxic excipients; iii) allowing specific targeting towards tumor cells and; iv) reducing side effects by decreasing systemic toxicity. In recent years, various therapeutic strategies based on nanoparticles (NPs) have been developed for the treatment of cancer thanks to their physicochemical properties, being the most used those based on liposomes, solid lipid NPs (SLNs), polymeric micelles, polymersomes, polymeric NPs and magnetic NPs.

The present research work is focused on the study of the antitumor activity of two nanoformulations systems loaded with the drug PTX in *in vitro* and *in vivo* models of lung cancer. The main goal of this study is to improve the anti-tumor effect of PTX, enhancing its cellular internalization, increasing its bioavailability *in vivo* and reducing its associated systemic toxicity to avoid the development of side effects as severe as painful peripheral neuropathy.

First, polymeric NPs of poly (lactic-co-glycolic acid) have been used for the encapsulation of PTX, called PLGA NPs. The PLGA polymer not only shows a high biocompatibility and biodegradability but also is accepted by the US Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA) for clinical use in humans, which makes these NPs ideal transporters for chemotherapeutic drugs. These NPs were synthesized and characterized in the Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology of the University of Seville and show a diameter of less than 250 nm and an electrical potential of -30 mV that makes them suitable for intravenous administration. In addition, these NPs show a biphasic release profile, with a rapid initial release of 25% in the first hour, followed by a more sustained release over the next 15 days.

Secondly, commercial cationic liposomes synthesized by the company Nanovex Biotechnologies were used, from ready-to-use commercial formulations. Specifically, in this study two cationic liposomes with different sizes were used for the encapsulation of PTX, MLV, with a size of 180-200 nm (MLV-PTX), and SUV, with a size of 80-100 nm (SUV-PTX). In parallel, these formulations were synthesized with a polyethylene glycol (PEG) coating to improve the *in vivo* circulation time of the liposomes (MLV-PEG-PTX and SUV-PEG-PTX).

Hemocompatibility tests were performed in human erythrocytes with both types of formulations without drug to evaluate their toxicity. The results show a high biocompatibility for both PLGA NPs and cationic liposomes in their different formulations, with a hemolysis of less than 2% in all cases. These biocompatibility studies were completed with cytotoxicity assays in lung tumor lines and in a non-tumor lung line, in which cell viability remained

above 95% with both types of nanosystems. Subsequently, proliferation assays were carried out to evaluate the anti-tumor effect of the PTX loaded formulations, in comparison with the free PTX, in the different lung cell lines. The PLGA NPs displayed a reduction of the PTX IC_{50} of up to 3.63 and 3.79 times in the human tumor lines A549 and NCI-H460, respectively. On the other hand, the lipid formulations also managed to significantly reduce the IC_{50} of the drug. Specifically, the MLV-PTX formulation showed the greatest antitumor effect, with reductions of 3.75 and 4.96 times of the IC_{50} of PTX in the A549 tumor lines and the murine LL2 tumor line. In these studies, it was observed that the addition of PEG to the formulations reduced the antitumoral effect of the liposomes probably because the polymer coating hinders cell internalization *in vitro*. However, in the non-tumor line L132 no significant differences in the IC_{50} of the drug were observed with the use of lipid formulations.

In addition to the proliferation assays in the tumor lines, the effect of the formulations in isolated tumor stem cells of the A549 cell line was analyzed. In this context, PLGA NPs increased the effect of the drug to the lower doses while the among the lipid formulations only MLV-PEG-PTX managed to increase the effect of PTX in these cells.

Once its antitumor efficacy was demonstrated, an analysis of the cell cycle modulation produced by the formulations in the different cell lines was carried out to check whether the encapsulation causes any alteration in the PTX mechanism of action. The results showed that both types of nanoformulations induce a cell cycle arrest in G_2 / M phases in the same way as the free drug. In addition, the determination of alpha-tubulin through immunofluorescence assay showed a multipolarization of the mitotic spindle in the nucleus of the cells treated with the nanoparticles with PTX, characteristic of the mitotic arrest produced by the drug.

Subsequently, cell internalization studies were carried out to determine whether the improvement of the antitumor effect of the nanosystems with drug is due to an increase in the amount of drug internalized in the cells. A significant increase in the intracellular concentration of PTX was observed with the nanoformulations against the free drug. With the PLGA NPs these differences were observed from very short exposure times (30 minutes), with an accumulation of PTX up to 30 higher in the A549 tumor line. In the case of cationic liposomes, the results were similar, although the differences with the free drug were less pronounced than with the NPs of PLGA with PTX. Furthermore, in the non-tumor line no differences were observed in the incorporation of the drug with the liposomes with respect to the free drug that explain the absence of IC_{50} differences in the proliferation assays, whereas they were observed with the PLGA NPs.

SUMMARY

To conclude the *in vitro* studies, the antitumor activity of the nanoformulations was determined in models of tumor spheroids of A549 and LL2, which mimic tumors *in vivo*. During the study, the tumor volume of these spheroids was evaluated after the administration of the different treatments. The results showed that the PLGA NPs reduce the growth of the spheroids in comparison with the cationic liposomes and increase the percentage of apoptosis.

In vivo tests were carried out on mice of strain C57BL/6, in which subcutaneous tumors were induced by the inoculation of tumor cells of the LL2 cell line. The mice were subjected to treatment with the different NPs of PLGA and the pegylated cationic liposomes, empty and associated with PTX. The results obtained show that the treatments do not increase the systemic toxicity induced by the free PTX and that the three formulations cause a decrease in the growth of the tumors higher than the obtained with the free drug. Specifically, tumors of mice treated with PLGA-PTX, MLV-PEG-PTX and SUV-PEG-PTX showed a volume 20% lower than those treated with PTX. In addition, the biodistribution assays showed that PLGA NPs with PTX improve the systemic bioavailability of the drug, more specifically in the lung tissue, and also increase the amount of drug in brain tissue, an advantage for the treatment of brain metastases. However, PTX levels in the tumor were lower than with free PTX except at 24 hours, when they reached similar levels, suggesting that NPs take longer to accumulate in this subcutaneous tumor. In the case of the cationic liposomes, only the formulation SUV-PEG-PTX significantly improved the systemic bioavailability of PTX, while MLV-PEG-PTX presented a pattern more similar to free PTX. As occurs with PLGA NPs, the accumulation in the tumor was greater with the free drug, although at 24 hours a greater accumulation of drug was observed with SUV-PEG-PTX.

PTX-induced painful peripheral neuropathy studies were performed by determination of mechanical allodynia and pain hyperalgesia in mice treated with PTX and with the pegylated cationic liposomes (MLV-PEG-PTX and SUV-PEG-PTX) in CD-1 mouse models. These studies were carried out in collaboration with the pain neuropharmacology group led by Dr. José Manuel Baeyens of the Faculty of Medicine of Granada. The development of this painful peripheral neuropathy is associated with the accumulation of PTX in the dorsal root ganglia (DRGs), where the somas of peripheral sensory neurons are found. This accumulation is possibly due to PTX can cross the large endothelial fenestrations typical of the capillary network that vascularize the DRGs. The results showed that the larger liposomes protected the mice from the development of hyperalgesia by heat and mechanical allodynia, while the smaller formulations and the free PTX induced the development of the neuropathy. These results were corroborated with the biodistribution assays in which the amount of PTX present in the DRGs was also analyzed, demonstrating the absence of PTX

in the DRGs of the mice treated with MLV-PEG-PTX and a similar accumulation of drug in the mice. treated with free PTX and the SUV-PEG-PTX liposomes.

In conclusion, the results of this research work show that PLGA NPs and cationic liposomes loaded with PTX are suitable nanoformulations and potential tools for the improvement of the treatment of lung cancer, since they present a high biocompatibility, increase the antitumor effect of the drug *in vivo* and can reduce some of the most undesirable side effects of PTX, such as painful peripheral neuropathy.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. EL CÁNCER

1. 1. CARCINOGENÉISIS

El término cáncer comprende a un numeroso grupo de enfermedades que se caracterizan por el desarrollo de células anormales, que se dividen, crecen y se diseminan sin control. En este proceso de crecimiento, estas células, denominadas células tumorales, pueden desprenderse de su lugar de origen e invadir otros tejidos próximos o lejanos a través del sistema vascular o linfático, dando lugar a lo que se conoce como metástasis. La clave de la aparición de una patología tumoral se encuentra en la alteración del proceso por el que toda célula se divide hasta que se desencadena la muerte celular programada, conocida como apoptosis. En las células sanas, este proceso se encuentra regulado por una serie de mecanismos complejos. Sin embargo, la alteración de este proceso en una célula tumoral le confieren la capacidad de evadir la apoptosis y dividirse sin límite, en lo que se conoce como proceso de carcinogénesis (Figura 1). Esta pérdida de control en el proceso de división, lo que se conoce como ciclo celular, y muerte celular, desemboca en el desarrollo masas de células conocidas como neoplasias o tumores (Pecorino 2008). La carcinogénesis puede tener como causa mutaciones, modificaciones epigenéticas, reajustes cromosómicos y/o alteraciones en las interacciones heretotípicas entre distintos tipos celulares, que a su vez pueden producirse como consecuencia de errores en la replicación, infección con virus oncogénicos o factores ambientales o genéticos (Fouad y Aanei, 2017).

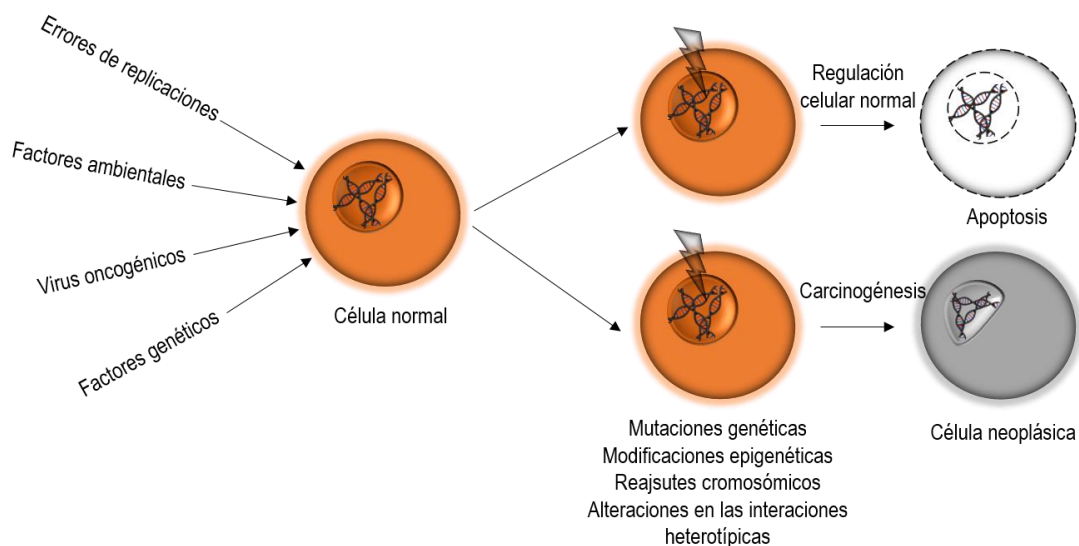


Figura 1: Proceso de carcinogénesis mediante el cual una célula normal pierde el control sobre el ciclo celular y la apoptosis, y se transforma en una célula tumoral.

1. 2. CÉLULAS TUMORALES: CAPACIDADES FUNCIONALES

Las células tumorales poseen alteraciones fisiológicas que les permiten sobrevivir, proliferar y diseminarse. Estas alteraciones fueron descritas por Hanahan y Weinberg como “capacidades funcionales” de las células tumorales (Figura 2) (Hanahan y Weinberg, 2000; Hanahan y Weinberg, 2011).

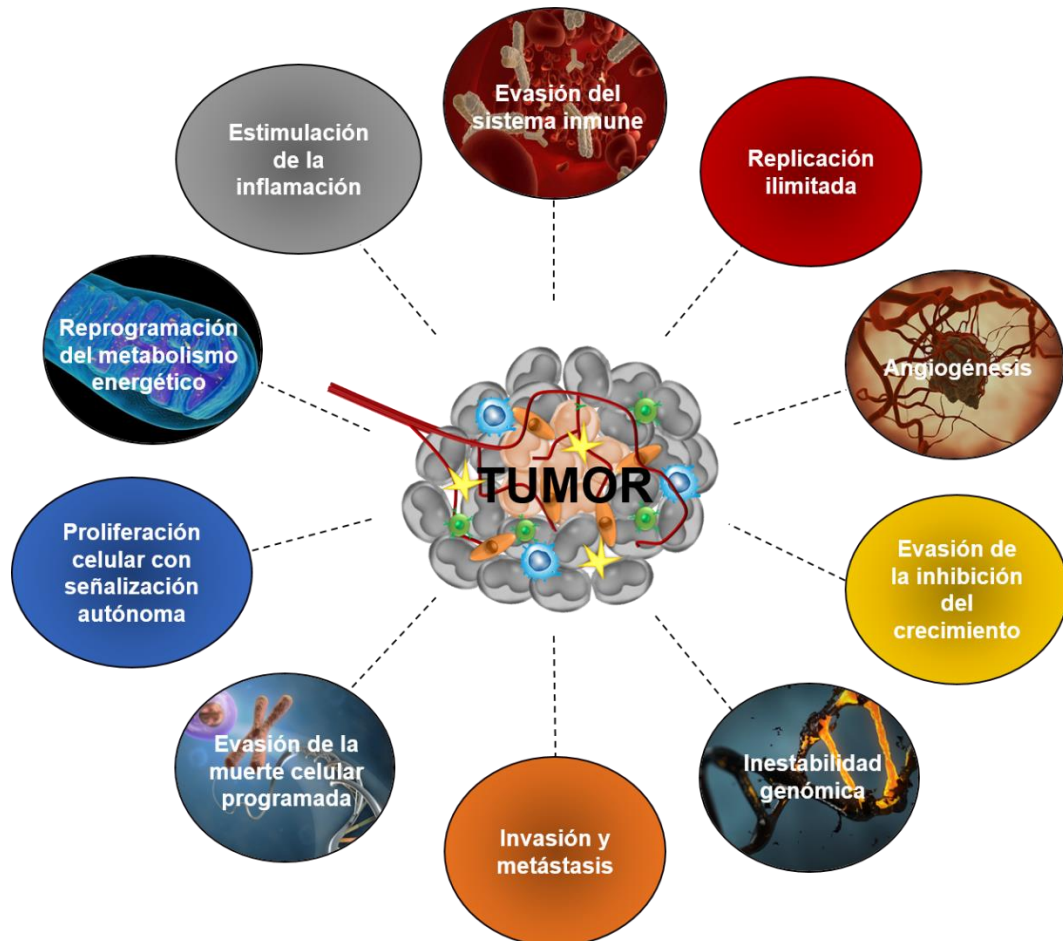


Figura 2: Capacidades funcionales que adquieren las células tumorales para su supervivencia proliferación y diseminación: evasión del sistema inmune, replicación ilimitada, angiogénesis, evasión de la inhibición del crecimiento, inestabilidad genómica, invasión y metástasis, evasión de la muerte celular programada, proliferación celular con señalización autónoma, reprogramación del metabolismo energético y estimulación de la inflamación.

– Evasión de la destrucción por el sistema inmune

El sistema inmunitario es responsable de la eliminación de la mayoría de las células tumorales incipientes o micrometástasis al mantener monitorizados los tejidos mediante un proceso conocido como inmunosupervisión. No obstante, el desarrollo del cáncer implica que esta inmunosupervisión no siempre es perfecta y que las células tumorales de alguna forma son capaces de evadir su eliminación por el sistema inmune. La immunoedición es el

modelo más reconocido para explicar esta evasión del sistema inmune y se compone de tres etapas: eliminación, equilibrio y evasión. En la primera, las células del sistema inmune se encargan de la detección y eliminación de las células neoplásicas incipientes. Cuando esta eliminación no se lleva a cabo con éxito, las células tumorales supervivientes entran en un proceso de equilibrio (segunda fase) durante el cual se mantienen y sufren una edición inmunológica, propiciando el desarrollo de variantes poco inmunogénicas capaces de escapar o evadirse de la detección del sistema inmune. Finalmente, si el sistema inmune no es capaz de detectar y eliminar estas células con baja capacidad inmunogénica, éstas avanzan hacia la etapa de escape (tercera fase) y se estimula la progresión tumoral, dando lugar a neoplasias detectables clínicamente. Este modelo podría ser uno de los mecanismos principales de evasión inmunitaria de las células tumorales, aunque se requieren más estudios para su mayor comprensión y posible desarrollo de dianas terapéuticas que estimulen o ayuden al sistema inmune a erradicar a éstas células tumorales resistentes (Dunn y cols., 2004; Hanahan y Weinberg, 2011; Villegas, 2015).

– **Inmortalidad replicativa**

La mayoría de los linajes celulares normales presentan un programa intrínseco que les permite dividirse un número limitado de veces, tras el cual entran en un estado irreversible de no proliferación, también conocido como senescencia celular, o en un estado de muerte celular programada o apoptosis (Hanahan y Weinberg, 2011). Esta limitación replicativa se encuentra determinada por la longitud de los telómeros, secuencias que protegen los extremos de los cromosomas y que se van acortando a medida que se suceden las divisiones celulares. Las células tumorales han desarrollado la capacidad de extender la longitud de estos telómeros gracias a la sobreexpresión de la telomerasa, adquiriendo una capacidad proliferativa ilimitada denominada inmortalización (Blasco, 2005; Diotti y Loayza, 2011).

– **Neovascularización**

La angiogénesis es un proceso mediante el cual, células endoteliales se dividen, migran y se ensamblan para la formación de nuevos vasos sanguíneos. Este proceso se encuentra activo principalmente durante la embriogénesis y puede activarse en la vida adulta en determinados procesos biológicos. Las células cancerígenas han desarrollado mecanismos para iniciar este proceso y proporcionar nutrientes y el oxígeno a la masa tumoral. Los nuevos vasos formados a partir de otros ya existentes, son desorganizados (Benazzi y cols., 2014; Fouad y Aanei, 2017) lo que provoca el efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR) que favorece la acumulación en su interior, entre otros, de nanopartículas (NPs) terapéuticas (Jabir y cols., 2012; Babu y cols., 2013). El principal desencadenante de este proceso es la hipoxia, que inicia la acumulación de factores de transcripción inducibles

por hipoxia (HIF) y la expresión de moléculas que interviene en la formación de los nuevos vasos sanguíneos. Además, factores como el de crecimiento epidérmico (EGF) o el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) inducen sobreexpresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que interviene en la formación de la neovasculatura (Dimova y cols., 2014; Fouad y Aanei, 2017).

– **Evasión de las señales de inhibición de crecimiento**

La homeostasis de un tejido no solo requiere de señales inductoras del crecimiento, sino también inhibitorias para evitar que una proliferación celular descontrolada. Esta inhibición puede, o bien inducir la entrada de las células a un estado quiescente (G_0), o bien, en un estado post-mitótico, normalmente relacionado con la diferenciación celular (Hanahan y Weinberg, 2000). Estas señales de inhibición suelen estar reguladas por los denominados genes supresores de tumores como Rb o p53. Este último, que puede detener la progresión del ciclo celular o desencadenar la apoptosis en respuesta a determinadas señales de estrés, ha sido encontrado mutado en casi el 50% de los tumores secuenciados. El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y el TGF- β (Bernstein y cols., 2013; Fouad y Aanei, 2017) también han sido relacionados con algunos tipos de tumores. En concreto, TGF- β se ha relacionado con la activación de la transición epitelio-mesenquimal (EMT) que confiere a las células tumorales un mayor grado de malignidad al estar relacionado con procesos de invasión y metástasis (Hanahan y Weinberg, 2011).

– **Inestabilidad genómica y mutagénesis**

La inestabilidad genómica ha sido documentada en la mayoría de los tipos de cáncer siendo un factor que permite a las células cancerígenas adquirir muchas de las capacidades anteriormente comentadas. La inestabilidad genómica puede presentarse como anomalías estructurales en los cromosomas, como inestabilidad en las regiones microsatélites, y fundamentalmente como mutaciones o represión epigenética de genes “vigilantes” de la estabilidad genómica responsables de la detección y reparación de daños en el ADN. Dos buenos ejemplos son p53 y BRCA1 y BRCA2. La mutación de p53, que activa la maquinaria de reparación o induce apoptosis en células con daños irreparables, es constante en un alto porcentaje de tumores. También los genes BRCA1 y BRCA2, involucrados en la reparación de ADN dañado y en mantener la estabilidad genómica de las células, han sido detectados alterados en cáncer de mama (Negrini y cols., 2010; Hanahan y Weinberg, 2011).

– **Invasión y metástasis**

Las células epiteliales no poseen movilidad y presentan fuertes adhesiones célula-célula y con la matriz extracelular en la que se encuentran embebidas. Durante la carcinogénesis determinadas células adquieren la capacidad de romper estas interacciones y abrirse paso a través de la remodelación o destrucción de la membrana basal hasta invadir el estroma circundante y alcanzar el torrente sanguíneo o sistema linfático. Estas células cancerígenas circulantes pueden migrar y alcanzar un sitio distante del tumor primario, en el cual se iniciará un proceso de formación de tumores secundarios o metástasis. Estas metástasis son las principales responsables del 90% de las muertes por cáncer. El proceso es extremadamente complejo, pero hay evidencias que apoyan la idea que las células cancerígenas podrían perder sus propiedades y adquirir características de células mesenquimales en el proceso EMT con un aumento de marcadores mesenquimales como son vimentina o N-cadherina y la pérdida del marcador epitelial E-cadherina, inactivado en la mayoría de las células cancerígenas y esencial para el desarrollo de metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000; Talbot y cols., 2012; Bersini y cols., 2014). También se ha implicado en este proceso a las metaloproteinasas de la matriz (MMPs), sobreexpresadas en muchos tipos de cáncer humanos y marcadores de mal pronóstico (Fouad y Aanei, 2017) e incluso a las quimioquinas (como CCL5) secretadas por células madre mesenquimales en respuesta a señales procedentes de las células tumorales (Karnoub y cols., 2007; Hanahan y Weinberg, 2011). Finalmente, establecida la metástasis, las células pueden sufrir nuevas alteraciones para volver a adquirir características epiteliales en un proceso opuesto a la EMT, transición mesenquimal-epitelial (MET), todavía poco conocida (Hanahan y Weinberg, 2011; Steinestel y cols., 2014).

– **Evasión de la muerte celular programada o apoptosis**

La homeostasis de un tejido no solo depende de las señales asociadas a la proliferación celular, sino también a las que inducen a las células a un programa de muerte programada o apoptosis, requiriéndose un equilibrio entre ambos procesos para el correcto funcionamiento del tejido. La apoptosis suele iniciarse ante diversas señales de estrés o daño irreparable del material genético. Las células tumorales han desarrollado mecanismos para eludir vías apoptóticas, como la alteración del equilibrio de proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas, la mutación de genes respondedores de estrés, como p53, o la inhibición de la actividad de las caspasas (Fouad y Aanei, 2017). Sin embargo, la alteración de estas vías apoptóticas no implica que las células cancerígenas no puedan sufrir una reentrada en la apoptosis. De hecho, la mayoría de los tratamientos quimioterápicos actuales están basados en la inducción de la muerte celular, y es un proceso que ocurre de manera natural en las

masas tumorales, aunque no a niveles suficientes para frenar el crecimiento del tumor. Algunos estudios sugieren incluso que, son las propias células tumorales las que podrían usar la apoptosis como mecanismo de presión selectiva para mantener los mejores linajes celulares y contribuir así a la progresión tumoral (Labi y Erlacher, 2015).

– **Desarrollo de señalización autónoma para la proliferación celular**

Los tejidos normales controlan minuciosamente la proliferación celular mediante cascadas de señalización que regulan el paso del estado quiescente de sus células a un estado activado de proliferación, con el fin de asegurar la homeostasis y correcto funcionamiento del tejido. Estas señales se transmiten a través de receptores de membrana que reconocen específicamente moléculas como factores de crecimiento o componentes de la matriz extracelular. En el caso de las células tumorales, existen tres vías principales para la adquisición de la autonomía proliferativa: i) en primer lugar, las células tumorales pueden generar sus propias señales de crecimiento que le permiten mantener el estado de proliferación activado de forma crónica. Se han encontrado evidencias de que estas células son capaces de producir y liberar mitógenos que actúan de forma autocrina o paracrina como estimuladores del crecimiento (Hanahan y Weinberg, 2000; Hanahan y Weinberg, 2011), ii) En segundo lugar, la alteración de determinados genes (entre ellos protooncogenes) puede mimetizar señales de crecimiento manteniendo un estado continuo de proliferación, suprimir la apoptosis o estimular la angiogénesis (Hanahan y Weinberg, 2000; Fouad y Aanei, 2017). Este es el caso de las mutaciones en algunas de las proteínas de la familia RAS, detectadas en casi el 30% de los tumores humanos; y iii) en tercer lugar, las células tumorales pueden emitir señales a células del nicho tumoral (células endoteliales o del estroma) induciendo la producción de factores de crecimiento que retroalimentan positivamente un estado proliferativo (Hanahan y Weinberg, 2000).

– **Reprogramación del metabolismo energético**

La elevada tasa proliferativa que mantienen las células cancerígenas precisa de un aumento en la producción de energía por el metabolismo celular. Sin embargo, las vías metabólicas tradicionales de las que se valen las células normales para producir la energía que precisan, no son suficientes para abastecer su continuo crecimiento. Existen evidencias de una serie de alteraciones en el metabolismo energético de las células tumorales, siendo la primera de ellas la conocida como glicólisis aerobia, descrita por Warburg en 1956. Las células tumorales presentan una elevada captación de glucosa y se ha observado que preferentemente utilizan la glicólisis aerobia como principal fuente de producción de energía, aún en presencia de oxígeno. En este proceso la glucosa se transforma en lactato, cuya excreción es la principal causante de la acidificación del nicho tumoral. Además, también se

han observado alteraciones metabólicas relacionadas con un aumento en la síntesis de ácidos grasos, que les conferiría los lípidos necesarios para la síntesis de las membranas celulares, y con en el metabolismo de la glutamina, que proveería a las células tumorales de precursores de aminoácidos esenciales (Warburg, 1956; Butler y cols., 2013; Zhao y cols., 2013; Herrera-González, 2015).

– **Estimulación de los procesos inflamatorios en el tumor**

La respuesta inflamatoria es una defensa universal del organismo para reparar daños en tejidos o combatir patógenos, e implica a células del sistema inmunitario innato y adaptativo, para restaurar la homeostasis en el tejido dañado. Sin embargo, a pesar de ser una respuesta natural del organismo, cuando se desregula en o se mantiene de forma inapropiada, puede producir daño, necrosis o inducir la transformación maligna celular. En la actualidad existen numerosas evidencias de la implicación de la respuesta inflamatoria en distintos estadios de la carcinogénesis, como pueden ser la transformación inicial, crecimiento, invasión y metástasis. Muchas de las causas ambientales y factores de riesgo para el desarrollo del cáncer están asociadas a alguna forma de inflamación crónica. De hecho, un estudio reciente ha mostrado que el tabaco no solo es un promotor para el desarrollo del cáncer por el alto contenido en sustancias carcinogénicas, sino también por su capacidad de desencadenar inflamación crónica (Takahashi y cols., 2010). Las células involucradas en este proceso inflamatorio incluyen macrófagos, mastocitos, neutrófilos y linfocitos B y T. Estas células infiltran los tumores y liberan una serie de moléculas que interactúan con las células tumorales y pueden desencadenar la activación de vías de señalización que favorecen la progresión tumoral. Algunas de estas moléculas son quimioquinas, citoquinas, microARNs, factores de crecimiento como EGF, factores de crecimiento angiogénico como VEGF, o enzimas como MMPs que favorecen la degradación de la matriz para los procesos de invasión y metástasis. Además, se ha observado que la respuesta inflamatoria desencadena la formación de radicales libres de oxígeno, que actúan como sustancias mutagénicas favoreciendo la transformación genética de las células tumorales durante la carcinogénesis, llegando incluso a conferirles un mayor grado de malignidad. Todas estas moléculas participan en la formación de un microambiente inflamatorio que propicia la progresión tumoral (Grivennikov y cols., 2010; Hanahan y Weinberg, 2011; Fernandes y cols., 2015).

El conjunto de capacidades de las células tumorales descrito, ha hecho del cáncer una enfermedad de gran diversidad y complejidad, dificultando el desarrollo de terapias antitumorales eficaces. En la actualidad, y según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2015 (World Health Organization, 2017), el cáncer es una de las principales

causas de muerte en el mundo, después de las enfermedades cardiovasculares, los accidentes cerebrovasculares y las infecciones de las vías respiratorias inferiores. En concreto, en 2012 se diagnosticaron 14,1 millones de nuevos casos y se registraron 8.2 millones de muertes por cáncer en el mundo, y se estima que en 2035 se alcanzarán los 24 millones de casos de pacientes con cáncer y las muertes ascenderán a 14 millones. Solo en España se registraron 215.535 casos en 2012 y se estiman 315.413 casos para el año 2035. Además, en el año 2016 se registró que un 27,5% de las muertes fueron debidas al cáncer en España. Por otra parte, se estima que uno de cada dos hombres y una de cada tres mujeres tendrán cáncer a lo largo de su vida. Estos datos reflejan la necesidad de investigar y desarrollar nuevas estrategias de tratamiento que mejoren el pronóstico y la calidad de vida de los pacientes, y que reduzcan estos elevados índices de mortalidad actuales (Ferlay y cols., 2015; Sociedad Española de Oncología Médica, 2018).

1. 3. NICHOS TUMORALES: CÉLULAS TUMORALES Y MICROAMBIENTE TUMORAL

Durante años la biología de un tumor se reducía a un conjunto de células transformadas relativamente homogéneas con capacidades de replicación autónomas. Sin embargo, los estudios realizados en las últimas décadas han puesto de manifiesto que los tumores son más complejos que algunos tejidos sanos y que se desarrollan y mantienen por diversos tipos de células especializadas que conforman el microentorno o microambiente tumoral. En dicho microambiente existe un parénquima de células epiteliales neoplásicas que envuelven a un estroma tumoral formado por distintos tipos celulares, que se van transformando, diferenciando o reclutando durante la progresión tumoral. Los principales tipos son células epiteliales neoplásicas, células madre tumorales (CSCs), células endoteliales, pericitos, células inflamatorias inmunitarias, fibroblastos y células estromales, representadas en la Figura 3 (Hanahan y Weinberg, 2011).

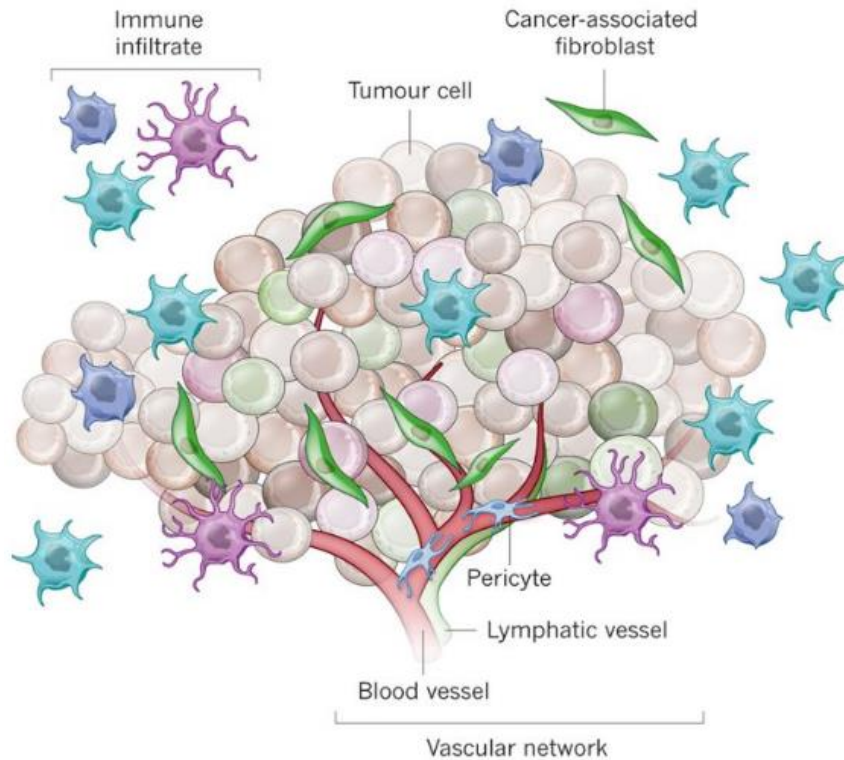


Figura 3: Orígenes e influencia de la heterogeneidad tumoral. El nicho tumoral. La formación de tumores implica la co-evolución de las células neoplásicas junto con la matriz extracelular y las células endoteliales vasculares, estromales e inmunes. El nicho tumoral es una estructura dinámica en la que el soporte estructural, el acceso a los factores de crecimiento, el suministro vascular y las interacciones de las células inmunitarias pueden variar drásticamente. El infiltrado inmune puede incluir múltiples tipos de células, estas poblaciones celulares pueden tener funciones tanto pro como antitumorales y pueden variar en su estado de activación y su localización dentro del tumor. La red vascular puede diferir en relación con el tejido de origen del vaso, la madurez (grado de cobertura del pericito), la presión intersticial y la funcionalidad. Los fibroblastos asociados con cáncer pueden tener una plasticidad significativa y divergir con respecto al estado de activación, la localización dentro del tejido, la respuesta al estrés y el origen (Junttila y Sauvage. Origins and influence of tumour heterogeneity. Recuperado con el permiso de Nature. 2013 Sep 19;501(7467): 346-54) (Junttila y de Sauvage, 2013).

Las CSCs, presentes en todos los tipos de tumores aunque con abundancia variable, poseen la capacidad de autorenovarse y generar otros tipos celulares diferenciados (Hanahan y Weinberg, 2011). No está claro si su origen proviene de las células madre del propio tejido que sufren una transformación oncogénica, o de una dediferenciación de las propias células neoplásicas. No obstante, algunos estudios apuntan a que el proceso de EMT podría ser clave para crear y mantener la población (Morel y cols., 2008; Singh y Settleman, 2010; Hanahan y Weinberg, 2011). Las CSCs poseen mayor resistencia a una gran variedad de tratamientos quimioterápicos convencionales, por lo que su estudio es de gran importancia para el

desarrollo de nuevas terapias oncológicas. De hecho, su persistencia explicaría la recidiva de algunos tumores que aparentemente se han eliminado con éxito mediante cirugía, quimioterapia y /o radioterapia. La hipótesis más extendida es que las CSCs podrían poseer estados de latencia durante años y desarrollar, ante circunstancias variadas, tumores más resistentes y agresivos (Creighton y cols., 2009; Singh y Settleman, 2010; Hanahan y Weinberg, 2011). Además, las CSCs pueden generar distintos tipos de células tumorales con funciones análogas a las células sanas (como células endoteliales que generen una nueva vasculatura atípica) que explicaría la elevada heterogeneidad genética en los tumores (Hanahan y Weinberg, 2011).

Las células endoteliales, implicadas en el proceso de angiogénesis tumoral y también presentes en el microentorno tumoral, presentan marcadores de superficie diferentes a los que presentan las células endoteliales normales (Ruoslahti, 2002; Nagy y cols., 2010). Asociadas a ellas, se encuentran los pericitos, un tipo de células mesenquimales especializadas que envuelven a las células endoteliales para formar las paredes de los vasos sanguíneos y que dan soporte de la neovasculatura tumoral. Se desconoce si la reducción de la población de pericitos puede inducir a la rápida penetración de las células neoplásicas en el sistema circulatorio, favoreciendo la diseminación de estas células para darán lugar a las metástasis tumorales (Bergers y Song, 2005; Pietras y Ostman, 2010; Hanahan y Weinberg, 2011). Por otra parte, las células inflamatorias inmunes están cada vez más aceptadas como componentes del microentorno tumoral y, de hecho, algunas hipótesis apuntan a que la formación de tumores puede estar asociada con la inflamación crónica (Schafer y Werner, 2008; Grivennikov y cols., 2010). Las principales células inflamatorias promotoras de tumores reconocidas son macrófagos, mastocitos y neutrófilos, que han demostrado desempeñar funciones críticas para la carcinogénesis mediante la liberación de moléculas como EGF, VEGF, factores proangiogénicos como FGF2, quimiocinas y citoquinas que amplifican el estado inflamatorio y son las principales fuentes de factores de crecimiento angiogénico, epitelial y estromal, y de enzimas remodeladoras de la matriz extracelular. Por su parte, también se encuentran en este estroma linfocitos T y B que facilitan el reclutamiento y activación de estos tipos celulares. En consecuencia, este conjunto de células inflamatorias inmunes se ha asociado con la inducción de la angiogénesis tumoral, la proliferación de células neoplásicas, la invasión tisular y la diseminación metastásica. Además de estas células inmunitarias, en el estroma tumoral también se encuentran células mieloides parcialmente diferenciadas cuya principal función parece ser la evasión de la destrucción del tumor por el sistema inmune al suprimir la actividad de las células NK y linfocitos T citotóxicos (Johansson y cols., 2008; DeNardo y cols., 2010; Hanahan y Weinberg, 2011).

Los fibroblastos y las células estromales también forman parte de la población celular presente en el microentorno tumoral. Por una parte, se distinguen dos tipos de fibroblastos, las células reprogramadas a partir de los fibroblastos que crean el soporte de los tejidos sanos, y los miofibroblastos, que son poco frecuentes en tejidos sanos y se han asociado a problemas de inflamación crónica y la fibrosis patológica en tejidos como pulmones, riñones e hígado. Estos fibroblastos parecen estar implicados en varios procesos en el desarrollo de los tumores y su progresión, destacando la síntesis de una gran variedad de componentes de la matriz extracelular característica de los estromas tumorales (Hanahan y Weinberg, 2011). Por otra parte, los diferentes tipos de células estromales componen la base del microambiente celular, aunque se desconoce si el tumor se abastece de este tipo de celular a partir de células estromales de los tejidos sanos adyacentes o de células reclutadas de la médula ósea, como ocurre con los pericitos o algunos fibroblastos asociados con cáncer (Bergfeld y DeClerck, 2010; Fang y Salven, 2011; Hanahan y Weinberg, 2011).

Todos estos tipos celulares que componen el microentorno celular presentan complejas interacciones mediante diversos tipos de moléculas de señalización que contribuyen de distintas formas en la carcinogénesis, crecimiento del tumor y posterior diseminación en forma de metástasis tumorales, además de evadir el reconocimiento y destrucción por el sistema inmune. Sin embargo, estas interacciones no son estáticas, sino que van variando durante la progresión tumoral. Así, en un tumor incipiente, se inician interacciones entre las células transformadas y las células estromales para ensamblar el estroma tumoral inicial, de forma que estas interacciones se vuelven más complejas e implican a más tipos celulares a medida que el cáncer va progresando (Hanahan y Weinberg, 2011).

2. CÁNCER DE PULMÓN

2. 1. INCIDENCIA, MORTALIDAD Y SUPERVIVENCIA

La incidencia y mortalidad del cáncer de pulmón se ha incrementado significativamente desde 1930 debido al aumento del consumo de tabaco, siendo actualmente la principal muerte por cáncer en el mundo. En 2012 fue el tipo de cáncer más frecuente con 1.8 millones de nuevos casos diagnosticados en el mundo, lo que supone un 13% de los tumores diagnosticados, seguido del cáncer de mama (1.7 millones de nuevos casos) y del cáncer colorrectal (1.4 millones de nuevos casos) (Figura 4). El cáncer de pulmón fue el más frecuente en varones en 2012, y el tercero con mayor incidencia en mujeres, después del cáncer de mama y colorrectal. Más concretamente en España, se estima que en 2017 fue el segundo tipo de cáncer más incidente en la población en varones, después del cáncer de próstata, y el cuarto en mujeres, después del cáncer de mama, colorrectal y útero (Ferlay y cols., 2015; Sociedad Española de Oncología Médica, 2018).



Figura 4: Incidencia de los tumores más frecuentes a nivel mundial en el año 2012 (Sociedad Española de Oncología Médica, 2018).

Además, el cáncer de pulmón es el tipo de cáncer con mayor índice de mortalidad registrado con 1.6 millones de muertes en 2012 (Figura 5). En Europa sigue siendo la principal causa de muerte por cáncer donde se registró una tasa de 33,3 defunciones por cada 100.000 habitantes varones y de 14,6/100.000 en mujeres en el año 2017. Solo en España, el cáncer de pulmón fue responsable de 22.187 muertes en 2016, y sigue siendo el que tiene una mayor tasa de mortalidad en varones, siendo el tercero en mujeres, después del cáncer de mama y colorrectal (Ferlay y cols., 2015; Sociedad Española de Oncología Médica, 2018). Por otra parte, la supervivencia a 5 años en pacientes de cáncer de pulmón es de un 18,1%, aunque puede aumentar hasta un 55,6% cuando no se ha desarrollado metástasis y el tumor está localizado. Cuando existe metástasis, la supervivencia a 5 años se reduce a un 4,5% y se estima que la mitad de los pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón mueren en menos

de un año, debido principalmente al diagnóstico tardío de este tipo de cáncer (Howlader, 2017).

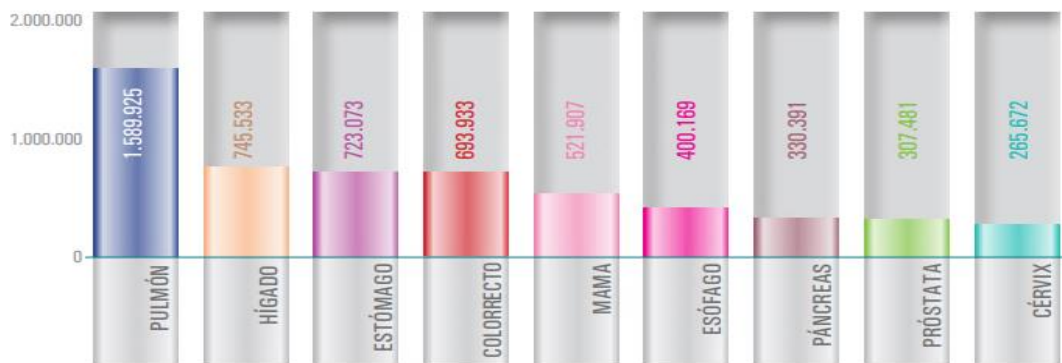


Figura 5: Mortalidad de los tumores más frecuentes a nivel mundial en el año 2012 (Sociedad Española de Oncología Médica, 2018).

2. 2. ETIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO

El factor etiológico más importante en el desarrollo del cáncer de pulmón es el consumo de **tabaco**, que contiene más de 60 sustancias carcinogénicas. Entre estas sustancias se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos o las nitrosaminas que han demostrado tener un efecto mutagénico sobre genes como p53, uno de los principales genes implicados en la carcinogénesis. Asimismo, los radicales libres presentes en el tabaco provocan daños oxidativos en el ADN de las células del epitelio bronquial que también favorece la carcinogénesis. En Estados Unidos se estima que el tabaco es responsable del cáncer de pulmón en el 90% de los hombres y del 75-80% de las mujeres (Sato y cols., 2007; Ridge y cols., 2013). En las mujeres, el tabaco ha duplicado el número de defunciones por cáncer de pulmón entre los años 2003 y 2012 (Sociedad Española de Oncología Médica, 2018). Concretamente, se ha observado que el consumo continuado de tabaco incrementa entre 9 y 10 veces la probabilidad de desarrollar un cáncer de pulmón frente a una persona no fumadora, aunque varía en función de la frecuencia y la cantidad consumida. En el caso de los ex fumadores el riesgo va disminuyendo con los años (80% a los 15 años). Sin embargo, el tabaco no solo afecta a los fumadores, sino también a los fumadores pasivos, cuyo riesgo de padecer cáncer de pulmón asciende hasta un 20-30% (Ridge y cols., 2013; Malhotra y cols., 2016; Schwartz y Cote, 2016).

El **radón, asbestos o radiaciones ionizantes** son otros de los factores de riesgo más importantes en el cáncer de pulmón. Se hecho, el **radón** se considera el segundo factor etiológico más importante de esta patología. Este gas inerte e inodoro que se produce por la descomposición del uranio y el radio presente en el suelo y las rocas y fue identificado como factor etiológico en los años 20 por el incremento en la incidencia de esta patología en

mineros. Este compuesto tiende a acumularse en el interior de los edificios y se considera el potencial contaminante ambiental en el interior de las viviendas. Su principal exposición es mediante inhalación y las partículas α que emiten tienen el potencial de dañar el epitelio pulmonar. Además, se ha observado que tiene un efecto sinérgico con el tabaco, aumentando el riesgo de padecer cáncer de pulmón de los fumadores 25 veces (Darby 2005, Darby, Hill et al. 2005). En cuanto a los **asbestos** o también conocidos como amianto, son silicatos de naturaleza fibrosa que se usaban frecuentemente en las industrias de construcción, y debido a su asociación con el desarrollo de cáncer de pulmón y mesotelioma, se ha reducido su uso notablemente en los últimos años. Estos minerales también han mostrado un efecto sinérgico sobre el riesgo de padecer cáncer de pulmón en las personas fumadoras (Ridge, McErlean et al. 2013, American Cancer Society 2016). Por último, las **radiaciones ionizantes** también pueden incrementar el riesgo de desarrollar cáncer, como se ha observado en estudios de los supervivientes de las bombas atómicas de Hiroshima y Nagasaki. Sin embargo, las dosis recibidas durante las radiografías de rayos X o las tomografías computarizadas se consideran de bajo riesgo para los beneficios que aportan en el campo de la medicina (Schwartz and Cote 2016).

Las **contaminaciones medioambientales** podrían ser uno de los principales factores etiológicos del cáncer, estimándose en un 5%, las muertes por cáncer de pulmón originadas por este factor y especialmente por productos derivados de la gasolina o del combustible diésel. También se ha observado que la exposición a minerales radiactivos, a compuestos como arsénicos, cadmio, níquel o plomo, entre otros, pueden incrementar los riesgos de padecer cáncer de pulmón (Ridge, McErlean et al. 2013, American Cancer Society 2016).

Los **factores genéticos** han sido identificados como posibles factores etiológicos del cáncer de pulmón. Estudios de asociación de genoma completo ha identificado varios loci de susceptibilidad asociados a esta patología, especialmente los relacionados con receptores de nicotina, que podrían aumentar la vulnerabilidad a la adicción del tabaco, y con la transcriptasa reversa de la telomerasa, responsable de la actividad enzimática de la telomerasa. Estos polimorfismos apuntan a una susceptibilidad genética al cáncer, lo que podría explicar por qué solo un 15% de las personas fumadoras desarrollan cáncer de pulmón a pesar de los carcinógenos que contiene el tabaco (Malhotra y cols., 2016; Schwartz y Cote, 2016). Además, un historial familiar positivo de cáncer de pulmón aumenta el riesgo de aparición temprana de este tipo de cáncer, así como un historial de familiares afectados por el síndrome de Li-Fraumeni, una enfermedad hereditaria dominante asociada a mutaciones en el gen p53 que aumenta la probabilidad de los afectados de desarrollar algún tipo de cáncer (Malkin y cols., 1990; Malhotra y cols., 2016).

Finalmente, existen otros factores de menor importancia en relación al cáncer de pulmón como son los **factores hormonales**, las **infecciones** por *Mycobacterium tuberculosis*, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o virus del papiloma humano (VPH), y por enfermedades crónicas la **enfermedad pulmonar obstructiva crónica**, que aumenta el riesgo del cáncer del pulmón entre 2 y 3 veces, independientemente del consumo de tabaco (Chaturvedi y cols., 2007; Turner y cols., 2007; Schwartz y Cote, 2016). Además, los pacientes que se someten a **resección quirúrgica** de un cáncer de pulmón presentan un mayor riesgo en los años sucesivos de desarrollar otros tumores pulmonares, siendo una causa frecuente de muerte en los pacientes de cáncer de pulmón (Johnson, 1998; Ridge y cols., 2013).

2. 3. CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE PULMÓN

El cáncer de pulmón puede clasificarse en base a sus características histológicas o en base un criterio de estadificación, siendo el más universal el sistema TNM establecido por *American Joint Committee on Cancer* (AJCC).

2. 3. 1. Clasificación histológica del cáncer de pulmón

La Organización Mundial de la Salud ha establecido dos tipos principales de cáncer de pulmón según sus características histológicas, su curso clínico y su respuesta al tratamiento: el cáncer de pulmón de células pequeñas o microcítico (CPCP) y el cáncer de pulmón de células no pequeñas o no microcítico (CPCNP). Además, existen otros tipos de tumores de pulmón que representan menos de un 5% de los casos, siendo el más frecuente de este grupo los tumores carcinoides de pulmón.

✓ CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS PEQUEÑAS O MICROCÍTICO

El CPCP representa entre el 10-15% de los casos diagnosticados de cáncer de pulmón y el 95% de los casos están asociados principalmente al consumo de tabaco. Las células que generan este tipo de tumores son pequeñas, con límites celulares poco definidos, escaso citoplasma y cromatina granular sin nucléolos visibles. Asimismo, son tumores altamente indiferenciados y que se caracterizan por presentar marcadores de diferenciación neuroendocrina en la mayoría de los casos, siendo categorizado como un tipo de carcinoma neuroendocrino de alto grado. Este tipo cáncer es el más agresivo debido a su rápida diseminación en estadios precoces y a la elevada tasa de proliferación de estas células. El desarrollo de este tipo de neoplasias es responsable del síndrome de la vena cava superior en muchos casos. Además, en el momento del diagnóstico suelen existir metástasis extrapulmonares, localizándose más frecuentemente en hígado, huesos, ganglios linfáticos, sistema nervioso central, glándulas suprarrenales, tejido subcutáneo o pleura, y se estima que

un 50% de los casos presentarán metástasis en el cerebro. A pesar de presentar mayor sensibilidad a la quimioterapia que los tumores de células no pequeñas, son frecuentes las recidivas con mayor resistencia a la quimioterapia, lo que reduce la supervivencia general a los 5 años a un 5-10% (Zakowski, 2003; Sher y cols., 2008; Instituto Nacional del Cáncer, 2018; Kalemkerian y cols., 2018).

✓ CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS O NO MICROCÍTICO

El CPCNP engloba un grupo heterogéneo de tumores y representa el 80-85% de los casos diagnosticados de cáncer de pulmón. Este tipo de tumores son más resistentes a la quimioterapia y radioterapia, en comparación con los CPCP, pero se considera menos agresivo por presentar una menor tasa de proliferación y una diseminación más tardía. Sin embargo, a pesar de ser menos agresivo, se estima que el 70% de los pacientes presentan tumores localmente avanzados o metástasis en otros órganos en el momento del diagnóstico (Molina y cols., 2008; Instituto Nacional del Cáncer, 2018). Dentro de este grupo se diferencian los siguientes subtipos:

○ *Carcinoma de células escamosas o epidermoide*

Este grupo comprende el 25-30% de los casos de cáncer de pulmón y está muy vinculado al consumo de tabaco, motivo por el cual se ha visto reducida la incidencia de este tipo de tumores debido al menor consumo de tabaco reflejado en los últimos años. Suele localizarse en la zona central de los pulmones ya que se originan a partir de células escamosas que recubren el interior de los bronquios. Este tipo de tumores suelen formar masas sólidas y se diseminan menos frecuentemente que los adenocarcinomas. (Moldvay y cols., 2004; Su y cols., 2010; Larráyo, 2011; Zappa y Mousa, 2016; Instituto Nacional del Cáncer, 2018).

○ *Adenocarcinoma*

Es el tipo más frecuente de tumores, aproximadamente el 40% de los casos, y es el más común entre las mujeres no fumadoras. Se origina en el epitelio alveolar o en las glándulas de la submucosa por lo que se sitúa en las áreas externas del pulmón y en el revestimiento de las vías respiratorias (Larráyo, 2011; American Cancer Society, 2016). Según el patrón histológico, se distinguen cinco subtipos predominantes, aunque es frecuente encontrar un patrón mixto. La clasificación más reciente de este tipo de tumores hace una distinción entre tres tipos principales: el adenocarcinoma *in situ* (AIS), adenocarcinoma mínimamente invasivo (MIA) o adenocarcinoma invasivo (IMA). El primer tipo se caracteriza por tener un tamaño de 3 cm o menos, con un patrón de crecimiento lepidico (entendiéndose por crecimiento lepidico la proliferación de células

neoplásicas revistiendo la superficie de las paredes alveolares) y sin características invasivas. Se estima que, tras la resección quirúrgica de este tipo de tumores, la supervivencia libre de enfermedad ronda el 100%. El segundo tipo, MIA, se caracteriza por un tamaño pequeño (< 3 cm), con un patrón de crecimiento predominantemente lepidico, y un pequeño foco invasivo (< 5mm). Finalmente, el tercer tipo es el más frecuente, entre el 70-90% de los casos, y presentan un patrón histológico mixto (Travis y cols., 2011; Fonfria Esparcia y cols., 2012; Zugazagoitia y cols., 2014). En general, el 20% de los pacientes con este tipo de tumores presentan metástasis distantes en el momento del diagnóstico, siendo los tejidos diseminados más frecuentes el cerebro, los huesos, la glándula adrenal y el hígado (Moldvay y cols., 2004; Larráyo, 2011; Zappa y Mousa, 2016).

○ ***Carcinoma de células grandes***

Es el tipo tumoral con menor incidencia dentro de los CPCNP, representando un 10-15% de los casos. Es el tipo con mayor grado de indiferenciación, con células grandes de abundante citoplasma y con un rápido crecimiento y diseminación, similar a los tumores CPCP. Se puede localizar en cualquier región del tejido pulmonar lo que suele dificultar el tratamiento (Larráyo, 2011; American Cancer Society, 2016; Zappa y Mousa, 2016).

2. 3. 2. *Estadificación del cáncer de pulmón. Clasificación TNM*

En la actualidad, el estadio del cáncer de pulmón se determina siguiendo el sistema TNM, donde T hace referencia al tamaño del tumor, N a la presencia o ausencia de metástasis ganglionares regionales y M a la presencia o ausencia de metástasis distantes (Tabla 1).

Tabla 1: Clasificación TNM del cáncer de pulmón (Amin y cols., 2017; Rami-Porta y cols., 2017).

Categoría	División	Características		
T (tamaño del tumor)	TX	Citología positiva, no es posible medirlo o hallarlo.		
	T0	Sin evidencias de tumor primario.		
	Tis	Carcinoma <i>in situ</i> . Carcinoma de células escamosas <i>in situ</i> (SCIS). Adenocarcinoma <i>in situ</i> (AIS)		
	T1	Tumor de ≤ 3 cm de máxima dimensión, rodeado de pleura pulmonar o visceral, sin evidencia de invasión en el bronquio principal.		
		Subdivisión	T1i	Adenocarcinoma mínimamente invasivo
			T1a	Tumor ≤ 1 cm de máxima extensión. Se incluyen en esta subdivisión los tumores superficiales diseminados de cualquier tamaño, cuya invasión se limita a la pared bronquial y puede extenderse próximo al bronquio principal, aunque son infrecuentes.
			T1b	Tumor > 1 cm y ≤ 2 cm de máxima extensión
	T1c		Tumor > 2 cm y ≤ 3 cm de máxima extensión	
	T2	Tumor de > 3 cm y ≤ 5 cm y que presente alguna de estas características: invasión del bronquio principal y de la pleura visceral, asociado con atelectasia o neumonitis obstructiva.		
		Subdivisión	T2a	Tumor > 3 cm y ≤ 4 cm de máxima extensión
	T2b		Tumor > 4 cm y ≤ 5 cm de máxima extensión	
T3	Tumor de > 5 cm y ≤ 7 cm y que esté invadiendo alguna de las siguientes regiones: pleura parietal, pared torácica, nervio frénico o pericardio. Nódulo/s tumorales separados en el mismo lóbulo.			
T4	Tumor de > 7 cm y que presente invasión en una o más de las siguientes regiones: diafragma, cavidad mediastínica, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio laríngeo recurrente, esófago, vértebras o carina. Nódulo/s tumorales separados en diferentes lóbulos ipsilaterales.			

N (afectación ganglios linfáticos)	NX	Los nódulos linfáticos regionales no pueden ser evaluados.		
	N0	No existen metástasis en los nódulos linfáticos regionales.		
	N1	Metástasis de nódulos peribronquiales y/o hilares ipsilaterales, y de los intrapulmonares ipsilaterales, incluyendo por extensión directa del tumor.		
	N2	Metástasis en nódulos mediastínicos ipsilaterales y/o los subcarinales.		
	N3	Metástasis en nódulos mediastínicos y/o hilares contralaterales, en los escalenos ipsilaterales o contralaterales o en los supraclaviculares.		
M (metástasis)	MX	Las metástasis distantes no pueden ser evaluadas.		
	M0	No existen metástasis distantes.		
	M1	Subdivisión	M1a	Metástasis distante en nódulo/s tumorales separados en un lóbulo contralateral, en nódulos pleurales. Derrame pleural maligno o derrame pericárdico.
			M1b	Metástasis distante en un solo órgano, incluyendo un solo nódulo no regional.
M1c			Metástasis distante en un solo órgano o en múltiples órganos.	

Este sistema permite establecer una clasificación en cuatro estadios principales en función del tamaño e invasión de los tejidos vecinos, invasión ganglionar o diseminación del tumoral. De esta forma, los estadios más bajos y con mejor pronóstico serían 0 y IA, en los cuales el tamaño del tumor es inferior a 2 cm y no existen ganglios afectados ni metástasis, y el estadio más alto y con peor pronóstico sería IV, con tumores de cualquier tamaño, ganglios afectados y metástasis distantes (Tabla 2).

Tabla 2: Clasificación del cáncer de pulmón por estadios siguiendo el sistema TNM (Amin y cols., 2017; Rami-Porta y cols., 2017).

Estadio	T	N	M
Carcinoma oculto	TX	N0	M0
0	Tumor in situ (Tis)	N0	M0
IA1	T1mi, T1a	N0	M0
IA2	T1b	N0	M0
IA3	T1c	N0	M0
IB	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0
IIB	T1a, T1b, T1c	N1	M0
	T2a, T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T1a, T1b, T1c	N2	M0
	T2a, T2b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0, N1	M0
IIIB	T1a, T1b, T1c	N3	M0
	T2a, T2b	N3	M0
	T3	N2	M0
	T4	N2	M0
IIIC	T3	N3	M0
	T4	N3	M0
IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a, M1b
IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1c

Por otra parte, algunas de las principales pruebas diagnósticas que permiten la detección del cáncer y el establecimiento del estadio del cáncer de pulmón son la radiografía de tórax, la tomografía computarizada y la tomografía por emisión de positrones (PET) (Figura 6) (Gridelli y cols., 2015).

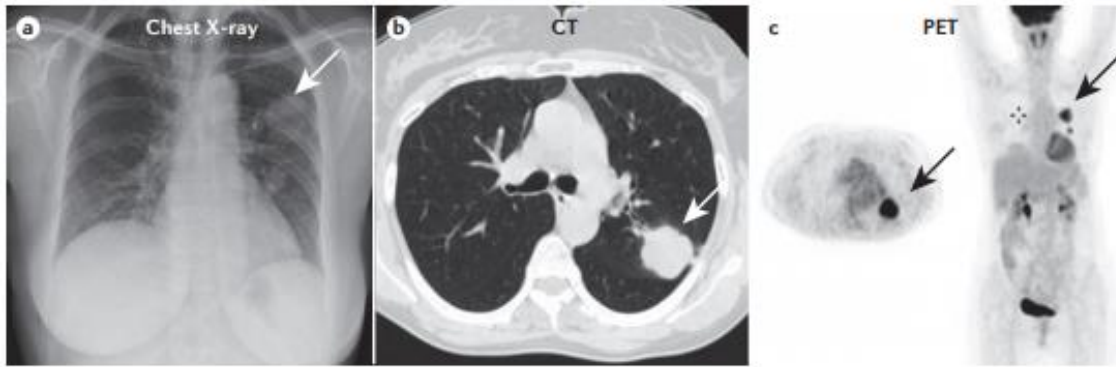


Figura 6: Diagnóstico del cáncer de pulmón. Cáncer pulmón detectado mediante radiografía de tórax (a), tomografía computarizada (b) y PET (c) mostrando el tumor de pulmón (flechas) (Gridelli y cols. *Diagnosis of lung cancer. Recuperado con el permiso de Nat Rev Dis Primers. 2015 May 21;1:15009*) (Gridelli y cols., 2015).

2. 4. TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PULMÓN

2. 4. 1. Cáncer de pulmón de células pequeñas o microcítico

El tratamiento del CPCP se aborda de forma diferente en función del estadio, distinguiendo entre estadio limitado, que engloba a los tumores en estadio I-III con cualquier T, cualquier N y M0 (a excepción de los tumores T3-4 con múltiples nódulos afectados y que no pueda abarcarse toda el área afectada mediante radioterapia), y estadio extendido o diseminado, que engloba a los tumores en estadio IV y los casos anteriormente mencionados del estadio III (Kalemkerian y cols., 2018). Sin embargo, en ambos casos se recomienda a los pacientes que abandonen el consumo de tabaco puesto que puede incrementar la toxicidad de los tratamientos y acortar la supervivencia (Videtic y cols., 2003).

– ESTADIO LIMITADO

Una vez diagnosticado y clasificado el estadio del paciente, aquellos con en estadio limitado con T1-2 y N0 se someten a una evaluación de la afectación de los ganglios linfáticos mediastínicos. A aquellos pacientes que no presentan adenopatías en los ganglios mediastínicos se les recomienda la resección quirúrgica, preferentemente mediante lobectomía, y a la disección o muestreo de nódulos linfáticos mediastínicos. Estos nódulos son evaluados tras la cirugía y, en el caso de no presentar anomalías, estos pacientes se someten a quimioterapia adyuvante (Kalemkerian y cols., 2018). Este grupo de pacientes son los que presentan un pronóstico más favorable, con una supervivencia a los 5 años del 50%. Sin embargo, el CPCP en estadio I es diagnosticado solo en el 5% de los casos, y solo para el 2-5% de los estos casos será apropiada la resección quirúrgica (Fruh y cols., 2013; Kalemkerian y cols., 2018). Por otra parte, si se detectan anomalías en los nódulos

INTRODUCCIÓN

mediastínicos, el tratamiento recomendado es la quimioterapia concurrente (o quimiorradiación), con radiación torácica en este caso, en combinación con radioterapia (RT) en los ganglios afectados. El resto de casos de CPCP en estadio limitado en los que no se recomienda la cirugía, se someterán a un tratamiento u otro en función de su estado funcional (EF), distinguiendo buen EF (0-2), mal EF (3-4) a consecuencia del CPCP y mal EF con independencia del cáncer (Kalemkerian y cols., 2018).

Los tratamientos quimioterápicos más recomendados, como primera opción terapéutica o como terapia adyuvante, son combinaciones de cisplatino o carboplatino con etopósido repartidos en 4-6 ciclos. En el caso de quimioterapia administrada junto o a la vez que la RT, se recomienda la opción de cisplatino/etopósido, que es la más utilizada (Evans y cols., 1985; Kalemkerian y cols., 2018).

Por otra parte, la RT ha demostrado mejorar las ratios de supervivencia de los pacientes en estadio limitado (Warde y Payne, 1992). Diferentes ensayos clínicos apuntan a que la mejor combinación es administrar la RT tras el primer o segundo ciclo de quimioterapia, siempre que sea posible la administración concurrente (Murray y cols., 1993). El programa más recomendado de RT son dosis de 1.5 Gy dos veces al día hasta un total de 45 Gy durante 3 semanas (Kalemkerian y cols., 2018).

– ESTADIO AVANZADO

Los pacientes con estadio avanzado pueden clasificarse en estadio avanzado sin metástasis cerebral ni en sitios sintomáticos localizados, estadio avanzado con sitios sintomáticos localizados, y estadio avanzado con metástasis cerebral. En el primer caso, la terapia más recomendada es la combinación de quimioterapia con cuidados de apoyo. En el segundo caso, que incluye a aquellos pacientes con el síndrome de la vena cava, metástasis óseas o compresión de la médula espinal, el tratamiento recomendado es la quimioterapia, en combinación con radioterapia en los sitios sintomáticos. Por último, en el tercer caso, si la metástasis cerebral es asintomática, se recomienda la aplicación de quimioterapia con posterior radioterapia total cerebral, mientras que en caso de ser sintomáticas podría aplicarse primero la radioterapia y posteriormente la quimioterapia (Kalemkerian y cols., 2018). Desafortunadamente, aunque los tratamientos pueden ayudar a paliar síntomas y a prolongar la supervivencia de muchos pacientes con estadio avanzado, la supervivencia a largo plazo es infrecuente (Demedts y cols., 2010).

Los tratamientos quimioterápicos más aplicados para pacientes con estadio avanzado son combinaciones de carboplatino o cisplatino con etopósido o irinotecan, repartidos en 4-6 ciclos.

La radioterapia torácica en este caso está recomendada para pacientes que presenten respuesta al tratamiento quimioterápico, y su aplicación en estos casos ha mostrado una pequeña mejora en la supervivencia de algunos pacientes (Slotman y cols., 2015). En el caso de aplicación de radioterapia localizada en sitios sintomáticos, la dosis depende del tamaño del tumor y de su localización. Finalmente, en el caso de la radioterapia total del cerebro la dosis recomendada son 30 Gy en 10 fracciones diarias (Kalemkerian y cols., 2018).

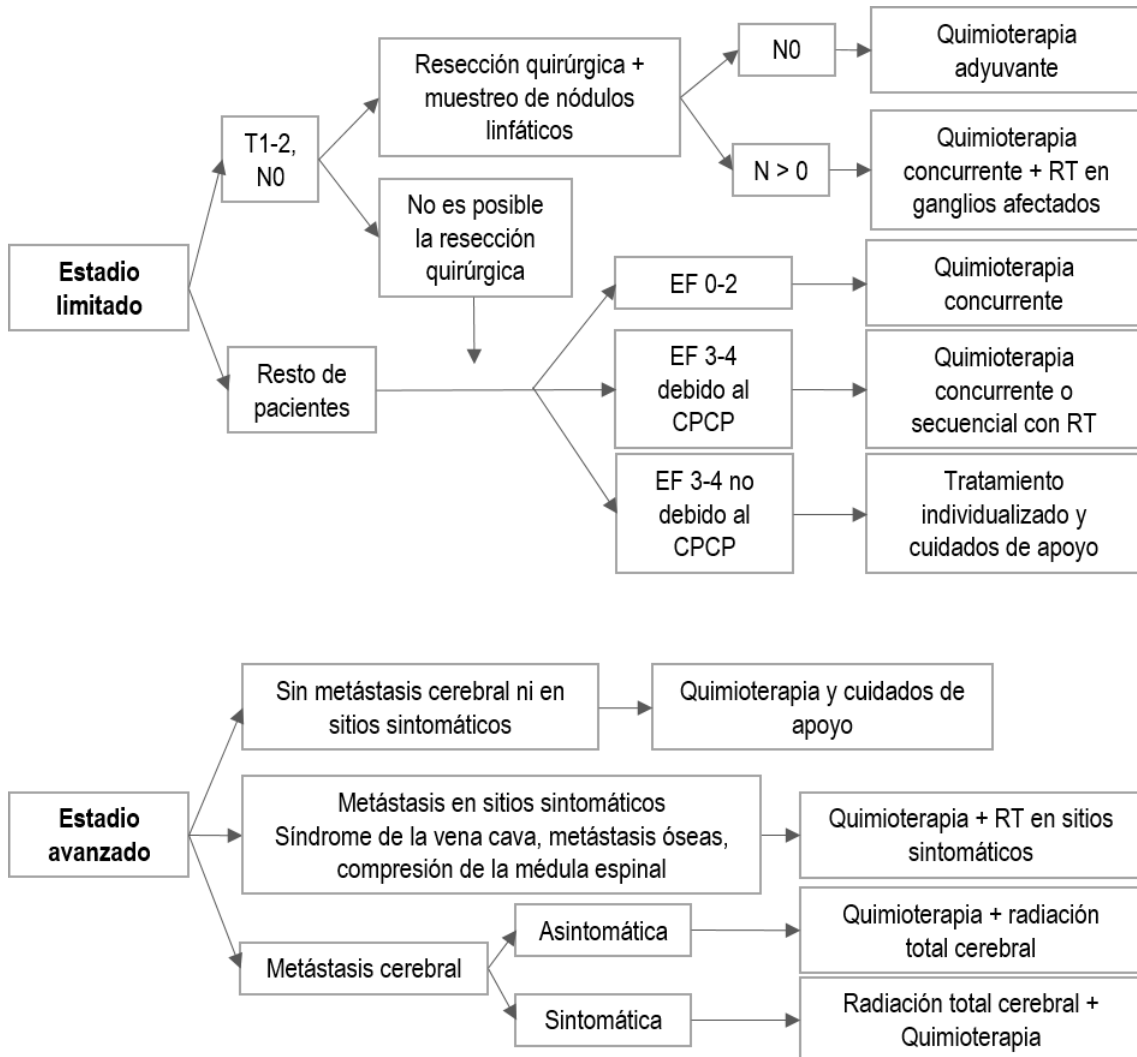


Figura 7: Tratamiento del CPCP en estadio limitado o avanzado.

Una vez finalizado el tratamiento inicial del CPCP, sea cual sea el estadio de partida, se recomienda realizar una tomografía computarizada con contraste del tórax, hígado y glándulas adrenales, junto a una resonancia magnética o tomografía del cerebro para evaluar la respuesta de los pacientes, ya que se estima que más del 50% de los pacientes con CPCP desarrollarán metástasis intracraneales (Kalemkerian y cols., 2018). En el caso de respuesta parcial o completa al tratamiento inicial, se recomienda realizar irradiación craneal profiláctica para disminuir la incidencia de metástasis cerebrales, ya que se ha visto su

aplicación mejora la supervivencia de los pacientes con CPCP (Arriagada y cols., 1995). La dosis preferida son 25 Gy en 10 fracciones diarias. Este tratamiento no está indicado para pacientes con un mal EF o con alteración del funcionamiento neurocognitivo (Kalemkerian y cols., 2018).

En pacientes en estadio limitado las ratios de respuesta iniciales esperadas son de un 70-90% tras un tratamiento quimioterápico combinado con radioterapia torácica, mientras que en un estadio avanzado de un 60 a un 70%, por lo que este tipo de tumores se consideran buenos respondedores a la quimioterapia inicial. Sin embargo, la supervivencia media se estima entre 14 y 20 meses y de 9 a 11 meses en estadio limitado y avanzado, respectivamente. Esto se debe a la posterior recidiva que sitúa la supervivencia a los dos años en un 40% en estadio limitado y solo en un 5% en estadio avanzado (Chute y cols., 1999; Kalemkerian y cols., 2018). Esta incapacidad de eliminar las células cancerígenas residuales tras la quimioterapia sugiere la existencia de células madre cancerígenas con una mayor resistencia al tratamiento citotóxico. Los pacientes que desarrollan recidiva tienen una media de supervivencia de 4 a 5 meses, aunque tiene una fuerte dependencia con el tiempo transcurrido entre la terapia inicial y la reaparición del cáncer. Si este intervalo es menor a 3 meses, la respuesta a la terapia de segunda línea es de menos de un 10%. Si el intervalo es superior a 3 meses, la respuesta esperada es de un 25% (Owonikoko y cols., 2012; Kalemkerian y cols., 2018). En estos casos, los tratamientos de segunda línea recomendados incluyen topotecan, irinotecan, PTX, docetaxel, temozolamida, nivolumab (en combinación o no con ipilimumab), vinorelbina, etopósido oral, gemcitabina o una combinación de ciclofosfamida, doxorubicina (DOX) y vincristina (Cheng y cols., 2007; Kalemkerian y cols., 2018). También en algunos casos se recomienda la participación en ensayos clínicos. Por último, cuando el intervalo es superior a 6 meses se recomienda volver a aplicar la terapia inicial (Kalemkerian y cols., 2018).

2. 4. 2. Cáncer de pulmón de células no pequeñas o no microcítico

La elección del tratamiento de los tumores CPCNP requiere de una evaluación patológica y una estadificación precisa, dado que esta elección varía en función del estadio, los estudios histológicos, la presencia de alteraciones genéticas y el EF del paciente. Además, la participación en ensayos clínicos también puede ser una opción recomendada de tratamiento en casos concretos. En cualquier caso, el abandono del consumo de tabaco está recomendado en todos los pacientes diagnosticados con CPCNP, como ocurre con los pacientes con CPCP (Ettinger y cols., 2018).

– ESTADIO I Y IIA

Los pacientes en estadios I o el subconjunto (T1-2, N1) del estadio II suelen seleccionarse para tratamiento por resección quirúrgica. El procedimiento quirúrgico usado dependerá de la extensión de la enfermedad y de la reserva cardiopulmonar del paciente. El procedimiento suele ser preferentemente lobectomía, siempre que sea anatómicamente posible y se pueda conseguir una resección completa del tumor; en caso contrario, se procede a la disección del pulmón completo. Conjuntamente, durante estos procedimientos quirúrgicos se recomienda la extracción de varios nódulos linfáticos para su posterior evaluación patológica, ya que en caso de detectar anomalías en nódulos mediastínicos (N2) se debe modificar el tratamiento posterior y reevaluarse el estadio del paciente. Tras la cirugía, si la resección ha sido completa, se recomienda observación, salvo en el caso de pacientes de alto riesgo, a los que se les recomienda quimioterapia adyuvante. Si la resección no ha sido completa, se recomienda preferentemente volver a realizar la cirugía o aplicación de RT. Concretamente, en tumores en estadio IIA sin resección completa, ambas opciones se recomiendan en combinación con quimioterapia (Howington y cols., 2013; Ettinger y cols., 2018). Por otra parte, aquellos pacientes que presenten tumores médicamente irresecables o tengan un alto riesgo de complicaciones, suelen tratarse con radioterapia estereotáctica ablativa (SABR), un tipo de tratamiento con una dosis muy alta de radiación aplicada en un volumen pequeño del tumor, y se puede considerar la combinación con quimioterapia. La técnica SABR es tan precisa que apenas daña las células sanas, de forma que se reducen en gran medida los efectos secundarios. En estudios clínicos se ha observado que la aplicación de SABR ha incrementado la supervivencia hasta el 60% a los tres años en pacientes en estadio I con tumores médicamente inoperables, frente al 20-35% obtenida con un tratamiento convencional con RT (Timmerman y cols., 2010; Ettinger y cols., 2018).

La quimioterapia para terapias neoadyuvantes o adyuvantes, recomendada en tumores CPCNP, se basa en combinaciones de cisplatino con vinorelbina, etopósido, gemcitabina, docetaxel o pemetrexed. En caso de pacientes que no toleren bien el cisplatino, se utilizan combinaciones de carboplatino con PTX, gemcitabina o pemetrexed. Estas combinaciones se pueden aplicar cuando se indica un tratamiento quimioterápico secuencial con RT. En cambio, en los tratamientos quimioterápicos concurrentes con RT, se recomiendan las combinaciones de cisplatino con etopósido, vinblastina o pemetrexed, o de carboplatino con PTX o pemetrexed. Finalmente, las dosis de tratamiento por RT utilizadas más habitualmente, suelen oscilar entre 45-54 Gy durante 5 semanas y entre 60-70 Gy durante 6-7 semanas, según si se aplica antes o después de la resección quirúrgica, respectivamente (Ettinger y cols., 2018).

INTRODUCCIÓN

✓ ESTADIO IIB Y III

Los pacientes en estadio clínico IIB (T3, N0) y IIIA tienen diferentes opciones de tratamiento y se recomienda una evaluación multidisciplinar en cada caso. A groso modo, cuando los tumores son quirúrgicamente resecables, se suele recomendar un pretratamiento quimioterápico concurrente o quimioterapia neoadyuvante antes de la cirugía. Este pretratamiento unido a la resección quirúrgica ha mostrado una supervivencia a los dos años del 50-70% y a los 5 años del 40% en el caso de tumores ubicados en el surco superior (Rusch y cols., 2007). Tras la cirugía, si la resección ha sido completa se recomienda la quimioterapia y la quimioterapia secuencial con RT, para cada estadio respectivamente. Si la resección no ha sido completa, para pacientes en estadio IIB se recomienda de nuevo la cirugía combinada con quimioterapia, mientras que para pacientes en estadio IIIA se recomienda la quimiorradiación (Ettinger y cols., 2018). En el caso de los tumores irresecables, el tratamiento recomendado es la quimioterapia concurrente, salvo en aquellos casos en los que no se observe respuesta tras dos o más ciclos, en cuyo caso se ha consolidado un tratamiento posterior con durvalumab en dosis de 10 mg/Kg cada dos semanas hasta los doce meses. Este anticuerpo inhibidor de PD-L1, un receptor implicado en supresión del sistema inmunitario en las células cancerígenas, es el primer tratamiento inmunoterápico aprobado por la FDA para pacientes con CPCNP en estadio III con tumores irresecables, tras los resultados de un ensayo clínico que mostró una mejora en la supervivencia libre de progresión de 11,6 meses frente a un placebo. Tras este estudio, durvalumab se ha consolidado como tratamiento en pacientes con tumores irresecables en estadio III que no responden a la quimioterapia concurrente basada en cisplatino o carboplatino (Antonia y cols., 2017; Ettinger y cols., 2018). En el caso de los pacientes en estadios IIIB y IIIC, no se les recomienda la resección quirúrgica, por lo que se les considera irresecables y el tratamiento es el indicado para estos tipos de tumores. Los tratamientos de quimioterapia y RT recomendados son los mismos que para los pacientes en estadio I y IIA (Ettinger y cols., 2018).

✓ ESTADIO IV

Actualmente, la mayoría de los pacientes con CPCNP presentan metástasis en el momento del diagnóstico. Estos pacientes en estadio IV se diferencian según presenten un único sitio de metástasis o múltiples. En el primer caso, cuando se trata de una metástasis cerebral, se recomienda la aplicación de SABR en el cerebro o, en caso de ser una metástasis sintomática, resección quirúrgica combinada con SABR o radicación total del cerebro. En caso de localizarse en otros órganos o tejidos, se suele aplicar RT para tratar la región metastásica. Asimismo, el tumor primario en el pulmón se trata en función del tamaño del

tumor y de los nódulos afectados (Ettinger y cols., 2018). Así, para cada tipo se recomiendan las siguientes opciones:

- ✓ T1-3, N0: Resección quirúrgica o SABR
- ✓ T1-3, N1: Resección quirúrgica, radiación o quimiorradiación
- ✓ T1-3, N2 y T4, N0-2: Quimiorradiación

Por otra parte, los pacientes con múltiples metástasis, se someten a un estudio histológico para clasificar el subtipo de CPCNP, a un estudio del estado funcional del paciente y a un estudio de alteraciones genéticas en determinados biomarcadores. El estudio de estos biomarcadores es fundamental para la correcta aplicación de los tratamientos, que en los últimos años se han ido personalizando. Los clínicamente más importantes son los genes EGFR, ALK, ROS1, BRAF V600E y PD-L1 (Figura 8), y los tratamientos recomendados son diferentes en función de si estos genes se encuentran alterados, como se refleja en la Tabla 3 (Gridelli y cols., 2015; Ettinger y cols., 2017; Ettinger y cols., 2018).

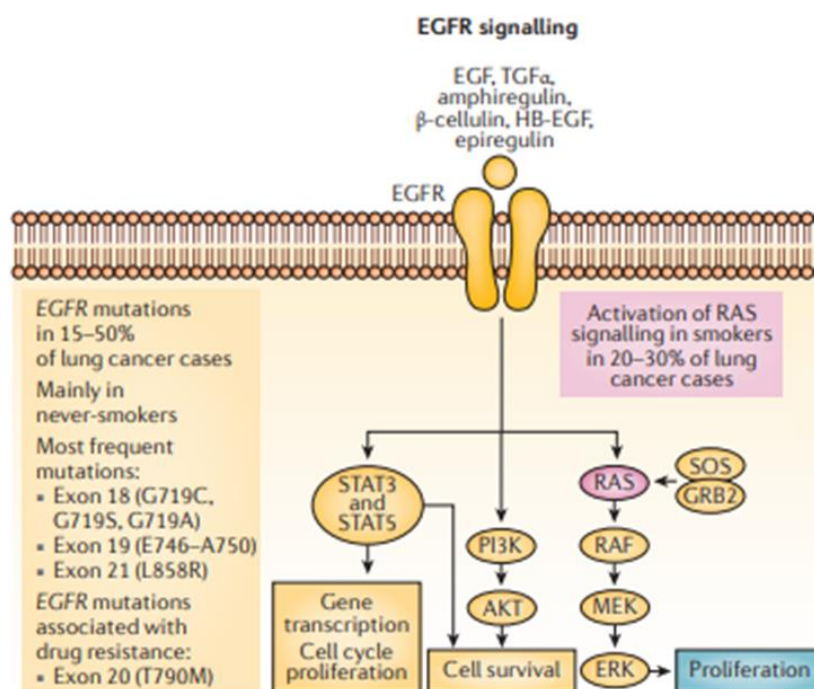


Figura 8: Implicaciones de las mutaciones EGFR. El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) e activa los efectores y vías que conducen a proliferación celular, supervivencia, transcripción de genes y progresión del ciclo celular. Las mutaciones activadoras en EGFR son frecuentemente observadas en los no fumadores, mientras que, en los fumadores, las mutaciones del gen KRAS conducen a la liberación de factores de crecimiento. Eso estimula aún más la señalización de EGFR (Gridelli y cols. Implications of EGFR and HER2 mutations. Recuperado con el permiso de Nat Rev Dis Primers. 2015 May 21;1:15009) (Gridelli y cols., 2015).

Tabla 3: Opciones de tratamientos inmunoterápicos de CPCNP metastásicos con alteraciones genéticas en los genes EGFR, ALK, ROS1, BRAF y PD-L1 (Ettinger y cols., 2018).

Biomarcadores	Tratamiento de primera línea	Tratamiento de segunda línea	Progresión
EGFR	Afatinib/Erlotinib/ Gefitinib/Osimertinib	Osimertinib	Terapia de primera línea según estudio histológico
ALK	Alectinib/Ceritinib/ Crizotinib	Alectinib/Brigatinib /Ceritinib	
ROS1	Ceritinib/Crizotinib	-	
BRAF V600E	Dafrafenib + trametinib	Dafrafenib + trametinib	
PD-L1	Pembrolizumab	Atezolizumab/ Nivolumab/ Pembrolizumab	

Aquellos pacientes que no presenten alteraciones en estos biomarcadores, junto con aquellos en los que se observe progresión de la enfermedad con las inmunoterapias personalizadas, suelen someterse a tratamientos de primera línea.

Por una parte, los adenocarcinomas y los tumores de células grandes en pacientes con buen EF (0-1) suelen tratarse con combinaciones de fármacos durante 4-6 ciclos. Las combinaciones más utilizadas son principalmente carboplatino junto con bevacizumab + PTX/pemetrexed, carboplatino o cisplatino en combinación con docetaxel, etopósido, gemcitabina, PTX o pemetrexed, cisplatino con bevacizumab + pemetrexed, carboplatino en combinación con unas nanoformulaciones de albúmina cargadas con PTX (Abraxane®), gemcitabina en combinación con docetaxel o vinorelbina, y, en última instancia, una combinación de pembrolizumab, carboplatino y pemetrexed. Cuando los pacientes presentan un EF 2 se eliminan las opciones de tratamiento con cisplatino, bevacizumab y pembrolizumab, y se recomiendan las combinaciones de carboplatino o gemcitabina, o terapias con un solo agente tumoral como son Abraxane®, docetaxel, gemcitabina, PTX y pemetrexed. A los pacientes con mal EF (3-4) se les recomiendan cuidados paliativos.

Por otra parte, a aquellos pacientes diagnosticados con un CPCNP de tipo escamoso y con buen EF se les recomiendan 4-6 ciclos de tratamientos combinados de carboplatino con Abraxane®, docetaxel, PTX o gemcitabina, de cisplatino con docetaxel, etopósido, gemcitabina o PTX, o de gemcitabina con docetaxel o vinorelbina. En el caso de un EF 2 se recomiendan las combinaciones de carboplatino o gemcitabina, o la administración única de

Abraxane®, docetaxel, PTX o gemcitabina. En casos de EF 3-4 se recurre a los cuidados paliativos. Finalmente, si tras estos tratamientos de primera línea para CPCNP metastásicos se produce una progresión de la enfermedad, se pueden utilizar inmunoterapias con nivolumab, pembrolizumab o atezolizumab u otras combinaciones de tratamientos quimioterápicos, o terapias paliativas, según el estado de la enfermedad. La RT en este tipo de pacientes está indicada como tratamiento paliativo en zonas metastásicas (Ettinger y cols., 2017; Ettinger y cols., 2018).

A pesar de los avances realizados en el tratamiento del CPCNP con las inmunoterapias personalizadas y la incorporación de la técnica SABR, las ratios de supervivencia a los 5 años desde el momento del diagnóstico siguen siendo bajas. En pacientes en estadios tempranos, la supervivencia es mayor, siendo la ratio estimada en estadio IA entre el 92% y el 77%, en estadio IB en torno al 60% y en estadio IIA y IIB entre el 60% y el 53%, respectivamente. En pacientes en estadios localmente más avanzados, esto es, IIIA, IIIB y IIIC, las ratios de supervivencia a los 5 años oscilan entre el 36% y el 13%. Finalmente, en el caso de pacientes con enfermedad metastásica IVA esta ratio está en torno al 10%, y en estadio IVB es menor del 1% (American Cancer Society, 2017; Amin y cols., 2017).

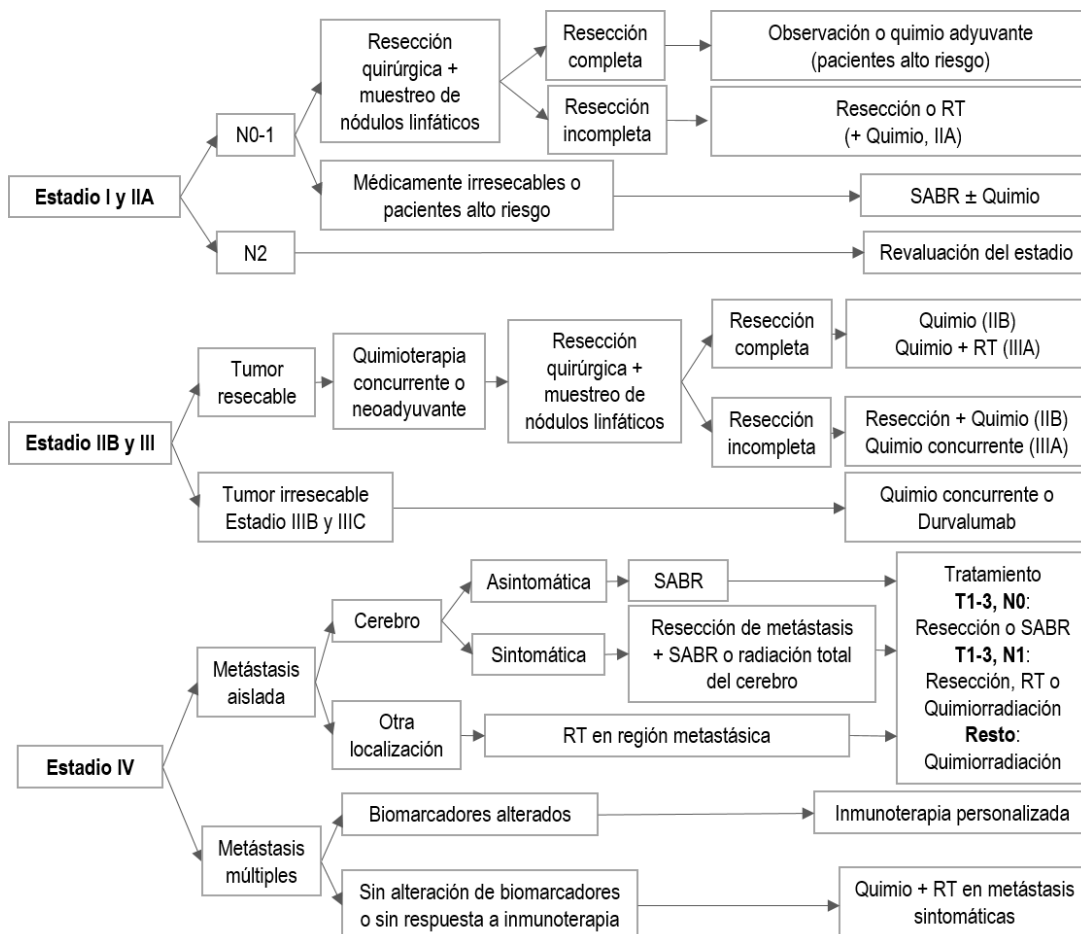


Figura 9: Tratamiento del CPCNP en función del estadio.

3. TAXANOS EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PULMÓN: PACLITAXEL

3.1. INTRODUCCIÓN

El paclitaxel o Taxol®, fue descubierto durante un cribado de compuestos derivados de diferentes especies de plantas con actividad antitumoral llevado a cabo por el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) entre 1960 y 1981. En 1962, el botánico A. Barclay recogió extractos de distintas partes de un tejo del Pacífico, *Taxus brevifolia*, un árbol de hoja perenne descubierto en los bosques del Noroeste del Pacífico. M. Wani y M. Wall analizaron las muestras de este árbol y encontraron actividad citotóxica en el extracto de la corteza. En 1967 este compuesto fue aislado e identificado, y le otorgaron el nombre de taxol (Figura 10). Cuatro años más tarde se publicó su estructura química y se incorporó al programa de desarrollo de fármacos del NCI (Mekhail y Markman 2002; Surapaneni y cols., 2012; Weaver, 2014).

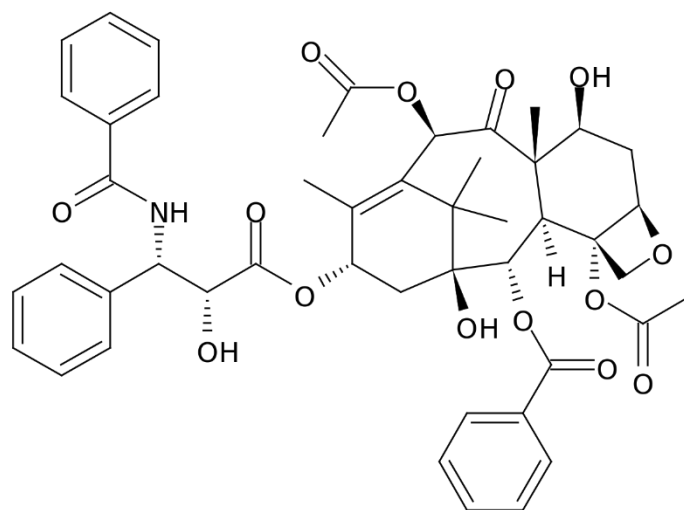


Figura 10: Representación de la estructura química del taxol.

Durante la realización de ensayos *in vivo* con ratones en modelos de leucemia, en 1978, se demostró la eficiencia antitumoral del taxol, lo que incitó a la realización de los primeros ensayos clínicos pocos años después. Muchos de estos ensayos se retrasaron por la escasa disponibilidad del taxol debido al crecimiento lento de *T. brevifolia*. El realizado en cáncer de ovario, obtuvo un 30% de respuesta en los pacientes tratados, impulsando la investigación para lograr producir el fármaco en mayores cantidades a través de la síntesis semisintética del taxol, a partir de precursores como 10-deacetylbaccatin III. Posteriormente, la empresa Bristol-Myers Squibb en 1992, registró el nombre comercial de Taxol®, le otorgó el nombre genérico de paclitaxel y finalmente, la FDA aprobó su uso para el tratamiento del cáncer de ovario. En la actualidad, este fármaco es una opción quimioterápica no sólo para cáncer de ovario sino páncreas, mama, cabeza y cuello, vejiga, gastroesofágico y endometrial, linfoma,

leucemia, sarcoma de Kaposi, y también, para cáncer de pulmón (McGuire y cols., 1989; Mekhail y Markman 2002; Surapaneni y cols., 2012; Weaver, 2014).

3. 2. MECANISMO DE ACCIÓN

El PTX es un agente antimitótico que se une a las subunidades β de la tubulina y bloquea la despolimerización de los microtúbulos (Figura 11), al contrario que otro tipo de agentes antimitóticos como la colchicina o los alcaloides de vinca que impiden su polimerización. Los microtúbulos son polímeros formados por heterodímeros de α y β tubulina que precisan de un equilibrio dinámico entre los procesos de polimerización y despolimerización. Durante la polimerización los dímeros de α y β tubulina unidos a guanósín trifosfato (GTP) se unen a otros dímeros ensamblados en el microtúbulo mediante la hidrólisis de GTP a guanósín difosfato (GDP) en el extremo positivo (+) del microtúbulo, en un proceso regulado por proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) (McGrogan y cols., 2008). Aunque su principal función de los microtúbulos es la formación del huso mitótico durante la división celular para separar las dos copias de material genético, también están implicados en diversos procesos durante la interfase celular como el mantenimiento de la forma celular, la movilidad, señales de transducción o transporte intracelular. El PTX altera el dinamismo de los microtúbulos, necesario para las funciones anteriores, estabilizando las uniones entre los heterodímeros de tubulina e impidiendo la despolimerización. Esta estabilización provoca un arresto de la célula en la metafase durante el proceso de mitosis, tras el ensamblaje del huso mitótico bipolar, y la posterior activación del programa de muerte celular programada o apoptosis. Algunos estudios sugieren que el tratamiento con PTX también puede inducir la multipolarización del huso mitótico en las células (Mekhail y Markman, 2002; Weaver, 2014). Asimismo, numerosos estudios asocian el tratamiento con PTX con la inhibición de la angiogénesis, la secreción de colagenasa y la proliferación celular (Surapaneni y cols., 2012).

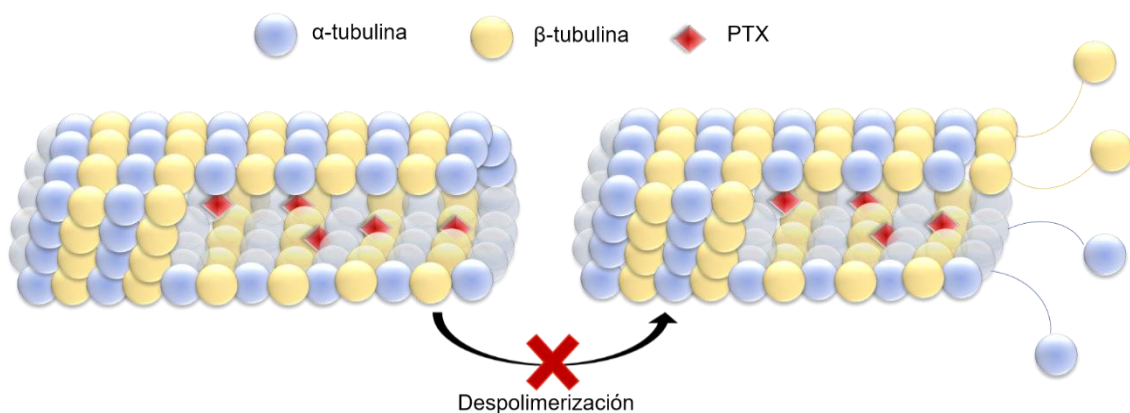


Figura 11: Mecanismo de acción del PTX mediante el cual se une a las subunidades β de la tubulina e impide la despolimerización de los microtúbulos.

3. 3. LIMITACIONES DEL TRATAMIENTO CON PACLITAXEL

El PTX es un alcaloide diterpénico con numerosas propiedades que lo convierten en un agente anticancerígeno ideal para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, al igual que otros muchos compuestos antitumorales, presenta numerosas limitaciones debido a su toxicidad lo que reduce su efectividad antineoplásica. Una de sus principales limitaciones es su baja solubilidad en agua (< 0.03 mg/ml), que conlleva al uso de excipientes orgánicos como el aceite de ricino polietoxilado (Cremophor® EL). De hecho, la formulación comercial de Taxol® utilizada en la clínica está preparada con Cremophor® EL y etanol en la misma proporción. Este excipiente presenta una elevada toxicidad y ha sido relacionado con algunos de los principales efectos secundarios derivados del tratamiento con PTX como son la hipersensibilidad aguda, caracterizada por disnea, enrojecimiento, erupción cutánea, dolor en el pecho, taquicardia, hipotensión, angioedema y urticaria generalizada. A pesar de la premedicación recomendada con corticoides y antihistamínicos, se observan reacciones poco severas en el 41-44% de los casos, y más severas, algunas potencialmente mortales, en el 1.5-3% de los casos (Gelderblom y cols., 2001; Mekhail y Markman, 2002; Choudhury y cols., 2017). Además, el Cremophor® EL modifica la farmacocinética del PTX y disminuye su biodisponibilidad en el tumor debido a que este solvente forma micelas en contacto con el plasma por las que el PTX tiene una alta afinidad, reduciendo su difusión a los tejidos. Por este motivo, no existe una relación dosis-dependiente directa con el efecto antitumoral del PTX (Sparreboom y cols., 1996; Miele y cols., 2009; Chen y cols., 2015; Choudhury y cols., 2017).

La toxicidad crónica es otra de las principales limitaciones de la administración del PTX, siendo las clínicamente más relevantes y frecuentes, la neuropatía periférica dolorosa y la toxicidad hematológica. Ambos son efectos indeseables dosis-dependientes que afectan a más del 60% de las personas tratadas y que interfieren en la terapia, obligando a menudo a su suspensión (generalmente de forma temporal y, a veces, definitivamente) o a reducir la dosis administrada, con la consiguiente reducción de la eficacia antineoplásica. Concretamente, la neuropatía periférica derivada del uso del PTX, está causada por la degeneración y desmielinización axonal de las neuronas del sistema periférico, a pesar de ser células con bajas tasas replicativas. Dado que el PTX no atraviesa la barrera hematoencefálica, su principal efecto ocurre a nivel de sistema nervioso periférico, donde provoca parestesia dolorosa en las extremidades, entumecimiento, hormigueo y pérdida del sentido del tacto. Estos efectos pueden perdurar meses o incluso años, reduciendo la calidad de vida de los pacientes. La neuropatía periférica también se encuentra parcialmente asociada al uso del Cremophor® (Gelderblom y cols., 2001; Gornstein y Schwarz, 2014).

Por otro lado, la toxicidad hematológica más frecuente es la mielosupresión, especialmente la neutropenia. No obstante, no es un efecto acumulativo, lo que indica que el PTX no provoca daños en las células hematopoyéticas inmaduras. Este efecto es limitante para la dosis de PTX, siendo la dosis recomendada de 200-250 mg/m². Este efecto suele revertirse tras 15-21 de tratamiento y los factores hematopoyéticos como el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) o el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) puede ayudar a reducir el impacto del tratamiento con PTX sobre los neutrófilos. El PTX también causa en ocasiones anemia o trombocitopenia (Guchelaar y cols., 1994; Mekhail y Markman, 2002). Asimismo, la toxicidad cardíaca, siendo el efecto más común la bradicardia asintomática, y la mialgia son otros de los efectos secundarios del PTX, aunque no parecen ser factores limitantes para la administración del PTX en pacientes (Mekhail y Markman, 2002; McGrogan y cols., 2008).

La rápida eliminación del PTX tras la administración intravenosa también es una limitación del tratamiento, siendo la vida media de eliminación aproximada de 5,8 horas. Esta rápida eliminación del fármaco sumada a la alteración farmacocinética provocada por el Cremophor® EL reduce la biodisponibilidad del fármaco en el tejido tumoral y hace que su efectividad antitumoral se vea significativamente reducida (Miele y cols., 2009; Feng y Mumper, 2013).

Finalmente, otra de las limitaciones más importantes del PTX son los mecanismos de resistencia presentes en algunas células tumorales. Existen dos principales mecanismos de resistencia al PTX, las alteraciones en la polimerización de microtúbulos y el fenómeno de resistencia a múltiples drogas (MDR). Algunas células tumorales presentan alteraciones en α o β tubulina con una capacidad deteriorada para polimerizar microtúbulos, siendo en estos casos el PTX contraproducente al estabilizar la dinámica de los microtúbulos. Otras formas de resistencia están asociadas a mutaciones en isotipos de tubulina. Concretamente, un estudio ha demostrado alteraciones en el dímero β -tubulina que se han relacionado con la resistencia a PTX en pacientes con CPCNP (Monzo y cols., 1999; Mekhail y Markman, 2002). Finalmente, otras mutaciones en genes implicados en la dinámica de los microtúbulos también pueden generar un fenotipo de resistencia a PTX.

Por otra parte, el fenotipo MDR de las células tumorales puede ser innato o puede ser adquirido tras la exposición al fármaco. Mediante este mecanismo las células expulsan determinados fármacos antitumorales al exterior mediante proteínas transportadoras dependientes de adenosín trifosfato (ATP), conocidas como transportadores ABC presentes en la membrana citoplasmática y nuclear, reduciendo de este modo el efecto antitumoral de estos fármacos (Ortiz y cols., 2017). Una de las principales proteínas implicadas en este

INTRODUCCIÓN

proceso es la P-glicoproteína (P-gp), un transportador ABC codificado por el gen MDR-1. En los últimos años se han asociado numerosos fármacos a la resistencia mediada por P-gp, como son los alcaloides de vinca, taxanos, fluoróforos y antraciclinas, entre otros (Juliano y Ling, 1976; Litman y cols., 2001). Concretamente, el PTX ha demostrado ser un sustrato de este transportador en numerosos estudios, como el realizado por Guo y cols. donde demostraron que la resistencia a PTX y docetaxel en una línea de cáncer de mama resistente era causada por una sobreexpresión del gen MDR-1 (Guo y cols., 2004). Este mecanismo de resistencia limita la eficacia terapéutica de muchos de los fármacos antitumorales que se aplican actualmente en clínica, por lo que sería interesante buscar alguna estrategia que permita evadir esta resistencia de algunas células tumorales.

4. NANOTECNOLOGÍA APLICADA AL CÁNCER

La nanotecnología es una ciencia interdisciplinaria que engloba los campos de la ingeniería, biología, química y medicina con el fin de aprovechar las ventajas de diferentes materiales reducidos a escala nanométrica para una infinidad de aplicaciones. En las últimas décadas, el estudio de la nanotecnología ha realizado avances en el campo de la medicina y en especial, en el diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades, entre las que cabe destacar el cáncer. Diversos estudios han demostrado la utilidad de las nanoformulaciones para la liberación de fármacos, desarrollar nuevos agentes para el diagnóstico por imagen (teragnosis) o superar barreras biológicas. Además, las nanoformulaciones han permitido avanzar en el desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en la terapia génica o la hipertermia, dada su capacidad para transportar ácidos nucleicos y compuestos magnéticos como la magnetita. No obstante, existen diversos parámetros, como el tamaño, la forma, las características de superficie o la naturaleza de los materiales, que pueden influir en sus propiedades fisicoquímicas y que han de ser tenidos en cuenta a la hora de diseñar nuevas nanoformulaciones,

El **tamaño** de las NPs posee relación directa con el tiempo de vida media de las NPs en el organismo y con la acumulación en el tejido tumoral. Tras la administración intravenosa, las NPs demasiado pequeñas (<10 nm) son excretadas rápidamente por el sistema renal hacia la orina a través de las paredes de los capilares del glomérulo renal que posee poros o fenestraciones de 6-8 nm. Por el contrario, las NPs con un tamaño superior a 150-300 nm son capturadas por los macrófagos del sistema reticuloendotelial y eliminadas de la circulación a través del hígado y del bazo (Cho y cols., 2008; Gaumet y cols., 2008; Yu y Zheng, 2015). Además, se ha observado que ciertas NPs como los nanotubos de carbono con un tamaño mayor de 2 μm pueden provocar obstrucciones en los capilares pulmonares (Ortiz y cols., 2017). En el tejido tumoral, tal y como se ha comentado previamente, la irregularidad de los vasos sanguíneos se acompaña de “huecos” entre las células endoteliales que favorecen el intercambio de sustancias y que, dado su tamaño (entre 100-780 nm) favorece la extravasación de las NPs hacia el tejido tumoral. Por tanto, el tamaño óptimo de NPs con fines terapéuticos se encuentra comprendido entre 70-200 nm (Cho y cols., 2008; Gaumet y cols., 2008; Ortiz y cols., 2017).

La **forma** de las NPs ha sido recientemente reconocida como una propiedad importante que influye en el tiempo de circulación, la biodistribución, la captación intracelular y el direccionamiento de las NPs. Hasta hace unos años, la forma más extendida a la hora de sintetizar NPs ha sido la esférica. Sin embargo, al observar como ciertos virus y bacterias con formas no esféricas eran capaces de evadir eficientemente el sistema inmune, se diseñaron

NPs con formas filamentosas, de disco, elipsoides o de aguja, que han mostrado propiedades beneficiosas para la encapsulación de fármacos antitumorales. Concretamente, las micelas filamentosas y los nanotubos de carbono han demostrado un mayor tiempo de circulación que sus equivalentes esféricos. Sin embargo, los estudios con NPs no esféricas están aún en una fase preliminar y serán necesarios más estudios para comprobar sus ventajas así como su posible toxicidad asociada (Acharya y Sahoo, 2011; Truong y cols., 2015; Ortiz y cols., 2017).

La **superficie** es otra característica importante que contribuye al tiempo de vida en el flujo sanguíneo, la biodistribución y la interacción de las NPs con las células. La superficie de las nanoformulaciones es la principal responsable de la interacción de las NPs con los fluidos biológicos o determinadas biomoléculas que pueden provocar su agregación o su reconocimiento por las células del sistema inmune, reduciendo la efectividad. Hay dos aspectos importantes a tener en cuenta: la carga y la hidrofobicidad. En primer lugar, la carga de las NPs juega un papel importante en la interacción celular de forma que la ausencia de carga disminuye su internalización, la carga negativa aumenta su tiempo de vida media y ayuda a la penetración en el tejido tumoral y la carga positiva favorece su internalización al interactuar con la membrana plasmática (cargada negativamente) debido al exceso de cargas positivas del medio externo (Kettler y cols., 2014; Ortiz y cols., 2017). En segundo lugar, la hidrofobicidad de las NPs está relacionada con su interacción y eliminación por parte de los macrófagos del sistema reticuloendotelial (SER). Las NPs hidrófobas en el torrente sanguíneo son fácilmente opsonizadas, lo que facilita el reconocimiento por parte de monocitos y macrófagos del SER iniciando una respuesta inmunitaria. Cuando los macrófagos fagocitan las NPs, las eliminan del torrente sanguíneo a través de hígado y bazo, reduciendo la cantidad de NPs que alcanzan el tejido tumoral. Por esta razón, el uso de envueltas hidrofílicas en la superficie de las NPs es una estrategia comúnmente utilizada. En este sentido, el polímero más ampliamente utilizado es el polietilenglicol (PEG), de naturaleza hidrofílica, sin carga y que ha demostrado un incremento de la solubilidad y estabilidad de las NPs. Además, la pegilación reduce las interacciones de la superficie de las NPs con las opsoninas presentes en el plasma, evadiendo la opsonización y el desencadenamiento de una respuesta inmunitaria. Por esta razón, las NPs pegiladas pueden permanecer durante más tiempo en el torrente sanguíneo, evitando su eliminación antes de alcanzar el tejido tumoral. No obstante, a pesar de mejorar la biodisponibilidad de las NPs, la envuelta de PEG también reduce la internalización celular de las NPs, lo que dificulta especialmente el tratamiento de las células tumorales resistentes ya que provocaría una liberación de fármacos en la matriz extracelular, su entrada en las células como fármacos libres, y su expulsión a través mecanismos de resistencia. Por tanto, es necesario combinar

las propiedades de tamaño, forma y superficie para diseñar NPs que puedan aumentar la eficiencia del tratamiento antitumoral (Gullotti y Yeo, 2009; Tran y cols., 2017; Von Roemeling y cols., 2017).

Finalmente, la **naturaleza de los materiales**, bien sea lipídica, polimérica, proteica, inorgánica, metálica o magnética, es otro aspecto clave para determinar la interacción de las NPs a nivel molecular, celular y sistémico. Por esta razón, las nanoformulaciones desarrolladas con fines terapéuticos suelen sintetizarse con materiales biocompatibles y biorreabsorbibles, fácilmente degradables por el metabolismo celular, dado que una de las principales limitaciones de su aplicabilidad es la toxicidad sistémica. Los materiales no degradables pueden provocar daños al acumularse en el interior de las células y en determinados órganos vitales. Si son fagocitadas por los macrófagos, se producirá la liberación de radicales libres que pueden ocasionar daño celular e inflamación. En el caso de acumularse en el interior de los lisosomas y la célula no disponga de enzimas capaces de degradar estos materiales se pueden llegar a desarrollar enfermedades de depósito lisosomal. No obstante, los materiales biodegradables también pueden dar lugar a productos tóxicos para las células, razón por la cual estos deben ser también biorreabsorbibles (Garnett y Kallinteri, 2006; Aillon y cols., 2009). La toxicidad también puede estar relacionada con el tamaño, forma, carga, envuelta, dispersión, capacidad de agregación, concentración de la NPs (Aillon y cols., 2009; Elsaesser y Howard, 2012) e inducción de estrés oxidativo. En relación a este último, las nanoformulaciones pueden generar radicales libres tanto por las propiedades fisicoquímicas de los materiales, como por la respuesta de las células fagocíticas a estos materiales, que causan daño a través de la oxidación de lípidos, proteínas o del ADN. Los principales órganos afectados por este estrés oxidativo suelen ser el hígado y el bazo, que forman parte del sistema retículo endotelial (SRE) que elimina las nanoformulaciones. Además, los órganos con mayor irrigación como los riñones y los pulmones, también pueden verse afectados. (Lanone y Boczowski, 2006; Aillon y cols., 2009; Elsaesser y Howard, 2012; Ortiz y cols., 2017) Asimismo, la incorporación de NPs en la circulación sistémica también puede tener efectos sobre componentes de la sangre. En primer lugar, las características de las NPs influirán en su interacción con proteínas de la sangre como son las opsoninas e inmunoglobulinas, y que pueden modificar la biodistribución de las NPs, provocando su acumulación en tejidos como hígado y bazo. Además, determinadas NPs pueden generar hemólisis y trombosis al interactuar con los glóbulos rojos y las plaquetas del torrente sanguíneo o aumentar la inmunotoxicidad al interactuar con los componentes del sistema inmunológico (Dobrovolskaia y McNeil, 2007; Aillon y cols., 2009).

4. 1. VENTAJAS TERAPÉUTICAS DE LAS NANOFORMULACIONES

Las nanoformulaciones permiten la superación de muchas de las limitaciones de los tratamientos quimioterápicos actuales, y aportan numerosas ventajas respecto a los tratamientos tradicionales:

- ✓ Transportan moléculas con baja solubilidad y mejoran su estabilidad, posibilitando la administración intravenosa de estos fármacos y evitando el uso de excipientes que puedan provocar toxicidad en el paciente (Feng y Mumper, 2013; Wicki y cols., 2015).
- ✓ Protegen los fármacos de la rápida metabolización y excreción, permitiendo prolongar la vida media en circulación y la biodisponibilidad del fármaco, facilitando así alcanzar el tejido de interés antes de que el fármaco sea eliminado del organismo (Feng y Mumper, 2013; Tran y cols., 2017).
- ✓ Facilitan la extravasación hacia el tejido tumoral gracias al efecto de permeabilidad y retención aumentada que se produce en este tejido por la desestructuración característica de los nuevos vasos sanguíneos derivados de la angiogénesis tumoral (Ortiz y cols., 2017; Von Roemeling y cols., 2017).
- ✓ Proporcionan nuevas opciones para el direccionamiento activo del fármaco a los tejidos de interés mediante la modificación superficial de las nanoformulaciones con anticuerpos o receptores específicos para esos tejidos, focalizando el efecto terapéutico del tratamiento (Feng y Mumper, 2013; Ortiz y cols., 2017).
- ✓ Aumentan de la eficacia antitumoral y pueden reducir la aparición de los efectos secundarios para ampliar los márgenes terapéuticos de los fármacos actuales (Shi y cols., 2017).
- ✓ Permiten la incorporación de varios agentes terapéuticos en la nanoformulación que pueden actuar conjuntamente favoreciendo la sinergia y amplificando el efecto antitumoral (Feng y Mumper, 2013).
- ✓ Facilitan el paso a través de barreras biológicas como la barrera gastrointestinal y hematoencefálica, superando una de las principales limitaciones de las terapias convencionales (Shi y cols., 2017).
- ✓ Permiten la liberación controlada del fármaco, bien por las propiedades de las NPs que favorezcan la liberación lenta del fármaco, o inducida por determinadas condiciones como pH o temperatura (Wicki y cols., 2015; Ortiz y cols., 2017).

- ✓ Presentan la capacidad de evadir o inhibir los sistemas de resistencia MDR, mediante la acción directa sobre los transportadores como P-gp, modificación del mecanismo de entrada al interior celular mediante procesos de endocitosis o alteración de la composición de la membrana plasmática (Wicki y cols., 2015; Ortiz y cols., 2017).
- ✓ Proporcionan una nueva estrategia multifuncional para el diagnóstico y tratamiento del cáncer con una misma nanoformulación (teragnosis), permitiendo la localización exacta de los tumores, la monitorización de la biodistribución por el organismo y la determinación de la eficacia terapéutica (Wicki y cols., 2015).

4. 1. 1. *Direccionamiento de las nanopartículas*

La nanomedicina ofrece una gran ventaja frente al uso de los tratamientos convencionales: el direccionamiento, es decir, la capacidad de modificar las nanoformulaciones para favorecer la acumulación específica de los agentes antitumorales que transportan en el tejido tumoral. Este direccionamiento permite aumentar el efecto quimioterápico al focalizar la acción del fármaco en el tejido tumoral y reducir los efectos secundarios producidos por la acción citotóxica de los fármacos en los tejidos sanos. En este contexto, se distinguen tres tipos de direccionamiento:

4. 1. 1. 1. Direccionamiento pasivo

En este tipo de direccionamiento las propias características fisicoquímicas de las NPs pueden ser aprovechadas para favorecer su acumulación en los tumores, sin necesidad de adicionar ningún ligando específico en su superficie. Este direccionamiento pasivo se produce gracias al conocido efecto de permeabilidad y retención aumentadas (EPR) que promueve una mayor extravasación de determinadas moléculas hacia el tejido tumoral (Figura 12). Este efecto se produce como consecuencia de determinadas anomalías en la neovascularización del tumor, necesaria para mantener la elevada tasa proliferativa de las células tumorales. Los nuevos vasos sanguíneos, generados mediante el proceso de angiogénesis tumoral, se caracterizan por presentar una estructura desordenada y defectuosa con fenestraciones o *gaps* de 100 a 780 nm entre las células endoteliales, que favorecen la difusión de moléculas hacia el tejido tumoral, mientras que estas fenestraciones tienen un tamaño de 1 a 20 nm en el epitelio vascular normal y, por tanto, la extravasación es mucho más reducida (Hobbs y cols., 1998; Gastón, 2008; Gullotti y Yeo, 2009; Wicki y cols., 2015). Esta desestructuración vascular, sumada a la excesiva producción de mediadores vasculares en los tejidos tumorales como VEGF, bradiquinina o el monóxido de carbono, incrementan la permeabilidad de estos nuevos vasos sanguíneos y favorecen la captación de moléculas hacia el tejido tumoral. Además, otro de los factores que promueve el efecto EPR es la disminución del drenaje linfático en el tumor, lo que aumenta el tiempo de retención de las

INTRODUCCIÓN

macromoléculas y promueve que las NPs puedan liberar los fármacos antes de ser eliminadas por el organismo (Maeda y cols., 2000; Bertrand y cols., 2014; Nakamura y cols., 2015; Ortiz y cols., 2017).

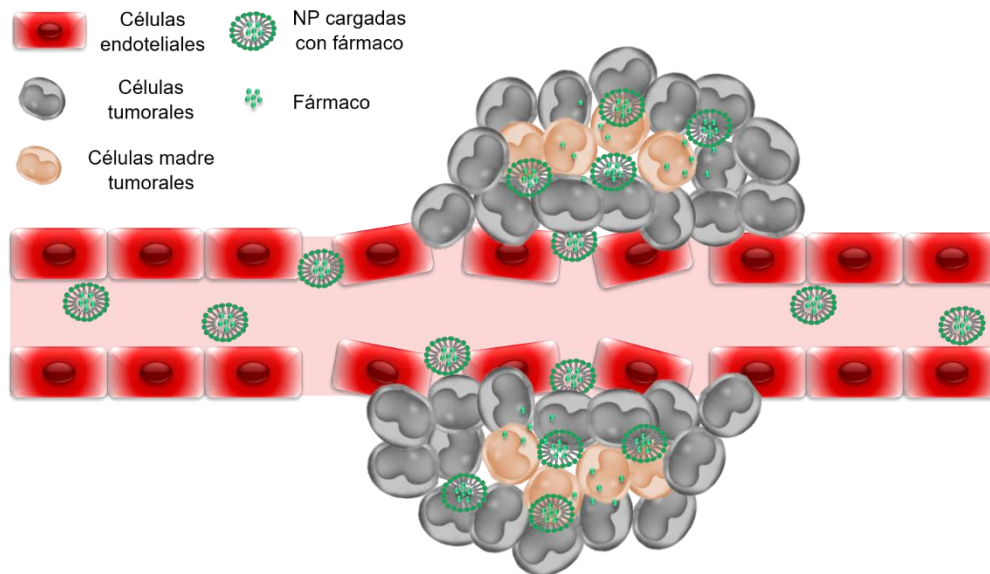


Figura 12: Direccionamiento pasivo de NPs cargadas con fármaco por efecto EPR, basado en el aumento de tamaño de las fenestraciones entre las células endoteliales, característico de la neovascularización tumoral, que favorece la extravasación de las NPs hacia el tejido tumoral.

Sin embargo, a pesar de que este tipo de direccionamiento pasivo no requiere de modificaciones especiales en la estructura de las NPs, éstas deben presentar una serie de requisitos para que el efecto EPR promueva su acumulación en el tejido tumoral, principalmente relacionados con el tamaño, carga de superficie, biocompatibilidad o tiempo de circulación de las NPs. Por una parte, las NPs deben presentar un tamaño inferior a los 150-300 nm, para poder ser transportadas fácilmente a través de los vasos y capilares sanguíneos y para prevenir su eliminación por el SRE a través del hígado y el bazo, y superior a los 10 nm (o tener un peso molecular superior a los 40 KDa) para no ser excretadas por los riñones. Así, las NPs con un tamaño de 30-100 nm son las que tienden a acumularse más en los tejidos tumorales con alta permeabilidad, y las NPs inferiores a 30 nm las que tienden a acumularse más en los tumores con menor permeabilidad, como es el caso del adenocarcinoma pancreático (Gaumet y cols., 2008; Gullotti y Yeo, 2009; Cabral y cols., 2011; Ortiz y cols., 2017). Otro aspecto importante es la carga superficial de las NPs, que debe ser ligeramente negativa o neutra debido a que las catiónicas suelen eliminarse más rápidamente mediante el aclaramiento renal (Gullotti y Yeo, 2009; He y cols., 2010; Ortiz y cols., 2017). Por otra parte, el efecto EPR también depende del tiempo de circulación de las NPs, siendo mayor la captación en el tejido tumoral cuanto más tiempo se mantengan en el

torrente sanguíneo. Asimismo, la biocompatibilidad de los nanomateriales es una propiedad importante que influye en la efectividad del direccionamiento pasivo, razón por la cual se debe evitar el uso de nanomateriales que puedan presentar inmunogenicidad y desencadenar una respuesta inmunológica, así como de aquellos que sean rápidamente opsonizados y eliminados del organismo por el SRE. Una de las estrategias más ampliamente utilizadas para incrementar esta biocompatibilidad es recubrir la superficie de las NPs con materiales altamente biocompatibles como pueden ser el PEG, el dextrano, el ácido poliacrílico o el óxido de polietileno (Sun y cols., 2015; Ortiz y cols., 2017). Por tanto, la modulación de las propiedades fisicoquímicas de las NPs es clave para aumentar la efectividad del efecto EPR.

Entre los años 80 y 90 se desarrollaron numerosas NPs de uso terapéutico basadas en el direccionamiento pasivo, conocidas como nanomedicinas de primera generación. Algunas de ellas han sido aprobadas para su aplicación clínica, como es el caso de Abraxane® o los liposomas pegilados cargados con DOX (Doxil®/Caelyx®) (Gullotti y Yeo, 2009; Wicki y cols., 2015). Sin embargo, la efectividad de estas nanoformulaciones es reducida dado que el direccionamiento pasivo presenta ciertas limitaciones. En primer lugar, el efecto EPR es altamente dependiente del grado de vascularización y la porosidad de los nuevos vasos del tumor, factores que son variables según el tipo y estado del tumor. En el caso de los tumores de próstata y páncreas, que presentan una vascularización muy pobre, el efecto EPR es muy reducido (Gullotti y Yeo, 2009; Cabral y cols., 2011; Maeda y cols., 2016). Por otra parte, la heterogeneidad del tumor y de su estroma, así como del gradiente de hipoxia, también puede reducir el direccionamiento hacia el tumor. Además, el efecto EPR no es suficiente para reducir los efectos secundarios derivados de los quimioterápicos, y no previene la acumulación de las NPs en otros órganos con vascularización fenestrada, como pueden ser el hígado y el bazo. Por todo ello, ante la necesidad de superar estas limitaciones, se han comenzado a desarrollar nanomedicinas de segunda generación, basadas en un direccionamiento activo con anticuerpos o receptores específicos frente a las células tumorales, o en un direccionamiento condicionado por estímulos externos como pueden ser cambios de pH o temperatura (Wicki y cols., 2015; Tran y cols., 2017).

4. 1. 1. 2. Direccionamiento activo

El direccionamiento activo consiste en la funcionalización de la superficie de las NPs con ligandos que presentan una alta especificidad por receptores u antígenos de la membrana de las células tumorales. Algunos de los ligandos más empleados para este fin son anticuerpos monoclonales, ácido fólico, transferrina, lactoferrina, péptidos, aptámeros (pequeños fragmentos de ADN o ARN) o polisacáridos. Esta estrategia de direccionamiento surgió con el propósito de reducir la toxicidad sistémica de los fármacos quimioterápicos, fomentando la incorporación de estos fármacos en las células tumorales y reduciéndola en

las células normales. En este aspecto, es importante que los receptores u antígenos empleados como diana estén sobreexpresados únicamente en las células tumorales y presentar una baja expresión en las células normales. Además, deben expresarse de forma homogénea en todas las células diana y no deben ser expulsados al torrente sanguíneo para no inducir la liberación anticipada de los fármacos de las NPs antes de alcanzar el tejido tumoral. No obstante, este tipo de direccionamiento no influye sobre la biodistribución de las NPs, sino que al igual que aquellas que no presentan ligandos específicos, la acumulación en tejido tumoral está condicionada por el efecto EPR. Una vez alcanzado el tejido tumoral y propiciado el contacto directo de las NPs con las células tumores, el direccionamiento activo aumenta la eficiencia de internalización desde el espacio extracelular, generalmente mediante endocitosis mediada por receptor, y la retención intracelular en estas células de forma específica. Esta estrategia terapéutica basada en el direccionamiento activo es especialmente interesante para superar la MDR, donde el direccionamiento pasivo no es suficiente. Además, el aumento en la incorporación específica de las NPs en las células tumorales, puede contrarrestar la reducción de la internalización de las NPs recubiertas con PEG (Allen, 2002; Kirpotin y cols., 2006; Cho y cols., 2008; Bae, 2009; Gullotti y Yeo, 2009; Zhong y cols., 2014; Ortiz y cols., 2017).

Los anticuerpos monoclonales han sido ampliamente utilizados como ligandos para el direccionamiento activo debido a su elevada especificidad. Al ser moléculas de gran tamaño, aumenta la complejidad a la hora de incorporarlos a la superficie de las NPs, por lo que en muchas ocasiones se utilizan fragmentos de la región hipervariable. Sin embargo, el uso de estas moléculas tiene varias limitaciones implícitas como pueden ser el aumento de la inmunogenicidad de las nanoformulaciones, lo que reduce su tiempo de circulación, o la sensibilidad ante cambios de temperatura, enzimas, solventes orgánicos o concentración de sales, lo que complica el proceso de síntesis (Allen, 2002; Kirpotin y cols., 2006; Bertrand y cols., 2014). A pesar de ello, se han desarrollado numerosas nanoformulaciones funcionalizadas con anticuerpos con las que se han obtenido buenos resultados *in vitro*, como NPs de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) unidas al EGFR y cargadas con rapamicina con las que se ha obtenido una incorporación 13 veces mayor en células tumorales de mama, que con sus análogos sin funcionalizar (Acharya y cols., 2009). Otro ejemplo son las NPs de PLGA conjugadas con Her2 y cargadas con tamoxifeno que han mostrado un 35% de internalización de las NPs en líneas de cáncer de mama que las NPs de PLGA sin Her2 (Vivek y cols., 2014). A día de hoy, algunas de estas NPs de segunda generación son objeto de ensayos clínicos, como es el caso de la nanoformulación Doxil®/Caelyx® complementada con un fragmento de la región hipervariable del anticuerpo frente a EGFR (Erbix®) y cuyos resultados de la fase I parecen prometedores en pacientes con tumores

sólidos avanzados (Mamot y cols., 2012). Otro ejemplo de nanoformulación que ha pasado una fase I es MCC-465, un liposoma pegilado cargado con DOX y funcionalizado con un fragmento del anticuerpo GAH específico frente a tumores gástricos (Matsumura y cols., 2004).

A pesar de ser esta estrategia se prevé muy prometedora, el direccionamiento activo presenta ciertos inconvenientes que han limitado su aprobación por la FDA (Peer y cols., 2007). Cabe destacar: i) en primer lugar, que los ligandos pueden aumentar la antigenicidad de las NPs y favorecer la eliminación a través del SRE. De hecho, en algunos estudios *in vivo* con NPs funcionalizadas con aptámeros se ha observado 1.5 – 2% de acumulación en el tumor frente a un 30-60% de acumulación en el hígado (Gu y cols., 2008; Gullotti y Yeo, 2009); ii) en segundo lugar, el aumentar de antigenicidad de las NPs reduce el tiempo de circulación, factor crítico para alcanzar el tejido tumoral y favorecer su extravasación por el efecto EPR, iii) en tercer lugar, la adición de ligandos puede comprometer la protección de la capa de PEG frente al sistema inmune. Por todo ello, es crítico para el diseño de estas nanoformulaciones maximizar el direccionamiento y la biocompatibilidad para evadir la eliminación por el sistema inmune (Gullotti y Yeo, 2009; Petros y DeSimone, 2010; Wicki y cols., 2015; Tran y cols., 2017).

A continuación, se exponen algunos ejemplos usados para el direccionamiento activo en el campo de la nanomedicina para el tratamiento de diversos tipos de tumores (Tabla 4).

Tabla 4: Ejemplos de direccionamiento activo usados en nanomedicina (Ortiz y cols., 2017).

Ligandos para direccionamiento activo	Nanoformulación	Fármaco encapsulado	Tipo de tumor	Referencia
Anticuerpo anti-EGFR	NPs de PLGA	Rapamicina	Mama	(Acharya, Dilnawaz et al. 2009)
Anticuerpo anti-EGFR	NPs de óxido de grafeno	Epirubicina	Glioma	(Yang, Lu et al. 2013)
Anticuerpo anti-Her2	NPs de PLGA	Tamoxifeno	Mama	(Vivek, Thangam et al. 2014)
Lactoferrina	NPs de albúmina de suero bovino	DOX	Glioma	(Su, Xing et al. 2014)
Transferrina	NPs de ácido poliláctico (PLA) y D-succinato de D-alfa-tocoferil PEG	Docetaxel	Glioma	(Gan and Feng 2010)
Transferrina	NPs de PLGA	Temozolamina	Glioma	(Jain, Chasoo et al. 2011)
Péptido Angiopep-2 reconocido por la proteína relacionada con el receptor de lipoproteína (LRP)	NPs de PEG y poli- ϵ -caprolactona (PCL)	PTX	Glioma	(Xin, Jiang et al. 2011)
Péptido GE11 reconocido por EGFR	NPs de PLGA-PCL	Lonidamina y PTX	Mama	(Milane, Duan et al. 2011)
Ácido fólico	Hidrogel	Curcumina	Cérvix	(Pillai, Thulasidasan et al. 2014)
Ácido fólico	NPs de 3-hidrobutirato y hidroxioctanoato	DOX	Cérvix	(Zhang, Zhao et al. 2010)
Ácido fólico	NPs de PLGA	PTX	Endometrio	(Liang, Yang et al. 2011)
Ácido hialurónico	NPs de ácido hialurónico	PTX	Carcinoma de células escamosas	(Yoon, Koo et al. 2013)
Ácido hialurónico	NPs de ácido hialurónico y ceramida	Docetaxel	Mama	(Cho, Yoon et al. 2011)

4. 1. 1. 3. Direccionamiento desencadenado por estímulos

Las nanoformulaciones con respuesta a estímulos se presentan como una nueva estrategia para mejorar la eficiencia terapéutica y reducir los efectos secundarios. Estas nanoformulaciones son diseñadas para responder específicamente a determinados estímulos externos o internos que desencadenan la liberación de los fármacos encapsulados, y es especialmente interesante cuando estos estímulos son únicos para una patología concreta. Algunos de los principales estímulos internos que pueden ser aprovechados para este fin son las alteraciones del pH o el desequilibrio en las reacciones de óxido-reducción. El microambiente tumoral se encuentra más acidificado (pH 5.5 – 6.5) que el resto de los tejidos sanos que presentan un pH fisiológico (pH 7.4). Esta acidificación se debe principalmente al aumento en la producción de ácido láctico debido a la insuficiencia de oxígeno en el tumor, causada por la aberrante vascularización y los altos requerimientos energéticos de estas células, que conducen a un estado de hipoxia y provocan un aumento en el metabolismo anaeróbico de estas células (Ganta y cols., 2008; Gao y cols., 2010; Kato y cols., 2013). Esta modulación de pH parece jugar un papel importante en el crecimiento tumoral, la aparición de metástasis y angiogénesis y en la respuesta clínica a los tratamientos de quimioterapia y radioterapia (Kato y cols., 2013). Además, los lisosomas también presentan el pH ácido en su interior y las enzimas hidrolíticas que pueden degradar las nanoformulaciones sensibles a pH durante el proceso de endocitosis. Las estrategias más comunes para sintetizar nanoformulaciones sensibles a los cambios de pH es utilizar materiales con grupos ionizables que tiendan a protonarse en condiciones de pH ácido, induciendo la desestructuración de la nanoformulación, o adicionar determinados enlaces susceptibles de ruptura en condiciones de pH ácido, como los enlaces amida (Kanamala y cols., 2016; Ortiz y cols., 2017). Un ejemplo de nanoformulación sensible a pH es una micela basada en un copolímero de polietilenglicol metil éter y poli(β -amino-éster) y cargadas con el fármaco DOX. Los estudios *in vitro* han mostrado que estas micelas a pH 6.4 liberan más de un 71% del fármaco encapsulado en 6 horas, mientras que a pH 7.4 se libera menos de un 20% en 24 horas. Estas micelas también han sido probadas en estudios *in vivo* con ratones con tumores inducidos a partir de una línea de melanoma (B16F10), y han mostrado una mayor eficiencia antitumoral y un aumento de la supervivencia de los ratones en comparación con la DOX administrada de forma libre (Gullotti y Yeo, 2009; Park y cols., 2009).

Como se ha mencionado anteriormente, otra de las estrategias para este tipo de direccionamiento es diseñar nanoformulaciones que respondan ante condiciones de desequilibrio en las reacciones de óxido reducción. La falta de oxígeno y nutrientes genera estrés oxidativo en las células tumorales, lo que aumenta la formación de radicales libres que pueden ocasionar daños irreversibles en las células. En respuesta, las células tumorales

aumentan la síntesis de glutatión, uno de los antioxidantes endógenos más importantes del organismo, para neutralizar los radicales libres. Los niveles de este antioxidante pueden llegar a ser de 100 a 1000 veces mayor dentro de las células que el medio extracelular y de 7 a 10 veces mayor que en las células normales. En ambiente reductor puede ser aprovechado para diseñar nanoformulaciones cuya estructura se base en puentes disulfuro, que en presencia del glutatión se rompen, liberando así los fármacos encapsulados. Esta estrategia se está aplicando principalmente para la encapsulación de ácidos nucleicos (Saito y cols., 2003; Ganta y cols., 2008; Fleige y cols., 2012; Wicki y cols., 2015). Un ejemplo son las nanopartículas poliméricas de poliaspartato que han desarrollado Cavallaro y cols. para la encapsulación de moléculas de ADN. Estos polímeros se ensamblan mediante puentes disulfuro, que se disocian en un ambiente reductor como es el exceso de glutatión intracelular, favoreciendo la liberación específica del ADN dentro de las células (Cavallaro y cols., 2006; Ganta y cols., 2008).

Además de los estímulos internos, también existen estímulos externos que pueden propiciar la liberación específica de las nanoformulaciones, como pueden ser incrementos de temperatura, luz, ultrasonidos o campos eléctricos y magnéticos. Concretamente, la hipertermia local, que implica un incremento de temperatura de 37 °C hasta unos 42 °C, puede inducir la liberación de fármacos de NPs cuando se utilizan materiales termosensibles o se incorporan a la formulación partículas de óxido de hierro con propiedades superparamagnéticas. El incremento de temperatura además aumenta la permeabilidad vascular facilitando la extravasación de las partículas hacia el tumor. Además, se ha observado que las células tumorales tienen una mayor sensibilidad al calor que las células normales (Ganta y cols., 2008; Wicki y cols., 2015; Tran y cols., 2017). ThermoDox® es un tipo de liposoma sensible a temperatura y cargado con DOX que actualmente se encuentra en fase III de ensayos clínicos para el tratamiento del carcinoma hepático (NCT00617981). Con el incremento de temperatura en la región donde se encuentra el tumor este liposoma puede penetrar más rápidamente hacia el tejido tumoral gracias al aumento de permeabilidad vascular y se produce una liberación rápida de la DOX, incrementando la efectividad del tratamiento (Chen y cols., 2013).

En la actualidad se están desarrollando cada vez más nanoformulaciones con respuesta a estímulos, ya sean internos o externos, debido a la posibilidad de focalizar los tratamientos en el tejido tumoral y de reducir los daños producidos en otros tejidos sanos. A pesar de ello, es necesario superar algunas limitaciones de estas nanoformulaciones, siendo una de las principales que la liberación de los fármacos suele producirse antes de la internalización de las nanoformulaciones, lo que reduce la efectividad del tratamiento en células tumorales resistentes (Gullotti y Yeo, 2009; Wicki y cols., 2015).

4. 1. 2. Resistencia a múltiples drogas

El efecto MDR (ver “Limitaciones del tratamiento con paclitaxel”), es una de las principales limitaciones de los tratamientos convencionales contra el cáncer. En la actualidad existen diferentes fármacos que pueden contrarrestar el efecto MDR, como son los inhibidores de canales de calcio (como el verapamilo), la ciclosporina A o el tamoxifeno. Asimismo, el excipiente Cremophor® EL, usado en la formulación del Taxol®, también ha mostrado tener cierto efecto inhibitorio sobre el mecanismo de resistencia mediado por P-gp (Woodcock y cols., 1990; Gelderblom y cols., 2001; Mekhail y Markman, 2002). Sin embargo, hasta ahora ningún estudio ha demostrado mejoras terapéuticas con la coadministración del PTX u otros fármacos y algún inhibidor de P-gp. No obstante, la administración de fármacos en NPs podría ser una buena estrategia puesto que existen evidencias de que son capaces de reducir esta resistencia (Figura 13) (Ma y Mumper, 2013). Los posibles mecanismos para contrarrestar el efecto MDR con el uso de las nanopartículas son la inhibición de la P-gp por los nanomateriales empleados para la encapsulación de los fármacos, la acumulación local de las moléculas de fármaco en el espacio extracelular o el aumento de la captación del fármaco por la internalización de las nanoformulaciones mediante endocitosis (Wong y cols., 2006). Concretamente, las NPs de tripalmitina con PTX desarrolladas por Leiva y cols., parecen actuar como un inhibidor de la P-gp, de forma similar al verapamilo, según los resultados obtenidos en los estudios de retención de rodamina con la línea resistente HCT15 (Leiva y cols., 2017). Por otra parte, Wong y cols. han sintetizado unas NPs híbridas de polímeros y lípidos y cargadas con DOX que evaden el mecanismo de resistencia de P-gp, favoreciendo la captación de la DOX en líneas de cáncer de mama humanas, incrementando hasta 8 veces la muerte celular que con la administración de la DOX libre (Wong y cols., 2006). Estas NPs también se han probado en estudios *in vivo* en ratones con tumores inducidos, en los que se muestra una actividad citotóxica significativa con un retraso en el crecimiento tumoral con una toxicidad sistémica mínima (Wong y cols., 2007). Asimismo, Sahoo y cols. han sintetizado unas NPs de PLGA conjugadas con transferrina y cargadas con PTX que han mostrado una mayor actividad antiproliferativa en una línea de cáncer de mama (MCF-7) resistente al fármaco gracias a una mayor captación celular y reducción de exocitosis en comparación con NPs no conjugadas. Esta diferencia puede deberse al mecanismo de internalización de endocitosis específica mediada por la transferrina, que puede influir en la incorporación de las NPs, la retención intracelular y, por lo tanto, en el efecto antitumoral (Sahoo y Labhasetwar, 2005). Estos ejemplos de nanoformulaciones ponen de manifiesto el importante papel que pueden jugar las NPs en la evasión de la resistencia a fármacos de determinadas células cancerígenas.

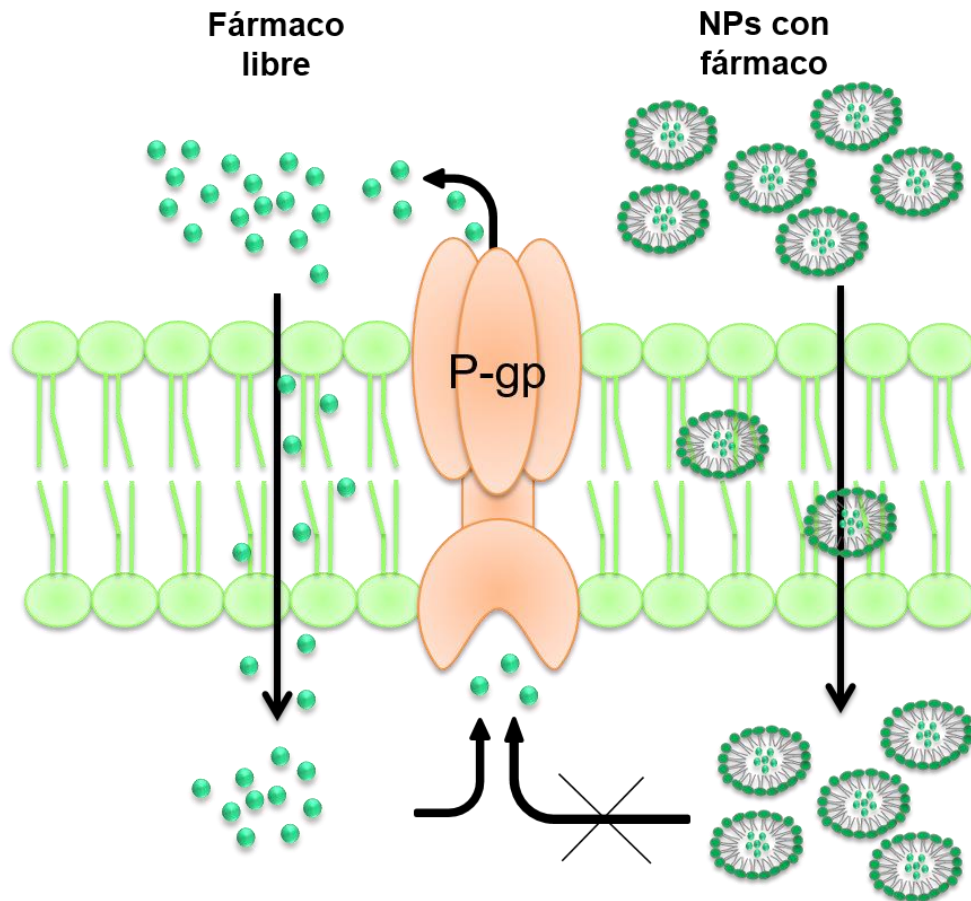


Figura 13: Efecto de las NPs sobre el mecanismo de resistencia a multidroga basado en P-gp. Esta proteína transmembrana reconoce diferentes fármacos antitumorales y los expulsa al medio extracelular, aumentando la resistencia a la quimioterapia tradicional. Con las NPs se podría evitar el reconocimiento de los fármacos por la P-gp y superar este tipo de resistencia.

4. 2. TIPOS DE NANOFORMULACIONES

La inminente necesidad de encontrar terapias eficaces que mejoren la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes con cáncer, ha fomentado el desarrollo de diversos tipos de nanoformulaciones que podrían superar las limitaciones de los tratamientos actuales (Figura 14). Concretamente, las estrategias terapéuticas actuales abarcan la encapsulación de fármacos, enzimas, antioxidantes o moléculas de ADN o ARN en alguno de estos nanosistemas su protección, transporte y liberación en las células tumorales. A continuación, se comentan los tipos de nanoformulaciones más relevantes en nanomedicina para el tratamiento del cáncer.

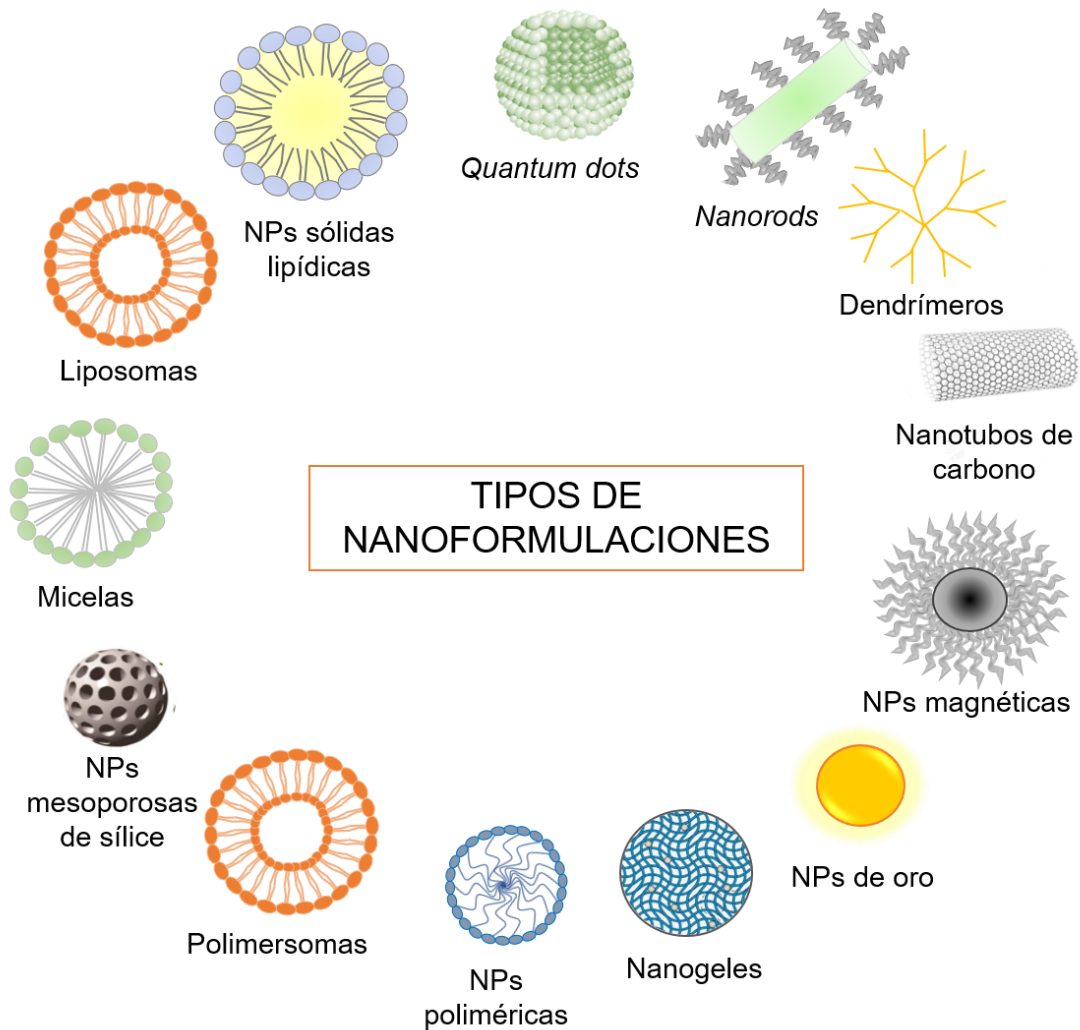


Figura 14: Tipos de nanoformulaciones empleadas para el tratamiento y diagnóstico del cáncer.

4. 2. 1. Liposomas

Los liposomas son vesículas esféricas de carácter anfipático formadas por una bicapa lipídica de fosfolípidos con un núcleo acuoso. Se diferencian de las micelas porque estas sólo poseen una monocapa lipídica. Este tipo de nanosistema permite la incorporación de fármacos hidrófilos, encapsulados en el núcleo acuoso, y fármacos hidrófobos, insertados en la región hidrófoba de la bicapa lipídica. (Vieira y Gamarra, 2016; Ortiz y cols., 2017). La baja toxicidad y elevada biocompatibilidad de los liposomas, debido a la naturaleza de su composición muy similar a la membrana celular, los han convertido en una de las nanoformulaciones más estudiadas y con más éxito clínico. Estos nanosistemas se han asociado a numerosos fármacos antitumorales como la DOX, PTX, oxaliplatino, irinotecán, cisplatino o daunorrubicina, entre otros (Slingerland y cols., 2012). Concretamente, los liposomas han mostrado una elevada eficiencia de encapsulación de antraciclinas como la DOX, daunorrubicina y epirubicina, además de reducir significativamente la cardiotoxicidad asociada a estos antitumorales, en comparación con los fármacos libres

(Bozzuto y Molinari, 2015). Asimismo, los liposomas catiónicos también se emplean en terapia génica para la encapsulación de moléculas de ADN o ARN con carga negativa, lo que demuestra la versatilidad de esta nanoformulación como nanomedicina (Vieira y Gamarra, 2016).

Los liposomas pueden clasificarse según el método de preparación, el tamaño o la lamellaridad. El tamaño puede variar entre nanómetros y micrómetros, aunque los liposomas con diámetros entre 50 y 450 nm son los más empleados para fines terapéuticos. En cuanto a la lamellaridad, se distinguen los liposomas multilamelares (MLV) y los unilamelares (ULV) (Figura 15). Los liposomas MLV tienen un tamaño comprendido entre 0.1 y 10 μm y están compuestos de varias bicapas lipídicas concéntricas y, por ende, varios compartimentos acuosos, mientras que los liposomas ULV tienen un menor tamaño y poseen una única bicapa lipídica y un único núcleo acuoso, y suelen obtenerse mediante el tratamiento con ultrasonidos de los MLV (Akbarzadeh y cols., 2013; Bozzuto y Molinari, 2015). Dentro de los ULV se distinguen tres tipos, las vesículas unilamelares pequeñas (SUV), con un tamaño menor de 100 nm, y las vesículas unilamelares grandes (LUV), con un tamaño de 100 – 500 nm, y las vesículas unilamelares gigantes (GUV), con un tamaño superior a 1 μm (Lanio y cols., 2009).

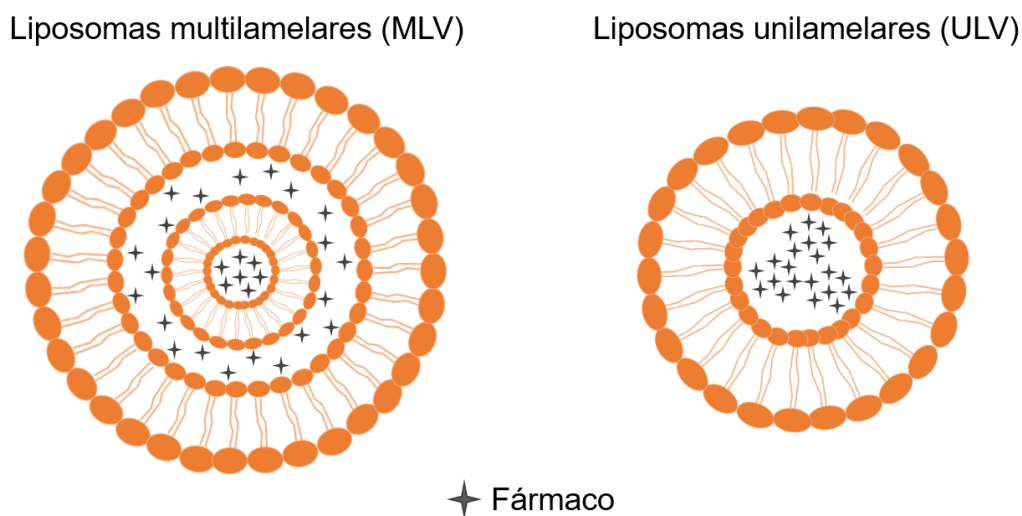


Figura 15: Tipos de liposomas según la lamellaridad.

En los últimos años se han desarrollado diferentes estrategias para mejorar y focalizar el transporte de los fármacos hacia los tejidos tumorales utilizando liposomas. Una de estas estrategias es la modificación de la superficie de los liposomas bien mediante el recubrimiento con polímeros, como el PEG, que aumentan el tiempo de circulación en el organismo y evitan la opsonización y, por tanto, el consiguiente reconocimiento por el SRE, o bien mediante la unión de anticuerpos, aptámeros o péptidos específicos que promueven

el direccionamiento activo (Akbarzadeh y cols., 2013; Belhadj y cols., 2017; He y Tang, 2017; Mozar y Chowdhury, 2018). Un ejemplo de este tipo de estrategias es el estudio realizado por Ju y cols., que ha demostrado que los liposomas modificados con péptidos que mejoran la penetración de estas nanoformulaciones *in vitro* y aumentan el efecto antitumoral del PTX en las células resistentes LLT de cáncer de pulmón no pequeñas. Además, también observaron que estas formulaciones provocaron una reducción de dos veces del volumen del tumor en ratones con tumores inducidos, en comparación con el PTX libre (Ju y cols., 2018).

Otro tipo de estrategia que se está empleando en los últimos años, es el uso de nanoformulaciones sensibles a ciertos estímulos, como la temperatura o los cambios de pH. Estos nanosistemas tienen un alto potencial terapéutico al dirigir la liberación de fármacos a los puntos específicos donde se producen estos estímulos. Un ejemplo de este tipo de formulaciones son los liposomas sensibles a pH, que inducen la liberación del fármaco en ambientes ácidos donde la membrana lipídica se desestabiliza mediante la protonación, como pueden ser el microambiente tumoral o el interior de endosomas o lisosomas (pH 5,5). Este es el caso de los liposomas desarrollados por Shi y cols., una nanoformulación cargada con PTX y funcionalizada con un péptido que mejora la internalización celular y la penetrabilidad a través de la barrera hematoencefálica para alcanzar los tumores cerebrales. Estos liposomas cargados con PTX mostraron una IC_{50} 2.6 y 6.78 veces más baja que el PTX libre en células tumorales de glioma y CSCs, respectivamente. Además, se observó una mayor capacidad de penetración en las regiones más profundas de los esferoides de glioma a pH ácido mediante imágenes de fluorescencia con liposomas marcados con cumarina. Además, los ensayos *in vivo* mostraron un aumento significativo en la supervivencia media en modelos de glioma de ratón tratados con los liposomas de 19,5 días, en comparación con PTX libre (Banerjee y cols., 2012; Shi y cols., 2015).

En la actualidad, no solo se están testando diversas formulaciones lipídicas en ensayos *in vitro* e *in vivo*, sino que ya existen formulaciones que se encuentran en fases avanzadas de ensayos clínicos, o incluso aprobadas para su aplicación clínica (Tabla 5). De hecho, la primera nanoformulación aprobada por la FDA para el tratamiento del cáncer fue en 1995 el Doxil®/Caelyx®, liposomas cargados con DOX y una envuelta de PEG que reduce la toxicidad sistémica gracias al efecto EPR (Bozzuto y Molinari, 2015). En la actualidad, se han aprobado otras seis formulaciones lipídicas con DOX (Myocet® y Lipo-Dox®), daunorrubicina (DaunoXome®), citarabina (DepoCyt®), vincristina (Marqibo®) y mifamurtida (Mepact®), que reducen la toxicidad y aumentan el tiempo de circulación de los fármacos (Frampton, 2010; Gokbuget y cols., 2011; Barenholz, 2012; Slingerland y cols., 2012; O'Brien y cols., 2013).

Tabla 5: Formulaciones de liposomas aprobadas en clínica para el tratamiento del cáncer.

Nombre comercial	Fármaco	Tipo de cáncer
Doxil®/Caelyx®	DOX	Sarcoma de Kaposi, ovario, mama, mieloma múltiple
Myocet®	DOX	Mama
Lipo-Dox®	DOX	Sarcoma de Kaposi, ovario, mama
DaunoXome®	Daunorrubicina	Sarcoma de Kaposi
DepoCyt®	Citarabina	Meningitis neoplásica
Marqibo®	Vincristina	Leucemia linfoide aguda
Mepact®	Mifamurtida	Osteosarcoma

Recientemente, se ha desarrollado un tipo de liposoma compuesto de colesterol y lecitina y cargado con PTX, conocido comercialmente como Lipusu®. Esta formulación está aprobada para su aplicación clínica en China desde 2006 para el tratamiento del cáncer de ovario, mama, CPCNP, estómago y cabeza y cuello. Sin embargo, aún no ha sido aprobado por la FDA o la EMA. Este liposoma ha demostrado un efecto antitumoral similar al fármaco libre, pero muestra una menor toxicidad sistémica. Además, hay otros dos tipos de liposomas asociados a PTX que se encuentran en ensayos clínicos (LEP-ETU y EndoTag-1) (Koudelka y Turanek, 2012; Slingerland y cols., 2013; Bernabeu y cols., 2017).

Sin embargo, a pesar del gran potencial de los liposomas como nanomedicinas, se requieren más esfuerzos para mejorar las limitaciones asociadas con este tipo de nanoformulaciones para lograr superar los ensayos clínicos, como son la liberación anticipada de medicamentos, la rápida eliminación por el SRE, la baja estabilidad o la baja eficiencia de la encapsulación de medicamentos (Naseri y cols., 2015; Tapeinos y cols., 2017).

4. 2. 2. Nanopartículas sólidas lipídicas

Otro tipo de nanoformulación basada en lípidos son las nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs), compuestas por una matriz de lípidos que son sólidos a temperatura fisiológica y estabilizadas con surfactantes como polímeros, lecitinas, polisorbatos o monoglicéridos polioxietilenados. Los lípidos empleados más frecuentemente para la síntesis de este tipo de NPs son 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) (Pizzol y cols., 2014, Dolatabadi y Omid, 2016). Estas nanoformulaciones presentan múltiples ventajas frente a otros sistemas lipídicos, como son la estabilidad física que proporciona protección a los fármacos encapsulados y evita su liberación anticipada y los menores costes en la producción a gran escala. Además, presentan una gran versatilidad ya que permite diversas modificaciones de su superficie para mejorar el direccionamiento activo o la sensibilidad a estímulos (como cambios de pH o temperatura), y una gran biocompatibilidad que les permite escapar más fácilmente del sistema reticuloendotelial (Jabir y cols., 2012, Dolatabadi y Omid, 2016). Asimismo, algunos estudios han demostrado la capacidad de estos sistemas de atravesar la barrera hematoencefálica. Martins y cols. diseñaron unas SLNs cargadas con camptotecina con las que fue posible detectar el fármaco en el cerebro de ratas tras 24 horas desde la administración de las SLNs, mientras que el fármaco libre no se detectó a partir de las 8 horas (Martins y cols., 2013).

Las SLNs cargadas con fármacos antitumorales también han demostrado reducir los efectos secundarios asociados a estos compuestos en algunos estudios. Este es el caso de las SLNs asociadas a temozolamida diseñadas por Huang y cols. para tratar tumores cerebrales, con las que observaron una reducción de la toxicidad cardíaca y renal en ratones (Huang y cols., 2008). Otras SLNs cargadas con PTX también mostraron una menor toxicidad renal que el fármaco libre *in vivo* en ratones inmunodeprimidos con tumores de mama inducidos, además de una mayor inhibición del crecimiento tumoral (Baek y cols., 2015). Asimismo, las SLNs de tripalmitina cargadas con PTX desarrolladas por Leiva y cols. han mostrado capacidad para eludir la resistencia multidrogas mediada por P-gp, así como una mayor actividad antitumoral en CSCs derivadas de líneas tumorales de pulmón y mama (Leiva y cols., 2017).

A pesar de las numerosas ventajas de estas SLNs, su aplicabilidad está limitada por la baja capacidad de encapsulación del fármaco, debido a su estructura cristalizada y la tendencia a la agregación y la gelificación. En un esfuerzo por mejorar estas limitaciones de las SLNs, está emergiendo una nueva generación de nanoformulaciones lipídicas, los transportadores lipídicos nanoestructurados (NLCs). Este nanosistema está compuesto por una mezcla de lípidos líquidos y sólidos a temperatura ambiente que le da una estructura cristalizada con más imperfecciones que las SLNs, lo que le permite aumentar la capacidad de carga del fármaco. Esta formulación no solo aumenta la capacidad de carga de los medicamentos en la estructura lipídica imperfecta, sino que también reduce la expulsión del medicamento durante el almacenamiento (Dolatabadi y Omid, 2016). Zhou y cols. han diseñado dos tipos de NLCs para mejorar el tratamiento del cáncer de pulmón, unos funcionalizados con un péptido específico frente a las CSCs y cargados con salinomycin, y

otros funcionalizados con un péptido frente al factor de crecimiento epidérmico (EGFP), sobreexpresado en la membrana de las células tumorales de pulmón, y cargados con PTX. El tratamiento combinado con ambos tipos de NLCs funcionalizados consiguió alcanzar un índice de inhibición del tumor del 53,24%, frente al 26,86% obtenido con los NLCs sin funcionalizar, *in vivo* en modelos de ratón, lo que sugiere que este tipo de formulaciones pueden ser una estrategia potencial para el tratamiento del cáncer (Zhou y cols., 2019).

4. 2. 3. Polimersomas

Los polimersomas son vesículas poliméricas con una bicapa similar a la de los liposomas compuesta de copolímeros sintéticos en bloque. Al igual que con los liposomas, el carácter anfipático de los polímeros permiten la encapsulación de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos. Este tipo de nanoformulación presenta una alta estabilidad, biocompatibilidad y un prolongado tiempo de circulación, lo que los hace adecuados para su posible aplicación *in vivo*. En los últimos años se han estado empleado como vehículo para el transporte, direccionamiento y liberación de agentes terapéuticos y como herramienta de diagnóstico no invasivo por imagen (Guan y cols., 2015; Tuguntaev y cols., 2016; Ortiz y cols., 2017). Así, polimersomas de poliéster y PEG diseñados por Ahmed y cols. se emplearon para encapsular PTX y DOX para el tratamiento del cáncer de mama en ensayos *in vivo* consiguiendo mejores resultados que con los fármacos libres (Ahmed y cols., 2006).

La posibilidad de modificar la superficie de los polimersomas amplía sus aplicaciones terapéuticas. Yang y cols. han encapsulado metotrexato disódico, un antitumoral empleado en el tratamiento del cáncer de pulmón, en polimersomas funcionalizados con un péptido específico que facilita la internalización celular y han conseguido aumentar la eficacia del fármaco en la línea tumoral de pulmón A549, así como una obtener una completa inhibición en la progresión tumoral y una mejora de la supervivencia en comparación con el metotrexato libre. Los polimersomas consiguieron aumentar la acumulación del fármaco en el tejido tumoral lo que habla de una mejora en la biodistribución del mismo (Yang y cols., 2018). Estudios de otros autores que ha sintetizado polimersomas funcionalizados con un péptido específico frente a las células tumorales de pulmón para la encapsulación del fármaco pemetrexed disódico, corroboran la utilidad clínica de estos sistemas. En este caso, el aumento del tiempo de circulación del fármaco (hasta 22 veces más) y la presencia en los tumores (hasta 9 veces más) condujo a una mayor supresión del crecimiento tumoral y una mayor supervivencia que con la formulación comercial normal del fármaco (Yang y cols., 2018).

4. 2. 4. *Micelas poliméricas*

Las micelas son sistemas que se forman por el autoensamblaje de moléculas anfipáticas en agua. Presentan una estructura compuesta de un núcleo hidrófobo y una superficie hidrofílica, lo que los convierte en nanoformulaciones idóneas para la encapsulación de fármacos hidrófobos, evitando así el uso de solventes orgánicos que pueden incrementar la toxicidad sistémica de los tratamientos. Además, no solo mejoran la solubilidad de estos fármacos, sino que han mostrado una alta biocompatibilidad y una mayor absorción y penetrabilidad en los tejidos (Thipparaboina y cols., 2015; Yu y cols., 2019).

El tipo de micela más estudiada ha sido la polimérica, ampliamente ensayada para liberación de fármacos. De hecho, una micela polimérica formada por PEG y PLA asociada a PTX para el tratamiento clínico del cáncer de mama y ovario y CPCNP, (Genexol-PM®) ha sido la primera micela comercializada. La principal ventaja de esta micela es que permite incrementar la dosis de PTX administrada con respecto al Taxol® sin aumentar la toxicidad sistémica, motivo este último, por el que suele abandonar el tratamiento (Kim y cols., 2004; Lim y cols., 2010; Bernabeu y cols., 2017; Park y cols., 2017). Otras dos formulaciones de micelas poliméricas comerciales asociadas a PTX que aún no han sido aprobadas en EEUU y Europa que son Nanoxel® y Paclical®. La primera es una micela polimérica compuesta de un co-polímero de N-isopropilacrilamida y vinilpirrolidona con sensibilidad a pH, de forma que se induce la liberación del PTX en condiciones de pH ácido, como el del microambiente tumoral. Esta formulación actualmente está aceptada en India para el tratamiento del cáncer de mama metastásico y ovario, además de para CPCNP y el sarcoma de Kaposi. La segunda, el Paclical®, es una micela compuesta de un derivado de retinol y fue aprobada en 2015 para el tratamiento del cáncer de ovario en combinación con carboplatino en Rusia. Sin embargo, aún se requiere un gran esfuerzo para mejorar las propiedades y solventar las limitaciones de estas formulaciones, ya que ninguna ha conseguido desplazar al Taxol® en la clínica (Bernabeu y cols., 2017).

A día de hoy existen numerosos estudios preclínicos con este tipo de nanoformulaciones. Un ejemplo son las micelas de monometoxipolietilenglicol y PCL que se emplearon para la encapsulación de quercetín, una molécula hidrófoba con propiedades antiinflamatorias y antioxidantes utilizada en el tratamiento del cáncer de colon. Los ensayos *in vivo* en ratones con tumores de colon inducidos mostraron una mayor inhibición del crecimiento tumoral y una reducción de la angiogénesis tumoral, en comparación con el fármaco libre (Xu y cols., 2015).

Las micelas poliméricas también se están estudiando para la terapia conjugada con múltiples fármacos, una estrategia ampliamente utilizada en clínica por ser capaz de

aumentar la eficacia antitumoral. En este campo, las nanoformulaciones no solo permiten mejorar la sinergia de los fármacos al inducir la liberación simultánea de ambos, sino también dirigir y focalizar el efecto antitumoral en el tejido tumoral mediante el uso de ligandos, como pueden ser el ácido fólico, ácido hialurónico, transferrina, aptámeros o lipoproteínas de baja densidad, o anticuerpos monoclonales (Yu y cols., 2019). Ma y cols. diseñaron unas micelas para la liberación combinada de DOX y curcumina, compuestas por vitamina E y funcionalizadas con ácido hialurónico, un ligando que ha mostrado afinidad por la proteína CD44, que juega un importante papel en la proliferación, invasión y metástasis tumoral. Los resultados con estas micelas mostraron un aumento en la acumulación de los fármacos en el tejido tumoral, además de una mayor inhibición del crecimiento tumoral y una reducción de los efectos secundarios, en comparación con las micelas sin funcionalizar (Ma y cols., 2017).

4. 2. 5. *Nanopartículas poliméricas*

Las NPs poliméricas son sistemas coloidales que se generan a partir de la agregación o autoensamblaje de polímeros y que tienen un tamaño inferior a un micrómetro. En el desarrollo de este tipo de nanoformulaciones se han empleado diversos tipos de polímeros, algunos naturales como la albúmina, gelatina, alginato, dextrano, heparina, colágeno o quitosano, y otros sintéticos como PEG, PCL, PLA, PLGA, polimetacrilato (PMA), poli(butilcianoacrilato) (PBCA) o pluronic, entre otros. Estas NPs poliméricas pueden clasificarse según el método de preparación en nanocápsulas, que presentan una matriz líquida rodeada por una cubierta polimérica, y nanoesferas, que es una matriz sólida de polímeros ensamblados. En el caso de las nanocápsulas, el fármaco vehiculizado quedaría embebido en la matriz líquida, mientras que, en las nanoesferas, el fármaco podría ir encapsulado en el núcleo interno o asociado a la superficie de la NPs (Wang y cols., 2009; Jabir y cols., 2012).

Una de las principales ventajas que tienen estas formulaciones es que suelen emplearse polímeros biocompatibles y biodegradables, de forma que durante su degradación no se generan metabolitos que puedan inducir toxicidad *in vivo*. Además, estos sistemas poliméricos pueden tener propiedades para proteger los fármacos de la degradación, mejorar la eficiencia antitumoral, inducir una liberación controlada del fármaco, favorecer el direccionamiento activo mediante la adición de anticuerpos, péptidos u otras moléculas específicas frente a las células tumorales permitir la coencapsulación de dos fármacos diferentes. Al mismo tiempo, estas NPs proporcionan una gran ventaja frente a otros sistemas, como los lipídicos, y es que admiten una elevada carga de fármaco, una característica importante para poder alcanzar los ensayos clínicos (Wang y cols., 2009; Hu y cols., 2010; Liechty y cols., 2010; Paranjpe y Muller-Goymann, 2014).

Numerosos estudios han demostrado la potencialidad y versatilidad de este tipo de sistemas. De hecho, las primeras NPs poliméricas aprobadas por la FDA y EMA para su aplicación clínica en el tratamiento de pacientes con CPCNP, han sido unas NPs de albúmina cargadas con PTX conocidas como Abraxane®. Esta formulación ha demostrado en estudios clínicos que incrementa la dosis máxima tolerada de PTX, al evitar el uso del Cremophor, y mejora la acumulación del fármaco en el tumor en comparación con la formulación comercial Taxol® (Ma y Mumper, 2013; Blair y Deeks, 2015; Gridelli y Sacco 2016; Louage y cols., 2017). Además, se han desarrollado otras formulaciones que se encuentran bajo estudio en ensayos clínicos. Este es el caso de Opaxio®, una NP de ácido poli(glutámico) conjugada con PTX que se encuentra actualmente en fase III para el tratamiento del cáncer de ovario y pulmón, y que ha demostrado un aumento de la vida media del PTX respecto a la formulación comercial (Bernabeu y cols., 2017). Otro ejemplo son las NPs poliméricas funcionalizadas con el antígeno prostático específico de membrana y cargadas con docetaxel (BIND-014) que se encuentra en fase I para el tratamiento del cáncer metastásico de tumores sólidos con resultados prometedores (Von Hoff y cols., 2016).

4. 2. 6. Nanopartículas magnéticas

Las NPs magnéticas son nanoformulaciones sintetizadas con materiales que presentan propiedades magnéticas o paramagnéticas, como el cobalto (Co), el níquel (Ni), el manganeso (Mn), el cinc (Zn) y el hierro (Fe). Una de las principales ventajas de este tipo de nanoformulaciones es que pueden ser direccionadas activamente hacia los tejidos tumorales mediante la aplicación de un campo magnético externo, favoreciendo la acumulación de dichas partículas en el tumor. Además, sus propiedades magnéticas no solo las hace adecuadas para el tratamiento del cáncer, sino que también tiene un gran potencial como herramienta de diagnóstico (Akbarzadeh y cols., 2012; Doello y cols., 2015). Las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONs, por sus siglas en inglés) son el tipo de NPs magnéticas más ampliamente utilizados en la terapia del cáncer, la terapia fototérmica y el diagnóstico por imágenes de resonancia magnética como agentes de contraste, debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, comportamiento superparamagnético y capacidad para modificar su superficie con anticuerpos, receptores y otros elementos. Las SPIONs están compuestas por un núcleo de hierro y pueden ser recubiertas con lípidos, polímeros o polisacáridos para favorecer la estabilidad y prolongar su tiempo de circulación (Santhosh y Ulrich, 2013; Gobbo y cols., 2015; Tietze y cols., 2015). Actualmente, existen dos tipos de partículas SPIONs que se han aprobado clínicamente como agentes de contraste, como son Feridex® y Resovist®. Estas SPIONs se administran de forma intravenosa y se eliminan de la sangre mediante el sistema reticuloendotelial, de forma que se puede observar captación en el hígado, bazo, médula ósea y ganglios linfáticos.

INTRODUCCIÓN

Estas dos partículas están aprobadas específicamente para la IRM del hígado. Asimismo, Combidex® otro tipo de SPIONs se han diseñado para la monitorización de los ganglios linfáticos, pero aún no ha sido aprobado para su uso clínico por la FDA (Wang, 2011).

No obstante, las SPIONs pueden diseñarse para realizar múltiples funciones; son las conocidas “nanopartículas teragnósticas” capaces de que integran las funciones de diagnóstico y terapia antitumoral en una misma formulación (Santhosh y Ulrich, 2013; Gobbo y cols., 2015). Este es el caso de las SPIONs cargadas con DOX desarrolladas por Maeng y cols., que demostró ser un agente de contraste para IRM más sensible que otros convencionales. Al mismo tiempo, los estudios *in vivo* con ratas y conejos con tumores hepáticos inducidos mostraron que el tratamiento con estas SPIONs causó una disminución significativa del volumen del tumor en comparación con los grupos tratados con DOX libre (Maeng y cols., 2010).

Otra de las estrategias terapéuticas frente al cáncer que implica el uso de NPs magnéticas, es la hipertermia. Esta estrategia se basa en la exposición de las células cancerígenas a altas temperaturas (43-49 °C), dado que presentan una menor resistencia a estas temperaturas que las células sanas, por lo que se minimizaría el daño en los tejidos normales. Concretamente, la hipertermia magnética permite inducir localmente un aumento de temperatura por medio de las pérdidas de energía magnética de las nanopartículas magnéticas bajo un campo magnético oscilante (Banobre-Lopez y cols., 2013; Hervault y Thanh, 2014). Este tipo de estrategia ya se ha experimentado en ratones con tumores inducidos donde se han obtenido resultados prometedores. De hecho, Resovist® ha mostrado una importante inhibición del crecimiento tumoral de hasta 5 veces en comparación con el control en ratones inmunodeprimidos con xenoinjertos de cáncer de pulmón humano (Araya y cols., 2013). Sin embargo, en los últimos años la estrategia más empleada es la combinación de hipertermia con fármacos quimioterápicos (Hervault y Thanh, 2014). Un buen ejemplo son los magnetoliposomas desarrollados por Babincová y cols., un liposoma cargado con SPIONs y con el fármaco DOX para el tratamiento de gliomas. Los resultados *in vitro* mostraron que los magnetoliposomas expuestos a un campo magnético externo son capaces de combinar la hipertermia con la liberación controlada de la DOX, provocando una reducción significativa de la viabilidad celular de células de glioma de ratón (línea C6). Además, los resultados *in vivo* mostraron que la aplicación de la DOX libre provocó un crecimiento más lento del tumor, mientras que la combinación de la hipertermia y la DOX provocó una regresión completa del tumor tras 28 días (Babincova y cols., 2018). Estos resultados demuestran el gran potencial de este tipo de nanopartículas para el tratamiento del cáncer, aunque aún quedan muchos estudios para garantizar la

ausencia de toxicidad y la biocompatibilidad de estos sistemas *in vivo* para su aplicación clínica.

4. 3. NANOFORMULACIONES CON PACLITAXEL

El PTX, tal y como comentamos previamente, es un fármaco de elección para cáncer de pulmón presenta numerosas limitaciones que dificultan su uso clínico. Su encapsulación en nanoformulaciones permite superar muchas de estas limitaciones, como son el aumento de solubilidad sin necesidad de excipientes orgánicos, la baja eficacia antitumoral, la especificidad frente a tumor el daño en tejidos sanos y la evasión de los mecanismos de resistencia a fármacos que desarrollan algunas células tumorales (Surapaneni y cols., 2012; Feng y Mumper, 2013; Ortiz y cols., 2017; Shi, y cols., 2017).

En los últimos años, se han desarrollado numerosos tipos de nanoformulaciones asociadas a PTX como Abraxane®. Sin embargo, aunque Nab-PTX incrementa la dosis máxima tolerada de PTX frente al Taxol® y mejora la acumulación del fármaco en el tejido tumoral por el efecto EPR, esta formulación también presenta graves limitaciones. A su elevado coste de producción se le suma el hecho de que estas NPs de albúmina replican muchos de los efectos secundarios más indeseados del Taxol®, como son las reacciones de hipersensibilidad, neutropenia, neuropatía, mialgia, anemia y trombocitopenia. De hecho, Abraxane® induce un grado más severo de neuropatía periférica dolorosa que el Taxol® (Yamashita y cols., 2011; Socinski y cols., 2012; Gupta y cols., 2014; Hirsh, 2014). Como ya vimos, se han desarrollado otras formulaciones asociadas a PTX como Lipusu® o Nanoxel® o Genexol-PM®, que han logrado superar algunos de los inconvenientes de la formulación comercial del PTX. Además, se encuentran en distintas fases de ensayos clínicos nanoformulaciones como LEP-ETU y EndoTag-1, para el tratamiento del cáncer de mama, y Opaxio®, para el tratamiento del cáncer de ovario y pulmón (Koudelka y Turanek, 2012; Slingerland y cols., 2013; Nehate y cols., 2014; Bernabeu y cols., 2017). Sin embargo, ninguna de las formulaciones anteriores, excluyendo a Abraxane®, se emplea en clínica en EEUU o Europa y la mayoría no logra superar las primeras fases de ensayos clínicos. Por tanto, es esencial el desarrollo de nuevas nanoformulaciones que mejoren la actividad de PTX reduciendo sus efectos secundarios y mejorando su uso clínico.

La presente tesis doctoral utiliza dos nanoformulaciones asociadas a PTX, NPs de PLGA y los liposomas catiónicos, para conseguir este objetivo, siendo sus características más destacadas las siguientes:

4. 3. 1. Nanopartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico)

Este nanosistema, frecuentemente empleados para para la encapsulación de fármacos, presenta alta biocompatibilidad y gran estabilidad y biodegradabilidad en monómeros de ácido láctico y glicólico que son fácilmente metabolizados mediante el ciclo de Krebs a CO₂ y H₂O, minimizando la toxicidad sistémica (Parveen y Sahoo, 2011; Sadat Tabatabaei Mirakabad y cols., 2014). Estas NPs se han empleado para la encapsulación de diversos tipos de fármacos para el tratamiento del cáncer como el PTX, doxorubicina, cisplatino, camptotecina, etopósido, curcumina o rapamicina, mediante estrategias de direccionamiento activo, facilitado por el efecto EPR, o pasivo, con la adición de péptidos, anticuerpos u otros ligandos (Figura 16) (Danhier y cols., 2012; Sadat Tabatabaei Mirakabad y cols., 2014). En esta tesis doctoral, se han realizado estudios con NPs de PLGA cargadas con PTX en distintos modelos *in vitro* e *in vivo* de cáncer de pulmón. Durante la polimerización, los monómeros de ácido láctico o glicólico se unen mediante enlaces éster para formar los copolímeros de PLGA, pudiendo variar la proporción de monómeros y, en consecuencia, algunas de sus propiedades. Por ejemplo, el tiempo de degradación es menor para los copolímeros con un menor peso molecular e hidrofobicidad. En el caso de los copolímeros con una mayor proporción de ácido láctico, el tiempo de degradación es más gradual debido a que este monómero es más hidrofóbico y tiene un mayor peso molecular que el ácido glicólico.

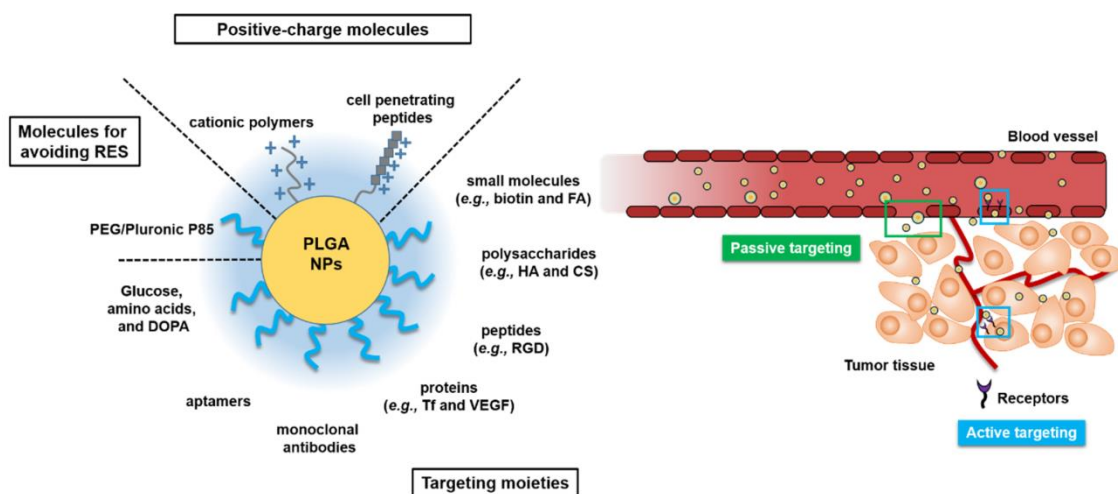


Figura 16: Nanopartículas de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) en las que se propone ingeniería de superficie para la orientación pasiva o activa del tumor. Arg-Gly-Asp (RGD); quitosano (CS); dopamina (DOPA); ácido fólico (FA); ácido hialurónico (HA); poli (etilenglicol) (PEG); sistema reticuloendotelial (RES); transferrina (Tf); factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Kim y cols. Various surface-engineered poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles (NPs). Recuperado con el permiso de Pharmaceutics. 2019 Jun 14;11(6) (Kim y cols., 2019).

En la actualidad, los polímeros de PLGA pueden encontrarse en el mercado con diferentes pesos moleculares y composición de los copolímeros (Sadat Tabatabaei Mirakabad y cols., 2014), y cuyo uso clínico está aprobado por la FDA y la EMA. Algunas de estas formulaciones de micropartículas son Somatuline® LA, Nutropin Depot®, Lupron Depot®, Arestin®, Decapeptul®, Suprecur® MP, Sandostatin LAR® o Trelstar™ Depot (Mundargi y cols., 2008). Estas NPs son capaces de proteger los fármacos de su degradación y favorecen la liberación controlada de éstos en las células tumorales, prolongando el efecto del tratamiento (Jabir y cols., 2012; Sadat Tabatabaei Mirakabad y cols., 2014).

4. 3. 2. *Liposomas catiónicos*

Estas nanoformulaciones ha permitido mejorar alguna de las limitaciones más indeseables de los medicamentos, como el aumento de solubilidad o la resistencia a multidroga (Leonessa y Clarke, 2003; Weiszhar y cols., 2012). La encapsulación de fármacos como el PTX en liposomas catiónicos aumenta su efecto antitumoral dado el incremento de su internalización en las células tumorales en las que la membrana posee una alta carga negativa (fosfatidilserinas, proteoglicanos y proteínas de membrana) que aumenta la afinidad por los liposomas (He y Tang, 2018). A pesar de que los liposomas catiónicos pueden ser más citotóxicos que los aniónicos o neutros a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y que pueden ser más fácilmente reconocidos el SRE, la adición de una capa de PEG, puede solventar estas limitaciones (He y Tang, 2018).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis doctoral es evaluar la capacidad de nanopartículas poliméricas de PLGA y de liposomas catiónicos cargados con PTX para mejorar el efecto antitumoral de este fármaco en modelos *in vitro* e *in vivo* de cáncer de pulmón, así como de evitar algunos de los efectos secundarios asociados al tratamiento con el PTX.

Los objetivos específicos:

- 1) Sintetizar y caracterizar NPs poliméricas de PLGA y liposomas catiónicos capaces de encapsular el PTX con la máxima eficiencia.
- 2) Determinar la actividad antiproliferativa de las NPs de PLGA y los liposomas catiónicos cargados con PTX *in vitro* usando cultivos en monocapa de células tumorales de pulmón, así como en una línea normal de pulmón.
- 3) Analizar si la encapsulación del PTX en las nanoformulaciones modifica el mecanismo de acción del fármaco mediante estudios de ciclo celular y apoptosis.
- 4) Determinar la actividad antiproliferativa de las formulaciones en modelos MTS, que remedan los tumores *in vivo*.
- 5) Analizar la actividad antineoplásica de las NPs de PLGA y los liposomas catiónicos sobre cultivos de CSCs aisladas de una línea tumoral de pulmón.
- 6) Determinar la mejora del efecto antitumoral del PTX con el uso de nanoformulaciones *in vivo* en modelos de ratón con tumores inducidos de cáncer de pulmón.
- 7) Analizar si la encapsulación del PTX en los liposomas catiónicos puede proteger de la neuropatía periférica dolorosa inducida por el fármaco.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. SÍNTESIS DE NPS DE PLGA

Las NPs de PLGA fueron sintetizadas y cedidas por la Dra. Lucía Martín Banderas del grupo de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Nanomedicina del Departamento de Farmacia y Tecnología farmacéutica de la Universidad de Sevilla. Las nanoformulaciones se sintetizaron mediante una modificación del método de nanoprecipitación (Fessi, 1989) para lo que se disolvió conjuntamente polímero de PLGA y Span® 60 en acetona, obteniendo una concentración de polímero de 1.5% (p/v). A continuación, 5 mL de esta solución se añadieron gota a gota (5 mL/min) utilizando una bomba de jeringa (Harvard Apparatus Ltd., Reino Unido), y bajo agitación magnética, a 15 mL de una solución acuosa de Pluronic® F-68 (0.5%, p/v). El contenido de acetona se evaporó a temperatura ambiente (TA) durante 4 horas, tras las cuales la suspensión de NPs se centrifugó a 10000 rpm durante 30 minutos y a 4 °C (Centrífuga Eppendorf 504R, Eppendorf AG, Alemania). Tras realizar dos lavados a la solución con NPs, se resuspendieron en una solución de trehalosa (crioprotector) al 5% (p/v), para posteriormente congelarlas en nitrógeno líquido y liofilizarlas (-80.0 ± 0.5 °C y 0.057 mbar; Cryodos freeze-drier, Telstar Industrial S.L., España). Las NPs cargadas con PTX se obtuvieron añadiendo una cantidad inicial de fármaco del 5, 10 o 15% (p/p) en la solución acetónica de PLGA. De manera similar, para la realización de los ensayos de internalización celular, se cargaron las NPs con el fluoróforo rojo nilo (RN) mediante la incorporación de 100 µL de una solución de acetona 10 mM de RN a la solución orgánica de PLGA, y siguiendo posteriormente los pasos anteriormente descritos. Todas las formulaciones fueron sintetizadas por triplicado (n=3).

2. CARACTERIZACIÓN DE LAS NPS DE PLGA

El diámetro medio y la distribución de tamaño de las NPs vacías y cargadas con PTX se analizó mediante espectroscopia de correlación de fotones (PCS), mientras que el potencial eléctrico de superficie se analizó mediante anemometría láser Doppler usando un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). La caracterización morfológica de las partículas se realizó mediante análisis de imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) en un Philips XL30 (Philips, Alemania). Para esta caracterización se extendió una pequeña muestra de la dispersión de partículas sobre un soporte, que se secó a TA y se revistió con una película delgada de oro.

Por otra parte, se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para determinar la concentración de PTX encapsulado en las NPs. Las condiciones cromatográficas se determinaron utilizando una columna C18 (Spherisorb® 5 µm ODS2, 4.6

x 250 mm Analytical Column, Waters Corp). La fase móvil compuesta de acetonitrilo y agua en proporción 55:45 (v/v) se mantuvo con un flujo de 1000 mL/min y fue filtrada, a través de filtros de nitrocelulosa de 0.22 µm (Merck Millipore, Billerica, MA), y desgasificada al vacío antes de su uso. Además, la longitud de la onda de detección ultravioleta (UV) fue de 227 nm. Para la detección, se pesaron 5 mg de NPs con PTX liofilizadas, se añadió 1 mL de acetonitrilo y se mezcló utilizando un vórtex para disolver las NPs en la fase orgánica. Seguidamente, se inyectaron 10 µL de la solución a analizar, previamente filtrada con un filtro estéril de 0.22 µm, en el sistema de HPLC para la cuantificación de la molécula de PTX. El contenido de fármaco se expresó como una medida de la eficiencia de encapsulación (EE%) y la capacidad de carga de las NPs (DL%), utilizando las siguientes ecuaciones.

$$EE(\%) = \frac{\text{cantidad cuantificada de PTX en las NPs}}{\text{cantidad teórica de PTX en las NPs}} \times 100$$

$$DL(\%) = \frac{\text{masa de PTX en las NPs}}{\text{masa de PTX}} \times 100$$

3. ANÁLISIS DE LA LIBERACIÓN *IN VITRO* DEL PTX DE LAS NPs DE PLGA

El análisis de la liberación *in vitro* del PTX se realizó con NPs de PLGA con concentraciones iniciales de fármaco del 5, 10 y 15% (p/p). Se resuspendieron 4 mg de NPs con PTX liofilizadas en 15 mL de medio de liberación (tampón fostato salino (PBS), pH = 7.4 ± 0.1) que contenía Tween® 80 al 0.1% (p/v) para asegurar el estado de baja concentración. El PBS se mantuvo a 37.0 ± 0.5 °C en agitación mecánica (100 rpm, Unitronic OR horizontal shaker, Selecta S.A., España) durante todo el experimento. Se fueron recogiendo muestras del medio de 500 µL a diferentes intervalos de tiempo, añadiendo un volumen igual de medio de liberación al medio con las NPs para mantener las mismas condiciones tras cada recogida de muestra. Estas muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 minutos (Centrífuga Eppendorf 504R, Eppendorf AG, Alemania) y los sobrenadantes se pasaron a través de un filtro de jeringa de 0.22 µm (Millex®-GV, Millipore, España). Finalmente, 10 µL de cada muestra se inyectaron en el HPLC bajo las condiciones utilizadas anteriormente para evaluar la cantidad de PTX liberado en cada tiempo al medio de liberación. Este PTX liberado a cada tiempo se determinó por triplicado usando una curva de calibración construida en el rango de 47 a 750 µg/mL (r²=0.9986) [límite de detección (LOD) = 5.9 µg/mL; límite de cuantificación (LOQ) = 23.4 µg/mL].

4. SÍNTESIS DE LIPOSOMAS CATIONICOS

En el desarrollo de esta tesis también se han ensayado liposomas catiónicos diseñados por la empresa Nanovex Biotechnologies (España). Estos liposomas pegilados y sin pegilar

se obtuvieron usando las formulaciones listas para usar o *ready-to-use* Pronanosome Lipo-Cat-PEG y Lipo-Cat, respectivamente, proporcionadas por la empresa. Para obtener los liposomas cargados con PTX, se pesaron cantidades precisas de PTX y Pronanosome Lipo-Cat o Lipo-Cat-PEG y se resuspendieron en cloroformo en un matraz de fondo plano. Posteriormente, se eliminó el cloroformo con presión reducida en un rotavapor a 40 °C durante 4 horas (Heidolph, Alemania). La película seca se hidrató durante 45 minutos a 60 °C usando un tampón compuesto por KCl (1.35 mM), NaCl (68.5 mM) KH₂PO₄ (0.75 mM) y Na₂HPO₄ (4.5 mM). Finalmente, la muestra se homogeneizó utilizando un homogeneizador SilentCrusher (Heidolph, Alemania) a 11000 rpm durante 8 minutos y a 60 °C para obtener los liposomas catiónicos de vesículas multilamelares (MLV), nanovesículas con un tamaño ligeramente superior a los 200 nm. Una parte de la muestra se separó para obtener vesículas unilamelares pequeñas (SUV) a partir de las MLV usando proceso de homogenización-sonicación para reducir el tamaño de las nanovesículas por debajo de los 100 nm. Se realizó una homogenización previa a 20000 rpm durante 5 minutos y una posterior sonicación con una sonda de ultrasonidos Sonics (EE.UU.) de 750 W durante 10 segundos a una amplitud del 20% y sonicación por pulsos 1:1.

5. CARACTERIZACIÓN DE LOS LIPOSOMAS CATIONICOS

El tamaño de los liposomas y el índice de polidispersidad (PDI) de la muestra se determinaron mediante dispersión dinámica de la luz (DSL) con un ángulo de 90° usando un Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). Se tomaron tres muestras independientes de cada formulación y las mediciones se realizaron por triplicado a temperatura ambiente y con una dilución 1:100. El potencial eléctrico de superficie de los liposomas fue determinado mediante la medición por Mixed Mode Measurement – Phase Analysis Light Scattering (M3-PALS) usando también el Zetasizer Nano ZS90.

Por otra parte, la concentración de PTX encapsulado en las diferentes formulaciones liposomales se analizó mediante cromatografía de fase inversa (RP-HPLC). Se llevó a cabo una centrifugación suave a 4000 rpm durante 20 minutos antes de la purificación por diálisis. Posteriormente, se colocó una muestra de 2 ml del sobrenadante en un tubo de diálisis SnakeSkin (10k MWCO) (ThermoFisher, EE.UU.). Se sumergió el tubo en 1000 mL de agua desionizada a temperatura ambiente y se agitó a 500 rpm durante 6 horas. Las muestras dializadas y no dializadas se diluyeron 1:25 (v/v) con metanol para facilitar la ruptura de la membrana vesicular y extraer el PTX de los liposomas. Finalmente, el PTX liberado se analizó por RP-HPLC (Shimadzu, Japón) a una longitud de onda de 227 nm con una fase móvil isocrática de acetonitrilo y tampón con ácido ortofosfórico (pH 5).

6. CULTIVOS CELULARES

Para el estudio *in vitro* de la capacidad de mejora de la eficacia antitumoral del PX asociado a nuestras nanoformulaciones respecto del PTX libre, hemos utilizado cuatro líneas tumorales de cáncer de pulmón y una línea normal de pulmón. Además, para determinar su capacidad para evadir los sistemas de resistencia a fármacos hemos utilizado dos líneas de cáncer de colon, con fenotipos resistente y sensible (Tabla 6).

Tabla 6: Líneas celulares de pulmón y colon utilizadas en los ensayos *in vitro*.

Líneas celulares de pulmón	
	Descripción
A549	Adenocarcinoma pulmonar de humano
NCI-H460	Carcinoma pulmonar de células grandes de humano
NCI-H520	Carcinoma de células escamosas humano
LL2	Carcinoma pulmonar de Lewis de ratón
L132	Epitelio pulmonar embrionario de humano
Líneas celulares de colon	
	Descripción
HCT-15	Carcinoma colorrectal resistente
T84	Carcinoma colorrectal sensible

Las líneas A549, LL2, HCT-15 y T84 han sido adquiridas de la *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA) y las líneas L132, NCI-H460 y NCI-H520 fueron proporcionadas por el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Todas las líneas celulares han sido cultivadas con Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma Aldrich, España) suplementado con suero bovino fetal descomplementado (Gibco, España) al 10% y 10mL/L penicilina-estreptomicina al 100X (Sigma Aldrich, España). Los cultivos se mantuvieron en monocapa en un incubador (Steri-Cult CO₂ Incubator, Thermo Electron Corporation, USA) a 37 °C con una atmósfera de CO₂ al 5% y 90% de humedad. La manipulación de los cultivos celulares se llevó a cabo en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar vertical (Aura Vertical S.D.4, Bio Air Instruments, Italia), además de utilizar fungibles y soluciones estériles.

7. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

En el desarrollo de esta tesis se han utilizado ratones hembras inmunocompetentes C57BL/6 con un peso entre 20-25 g (Charles River, Barcelona, España) para estudios de actividad antitumoral, farmacocinética y biodistribución, descritos más adelante, y ratones

hembras CD-1 (Charles River, Barcelona, España) con un peso entre 26 y 32 g para los estudios de comportamiento y dolor neuropático. El cuidado de los animales se realizó de acuerdo con los estándares institucionales (Comité de Ética de la Investigación de la Universidad de Granada, España) y los estándares internacionales (Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas 2010/63). Los ratones se mantuvieron a una habitación con control de temperatura a 22 ± 1 °C, con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad y en un ambiente estéril.

8. ENSAYOS DE HEMOCOMPATIBILIDAD

La hemocompatibilidad de las NPs de PLGA y las diferentes formulaciones de liposomas se analizaron siguiendo el protocolo descrito por Evans y cols. (Evans y cols., 2013). Las muestras de sangre humana fueron cedidas por donantes sanos y recogidas en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para evitar la coagulación. Estos tubos se centrifugaron a 1600 rpm durante 5 minutos. El plasma fue descartado y se realizaron dos lavados con el mismo volumen con NaCl 150 mM (mezclando por inversión y centrifugando las muestras 5 minutos a 1600 rpm). El sobrenadante obtenido fue reemplazado con PBS a pH 7.4 y se realizó una dilución 1:50, descartando la lisis de eritrocitos por la ausencia de sedimentación. De esta dilución se añadieron 190 μ L a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo cónico. Se añadieron por triplicado los diferentes tratamientos con las formulaciones vacías en un rango de concentración de 10-500 μ g/mL en un volumen final de 200 μ L por pocillo. Se utilizó PBS a pH 7.4 como control negativo y Tritón X-100 al 20% como control positivo, ambos por triplicado. La placa se incubó durante una hora a 37 °C y se centrifugó a 1600 rpm durante 5 minutos. Se transfirieron 100 μ L del sobrenadante de cada pocillo a una placa nueva de fondo plano y se midió la hemoglobina liberada a 492 nm con un espectrómetro EX-Thermo Multiskan. El porcentaje de hemólisis para cada concentración de NPs se calculó con la siguiente ecuación:

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

9. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS BLANCAS SANGUÍNEAS

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se aislaron mediante la técnica del gradiente de densidad con Ficoll a partir de muestras de sangre humana de donantes sanos (25 ml) recogidas en un tubo estéril con heparina. Las muestras de sangre se mezclaron con el doble de volumen de PBS. Posteriormente, esta sangre diluida se añadió a un tubo con la mitad del volumen total de Ficoll-Histopaque 10.771 (Sigma Aldrich, España). Este tubo se centrifugó a 1500 rpm durante 30 minutos a 4 °C. La capa intermedia del gradiente con las células mononucleares se recogió en un tubo nuevo y se realizaron dos

lavados con PBS. Las PBMCs obtenidas se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 5×10^4 células por pocillo en medio RPMI suplementado con suero bovino fetal al 10%. Una vez sembradas las células en suspensión, se agregaron los diferentes tratamientos en un rango de concentración de 5 a 750 nM. Tras 72 h de exposición, se determinó la viabilidad celular (VC (%)) utilizando el *Cell Counting Kit-8* (CCK-8) (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japón), añadiendo 10 μ L por pocillo e incubando las células durante 4 horas a 37 °C. Finalmente, se empleó un lector de placas Multiskan EX -Thermo (Flow, Irvine, California) para medir la absorbancia del CCK-8 a 450 nm. El porcentaje de VC se calculó con la siguiente fórmula:

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

10. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN

Los ensayos de proliferación celular se realizaron con el fin de comprobar si las nanoformulaciones aumentaban el efecto antitumoral del PTX respecto a su administración en forma libre. Estos ensayos se llevaron a cabo en placas de 24 pocillos y a una densidad de células definida para cada línea celular. Las células cultivadas en frascos de cultivos de 75 mm³, se despegaron utilizando una solución de tripsina diluida en PBS-EDTA en una dilución 1:3. Se realizó el conteo celular con azul tripán al 0.4% en una cámara de Neubauer. Se sembraron las células en las placas con su medio de cultivo de mantenimiento a una densidad de 5×10^3 células/pocillo en A549 y NCI-H460, 2×10^3 células/pocillo en LL2 y 8×10^3 células/pocillo en la línea normal L132 y con un volumen final de 400 μ L por pocillo. Posteriormente, transcurrida la adhesión celular a las placas unas 12 horas después de la siembra, se procedió a la administración de los fármacos: PTX libre, NPs cargadas con PTX y NPs vacías. Las NPs engloban las NPs de PLGA, y las cuatro formulaciones de liposomas (MLV, SUV, MLV-PEG y SUV-PEG). El estudio del efecto de las NPs blancas (vacías) se realizó como control para comprobar si las nanoformulaciones blancas presentaban toxicidad en los cultivos celulares. Los fármacos se adicionaron en pocillos por duplicado a concentraciones crecientes de PTX en las diferentes formulaciones en dosis comprendidas entre 1-55 nM. Para adicionar las NPs vacías se añadió una cantidad equivalente a la de las nanoformulaciones asociadas con PTX. Los tratamientos fueron mantenidos durante 96 horas, realizando un cambio de medio y nueva adición de fármacos tras 48 horas desde la primera administración. Al finalizar el tratamiento, se procedió a determinar la VC mediante un ensayo colorimétrico con sulforrodamina B (SRB), un colorante que se adhiere a las proteínas básicas de las membranas celulares. Para ello, se fijaron las células a las placas utilizando 300 μ L por pocillo de ácido tricloroacético (TCA) al 10% durante 20 minutos a 4

°C. Posteriormente, tras una serie de 3 lavados con agua destilada, se realizó una tinción con 250 µL por pocillo de una solución de SBR al 0.4% en ácido acético al 1%. Tras 20 minutos en agitación y se lavaron las placas tres veces con ácido acético al 1% para eliminar los restos de SBR. Finalmente, se solubilizó el colorante con 200 µL de Trizma® (10 mM, pH 10.5) y se traspasó el volumen de cada pocillo a dos pocillos de una placa de 96 con 100 µL cada uno, por lo que se obtuvieron 4 réplicas de cada dosis administrada. La absorbancia o densidad óptica (DO) a 492 nm se determinó con un lector de placas Multiskan EX -Thermo (Flow, Irvine, California) y se calculó el porcentaje de VC como se describió anteriormente.

Por otra parte, se ha calculado la IC_{50} de cada tratamiento con el programa GraphPad Prism 6 a partir de los datos de VC, entendiéndose por IC_{50} la dosis a la cual se reduce la VC al 50%, y se ha calculado índice terapéutico (IT), una medida de la mejora que produce un tratamiento frente a otro, indicando el número de veces que se disminuye la IC_{50} del tratamiento de referencia, mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$IT \text{ (índice terapéutico)} = \frac{IC_{50}PTX}{IC_{50}NPS - PTX}$$

11. ANÁLISIS DE CICLO CELULAR

El análisis del ciclo celular se realizó para comprobar que la encapsulación del PTX en nanoformulaciones no modifica su mecanismo de acción, basado en la interacción del fármaco con las subunidades de la tubulina para evitar la despolimerización de los microtúbulos, lo que desencadena una parada en las fases G_2 / M del ciclo celular. Las diferentes líneas celulares se sembraron en placas de 6 pocillos con 1,2 mL de medio de cultivo, y a una densidad de 5×10^4 células por pocillo en las líneas A549 y NCI-H460, 4×10^4 células en LL2 y 6×10^4 células en L132. Transcurridas unas 12 horas de incubación para la adhesión celular a las placas, se realizó un reemplazo del medio de cultivo por un medio libre de suero, con el fin de sincronizar el ciclo de las células. Posteriormente, pasadas 24 horas, se realizó un nuevo cambio de medio de cultivo por DMEM complementado con suero y antibiótico, y se administraron PTX, NPs cargadas con PTX y NPs vacías a la dosis correspondiente a la IC_{50} del PTX libre, dejando tres pocillos de control sin tratamiento. Tras 48 horas desde la adición de las distintas formulaciones, se recogieron en tubos de citometría el medio de cultivo y las células, despegadas con una solución de tripsina diluida en PBS-EDTA (1:3 v/v) y se centrifugaron a 4000 rpm durante 3 minutos. Las células se resuspendieron en 100 µL de PBS y se fijaron con 900 µL de etanol al 70% en frío y en agitación. Se realizó una incubación de 15 minutos a 4°C, se centrifugaron las células y se llevó a cabo un lavado con PBS para eliminar los restos de etanol. Seguidamente, se añadió PBS y una solución de extracción de ADN (0.2 M Na_2HPO_4 , 0.1 M ácido cítrico, pH 7.8) en

proporción 1:1 y se mantuvieron a 37 °C durante 10 minutos. Se centrifugaron las células a 4000 rpm durante 3 minutos y se resuspendieron en una solución de yoduro de propidio (IP) y RNAsa del kit Immunostep (Salamanca, España). Se realizó una última incubación de 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad y se procedió a analizar las muestras en el citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, San José, EEUU).

12. ENSAYOS DE INMUNOFLUORESCENCIA

El arresto en la fase G₂ / M del ciclo celular inducido por el PTX se analizó también mediante un estudio de inmunofluorescencia con un anticuerpo anti- α -tubulina. Las líneas celulares se sembraron en placas de 24 pocillos en medio DMEM a una densidad celular de 2x10⁴ células por pocillo, en el caso de A549 y LL2, y 3.5x10⁴ células por pocillo en el de L132, y se incubaron toda la noche para permitir la adherencia a la placa. Se realizó un cambio de medio por uno libre de suero para inducir la sincronización del ciclo celular. Posteriormente se realizó otro cambio de medio suplementado con suero y se adicionaron las diferentes formulaciones a las dosis más altas usadas para los ensayos de proliferación en cada línea celular (30 nM en A549 y L132 y 55 nM en LL2). Tras 24 horas se fijaron las células con metanol 100% frío, incubando durante 30 minutos a -20 °C. Se permeabilizaron las células utilizando una solución de Tritón X-100 al 0.1% en PBS-Tween. Seguidamente se realizó un bloqueo para reducir los sitios de unión no específicos en una solución en PBS-Tween con suero de cabra al 5% y Tritón X-100 al 0.3%, incubando durante una hora a temperatura ambiente en agitación. Las células se incubaron con el anticuerpo primario anti- α -tubulina en una dilución 1:300 (v/v) (Sigma Aldrich, España) durante una hora a temperatura ambiente en agitación. Finalmente, se realizó una incubación con el anticuerpo secundario conjugado Alexa-Fluor 488 en una dilución 1:500 (v/v) durante una hora a en agitación y en oscuridad. Los núcleos fueron teñidos con Hoescht 33342 (1:2000) durante 10 minutos en oscuridad. Las imágenes se obtuvieron usando un microscopio de fluorescencia (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

13. ANÁLISIS DE APOPTOSIS

Los estudios de apoptosis se realizaron con todas las líneas celulares siguiendo el mismo procedimiento que para los ensayos de ciclo celular para corroborar que las NPs no modifican el tipo de muerte celular inducida por el PTX. Una vez se incubaron las células 48 horas con los correspondientes tratamientos por triplicado, se utilizó el kit de Immunostep *Anexin V-PE Apoptosis Detection*. Para ello, se recogió el medio de cultivo de cada muestra, se despegaron las células con una solución de tripsina diluida en PBS-EDTA (1:3 v/v) y se centrifugaron a 4000 rpm durante 3 minutos. Se realizó un lavado con PBS y se añadió una solución preparada con el tampón *Annexin-binding* a la que se le añadió *Annexin V-PE* y

7AAD. Se incubaron las células con esta solución 15 minutos a TA en oscuridad y se analizaron las muestras con el citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, San Jose, EEUU).

14. ENSAYOS DE INTERNALIZACIÓN CELULAR

Este ensayo se realizó para determinar si el mayor efecto antiproliferativo del PTX asociado a las NPs se debe a la mayor capacidad de internalización que le confieren las nanoformulaciones. Para ello, se realizó un análisis por citometría de flujo en la línea A549, utilizando NPs unidas a Rojo Nilo (RN). En primer lugar, se sembraron las células en placas de 6 pocillos a una densidad de 5×10^4 células por pocillo, tras 12 horas, se realizó un reemplazo por un medio con RN o NPs-RN a una dosis de $0.5 \mu\text{M}$. Se incubaron las células a diferentes tiempos (0.5, 1, 2 y 4 horas) y se realizó un lavado para eliminar el RN del medio que no hubiera entrado en las células. A continuación, se despegaron las células con una solución de tripsina diluida en PBS-EDTA (1:3 v/v) y se centrifugaron a 1600 rpm durante 5 minutos. Se realizaron dos lavados con PBS y se analizaron las muestras mediante la detección de Ficoeritrina (PE) con un citómetro de flujo FACSCanto II (Becton Dickinson, San Jose, EEUU). Por otra parte, se realizó un estudio cualitativo de la internalización celular del RN mediante imágenes de fluorescencia en la línea A549. Para ello, se sembraron las células en placas de 24 pocillos a una densidad de 2.5×10^4 células por pocillo. Transcurridas 12 horas se administraron los tratamientos a una dosis de $0.1 \mu\text{M}$ y se incubaron las células a los mismos tiempos utilizados en el análisis por citometría de flujo. Los núcleos de las células fueron teñidos con el marcador Hoechst 33342 (Sigma Aldrich, España) usando una dilución 1:2000. Se realizaron tres lavados con PBS y se tomaron las imágenes con un microscopio de fluorescencia (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

15. ESTUDIOS DE FARMACOCINÉTICA INTRACELULAR DEL PTX

La cuantificación del PTX intracelular se realizó para comprobar si el aumento del efecto antitumoral con las formulaciones cargadas con PTX se deben a un aumento de la internalización celular del PTX. En este análisis se siguió una modificación del protocolo descrito por Li y cols. (Li y cols., 2013) para el posterior análisis del PTX por un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (WatersT, Acquity H Class model) acoplado a un espectrómetro de masas (Waters, XEVO TQ-S model) (UPLC-MS/MS). Se sembraron las células de las líneas A549, L132 y LL2 en placas de 6 pocillos a una densidad de 4×10^5 células/pocillo en medio DMEM. Tras la adhesión a la placa, se adicionaron los tratamientos con PTX libre y NPs-PTX a una dosis de 500 nM . A los diferentes tiempos de incubación (0.5, 1, 2 y 4 horas) se descartó el medio y se realizó un lavado con PBS para eliminar los restos de PTX del medio. Se recogieron las células en $800 \mu\text{L}$ de un buffer de

lisis y se incubaron durante 5 minutos. Este buffer de lisis se compone de Tris HCl 0.1 M pH 7.5, EDTA 0.1 M pH 8, SDS 0.5% y NaCl 0.1 M en agua miliQ. Se recogieron las células y se sonicaron durante 5 minutos con un Ultrasonic-homogenizer Labsonic® M (Sartorius, Alemania) para favorecer la lisis celular. Se sacaron tres réplicas de cada muestra de 200 μ L y se procesaron siguiendo el método descrito por Fernández-Peralbo y cols. (Fernández-Peralbo y cols., 2014) para su análisis por UPLC-MS/MS. Concretamente, a las muestras de células tratadas con las formulaciones de liposomas y su respectivo control tratado con PTX, se le adicionaron 200 μ L de metanol para favorecer la lisis de los liposomas. Posteriormente, se le añadieron 500 μ L de éter metil tert-butílico (MTBE), que facilita la extracción del PTX de la muestra, y 15 μ L de docetaxel, usado como estándar interno. Tras mezclar con vórtex durante 1 minuto, incubar 5 minutos a temperatura ambiente y volver a mezclar con vórtex otros 5 minutos, las muestras se centrifugaron a 13200 rpm durante 5 minutos. Se recogió la fase orgánica en la que encuentra el PTX y evaporaron las muestras con vacío. Finalmente, en el momento del por UPLC-MS/MS se resuspendieron las muestras en metanol. La columna del equipo es el modelo ACQUITY UPLC® BEH ShieldRP18 1.7 μ m y los solventes para el gradiente de fase móvil fueron H₂O con un 0.1% de ácido fórmico (solvente A) y acetonitrilo con un 0.1% de ácido fórmico (solvente B). Paralelamente, se recogió una muestra de la solución de lisis de las células tras la sonicación, para hacer una extracción de proteínas, cuantificadas con la técnica Bradford. La concentración de PTX se normalizó con la concentración de proteínas para cada muestra.

16. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CSCs

Siguiendo el protocolo descrito por Leiva y cols. (Leiva y cols., 2017), se aislaron células madre cancerígenas (CSCs) a partir de la línea A549. Se prepararon placas de 6 pocillos con 1 mL de agarosa al 1% y se sembraron 1.2×10^5 células por pocillo en un medio DMEM/F-12 suplementado con B27 (1X), EGF (20 ng/mL), bFGF (20 ng/mL), heparina (4 μ g/mL) y penicilina-estreptomina al 1%. Se realizó un cambio de medio cada dos o tres días durante 14 días y se tomaron imágenes con un microscopio invertido de contraste de fases para monitorizar el aislamiento de las CSCs.

Finalizado el tiempo de aislamiento, se recogieron las células y se resuspendieron en TRI Reagent (Sigma, España), para la extracción de ARN mediante el kit RNeasy Mini Kit (Quiagen, MD, EEUU). Las muestras se homogenizaron con una jeringa de 1 mL unas 15 veces y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos para inducir la disociación de los complejos nucleoprotéicos. Se añadió cloroformo (100 μ L por cada 500 μ L de TRI) y se mezclaron las muestras con vórtex durante 15 segundos. Se realizó una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron 15 minutos a 4 °C a 11400 rpm. Se recogió la fase acuosa y se añadió el mismo volumen recogido de etanol al 70%. Se cargó

todo el volumen en una Mini Columna RNeasy Qiagen y se realizó una centrifugación de 1 minuto a 4 °C y 9300 rpm. Se tiró el sobrenadante y se añadieron 350 µL del tampón RW1 a la columna. Se realizó una nueva centrifugación en las mismas condiciones. Se añadió a la columna una mezcla de 10 µL de DNAsa I y 70 µL del tampón RDD. Se incubaron las muestras 15 minutos a temperatura ambiente y se añadieron 350 µL del tampón RW1 para eliminar los restos de DNAsa. Se centrifugaron las columnas y se añadieron 500 µL del tampón RPE. Tras centrifugar las muestras, se realizó un nuevo lavado con 500 µL de etanol al 80% y se centrifugaron de nuevo las columnas a 9300 rpm durante 3 minutos tirando el sobrenadante. Se incubaron las columnas 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron las muestras 5 minutos a 13200 rpm para eliminar los restos de etanol. Se cambió la columna en un nuevo tubo y se añadieron 30 µL de agua libre de RNAsas para la elución del ARN. Se incubaron las columnas 3-4 minutos y se centrifugaron las muestras 2 minutos a 13200 rpm. Se repitió de nuevo este proceso para eluir todo el ARN de la columna.

Con este ARN aislado se realizó una transcripción inversa con el kit Reverse Transcription System (Promega, EE.UU.). Se coge 1 µg de la muestra de ARN con y se completa hasta 10 µL con agua libre de RNAsas para desnaturalizar el ARN en un primer ciclo de 10 minutos a 70 °C. Posteriormente, a esta muestra se añaden MgCl₂ (1 mM), tampón (1X), mezcla de dNTPs (1mM), inhibidor de RNAsas (20 unidades), oligos (dT) (0.5 µg/µg ARN) y la enzima *reverse transcriptase* AMV (15 unidades) y se realiza un segundo ciclo de PCR de 60 minutos a 42 °C y 5 minutos a 95 °C, manteniendo a muestra de cDNA obtenida a 4 °C hasta su almacenamiento a -20 °C.

El cDNA obtenido fue empleado para su amplificación mediante Real-Time PCR (qPCR) usando el termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies). Para ello se emplearon los reactivos SYBR® Premix Ex Taq™ II (Takara, Japón) y en un volumen final de 20 µL de reacción se añadieron 20 ng de cDNA, 10 µL de *SYBR Premix (Tli RNaseH Plus)*, 0.2 µL de *ROXReference Dye* y 100 nM de los cebadores específicos de los genes de interés, enrasando con agua hasta los 20 µL. Los cebadores específicos empleados fueron los de los genes SOX2, OCT4, NANOG, CD133 y como gen endógeno HPRT, recogidos en la Tabla 7. El ciclo de la qPCR utilizado fueron inicialmente 2 minutos a 50 °C seguido de 10 minutos a 95 °C y 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 60 segundos a 60 °C. Los datos obtenidos se referenciaron al log₂ de la expresión relativa (RQ) del ARNm de ese gen en las CSCs respecto a la expresión en la línea celular de la que provienen (línea basal), representando los resultados obtenidos como la media de cuatro réplicas ± desviación estándar (DS).

Tabla 7: Secuencias de los cebadores empleados para la caracterización de las CSCs mediante qPCR.

Gen	Secuencia de los cebadores (5' → 3')		Bases
SOX2	Forward	ATAATAACAATCATCGGCGG	20
	Reverse	AAAAAGAGAGAGGCAAACCTG	20
OCT4	Forward	GATCACCTGGGATATACAC	20
	Reverse	GCTTTGCATATCTCCTGAAG	20
NANOG	Forward	CTATCCATCCTTGCAAATGTC	21
	Reverse	GTTCTGGTCTTCTGTTTCTTG	21
CD133	Forward	AAGCATTGGCATCTTCTATG	20
	Reverse	TTTGCTCTGGAGTTTCATTC	20
HPRT	Forward	TGACACTGGCAAACAATGCA	21
	Reverse	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	21

17. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN EN CSCS

Con el fin de determinar si las diferentes formulaciones cargadas con PTX son capaces de evadir el mecanismo de resistencia de las CSCs, principales responsables de las recidivas en los pacientes con cáncer, se llevó a cabo un ensayo de proliferación con las CSCs aisladas a partir de la línea A549 y caracterizadas por qPCR. Para ello, se sembraron 1.2×10^3 de las CSCs por pocillo en una placa de 96 pocillos con 100 μ L de medio de inducción y se le añadieron los diferentes tratamientos con PTX libre y las diferentes formulaciones de PLGA y liposomas en un rango de concentración entre 1-100 nM y por octuplicado, dejando un grupo de 8 pocillos como control sin tratamiento. El análisis de la VC se realizó tras 72 horas de incubación usando el CCK-8 (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japón), añadiendo 10 μ L por pocillo e incubando las células durante 4 horas a 37 °C. La absorbancia se midió a 450 nm en un espectrómetro EX – Thermo Multiskan. La VC (%) se calculó como se describió anteriormente en los ensayos de proliferación con las líneas celulares y los datos representados se corresponden con ocho réplicas \pm DS.

18. ESTUDIO DE FENÓMENOS DE RESISTENCIA A FÁRMACOS

Para determinar la capacidad de nuestras nanoformulaciones para eludir los mecanismos de resistencia a drogas, se utilizaron dos líneas tumorales de cáncer de colon con expresión diferencial de P-gp: HCT-15 con una expresión alta de P-gp y T84 con una expresión baja de P-gp (Baek y Cho, 2015). Ambas líneas se sembraron a una concentración de 1×10^5 células por pocillo en una placa de 6 pocillos. Tras 24 horas de incubación para la

adhesión celular, se administraron los tratamientos para inhibir la expresión de P-gp, utilizando como control positivo el verapamilo (Sigma Aldrich, España), un inhibidor comercial de P-gp, y las diferentes formulaciones vacías de PLGA y liposomas. Estos tratamientos se administraron a unas dosis de 14.3 μM , en el caso del verapamilo, y a una dosis correspondiente a 50 nM de PTX en el caso de las nanoformulaciones. Como control negativo se emplearon células sin pretratamiento. Tras 24 horas se adicionó la rodamina 123 (Sigma Aldrich, España), sustrato de P-gp, a una dosis 1.3 μM y se dejaron incubar las células 30 minutos a 37 °C en la estufa y en oscuridad, tiempo tras el cual se realizó un cambio de medio. Posteriormente se recogieron las células a tiempo 0, 0.5, 1 y 2 horas tras eliminar el medio con rodamina extracelular y hacer un lavado con PBS. La intensidad de fluorescencia intracelular se determinó con el citómetro de flujo FACScan. Los resultados se representan por triplicado \pm DS.

19. ENSAYOS EN MTS

Los esferoides tumorales multicelulares (MTS) se utilizaron para determinar la eficiencia antitumoral en sistemas que remedan los tumores *in vivo*. Para la generación de los MTS, se prepararon placas de 96 pocillos con 100 μl /pocillo de agarosa al 1% y una vez gelificada la agarosa, se sembraron 250 y 400 células de las líneas A549 y LL2, respectivamente. Seguidamente, para inducir la agregación celular de los MTS se centrifugaron las placas a 2260 rpm durante 5 minutos. Tras 72 horas de incubación, se adicionaron los tratamientos con PTX libre, formulaciones de PLGA y formulaciones de liposomas por octuplicado a la dosis correspondiente a la IC_{50} de cada línea celular (día 0). Un grupo de MTS sin tratar se utilizó como control. Transcurridas 48 horas, se realizó un cambio de medio y una nueva adición de fármacos, como en el caso de los estudios *in vitro*. Finalmente, a día 4, se realizó un nuevo cambio de medio y se mantuvieron los MTS otros cuatro días sin tratamiento. Se tomaron imágenes de microscopía óptica cada dos o tres días para monitorizar el crecimiento de los MTS mediante un microscopio invertido de contraste de fase (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Posteriormente, se procesaron las imágenes con el software ImageJ, midiendo el diámetro mayor (a) y el diámetro menor (b) de cada MTS, y se calculó el volumen de los MTS (mm^3) con la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen (mm}^3\text{)} = \frac{a * b^2 * \pi}{6}$$

Los volúmenes representados en las gráficas son la media de los octuplicados de cada tratamiento \pm DS.

Adicionalmente, se realizó un ensayo de TUNEL con los MTS de A549 y LL2 a día cuatro de tratamiento para comparar la apoptosis inducida por el PTX libre y por las diferentes formulaciones, utilizando como control los MTS sin tratar. Para ello, se fijaron los MTS con paraformaldehído al 4% durante 3 horas a temperatura ambiente y se procesaron siguiendo las instrucciones descritas en el kit de TUNEL (Roche, Mannheim, Alemania), tiñendo los núcleos con el marcador Hoechst 33342 (1:2000). Las imágenes de fluorescencia se tomaron con un microscopio confocal Nikon A1 (Nikon Corporation, Tokio, Japón).

20. ENSAYOS *IN VIVO*

Los ensayos *in vivo* se realizaron con el fin de determinar la actividad antitumoral y la toxicidad de las NPs en modelos de ratón. Concretamente, estos estudios se realizaron con ratones inmunocompetentes de la cepa C57BL/6 que fueron inoculados vía subcutánea en el flanco derecho con 5×10^5 células de la línea LL2 de cáncer de pulmón procedente de esta cepa de ratón, contenidas en 100 μ L de PBS (día 0). Cuando los tumores fueron palpables, los animales se dividieron en cinco grupos (n=12), correspondientes a un grupo control sin tratamiento y grupos con los tratados con: PTX libre (disuelto en proporción 1:1 en Cremophor EL (Scharlau, Barcelona, España) y etanol absoluto), Cremophor EL, NPs-PTX y NPs vacías. Posteriormente, se realizaron cuatro administraciones de 10 mg/kg en relación al PTX cada tres días por vía intravenosa a través de la vena de la cola. Los volúmenes de los tumores de cada ratón se determinaron mediante la medida del diámetro mayor (a) y el diámetro menor (b) del tumor con un calibre digital. El volumen tumoral se calculó mediante la ecuación usada para calcular el volumen de los MTS. Además, se recogieron datos de peso (g) y supervivencia de los ratones de cada grupo. Asimismo, se tomaron muestras de sangre por duplicado de cuatro ratones del grupo control y de los grupos tratados con PTX libre y NPs-PTX en el día 25 desde el inicio del tratamiento para realizar un estudio de las diferentes poblaciones sanguíneas después de los tratamientos. Los recuentos sanguíneos se obtuvieron después de analizar las muestras de sangre con el analizador hematológico Mythic 22CT C2 (Orphée SA, Suiza).

Por otra parte, se realizó este mismo ensayo con las formulaciones de liposomas. En este caso se dividieron los ratones en siete grupos (n=12), correspondientes a un grupo control sin tratar y seis grupos con los siguientes tratamientos: PTX libre, Cremophor, MLV-PEG-PTX, SUV-PEG-PTX y las formulaciones vacías MLV-PEG y SUV-PEG. En este caso, se recogieron datos de volumen tumoral y peso de los diferentes grupos de ratones.

21. ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS Y DE BIODISTRIBUCIÓN EN TEJIDOS

Los estudios de farmacocinética en plasma y de biodistribución en tejidos se realizaron en ratones inmunocompetentes de la cepa C57BL/6 con tumores inducidos (como en el caso

de los ensayos *in vivo*). Cuando los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 200 mm³, los ratones se dividieron en ~~dos~~ grupos (n=20), correspondientes a PTX libre y NPs-PTX. Los tratamientos se administraron intravenosos en una dosis única de 10 mg/kg de PTX. Se sacrificaron cinco ratones de cada tratamiento a tiempos específicos (30 minutos, 1, 6, 12 y 24 horas) para recoger las muestras de sangre y tejidos (cerebro, pulmones, corazón, hígado, bazo, riñones, tumor y 6 ganglios de la raíz dorsal (DRGs) de las vértebras lumbares). Las muestras se procesaron siguiendo una modificación del protocolo descrito por Fernández-Peralbo y cols. (Fernandez-Peralbo y cols., 2014). En primero lugar, las muestras de sangre se recogieron en tubos con EDTA, se centrifugaron a 3600 rpm durante 12 minutos y el plasma se transfirió a un tubo nuevo. Los tejidos se pesaron y se resuspendieron en un volumen dos veces mayor de su peso de una solución de cloruro sódico (0.9%). Posteriormente se homogenizaron usando un homogeneizador de alta velocidad IKA T10 Basic ULTRA-TURRAX (Alemania). Las muestras de DRGs se sonicaron en un volumen de 200 µL de la solución de cloruro sódico durante 5 minutos en ciclos de 30 segundos. Para el procesamiento posterior de las muestras se recogieron 200 µL de cada y se incubaron 5 minutos en un baño de ultrasonidos. A continuación, se adicionó docetaxel (150 ng/ml) como estándar interno y 500 µL de MTBE, que facilita la extracción del PTX. Al igual que para las muestras para la cuantificación del PTX intracelular, tras mezclar con vórtex durante 1 minuto, incubar 5 minutos a temperatura ambiente y volver a mezclar con vórtex otros 5 minutos, las muestras se centrifugaron a 13200 rpm durante 5 minutos. Se recogió el sobrenadante y se secaron al vacío hasta el análisis por UPLC-MS/MS. Los datos se representan como la media de cuatro muestras ± DS.

22. ENSAYOS DE COMPORTAMIENTO DE DOLOR NEUROPÁTICO

Los estudios de comportamiento fueron realizados por el grupo de Neurofarmacología del dolor (CTS109) dirigido por el Dr. José Manuel Baeyens, perteneciente al Departamento de Farmacología (Facultad de Medicina, Universidad de Granada), con el fin de comprobar si las formulaciones lipídicas eran capaces de proteger de la neuropatía periférica dolorosa. En estos ensayos se emplearon ratones hembra CD-1 (Charles River, Barcelona, España) con un peso aproximado de 26-32 g. El PTX se preparó a una concentración de 6 mg/ml en una solución compuesta de un 50% de Cremophor EL (Sigma-Aldrich, Madrid, España) 50% de etanol absoluto. Esta solución se diluyó posteriormente hasta 1.4 mg/ml con solución salina 0.9% para su administración. De la misma forma, se preparó la solución disolvente del PTX libre para ser empleada como control. Los ratones se dividieron en grupos de 8-13 ratones y se anestesiaron con isofluorano (2%) para la administración intravenosa de 7 mg/kg de PTX libre, solución disolvente del PTX, SUV-PEG-PTX y MLV-PEG-PTX, además de las dos nanoformulaciones sin carga (SUV-PEG y MLV-PEG), en un volumen

de 5 mL/kg una vez al día durante 5 días consecutivos. El día 0 se consideró como el día de la primera administración. La hipersensibilidad al dolor en los ratones se analizó en los días 0 (antes del tratamiento), 3, 7, 10, 14 y 17, con dos pruebas nociceptivas para estudiar el desarrollo de la alodinia mecánica y la hiperalgesia térmica inducida por el fármaco PTX.

La alodinia mecánica se evaluó utilizando filamentos von Frey siguiendo el método *up-down*, con algunas modificaciones (Cobos y cols., 2018). En cada día de evaluación, los ratones se habituaron durante 120 minutos en cajas de plástico transparente individuales (7 x 7 x 13 cm) colocadas en plataformas de malla de alambre. Después del tiempo de habituación, los filamentos se aplicaron sobre las plantas de las patas traseras presionando hacia arriba para causar una ligera curva en el filamento durante 2-3 segundos. Los monofilamentos de von Frey calibrados (Kit de evaluación sensorial de prueba táctil; Stoelting, Wood Dale, IL, EE. UU.), con fuerzas de flexión que oscilaron entre 0,02 y 2 g, se aplicaron utilizando el paradigma ascendente, comenzando con el filamento de 0,6 g y permitiendo 10 segundos entre aplicaciones sucesivas. La respuesta al filamento se consideró positiva si se observaba mordida / lamida inmediata, estremecimiento o rápida retirada de la pata estimulada. En cada prueba consecutiva, si hubo una respuesta positiva, se usó una más débil, en caso contrario, se seleccionó un estímulo más fuerte. Ambas patas traseras se evaluaron por separado y el umbral mecánico se calculó como el promedio de ambas patas en cada animal. Todas las evaluaciones de comportamientos fueron realizadas por un observador sin conocimiento de los tratamientos administrados.

La hiperalgesia por calor se evaluó con el método de Hargreaves, con ligeras modificaciones (Nieto y cols., 2012). Los ratones se habituaron durante 120 minutos en cámaras individuales de plexiglás (9 x 9 x 22 cm) colocadas en una superficie de vidrio a 30 °C. Después de la habituación, un haz de calor radiante se enfocó en la superficie plantar de la pata trasera ipsilateral con un aparato de prueba plantar (IITC, CA, EE. UU.), hasta que el ratón realizó una respuesta de retirada. Cada ratón se probó tres veces en cada pata trasera y se calculó el promedio de las latencias para ambas patas. Se permitieron al menos 60 s entre mediciones consecutivas. Además, se usó un tiempo de latencia de corte de 20 s en cada medición para evitar lesiones en la piel y sufrimiento innecesario a los animales.

23. ANÁLISIS DE LOS DRGs POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Los ratones CD-1 (Charles River, Barcelona, España) se anestesiaron con isoflurano (IsoVet®, B. Braun, Barcelona, España) y se perfundieron intracardialmente con 20 ml de solución salina, seguido de 30 ml recién preparados de tampón fosfato 0,1 M pH 7.4 con glutaraldehído al 2% y paraformaldehído al 1%, durante 15 min. Después de la perfusión, se

disecionó el DRG L4 de los ratones y se fijó tampón fosfato 0,1 M pH 7.2 con glutaraldehído al 2% y paraformaldehído al 1% durante la noche a 4°C. Posteriormente, las muestras de fijación se transfirieron a tampón fosfato 0,1 M con sacarosa al 10% durante 24 horas a 4 ° C, y se fijaron con tampón fosfato 0,1 M pH 7.2 con 0,1% de tetróxido de osmio y 1% de ferrocianuro de potasio durante 1 hora a 4 ° C. Se deshidrataron en una serie graduada de alcoholes y se incrustaron en resina epoxi. Las secciones ultrafinas se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo, y se analizaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss LEO 906E (Zeiss, Oberkochen, Alemania). El software ImageJ se utilizó para medir el diámetro de los poros en los capilares fenestrados.

24. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los estudios estadísticos se realizaron usando el software SPSS versión 17.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Los datos de los resultados *in vitro* e *in vivo* se analizaron con los test estadísticos *t-student* y análisis de varianza (ANOVA), y las diferencias se consideraron significativas con un valor $p < 0.05$. Además, las diferencias significativas entre las curvas de supervivencia se analizaron con el método de Kaplan-Meier con el test estadístico *log-rank*. Los valores de IC_{50} se determinaron con el programa GraphPad Prism versión 6.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOFORMULACIONES

1.1. NPs DE PLGA

Las NPs de PLGA fueron sintetizadas y caracterizadas por la Dra. Lucía Martín Banderas del grupo de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Nanomedicina del Departamento de Farmacia y Tecnología farmacéutica de la Universidad de Sevilla. Durante el proceso de síntesis, basada en un método de nanoprecipitación, se analizó la influencia de la cantidad inicial de PTX empleada (5, 10, 15% p/p) sobre el tamaño y el potencial eléctrico de superficie de las NPs.

Las NPs de PLGA sintetizadas se caracterizaron por presentar una morfología esférica con un tamaño menor a 250 nm con un coeficiente de variación (CV%) menor del 15%. Además, el PDI obtenido fue inferior a 0.3, lo que sugiere que las NPs presentan una distribución homogénea de tamaño. Por otra parte, el potencial eléctrico de superficie (potencial zeta, ζ) de las NPs de PLGA resultó ser negativo en agua y similar a la superficie negativa de las NPs poliméricas puras (valor ζ medio \approx -30 mV) (Tabla 8).

Tabla 8: Tamaño de partícula, distribución de tamaño y potencial zeta con respecto a varias concentraciones iniciales de fármaco. Los datos representan la media \pm DS (n=3).

PTX (%p/p)	Diámetro \pm DS (nm)	CV (%)	PDI \pm DS	$\zeta \pm$ DS (mV)
0	201.6 \pm 2.4	1.2	0.2 \pm 0.0	-31.1 \pm 0.9
5	232.5 \pm 8.8	3.8	0.2 \pm 0.0	-28.0 \pm 0.9
10	243.2 \pm 37.2	15.3	0.3 \pm 0.1	-25.7 \pm 0.8
15	186.9 \pm 9.7	5.2	0.3 \pm 0.1	-24.8 \pm 0.8

El tamaño, distribución y potencial zeta de las NPs de PLGA no presentaron variaciones considerables con las diferentes cantidades iniciales de PTX. Además, no se observaron sedimentos voluminosos ni agregaciones de NPs (Figura 17A). Sin embargo, la baja estabilidad de la suspensión de NPs en un medio acuoso puede suponer una limitación para su aplicabilidad clínica. Con el fin de mejorar la estabilidad a largo plazo, se utilizó trehalosa como crioprotector al 5% p/v para almacenar las NPs a -20 °C. Además, se comprobó la estabilidad de estos sistemas mediante varios ciclos de congelación y descongelación, tras los cuales se realizó una medida del diámetro medio de las NPs de PLGA. En la Figura 17B puede observar como las NPs congeladas sin el crioprotector sufren un aumento de tamaño del 165% hasta los 600 nm. En el caso de las NPs que se congelan

RESULTADOS

con trehalosa, las nanopartículas sufrieron un ligero aumento de su diámetro del 13% tras el primer ciclo y del 29% tras el tercer ciclo de congelación y descongelación, con diámetros comprendidos entre 250 y 300 nm, aceptables para una administración parenteral.

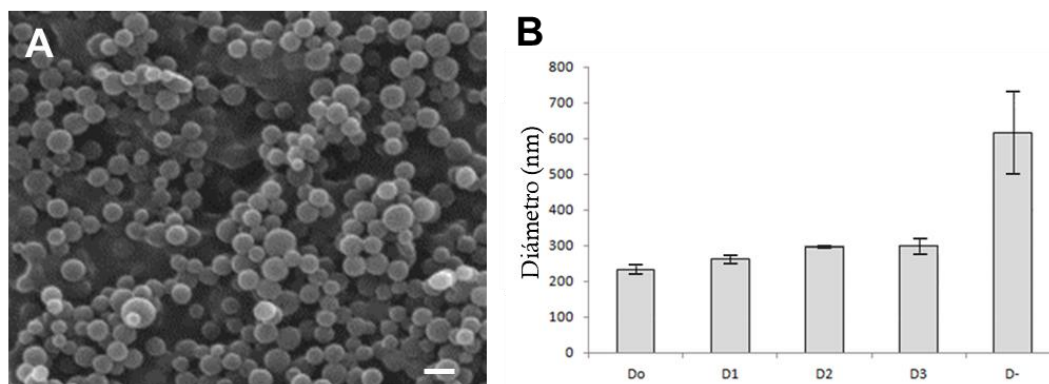


Figura 17: (A) Imagen de las NPs de PLGA realizado con un microscopio electrónico de barrido (SEM). Barra de escala 1 μ m. (B) Efecto de los ciclos de congelación y descongelación sobre el diámetro de las NPs de PLGA con el uso del crioprotector. Do: diámetro inicial, D1: diámetro tras un ciclo, D2: diámetro tras dos ciclos, D3: diámetro tras tres ciclos, D-: diámetro sin crioprotector.

Los resultados obtenidos en el estudio de la incorporación del PTX en las NPs de PLGA se observó que el aumento de la cantidad de fármaco inicial (2.25, 4.5, 6.75 mg) no se tradujo en una diferencia significativa en la EE (%) cuando la masa de polímero se mantuvo constante (45 mg). Debido a la naturaleza hidrofóbica del fármaco y el polímero la síntesis de las NPs de PLGA cargadas con PTX mediante nanoprecipitación fue un proceso reproducible y con una alta EE (%), que en todos los casos resultó por encima del 85% (Tabla 9). La EE (%) más alta se obtuvo con la concentración de PTX inicial más baja 5% probablemente debido a que la alta cantidad de polímero redujo la pérdida de fármaco durante la síntesis y se aumentó la encapsulación a un 91%. Los valores de carga de fármaco obtenidos estuvieron entre el 5 y 13%. Estos resultados demuestran que el tamaño de las NPs y la EE (%) no se ven afectados significativamente por la concentración inicial de PTX cuando otras variables de la formulación se mantienen constantes.

Tabla 9: Eficiencia de encapsulación (EE, %) y la carga de fármaco (DL, %) relacionada con la concentración inicial del PTX. Los datos representan la media \pm DS ($n=6$).

PTX (%p/p)	EE \pm DS (%)	DL \pm DS (%)
0	-	-
5	91.6 \pm 5.1	4.6 \pm 3.7
10	90.9 \pm 9.2	9.1 \pm 3.2
15	85.0 \pm 10.7	12.8 \pm 4.2

1. 2. LIPOSOMAS CATIONICOS

Los liposomas catiónicos fueron sintetizados y caracterizados por la empresa Nanovex Biotechnologies (España). Estas formulaciones presentaron diferencias de tamaño y composición, distinguiendo cuatro tipos de liposomas. Los liposomas MLV presentan un tamaño de 183-247 nm, mientras que el tamaño de los liposomas SUV se encontraba en un rango de 84-103nm. Con el fin de poder realizar los estudios *in vivo*, mejorando el tiempo de biodisponibilidad de las formulaciones, así como la reactividad ante el sistema inmune de las mismas, se sintetizaron ambos tipos de liposomas añadiendo una envuelta de PEG. La adición del PEG a la superficie de los liposomas provocó una reducción del potencial eléctrico de superficie respecto a sus análogos sin pegilar, aunque siguieron presentando carga positiva, como se observa en la Tabla 10. Por otra parte, el PDI de los liposomas MLV-PEG resultó más alto que en su análogo sin pegilar debido a la elevada concentración de lípidos y a la presencia del polímero PEG. Además, se caracterizaron las formulaciones sin carga de fármaco correspondientes a los cuatro tipos de liposomas. Finalmente, la eficiencia de encapsulación del PTX en las formulaciones durante el proceso de síntesis fue del 80-95% en todos los casos.

Tabla 10: Tamaño de partícula, distribución de tamaño y potencial zeta de las diferentes formulaciones de liposomas catiónicos. Los datos representan la media \pm DS (n=3).

Formulación	Diámetro \pm DS (nm)	PDI \pm DS	$\zeta \pm$ DS (mV)
MLV-PTX	226.4 \pm 32	0.380 \pm 0.022	+50 \pm 1.4
MLV	247.46 \pm 26	0.360 \pm 0.029	+54.2 \pm 1
MLV-PEG-PTX	183 \pm 29.1	0.592 \pm 0.049	+1.59 \pm 0.19
MLV-PEG	186 \pm 20	0.500 \pm 0.009	+8.71 \pm 1.8
SUV-PTX	84.32 \pm 26	0.386 \pm 0.033	+52 \pm 1.2
SUV	103.46 \pm 22	0.407 \pm 0.044	+41.4 \pm 0.6
SUV-PEG-PTX	88.48 \pm 19	0.409 \pm 0.006	+3.69 \pm 0.52
SUV-PEG	91.37 \pm 24	0.408 \pm 0.005	+9.48 \pm 0.55

2. ANÁLISIS DE LA LIBERACIÓN *IN VITRO* DEL PTX DE LAS NPs DE PLGA

El perfil de liberación del PTX de estas NPs resultó ser bifásico, con una fase inicial de liberación rápida ($\approx 25\%$ en 1 hora) y una segunda fase de liberación más sostenida durante un periodo de 15 días (Figura 18). Las NPs de PLGA con mayor carga inicial de fármaco (15%) liberaron hasta el 90% de su carga tras los 15 días de incubación en la solución tamponada. Este perfil sugiere que el fármaco se disperse uniformemente dentro de las NPs y se libera de forma sostenida por mecanismos de difusión.

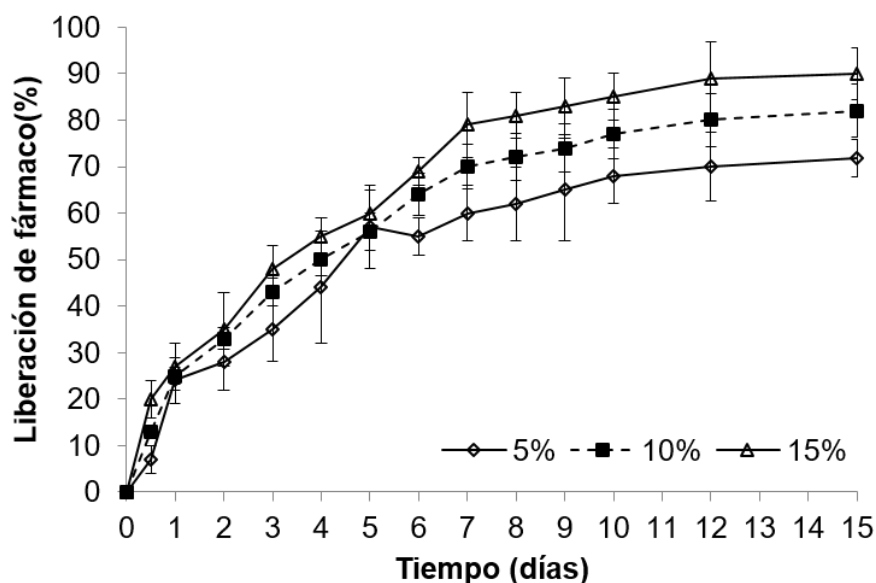


Figura 18: Perfil de liberación *in vitro* del PTX de las NPs de PLGA a diferentes concentraciones iniciales de PTX (5, 10 y 15% p/p) y en un medio tamponado. Los datos representados se corresponden con la media \pm DS del experimento por triplicado.

3. ENSAYOS DE HEMOCOMPATIBILIDAD

3. 1. NPs DE PLGA

La hemocompatibilidad de las NPs de PLGA se testó sobre eritrocitos humanos aislados de una muestra de sangre de donantes sanos. Como puede observarse en la Figura 19A, las NPs de PLGA vacías no provocaron lisis en los eritrocitos humanos a ninguna de las concentraciones testadas, siendo la hemólisis obtenida menor al 1% en todos los casos. Resultados similares fueron obtenidos con la exposición a PBS, usado como control negativo. Por el contrario, el control positivo (Tritón X-100 al 20%) provocó la liberación completa de la hemoglobina de los eritrocitos mediante la ruptura de la membrana. Asimismo, se tomaron imágenes de microscopía óptica de los eritrocitos expuestos a las NPs de PLGA, en las que puede observarse que estos eritrocitos no presentan alteraciones morfológicas y mantienen su estructura de disco bicóncavo (Figura 19B). Estos resultados demuestran la biocompatibilidad de las NPs de PLGA en los eritrocitos humanos, una característica esencial para el uso *in vivo* de esta nanoformulación.

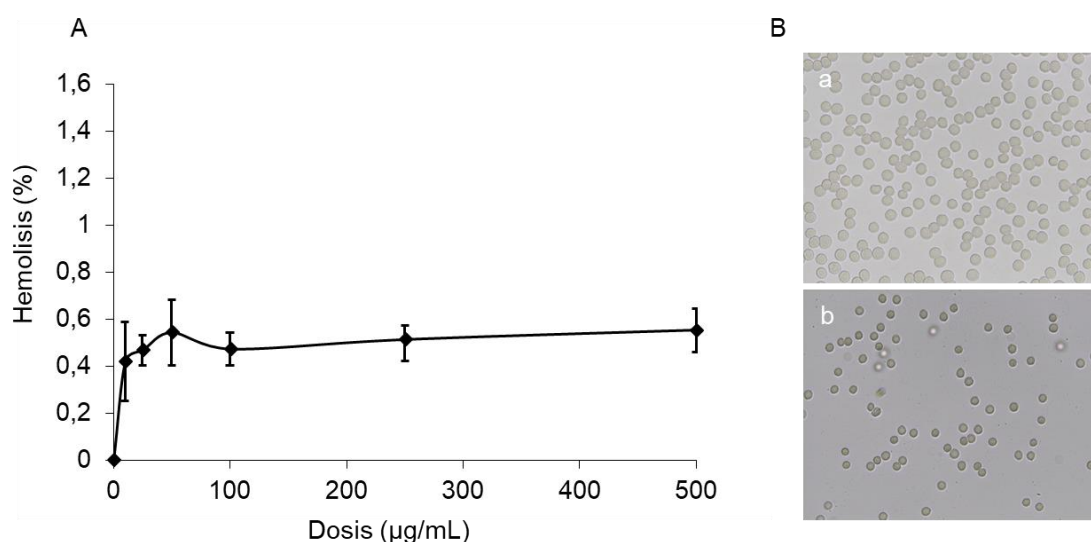


Figura 19: Ensayo de hemólisis con las NPs de PLGA. A) Gráfica del porcentaje de hemólisis obtenido a las diferentes concentraciones de NPs de PLGA ($\mu\text{g/mL}$), utilizando como control positivo Tritón X-100 al 20% y como control negativo PBS (pH 7.4). Los datos representados se corresponden con la media \pm desviación estándar del experimento por triplicado. B) Imagen representativa al microscopio óptico de eritrocitos no tratados (a) y tratados con NPs de PLGA a la dosis de 250 $\mu\text{g/mL}$ (b).

Magnificación 40X.

3. 2. LIPOSOMAS CATIONICOS

La hemocompatibilidad en eritrocitos humanos también fue analizada con las formulaciones lipídicas. Los cuatro tipos de liposomas provocaron una hemólisis menor del 2% a todas las concentraciones testadas, como se muestra en la Figura 20A, siendo la

RESULTADOS

formulación MLV-PEG-PTX la que causó una menor lisis en los eritrocitos, con menos de un 1% a la dosis más alta. Además, no se observaron cambios morfológicos en los eritrocitos tras la exposición a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los diferentes liposomas (Figura 20B). Estos resultados sugieren que los liposomas presentan una alta biocompatibilidad con los glóbulos rojos humanos, como en el caso de las NPs de PLGA.

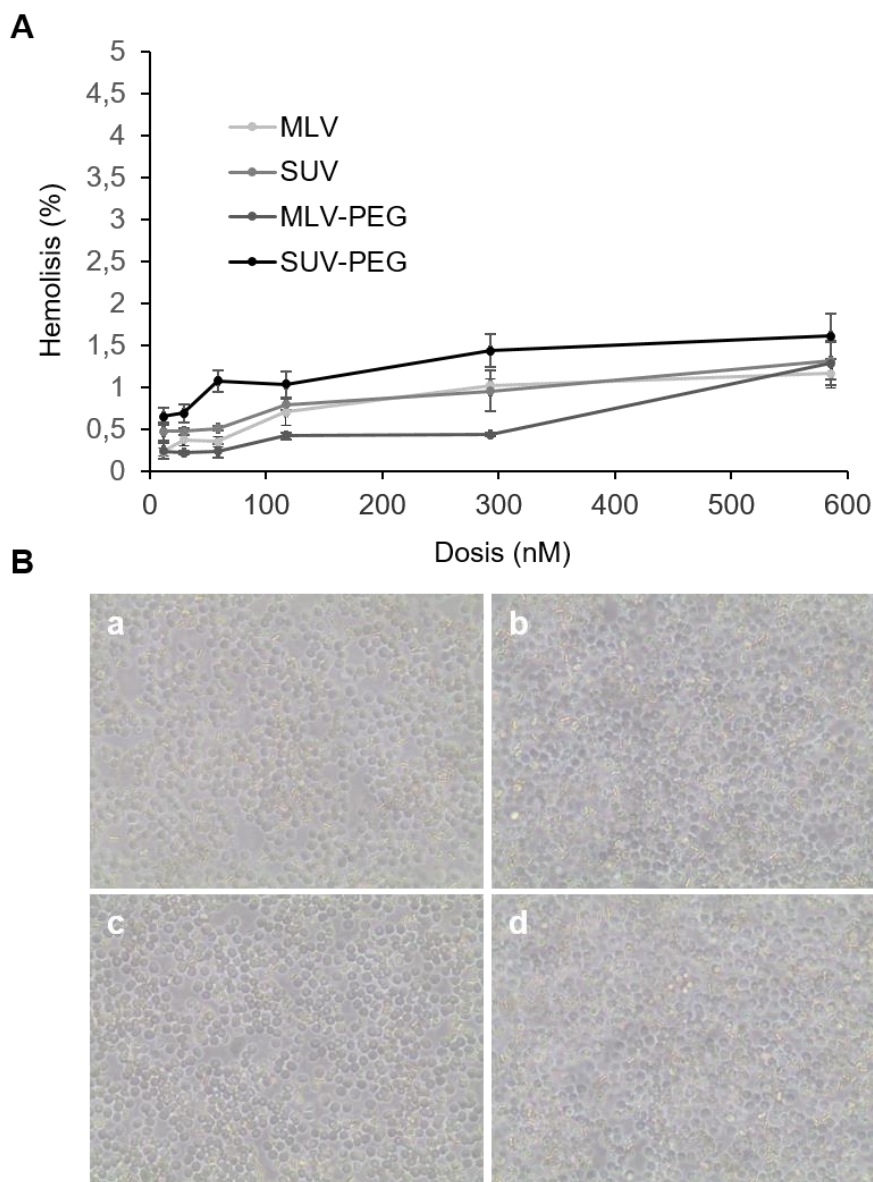


Figura 20: Ensayo de hemólisis con los liposomas catiónicos. A) Gráfica del porcentaje de hemólisis obtenido a las diferentes concentraciones de las formulaciones ($\mu\text{g}/\text{mL}$). Los datos representados se corresponden con la media \pm desviación estándar del experimento por triplicado. B) Imagen representativa al microscopio óptico de eritrocitos tratados con las cuatro formulaciones (MLV (a), SUV (b), MLV-PEG (c), SUV-PEG (d)) a la dosis de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Magnificación 40X.

4. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN

4.1. NPs DE PLGA

La actividad citotóxica de las NPs de PLGA vacías se determinó en todas las líneas con el fin de comprobar la biocompatibilidad de este sistema de liberación *in vitro*. En la Figura 21 se observa que las NPs de PLGA no resultaron tóxicas para ninguna de las líneas celulares, ya sean humanas o de ratón, a ninguna de las dosis probadas, siendo la VC superior al 90% en todos los casos.

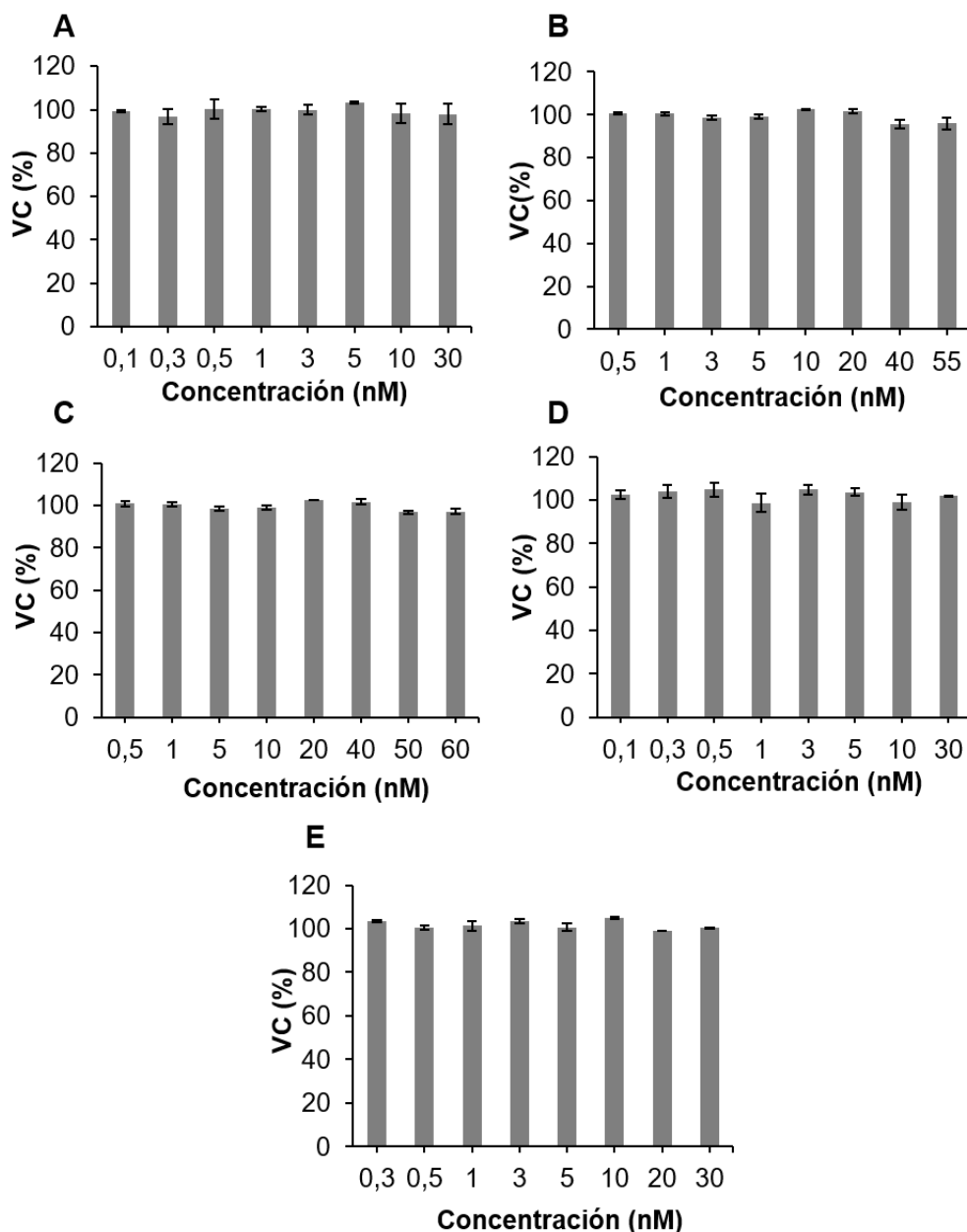


Figura 21: Citotoxicidad de las NPs de PLGA vacías en las líneas de cáncer de pulmón A549 (A), LL2 (B), NCI-H520 (C), NCI-H460 (D) y la línea no tumoral de pulmón L132 (E). Los resultados se representaron como porcentaje de VC (%). Los datos representan la media de tres réplicas \pm DS.

RESULTADOS

Por otra parte, los tratamientos de PTX libre y NPs de PLGA-PTX provocaron una respuesta celular dependiente de la dosis. Sin embargo, la citotoxicidad fue significativamente mayor cuando se administró el PTX encapsulado en las NPs de PLGA, en comparación con la obtenida con el PTX libre ($p < 0.05$) (Figura 22).

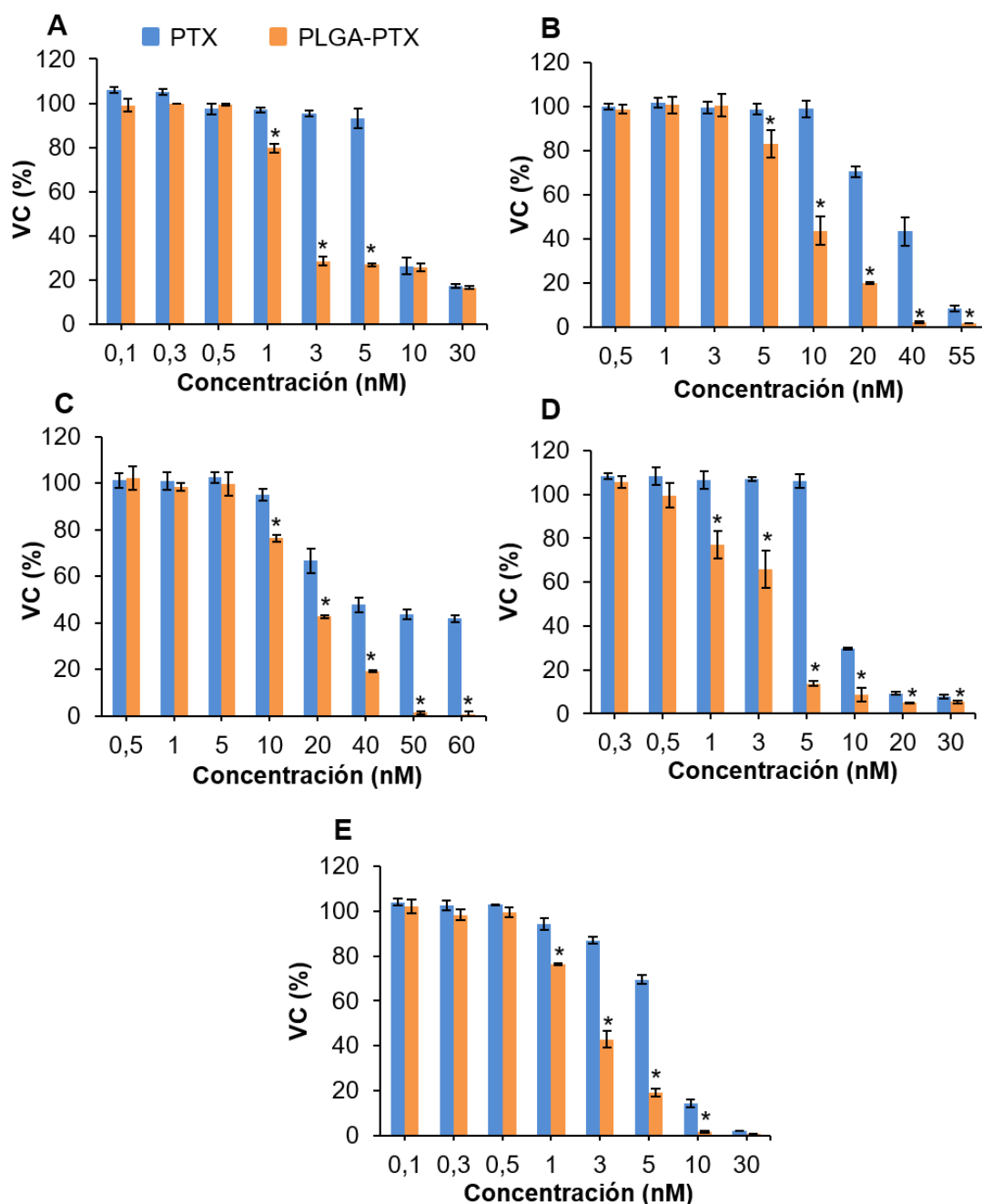


Figura 22: Ensayo de proliferación con las NPs de PLGA-PTX en las líneas de cáncer de pulmón A549 (A), LL2 (B), NCI-H520 (C), NCI-H460 (D) y la línea no tumoral de pulmón L132 (E). Los resultados se representaron como porcentaje de VC (%). Los datos representan la media de tres réplicas \pm DS. *Datos con diferencias significativas entre el tratamiento con NPs de PLGA-PTX y PTX libre ($p < 0.05$).

Concretamente, el tratamiento con las NPs de PLGA-PTX produjo una disminución de la IC_{50} del PTX en comparación con el PTX libre de 3.79 veces en la línea tumoral NCI-H460 (desde 10.5 ± 2.33 nM a 3.4 ± 0.63 nM) y de 3.63 veces en la línea tumoral A549 (de 8.7 ± 2.06 nM a 2.4 ± 1.07 nM). Asimismo, en las líneas NCI-H520 y LL2 la IC_{50} del tratamiento disminuyó significativamente de 44.7 ± 5.16 nM y 28.3 ± 1.9 nM, con el uso de fármaco libre, a 16.8 ± 1.18 nM y 10.5 ± 1.45 nM, con la administración de las NPs de PLGA-PTX, respectivamente. Los ensayos de proliferación se realizaron también en la línea no tumoral L132, en la que también se observó un aumento de la actividad antitumoral con el uso de las NPs de PLGA-PTX en comparación con el PTX libre, con una reducción de la IC_{50} del PTX de 2.96 veces. Los datos de IC_{50} obtenidos con los tratamientos con PTX libre y NPs de PLGA-PTX en las diferentes líneas se recogen en la Tabla 11.

Tabla 11: Concentración inhibitoria del PTX libre y de las NPs de PLGA-PTX a la que se produce el 50% de muerte celular e IT en las diferentes líneas celulares de pulmón.

Línea celular	IC_{50} PTX (nM)	IC_{50} NPs de PLGA-PTX (nM)	IT
A549	8.7 ± 2.06	2.4 ± 1.07	3.63
LL2	28.3 ± 1.9	10.5 ± 1.45	2.69
NCI-H520	44.7 ± 5.16	16.8 ± 1.18	2.66
NCI-H460	10.5 ± 2.33	3.4 ± 0.63	3.79
L132	7.4 ± 1.36	2.5 ± 0.14	2.96

4. 2. LIPOSOMAS CATIONICOS

Tras testar la hemocompatibilidad de los liposomas catiónicos, se realizaron estudios de citotoxicidad con las nanoformulaciones pegiladas y no pegiladas blancas en todas las líneas celulares. Los resultados muestran que ninguno de los liposomas redujo la VC por debajo del 90%, demostrando su biocompatibilidad *in vitro* (Figura 23).

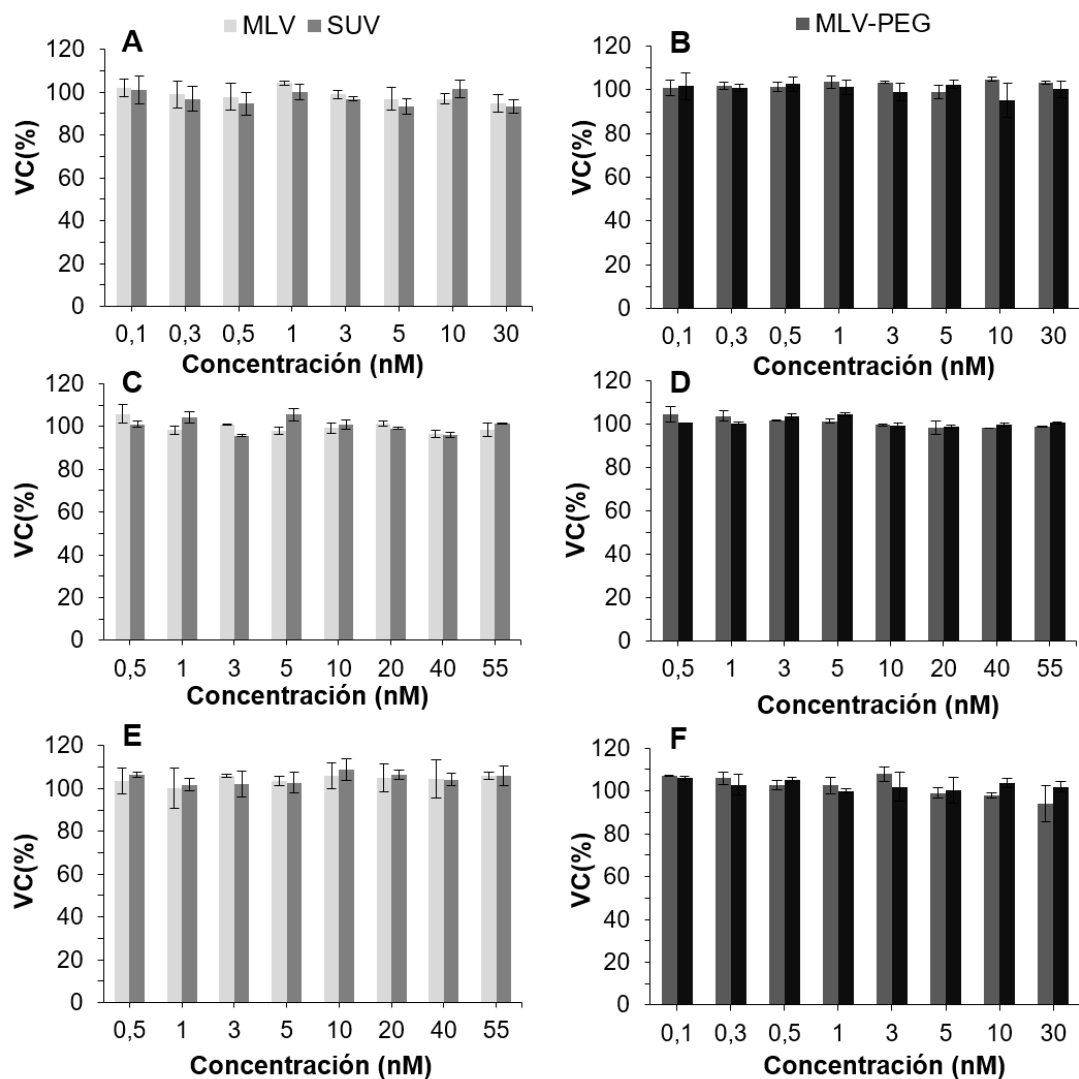


Figura 23: Citotoxicidad de los liposomas vacíos en las líneas de cáncer de pulmón A549 (A, B), LL2 (C, D) y la línea no tumoral de pulmón L132 (E, F). Los resultados se representaron como porcentaje de VC (%). Los datos representan la media de tres réplicas \pm DS.

Por el contrario, los liposomas MLV y SUV cargados con PTX mostraron una reducción significativa en la VC de todas las líneas celulares testadas en comparación con la disminución provocada por el PTX libre (Figura 24).

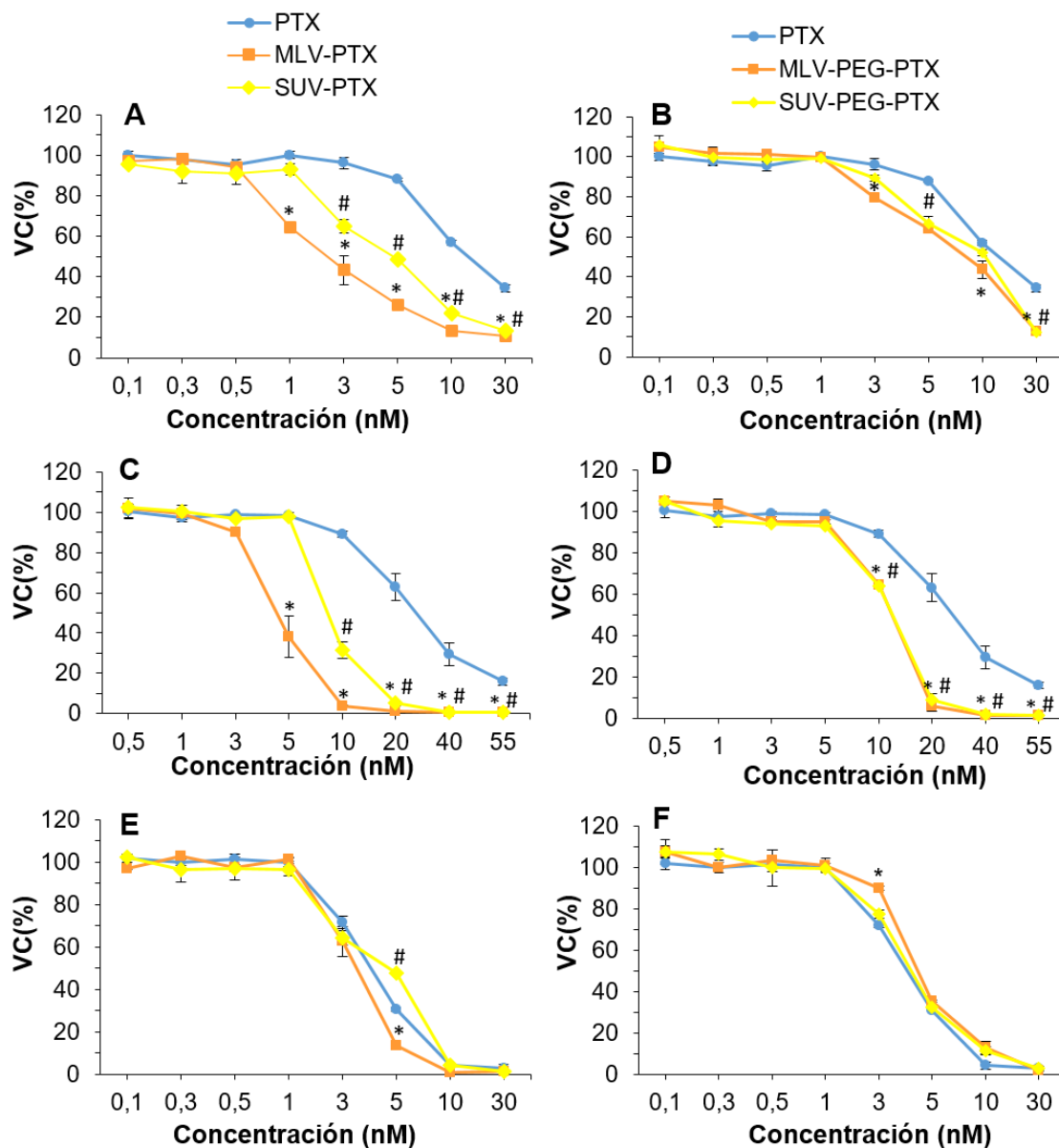


Figura 24: Ensayo de proliferación con los liposomas catiónicos no pegilados y sus análogos pegilados cargados con PTX en las líneas de cáncer de pulmón A549 (A, B), LL2 (C, D) y la línea no tumoral de pulmón L132 (E, F). Los resultados se representaron como porcentaje de VC (%). Los datos representan la media de tres réplicas \pm DS. *Datos con diferencias significativas entre los tratamientos con liposomas MLV-PTX/MLV-PEG-PTX y PTX libre ($p < 0.05$). #Datos con diferencias significativas entre los tratamientos con liposomas SUV-PTX/SUV-PEG-PTX y PTX libre ($p < 0.05$).

RESULTADOS

El tratamiento con MLV-PTX redujo la IC₅₀ de PTX libre 3.75 veces y 4.94 veces en las líneas A549 y LL2, respectivamente (Tabla 12). Por otra parte, la formulación SUV-PTX resultó tener una menor citotoxicidad que MLV-PTX, produciendo disminuciones menores de la IC₅₀ del PTX (1.84 y 2.85 veces en A549 y LL2 respectivamente). No obstante, este aumento en el efecto citotóxico del PTX con el uso de los liposomas catiónicos no se observó en la línea no tumoral L132, cuya IC₅₀ prácticamente no se modificó con el uso de estos liposomas en comparación con el PTX libre. Una vez testados los liposomas no pegilados, se realizaron los ensayos de proliferación con los liposomas pegilados, MLV-PEG-PTX y SUV-PEG-PTX. Ambas formulaciones mostraron un menor efecto antitumoral *in vitro* en todas las líneas celulares en comparación con sus análogos sin pegilación. En la línea A549, MLV-PEG-PTX redujo la IC₅₀ del PTX libre 1.36 veces, mientras que el tratamiento con SUV-PEG-PTX no causó efecto significativo sobre la IC₅₀. Sin embargo, en la línea LL2 ambas formulaciones provocaron reducciones significativas de la IC₅₀ de 2 veces aproximadamente. Por el contrario, como se observa también con MLV-PTX y SUV-PTX, la línea L132 no sufrió ninguna modificación en la IC₅₀ del PTX con el uso de los liposomas pegilados.

Tabla 12: Concentración inhibitoria del PTX libre y de las formulaciones lipídicas cargadas con PTX a la que se produce el 50% de muerte celular e IT en las diferentes líneas celulares de pulmón

Línea celular	IC₅₀ PTX (nM)	IC₅₀ MLV-PTX (nM)	IT	IC₅₀ SUV-PTX (nM)	IT
A549	10.5 ± 0.9	2.8 ± 0.8	3,75	5,7 ± 1.6	1,84
LL2	27.65 ± 0.8	5.6 ± 1.5	4,94	9.7 ± 1.5	2,85
L132	4.85 ± 1.1	2.92 ± 1.2	1,66	4.71 ± 1.4	1,03

Línea celular	IC₅₀ PTX (nM)	IC₅₀ MLV-PEG-PTX (nM)	IT	IC₅₀ SUV-PEG-PTX (nM)	IT
A549	10.5 ± 0.9	7.7 ± 1	1,36	9,6 ± 2.15	1,09
LL2	27.65 ± 0.8	14.7 ± 3.2	1,88	13.45 ± 1.3	2,05
L132	4.85 ± 1.1	4.23 ± 0.3	1,14	4.5 ± 0.4	1,08

5. ANÁLISIS DE CICLO CELULAR

5.1. NPs DE PLGA

El análisis de ciclo celular en las diferentes líneas celulares se realizó para verificar si la encapsulación del PTX modifica el mecanismo de acción del PTX, el cual provoca la detección del ciclo celular en la fase G_2 / M mediante su interacción con los microtúbulos. Dadas las diferencias observadas en el efecto antitumoral con los tratamientos con PTX libre y las NPs de PLGA-PTX en los ensayos de proliferación, se optó por utilizar la dosis de IC_{50} del PTX libre, reduciendo el tiempo de exposición a 48 horas para poder observar el efecto del tratamiento con las NPs de PLGA-PTX.

En primer lugar, los perfiles de ciclo celular fueron muy similares entre las células sin tratar y las tratadas con las NPs de PLGA vacías en todas las líneas celulares analizadas. Concretamente, en estas muestras se observó una proporción células en la fase G_1 del 40-60%, en la fase S del 30-40% y en fase G_2 / M del 5 al 20%, según la línea celular (Figura 25). Esta proporción también se observó en las muestras de la línea normal L132, siendo mayor el porcentaje de células en G_1 debido a su menor tasa de proliferación. Por otra parte, las muestras tratadas con PTX libre no mostraron diferencias con respecto a las células sin tratar debido al acortamiento del tiempo de exposición a la dosis de IC_{50} , salvo en la línea NCI-H520 que se observó una acumulación en G_2 / M del 84,8% y en $subG_1$ del 43,8%. Finalmente, en las muestras tratadas con NPs de PLGA-PTX se observó una acumulación de células detenidas en la fase G_2 / M (alrededor del 70-90%) y un incremento de fase $subG_1$ (40-70%), en comparación con el resto de los tratamientos.

Esta acumulación de células en G_2 / M con las NPs de PLGA-PTX se produjo en todas las líneas analizadas salvo en la línea murina LL2, en la que se observó un 100% de muerte celular. Por este motivo, debido a la alta tasa de replicación de esta línea celular, para poder observar el efecto del PTX se optó por aumentar la dosis y reducir el tiempo de exposición. Los resultados mostrados en la Figura 26, revelaron una acumulación del 65-70% en la fase G_2 / M y del 35-50% en fase $subG_1$, tanto en las muestras tratadas con PTX libre, como en las tratadas con NPs de PLGA-PTX. Por lo tanto, los datos obtenidos con el análisis de ciclo celular indican que la nanoformulación de PLGA no interfiere en el mecanismo de acción del PTX.

RESULTADOS

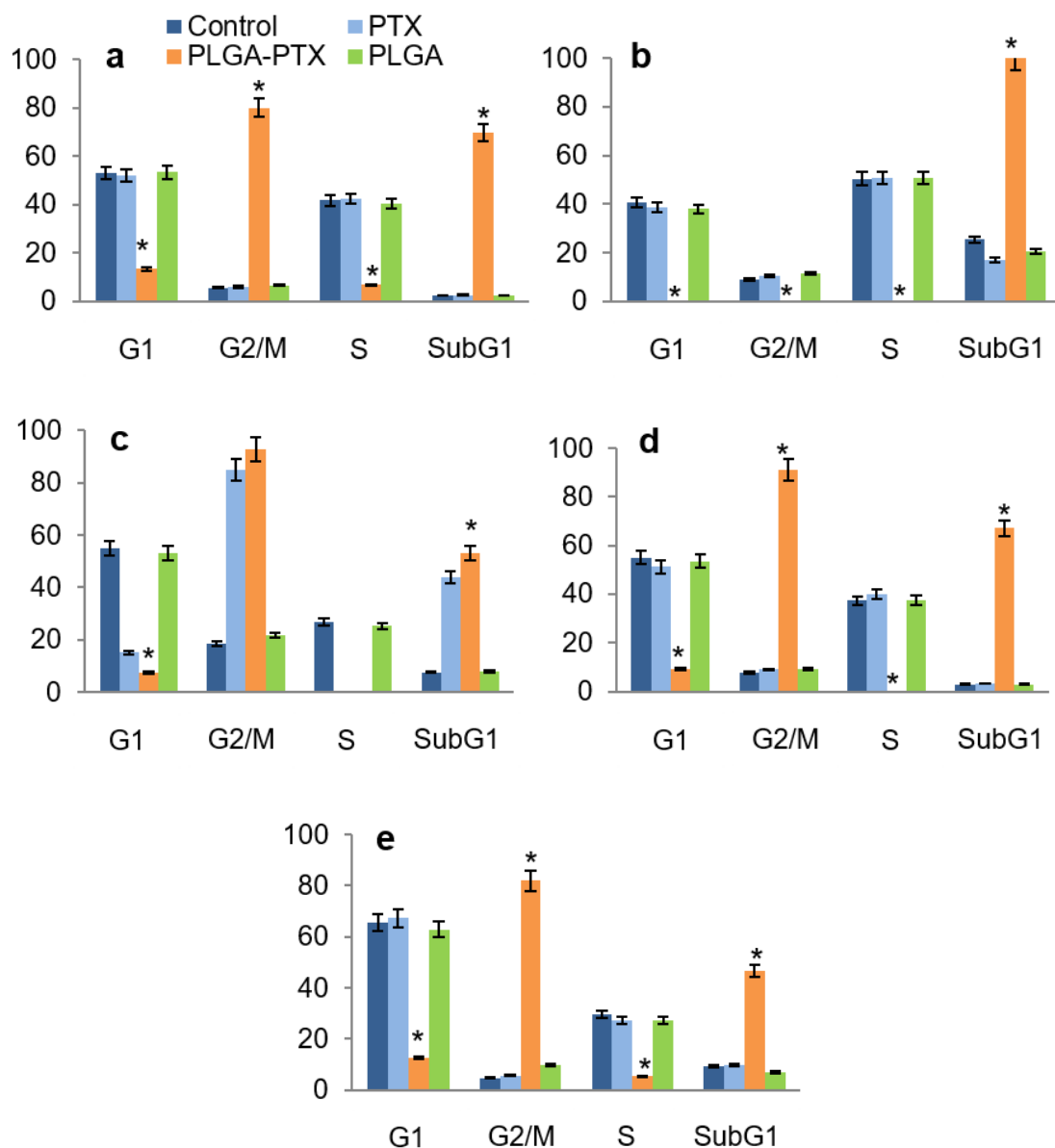


Figura 25: Análisis de ciclo celular en las líneas de cáncer de pulmón A549 (A), LL2 (B), NCI-H520 (C), NCI-H460 (D) y la línea no tumoral de pulmón L132 (E). Las células se trataron con PTX libre, NPs de PLGA-PTX y NPs de PLGA vacías durante 48 horas y a la dosis de IC_{50} del PTX de cada línea. Las muestras se analizaron mediante FACScan y los resultados se expresaron como el porcentaje de células marcadas en cada fase del ciclo celular. Los datos representan la media de tres réplicas \pm DS. *Datos con diferencias significativas entre el tratamiento con NPs de PLGA-PTX y PTX libre ($p < 0.05$).

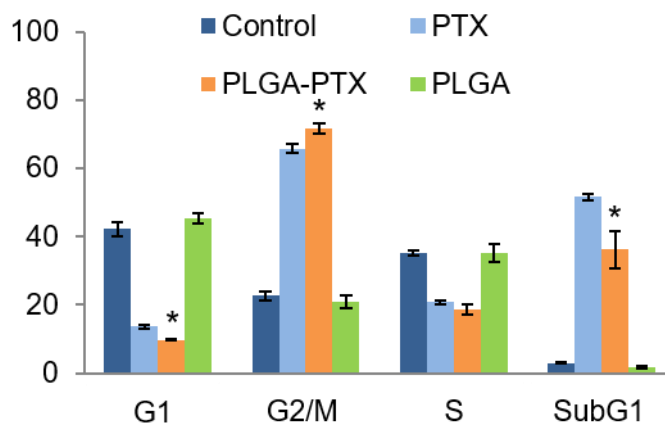


Figura 26: Análisis de ciclo celular en la línea de cáncer de pulmón LL2. Las células se trataron con PTX libre, NPs de PLGA-PTX y NPs de PLGA vacías durante 15 horas y a una dosis correspondiente al doble de la IC_{50} del PTX (56 nM). Las muestras se analizaron mediante FACScan y los resultados se expresaron como el porcentaje de células marcadas en cada fase del ciclo celular. Los datos representan la media de tres réplicas \pm DS. *Datos con diferencias significativas entre el tratamiento con NPs de PLGA-PTX y PTX libre ($p < 0.05$).

5. 2. LIPOSOMAS CATIÓNICOS

La modulación del ciclo celular con la encapsulación del PTX en liposomas catiónicos se analizó mediante citometría de flujo. En primer lugar, las células tratadas con cualquiera de los liposomas vacíos mostraron un perfil de ciclo similar al de las células sin tratar. Por el contrario, como se muestra en el Figura 27, todos los liposomas incrementaron el porcentaje de células en fase SubG₁ en comparación con el PTX libre en todas las líneas, excepto en la línea no tumoral L132. Concretamente, MLV-PTX, la formulación con mayor efecto antiproliferativo, también indujo la acumulación de células en la fase G₂ / M (26.7%) en la línea A549, en comparación con el PTX (15.8%) y en fase S (39.9% en comparación con el 24% con PTX libre). El resto de formulaciones no presentaron modificaciones del perfil de ciclo celular con respecto al PTX libre, lo que demuestra que las formulaciones lipídicas no interfieren en el mecanismo de acción del fármaco.

En la línea LL2, dada su mayor tasa de crecimiento, se realizó un estudio complementario reduciendo el tiempo de exposición y duplicando la dosis de los tratamientos. Como se muestra en la Figura 28, no se observó ninguna modificación en el perfil de ciclo celular con respecto al PTX libre, con una acumulación en G₂ / M del 60-70% y una ligera disminución de la fase SubG₁. Finalmente, en la línea L132 el tratamiento con el PTX libre provocó un aumento de células en fase SubG₁ mayor que con los tratamientos con los liposomas catiónicos, mientras que éstos últimos provocaron una mayor retención de células en la fase S.

RESULTADOS

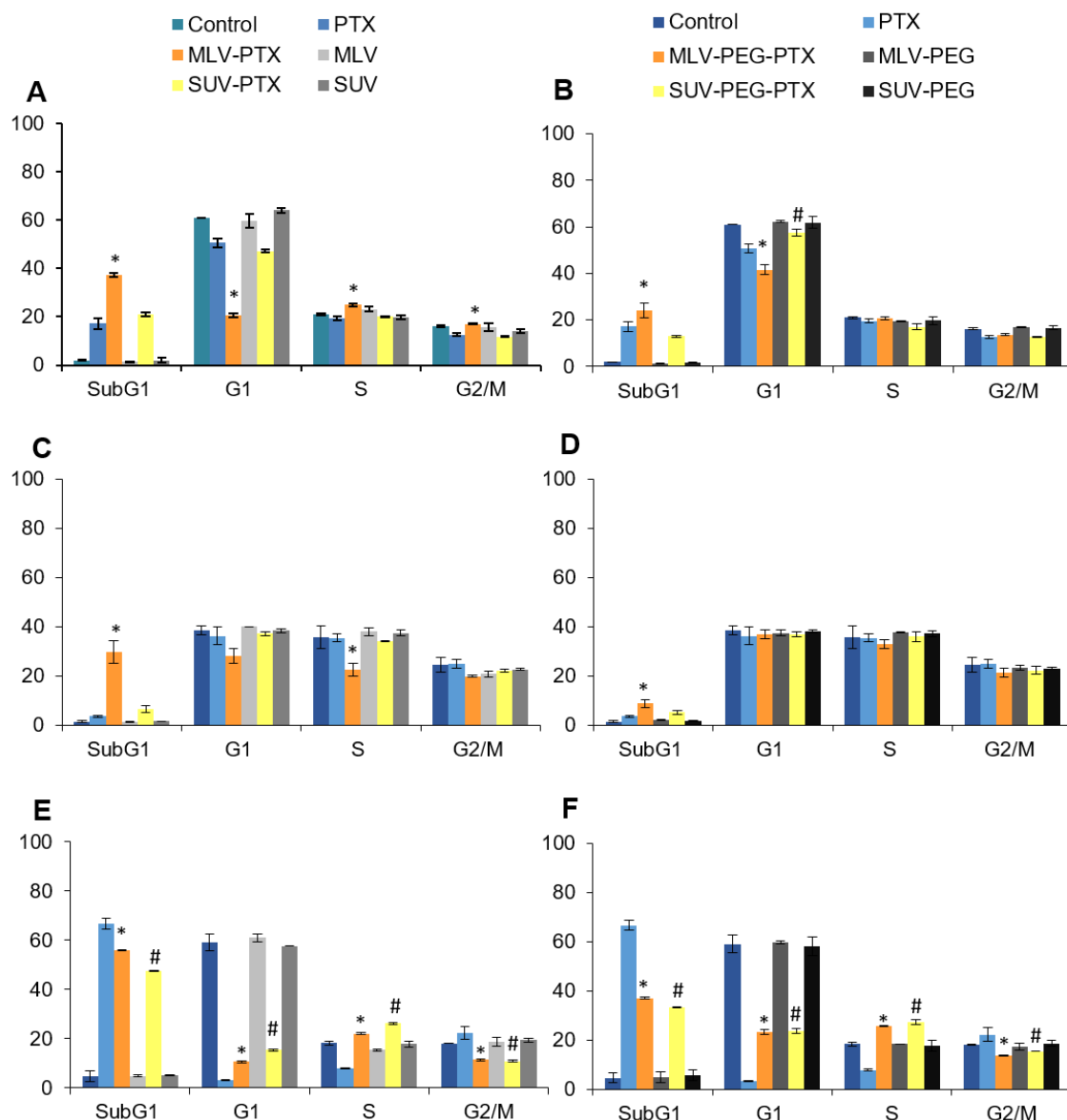


Figura 27: Análisis de ciclo celular en las líneas de cáncer de pulmón A549 (A, B), LL2 (C, D) y la línea no tumoral de pulmón L132 (E, F). Las células se trataron con PTX libre, liposomas cargados con PTX y liposomas vacíos durante 48 horas y a la dosis de IC_{50} del PTX de cada línea. Las muestras se analizaron mediante FACScan y los resultados se expresaron como el porcentaje de células marcadas en cada fase del ciclo celular. Los datos representan la media de tres réplicas \pm DS. *Datos con diferencias significativas entre los tratamientos con liposomas MLV-PTX/MLV-PEG-PTX y PTX libre ($p < 0.05$). #Datos con diferencias significativas entre los tratamientos con liposomas SUV-PTX/SUV-PEG-PTX y PTX libre ($p < 0.05$).

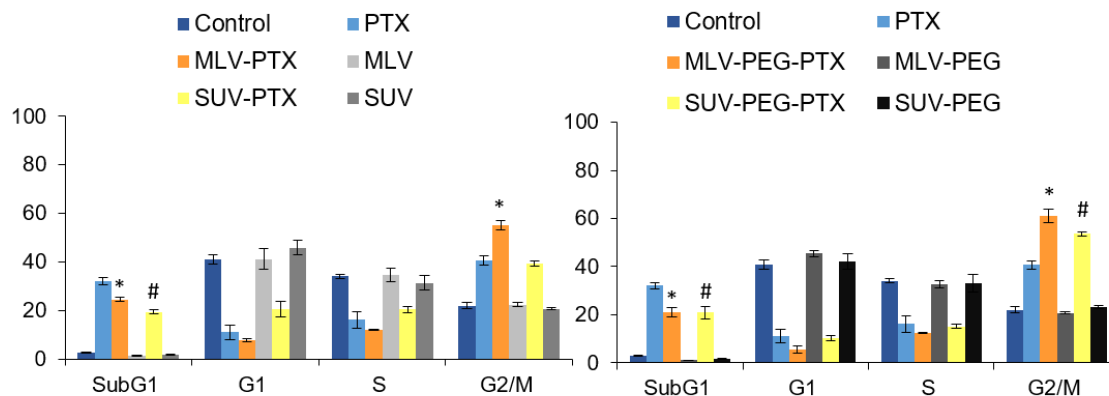


Figura 28: Análisis de ciclo celular en la línea de cáncer de pulmón LL2. Las células se trataron con PTX libre, liposomas cargados con PTX y liposomas vacíos durante 15 horas y a una dosis correspondiente al doble de la IC_{50} del PTX (56 nM). Las muestras se analizaron mediante FACSscan y los resultados se expresaron como el porcentaje de células marcadas en cada fase del ciclo celular. Los datos representan la media de tres réplicas \pm DS. *Datos con diferencias significativas entre los tratamientos con los liposomas lipídicos y PTX libre ($p < 0.05$).

6. ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA

6. 1. NPs DE PLGA

El ensayo de inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-alfa-tubulina se realizó para corroborar cualitativamente la detención en la fase G_2 / M del ciclo celular causada por el PTX, que ya se detectó mediante citometría de flujo. Como se puede observar, en las tres líneas celulares el PTX provocó una acumulación de alfa tubulina, en lo que parece un arresto irreversible en la metafase que impide completar la división celular (Figura 29). Además, en algunas células se pudo observar una multipolarización del huso mitótico (flechas naranjas), característica de este efecto antimitótico del PTX. Este patrón también se observó en las células tratadas con las NPs de PLGA-PTX lo que confirma que la encapsulación del fármaco no afecta a su mecanismo de acción antimitótica. Por otro lado, el marcaje de fluorescencia de las células expuestas a las NPs de PLGA vacías fue muy similar al de las células sin tratar, e incluso se pudieron observar células en proceso de división mitótica.

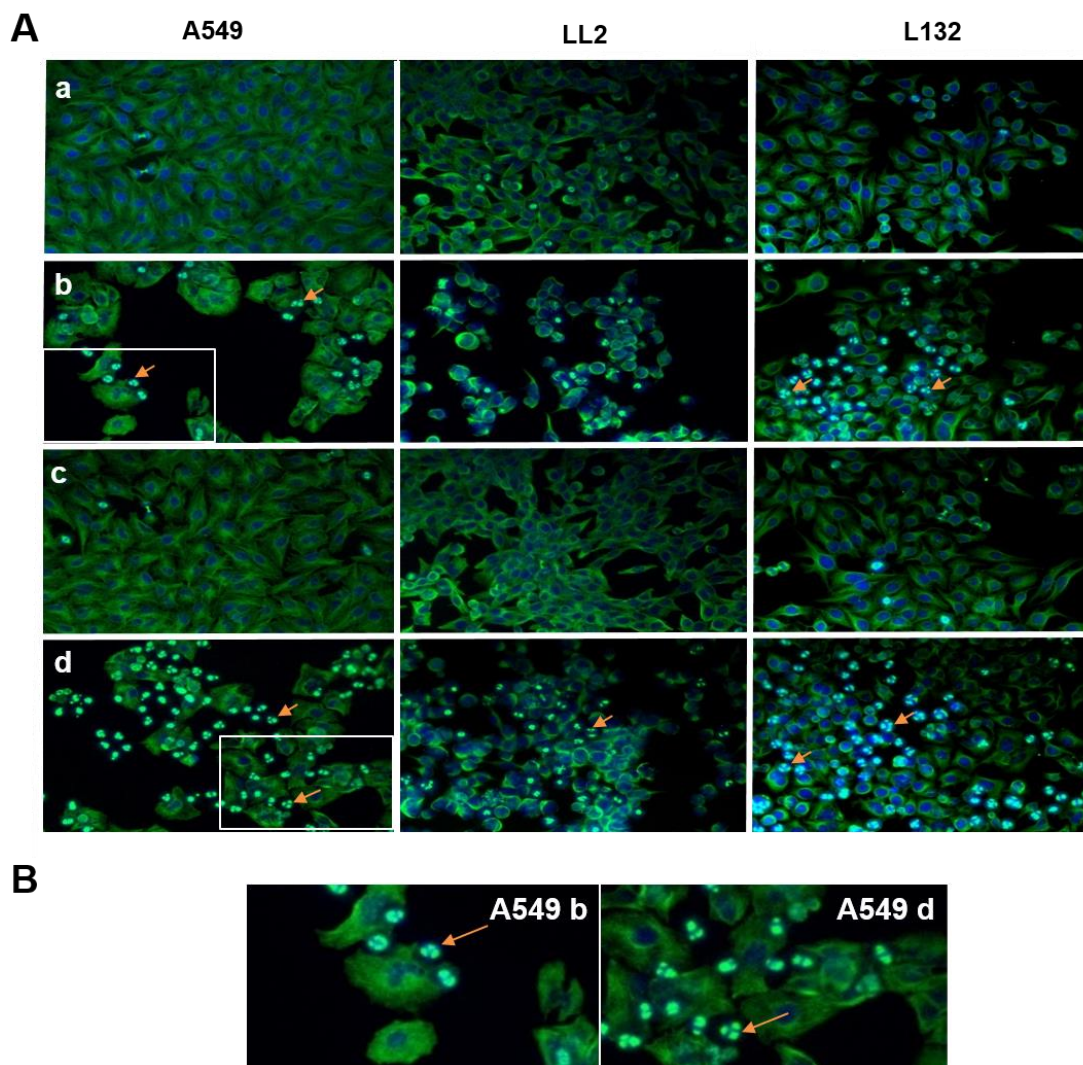
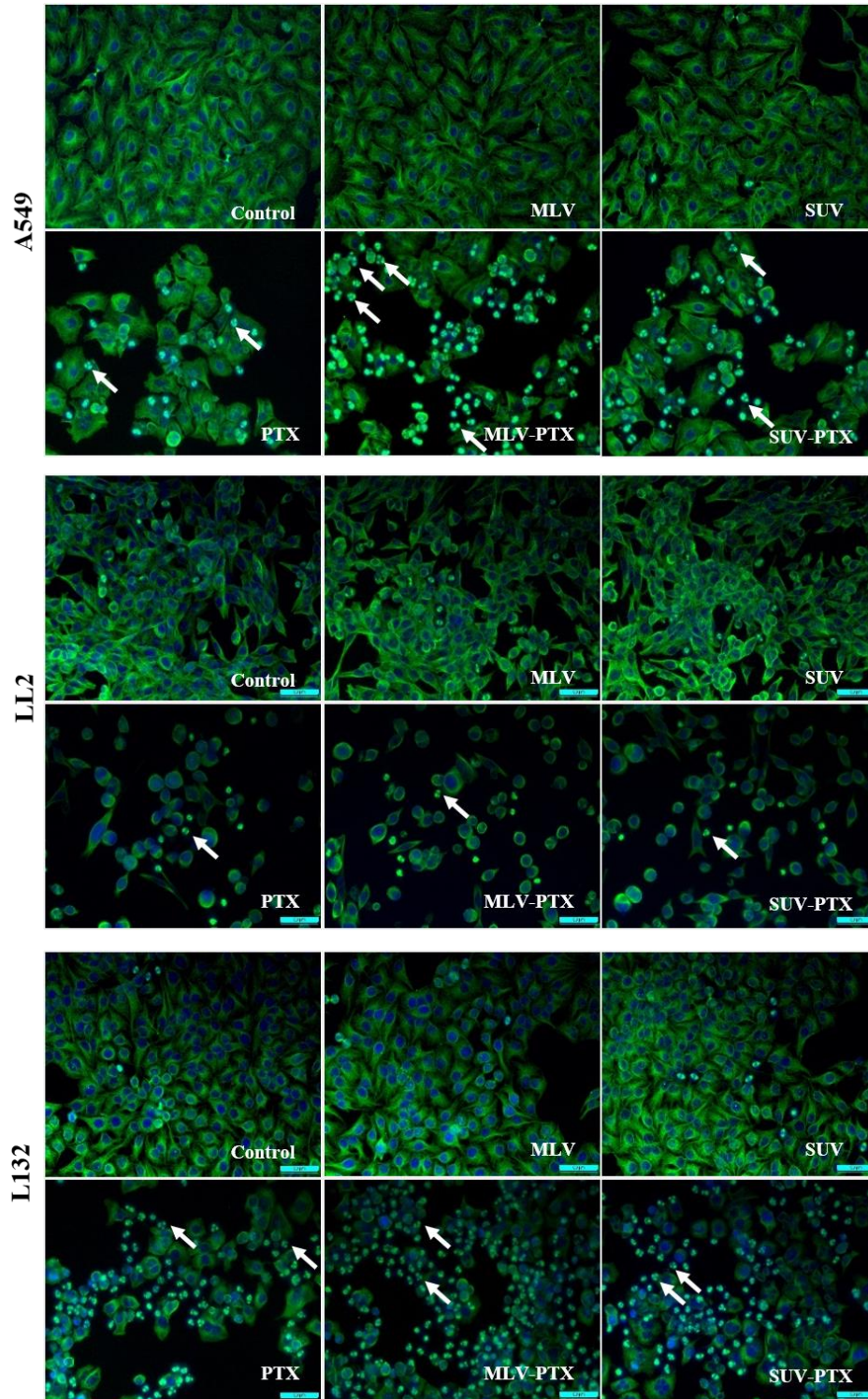


Figura 29: Inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-alfa-tubulina. A) Líneas celulares A549, LL2 y L132 sin tratamiento (control) (a), y tratadas con PTX libre (b), NPs de PLGA vacías (c) y NPs de PLGA-PTX (d) Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258. Las flechas naranjas señalan la multipolarización del huso por el efecto antimitótico del PTX. Magnificación 20X. C) Detalle de la multipolarización del huso en las imágenes A549 (b) y A549 (d).

6. 2. LIPOSOMAS CATIÓNICOS

En el ensayo de inmunofluorescencia, complementario al estudio de los perfiles de ciclo celular, se demostró que la morfología celular y el marcaje de α -tubulina fue similar en las células tratadas con los liposomas vacíos que en las no tratadas, usadas como control, en las tres líneas estudiadas (Figura 30). Por otra parte, las células tratadas con PTX y las cuatro formulaciones lipídicas cargadas con PTX mostraron un marcaje de microtúbulos muy similar, con condensación en los núcleos desestructurados de las células afectas, patrón que también se observó con las NPs de PLGA y que se podría corresponder con una detención

irreversible en la metafase, provocando el arresto celular en la fase G_2 / M . Además, en algunas células es posible observar la multipolarización del huso, como en el caso de las NPs de PLGA. Estos resultados sustentan la hipótesis de que las formulaciones lipídicas no modifican el efecto del PTX con su encapsulación.



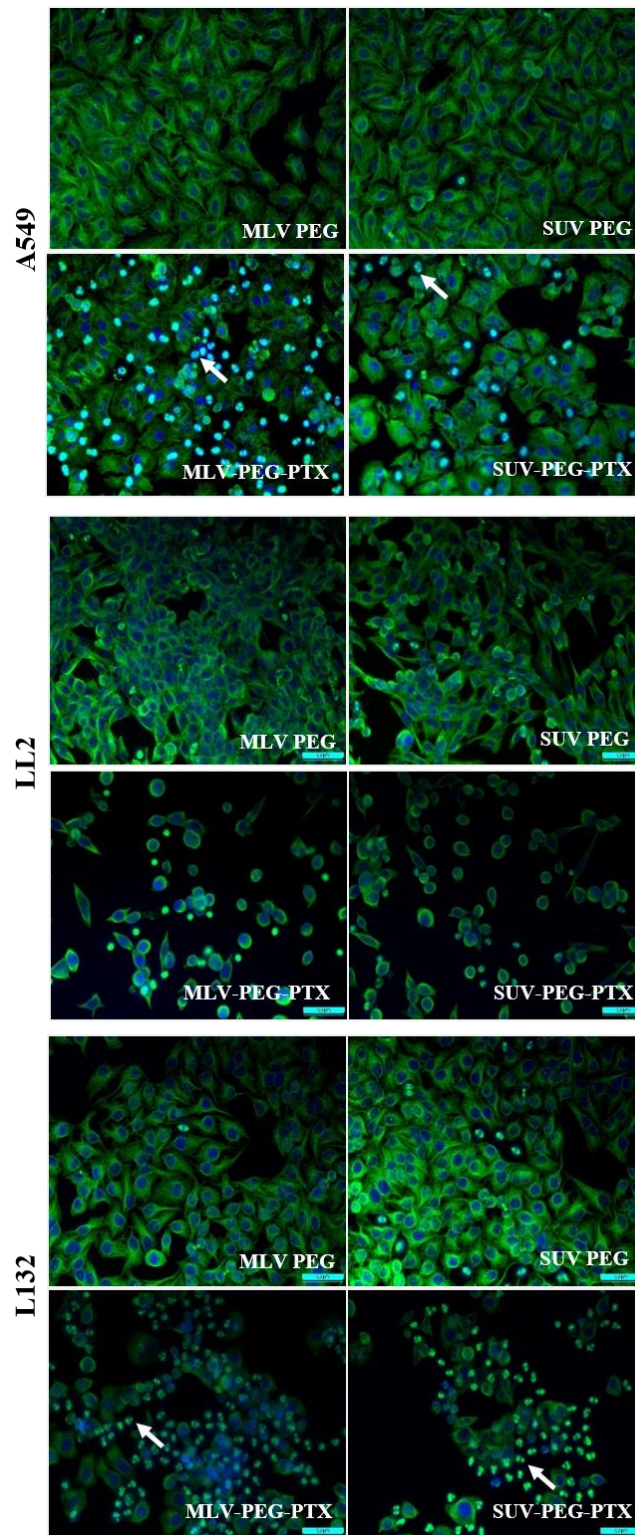


Figura 30: Inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-alfa-tubulina. A) Líneas celulares A549, LL2 y L132 tratadas con diferentes tratamientos durante 24 horas tras inducir la sincronización del ciclo celular mediante privación de suero. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258. Las flechas blancas señalan la multipolarización del huso por el efecto antimitótico del PTX. Magnificación 20X.

7. ANÁLISIS DE APOPTOSIS CON NPs DE PLGA

Los resultados mostraron un mayor porcentaje de células en apoptosis temprana o tardía (entre un 20% y un 60% según la línea celular), con la correspondiente reducción de la VC, tras el tratamiento con NPs de PLGA-PTX en comparación con el tratamiento con PTX libre (Figura 31).

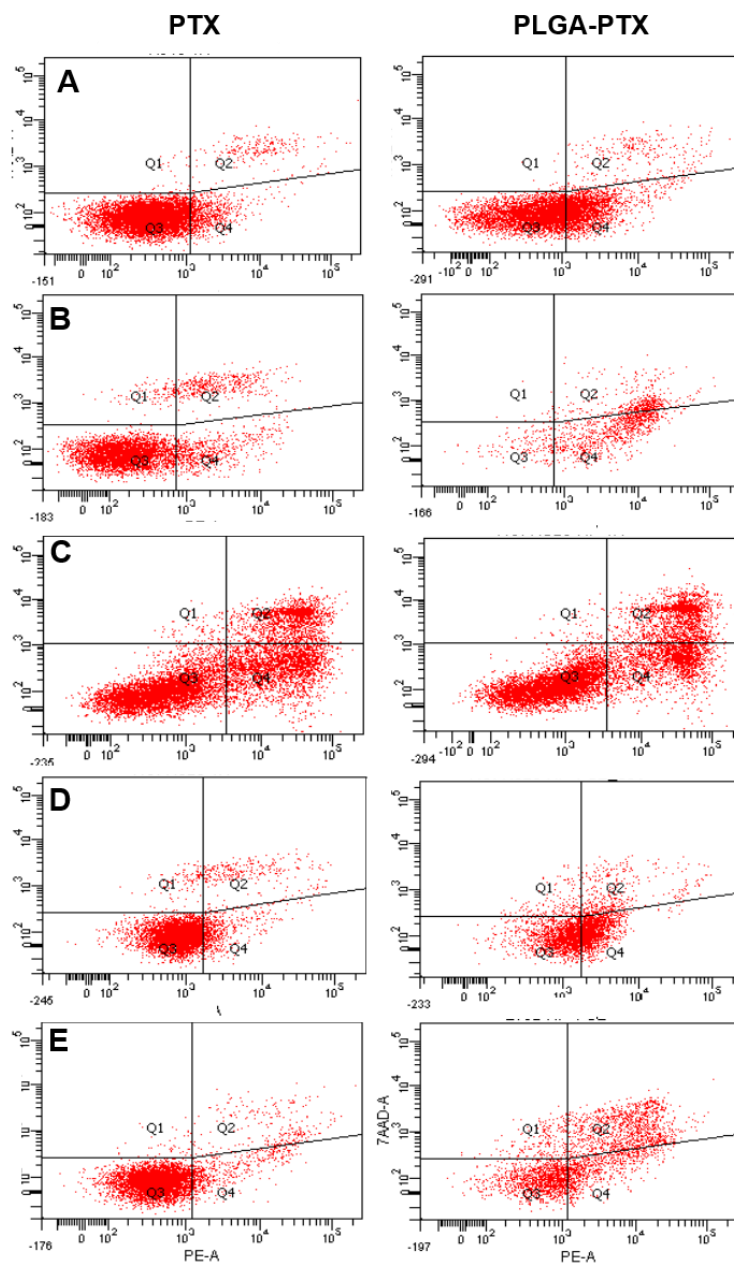


Figura 31: Imagen representativa del análisis de apoptosis por FACSscan después del tratamiento con PTX libre y NPs de PLGA-PTX. Las líneas celulares A549 (A), LL2 (B), NCI-H520 (C) y NCI-H460 (D) y L132 (E) se expusieron a estos tratamientos a la dosis de IC_{50} del PTX durante 48 horas. Los datos representan la media de tres réplicas \pm DS.

En las líneas celulares LL2, L132 y NCI-H520 se observó una proporción similar de células en apoptosis temprana y tardía con el tratamiento con las NPs de PLGA-PTX. Además, en las líneas LL2 y L132 se observó un aumento de la apoptosis temprana del 49% y 12%, respectivamente, y de la apoptosis tardía de un 20% en ambos casos, en comparación con el tratamiento con PTX libre. En cambio, en la línea NCI-H520 no se observaron diferencias en el patrón de muerte celular entre ambos tratamientos. Finalmente, en las líneas A549 y NCI-H460 solo se observó apoptosis temprana con el tratamiento de NPs de PLGA-PTX con un aumento del 24% y 32% con respecto al tratamiento con PTX libre, respectivamente.

8. ENSAYOS DE INTERNALIZACIÓN CELULAR CON NPs DE PLGA

Las NPs de PLGA cargadas con el marcador fluorescente RN se emplearon para determinar la mejora de la captación intracelular de las moléculas transportadas en estas NPs. En primer lugar, el análisis cualitativo por microscopía de fluorescencia reveló una mayor captación de RN en células de la línea A-549 tratadas con las NPs de PLGA-RN en comparación con las tratadas con RN libre, con un aumento progresivo de la acumulación intracelular del RN en los diferentes tiempos de incubación. Además, se observó una mayor intensidad de fluorescencia en el citoplasma celular, siendo muy bajo el marcaje nuclear para todos los tiempos de exposición (Figura 32). Este aumento de la captación celular se corroboró mediante el análisis por citometría de flujo, que evidenció que la internalización del RN fue mayor con las NPs de PLGA-RN que con el RN libre en todos los tiempos analizados, con un incremento de fluorescencia intracelular del 93% (0,5 h), 73% (1 h) 75% (2 h) y 73% (4 h) (Figura 33). Estos resultados podrían explicar el efecto de potenciación de PTX contra las células de cáncer de pulmón, ya que la encapsulación de PTX parece favorecer la internalización del fármaco en las células desde tiempos de exposición muy cortos (0,5 h).

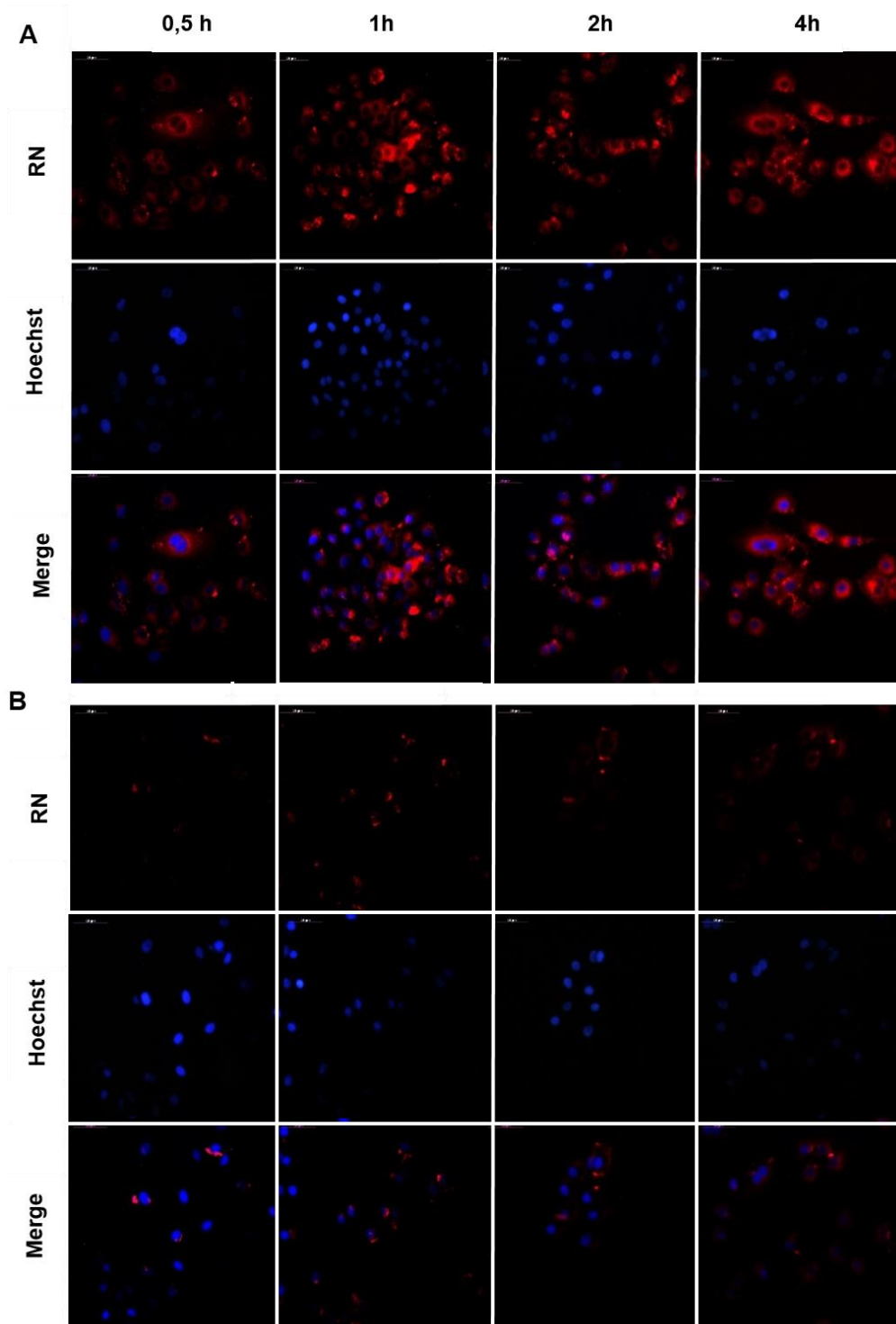


Figura 32: Análisis por microscopía de fluorescencia de la captación intracelular del RN cargado en las NPs de PLGA. La línea celular A549 se incubó con NPs de PLGA-RN (A) y RN libre (B) ($0,1 \mu\text{M}$) a diferentes tiempos (0,5, 1, 2 y 4 horas). Los núcleos celulares se tiñeron con Hoechst 33258 ($0,05 \mu\text{M}$). Magnificación 20X.

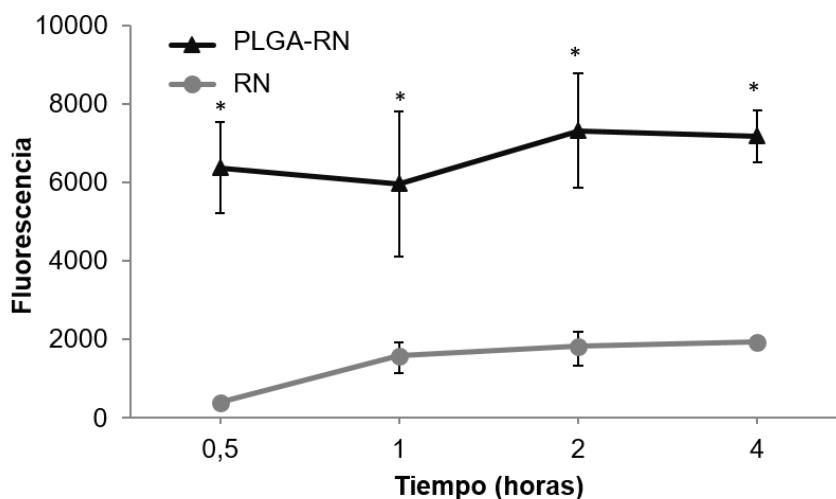


Figura 33: Análisis de la captación intracelular del RN por citometría de flujo. Las células se incubaron con NPs de PLGA-RN y RN libre ($0.1 \mu\text{M}$) a distintos tiempos (0.5, 1, 2 y 4 horas). Los datos representan la media de tres réplicas \pm DS. *Datos con diferencias significativas entre el tratamiento con NPs de PLGA-RN y RN libre ($p < 0.05$).

9. ESTUDIO DE LA FARMACOCINÉTICA INTRACELULAR DEL PTX

9. 1. NPs DE PLGA

Con el fin de completar los estudios de internalización, se determinó la concentración de PTX intracelular a diferentes tiempos después de exponer a las células a los tratamientos con PTX libre y las NPs de PLGA-PTX. Como se muestra en la Figura 34, la concentración de PTX intracelular aumentó tras los primeros 30 minutos de exposición a los tratamientos y fue significativamente mayor cuando se trataron las células con las NPs de PLGA-PTX que, con el fármaco libre, siendo 30 veces mayor en el caso de la línea A549. Además, se obtuvieron resultados similares en las otras dos líneas estudiadas LL2 y L132, con concentraciones de PTX 10.3 y 12.4 veces mayor con las NPs de PLGA-PTX, respectivamente.

La concentración de PTX intracelular permaneció constante o se incrementó en las líneas celulares tumorales de pulmón después de un pico de acumulación tras la primera hora de exposición. Por el contrario, la línea celular no tumoral L132 mostró una disminución progresiva tras la primera hora de incubación con las NPs, reduciéndose desde $6 \times 10^{-4} \mu\text{g}$ de PTX/ μg proteínas tras la primera hora hasta $2 \times 10^{-4} \mu\text{g}$ de PTX/ μg proteínas a las 4 horas.

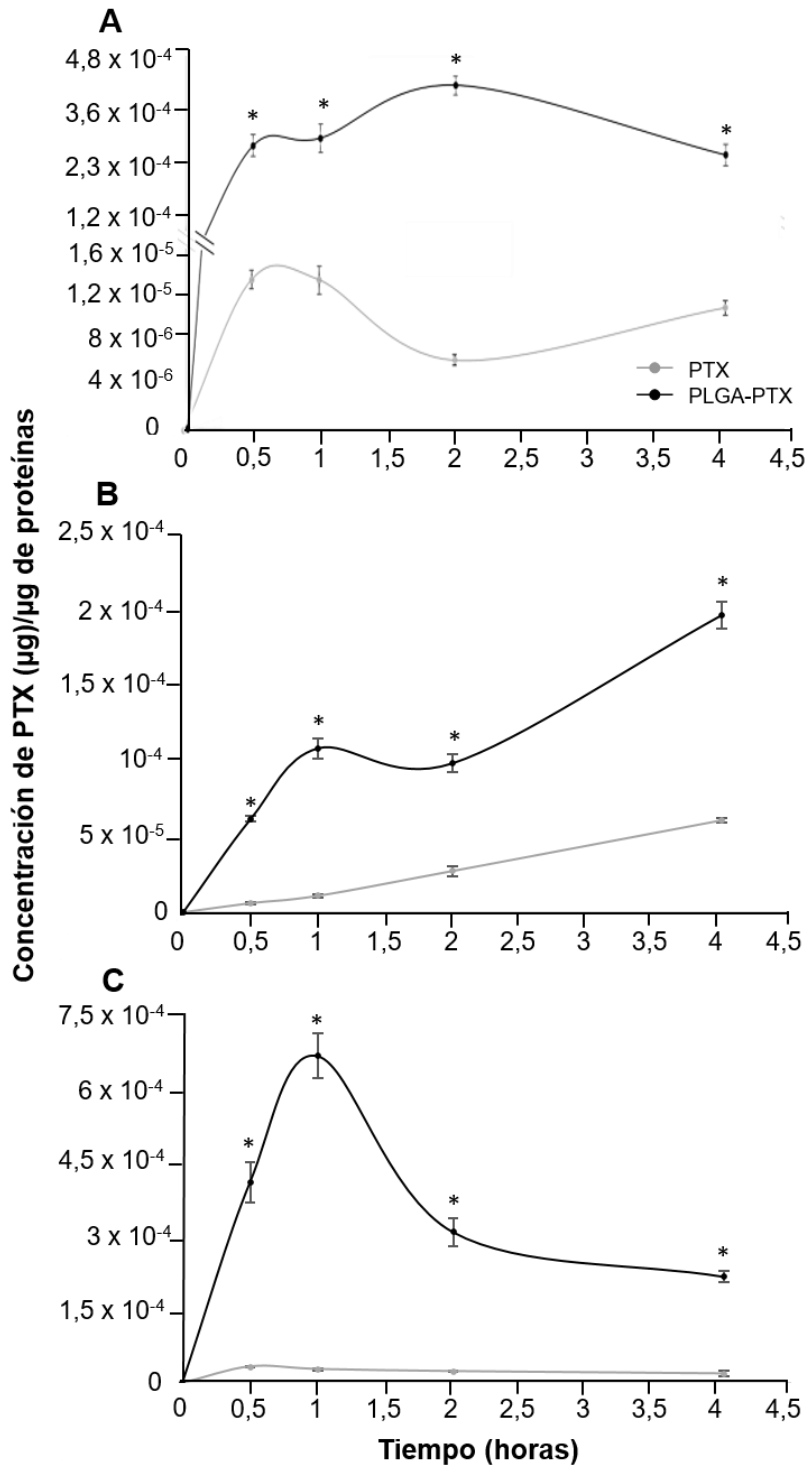


Figura 34: Incorporación intracelular del PTX. Las líneas celulares A549 (A), LL2 (B) y L132 (C) se trataron con PTX libre y NPs de PLGA-PTX y se determinó el fármaco intracelular a distintos tiempos de exposición (0.5, 1, 2 y 4 horas) usando UPLC-MS/MS. Los datos representan el valor medio de tres réplicas \pm DS. *Datos con diferencias significativas entre el tratamiento con NPs de PLGA-PTX y PTX libre ($p < 0.05$).

9. 2. LIPOSOMAS CATIÓNICOS

Los estudios de internalización celular se realizaron para determinar si la mejora del efecto antitumoral estaba relacionada con una mayor incorporación del fármaco en las células. Los resultados mostraron que las dos formulaciones sin pegilación (MLV-PTX y SUV-PTX) aumentaron la concentración PTX intracelular en las líneas tumorales (Figura 35).

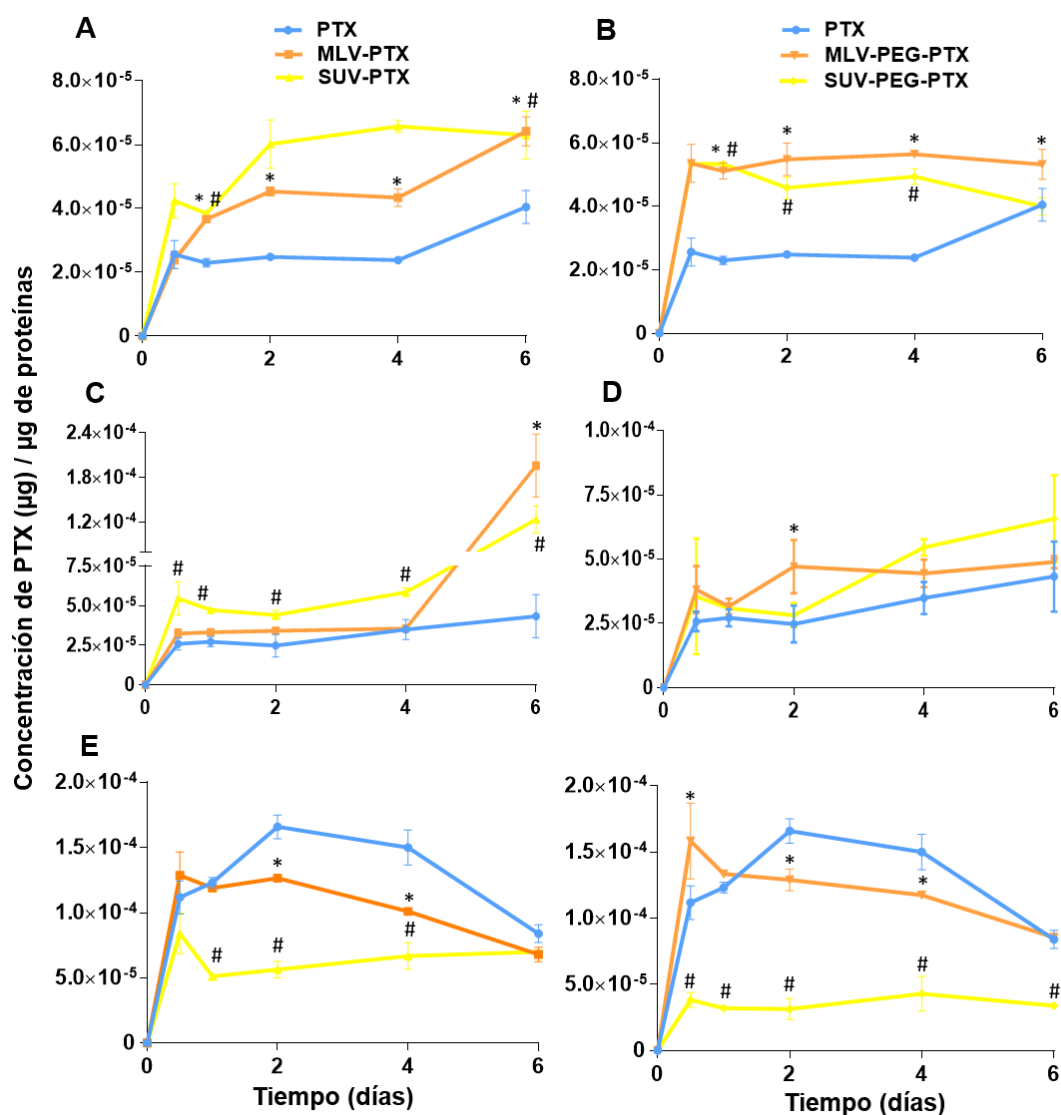


Figura 35: Incorporación intracelular del PTX. Las líneas celulares A549 (A, B), LL2 (C, D) y L132 (E, F) se trataron con PTX libre y las formulaciones lipídicas y se determinó el fármaco intracelular a distintos tiempos de exposición (0.5, 1, 2 y 4 horas) usando UPLC-MS/MS. Los datos representan el valor medio de tres réplicas \pm DS. *Datos con diferencias significativas entre los tratamientos con liposomas MLV-PTX/MLV-PEG-PTX y PTX libre ($p < 0.05$). #Datos con diferencias significativas entre los tratamientos con liposomas SUV-PTX/SUV-PEG-PTX y PTX libre ($p < 0.05$).

Concretamente, tras 6 horas de exposición a los tratamientos, el PTX intracelular detectado fue aproximadamente dos veces superior con ambas formulaciones en comparación con el PTX libre en la línea A549, mientras que en la línea LL2 unas 4,75 y 3 veces superior, respectivamente. Curiosamente, en la línea LL2 parece que la internalización celular de las formulaciones es lenta y escasa durante las primeras horas de incubación, y es a partir de las 6 horas de exposición donde se produce un aumento exponencial del PTX intracelular. En la línea normal L132 no se observaron diferencias en la incorporación de fármaco con el uso de los liposomas MLV-PTX o SUV-PTX en comparación con el PTX libre tras 6 horas de exposición, aunque durante las primeras horas de incubación fue mayor la incorporación detectada con el PTX libre que con los liposomas. Por su parte, los liposomas pegilados (MLV-PEG-PTX y SUV-PEG-PTX) aumentaron la incorporación del PTX en la línea A549 hasta 2.5 veces durante las 2-4 primeras horas de exposición, pese a que, tras 6 horas de incubación, la concentración intracelular de PTX fue muy similar a la detectada con el PTX libre. Sin embargo, estas formulaciones pegiladas no incrementaron la concentración de PTX en las células de la línea tumoral LL2 y en la normal L132.

10. ESTUDIO DE CARACTERIZACIÓN DE CSCs

Las tumoresferas derivadas de A549 se pudieron observar desde el día 1, siendo más compactas y de mayor tamaño en torno al día 4, alcanzando tamaños de hasta 300 μm . Asimismo, para verificar el correcto aislamiento de las CSCa se realizó un análisis de la expresión relativa del ARNm de genes específicos del fenotipo de célula madre, como son SOX2, NANOG, OCT4 y CD133, transcurridos los 15 días de aislamiento. Los resultados mostraron una sobreexpresión de dos veces de los genes CD133, NANOG y SOX2, y de hasta cinco veces en el caso de OCT4, en comparación con la expresión obtenida con la línea A549 basal (Figura 36). Estos resultados demuestran que las células aisladas se corresponden con un fenotipo de células madre cancerígenas derivadas de la línea A549.

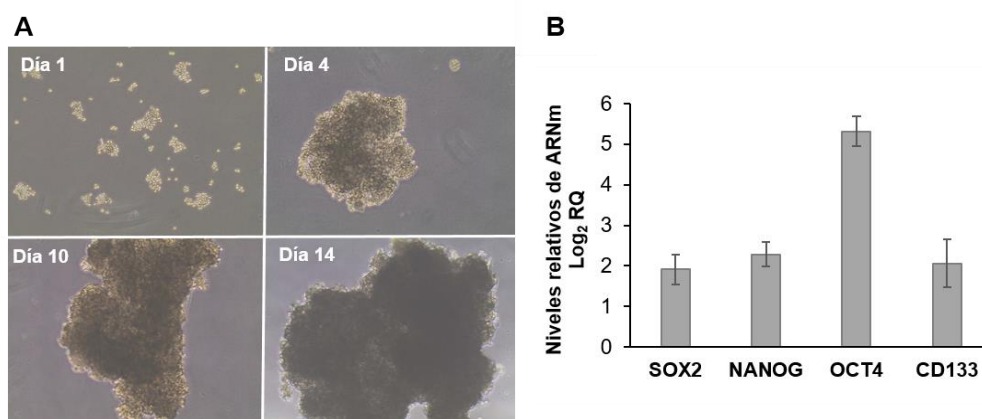


Figura 36: Caracterización de las CSCs. A. Imágenes representativas de las CSCs derivadas de A549 durante el proceso de aislamiento desde el día 1 (agregaciones celulares) hasta el día 14 (agregados celulares compactos con un tamaño aproximado de 300 μm). Magnificación 4X. B. Expresión de los genes *SOX2*, *NANOG*, *OCT4* y *CD133* de las CSCs. Los datos muestran el \log_2 del aumento de expresión del ARNm relativa a la de las células tumorales A549 basales, representando la media de ocho réplicas \pm DS.

11. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN EN CSCS

11. 1. NPS DE PLGA

La actividad antitumoral de las NPs de PLGA se testó sobre las CSCs aisladas de la línea tumoral A549, previamente caracterizadas. Los resultados mostraron una ausencia de toxicidad sobre las CSCs con el uso de las NPs vacías, corroborando la compatibilidad de la nanoformulación. Por otra parte, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos con PTX y PLGA-PTX en las dosis más bajas, obteniendo una reducción de un 22% y un 34% de la VC con PTX y PLGA-PTX a la dosis de 30 nM, respectivamente. Por otra parte, con la administración de dosis superiores (50-100 nM) el efecto de ambos tratamientos fue muy similar y se mantuvo constante en torno 60-65% de VC, lo que impidió alcanzar la dosis de IC_{50} , como puede observarse en la Figura 37.

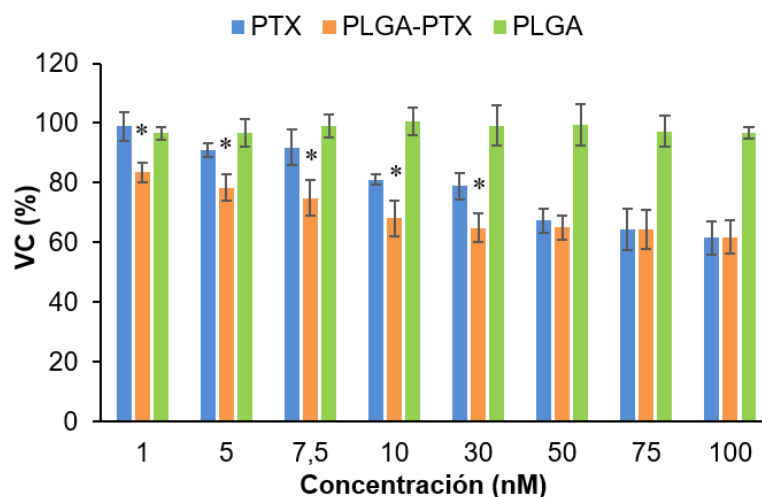


Figura 37: Ensayo de proliferación en CSCs tras 72 horas de incubación con los tratamientos de PTX, PLGA-PTX y PLGA (1-100 nM). El porcentaje de VC se representó como el valor medio ocho réplicas \pm DS. *Datos con diferencias significativas entre el tratamiento con PLGA-PTX y PTX libre ($p < 0.05$).

11. 2. LIPOSOMAS CATIÓNICOS

El efecto antitumoral de los liposomas también fue testado sobre las CSCs derivadas de A549. En el rango de concentración usado en el ensayo no se llegó a alcanzar la dosis de IC_{50} ni con el tratamiento con PTX libre, ni con ninguna de las formulaciones de liposomas cargadas con PTX, como se muestra en la Figura 38. De hecho, el efecto de los diferentes tratamientos a la dosis más alta (100 nM) resultó en una supervivencia celular alrededor del 65-70%, salvo con el tratamiento con SUV-PEG-PTX, con el que la supervivencia celular se mantuvo en un 80%. Por su parte, MLV-PTX y SUV-PTX tuvieron un efecto muy similar al PTX libre a todas las concentraciones testadas, mientras que MLV-PEG-PTX fue la única formulación que mejoró significativamente el efecto del PTX libre, mejorando el efecto antitumoral del fármaco desde las dosis más bajas (5 nM) a las más altas (75 nM). Finalmente, SUV-PEG-PTX resultó ser la formulación con menor efecto antitumoral sobre las CSCs de A549.

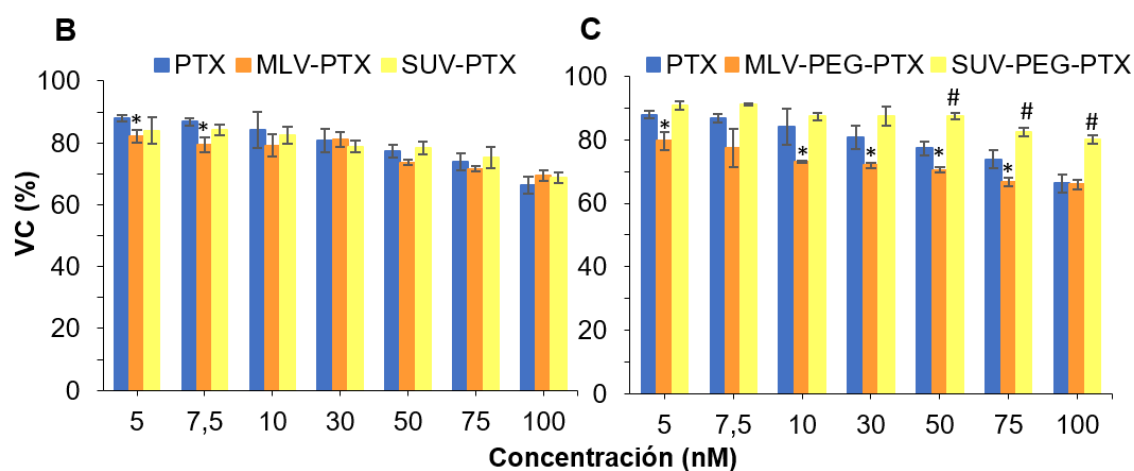


Figura 38: Ensayo de proliferación en CSCs tras 72 horas de incubación con los tratamientos de PTX libre y las formulaciones lipídicas cargadas con PTX (1-100 nM). El porcentaje de VC se representó como el valor medio ocho réplicas \pm DS. *Datos con diferencias significativas entre los tratamientos con liposomas MLV-PTX/MLV-PEG-PTX y PTX libre ($p < 0.05$). #Datos con diferencias significativas entre los tratamientos con liposomas SUV-PTX/SUV-PEG-PTX y PTX libre ($p < 0.05$).

12. ESTUDIO DE FENÓMENOS DE RESISTENCIA A FÁRMACOS CON NPs DE PLGA

En este estudio, se analizó la capacidad de las NPs de PLGA para inhibir el mecanismo de resistencia mediado por el transportador P-glicoproteína mediante un ensayo de retención de rodamina, un sustrato de este transportador. Como se observa en la Figura 39, la preincubación de las células resistentes con las NPs de PLGA mostró un perfil de rodamina muy similar al obtenido con células sin pretratamiento, mientras que con el verapamilo se observó una mayor retención de la rodamina, al ejercer su efecto inhibitorio sobre la P-gp. Por tanto, estos resultados sugieren que las NPs de PLGA no muestran capacidad inhibitoria frente al transportador P-gp.

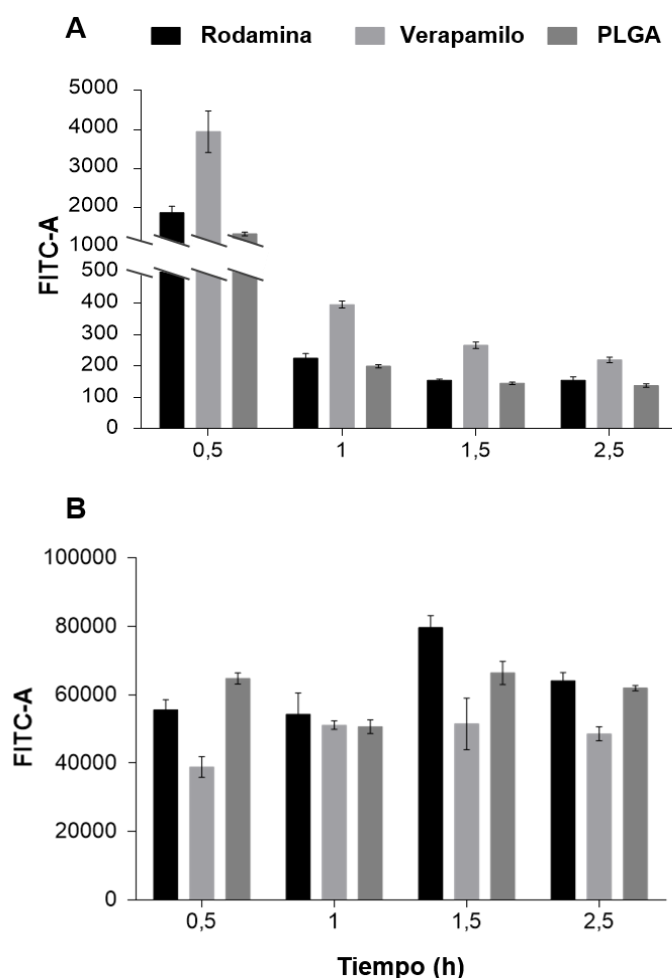


Figura 39: Modulación de la resistencia a fármacos mediada por P-gp tras el tratamiento con NPs de PLGA. Las células resistentes de la línea HCT-15 (A) y las células sensibles de la línea T84 (B) se incubaron con NPs de PLGA o verapamilo durante 24 horas. Posteriormente, se añadió rodamina, un sustrato fluorescente de la P-gp. Tras media hora, se eliminó la rodamina del medio y se recogieron muestras a distintos tiempos (0,5, 1, 1,5 y 2,5 h) para analizar mediante citometría de flujo FACScan la rodamina intracelular. Los datos representan la media de tres réplicas \pm DS.

13. ENSAYOS EN MTS

13. 1. NPs DE PLGA

Los MTS, un modelo tridimensional que remeda los tumores *in vivo*, se generaron a partir de las líneas tumorales de pulmón A549 y LL2 para analizar la actividad antitumoral de las NPs de PLGA en este tipo de modelos. Los MTS de ambas líneas tratados con NPs de PLGA vacías no mostraron diferencias significativas de volumen en comparación con los MTS sin tratar, usados como controles. Esto evidencia la ausencia de toxicidad de la nanoformulación, como ya se corroboró con los ensayos de hemólisis y de proliferación en células en monocapa y CSCs. Por el contrario, tanto el tratamiento con PTX libre como con las NPs de PLGA-PTX desembocó en una disminución significativa del volumen de los MTS en ambas líneas en comparación con los MTS controles. Sin embargo, la monitorización del volumen de ambos MTS reveló una reducción de volumen significativamente mayor y dependiente del tiempo con el tratamiento con las NPs de PLGA-PTX desde el día 4 al día 8, en comparación con el PTX libre. Específicamente, las NPs de PLGA-PTX a día 4 indujeron una reducción de los MTS derivados de la línea A549 del 45% en comparación con el PTX libre que solo disminuyó un 16.4%. A día 6 y 8 tras el tratamiento, el volumen de los MTS de A549 tratados con las NPs de PLGA-PTX fue un 27% más reducido que el de los tratados con PTX libre (Figura 40). Asimismo, el tratamiento con las NPs de PLGA-PTX también provocó una mayor reducción del volumen de los MTS derivados de la línea LL2 (75%, 90% y 92.5%) que el del PTX libre (21%, 22% y 37%) en los días 4, 6 y 8, respectivamente (Figura 41). Estas diferencias del volumen entre los tratamientos con PTX libre y NPs de PLGA-PTX fueron más acentuadas en los MTS de la línea LL2 que en la línea A549 probablemente debido al alta tasa de proliferación de la línea murina. Por tanto, estos resultados sugieren que las NPs de PLGA favorecen la actuación del fármaco en la masa tumoral, mejorando su actividad antitumoral en modelos tridimensionales.

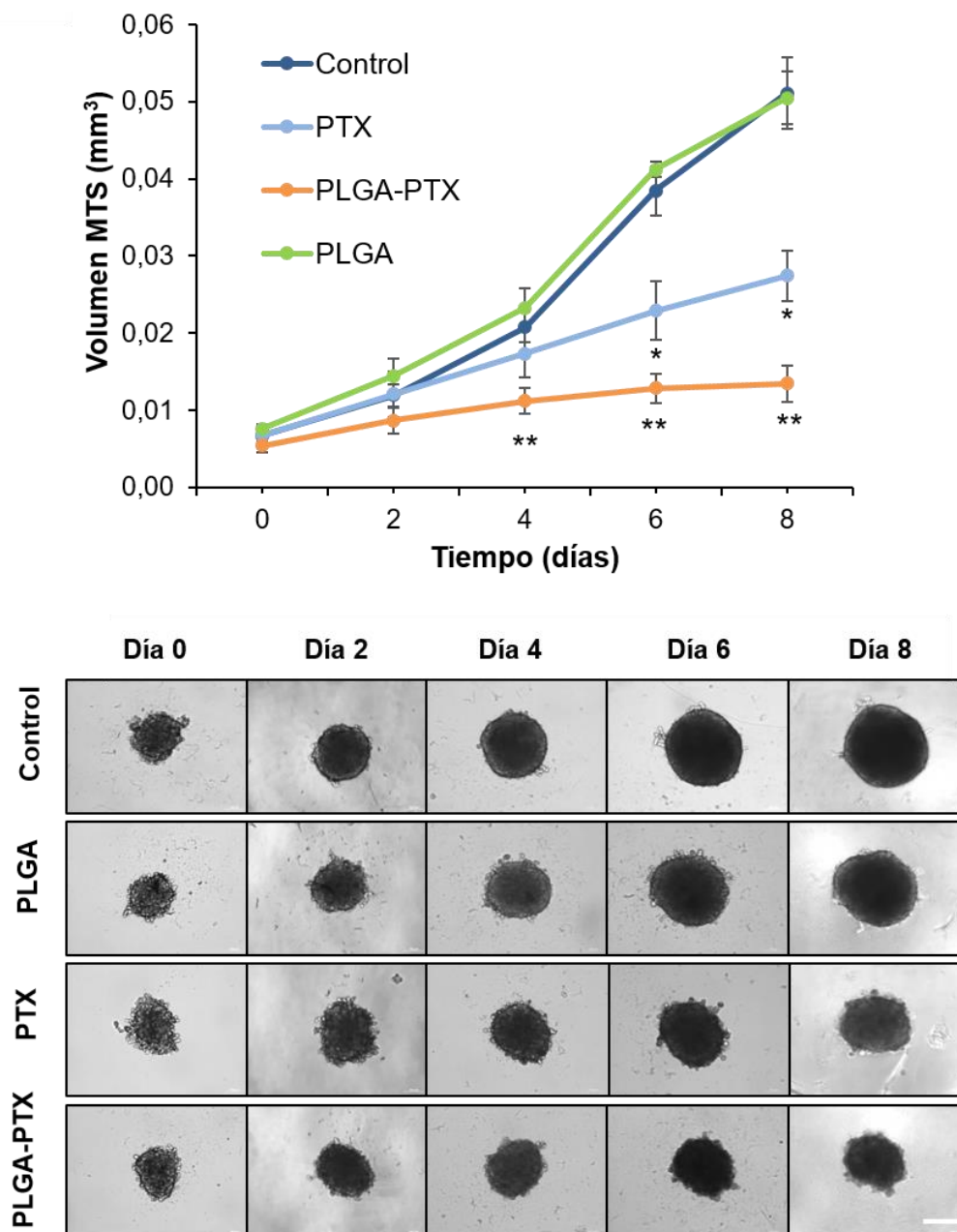


Figura 40: Análisis de la modulación del crecimiento de los MTS tras la administración de los distintos tratamientos (control, PTX, PLGA-PTX, PLGA). Representación gráfica de la monitorización de los volúmenes de los MTS de A549 (mm³) tras diferentes tiempos de exposición. Los MTS no tratados y los tratados con las NPs de PLGA vacías se utilizaron como control. Los datos de volumen representan el valor medio de ocho réplicas \pm DS. *Diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el tratamiento con PTX libre y los MTS controles. **Diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el tratamiento con PTX libre y con NPs de PLGA-PTX. Magnificación de imágenes 4X.

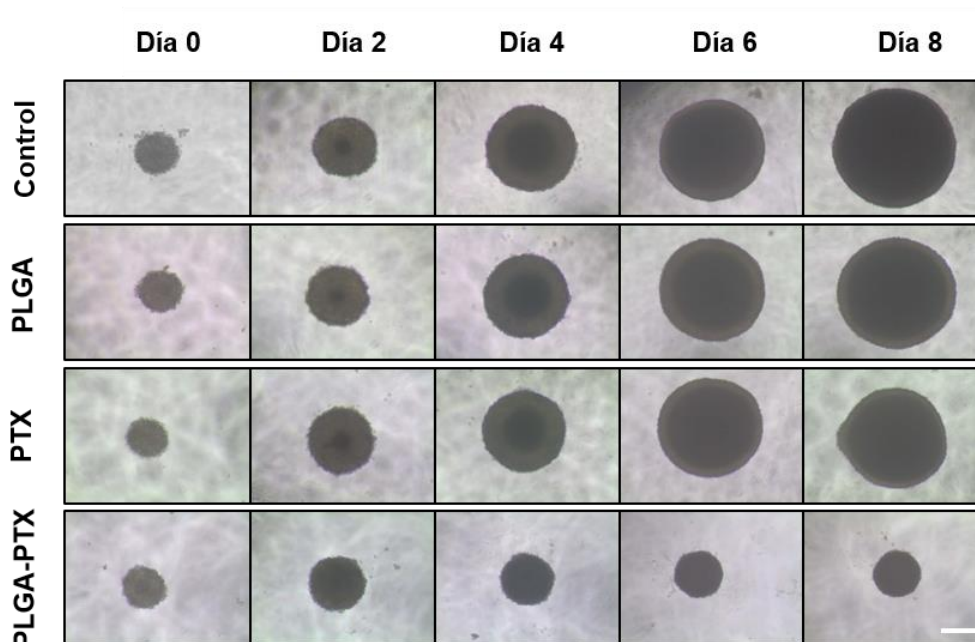
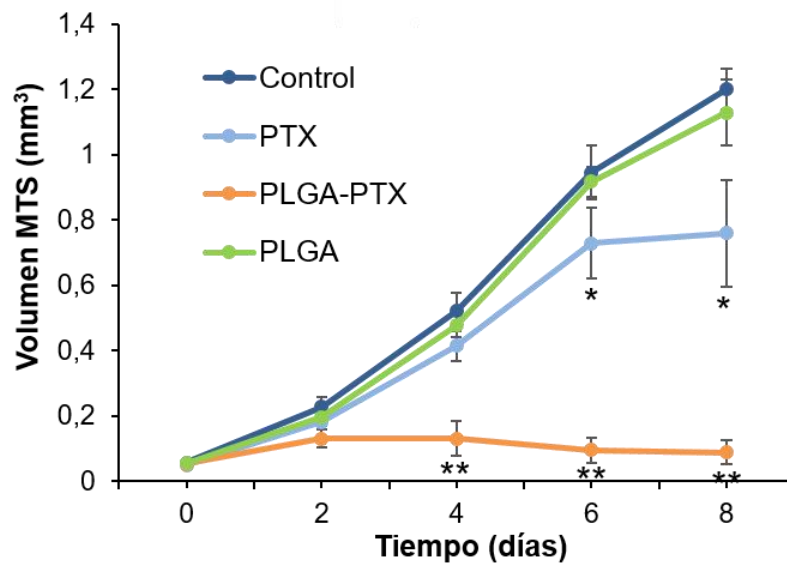


Figura 41: Análisis de la modulación del crecimiento de los MTS tras la administración de los distintos tratamientos (control, PTX, PLGA-PTX, PLGA). Representación gráfica de la monitorización de los volúmenes de los MTS de LL2 (mm³) tras diferentes tiempos de exposición. Los MTS no tratados y los tratados con las NPs de PLGA vacías se utilizaron como control. Los datos de volumen representan el valor medio de ocho réplicas \pm DS. *Diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el tratamiento con PTX libre y los MTS controles. **Diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el tratamiento con PTX libre y con NPs de PLGA-PTX. Magnificación de imágenes 4X.

RESULTADOS

En vista de estos resultados, se realizó un ensayo de TUNEL para determinar la modulación del fenómeno de apoptosis inducida por las NPs de PLGA-PTX en los MTS. Como se muestra en la Figura 42, la superficie de los MTS de A549 (A) y LL2 (B) tratados con las NPs de PLGA-PTX exhibió una mayor proporción de células apoptóticas en comparación con los MTS tratados con PTX libre. No fue posible la observación de marcaje en capas más profundas del MTS debido a su compactación que no facilita la entrada del marcador de apoptosis o el Hoechst. Por otra parte, los MTS controles y tratados con NPs de PLGA vacías no mostraron marcaje por TUNEL.

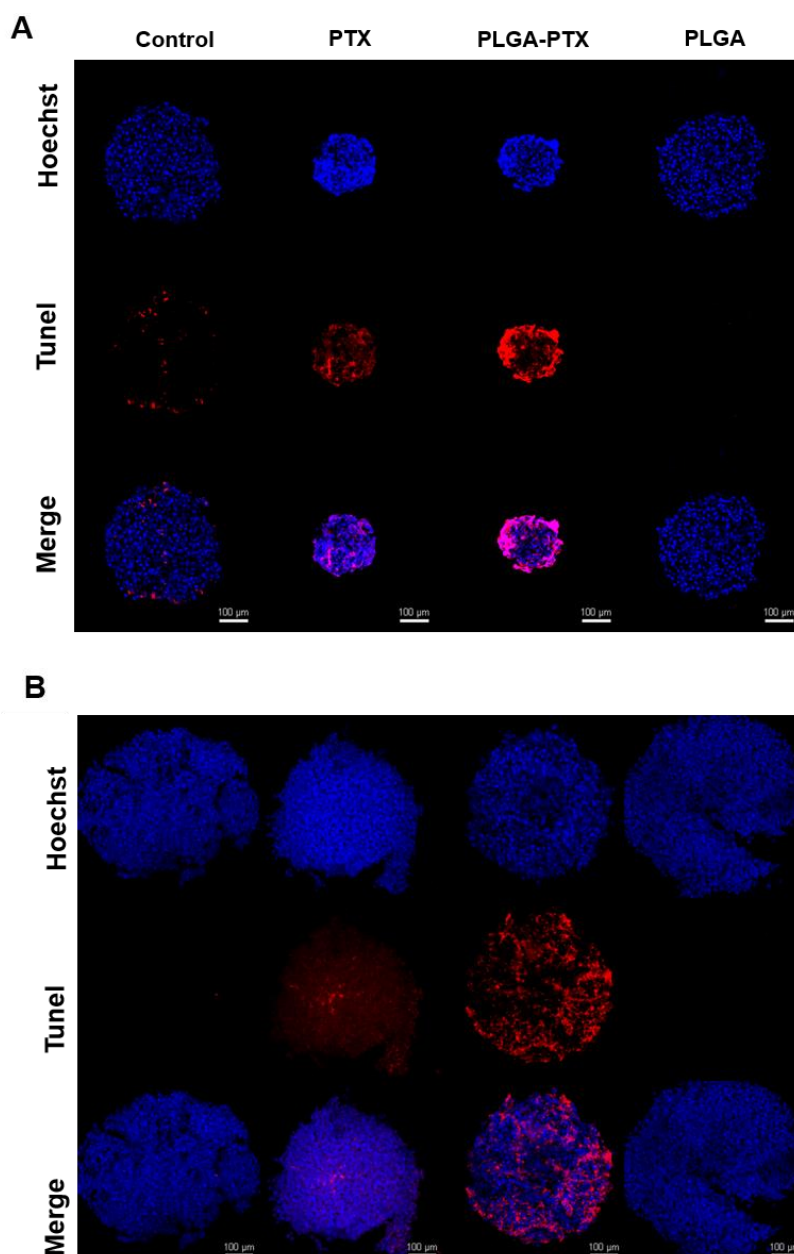
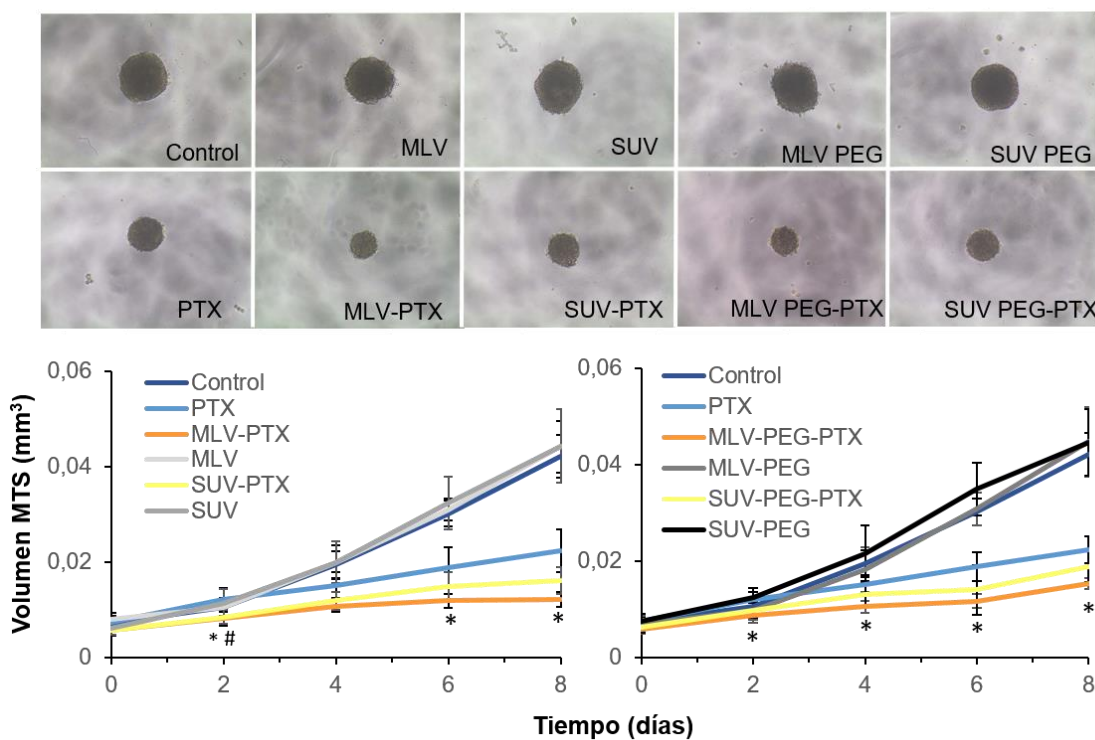


Figura 42: Análisis de apoptosis por TUNEL en MTS de A549 (A) y LL2 (B) tratados con PTX, NPs de PLGA-PTX y PLGA vacías. Los MTS no tratados se utilizaron como controles negativos y los núcleos fueron teñidos con Hoechst. Barra de escala = 100 μm.

13. 2. LIPOSOMAS CATIONICOS

Los MTS generados a partir de las líneas celulares A549 y LL2 se utilizaron para determinar la penetrabilidad y el efecto antitumoral de los liposomas catiónicos cargados con PTX. Los resultados mostraron que el tratamiento con los liposomas de mayor tamaño MLV-PTX y MLV-PEG-PTX provocó una reducción significativa del volumen de los MTS de A549 desde el día 4 en comparación con el tratamiento con el PTX libre. Concretamente, tras ocho días los MTS tratados con ambos liposomas resultaron un 46% y 32% más pequeños que los tratados con el fármaco libre, respectivamente (Figura 43A). Por el contrario, los liposomas más pequeños SUV-PTX y SUV-PEG-PTX no mejoraron la actividad antitumoral del fármaco libre. Por otro lado, los MTS derivados de la línea LL2 se caracterizaron por presentar un crecimiento muy rápido, como se puede observar en los MTS usados como controles, que inicialmente presentaron un volumen aproximado de 0,02 mm³ y alcanzaron un volumen de 0,5 mm³ a tiempo final. El tratamiento con los liposomas MLV-PTX y SUV-PTX provocó una reducción en torno al 60% en comparación con el PTX libre (Figura 43B). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con el uso de las formulaciones pegiladas en comparación con el fármaco libre. Finalmente, los MTS usados como controles y los tratados con los liposomas sin fármacos no mostraron diferencias de volumen.

A



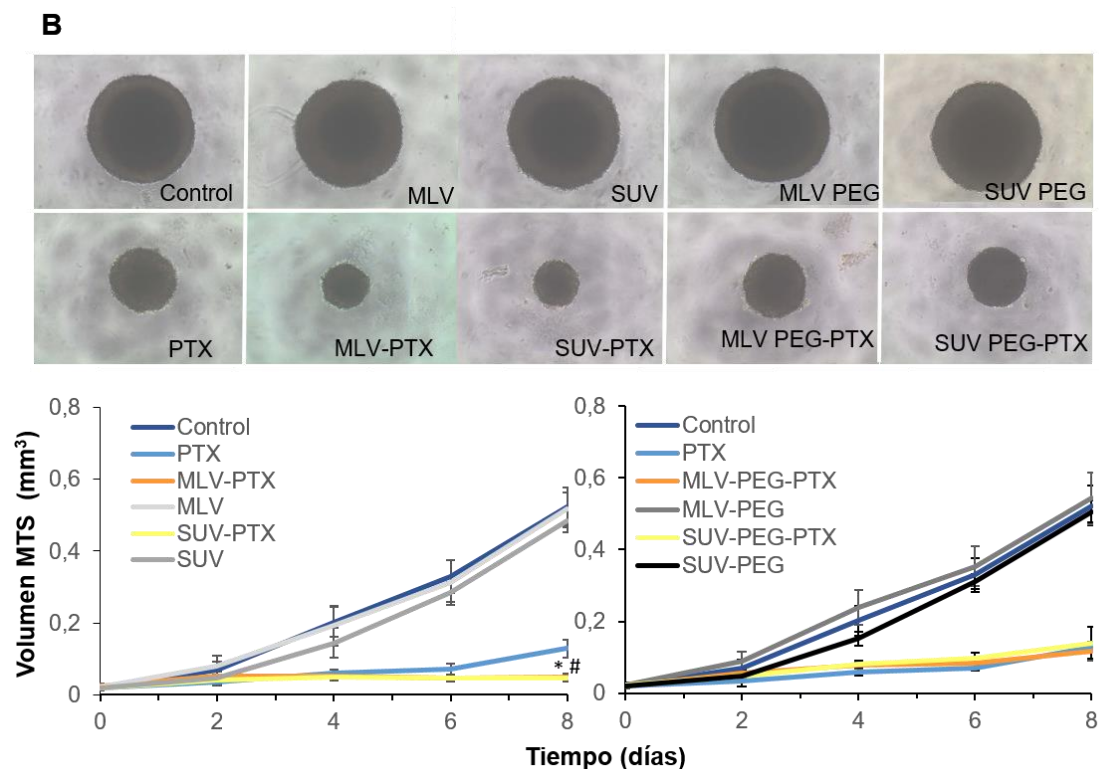


Figura 43: Análisis de la modulación del crecimiento de los MTS tras la administración de los distintos tratamientos (control, PTX, MLV-PTX, SUV-PTX, MLV, SUV, MLV-PEG-PTX, SUV-PEG-PTX, MLV-PEG, SUV-PEG). Representación gráfica de la monitorización de los volúmenes de los MTS con imágenes representativas a día 8 de A549 (A) y LL2 (B) (mm³) tras diferentes tiempos de exposición. Los MTS no tratados y los tratados con las formulaciones vacías se utilizaron como control. Los datos de volumen representan el valor medio de ocho réplicas \pm DS. *Datos con diferencias significativas entre los tratamientos con liposomas MLV-PTX/MLV-PEG-PTX y PTX libre ($p < 0.05$). #Datos con diferencias significativas entre los tratamientos con liposomas SUV-PTX/SUV-PEG-PTX y PTX libre ($p < 0.05$). Magnificación de imágenes 4X.

El ensayo de TUNEL, realizado para determinar la modulación de la apoptosis en los MTS permitió mostrar un área mayor de células apoptóticas en los MTS derivados de A549 tratados con MLV-PTX y MLV-PEG-PTX que en los tratados con PTX libre. Además, las formulaciones más pequeñas tuvieron un marcaje apoptótico similar al PTX. En cambio, los resultados en los MTS de LL2 revelaron que aquellos tratados con MLV-PTX son los que mostraron un mayor marcaje de células apoptóticas (Figura 44). Finalmente, los MTS de ambas líneas tratados con los liposomas sin fármaco no mostraron marcaje de TUNEL. Estos resultados se corresponden con los obtenidos con la monitorización del volumen de los MTS.

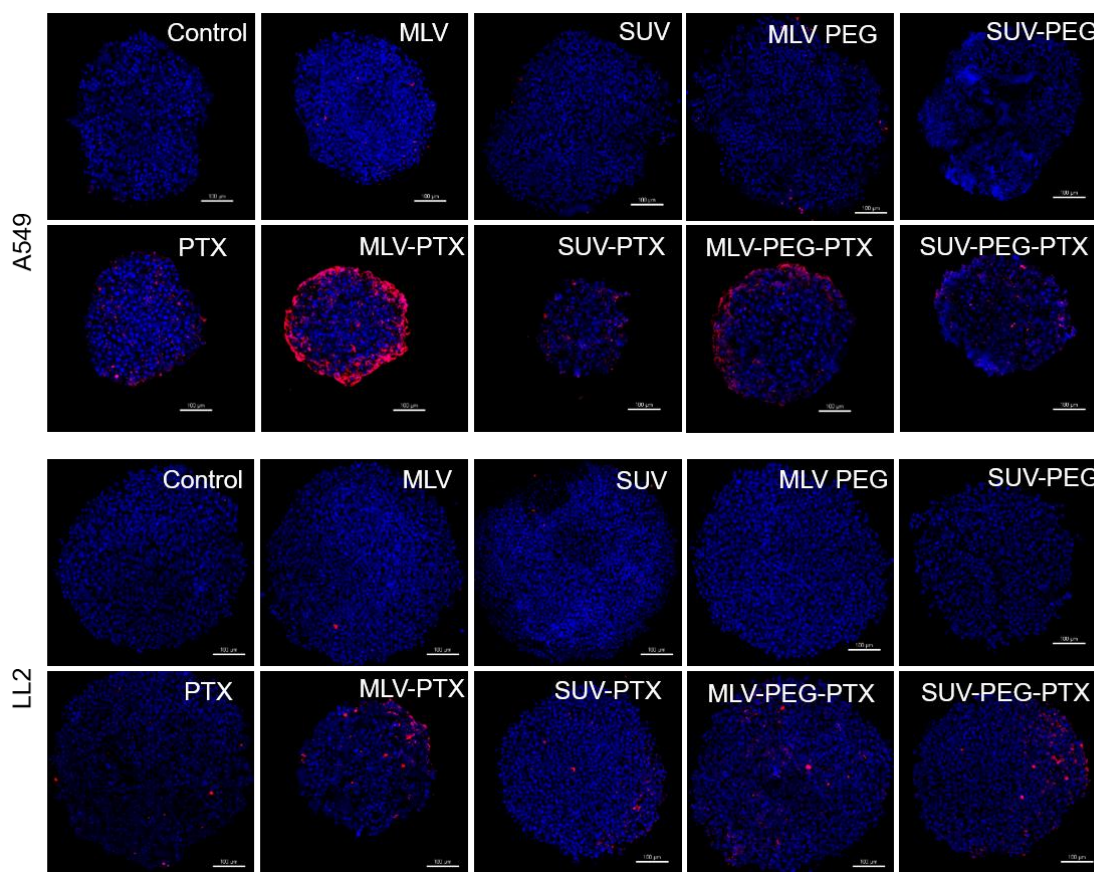


Figura 44: Análisis de apoptosis por TUNEL en MTS de A549 y LL2 tratados con PTX, MLV-PTX, SUV-PTX, MLV-PEG-PTX, SUV-PEG-PTX, y las formulaciones análogas vacías en una dosis equivalente a la IC_{50} de cada línea obtenida en los estudios de proliferación en monocapa y tras 4 días de exposición. Los MTS no tratados se utilizaron como controles negativos de TUNEL. La apoptosis se detectó con marcaje rojo de TUNEL y los núcleos se detectan en azul por tinción con Hoechst. Barra de escala = 100 μ m.

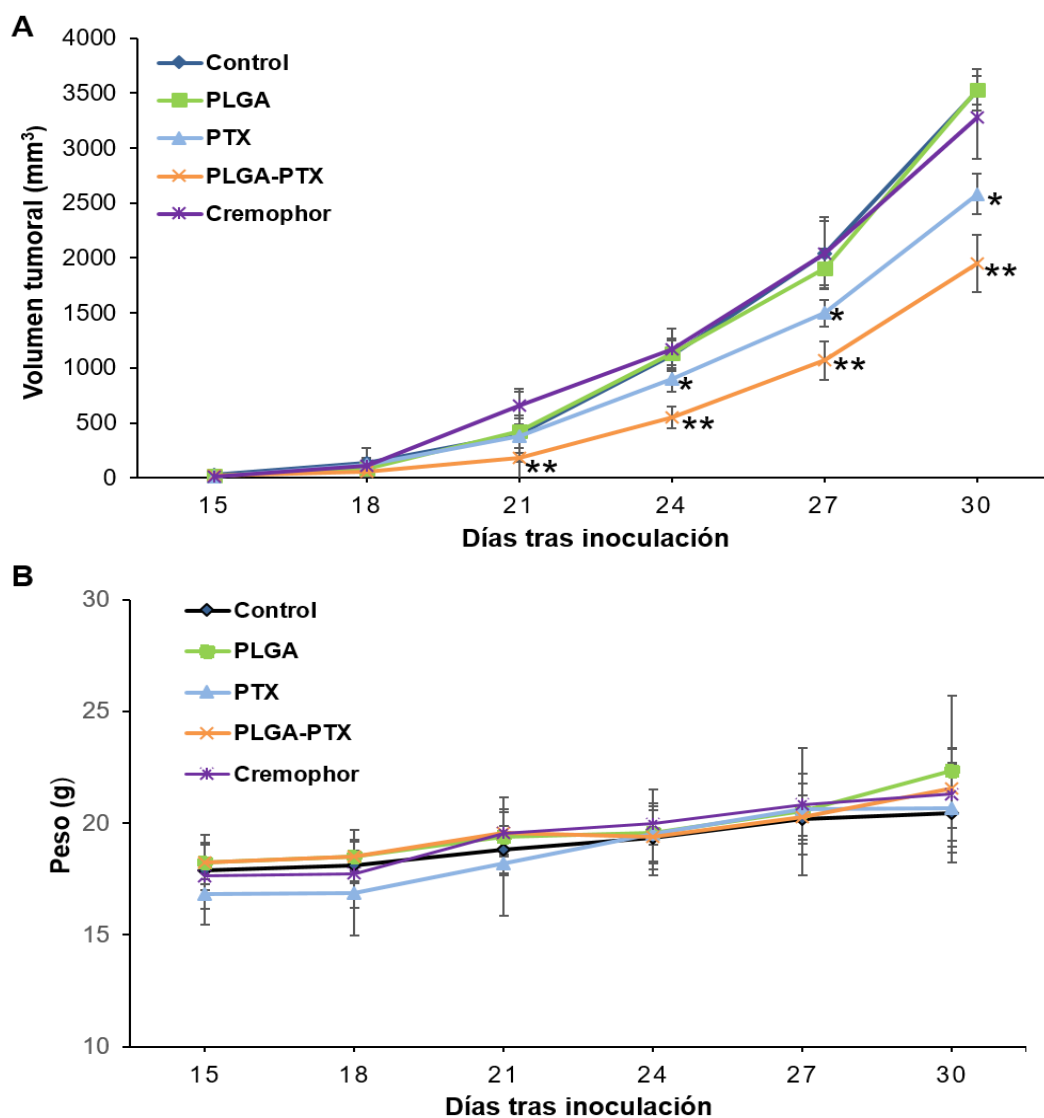
14. ENSAYOS *IN VIVO*

14. 1. NPS DE PLGA

Los ensayos *in vivo* en ratones inmunocompetentes C57BL/6 con tumores subcutáneos inducidos se realizaron para testar la actividad antitumoral y la biocompatibilidad de las NPs de PLGA. Como puede observarse en la Figura 45A, los tumores de los ratones tratados con las NPs de PLGA-PTX mostraron una disminución significativamente mayor ($p < 0.05$) de su volumen (44.6%) en comparación con los de los ratones tratados con PTX libre (24.4%) a día 30 desde la inoculación. Al mismo tiempo, también es posible observar que el crecimiento de los tumores de los ratones tratados con NPs de PLGA-PTX se ralentiza considerablemente desde el día 21 en comparación con el resto de grupos de tratamiento. Estos resultados sugieren y corroboran la mejora de la actividad antitumoral que presenta el

RESULTADOS

PTX cuando se administra encapsulado en las NPs de PLGA. Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas entre los tumores del grupo control y los tratados con Cremophor y NPs de PLGA vacías. Asimismo, no se detectaron pérdidas de peso significativas con ninguno de los tratamientos (Figura 45B), siendo uno de los principales indicadores de toxicidad sistémica. Conjuntamente, se realizaron estudios de supervivencia con el método de Kaplan-Meier (Figura 45C), donde no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos tratados tras analizar la supervivencia con el test log-rank, a pesar de las diferencias observadas en el volumen tumoral.



C

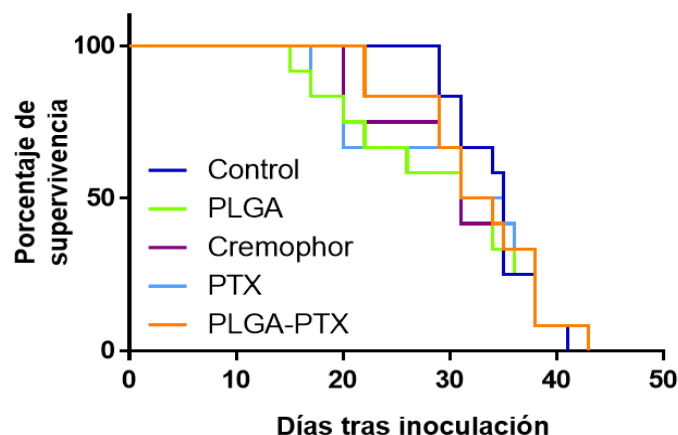


Figura 45: Estudios *in vivo* en ratones inmunocompetentes con tumores de pulmón inducidos. A. Inhibición del crecimiento tumoral después de la administración de los diferentes tratamientos con Cremophor, PTX libre, NPs de PLGA-PTX y NPs de PLGA vacías, usando el grupo sin tratar como control. B. Representación gráfica del progreso de peso de los ratones. C. Curva de supervivencia de Kaplan Meier. Las comparaciones entre las curvas de supervivencia entre los diferentes grupos de ratones se realizaron con la prueba de log-rank ($p < 0.05$). Los datos se representan como el valor medio \pm DS ($n = 12$). *Diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratado con PTX libre ($p < 0.05$). **Diferencias significativas entre el grupo tratado con PTX libre y NPs de PLGA-PTX.

Por otra parte, el análisis de la toxicidad sanguínea tras los tratamientos con PTX libre y las NPs de PLGA-PTX mostró que no existen diferencias significativas entre ambos tratamientos, como se observa en la Tabla 13.

Tabla 13: Análisis de parámetros sanguíneos en ratones no tratados y tratados con PTX y NPs de PLGA-PTX. Los datos representan el valor medio \pm DS ($n = 8$). * Datos con diferencias significativas entre el tratamiento con NPs de PLGA-PTX y PTX libre ($p < 0.05$).

Parámetros sanguíneos	CONTROL	PTX	PLGA-PTX
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	3.12 \pm 0.5	4.11 \pm 0.74	4.6 \pm 0.46
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	6.76 \pm 1.2	8.24 \pm 0.23	8.33 \pm 0.3
HGB (g/dL)	10.77 \pm 1.77	13.22 \pm 0.34	13.4 \pm 0.5
HCT (%)	31.13 \pm 5.6	38.77 \pm 1	38.9 \pm 2.03
RDW	13.87 \pm 0.41	14.76 \pm 0.26	14.73 \pm 0.73

RESULTADOS

PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	525 ± 120.85	771.1 ± 144.9	699.2 ± 159.3
PCT (%)	0.31 ± 0.07	0.48 ± 0.08	0.44 ± 0.13
PDW	19.13 ± 2.75	18.26 ± 2.44	23.08 ± 5.77
LYM (%)	97 ± 0.51	97.4 ± 1.09	97.43 ± 0.95
MON (%)	0.28 ± 0.18	0.35 ± 0.18	$0.58 \pm 0.12^*$
NEU (%)	2.52 ± 0.54	1.94 ± 1.05	1.35 ± 0.74
EOS (%)	0.12 ± 0.1	0.14 ± 0.13	0.13 ± 0.14
BAS (%)	0.08 ± 0.08	0.18 ± 0.13	$0.5 \pm 0.3^*$

WBC, glóbulos blancos; RBC, glóbulos rojos totales; HGB, hemoglobina, HCT, hematocrito; RDW, ancho de distribución de glóbulos rojos; PLT, plaquetas totales; PCT, plaquetocrito; PDW, ancho de distribución plaquetaria; LYM, linfocitos; MON, monocitos; NEU, neutrófilos; EOS, eosinófilos; BAS, basófilos

14. 2. LIPOSOMAS CATIONICOS

Al igual que con las NPs de PLGA, se emplearon ratones C57BL/6 con tumores pulmonares subcutáneos inducidos para analizar la actividad antitumoral de las formulaciones de liposomas catiónicos *in vivo*, así como la posible toxicidad sistémica inducida por las formulaciones vacías. Como se muestra en la figura 46A, los resultados mostraron que ambos tipos de liposomas, MLV-PEG-PTX y SUV-PEG-PTX, indujeron una reducción de volumen tumoral significativamente mayor (56,35% y 57,14%, respectivamente) que con el tratamiento con PTX libre (36,35%) a día 39 desde el inicio del tratamiento. Estos resultados corroboran que la encapsulación del PTX en las formulaciones lipídicas mejora el efecto del fármaco antitumoral, al igual que se observó en los ensayos *in vitro*. Por otro lado, no se encontraron diferencias en el crecimiento del tumor entre el grupo de control y los grupos tratados con liposomas vacíos. Además, no se observó un aumento en la toxicidad de la PTX con el uso de MLV-PEG-PTX y SUV-PEG-PTX ya que no se detectó una pérdida de peso significativa en los ratones tratados en comparación con el grupo tratado con PTX libre, lo que implica que las formulaciones no inducen una toxicidad sistémica en los ratones (Figura 46B).

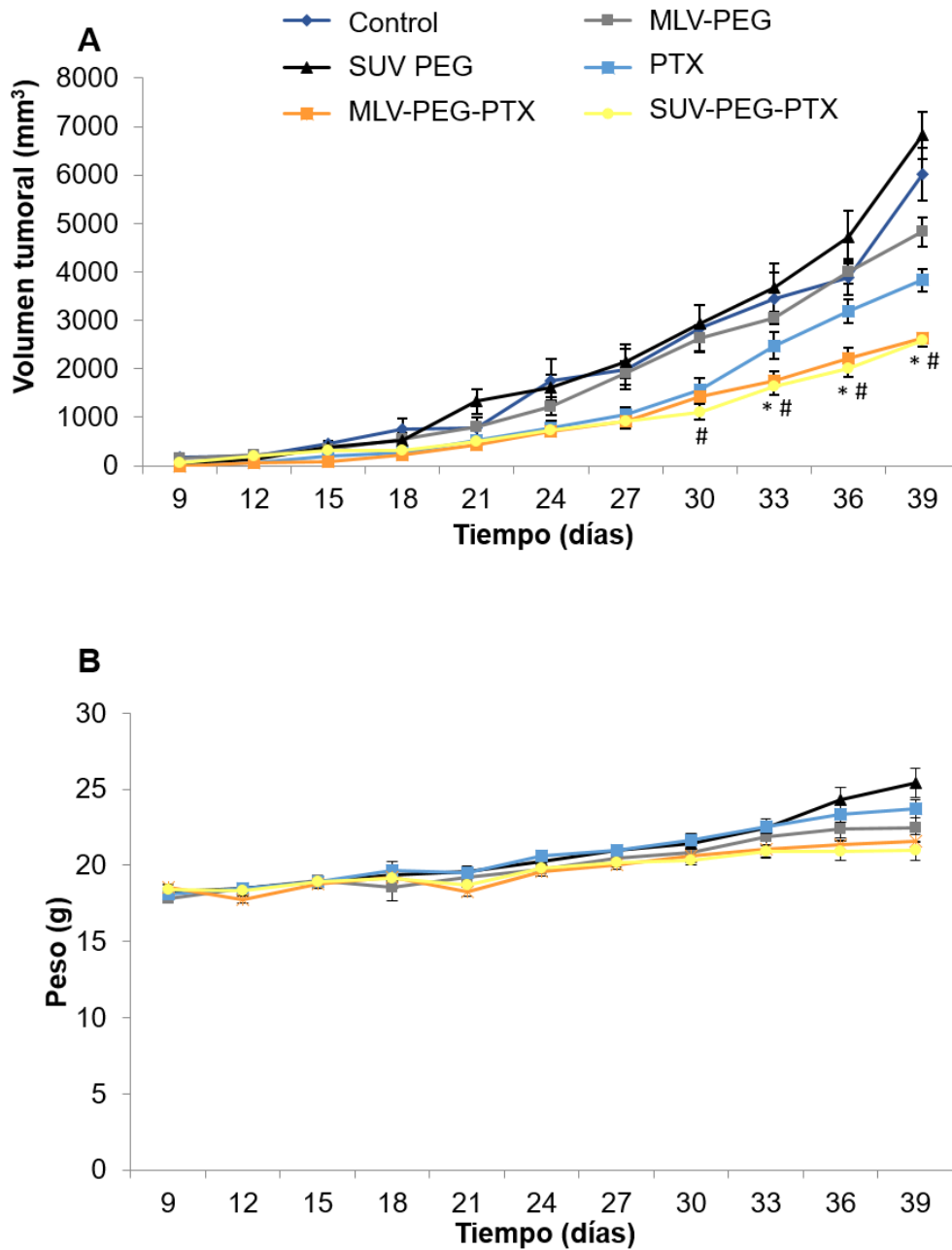


Figura 46: Estudios *in vivo* en ratones inmunocompetentes con tumores de pulmón inducidos. A. Inhibición del crecimiento tumoral después de la administración de los diferentes tratamientos con Cremophor, PTX libre, MLV-PEG-PTX, SUV-PEG-PTX y las formulaciones vacías, usando el grupo sin tratar como control. B. Representación gráfica del progreso de peso de los ratones. Los datos se representan como el valor medio \pm DS ($n = 12$). *Datos con diferencias significativas entre los tratamientos con liposomas MLV-PEG-PTX y PTX libre ($p < 0.05$). #Datos con diferencias significativas entre los tratamientos con liposomas SUV-PEG-PTX y PTX libre ($p < 0.05$)

15. ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS Y DE BIODISTRIBUCIÓN EN TEJIDOS

15. 1. NPs DE PLGA

Los estudios de biodistribución del PTX en diferentes tejidos se realizaron tras una administración intravenosa única de NPs de PLGA-PTX y PTX libre en ratones inmunocompetentes con tumores inducidos. La Figura 47A muestra cómo el tratamiento con NPs de PLGA-PTX provocó una mayor acumulación de PTX en todos los tejidos, a excepción del corazón, a todos los tiempos de estudio en comparación con el PTX libre. Curiosamente, la mayor concentración de PTX tras la administración de la nanoformulación se detectó en el tejido pulmonar tras la primera hora de exposición, y en el hígado y bazo tras 6, 12 y 24 horas de exposición. Además, un estudio específico en tejido cerebral mostró que las NPs de PLGA-PTX aumentaron significativamente la concentración de PTX (especialmente después de las 12 h, con un pico de ~ 400 ng PTX / g tejido) en relación con los valores observados con el PTX libre (Figura 47B). Por otra parte, se realizó un análisis específico en los DRGs para determinar la presencia de PTX. Sorprendentemente, como se observa en la Figura 47C, se detectó una concentración de PTX significativamente menor (<1 ng/6 DRGs) en estas estructuras cuando se administró el PTX encapsulado en las NPs de PLGA, en comparación con la concentración detectada con la administración libre del fármaco. Estos resultados muestran que las NPs disminuyen la entrada del PTX a estas estructuras, que se han asociado en numerosos estudios con el desarrollo de la neuropatía periférica dolorosa de los pacientes que reciben tratamientos oncológicos con PTX. Por su parte, el análisis del tejido tumoral mostró que el PTX libre penetró en el tumor subcutáneo con mayor rapidez que las NPs de PLGA-PTX, con concentraciones de 1100 ng PTX/g tejido y 200 ng PTX/ g tejido, respectivamente tras la primera hora de exposición. Posteriormente, trascurridas 24 horas la concentración de PTX en el tumor alcanzó niveles similares con ambos tratamientos (Figura 47D). A pesar de no haber detectado una acumulación prominente de PTX en el tumor con la administración de NPs de PLGA-PTX, sí fue posible demostrar la inhibición del crecimiento tumoral con este tratamiento, lo que sugiere que posiblemente esta nanoformulación requiere tiempos más prolongados de exposición para penetrar y acumularse en el tumor subcutáneo. Finalmente, los estudios farmacocinéticos en plasma revelaron que el tratamiento con NPs de PLGA-PTX mantuvo niveles significativamente más altos de PTX tras 12 y 24 horas de exposición en comparación con el PTX libre, a pesar de que el PTX libre se detectó en mayor concentración tras la primera hora (Figura 47E). Estos resultados representan una mejora significativa de la biodisponibilidad del fármaco en el torrente sanguíneo con la encapsulación del fármaco en las NPs de PLGA.

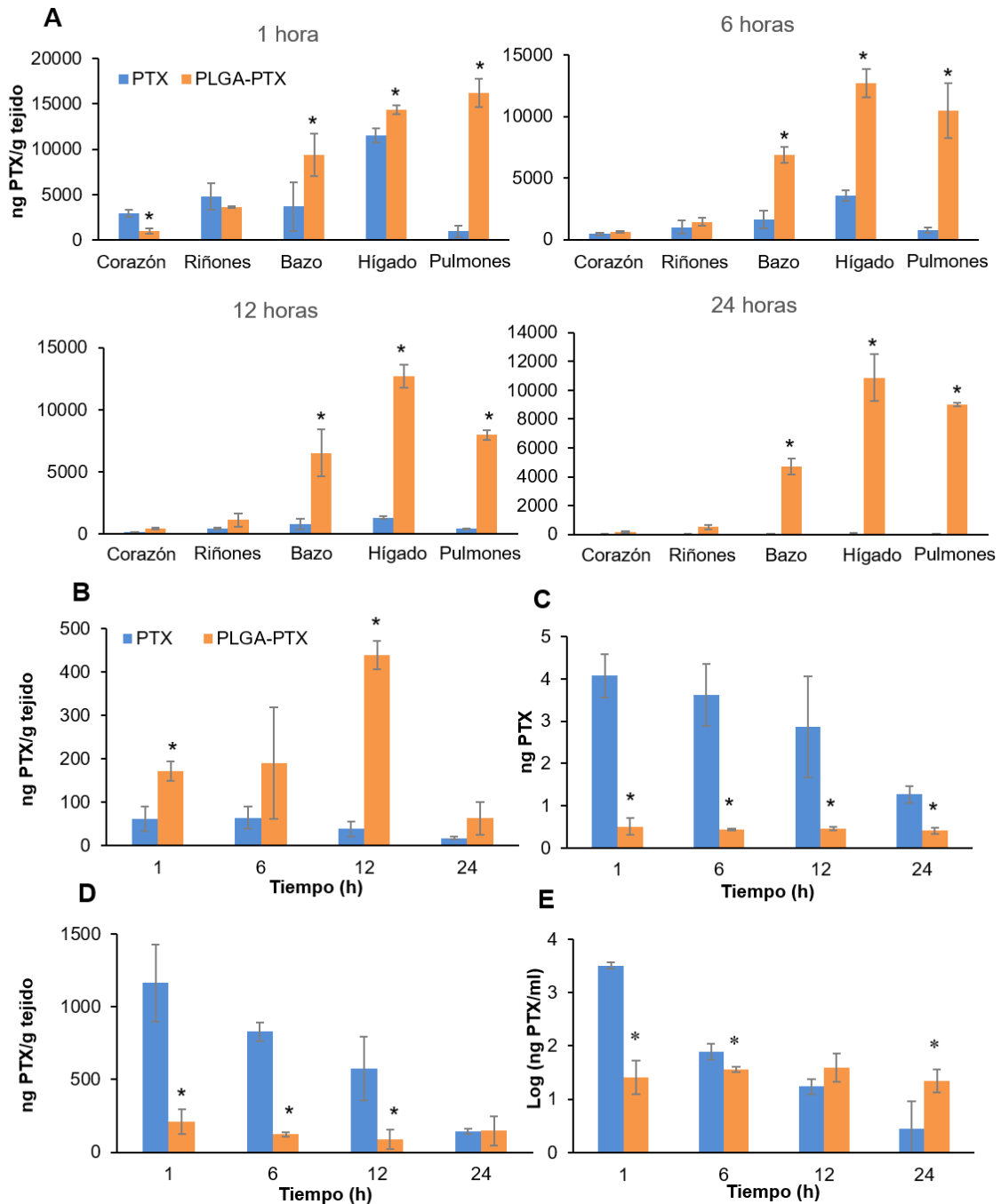


Figura 47. Biodistribución de PTX en ratones inmunocompetentes con la administración de una dosis única de 10 mg/kg de PTX o NPs de PLGA-PTX. La concentración de PTX (ng PTX/g tejido) se determinó a distintos tiempos en corazón, riñones, bazo, hígado y pulmones (A), cerebro (B), DRGs (ng PTX) (C), tumor (D) y plasma (ng PTX/ml plasma) (E). Los resultados se expresaron como el valor medio de cinco réplicas biológicas \pm DS. *Datos con diferencias significativas entre el tratamiento con NPs de PLGA-PTX y PTX libre ($p < 0.05$).

15. 2. LIPOSOMAS CATIONICOS

El estudio de biodistribución también se realizó después del tratamiento con liposomas pegilados cargados de PTX. Como se observa en la Figura 48A, tras los dos primeros tiempos analizados (0.5 y 1 hora) se observó una distribución sistémica del PTX similar con los tres tratamientos (PTX libre, MLV-PEG-PTX y SUV-PEG-PTX), con una mayor acumulación de PTX en hígado, y bazo. Sin embargo, después de 6 y 12 horas, los liposomas más pequeños permitieron una mayor acumulación del fármaco en los pulmones que el PTX libre o los liposomas MLV-PEG-PTX. Finalmente, a las 24 horas, el tratamiento con SUV-PEG-PTX permitió mantener el PTX en todos los tejidos en mayor proporción que con los otros dos tratamientos. Además, se realizó un estudio específico para analizar la acumulación del PTX en los DRGs lumbar, en el que se observó que, si bien los tratamientos con PTX libre y SUV-PEG-PTX permitieron la acumulación del fármaco en estas estructuras, no se detectó PTX en estas estructuras neurológicas después de la primera hora de tratamiento con MLV-PEG-PTX (Figura 48C). Por otra parte, el PTX libre permitió alcanzar el tejido tumoral en mayor proporción que las otras dos formulaciones durante las primeras 12 horas desde la administración. Sin embargo, los liposomas más pequeños promovieron una mayor acumulación de PTX a las 24 horas en comparación con el PTX libre y el MLV-PEG-PTX (Figura 48D). Finalmente, el análisis de farmacocinética del PTX (Figura 48B) mostró que el PTX libre presenta concentraciones superiores al de los liposomas en los tiempos iniciales, disminuye progresivamente su concentración en el torrente sanguíneo. Sin embargo, a tiempos finales podemos observar una mayor concentración del PTX de los liposomas de menor tamaño en relación al PTX libre.

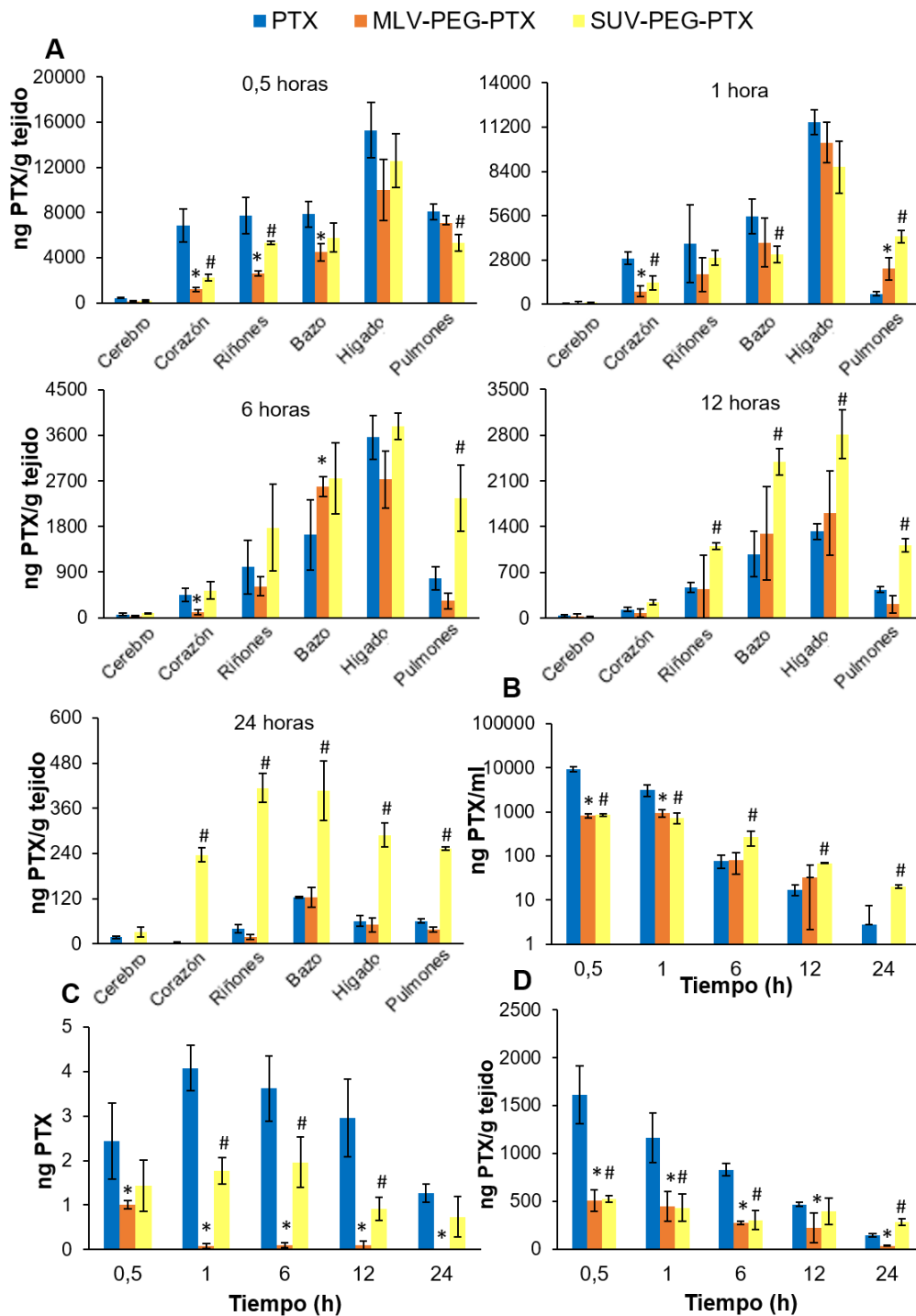


Figura 48. Ensayo de biodistribución de PTX en ratones inmunocompetentes con la administración de una dosis única de 10 mg/kg de PTX o los liposomas MLV-PEG-PTX y SUV-PEG-PTX. La concentración de PTX (ng PTX/g tejido) se determinó a distintos tiempos en cerebro, corazón, riñones, bazo, hígado y pulmones (A), plasma (ng PTX/ml plasma) (B), DRGs (ng PTX) (C) y tumor (ng PTX/g tejido) (D). Los resultados se expresaron como el valor medio de cinco réplicas biológicas \pm DS. *Datos con diferencias significativas entre los tratamientos con liposomas MLV-PEG-PTX y PTX libre ($p < 0.05$). #Datos con diferencias significativas entre los tratamientos con liposomas SUV-PEG-PTX y PTX libre ($p < 0.05$)

16. ENSAYOS DE COMPORTAMIENTO DE DOLOR NEUROPÁTICO CON LOS LIPOSOMAS CATIONICOS

Los ensayos de comportamiento de alodinia mecánica e hiperalgesia por calor se realizaron con el fin de comprobar si los liposomas de mayor tamaño son capaces de proteger de la neuropatía dolorosa inducida por el fármaco PTX. Con este fin, se estudiaron los efectos de la administración intravenosa repetida de los diferentes tratamientos (PTX libre, excipientes del PTX y los liposomas catiónicos MLV-PEG-PTX y SUV-PEG-PTX, así como las formulaciones sin fármaco MLV-PEG y SUV-PEG) durante 5 días en el desarrollo de la neuropatía dolorosa en los ratones CD-1. Las respuestas basales previas al inicio del tratamiento a las pruebas de von Frey (Figura 49A) y Hargreaves (Figura 49B) no fueron significativamente diferentes entre los grupos de estudio. Los resultados obtenidos tras los tratamientos mostraron que los ratones que fueron tratados con los excipientes del PTX y los liposomas catiónicos sin carga (SUV-PEG y MLV-PEG) (liposomas sin fármaco) no modificaron significativamente las respuestas basales en ambas pruebas de comportamiento. Sin embargo, la administración del PTX libre indujo el desarrollo de alodinia mecánica e hiperalgesia por calor, que se manifestó como una reducción de las fuerzas de umbral para la retirada de la pata después de la estimulación mecánica, y una reducción de las latencias para la retirada de la pata después de la estimulación térmica, respectivamente. Asimismo, la administración del PTX en la formulación pequeña (SUV-PEG-PTX) indujo un patrón de desarrollo neuropático doloroso similar al observado con el tratamiento con PTX libre, aunque la hipersensibilidad mecánica se prolongó durante más días que el PTX libre y los resultados de hipersensibilidad térmica mostraron un tiempo de latencia superior al del fármaco libre. Sin embargo, la misma concentración de PTX (7 mg / kg) administrada en liposomas de un diámetro aproximado de 200 nm (MLV-PEG-PTX) no indujo ni hipersensibilidad mecánica ni hipersensibilidad al calor, con resultados similares a los obtenidos con los excipientes del PTX y los liposomas sin fármacos.

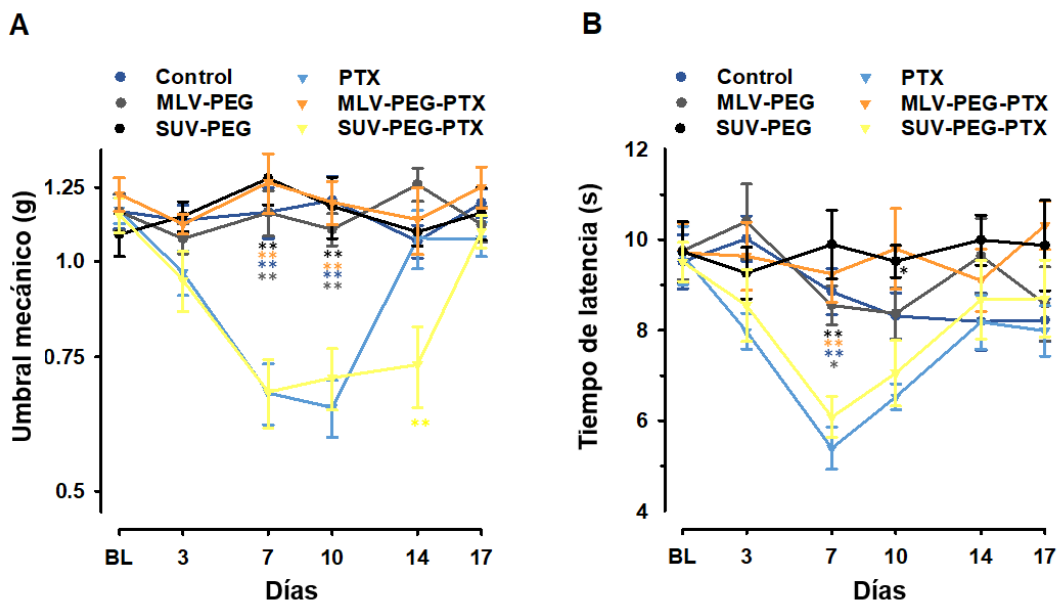


Figura 49. Ensayos de comportamiento de dolor neuropático en ratones CD-1 tras la administración intravenosa de 7 mg/kg de diferentes tratamientos (PTX libre, excipientes del PTX, MLV-PEG, MLV-PEG-PTX, SUV-PEG, SUV-PEG-PTX) una vez al día durante 5 días consecutivos. A) Prueba de von Frey. B) Prueba de Hargreaves. Diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con el PTX libre y el resto de grupos de tratamiento * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

17. ANÁLISIS DE LOS DRGs POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

La Figura 50 ilustra las características ultraestructurales de los capilares de los DRGs L4, que mostraron la presencia de capilares continuos y fenestrados. Los capilares continuos se caracterizaron por la presencia de un endotelio ininterrumpido y una lámina basal continua (Figura 50A). Los capilares fenestrados en los DRGs L4 se caracterizaron por un endotelio interrumpido con poros que miden 80-100 nm de diámetro y una lámina basal continua (Figuras 50B y C).

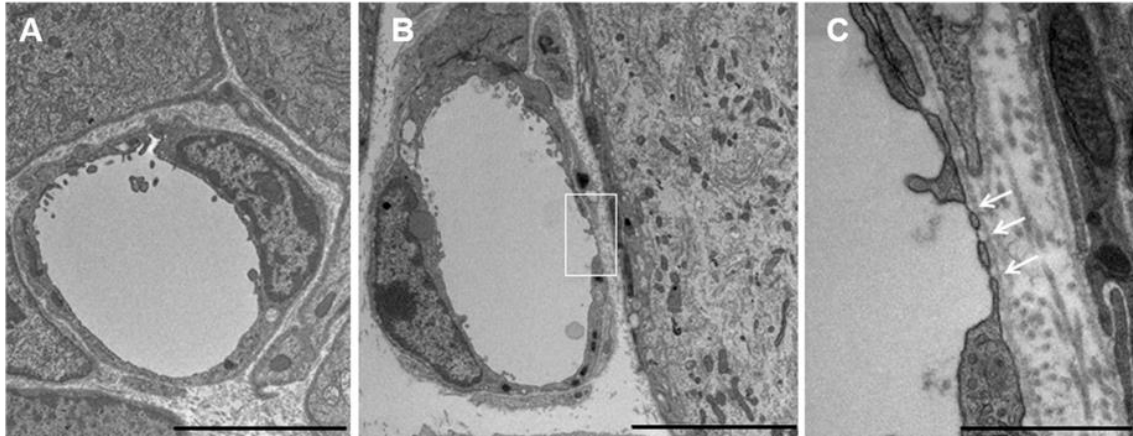


Figura 50: Micrografías electrónicas de transmisión de capilares fenestrados y continuos del DRG L4 de los ratones CD-1. (A) Sección transversal de un capilar continuo; (B) Sección transversal de un capilar fenestrado (C) Gran aumento de los poros en los capilares fenestrados que se unen por un diafragma (flechas). Barra de escala: 5 μ m (A, B) y 1 μ m (C).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Uno de los principales fármacos antitumorales más ampliamente utilizado para el tratamiento de distintos tipos de tumores sólidos, como pueden ser ovario, páncreas, mama o pulmón, es el PTX. De hecho, su aprobación clínica por parte de la FDA supuso un gran avance para el tratamiento del cáncer, con numerosos estudios y ensayos clínicos que avalan su potencialidad como agente antitumoral (Chang y cols., 1993; Choy y cols., 1994; Fonseca y cols., 2002; Parveen y Sahoo, 2011; Jabir y cols., 2012). Sin embargo, como la mayoría de fármacos antitumorales, el PTX presenta diversas limitaciones que reducen la efectividad del tratamiento quimioterápico. En primer lugar, su reducida solubilidad requiere del uso de excipientes orgánicos como el Cremophor® o el Tween 80, asociados a numerosos efectos indeseados tales como la hipersensibilidad o neurotoxicidad (Prados y cols., 2008; Bernabeu y cols., 2017; Stage y cols., 2018). Asimismo, la baja especificidad del fármaco por los tejidos tumorales, incrementa su toxicidad sistémica provocando efectos secundarios como la alopecia reversible, mielosupresión, artralgia/mialgia, astenia y reacciones de hipersensibilidad (Ranson y cols., 2000; Hardin y cols., 2017). Además, dos de los efectos secundarios con mayor relevancia clínica y que aparecen con mayor frecuencia en pacientes tratados con PTX son la toxicidad hematológica y la neurotoxicidad periférica que induce el desarrollo de neuropatías periféricas dolorosas (Argyriou y cols., 2008). Estos efectos indeseables son dosis-dependientes y afectan a más del 60% de las personas tratadas con síntomas como parestesia, disestesia, entumecimiento o dolor neuropático, comprometiendo significativamente la calidad de vida de los pacientes y obligando a menudo a suspender el tratamiento de forma temporal, o a reducir la dosis administrada, con la consiguiente reducción de la eficacia antineoplásica (Dougherty y cols., 2004; Gornstein y Schwarz, 2014; De Iuliis y cols., 2015; Stage y cols., 2018). Por otra parte, la administración del PTX también presenta otros inconvenientes como la resistencia a multidrogas que desarrollan algunas las células tumorales, como las CSCs, ante la exposición prolongada al fármaco, o la falta de efectividad del tratamiento que incrementa el porcentaje de pacientes no respondedores.

En este contexto, el desarrollo de nanomedicinas representa una estrategia prometedora capaz de solventar muchas de estas limitaciones de los fármacos antitumorales convencionales y de aportar numerosas ventajas al tratamiento quimioterápico como la capacidad de aumentar la biodisponibilidad de los fármacos en el torrente sanguíneo por un tiempo más prolongado, su capacidad de extravasación hacia el interior de los tejidos de forma pasiva mediante el fenómeno EPR o la posibilidad de controlar la liberación del fármaco y de direccionar el agente quimioterápico hacia un tipo de tumor concreto, disminuyendo el daño en los tejidos sanos (Brigger y cols., 2002; Dinarvand y cols., 2011;

Jabir y cols., 2012; Kundranda y Niu, 2015). A esto debemos sumar el hecho de que algunas nanoformulaciones son capaces incluso de evadir los mecanismos MDR de las células tumorales y de eliminar con mayor eficiencia las CSCs, dos de las principales causas de la ineficacia de la farmacoterapia tradicional que favorecen la aparición de recidivas. Por tanto, la nanomedicina ha abierto un abanico de posibilidades para la mejora del tratamiento y diagnóstico del cáncer, y son muchos los estudios que están centrando sus esfuerzos en el diseño de nanoformulaciones como vehículos para los fármacos antitumorales.

En los últimos años se han desarrollado numerosos tipos de nanoformulaciones para mejorar la eficacia del PTX, como la formulación Abraxane®, una nanopartícula de albúmina unida a PTX (Nab-PTX), que ha sido la primera aprobada por la FDA y la EMA para el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (Ma y Mumper, 2013; Blair y Deeks, 2015; Gridelli y Sacco, 2016). Sin embargo, a pesar de que la formulación Nab-PTX ha permitido aumentar la acumulación de fármaco en el tumor y superar la dosis máxima tolerada de paclitaxel en comparación con el Taxol® comercial, evitando el uso del Cremophor®, esta formulación aún presenta varias limitaciones asociadas con su aplicación clínica (Louage y cols., 2017). De hecho, además de sus elevados costes de producción, la administración de Abraxane® también se ha asociado con alguno de los efectos secundarios más indeseables del Taxol®, como las reacciones de hipersensibilidad, neutropenia, neuropatías, mialgia, anemia o trombocitopenia (Socinski y cols., 2012; Gupta y cols., 2014; Hirsh, 2014). Concretamente, el tratamiento con Abraxane® genera una neuropatía periférica de grado 3, más severa que el Taxol®, hasta en un 10% de los casos (Yamashita y cols., 2011). Además, un estudio reciente *in vitro* con células tumorales de pulmón (A549) demostró que Abraxane® contribuyó a desarrollar resistencia al PTX mediante la sobreexpresión de P-gp (Zhao y cols., 2015). El PTX también se ha formulado en liposomas de colesterol y lecitina, formulación comercialmente conocida como Lipusu®, para el tratamiento de tumores de ovario, mama, CPCNP, gástricos y de cabeza y cuello, con una toxicidad asociada más baja que con el PTX libre. Asimismo, existen dos formulaciones liposomales LEP-ETU y EndoTag-1 cargadas con PTX que están siendo testadas en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer de mama (Koudelka y Turanek, 2012; Slingerland y cols., 2013; Bernabeu y cols., 2017). Otras formulaciones poliméricas asociadas con PTX han sido aprobadas para su uso clínico en algunos países asiáticos como son Nanoxel® y Genexol-PM® para el tratamiento del cáncer de pulmón y el de mama metastásico y CPCNP localmente avanzado o metastásico, respectivamente. Genexol-PM® incluso ha demostrado un aumento de la ventana terapéutica del PTX sin aumentar su toxicidad (Nehate y cols., 2014). Opaxio™, una formulación polimérica de ácido poliglutámico conjugada con PTX, también se está testando en un ensayo clínico de

fase III para el tratamiento del cáncer de ovario y pulmón. Esta formulación aumenta la vida media de la PTX y libera el fármaco de la red de polímeros a través de la acción de las proteasas lisosomales (Bernabeu y cols., 2017). Sin embargo, en la actualidad, de todas las formulaciones mencionadas anteriormente, solo Abraxane® se emplea clínicamente en los Estados Unidos y Europa. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas formulaciones de PTX es necesario para mejorar su eficiencia antitumoral y reducir sus efectos secundarios.

En este contexto se enmarca el propósito de esta tesis doctoral, la evaluación de dos nuevos sistemas de encapsulación de PTX con el fin de mejorar las propiedades farmacológicas del PTX y reducir los efectos secundarios derivados de su aplicación clínica, unas NPs poliméricas de PLGA y unos liposomas catiónicos comerciales.

La primera de las formulaciones se sintetizó con PLGA, un polímero con una elevada biocompatibilidad y que, además, ha sido aprobado para su uso en humanos por la FDA, lo que convierte a las NPs de PLGA en un transportador ideal para el desarrollo de nuevas nanoformulaciones citotóxicas por su reducida toxicidad al metabolizar los monómeros de ácido láctico y glicólico mediante el ciclo de Krebs. Concretamente, estas NPs de PLGA, sintetizadas en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Sevilla, se caracterizaron por presentar una distribución homogénea de tamaño con un diámetro menor de 250 nm, y un potencial eléctrico medio de -30mV, lo que las convierte en agentes terapéuticos adecuados para la administración intravenosa. Además, en el proceso de síntesis consiguió alcanzar una eficiencia de encapsulación del 91%, y se realizaron estudios para evaluar la liberación del fármaco en condiciones fisiológicas, donde se observó una liberación inicial rápida del 25% durante la primera hora, seguida de una posterior liberación más sostenida, llegando a alcanzar el 90% de liberación a los 15 días.

Por otra parte, los liposomas catiónicos cargados con PTX se sintetizaron por la empresa Nanovex Biotechnologies a partir de unas formulaciones comerciales *ready-to-use*. Concretamente, los liposomas catiónicos han mostrado una capacidad mejorada para incorporarse a las células por endocitosis y la adición de una envuelta de PEG ha demostrado prolongar los tiempos de circulación de las nanovesículas en la sangre, evitando el reconocimiento de estas formulaciones por el sistema reticuloendotelial. Además, en recientes estudios se ha observado que el uso de liposomas como vehículos transportadores de fármacos puede superar la resistencia que presentan determinadas células a los quimioterápicos como el PTX, favoreciendo la liberación de los fármacos directamente en las mitocondrias e induciendo la entrada en apoptosis de las células resistentes. Todas estas características convierten a los liposomas en transportadores adecuados para el PTX. En este trabajo se presentan dos liposomas catiónicos con diferentes tamaños, MLV con un tamaño

de 180-200 nm y SUV con un tamaño de 80-100 nm, con el fin de corroborar si el aumento tamaño de los liposomas puede impedir el paso del PTX hacia los DRGs al no poder atravesar las fenestraciones del sistema endotelial que vasculariza los DRGs. Además, estas formulaciones fueron recubiertas con PEG para mejorar las propiedades de estos liposomas *in vivo* mediante el aumento del tiempo de circulación y la reducción de la reactividad del sistema inmunitario.

A continuación, se discuten los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* e *in vivo* con ambos tipos de formulaciones.

1. LAS NANOFORMULACIONES DE PLGA Y LOS LIPOSOMAS CATIONICOS PRESENTAN UNA ALTA BIOCAMPATIBILIDAD

Uno de los aspectos más importantes demostrados en este trabajo, es la alta compatibilidad de las NPs de PLGA y de los liposomas catiónicos testada con los ensayos de citotoxicidad *in vitro* y con el ensayo de hemólisis con eritrocitos aislados de sangre humana, requisito fundamental para su aplicación clínica en humanos. Por una parte, los estudios realizados sobre las líneas celular de pulmón mostraron una toxicidad menor al 10% en todas las dosis testadas, tanto con las NPs de PLGA, como con los liposomas catiónicos, lo que demuestra que el efecto antitumoral observado con estas formulaciones cargadas con PTX se debe exclusivamente al efecto del fármaco, y no a una toxicidad añadida por la composición de las nanoformulaciones. Por otra parte, los resultados obtenidos en el ensayo de biocompatibilidad con eritrocitos humanos revelaron una hemólisis inferior al 1% con la exposición a las NPs de PLGA, e inferior al 2% con los liposomas catiónicos, en todas las concentraciones probadas, con una morfología muy similar a los glóbulos rojos del control negativo con PBS.

Una de las principales ventajas de las NPs de PLGA es que su biocompatibilidad del PLGA ya ha sido previamente demostrada y su aplicación en humanos ha sido aprobada FDA (Lu y cols., 2009; Acharya y Sahoo, 2011; Sadat Tabatabaei Mirakabad y cols., 2014; Mir y cols., 2017). No obstante, la biocompatibilidad de NPs de PLGA ha sido corroborada en otros estudios en los que se emplearon NPs de PLGA similares para la vehiculización de Δ^9 -Tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), (Martin-Banderas y cols., 2015), con las que se obtuvo una hemólisis inferior al 2.5%, y otras asociadas a caseína desarrolladas para la encapsulación del PTX (Narayanan y cols., 2014).

Los liposomas, por su parte, han sido considerados tradicionalmente como biocompatibles al diseñarse a partir de fosfolípidos que conforman las membranas biológicas. Sin embargo, la modificación de grupos químicos o de la superficie de la nanoformulación,

puede afectar a su hemorreactividad. De hecho, liposomas comerciales con envueltas de PEG, como el Doxil®, inducen un síndrome de hipersensibilidad conocido pseudoalergia relacionada con la activación del complemento. Por esta razón, los estudios de biocompatibilidad son muy importantes para evaluar el potencial de las formulaciones para su aplicación en humanos. En otros estudios también se han realizado estudios de biocompatibilidad con liposomas con resultados similares a los obtenidos con nuestros liposomas. Kuznetsova y cols. sintetizaron unos liposomas compuestos de fosfatidilcolina y fosfatidilinositol y combinados con profármacos lipofílicos con los que obtuvieron una hemólisis inferior al 1% (Kuznetsova y cols., 2012). Nie y cols. también sintetizaron unos liposomas con y sin envuelta de PEG, lo que supone una diferencia de potencial zeta entre las formulaciones al presentar el PEG carga negativa, y observaron que los liposomas pegilados tuvieron menos impacto sobre los eritrocitos de conejo que los no pegilados (Nie y cols., 2012). Curiosamente, nuestras formulaciones presentaron una elevada biocompatibilidad sobre eritrocitos humanos, independientemente de la envuelta de PEG.

Por tanto, los estudios de biocompatibilidad realizados, soportados por estudios de otros autores, sugieren que tanto las NPs de PLGA como los liposomas catiónicos son formulaciones apropiadas para continuar con los estudios *in vivo* con animales de experimentación.

2. LAS NPs DE PLGA Y LOS LIPOSOMAS CATIÓNICOS POTENCIAN EL EFECTO ANTITUMORAL DEL PTX EN LÍNEAS TUMORALES

Una vez demostrada la excelente biocompatibilidad de las NPs de PLGA y los liposomas catiónicos, se realizaron los ensayos de citotoxicidad con los dos tipos de nanoformulaciones cargadas con PTX. En primer lugar, las NPs de PLGA-PTX mostraron una disminución significativa de la IC₅₀ del PTX en comparación con el PTX libre en todas las líneas celulares de pulmón de hasta 3.63 veces y 3.79 veces en las líneas tumorales humanas A549 y NCI-H460, respectivamente. Esta mejora del efecto antitumoral se hace más evidente en las dosis más bajas, donde el fármaco libre tiene una baja efectividad y las NPs de PLGA-PTX consiguen reducir la supervivencia celular hasta un 15-30% más. Estos resultados sugieren que el uso de esta formulación reduce la dosis mínima a la cual el fármaco muestra actividad antitumoral en las líneas tumorales, lo que supone una ventaja frente al uso del PTX libre. Esta mejora en la efectividad del fármaco también ha sido observado por Fonseca y cols. (Fonseca y cols., 2002), que sintetizaron unas NPs de PLGA cargadas con PTX con las que realizaron ensayos de VC en la línea tumoral de pulmón NCI-H69, obteniendo una reducción de aproximadamente el 30% de la VC con el uso de las NPs en comparación con el Taxol® comercial. Recientemente, NPs de un copolímero de PLGA-

DISCUSIÓN

Tween 80 cargadas con PTX también provocaron una reducción de hasta 3.5 veces en la línea de A549 basal, siendo resultados muy similares a los obtenidos con nuestras NPs en esta línea celular. Y no solo eso, sino que también consiguieron disminuir la IC_{50} de una línea tumoral de A549 con resistencia a PTX de 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ con PTX libre a 1,26 $\mu\text{g}/\text{ml}$ con las NPs PLGA-Tween 80-PTX (Yuan y cols., 2016). Otros estudios con NPs poliméricas huecas de polivinilpiridina cargadas con PTX (PTX@p4VP) han demostrado mejoras en el efecto del fármaco con su encapsulación, disminuyendo su IC_{50} 1.6 y 2.9 veces en las líneas A549 y MCF7, respectivamente, en comparación con el PTX libre (Contreras-Caceres y cols., 2017). Asimismo, Song y cols. sintetizaron otras NPs de ácido hialurónico y vitamina E cargadas con PTX capaces de reducir la IC_{50} del Taxol® desde 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 0.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en la línea A549 tras 48 horas de incubación (Song y cols., 2018). Por otra parte, en la línea inmortalizada de epitelio pulmonar L132, se observó una disminución similar en la proliferación celular con el uso de las PLGA-PTX NPs frente al PTX a la obtenida con las líneas tumorales de pulmón, lo que sugiere que no existe una especificidad de las NPs hacia las líneas tumorales. Esta falta de especificidad también se ha observado en otros estudios con NPs de tripalmitina cargadas con PTX, donde la IC_{50} del PTX en la línea L132 disminuyó 39 veces respecto al PTX libre (Leiva y cols., 2017). Sin embargo, una de las principales ventajas del uso de nanoformulaciones es la capacidad de aumentar la especificidad de los tratamientos mediante el uso de anticuerpos, receptores o moléculas específicas incorporadas en las formulaciones que fomenten el direccionamiento activo hacia las células tumorales, lo que abre un abanico de posibilidades para mejorar la especificidad de las NPs de PLGA en estudios futuros.

En relación a los resultados obtenidos con los liposomas catiónicos, la encapsulación del PTX en estas formulaciones lipídicas amplificó el efecto antitumoral del fármaco en todas las líneas tumorales de pulmón testadas. Concretamente, la nanoformulación con mayor potencialidad resultó ser MLV-PTX sin envuelta PEG, con la que se consiguió una reducción de la IC_{50} del PTX de 3.75 y 4.96 veces en las líneas celulares A549 y LL2, respectivamente. Este hecho podría deberse al mayor tamaño del liposoma que permite encapsular más moléculas de PTX, favoreciendo su internalización simultáneamente en el interior celular. Por otra parte, la pegilación de las formulaciones redujo significativamente el efecto antitumoral respecto a sus análogos sin pegilar debido a que la envuelta polimérica dificulta la internalización celular *in vitro*, como ya se ha referenciado anteriormente (Gullotti y Yeo, 2009; Tran y cols., 2017). Sin embargo, la envuelta PEG es capaz de evadir la opsonización y, por tanto, el desencadenamiento de una respuesta inmunitaria, por lo que la adición de PEG a la formulación puede aumentar la vida media de los liposomas *in vivo*, motivo por el cual se han empleado estos liposomas pegilados para los estudios realizados en modelos de ratón.

Estos resultados han superado los obtenidos recientemente por Hong y cols. con otros liposomas cargados con PTX en la línea tumoral de pulmón NCI-H460, en los que se obtuvo una IC_{50} similar con la formulación lipídica (14 nM) con respecto a la PTX libre (21 nM). Además, estos autores no observaron diferencias significativas entre los liposomas pegilados y no pegilados (Hong y cols., 2016). Zhang y cols. sintetizaron unos liposomas cargados con PTX y funcionalizados con un péptido que favorece la internalización en las células (PFV-Lip-PTX), con los que obtuvieron una mejora significativa del efecto antitumoral *in vitro* en la línea de cáncer de mama MCF-7 con respecto a los liposomas no funcionalizados. Sin embargo, los liposomas PFV-Lip-PTX presentaron una IC_{50} 3.26 veces más alta en comparación con PTX libre. No obstante, a pesar de no mejorar la actividad del fármaco libre *in vitro*, los resultados *in vivo* en ratones desnudos BALB/c con tumores de mama inducidos con la línea tumoral humana MCF-7 mostraron una reducción significativa del volumen tumoral cuando los ratones fueron tratados con los liposomas PFV-Lip-PTX respecto a los ratones que fueron tratados con el PTX libre, así como una mayor acumulación en el tumor (Zhang y cols., 2018). Asimismo, otro resultado prometedor del uso de estas formulaciones es que no han mostrado diferencias significativas con respecto al PTX en la línea no tumoral de pulmón, L132, lo que sugiere que estos liposomas presentan algún tipo de especificidad intrínseca por las células tumorales, aunque habría que realizar otros estudios para corroborar esta hipótesis.

3. LOS SISTEMAS DE PLGA Y LOS LIPOSOMAS CATIONICOS ASOCIADOS A PTX MODULAN EL CICLO CELULAR

El tratamiento con PTX produce un arresto en la fase G_2 del ciclo celular al impedir la despolimerización de los microtúbulos, que desencadena la entrada en apoptosis en la célula. En este trabajo se han llevado a cabo estudios del ciclo celular tras los tratamientos con los dos tipos de nanoformulaciones para comprobar que la encapsulación del fármaco no implica modificaciones en su mecanismo de acción.

En primer lugar, los estudios de modulación del ciclo celular mostraron una acumulación de células en la fase G_2 en todas las líneas tumorales tras el tratamiento con las NPs de PLGA-PTX. Esta modulación del ciclo celular también se observó en la línea no tumoral L132, al no existir especificidad por parte de las NPs hacia las líneas tumorales. Sin embargo, con el tratamiento con el fármaco libre, este arresto en fase G_2 no fue tan evidente en todas las líneas celulares estudiadas, debido a que bajo las condiciones utilizadas para el estudio (tiempo de exposición y dosis) el PTX libre tiene una actividad antitumoral muy baja en comparación con las nanoformulaciones con PTX, con las que incluso se observó un considerable porcentaje de muerte celular (Sub G_1). Concretamente, en la línea tumoral

DISCUSIÓN

murina LL2 tuvo que repetirse el ensayo reduciendo el tiempo de exposición y aumentando la dosis debido a que la alta tasa de replicación de esta línea impidió observar la acumulación en G₂ bajo las condiciones empleadas con el resto de líneas celular, con las que solo se obtuvo un 100% de muerte celular. Asimismo, el perfil de ciclo celular tras el tratamiento con las NPs de PLGA sin PTX no mostró diferencias en comparación con las células sin tratar. Por tanto, estos resultados sugieren que la encapsulación del fármaco no interfiere en su mecanismo de acción, el cual ya ha sido descrito en numerosos estudios (Jordan y Wilson, 2004; Surapaneni y cols., 2012; Prota y cols., 2013). En otros estudios, como los realizados por Yuan y cols. se obtuvieron resultados similares con NPs de PLGA-Tween 80 cargadas con PTX, viéndose potenciado el efecto del PTX con una acumulación en torno al 25%, frente al 50% obtenido con las NPs cargadas (Yuan y cols., 2016). En otro estudio realizado en la línea MCF7 se observó un incremento de células en fase G₂ cuando fueron tratadas con NPs de PCL-PTX (72%) con respecto a las obtenidas tras el tratamiento con PTX libre (42%), siendo resultados similares a los presentados en este trabajo (Lopez-Gasco y cols., 2012).

Por otra parte, los estudios de ciclo celular realizados en la línea A549 con los liposomas catiónicos mostraron una acumulación de células en fase G₂ solo con la formulación con mayor efecto antitumoral, MLV-PTX. El resto de las formulaciones no causaron una acumulación significativa en la fase G₂ / M, probablemente porque la dosis utilizada fue demasiado baja o el tiempo de exposición fue demasiado alto para observar una población significativa en esta fase antes de que se active la apoptosis, ya que sí se observó un aumento de muerte celular con las diferentes formulaciones en comparación con el PTX libre. Al igual que con las NPs de PLGA, en la línea LL2 no se observaron modificaciones en el perfil de ciclo con los distintos tratamientos bajo estas condiciones, por lo que se repitió el ensayo bajando el tiempo de exposición a 15 horas y aumentando la dosis utilizado. Los resultados obtenidos con estas condiciones mostraron una acumulación de células en la fase G₂ / M, así como un incremento en la muerte celular (SubG₁) con las todas las formulaciones de liposomas, así como con el PTX libre. En cuanto a la línea no tumoral L132, se observó una acumulación en la fase S, así como un incremento de muerte celular, con el tratamiento con los diferentes liposomas, mientras que con el PTX libre esta acumulación se produjo en la fase G₂ / M, así como un porcentaje de muerte celular similar al obtenido con los liposomas. Este patrón también se ha observado en otros estudios del ciclo celular como los presentados por Tong y cols. en células tratadas con PTX libre y con liposomas cargados con PTX (Tong y cols., 2014). Además, los ensayos del ciclo celular presentados por estos autores mostraron una detención de ~24% en la fase G₂ / M con liposomas cargados con PTX en comparación con ~14% con el PTX libre. Estos resultados avalan los obtenidos en nuestros

estudios de ciclo celular y sugieren que la encapsulación del PTX en liposomas no interfiere con su mecanismo de acción.

Esta modulación del ciclo celular se corroboró con los ensayos de inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-tubulina α , en los que se observó una intensa acumulación de marcaje fluorescente en el núcleo celular de las tres líneas celulares tras los tratamientos con los dos tipos de nanoformulaciones y el PTX libre. Esta condensación de microtúbulos en los núcleos desestructurados de las células, con multipolarización del huso en algunas células, podría corresponderse con un arresto irreversible en metafase, lo que causaría la parada en la fase G_2 / M del ciclo celular observada por citometría de flujo. Estos resultados se corresponden con los obtenidos por Wang y cols. en líneas de cáncer de próstata al exponerlas a dosis similares de PTX (50 nM), en los que también se observó la multipolarización del huso en los núcleos (Wang y cols., 2015). Asimismo, Heney y cols. también observaron un perfil similar de arresto mitótico con imágenes de fluorescencia de células de MCF7 teñidas con DAPI con el uso de liposomas cargados con PTX (Heney y cols., 2010). En el caso de las células tratadas con los sistemas de encapsulación sin fármaco, el perfil de fluorescencia fue muy similar al de las células sin tratar, incluso se observaron células en proceso de división mitótica. Estos resultados no solo indican que la encapsulación del fármaco en nanoformulaciones no modifican su mecanismo de acción, sino que también el uso de estos sistemas puede potenciar su efecto antimitótico.

En el caso de las NPs de PLGA, se realizó conjuntamente un análisis sobre el mecanismo de muerte celular mediante estudios de apoptosis. Los resultados mostraron que el tratamiento con NPs de PLGA-PTX provocó un incremento de células en apoptosis temprana o tardía en comparación con el tratamiento con PTX libre. Estos resultados demuestran que la encapsulación no interviene en el mecanismo de muerte celular, y que, además, potencia el efecto antitumoral del PTX. Este efecto también ha sido observado en otros estudios con NPs de PLGA con quitosán cargadas con PTX en las líneas tumorales de pulmón A549 y H1299, con un porcentaje de células en apoptosis a 48 horas de 25,84% y 12,24%, respectivamente. Estos porcentajes se vieron incrementados cuando añadieron un péptido a la envuelta dirigido contra los receptores de integrina $\alpha_v\beta_3$, sobreexpresados en algunas líneas de cáncer de pulmón, con un 35% y 32,54% de apoptosis en las líneas de estudio (Babu y cols., 2017).

4. LAS NPS DE PLGA Y LOS LIPOSOMAS CATIÓNICOS FACILITAN LA INTERNALIZACIÓN CELULAR DEL PTX

Tras comprobar que la encapsulación del PTX potencia su efecto antitumoral, se procedió a comprobar si dicha potenciación podría deberse a un aumento de la

DISCUSIÓN

internalización del fármaco en las células. Por esta razón, se llevó a cabo un ensayo para medir la concentración de PTX intracelular a distintos tiempos mediante UPLC-MS/MS. Los resultados de estos ensayos mostraron que el PTX se acumuló en las células mucho más rápido cuando se administró encapsulado en las NPs de PLGA en las tres líneas celulares, lo que explicaría el aumento de la efectividad del tratamiento con las NPs cargadas con PTX. En el caso de las dos líneas tumorales, la concentración de PTX fue incrementándose gradualmente hasta mantenerse relativamente constante en los últimos tiempos analizados. Por el contrario, en la línea no tumoral, se observó un pico de acumulación tras una hora de exposición, tras el cual se produjo una reducción pronunciada del PTX intracelular. Sin embargo, a pesar de esta disminución del PTX intracelular, la internalización del PTX con las NPs de PLGA fue igualmente muy superior a la del PTX libre en esta línea, motivo por el cual también se observó una disminución de la IC_{50} del fármaco en esta línea. Estos resultados fueron similares a los observados por Leiva y cols. en los que se observó que las NPs de tripalmitina cargadas con PTX favorecen la internalización del PTX en las líneas tumorales A549 y MCF7, siendo significativamente mayor la acumulación del PTX a las 2h y 4h en comparación con el PTX libre (Leiva y cols., 2017). En este caso, las NPs de PLGA mostraron diferencias significativas con respecto a la entrada del PTX libre desde tiempos muy cortos (30 min), con una acumulación de PTX de hasta 30 veces mayor en la línea A549.

En este contexto, se sintetizaron unas NPs de PLGA cargadas con RN para realizar estudios complementarios analizando la internalización celular. Concretamente, se realizó un ensayo comparando la internalización de las NPs de PLGA-RN y RN libre a distintos tiempos mediante microscopia de fluorescencia, y se cuantificó la intensidad de señal mediante citometría de flujo. Estos ensayos demostraron que la encapsulación facilita la entrada del fármaco al interior de la célula desde tiempos muy cortos de exposición, siendo ya visible la diferencia entre el RN libre y las NPs de PLGA-RN desde 0.5 horas, y viéndose la mayor diferencia tras 4 horas de exposición. Por tanto, estos ensayos corroboran lo obtenido mediante la cuantificación de PTX intracelular por UPLC/MS-MS. Según se ha expuesto y comprobado en diversas referencias bibliográficas, las NPs de PLGA se internalizan mediante endocitosis mediada por clatrina o pinocitosis. Además, se ha observado que pueden escapar de los endolisosomas y penetrar hasta el citosol en solo 10 minutos de incubación, lo que contrasta con los resultados obtenidos (Vasir y Labhasetwar, 2007; Danhier y cols., 2012; Sadat Tabatabaei Mirakabad y cols., 2014). Xu y cols. sintetizaron unas NPs de PLGA-RN con las que observaron acumulación de RN en la región perinuclear a tiempos tan cortos como 1 minuto tras la exposición con las NPs (Xu y cols., 2009). Resultados similares fueron obtenidos con unas micelas de PCL cargadas con FITC-

PTX con las que se vieron que a partir de las 2 horas se apreciaba un mayor acúmulo de FITC-PTX en las células expuestas a las micelas de PCL cargadas frente al FITC-PTX libre, tanto por imágenes de fluorescencia, como por medida intracelular de PTX por HPLC en la línea LL2 (Gong y cols., 2012).

En relación a los resultados obtenidos con las NPs de PLGA, se obtuvieron resultados similares con los liposomas catiónicos. La encapsulación del PTX en estos liposomas incrementó la concentración de PTX acumulado en el interior celular en las líneas tumorales A549 y LL2, aunque los datos sugieren que la internalización en la línea murina es más lenta que en la línea humana. En cualquier caso, los liposomas más grandes (MLV-PTX, MLV-PEG-PTX) favorecieron en mayor medida la internalización del fármaco en comparación con los liposomas más pequeños, seguramente debido a la mayor cantidad de moléculas de fármaco encapsuladas en cada liposoma. Probablemente, esta internalización se lleva a cabo mediante pinocitosis o endocitosis mediada por clatrina, como se ha observado en otros estudios realizados con liposomas catiónicos (Miller y cols., 1998; Li y cols., 2011). Sin embargo, para analizar el mecanismo concreto de internalización de estos liposomas se requerirían nuevos estudios complementarios. Resultados similares fueron obtenidos por Ruttala y cols. con el uso de liposomas cargados con NPs de albúmina cargadas con PTX, con los cuales se mejoró la internalización del PTX en las líneas tumorales MCF7 y B16F10 (Ruttala y Ko, 2015). Por el contrario, en la línea no tumoral se observó que el PTX libre se internalizó en mayor medida que cualquiera de las diferentes formulaciones lipídicas. Estos resultados podrían explicar los obtenidos en los ensayos de proliferación celular, en los cuales no se observó que ninguna de las formulaciones redujese la IC₅₀ del fármaco libre en esta línea celular.

5. LOS DOS SISTEMAS DE ENCAPSULACIÓN MEJORAN LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL FRENTE A LAS CSCs

En los estudios anteriores se ha comprobado como la encapsulación del PTX en NPs de PLGA, así como en los liposomas catiónicos, han mejorado las propiedades antitumorales del fármaco, así como su internalización celular. Sin embargo, una de las principales causas del fracaso terapéutico del cáncer es la recidiva debido a la presencia de CSCs que no se consiguen eliminar con los tratamientos tradicionales. Por esto motivo, se ha realizado un estudio del efecto de estas nanoformulaciones sobre CSCs aisladas de la línea tumoral A549. En primer lugar, se comprobó que las células aisladas correspondieran a CSCs. La morfología de las tumoresferas fue similar al observado por otros autores que han utilizado ensayos de aislamientos de CSCs parecidos con líneas tumorales de pulmón (Zhang y cols., 2015; Zhao y cols., 2015; Leiva y cols., 2017). Por otra parte, se realizó un estudio

de la expresión de cuatro marcadores seleccionados para el fenotipo de células madre, que reveló una sobreexpresión de todos los marcadores estudiados, como también se ha descrito en otros estudios (Luanpitpong y cols., 2014; Zhang y cols., 2015). Estos resultados permiten confirmar que efectivamente las células aisladas cumplían los criterios para ser consideradas CSCs.

Una vez aisladas, se llevó a cabo un ensayo de proliferación con ambos tipos de formulaciones. Los resultados obtenidos con las NPs de PLGA mostraron una disminución significativa de la VC en las CSCs con las PLGA-PTX NPs a las dosis más bajas con respecto al PTX libre, aunque el efecto a dosis más altas fue similar con ambos tratamientos. Esto puede ser debido a la falta de especificidad de las NPs por el fenotipo de CSCs. Por ello, una de las posibles mejoras de esta nanoformulación que podría plantearse sería la adición de un direccionamiento activo en la envuelta polimérica para mejorar el efecto antitumoral frente a las CSCs. Esta estrategia se ha empleado ya en algunos estudios como el realizado por Swaminathan y cols. con unas NPs de PLGA cargadas con PTX y funcionalizadas con un anticuerpo anti-CD33, uno de los marcadores que se sobreexpresan en las CSCs. La adición de este anticuerpo a las NPs provocó una disminución de las esferas formadas de MCF7 del 70% frente al 10% obtenido tras la exposición con PTX libre (Swaminathan y cols., 2013). Asimismo, Wang y cols. desarrollaron unas NPs de quitosán, pluronic y PLGA (PFP) combinando los fármacos antitumorales doxorubicina e irinotecan y funcionalizadas con ácido hialurónico (HA) (HA-PFP-DC), dirigido contra el marcador CD44 característico del fenotipo de célula madre, con las que obtuvieron reducciones de la proliferación de CSCs derivadas de cáncer de próstata y de mama de hasta 66.3 y 419.1 veces, respectivamente, en comparación con estas NPs sin HA (Wang y cols., 2015).

En relación a este estudio se realizó un análisis con las NPs de PLGA de su posible capacidad de inhibición de P-gp, uno de los principales mecanismos de resistencia a fármacos que desarrollan las células tumorales como las CSCs. Para ello, se realizó un ensayo de retención de rodamina (sustrato de P-gp), con una línea resistente a PTX y una alta expresión de P-gp, HCT-15, y una línea sensible, T84, ambas tumorales de colon al no disponer de una línea tumoral de pulmón resistente a P-gp. Los resultados en este caso no mostraron que las NPs de PLGA tuvieran un efecto similar al verapamilo, un inhibidor comercial de P-gp, al no favorecer la retención de la rodamina, por lo que estas NPs no parecen ser capaces de evadir el mecanismo de resistencia basado en P-gp.

Paralelamente, los resultados de los ensayos de proliferación de las CSCs con los liposomas catiónicos mostraron que solo una de las formulaciones, MLV-PEG-PTX consiguió disminuir significativamente la proliferación de las CSCs a la mayoría de dosis

empleadas en comparación con el PTX libre, a pesar de no alcanzar la IC_{50} con ninguno de los dos tratamientos. Estos resultados sugieren que el recubrimiento con PEG podría favorecer la evasión del mecanismo de resistencia de las CSCs, y además su mayor tamaño permitiría la incorporación de más moléculas de PTX, que podrían compensar la expulsión del fármaco a través de la acción de mecanismos de resistencia como la P-glicoproteína. Sin embargo, se requerirían más estudios para verificar esta hipótesis. Otros estudios en CSCs (CD133+) aisladas de sarcoma de ratón demostraron que el tratamiento con liposomas pegilados cargados con epirubicina y metformina tuvo una mayor efectividad que los fármacos libres (Yang y cols., 2014). La mejora de la actividad antitumoral en las CSCs, a pesar de la ausencia de un direccionamiento activo, sugiere que la adición de alguna molécula específica en la envoltura de los liposomas podría posiblemente mejorar este efecto aún más contra estas células resistentes, como en el caso de las NPs de PLGA. Este es el caso de los liposomas catiónicos sintetizados por Sun y cols. que fueron modificados mediante la adición de una proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad y un aptámero de ARN con capacidad de unión al receptor CD133, sobreexpresado en CSCs. Estos liposomas cargados con PTX y un siRNA mostraron una capacidad aumentada de reconocer células madre de glioma (CD133+) e inducir selectivamente la apoptosis de estas células, mostrando un gran potencial como terapia frente a CSCs de glioma (Sun y cols., 2018).

6. LAS NPs DE PLGA Y LOS LIPOSOMAS CATIÓNICOS REDUCEN EL VOLUMEN DE LOS MTS

Con objeto de estudiar la penetrabilidad y la actividad antitumoral de los dos tipos de nanoformulaciones en modelos que remedan los tumores *in vivo*, se realizaron ensayos con MTS generados a partir de dos líneas tumorales, A549 y LL2. Estos MTS fueron monitorizados desde el día 0 (correspondiente al tercer día desde el momento de la siembra), hasta el día 8 para determinar la modulación de volumen con los diferentes tratamientos (administrados los días 0 y 2). En cuanto a las NPs de PLGA, no se encontraron diferencias significativas entre los MTS tratados con las NPs vacías y los MTS usados como controles sin tratamiento, corroborando la biocompatibilidad del sistema de encapsulación en modelos tridimensionales. Por otra parte, se observó un ralentizamiento del crecimiento de los MTS con los tratamientos de PTX libre y NPs de PLGA-PTX en comparación con los MTS sin tratar. Además, el tratamiento con las NPs de PLGA-PTX presentó diferencias significativas con respecto al PTX libre, con una diferencia de volumen a día 8 del 27% y 55.5% en los MTS de A549 y LL2, respectivamente. Concretamente, el tratamiento con las NPs de PLGA en los MTS de LL2 no solo ralentizó el crecimiento de los esferoides, sino que además provocó una disminución del volumen tumoral desde el día 4 hasta el día 8. En relación a

DISCUSIÓN

estos resultados, es necesario destacar que ambos tipos de MTS sufrieron modificaciones morfológicas visibles con el tratamiento con PTX libre, pero sobre todo con las NPs de PLGA, mostrando una estructura menos compacta y con los bordes menos definidos. Estos resultados sugieren por tanto que las NPs no solo mejoran la entrada del PTX a nivel celular, sino que también incrementan la capacidad de penetración y difusión del fármaco en modelos tridimensionales. Resultados similares se observaron en MTS de A549 tras ser tratados con PTX@p4VP frente al PTX libre, consiguiendo una diferencia en volumen tumoral respecto a los controles del ~80% y ~70%, respectivamente (Contreras-Caceres y cols., 2017). Leiva y cols. también realizaron otro estudio con MTS en A549 que fueron tratados con NPs de tripalmitina asociadas a PTX, en el que se observó la encapsulación en las NPs mejoró la penetración en masas celulares sólidas, con diferencias del 15% del volumen de los MTS en comparación con los tratados con PTX libre y del 85% en comparación con MTS sin tratar, siendo mayor la efectividad de las NPs de PLGA en comparación con el PTX libre (Leiva y cols., 2017).

En cuanto a los estudios realizados con los liposomas catiónicos, tanto los MTS de A549 como los de LL2 no mostraron diferencias significativas entre los controles no tratados y los MTS tratados con los liposomas descargados, lo que confirma la biocompatibilidad de estos sistemas en modelos 3D, al igual que se confirmó con las líneas celulares en monocapa. En los MTS de la línea A549, los liposomas grandes mostraron un mayor efecto antitumoral y una mayor capacidad de penetración en el MTS que los liposomas pequeños y que el PTX libre, aunque el liposoma MLV-PTX mostró una mayor efectividad sobre los MTS que su análogo con envuelta de PEG. Sin embargo, en los MTS de la línea murina, los liposomas no pegilados mostraron una mayor capacidad de penetración en el MTS, logrando una diferencia de volumen del 15% con respecto al tratamiento con el PTX libre a día 8. En este caso, los liposomas pegilados no mostraron diferencias significativas con respecto a la PTX libre. Los MTS de LL2 muestran una tasa de crecimiento más elevada que los de A549, con diferencias de tamaño considerable en los controles de 0.5 mm³ y 0.04 mm³ a día 8, respectivamente. Además, los MTS de la línea murina presentan una mayor compactación y densidad, lo que, sumado a su gran tamaño, podría dificultar la penetrabilidad de los liposomas pegilados, que ya mostraron una menor capacidad de internalización en las líneas cultivadas en monocapa. En el caso de los MTS de A549, al tratarse de esferoides menos compactos y más pequeños, los liposomas más grandes podrían penetrar mejor y pueden liberar una mayor carga de fármaco en los esferoides. Además, ya se observó en los cultivos en monocapa una mayor internalización de los liposomas MLV-PTX y MLV-PEG-PTX frente a los liposomas más pequeños SUV-PTX y SUV-PEG-PTX, por lo que puede que en esta línea celular no influya tanto la pegilación como en el caso de la línea LL2. Otro estudio

realizado con esferoides de la línea PC3, tratados con liposomas pegilados y no pegilados y cargados con docetaxel, reveló que las nanoformulaciones no pegiladas mejoraron la penetración y el efecto antitumoral en modelos 3D tras tiempos de exposición cortos (48 y 72 horas) en comparación con el docetaxel libre y los liposomas pegilados. Sin embargo, a dosis altas y un tiempo de exposición más largo (96 horas), los liposomas pegilados y no pegilados tuvieron un efecto antitumoral comparable, probablemente porque los liposomas pegilados requieren un mayor tiempo para penetrar en el esferoide e internalizar el fármaco en las células (Pereira y cols., 2016).

Paralelamente, se analizó el índice de apoptosis inducida en estos sistemas en los que la interconexión celular puede asemejarse a la de un tumor *in vivo*, cuando se expusieron a los diferentes tratamientos con PTX libre y ambos tipos de nanoformulaciones cargadas con PTX. Este análisis se realizó mediante la técnica de TUNEL que permite el marcaje de las células apoptóticas de las capas más superficiales de los MTS. Los resultados obtenidos con esta técnica en los MTS de ambas líneas corroboraron el aumento en el porcentaje de muerte celular en los MTS tratados con las NPs de PLGA-PTX respecto al PTX libre, que explicarían las diferencias de volumen y morfología comentadas anteriormente. En relación a los resultados obtenidos con los liposomas, los MTS de ambas líneas celulares con mayor marcaje apoptótico resultaron ser los tratados con los liposomas MLV-PTX. Además, en los MTS de A549 también se observó un alto índice de apoptosis cuando fueron tratados con MLV-PEG-PTX. Estos ensayos se corresponden con lo observado en la monitorización del volumen de los MTS en ambas líneas. Contreras-Cáceres y cols. también observaron un mayor índice de apoptosis mediante la técnica de TUNEL cuando los esferoides de A549 se expusieron a la nanoformulación PTX@p4VP frente al PTX libre (Contreras-Caceres y cols., 2017).

7. LOS SISTEMAS DE PLGA Y LIPOSOMAS CATIONICOS DISMINUYEN EL VOLUMEN DE LOS TUMORES *IN VIVO*

Los prometedores resultados obtenidos en los estudios con MTS incentivaron la realización de los ensayos *in vivo* con ratones de la cepa C57BL/6, a los que se le indujeron tumores subcutáneos de pulmón mediante la inoculación de células de la línea murina LL2. En primer lugar, los ratones tratados con las NPs de PLGA-PTX mostraron una reducción significativa del crecimiento tumoral (44.6%), en mayor medida que el PTX libre (24.4%), con diferencias visibles desde el tercer día de tratamiento (día 21). Además, el tratamiento con las NPs de PLGA no indujo toxicidad en los ratones, al no observar diferencias significativas en el peso de los ratones con respecto a los no tratados, sino un incremento del peso consistente con un crecimiento normal de los ratones. Complementariamente, se

DISCUSIÓN

realizó un análisis de toxicidad hematológica de las NPs PLGA-PTX y el PTX libre, con el que no se detectaron diferencias significativas entre ambos tratamientos, por lo que las NPs no parecen incrementar la toxicidad hematológica del fármaco libre *in vivo*. Sin embargo, aunque se consiguió retrasar el crecimiento tumoral, el tratamiento con las NPs no mejoró la supervivencia media de los ratones con respecto a los tratados con el PTX libre. Probablemente, el efecto antitumoral, así como la supervivencia, podrían mejorarse si se aumentara la especificidad de las NPs de PLGA, lo que evitaría que se acumularan en otros tejidos sanos y fomentaría que llegaran al tejido tumoral donde ejercerían su acción citotóxica más eficazmente. Estudios previos *in vivo* han demostrado la efectividad de las NPs de PLGA. Concretamente, se analizó el efecto antitumoral de NPs de PLGA emulsionadas con TPGS, también conocido como vitamina E, y cargadas con PTX, en ratones con xenoinjertos de cáncer de pulmón inducidos con la línea A549, y se observó que las NPs potenciaron en gran medida el efecto del fármaco, provocando una disminución significativa del tamaño los tumores en comparación con el PTX libre (Sun y cols., 2014). Resultados similares se obtuvieron con micelas poliméricas de PCL con una envuelta de PEG (MPEG-PCL) y cargadas con PTX, con las que se consiguieron una reducción del volumen tumoral superior a la obtenida con el PTX libre (Gong y cols., 2012). Asimismo, los resultados *in vivo* mostrados en este trabajo mejoraron los obtenidos por Yuan y cols., que sintetizaron unas NPs de PLGA y Tween 80 cargadas con PTX con las que obtuvieron una disminución del 13% del volumen tumoral en modelos de ratón inmunodeprimidos con xenoinjertos inducidos con la línea A549, en comparación con el tratamiento con el PTX libre (Yuan y cols., 2016). Yao y cols. también obtuvieron una disminución del volumen tumoral similar (15.9%) respecto al PTX libre con el uso de NPs de PLGA con envuelta de PEG y funcionalizadas con ácido fólico en modelos de ratón con tumores ováricos inducidos (Yao y cols., 2018).

Por otra parte, los liposomas catiónicos MLV-PEG-PTX y SUV-PEG-PTX consiguieron reducir el tamaño de los tumores hasta un 56.4% y 57.9% con respecto al tamaño de los ratones sin tratamiento, en comparación con la reducción del 36.4% obtenida con el tratamiento con PTX libre. Estas diferencias entre los tratamientos con los liposomas catiónicos y el PTX libre resultaron significativas desde el día 33 del inicio del tratamiento, mientras que la efectividad de los liposomas con respecto a los controles sin tratamiento se observó desde el día 24. Además, al igual que con las NPs de PLGA, el uso de los liposomas vacíos no causó una toxicidad sistémica evidente, tomando como parámetro de referencia el peso de los ratones. Los resultados obtenidos con estos liposomas catiónicos fueron similares a los obtenidos por Qi y cols. con el uso de liposomas pegilados cargados con PTX en modelos de ratón inmunodeprimidos con tumores ováricos inducidos con la línea CAO-3,

con los que demostraron que los liposomas cargados con PTX ejercían su efecto antitumoral mediante la apoptosis activada por la vía de señalización dependiente de caspasas (Qi y cols., 2018). Asimismo, Yang y cols. también obtuvieron mejoras significativas en la reducción del volumen de los tumores en modelos de ratón inmunodeprimidos con tumores mamarios con la encapsulación del PTX en liposomas pegilados, en comparación con el fármaco libre. Estas diferencias de volumen obtenidas entre los tratamientos con PTX libre y los liposomas cargados con PTX se observaron desde casi el inicio de los tratamientos. En cambio, con nuestros liposomas catiónicos, la disminución de volumen tumoral fue significativa en los últimos días de tratamiento. Esto puede ser debido a la carga superficial de los liposomas. En el caso del Yang y cols. los liposomas pegilados presentaban carga negativa, lo que favorece la internalización celular y penetrabilidad en los tejidos, mientras que la carga positiva de los liposomas de estudio en este trabajo, ralentiza estos procesos, por lo que probablemente estas formulaciones requieran un mayor tiempo de exposición para alcanzar el tejido tumoral (Yang y cols., 2007).

Estos estudios corroboran la efectividad de las NPs de PLGA-PTX y los liposomas catiónicos, los cuales han demostrado mejorar significativamente la actividad antitumoral del PTX frente a tumores de cáncer de pulmón en comparación con el fármaco libre. Asimismo, los estudios de biodistribución demostraron algunas ventajas clínicamente relevantes con respecto a otras nanoformulaciones de PTX, como las que se describen a continuación.

8. LOS SISTEMAS POLIMÉRICOS Y LIPÍDICOS MEJORAN LA BIODISPONIBILIDAD *IN VIVO* DEL PTX

Los estudios de biodistribución *in vivo* se llevaron a cabo para analizar la distribución sistémica del fármaco tras la administración intravenosa de ambos tipos de formulaciones cargadas con PTX.

En primer lugar, la encapsulación del PTX en las NPs de PLGA mejoró la biodisponibilidad sistémica del fármaco en comparación con el PTX libre, observando una mayor acumulación del compuesto antitumoral en todos los tejidos, a excepción del corazón. Más concretamente, la mayor acumulación de PTX detectada tras el tratamiento con las NPs de PLGA-PTX fue en el tejido pulmonar, hígado y bazo. Estos dos últimos tejidos forman parte del sistema reticuloendotelial, el principal responsable de la eliminación de elementos desconocidos con tamaños superiores a 150- nm. Dado que las NPs de PLGA que presentan un tamaño superior a 180 nm, esto podría explicar la elevada cantidad de PTX detectada en ambos tejidos. No obstante, la alta acumulación del PTX en el tejido pulmonar desde tiempos de exposición muy cortos (1 hora) podría suponer una gran ventaja para el

tratamiento de los tumores pulmonares primarios, aunque serían necesarios otros estudios complementarios para respaldar esta observación. En cuanto al tejido tumoral, inicialmente se detectó una mayor cantidad de PTX tras el tratamiento con el PTX libre. Sin embargo, tras 24 horas, la concentración de PTX en el tumor alcanzó un nivel similar con las NPs de PLGA-PTX y con el PTX libre. A pesar de que no se detectaron cantidades abundantes de PTX en el tumor en comparación con otros tejidos, si se observaron diferencias significativas en el volumen tumoral desde la tercera administración de NPs de PLGA-PTX respecto al tratamiento con PTX libre. Estos resultados sugieren que las NPs de PLGA podrían requerir un tiempo más prolongado para penetrar y acumularse en el tumor subcutáneo, lo que podría verificarse con un ensayo de biodistribución a tiempos más largos. De hecho, Adesina y cols. realizaron ensayos de biodistribución con unas NPs PLA cargadas con un fluoróforo con los que observaron que las NPs no se detectaron en el tejido tumoral hasta 48–72 h después de la administración. Además, también se observó una gran acumulación de estas NPs en los pulmones, seguidamente del hígado, bazo y riñones, como ocurre con las NPs de PLGA (Adesina y cols., 2014). Por su parte, Klippstein y cols. también observaron una acumulación de NPs de PLGA pegiladas marcados con DiR en el tejido pulmonar tras 24 horas desde la administración del tratamiento en modelos de ratón con tumores de colon inducidos. En este caso, la acumulación del PTX en este tejido puede representar una gran ventaja en el tratamiento de tumores primarios de pulmón (Klippstein y cols., 2015).

La encapsulación del PTX en NPs de PLGA también ha dado como resultado la detección de una mayor cantidad de fármaco en el cerebro, lo que parece sugerir que estas NPs son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica. Este hallazgo puede representar una ventaja significativa en el tratamiento de metástasis cerebrales derivadas de cáncer de pulmón o incluso de otros tumores sensibles a PTX. De hecho, otras NPs de PLGA han demostrado su capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica. Arshad y cols. sintetizaron unas NPs de PLGA cargadas con carboplatino para el tratamiento de glioblastoma, con las que se demostró que la encapsulación en la formulación polimérica mejoró la citotoxicidad tumoral y redujo la toxicidad neuronal (Arshad y cols., 2015). Asimismo, Fornaguera y cols. funcionalizaron unas NPs de PLGA cargadas con loperamida con la que demostró que esta formulación era capaz de atravesar eficientemente la barrera hematoencefálica (Fornaguera y cols., 2015).

Por otro lado, se realizó un análisis específico en las estructuras de DRGs lumbares para determinar la presencia de PTX. Las neuronas sensoriales primarias en los DRGs juegan un papel esencial en la transmisión del dolor y están directamente involucradas en el desarrollo de la neuropatía periférica. De hecho, la presencia de altas concentraciones de PTX en los DRGs modifica las propiedades de la membrana neuronal y se ha asociado con

dolor, alodinia e hiperalgesia (Zhang y Dougherty, 2014; Li y cols., 2017). Estos efectos secundarios pueden conducir a la interrupción del tratamiento o la reducción de la posología del fármaco, con la consiguiente disminución de la eficacia antineoplásica (Conlin y cols., 2010). Por lo tanto, si se consiguiese que una menor cantidad de PTX entrara en los ganglios de la raíz dorsal, se podría prevenir el desarrollo de la neuropatía. Algunas formulaciones utilizadas clínicamente como Abraxane® no han podido superar esta limitación y pueden inducir un nivel aún más grave de neuropatía periférica que el Taxol®. Sorprendentemente, como se muestra en la Figura 47C, se detectó una concentración de PTX significativamente menor (<1 ng / 6 DRG) en los DRGs cuando se usaron NPs de PLGA-PTX en comparación con el PTX libre, lo que sugiere que las NPs podrían disminuir la entrada del fármaco en los DRGs. Dado que la alteración de los DRGs por PTX se ha asociado con el desarrollo de neuropatía periférica en pacientes oncológicos, el uso de estas NPs podría representar una alternativa de tratamiento que no solo mejora la actividad antitumoral propia del fármaco, sino que podría evitar la aparición de este efecto secundario, aunque serían necesarios más estudios para corroborar esta hipótesis.

Finalmente, los estudios farmacocinéticos en sangre revelaron que el tratamiento con las NPs de PLGA-PTX mantuvo niveles significativamente más altos del fármaco en los últimos períodos del ensayo (12 y 24 h) en comparación con la PTX libre. Estos resultados representan una mejora significativa en la biodisponibilidad del fármaco en comparación con la administración del PTX libre, con el que no fue posible detectar PTX en la sangre tras 24 h, lo que también se ha descrito en otros estudios farmacocinéticos con otras NP de polímeros y lípidos (Han y cols., 2006; Wang y cols., 2013; Tran y cols., 2014; Zhang y Zhang, 2015).

Por otra parte, también se realizaron estudios de biodistribución y farmacocinéticos con ratones tratados con PTX libre y con ambas formulaciones de liposomas MLV-PEG-PTX y SUV-PEG-PTX. Como se puede observar en la Figura 48B, la encapsulación del PTX en los liposomas no aumentó demasiado la biodisponibilidad de fármaco en la circulación sanguínea. Sin embargo, la administración de los liposomas catiónicos más pequeños (SUV-PEG-PTX) aumentó la biodisponibilidad del fármaco en el resto de los tejidos. Por su parte, la formulación MLV-PEG-PTX presentó un patrón más similar al PTX, probablemente como consecuencia de su mayor tamaño (> 200 nm) que favorece su eliminación a través del sistema reticuloendotelial más rápidamente que los liposomas más pequeños. Probablemente, el tamaño más reducido de la formulación SUV-PEG-PTX permite prolongar la vida media al pasar más desapercibido por el sistema reticuloendotelial y favorezca su penetrabilidad a través de las fenestraciones de las células endoteliales del sistema vascular. Curiosamente, esta puntualización, que parece ser una ventaja de los

DISCUSIÓN

liposomas más pequeños al mejorar la biodisponibilidad del PTX, resulta ser un inconveniente en cuanto la acumulación del PTX en los DRGs. Concretamente, el análisis de distribución en estas estructuras mostró una concentración muy baja de PTX detectada con el uso de los liposomas más grandes (MLV-PEG-PTX), mientras que el tamaño de los liposomas más pequeños favoreció la acumulación del PTX en estas estructuras de forma similar al PTX libre. Estos resultados sugirieron que el tamaño más grande de la formulación MLV-PEG-PTX previene la entrada de PTX a través de las fenestraciones endoteliales que vascularizan los DRGs, evitando así la neuropatía periférica como se ha demostrado con los ensayos de comportamiento con ratones CD-1. La administración de los grandes liposomas MLV-PEG-PTX no indujo hipersensibilidad mecánica ni hipersensibilidad al calor, mientras que el tratamiento con los liposomas SUV-PEG-PTX produjo una respuesta similar a la observada con el uso de PTX libre, datos que respaldan que la acumulación del PTX en estas estructuras está vinculada al desarrollo de la neuropatía dolorosa, así como que el uso de formulaciones de mayor tamaño pueden evitar la aparición de este efecto secundario de los tratamientos con PTX.

En cuanto al tejido tumoral, el tratamiento con el PTX libre favoreció una mayor acumulación del fármaco durante las primeras 6 horas tras la administración. Sin embargo, tras 24 horas, la mayor acumulación de PTX observada fue con el tratamiento con los liposomas más pequeños SUV-PEG-PTX, mientras que con el PTX libre apenas se detectó fármaco en el tumor. Estos resultados sugieren que las formulaciones de liposomas probablemente necesiten más tiempo en circulación para alcanzar el tejido tumoral, como ocurría con las NPs de PLGA. En otros estudios, también se ha observado cómo los liposomas catiónicos aumentan la concentración del fármaco encapsulado, en este caso, la doxorubicina, en el tejido tumoral a las 24 horas en comparación con la administración del fármaco libre en modelos de ratones tumores inducidos de leucemia linfocítica (Wu y cols., 2007). Sin embargo, aunque se detecta mayor cantidad de PTX con los liposomas más pequeños, no se observaron diferencias significativas entre el tratamiento con ambos tipos de liposomas, lo que supone que los liposomas más grandes, no solo reducen el volumen tumoral de forma similar a los liposomas pequeños, sino que también son capaces de evitar el desarrollo de la neuropatía periférica dolorosa.

Por lo tanto, tanto las NPs de PLGA y los liposomas catiónicos presentados en este trabajo no solo mejoran la actividad antitumoral del PTX, sino que aportan otro tipo de ventajas, como una mayor biodisponibilidad, la posibilidad de atravesar la barrera hematoencefálica, la elevada acumulación en el tejido pulmonar que podría mejorar el tratamiento de los tumores primarios de pulmón o la reducción de efectos secundarios como la neuropatía periférica dolorosa al evitar que el PTX alcance los DRGs.

9. LOS LIPOSOMAS CATIONICOS DE MAYOR TAMAÑO PROTEGEN DE LA NEUROPATÍA PERIFÉRICA INDUCIDA POR EL PTX

El desarrollo de la neuropatía periférica dolorosa está asociada a la acumulación de PTX en los DRGs, donde se encuentran los somas de las neuronas sensoriales periféricas. Estas estructuras presentan una elevada vascularización con capilares fenestrados, lo que las hace particularmente sensibles a los agentes neurotóxicos. Por esta razón, se planteó la hipótesis de que la encapsulación de fármacos como el PTX, que inducen neurotoxicidad, en nanoformulaciones con un tamaño superior a las fenestraciones de estas células endoteliales, podría prevenir la acumulación del fármaco en las estructuras de los DRGs, y por consiguiente la neuropatía dolorosa. Con el fin de demostrar esta hipótesis, se realizó un estudio mediante microscopía electrónica de transmisión para medir el tamaño de las fenestraciones endoteliales de los DRGs en ratones CD-1, con el que se determinó un tamaño entre 80 y 100 nm en las fenestraciones del DRG L4 (Figura 50). Además, se realizaron estudios de comportamiento con esta cepa de ratón, en los que se analizó el desarrollo de hiperalgesia por calor y alodinia mecánica, característicos de la neuropatía periférica dolorosa. Estos ratones fueron tratados con el PTX libre y con las formulaciones MLV-PEG-PTX y SUV-PEG-PTX. Curiosamente, la administración de los liposomas más grandes (MLV-PEG-PTX) no indujo hipersensibilidad mecánica ni hipersensibilidad al calor en los modelos de ratón, mientras que los más pequeños (SUV-PEG-PTX) produjeron una respuesta similar a la observada con el uso de PTX libre (Figura 49), lo que respalda la hipótesis planteada. Además, recientemente Zang y cols. usaron liposomas pegilados, sintetizados con fosfatidilcolina y colesterol, y cargados con PTX, para sensibilidad de ratas a la estimulación mecánica y por calor. En sus estudios observaron que la respuesta de las ratas no aumentó con respecto a la obtenida con el tratamiento con PTX libre (Zang y cols., 2019). Concretamente, el tamaño de estos liposomas pegilados (140 ± 13 nm) fue similar al de los liposomas catiónicos MLV-PEG-PTX (183 ± 29.1 nm), aunque se desconoce el tamaño de las fenestraciones endoteliales de la vasculatura de los DRGs de rata.

Por lo tanto, estos resultados demuestran que el uso de los liposomas catiónicos con un tamaño superior a las fenestraciones de los capilares que vascularizan los DRGs protegen a los modelos murinos del desarrollo de la neuropatía periférica dolorosa inducida por el PTX, uno de los efectos más indeseados de este agente quimioterápico.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se han sintetizado nuevas NPs de PLGA y liposomas catiónicos asociados con el fármaco PTX, uno de los fármacos de elección para el tratamiento del cáncer de pulmón.
2. Las NPs de PLGA y los liposomas presentaron una alta biocompatibilidad tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*.
3. Las dos nanoformulaciones asociadas con PTX disminuyeron significativamente la IC₅₀ del fármaco libre en todas las líneas tumorales testadas, mejorando la eficiencia antitumoral del tratamiento.
4. La encapsulación del PTX en las nanoformulaciones no alteró el mecanismo de acción del fármaco, provocando la misma parada en el proceso de división mitótica que el PTX libre.
5. Las NPs de PLGA y los liposomas facilitan la incorporación intracelular del PTX en las células tumorales en comparación con el PTX libre.
6. Los dos sistemas mejoran la actividad antitumoral del PTX frente a las CSCs aisladas de la línea tumoral A549.
7. Las NPs de PLGA y los liposomas cargados con PTX disminuyen significativamente el volumen e incrementan la apoptosis en los MTS de células tumorales de pulmón en comparación con el PTX libre.
8. Las NPs de PLGA mejoraron la actividad antitumoral del PTX en modelos de ratón con tumores inducidos, aunque no aumentaron la tasa de supervivencia respecto al tratamiento con PTX libre.
9. Los dos tipos de liposomas provocaron una reducción significativamente mayor de los tumores en modelos *in vivo* que el PTX libre.
10. Las NPs de PLGA permitieron un incremento de la biodisponibilidad del PTX *in vivo*, permitiendo una mayor acumulación del fármaco en pulmones, hígado y bazo. Además, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica permitiendo localizar el fármaco en el cerebro.
11. Los liposomas más pequeños mejoraron la biodisponibilidad del PTX en el organismo, mientras que los liposomas más grandes mostraron un patrón similar al PTX libre.

CONCLUSIONES

12. La administración del PTX en las NPs de PLGA y los liposomas más grandes evitó la acumulación del fármaco en los DRGs.
13. Los liposomas de mayor tamaño consiguieron evitar el desarrollo de la neuropatía periférica dolorosa inducida por el PTX, lo que no ocurre con los liposomas más pequeños.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. New PLGA NPs and cationic liposomes have been synthesized associated with PTX, one of the drugs of choice for the treatment of lung cancer.
2. PLGA NPs and liposomes showed high biocompatibility in both *in vitro* and *in vivo* assays.
3. The two nanoformulations associated with PTX significantly decreased the IC₅₀ of the free drug in all the tumor lines tested, improving the antitumor efficiency of the treatment.
4. The encapsulation of PTX in the nanoformulations did not alter the mechanism of action of the drug, causing the same arrest in the mitotic division process as the free PTX.
5. PLGA NPs and liposomes facilitate intracellular incorporation of PTX in tumor cells compared to free PTX.
6. The two systems improve the anti-tumor activity of PTX against CSCs isolated from the lung tumor cell line.
7. PTX-loaded PLGA NPs and liposomes significantly decrease the volume and increase apoptosis in MTS of lung tumor cells compared to free PTX.
8. PLGA NPs improved the anti-tumor activity of PTX in mouse models with induced tumors, although they did not increase the survival rate with respect to treatment with free PTX.
9. The two types of liposomes caused a significantly greater reduction of tumors in *in vivo* models than free PTX.
10. PLGA NPs allowed an increase of the bioavailability of PTX *in vivo*, favoring a greater accumulation of the drug in lungs, liver and spleen. In addition, they are able to cross the blood-brain barrier allowing the drug to be located in the brain.
11. The smaller liposomes improved the bioavailability of PTX in the organism, while the larger liposomes showed a pattern similar to free PTX.
12. The administration of PTX in the PLGA NPs and the larger liposomes prevented the accumulation of the drug in the DRGs.

CONCLUSIONS

13. The larger liposomes managed to avoid the development of painful peripheral neuropathy induced by PTX, which does not occur with the smaller liposomes

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Acharya, S., F. Dilnawaz and S. K. Sahoo (2009). "Targeted epidermal growth factor receptor nanoparticle bioconjugates for breast cancer therapy." *Biomaterials* **30**(29): 5737-5750.
- 2) Acharya, S. and S. K. Sahoo (2011). "PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect." *Adv Drug Deliv Rev* **63**(3): 170-183.
- 3) Adesina, S. K., A. Holly, G. Kramer-Marek, J. Capala and E. O. Akala (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.
- 4) Ahmed, F., R. I. Pakunlu, A. Brannan, F. Bates, T. Minko and D. E. Discher (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.
- 5) Aillon, K. L., Y. Xie, N. El-Gendy, C. J. Berkland and M. L. Forrest (2009). "Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity." *Adv Drug Deliv Rev* **61**(6): 457-466.
- 6) Akbarzadeh, A., R. Rezaei-Sadabady, S. Davaran, S. W. Joo, N. Zarghami, Y. Hanifehpour, M. Samiei, M. Kouhi and K. Nejati-Koshki (2013). "Liposome: classification, preparation, and applications." *Nanoscale Res Lett* **8**(1): 102.
- 7) Akbarzadeh, A., M. Samiei and S. Davaran (2012). "Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine." *Nanoscale Res Lett* **7**(1): 144.
- 8) Allen, T. M. (2002). "Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy." *Nat Rev Cancer* **2**(10): 750-763.
- 9) American Cancer Society. (2016). "Non-Small Cell Lung Cancer Risk Factors." Retrieved March 2018, from <https://www.cancer.org/cancer/non-small-cell-lung-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>.
- 10) American Cancer Society. (2016). "What Is Non-Small Cell Lung Cancer?" Retrieved March 2018, from <https://www.cancer.org/cancer/non-small-cell-lung-cancer/about/what-is-non-small-cell-lung-cancer.html>.
- 11) American Cancer Society. (2017). "Non-Small Cell Lung Cancer Survival Rates, by Stage." Retrieved March 2018, from <https://www.cancer.org/cancer/non-small-cell-lung-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>.
- 12) Amin, M. B., F. L. Greene, S. B. Edge, C. C. Compton, J. E. Gershenwald, R. K. Brookland, L. Meyer, D. M. Gress, D. R. Byrd and D. P. Winchester (2017). "The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a

- population-based to a more "personalized" approach to cancer staging." CA Cancer J Clin **67**(2): 93-99.
- 13) Antonia, S. J., A. Villegas, D. Daniel, D. Vicente, S. Murakami, R. Hui, T. Yokoi, A. Chiappori, K. H. Lee, M. de Wit, B. C. Cho, M. Bourhaba, X. Quantin, T. Tokito, T. Mekhail, D. Planchard, Y. C. Kim, C. S. Karapetis, S. Hirt, G. Ostoros, K. Kubota, J. E. Gray, L. Paz-Ares, J. de Castro Carpeno, C. Wadsworth, G. Melillo, H. Jiang, Y. Huang, P. A. Dennis, M. Ozguroglu and P. Investigators (2017). "Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer." N Engl J Med **377**(20): 1919-1929.
 - 14) Araya, T., K. Kasahara, S. Nishikawa, H. Kimura, T. Sone, H. Nagae, Y. Ikehata, I. Nagano and M. Fujimura (2013). "Antitumor effects of inductive hyperthermia using magnetic ferucarbotran nanoparticles on human lung cancer xenografts in nude mice." Onco Targets Ther **6**: 237-242.
 - 15) Argyriou, A. A., M. Koltzenburg, P. Polychronopoulos, S. Papapetropoulos and H. P. Kalofonos (2008). "Peripheral nerve damage associated with administration of taxanes in patients with cancer." Crit Rev Oncol Hematol **66**(3): 218-228.
 - 16) Arriagada, R., T. Le Chevalier, F. Borie, A. Riviere, P. Chomy, I. Monnet, A. Tardivon, F. Viader, M. Tarayre and S. Benhamou (1995). "Prophylactic cranial irradiation for patients with small-cell lung cancer in complete remission." J Natl Cancer Inst **87**(3): 183-190.
 - 17) Arshad, A., B. Yang, A. S. Bienemann, N. U. Barua, M. J. Wyatt, M. Woolley, D. E. Johnson, K. J. Edler and S. S. Gill (2015). "Convection-Enhanced Delivery of Carboplatin PLGA Nanoparticles for the Treatment of Glioblastoma." PLoS One **10**(7): e0132266.
 - 18) Babincova, N., P. Sourivong, P. Babinec, C. Bergemann, M. Babincova and S. Durdik (2018). "Applications of magnetoliposomes with encapsulated doxorubicin for integrated chemotherapy and hyperthermia of rat C6 glioma." Z Naturforsch C **73**(7-8): 265-271.
 - 19) Babu, A., A. K. Templeton, A. Munshi and R. Ramesh (2013). "Nanoparticle-Based Drug Delivery for Therapy of Lung Cancer: Progress and Challenges." J Nanomater **2013**: 11.
 - 20) Bae, Y. H. (2009). "Drug targeting and tumor heterogeneity." J Control Release **133**(1): 2-3.
 - 21) 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.
 - 22) Baek, J. S., J. H. Kim, J. S. Park and C. W. Cho (2015). "Modification of paclitaxel-loaded solid lipid nanoparticles with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin enhances absorption and reduces nephrotoxicity associated with intravenous injection." Int J Nanomedicine **10**: 5397-5405.

- 23) Banerjee, S., K. Sen, T. K. Pal and S. K. Guha (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.
- 24) Banobre-Lopez, M., A. Teijeiro and J. Rivas (2013). "Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment." Rep Pract Oncol Radiother **18**(6): 397-400.
- 25) Barenholz, Y. (2012). "Doxil(R)--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned." J Control Release **160**(2): 117-134.
- 26) Belhadj, Z., C. Zhan, M. Ying, X. Wei, C. Xie, Z. Yan and W. Lu (2017). "Multifunctional targeted liposomal drug delivery for efficient glioblastoma treatment." Oncotarget **8**(40): 66889-66900.
- 27) Benazzi, C., A. Al-Dissi, C. H. Chau, W. D. Figg, G. Sarli, J. T. de Oliveira and F. Gartner (2014). "Angiogenesis in spontaneous tumors and implications for comparative tumor biology." ScientificWorldJournal **2014**: 919570.
- 28) Bergers, G. and S. Song (2005). "The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance." Neuro Oncol **7**(4): 452-464.
- 29) Bergfeld, S. A. and Y. A. DeClerck (2010). "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment." Cancer Metastasis Rev **29**(2): 249-261.
- 30) Bernabeu, E., M. Cagel, E. Lagomarsino, M. Moretton and D. A. Chiappetta (2017). "Paclitaxel: What has been done and the challenges remain ahead." Int J Pharm **526**(1-2): 474-495.
- 31) Bernstein, J. M., C. R. Bernstein, C. M. West and J. J. Homer (2013). "Molecular and cellular processes underlying the hallmarks of head and neck cancer." Eur Arch Otorhinolaryngol **270**(10): 2585-2593.
- 32) Bersini, S., J. S. Jeon, M. Moretti and R. D. Kamm (2014). "In vitro models of the metastatic cascade: from local invasion to extravasation." Drug Discov Today **19**(6): 735-742.
- 33) Bertrand, N., J. Wu, X. Xu, N. Kamaly and O. C. Farokhzad (2014). "Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology." Adv Drug Deliv Rev **66**: 2-25.
- 34) Blair, H. A. and E. D. Deeks (2015). "Albumin-Bound Paclitaxel: A Review in Non-Small Cell Lung Cancer." Drugs **75**(17): 2017-2024.
- 35) Blasco, M. A. (2005). "Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond." Nat Rev Genet **6**(8): 611-622.
- 36) Bozzuto, G. and A. Molinari (2015). "Liposomes as nanomedical devices." Int J Nanomedicine **10**: 975-999.
- 37) Brigger, I., C. Dubernet and P. Couvreur (2002). "Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis." Adv Drug Deliv Rev **54**(5): 631-651.

- 38) Butler, E. B., Y. Zhao, C. Munoz-Pinedo, J. Lu and M. Tan (2013). "Stalling the engine of resistance: targeting cancer metabolism to overcome therapeutic resistance." Cancer Res **73**(9): 2709-2717.
- 39) Cabral, H., Y. Matsumoto, K. Mizuno, Q. Chen, M. Murakami, M. Kimura, Y. Terada, M. R. Kano, K. Miyazono, M. Uesaka, N. Nishiyama and K. Kataoka (2011). "Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size." Nat Nanotechnol **6**(12): 815-823.
- 40) Cavallaro, G., M. Campisi, M. Licciardi, M. Ogris and G. Giammona (2006). "Reversibly stable thiopolyplexes for intracellular delivery of genes." J Control Release **115**(3): 322-334.
- 41) Cobos, E. J., C. A. Nickerson, F. Gao, V. Chandran, I. Bravo-Caparros, R. Gonzalez-Cano, P. Riva, N. A. Andrews, A. Latremoliere, C. R. Seehus, G. Perazzoli, F. R. Nieto, N. Joller, M. W. Painter, C. H. E. Ma, T. Omura, E. J. Chesler, D. H. Geschwind, G. Coppola, M. Rangachari, C. J. Woolf and M. Costigan (2018). "Mechanistic Differences in Neuropathic Pain Modalities Revealed by Correlating Behavior with Global Expression Profiling." Cell Rep **22**(5): 1301-1312.
- 42) Conlin, A. K., A. D. Seidman, A. Bach, D. Lake, M. Dickler, G. D'Andrea, T. Traina, M. Danso, A. M. Brufsky, M. Saleh, A. Clawson and C. A. Hudis (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.
- 43) Contreras-Caceres, R., M. C. Leiva, R. Ortiz, A. Diaz, G. Perazzoli, M. A. Casado-Rodriguez, C. Melguizo, J. M. Baeyens, J. M. Lopez-Romero and J. Prados (2017). "Paclitaxel-loaded hollow-poly(4-vinylpyridine) nanoparticles enhance drug chemotherapeutic efficacy in lung and breast cancer cell lines." Nano Res. **10**(3): 856-875.
- 44) Creighton, C. J., X. Li, M. Landis, J. M. Dixon, V. M. Neumeister, A. Sjolund, D. L. Rimm, H. Wong, A. Rodriguez, J. I. Herschkowitz, C. Fan, X. Zhang, X. He, A. Pavlick, M. C. Gutierrez, L. Renshaw, A. A. Larionov, D. Faratian, S. G. Hilsenbeck, C. M. Perou, M. T. Lewis, J. M. Rosen and J. C. Chang (2009). "Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(33): 13820-13825.
- 45) Chang, A. Y., K. Kim, J. Glick, T. Anderson, D. Karp and D. Johnson (1993). "Phase II study of taxol, merbarone, and piroxantrone in stage IV non-small-cell lung cancer: The Eastern Cooperative Oncology Group Results." J Natl Cancer Inst **85**(5): 388-394.
- 46) Chaturvedi, A. K., R. M. Pfeiffer, L. Chang, J. J. Goedert, R. J. Biggar and E. A. Engels (2007). "Elevated risk of lung cancer among people with AIDS." AIDS **21**(2): 207-213.
- 47) Chen, K. J., H. F. Liang, H. L. Chen, Y. Wang, P. Y. Cheng, H. L. Liu, Y. Xia and H. W. Sung (2013). "A thermoresponsive bubble-generating liposomal system for triggering localized extracellular drug delivery." ACS Nano **7**(1): 438-446.

- 48) Chen, N., C. Brachmann, X. Liu, D. W. Pierce, J. Dey, W. S. Kerwin, Y. Li, S. Zhou, S. Hou, M. Carleton, R. A. Klinghoffer, M. Palmisano and R. Chopra (2015). "Albumin-bound nanoparticle (nab) paclitaxel exhibits enhanced paclitaxel tissue distribution and tumor penetration." Cancer Chemother Pharmacol **76**(4): 699-712.
- 49) Cheng, S., W. K. Evans, D. Stys-Norman, F. A. Shepherd and C. Lung Cancer Disease Site Group of Cancer Care Ontario's Program in Evidence-based (2007). "Chemotherapy for relapsed small cell lung cancer: a systematic review and practice guideline." J Thorac Oncol **2**(4): 348-354.
- 50) Cho, H. J., H. Y. Yoon, H. Koo, S. H. Ko, J. S. Shim, J. H. Lee, K. Kim, I. C. Kwon and D. D. Kim (2011). "Self-assembled nanoparticles based on hyaluronic acid-ceramide (HA-CE) and Pluronic(R) for tumor-targeted delivery of docetaxel." Biomaterials **32**(29): 7181-7190.
- 51) Cho, K., X. Wang, S. Nie, Z. G. Chen and D. M. Shin (2008). "Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer." Clin Cancer Res **14**(5): 1310-1316.
- 52) Choudhury, H., B. Gorain, R. K. Tekade, M. Pandey, S. Karmakar and T. K. Pal (2017). "Safety against nephrotoxicity in paclitaxel treatment: Oral nanocarrier as an effective tool in preclinical evaluation with marked in vivo antitumor activity." Regul Toxicol Pharmacol **91**: 179-189.
- 53) Choy, H., W. Akerley, H. Safran, J. Clark, V. Rege, A. Papa, M. Glantz, Y. Puthawala, C. Soderberg and L. Leone (1994). "Phase I trial of outpatient weekly paclitaxel and concurrent radiation therapy for advanced non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol **12**(12): 2682-2686.
- 54) Chute, J. P., T. Chen, E. Feigal, R. Simon and B. E. Johnson (1999). "Twenty years of phase III trials for patients with extensive-stage small-cell lung cancer: perceptible progress." J Clin Oncol **17**(6): 1794-1801.
- 55) Danhier, F., E. Ansorena, J. M. Silva, R. Coco, A. Le Breton and V. Preat (2012). "PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications." J Control Release **161**(2): 505-522.
- 56) Darby, S. (2005). "Residential radon, smoking and lung cancer." Radiat Res **163**(6): 696.
- 57) Darby, S., D. Hill, A. Auvinen, J. M. Barros-Dios, H. Baysson, F. Bochicchio, H. Deo, R. Falk, F. Forastiere, M. Hakama, I. Heid, L. Kreienbrock, M. Kreuzer, F. Lagarde, I. Makelainen, C. Muirhead, W. Oberaigner, G. Pershagen, A. Ruano-Ravina, E. Ruostenoja, A. S. Rosario, M. Tirmarche, L. Tomasek, E. Whitley, H. E. Wichmann and R. Doll (2005). "Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies." BMJ **330**(7485): 223.
- 58) De Iuliis, F., L. Taglieri, G. Salerno, R. Lanza and S. Scarpa (2015). "Taxane induced neuropathy in patients affected by breast cancer: Literature review." Crit Rev Oncol Hematol **96**(1): 34-45.

BIBLIOGRAFÍA

- 59) Demedts, I. K., K. Y. Vermaelen and J. P. van Meerbeeck (2010). "Treatment of extensive-stage small cell lung carcinoma: current status and future prospects." Eur Respir J **35**(1): 202-215.
- 60) DeNardo, D. G., P. Andreu and L. M. Coussens (2010). "Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity." Cancer Metastasis Rev **29**(2): 309-316.
- 61) Dimova, I., G. Popivanov and V. Djonov (2014). "Angiogenesis in cancer - general pathways and their therapeutic implications." J BUON **19**(1): 15-21.
- 62) Dinarvand, R., N. Sepehri, S. Manoochehri, H. Rouhani and F. Atyabi (2011). "Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents." Int J Nanomedicine **6**: 877-895.
- 63) Diotti, R. and D. Loayza (2011). "Shelterin complex and associated factors at human telomeres." Nucleus **2**(2): 119-135.
- 64) Dobrovolskaia, M. A. and S. E. McNeil (2007). "Immunological properties of engineered nanomaterials." Nat Nanotechnol **2**(8): 469-478.
- 65) Doello, K., L. Cabeza, R. Ortiz, J. L. Arias, C. Melguizo and J. Prados (2015). "Nanopartículas magnéticas en el diagnóstico y tratamiento del cáncer." Actual. Médica **109**: 139-144.
- 66) Dolatabadi, J. E. N. and Y. Omid (2016). "Solid lipid-based nanocarriers as efficient targeted drug and gene delivery systems." Trends in Analytical Chemistry **77**: 100-108.
- 67) Dougherty, P. M., J. P. Cata, J. V. Cordella, A. Burton and H. R. Weng (2004). "Taxol-induced sensory disturbance is characterized by preferential impairment of myelinated fiber function in cancer patients." Pain **109**(1-2): 132-142.
- 68) Dunn, G. P., L. J. Old and R. D. Schreiber (2004). "The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting." Immunity **21**(2): 137-148.
- 69) Elsaesser, A. and C. V. Howard (2012). "Toxicology of nanoparticles." Adv Drug Deliv Rev **64**(2): 129-137.
- 70) Ettinger, D. S., D. E. Wood, D. L. Aisner, W. Akerley, J. Bauman, J. Y. Chang, L. R. Chirieac, T. A. D'Amico, M. M. DeCamp, T. J. Dilling, M. Dobelbower, R. Govindan, M. A. Gubens, M. Hennon, L. Horn, R. P. Lackner, M. Lanuti, T. A. Leal, L. J. Leisch, R. Lilenbaum, J. Lin, B. W. Loo, Jr., R. Martins, G. A. Otterson, K. Reckamp, G. J. Riely, S. E. Schild, T. A. Shapiro, J. Stevenson, S. J. Swanson, K. Tauer, S. C. Yang, K. Gregory and M. Hughes. (2018). "Non-Small Cell Lung Cancer Version 3.2018 NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines)." Retrieved March 2018, from https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nscl.pdf.
- 71) Ettinger, D. S., D. E. Wood, D. L. Aisner, W. Akerley, J. Bauman, L. R. Chirieac, T. A. D'Amico, M. M. DeCamp, T. J. Dilling, M. Dobelbower, R. C. Doebele, R. Govindan, M. A. Gubens, M. Hennon, L. Horn, R. Komaki, R. P. Lackner, M.

- Lanuti, T. A. Leal, L. J. Leisch, R. Lilenbaum, J. Lin, B. W. Loo, Jr., R. Martins, G. A. Otterson, K. Reckamp, G. J. Riely, S. E. Schild, T. A. Shapiro, J. Stevenson, S. J. Swanson, K. Tauer, S. C. Yang, K. Gregory and M. Hughes (2017). "Non-Small Cell Lung Cancer, Version 5.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology." J Natl Compr Canc Netw **15**(4): 504-535.
- 72) Evans, B. C., C. E. Nelson, S. S. Yu, K. R. Beavers, A. J. Kim, H. Li, H. M. Nelson, T. D. Giorgio and C. L. Duvall (2013). "Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs." J Vis Exp(73): e50166.
- 73) Evans, W. K., F. A. Shepherd, R. Feld, D. Osoba, P. Dang and G. Deboer (1985). "VP-16 and cisplatin as first-line therapy for small-cell lung cancer." J Clin Oncol **3**(11): 1471-1477.
- 74) Fang, S. and P. Salven (2011). "Stem cells in tumor angiogenesis." J Mol Cell Cardiol **50**(2): 290-295.
- 75) Feng, L. and R. J. Mumper (2013). "A critical review of lipid-based nanoparticles for taxane delivery." Cancer Lett **334**(2): 157-175.
- 76) Ferlay, J., I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. M. Parkin, D. Forman and F. Bray (2015). "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012." Int J Cancer **136**(5): E359-386.
- 77) Fernandes, J. V., R. N. Cobucci, C. A. Jatoba, T. A. Fernandes, J. W. de Azevedo and J. M. de Araujo (2015). "The role of the mediators of inflammation in cancer development." Pathol Oncol Res **21**(3): 527-534.
- 78) Fernandez-Peralbo, M. A., F. Priego-Capote, M. D. Luque de Castro, A. Casado-Adam, A. Arjona-Sanchez and F. C. Munoz-Casares (2014). "LC-MS/MS quantitative analysis of paclitaxel and its major metabolites in serum, plasma and tissue from women with ovarian cancer after intraperitoneal chemotherapy." J Pharm Biomed Anal **91**: 131-137.
- 79) Fessi, H. P., F.; Devissaguet, J.P.; Ammoury, N.; Benita, S. (1989). "Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement." Int J Pharm **55**(1): R1-R4.
- 80) Fleige, E., M. A. Quadir and R. Haag (2012). "Stimuli-responsive polymeric nanocarriers for the controlled transport of active compounds: concepts and applications." Adv Drug Deliv Rev **64**(9): 866-884.
- 81) Fonfria Esparcia, C., M. Atarés Huerta, L. Requeni Monfort, J. Blay Beltran, L. Navarro, M. Domingo Montañana and Valencia/ES (2012). Nueva clasificación del adenocarcinoma de pulmón: lo que el radiólogo debe saber. Sociedad Española de Radiología Médica (SERAM 2012). Granada.

BIBLIOGRAFÍA

- 82) Fonseca, C., S. Simoes and R. Gaspar (2002). "Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity." J Control Release **83**(2): 273-286.
- 83) Fornaguera, C., A. Dols-Perez, G. Caldero, M. J. Garcia-Celma, J. Camarasa and C. Solans (2015). "PLGA nanoparticles prepared by nano-emulsion templating using low-energy methods as efficient nanocarriers for drug delivery across the blood-brain barrier." J Control Release **211**: 134-143.
- 84) Fouad, Y. A. and C. Aanei (2017). "Revisiting the hallmarks of cancer." Am J Cancer Res **7**(5): 1016-1036.
- 85) Frampton, J. E. (2010). "Mifamurtide: a review of its use in the treatment of osteosarcoma." Paediatr Drugs **12**(3): 141-153.
- 86) Fruh, M., D. De Ruyscher, S. Popat, L. Crino, S. Peters, E. Felip and E. G. W. Group (2013). "Small-cell lung cancer (SCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up." Ann Oncol **24** **Suppl 6**: vi99-105.
- 87) Gan, C. W. and S. S. Feng (2010). "Transferrin-conjugated nanoparticles of poly(lactide)-D-alpha-tocopheryl polyethylene glycol succinate diblock copolymer for targeted drug delivery across the blood-brain barrier." Biomaterials **31**(30): 7748-7757.
- 88) Ganta, S., H. Devalapally, A. Shahiwala and M. Amiji (2008). "A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery." J Control Release **126**(3): 187-204.
- 89) Gao, W., J. M. Chan and O. C. Farokhzad (2010). "pH-Responsive nanoparticles for drug delivery." Mol Pharm **7**(6): 1913-1920.
- 90) Garnett, M. C. and P. Kallinteri (2006). "Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles." Occup Med (Lond) **56**(5): 307-311.
- 91) Gastón, M. (2008). "El endotelio vascular." Flebología y Linfología / Lecturas vasculares **9**: 508-513.
- 92) Gaumet, M., A. Vargas, R. Gurny and F. Delie (2008). "Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters." Eur J Pharm Biopharm **69**(1): 1-9.
- 93) Gelderblom, H., J. Verweij, K. Nooter and A. Sparreboom (2001). "Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation." Eur J Cancer **37**(13): 1590-1598.
- 94) Gobbo, O. L., K. Sjaastad, M. W. Radomski, Y. Volkov and A. Prina-Mello (2015). "Magnetic Nanoparticles in Cancer Theranostics." Theranostics **5**(11): 1249-1263.
- 95) Gokbuget, N., C. M. Hartog, R. Bassan, H. G. Derigs, H. Dombret, R. Greil, J. M. Hernandez-Rivas, F. Huguet, T. Intermesoli, E. Jourdan, C. Junghanss, L. Leimer, M. J. Moreno, A. Reichle, J. Ribera, M. Schmid, H. Serve, M. Stelljes, R. Stuhlmann, D. Hoelzer, A. L. L. German Multicenter Study Group for Adult and A. L. L. the

- European Working Group for Adult (2011). "Liposomal cytarabine is effective and tolerable in the treatment of central nervous system relapse of acute lymphoblastic leukemia and very aggressive lymphoma." *Haematologica* **96**(2): 238-244.
- 96) Gong, C., Y. Xie, Q. Wu, Y. Wang, S. Deng, D. Xiong, L. Liu, M. Xiang, Z. Qian and Y. Wei (2012). "Improving anti-tumor activity with polymeric micelles entrapping paclitaxel in pulmonary carcinoma." *Nanoscale* **4**(19): 6004-6017.
- 97) Gornstein, E. and T. L. Schwarz (2014). "The paradox of paclitaxel neurotoxicity: Mechanisms and unanswered questions." *Neuropharmacology* **76 Pt A**: 175-183.
- 98) Gridelli, C., A. Rossi, D. P. Carbone, J. Guarize, N. Karachaliou, T. Mok, F. Petrella, L. Spaggiari and R. Rosell (2015). "Non-small-cell lung cancer." *Nat Rev Dis Primers* **1**: 15009.
- 99) Gridelli, C. and P. C. Sacco (2016). "Novel cytotoxic drugs in advanced nonsmall cell lung cancer." *Curr Opin Oncol* **28**(2): 110-114.
- 100) Grivennikov, S. I., F. R. Greten and M. Karin (2010). "Immunity, inflammation, and cancer." *Cell* **140**(6): 883-899.
- 101) Gu, F., L. Zhang, B. A. Teply, N. Mann, A. Wang, A. F. Radovic-Moreno, R. Langer and O. C. Farokhzad (2008). "Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(7): 2586-2591.
- 102) Guan, L., L. Rizzello and G. Battaglia (2015). "Polymersomes and their applications in cancer delivery and therapy." *Nanomedicine (Lond)* **10**(17): 2757-2780.
- 103) Guchelaar, H. J., C. H. ten Napel, E. G. de Vries and N. H. Mulder (1994). "Clinical, toxicological and pharmaceutical aspects of the antineoplastic drug taxol: a review." *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **6**(1): 40-48.
- 104) Gullotti, E. and Y. Yeo (2009). "Extracellularly activated nanocarriers: a new paradigm of tumor targeted drug delivery." *Mol Pharm* **6**(4): 1041-1051.
- 105) Guo, B., D. J. Villeneuve, S. L. Hembruff, A. F. Kirwan, D. E. Blais, M. Bonin and A. M. Parissenti (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.
- 106) Gupta, N., H. Hatoum and G. K. Dy (2014). "First line treatment of advanced non-small-cell lung cancer - specific focus on albumin bound paclitaxel." *Int J Nanomedicine* **9**: 209-221.
- 107) Han, L. M., J. Guo, L. J. Zhang, Q. S. Wang and X. L. Fang (2006). "Pharmacokinetics and biodistribution of polymeric micelles of paclitaxel with Pluronic P123." *Acta Pharmacol Sin* **27**(6): 747-753.

BIBLIOGRAFÍA

- 108) Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- 109) Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- 110) Hardin, C., E. Shum, A. P. Singh, R. Perez-Soler and H. Cheng (2017). "Emerging treatment using tubulin inhibitors in advanced non-small cell lung cancer." Expert Opin Pharmacother **18**(7): 701-716.
- 111) He, C., Y. Hu, L. Yin, C. Tang and C. Yin (2010). "Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles." Biomaterials **31**(13): 3657-3666.
- 112) He, K. and M. Tang (2017). "Safety of novel liposomal drugs for cancer treatment: Advances and prospects." Chem Biol Interact.
- 113) He, K. and M. Tang (2018). "Safety of novel liposomal drugs for cancer treatment: Advances and prospects." Chem Biol Interact **295**: 13-19.
- 114) Herrera-González, N. E. M.-G., F.; Mejía-Jiménez, E. (2015). "El efecto Warburg: la mano derecha en el desarrollo del cáncer." Rev Esp Méd Quir **20**(2): 171-177.
- 115) Hervault, A. and N. T. Thanh (2014). "Magnetic nanoparticle-based therapeutic agents for thermo-chemotherapy treatment of cancer." Nanoscale **6**(20): 11553-11573.
- 116) Hirsh, V. B., A.; Binder, G.; Langer C.; Ong T.J.; Renschler, M.; Bornheimer, R.; Whiting, S.; Oster, G. (2014). "Cost effectiveness of nab-paclitaxel plus carboplatin (nab-PC) relative to bevacizumab plus solvent-based paclitaxel and carboplatin (B+sb-PC) in elderly patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC)." Int J Radiat Oncol Biol Phys **90** (5 Suppl 1): S62-S62.
- 117) Hobbs, S. K., W. L. Monsky, F. Yuan, W. G. Roberts, L. Griffith, V. P. Torchilin and R. K. Jain (1998). "Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(8): 4607-4612.
- 118) Howington, J. A., M. G. Blum, A. C. Chang, A. A. Balekian and S. C. Murthy (2013). "Treatment of stage I and II non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines." Chest **143**(5 Suppl): e278S-e313S.
- 119) Howlader, N. N., A. M.; Krapcho, M.; Miller, D.; Bishop, K.; Kosary, C. L.; Yu, M.; Ruhl, J.; Tatalovich, Z.; Mariotto, A.; Lewis, D. R.; Chen, H. S.; Feuer, E. J.; Cronin, K. A. . (2017). "SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014 based on November 2016 SEER data submission." Retrieved February 2018, from https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/.
- 120) Hu, C. M., S. Aryal and L. Zhang (2010). "Nanoparticle-assisted combination therapies for effective cancer treatment." Ther Deliv **1**(2): 323-334.

- 121) Huang, G., N. Zhang, X. Bi and M. Dou (2008). "Solid lipid nanoparticles of temozolomide: potential reduction of cardiac and nephric toxicity." *Int J Pharm* **355**(1-2): 314-320.
- 122) Instituto Nacional del Cáncer, N. I. H. (2018). "Tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas (PDQ®)–Versión para profesionales de salud." Retrieved March 2018, from <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/pulmon/pro/tratamiento-pulmon-celulas-no-pequenas-pdq#section/1>.
- 123) Instituto Nacional del Cáncer, N. I. H. (2018). "Tratamiento del cáncer de pulmón de células pequeñas (PDQ®)–Versión para profesionales de salud." Retrieved March 2018, from <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/pulmon/pro/tratamiento-pulmon-celulas-pequenas-pdq#section/1>.
- 124) Jabir, N. R., S. Tabrez, G. M. Ashraf, S. Shakil, G. A. Damanhoury and M. A. Kamal (2012). "Nanotechnology-based approaches in anticancer research." *Int J Nanomedicine* **7**: 4391-4408.
- 125) Jain, A., G. Chasoo, S. K. Singh, A. K. Saxena and S. K. Jain (2011). "Transferrin-appended PEGylated nanoparticles for temozolomide delivery to brain: in vitro characterisation." *J Microencapsul* **28**(1): 21-28.
- 126) Johansson, M., D. G. Denardo and L. M. Coussens (2008). "Polarized immune responses differentially regulate cancer development." *Immunol Rev* **222**: 145-154.
- 127) Johnson, B. E. (1998). "Second lung cancers in patients after treatment for an initial lung cancer." *J Natl Cancer Inst* **90**(18): 1335-1345.
- 128) Ju, R. J., L. Cheng, Y. Xiao, X. Wang, C. Q. Li, X. M. Peng and X. T. Li (2018). "PTD modified paclitaxel anti-resistant liposomes for treatment of drug-resistant non-small cell lung cancer." *J Liposome Res* **28**(3): 236-248.
- 129) 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.
- 130) Junttila, M. R. and F. J. de Sauvage (2013). "Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response." *Nature* **501**(7467): 346-354.
- 131) Kalemkerian, G. P., B. W. Loo, Jr., W. Akerley, A. Attia, L. Q. Chow, R. H. Decker, M. Dobelbower, A. Dowlati, R. J. Downey, C. Florsheim, A. K. Ganti, J. C. Grecula, M. A. Gubens, C. L. Hann, J. Hayman, R. S. Heist, M. Koczywas, R. Mehra, R. E. Merritt, N. Mohindra, J. Molina, C. A. Moran, D. Morgensztern, S. Pokharel, D. C. Portnoy, N. Ready, C. Rusthoven, C. C. Williams, Jr., K. G. Hoffmann, M. Hughes and N. National Comprehensive Cancer. (2018). "Small Cell Lung Cancer Version 2.2018 NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology." Retrieved March 2018, from https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/sclc.pdf.
- 132) Kanamala, M., W. R. Wilson, M. Yang, B. D. Palmer and Z. Wu (2016). "Mechanisms and biomaterials in pH-responsive tumour targeted drug delivery: A review." *Biomaterials* **85**: 152-167.

BIBLIOGRAFÍA

- 133) Karnoub, A. E., A. B. Dash, A. P. Vo, A. Sullivan, M. W. Brooks, G. W. Bell, A. L. Richardson, K. Polyak, R. Tubo and R. A. Weinberg (2007). "Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis." Nature **449**(7162): 557-563.
- 134) Kato, Y., S. Ozawa, C. Miyamoto, Y. Maehata, A. Suzuki, T. Maeda and Y. Baba (2013). "Acidic extracellular microenvironment and cancer." Cancer Cell Int **13**(1): 89.
- 135) Kettler, K., K. Veltman, D. van de Meent, A. van Wezel and A. J. Hendriks (2014). "Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions, and cell type." Environ Toxicol Chem **33**(3): 481-492.
- 136) Kim, K. T., J. Y. Lee, D. D. Kim, I. S. Yoon and H. J. Cho (2019). "Recent Progress in the Development of Poly(lactic-co-glycolic acid)-Based Nanostructures for Cancer Imaging and Therapy." Pharmaceutics **11**(6)
- 137) Kim, T. Y., D. W. Kim, J. Y. Chung, S. G. Shin, S. C. Kim, D. S. Heo, N. K. Kim and Y. J. Bang (2004). "Phase I and pharmacokinetic study of Genexol-PM, a cremophor-free, polymeric micelle-formulated paclitaxel, in patients with advanced malignancies." Clin Cancer Res **10**(11): 3708-3716.
- 138) Kirpotin, D. B., D. C. Drummond, Y. Shao, M. R. Shalaby, K. Hong, U. B. Nielsen, J. D. Marks, C. C. Benz and J. W. Park (2006). "Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models." Cancer Res **66**(13): 6732-6740.
- 139) Klippstein, R., J. T. Wang, R. I. El-Gogary, J. Bai, F. Mustafa, N. Rubio, S. Bansal, W. T. Al-Jamal and K. T. Al-Jamal (2015). "Passively Targeted Curcumin-Loaded PEGylated PLGA Nanocapsules for Colon Cancer Therapy In Vivo." Small **11**(36): 4704-4722.
- 140) Koudelka, S. and J. Turanek (2012). "Liposomal paclitaxel formulations." J Control Release **163**(3): 322-334.
- 141) 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.
- 142) Labi, V. and M. Erlacher (2015). "How cell death shapes cancer." Cell Death Dis **6**: e1675.
- 143) Lanio, M. E., M. C. Luzardo, R. Laborde, O. Sánchez, Y. Cruz-Leal, F. Pazos, M. Tejuca, A. Valle, M. E. Alonso, L. E. Fernández and C. Álvarez (2009). "Las vesículas liposomales: obtención, propiedades y aplicaciones potenciales en la biomedicina." Rev Cub Física **26**(1): 23-30.
- 144) Lanone, S. and J. Boczkowski (2006). "Biomedical applications and potential health risks of nanomaterials: molecular mechanisms." Curr Mol Med **6**(6): 651-663.
- 145) Larráyoz Ilundáin, M. (2011). Relevancia funcional de VEGFA y sus receptores en cáncer de pulmón, Universidad de Navarra.

- 146) Leiva, M. C., R. Ortiz, R. Contreras-Caceres, G. Perazzoli, I. Mayevych, J. M. Lopez-Romero, F. Sarabia, J. M. Baeyens, C. Melguizo and J. Prados (2017). "Tripalmitin nanoparticle formulations significantly enhance paclitaxel antitumor activity against breast and lung cancer cells in vitro." Sci Rep **7**(1): 13506.
- 147) Leonessa, F. and R. Clarke (2003). "ATP binding cassette transporters and drug resistance in breast cancer." Endocr Relat Cancer **10**(1): 43-73.
- 148) Li, M., E. A. Czyszczon and J. J. Reineke (2013). "Delineating intracellular pharmacokinetics of paclitaxel delivered by PLGA nanoparticles." Drug Deliv Transl Res **3**(6): 551-561.
- 149) Li, Y., C. E. Tatsui, L. D. Rhines, R. Y. North, D. S. Harrison, R. M. Cassidy, C. A. Johansson, A. K. Kosturakis, D. D. Edwards, H. Zhang and P. M. Dougherty (2017). "Dorsal root ganglion neurons become hyperexcitable and increase expression of voltage-gated T-type calcium channels (Cav3.2) in paclitaxel-induced peripheral neuropathy." Pain **158**(3): 417-429.
- 150) Liang, C., Y. Yang, Y. Ling, Y. Huang, T. Li and X. Li (2011). "Improved therapeutic effect of folate-decorated PLGA-PEG nanoparticles for endometrial carcinoma." Bioorg Med Chem **19**(13): 4057-4066.
- 151) Liechty, W. B., D. R. Kryscio, B. V. Slaughter and N. A. Peppas (2010). "Polymers for drug delivery systems." Annu Rev Chem Biomol Eng **1**: 149-173.
- 152) Lim, W. T., E. H. Tan, C. K. Toh, S. W. Hee, S. S. Leong, P. C. Ang, N. S. Wong and B. Chowbay (2010). "Phase I pharmacokinetic study of a weekly liposomal paclitaxel formulation (Genexol-PM) in patients with solid tumors." Ann Oncol **21**(2): 382-388.
- 153) Litman, T., T. E. Druley, W. D. Stein and S. E. Bates (2001). "From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance." Cell Mol Life Sci **58**(7): 931-959.
- 154) Louage, B., O. De Wever, W. E. Hennink and B. G. De Geest (2017). "Developments and future clinical outlook of taxane nanomedicines." J Control Release **253**: 137-152.
- 155) Luanpitpong, S., L. Wang, V. Castranova and Y. Rojanasakul (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.
- 156) Ma, P. and R. J. Mumper (2013). "Anthracycline Nano-Delivery Systems to Overcome Multiple Drug Resistance: A Comprehensive Review." Nano Today **8**(3): 313-331.
- 157) Ma, P. and R. J. Mumper (2013). "Paclitaxel Nano-Delivery Systems: A Comprehensive Review." J Nanomed Nanotechnol **4**(2): 1000164.
- 158) Ma, W., Q. Guo, Y. Li, X. Wang, J. Wang and P. Tu (2017). "Co-assembly of doxorubicin and curcumin targeted micelles for synergistic delivery and improving anti-tumor efficacy." Eur J Pharm Biopharm **112**: 209-223.

- 159) Maeda, H., K. Tsukigawa and J. Fang (2016). "A Retrospective 30 Years After Discovery of the Enhanced Permeability and Retention Effect of Solid Tumors: Next-Generation Chemotherapeutics and Photodynamic Therapy--Problems, Solutions, and Prospects." Microcirculation **23**(3): 173-182.
- 160) Maeda, H., J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura and K. Hori (2000). "Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review." J Control Release **65**(1-2): 271-284.
- 161) Maeng, J. H., D. H. Lee, K. H. Jung, Y. H. Bae, I. S. Park, S. Jeong, Y. S. Jeon, C. K. Shim, W. Kim, J. Kim, J. Lee, Y. M. Lee, J. H. Kim, W. H. Kim and S. S. Hong (2010). "Multifunctional doxorubicin loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for chemotherapy and magnetic resonance imaging in liver cancer." Biomaterials **31**(18): 4995-5006.
- 162) Malhotra, J., M. Malvezzi, E. Negri, C. La Vecchia and P. Boffetta (2016). "Risk factors for lung cancer worldwide." Eur Respir J **48**(3): 889-902.
- 163) Malkin, D., F. P. Li, L. C. Strong, J. F. Fraumeni, Jr., C. E. Nelson, D. H. Kim, J. Kassel, M. A. Gryka, F. Z. Bischoff, M. A. Tainsky and et al. (1990). "Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms." Science **250**(4985): 1233-1238.
- 164) Mamot, C., R. Ritschard, A. Wicki, G. Stehle, T. Dieterle, L. Bubendorf, C. Hilker, S. Deuster, R. Herrmann and C. Rochlitz (2012). "Tolerability, safety, pharmacokinetics, and efficacy of doxorubicin-loaded anti-EGFR immunoliposomes in advanced solid tumours: a phase 1 dose-escalation study." Lancet Oncol **13**(12): 1234-1241.
- 165) Martins, S. M., B. Sarmiento, C. Nunes, M. Lucio, S. Reis and D. C. Ferreira (2013). "Brain targeting effect of camptothecin-loaded solid lipid nanoparticles in rat after intravenous administration." Eur J Pharm Biopharm **85**(3 Pt A): 488-502.
- 166) Matsumura, Y., M. Gotoh, K. Muro, Y. Yamada, K. Shirao, Y. Shimada, M. Okuwa, S. Matsumoto, Y. Miyata, H. Ohkura, K. Chin, S. Baba, T. Yamao, A. Kannami, Y. Takamatsu, K. Ito and K. Takahashi (2004). "Phase I and pharmacokinetic study of MCC-465, a doxorubicin (DXR) encapsulated in PEG immunoliposome, in patients with metastatic stomach cancer." Ann Oncol **15**(3): 517-525.
- 167) McGrogan, B. T., B. Gilmartin, D. N. Carney and A. McCann (2008). "Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer." Biochim Biophys Acta **1785**(2): 96-132.
- 168) McGuire, W. P., E. K. Rowinsky, N. B. Rosenshein, F. C. Grumbine, D. S. Ettinger, D. K. Armstrong and R. C. Donehower (1989). "Taxol: a unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms." Ann Intern Med **111**(4): 273-279.
- 169) Mekhail, T. M. and M. Markman (2002). "Paclitaxel in cancer therapy." Expert Opin Pharmacother **3**(6): 755-766.

- 170) Miele, E., G. P. Spinelli, E. Miele, F. Tomao and S. Tomao (2009). "Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane ABI-007) in the treatment of breast cancer." Int J Nanomedicine **4**: 99-105.
- 171) Milane, L., Z. Duan and M. Amiji (2011). "Therapeutic efficacy and safety of paclitaxel/Ionidamine loaded EGFR-targeted nanoparticles for the treatment of multi-drug resistant cancer." PLoS One **6**(9): e24075.
- 172) Moldvay, J., M. Jackel, K. Bogos, I. Soltesz, L. Agocs, G. Kovacs and Z. Schaff (2004). "The role of TTF-1 in differentiating primary and metastatic lung adenocarcinomas." Pathol Oncol Res **10**(2): 85-88.
- 173) Molina, J. R., P. Yang, S. D. Cassivi, S. E. Schild and A. A. Adjei (2008). "Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship." Mayo Clin Proc **83**(5): 584-594.
- 174) Monzo, M., R. Rosell, J. J. Sanchez, J. S. Lee, A. O'Brate, J. L. Gonzalez-Larriba, V. Alberola, J. C. Lorenzo, L. Nunez, J. Y. Ro and C. Martin (1999). "Paclitaxel resistance in non-small-cell lung cancer associated with beta-tubulin gene mutations." J Clin Oncol **17**(6): 1786-1793.
- 175) Morel, A. P., M. Lievre, C. Thomas, G. Hinkal, S. Ansieau and A. Puisieux (2008). "Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition." PLoS One **3**(8): e2888.
- 176) Mozar, F. S. and E. H. Chowdhury (2018). "Impact of PEGylated Nanoparticles on Tumor Targeted Drug Delivery." Curr Pharm Des.
- 177) Mundargi, R. C., V. R. Babu, V. Rangaswamy, P. Patel and T. M. Aminabhavi (2008). "Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives." J Control Release **125**(3): 193-209.
- 178) Murray, N., P. Coy, J. L. Pater, I. Hodson, A. Arnold, B. C. Zee, D. Payne, E. C. Kostashuk, W. K. Evans, P. Dixon and et al. (1993). "Importance of timing for thoracic irradiation in the combined modality treatment of limited-stage small-cell lung cancer. The National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group." J Clin Oncol **11**(2): 336-344.
- 179) Nagy, J. A., S. H. Chang, S. C. Shih, A. M. Dvorak and H. F. Dvorak (2010). "Heterogeneity of the tumor vasculature." Semin Thromb Hemost **36**(3): 321-331.
- 180) Nakamura, H., J. Fang and H. Maeda (2015). "Development of next-generation macromolecular drugs based on the EPR effect: challenges and pitfalls." Expert Opin Drug Deliv **12**(1): 53-64.
- 181) Naseri, N., H. Valizadeh and P. Zakeri-Milani (2015). "Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Structure, Preparation and Application." Adv Pharm Bull **5**(3): 305-313.
- 182) Negrini, S., V. G. Gorgoulis and T. D. Halazonetis (2010). "Genomic instability--an evolving hallmark of cancer." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(3): 220-228.

BIBLIOGRAFÍA

- 183) Nehate, C., S. Jain, A. Saneja, V. Khare, N. Alam, R. D. Dubey and P. N. Gupta (2014). "Paclitaxel formulations: challenges and novel delivery options." Curr Drug Deliv **11**(6): 666-686.
- 184) Nieto, F. R., C. M. Cendan, C. Sanchez-Fernandez, E. J. Cobos, J. M. Entrena, M. A. Tejada, D. Zamanillo, J. M. Vela and J. M. Baeyens (2012). "Role of sigma-1 receptors in paclitaxel-induced neuropathic pain in mice." J Pain **13**(11): 1107-1121.
- 185) O'Brien, S., G. Schiller, J. Lister, L. Damon, S. Goldberg, W. Aulitzky, D. Ben-Yehuda, W. Stock, S. Coutre, D. Douer, L. T. Heffner, M. Larson, K. Seiter, S. Smith, S. Assouline, P. Kuriakose, L. Maness, A. Nagler, J. Rowe, M. Schaich, O. Shpilberg, K. Yee, G. Schmieder, J. A. Silverman, D. Thomas, S. R. Deitcher and H. Kantarjian (2013). "High-dose vincristine sulfate liposome injection for advanced, relapsed, and refractory adult Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia." J Clin Oncol **31**(6): 676-683.
- 186) Ortiz, R., L. Cabeza, M. C. Leiva, J. Jimenez-Lopez, C. Melguizo and J. Prados (2017). "Nanomaterial Platform for Drug Delivery in Cancer." Current Organic Chemistry **21**(23): 2376-2399.
- 187) Owonikoko, T. K., M. Behera, Z. Chen, C. Bhimani, W. J. Curran, F. R. Khuri and S. S. Ramalingam (2012). "A systematic analysis of efficacy of second-line chemotherapy in sensitive and refractory small-cell lung cancer." J Thorac Oncol **7**(5): 866-872.
- 188) Paranjpe, M. and C. C. Muller-Goymann (2014). "Nanoparticle-mediated pulmonary drug delivery: a review." Int J Mol Sci **15**(4): 5852-5873.
- 189) Park, I. H., J. H. Sohn, S. B. Kim, K. S. Lee, J. S. Chung, S. H. Lee, T. Y. Kim, K. H. Jung, E. K. Cho, Y. S. Kim, H. S. Song, J. H. Seo, H. M. Ryoo, S. A. Lee, S. Y. Yoon, C. S. Kim, Y. T. Kim, S. Y. Kim, M. R. Jin and J. Ro (2017). "An Open-Label, Randomized, Parallel, Phase III Trial Evaluating the Efficacy and Safety of Polymeric Micelle-Formulated Paclitaxel Compared to Conventional Cremophor EL-Based Paclitaxel for Recurrent or Metastatic HER2-Negative Breast Cancer." Cancer Res Treat **49**(3): 569-577.
- 190) Park, J., P. M. Fong, J. Lu, K. S. Russell, C. J. Booth, W. M. Saltzman and T. M. Fahmy (2009). "PEGylated PLGA nanoparticles for the improved delivery of doxorubicin." Nanomedicine **5**(4): 410-418.
- 191) Parveen, S. and S. K. Sahoo (2011). "Long circulating chitosan/PEG blended PLGA nanoparticle for tumor drug delivery." Eur J Pharmacol **670**(2-3): 372-383.
- 192) Pecorino, L. (2008). *Molecular Biology of Cancer. Mechanisms, Target and Therapeutics.*, Oxford, NY.
- 193) Peer, D., J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit and R. Langer (2007). "Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy." Nat Nanotechnol **2**(12): 751-760.

- 194) Pereira, S., R. Egbu, G. Jannati and W. T. Al-Jamal (2016). "Docetaxel-loaded liposomes: The effect of lipid composition and purification on drug encapsulation and in vitro toxicity." Int J Pharm **514**(1): 150-159.
- 195) Petros, R. A. and J. M. DeSimone (2010). "Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications." Nat Rev Drug Discov **9**(8): 615-627.
- 196) Pietras, K. and A. Ostman (2010). "Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma." Exp Cell Res **316**(8): 1324-1331.
- 197) Pillai, J. J., A. K. Thulasidasan, R. J. Anto, D. N. Chithralekha, A. Narayanan and G. S. Kumar (2014). "Folic acid conjugated cross-linked acrylic polymer (FA-CLAP) hydrogel for site specific delivery of hydrophobic drugs to cancer cells." J Nanobiotechnology **12**: 25.
- 198) Pizzol, C. D., F. B. Filippin-Monteiro, J. A. Restrepo, F. Pittella, A. H. Silva, P. Alves de Souza, A. Machado de Campos and T. B. Creczynski-Pasa (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.
- 199) Prados, J., C. Melguizo, A. Rama, R. Ortiz, H. Boulaiz, F. Rodriguez-Serrano, O. Caba, J. J. Rodriguez-Herva, J. L. Ramos and A. Aranega (2008). "Combined therapy using suicide gene and paclitaxel enhances growth inhibition of multicellular tumour spheroids of A-549 human lung cancer cells." Int J Oncol **33**(1): 121-127.
- 200) Qi, Z., L. Yin, Y. Xu and F. Wang (2018). "Pegylated liposomal paclitaxel induces ovarian cancer cell apoptosis via TNF-induced ERK/AKT signaling pathway." Mol Med Rep **17**(6): 7497-7504.
- 201) Rami-Porta, R., H. Asamura, W. D. Travis and V. W. Rusch (2017). "Lung cancer - major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual." CA Cancer J Clin **67**(2): 138-155.
- 202) Ranson, M., N. Davidson, M. Nicolson, S. Falk, J. Carmichael, P. Lopez, H. Anderson, N. Gustafson, A. Jeynes, G. Gallant, T. Washington and N. Thatcher (2000). "Randomized trial of paclitaxel plus supportive care versus supportive care for patients with advanced non-small-cell lung cancer." J Natl Cancer Inst **92**(13): 1074-1080.
- 203) Ridge, C. A., A. M. McErlean and M. S. Ginsberg (2013). "Epidemiology of lung cancer." Semin Intervent Radiol **30**(2): 93-98.
- 204) Ruoslahti, E. (2002). "Specialization of tumour vasculature." Nat Rev Cancer **2**(2): 83-90.
- 205) Rusch, V. W., D. J. Giroux, M. J. Kraut, J. Crowley, M. Hazuka, T. Winton, D. H. Johnson, L. Shulman, F. Shepherd, C. Deschamps, R. B. Livingston and D. Gandara (2007). "Induction chemoradiation and surgical resection for superior sulcus non-small-cell lung carcinomas: long-term results of Southwest Oncology Group Trial 9416 (Intergroup Trial 0160)." J Clin Oncol **25**(3): 313-318.

BIBLIOGRAFÍA

- 206) Sadat Tabatabaei Mirakabad, F., K. Nejati-Koshki, A. Akbarzadeh, M. R. Yamchi, M. Milani, N. Zarghami, V. Zeighamian, A. Rahimzadeh, S. Alimohammadi, Y. Hanifehpour and S. W. Joo (2014). "PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems." Asian Pac J Cancer Prev **15**(2): 517-535.
- 207) Sahoo, S. K. and V. Labhasetwar (2005). "Enhanced antiproliferative activity of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles is mediated via sustained intracellular drug retention." Mol Pharm **2**(5): 373-383.
- 208) Saito, G., J. A. Swanson and K. D. Lee (2003). "Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities." Adv Drug Deliv Rev **55**(2): 199-215.
- 209) Santhosh, P. B. and N. P. Ulrich (2013). "Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles: promising tools in cancer theranostics." Cancer Lett **336**(1): 8-17.
- 210) Sato, M., D. S. Shames, A. F. Gazdar and J. D. Minna (2007). "A translational view of the molecular pathogenesis of lung cancer." J Thorac Oncol **2**(4): 327-343.
- 211) Schafer, M. and S. Werner (2008). "Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(8): 628-638.
- 212) Schwartz, A. G. and M. L. Cote (2016). "Epidemiology of Lung Cancer." Adv Exp Med Biol **893**: 21-41.
- 213) Sher, T., G. K. Dy and A. A. Adjei (2008). "Small cell lung cancer." Mayo Clin Proc **83**(3): 355-367.
- 214) Shi, J., P. W. Kantoff, R. Wooster and O. C. Farokhzad (2017). "Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities." Nat Rev Cancer **17**(1): 20-37.
- 215) Shi, K., Y. Long, C. Xu, Y. Wang, Y. Qiu, Q. Yu, Y. Liu, Q. Zhang, H. Gao, Z. Zhang and Q. He (2015). "Liposomes Combined an Integrin $\alpha v \beta 3$ -Specific Vector with pH-Responsible Cell-Penetrating Property for Highly Effective Antiglioma Therapy through the Blood-Brain Barrier." ACS Appl Mater Interfaces **7**(38): 21442-21454.
- 216) Singh, A. and J. Settleman (2010). "EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer." Oncogene **29**(34): 4741-4751.
- 217) Slingerland, M., H. J. Guchelaar and H. Gelderblom (2012). "Liposomal drug formulations in cancer therapy: 15 years along the road." Drug Discov Today **17**(3-4): 160-166.
- 218) Slingerland, M., H. J. Guchelaar, H. Rosing, M. E. Scheulen, L. J. van Warmerdam, J. H. Beijnen and H. Gelderblom (2013). "Bioequivalence of Liposome-Entrapped Paclitaxel Easy-To-Use (LEP-ETU) formulation and paclitaxel in polyethoxylated castor oil: a randomized, two-period crossover study in patients with advanced cancer." Clin Ther **35**(12): 1946-1954.

- 219) Slotman, B. J., H. van Tinteren, J. O. Praag, J. L. Kneijens, S. Y. El Sharouni, M. Hatton, A. Keijser, C. Faivre-Finn and S. Senan (2015). "Use of thoracic radiotherapy for extensive stage small-cell lung cancer: a phase 3 randomised controlled trial." Lancet **385**(9962): 36-42.
- 220) Sociedad Española de Oncología Médica, S. E. O. M. (2018). "Las cifras del cáncer en España 2018." Retrieved February 2018, from https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Las_Cifras_del_cancer_en_Espana2018.pdf.
- 221) Socinski, M. A., I. Bondarenko, N. A. Karaseva, A. M. Makhson, I. Vynnychenko, I. Okamoto, J. K. Hon, V. Hirsh, P. Bhar, H. Zhang, J. L. Iglesias and M. F. Renschler (2012). "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 **30**(17): 2055-2062.
- 222) Sparreboom, A., O. van Tellingen, W. J. Nooijen and J. H. Beijnen (1996). "Nonlinear pharmacokinetics of paclitaxel in mice results from the pharmaceutical vehicle Cremophor EL." Cancer Res **56**(9): 2112-2115.
- 223) Stage, T. B., T. K. Bergmann and D. L. Kroetz (2018). "Clinical Pharmacokinetics of Paclitaxel Monotherapy: An Updated Literature Review." Clin Pharmacokinet **57**(1): 7-19.
- 224) Steinestel, K., S. Eder, A. J. Schrader and J. Steinestel (2014). "Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition." Clin Transl Med **3**: 17.
- 225) Su, X., D. Chakravarti, M. S. Cho, L. Liu, Y. J. Gi, Y. L. Lin, M. L. Leung, A. El-Naggar, C. J. Creighton, M. B. Suraokar, I. Wistuba and E. R. Flores (2010). "TAp63 suppresses metastasis through coordinate regulation of Dicer and miRNAs." Nature **467**(7318): 986-990.
- 226) Su, Z., L. Xing, Y. Chen, Y. Xu, F. Yang, C. Zhang, Q. Ping and Y. Xiao (2014). "Lactoferrin-modified poly(ethylene glycol)-grafted BSA nanoparticles as a dual-targeting carrier for treating brain gliomas." Mol Pharm **11**(6): 1823-1834.
- 227) Sun, L., Q. Wu, F. Peng, L. Liu and C. Gong (2015). "Strategies of polymeric nanoparticles for enhanced internalization in cancer therapy." Colloids Surf B Biointerfaces **135**: 56-72.
- 228) Sun, X., Y. Chen, H. Zhao, G. Qiao, M. Liu, C. Zhang, D. Cui and L. Ma (2018). "Dual-modified cationic liposomes loaded with paclitaxel and survivin siRNA for targeted imaging and therapy of cancer stem cells in brain glioma." Drug Deliv **25**(1): 1718-1727.
- 229) Sun, Y., B. Yu, G. Wang, Y. Wu, X. Zhang, Y. Chen, S. Tang, Y. Yuan, R. J. Lee, L. Teng and S. Xu (2014). "Enhanced antitumor efficacy of vitamin E TPGS-emulsified PLGA nanoparticles for delivery of paclitaxel." Colloids Surf B Biointerfaces **123**: 716-723.

BIBLIOGRAFÍA

- 230) Surapaneni, M. S., S. K. Das and N. G. Das (2012). "Designing Paclitaxel drug delivery systems aimed at improved patient outcomes: current status and challenges." ISRN Pharmacol **2012**: 623139.
- 231) Swaminathan, S. K., E. Roger, U. Toti, L. Niu, J. R. Ohlfest and J. Panyam (2013). "CD133-targeted paclitaxel delivery inhibits local tumor recurrence in a mouse model of breast cancer." J Control Release **171**(3): 280-287.
- 232) Takahashi, H., H. Ogata, R. Nishigaki, D. H. Broide and M. Karin (2010). "Tobacco smoke promotes lung tumorigenesis by triggering IKKbeta- and JNK1-dependent inflammation." Cancer Cell **17**(1): 89-97.
- 233) Talbot, L. J., S. D. Bhattacharya and P. C. Kuo (2012). "Epithelial-mesenchymal transition, the tumor microenvironment, and metastatic behavior of epithelial malignancies." Int J Biochem Mol Biol **3**(2): 117-136.
- 234) Tapeinos, C., M. Battaglini and G. Ciofani (2017). "Advances in the design of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for targeting brain diseases." J Control Release **264**: 306-332.
- 235) Thipparaboina, R., R. B. Chavan, D. Kumar, S. Modugula and N. R. Shastri (2015). "Micellar carriers for the delivery of multiple therapeutic agents." Colloids Surf B Biointerfaces **135**: 291-308.
- 236) Tietze, R., J. Zaloga, H. Unterweger, S. Lyer, R. P. Friedrich, C. Janko, M. Pottler, S. Durr and C. Alexiou (2015). "Magnetic nanoparticle-based drug delivery for cancer therapy." Biochem Biophys Res Commun **468**(3): 463-470.
- 237) Timmerman, R., R. Paulus, J. Galvin, J. Michalski, W. Straube, J. Bradley, A. Fakiris, A. Bezjak, G. Videtic, D. Johnstone, J. Fowler, E. Gore and H. Choy (2010). "Stereotactic body radiation therapy for inoperable early stage lung cancer." JAMA **303**(11): 1070-1076.
- 238) Tran, P. H., T. T. Tran and B. J. Lee (2014). "Biodistribution and pharmacokinetics in rats and antitumor effect in various types of tumor-bearing mice of novel self-assembled gelatin-oleic acid nanoparticles containing paclitaxel." J Biomed Nanotechnol **10**(1): 154-165.
- 239) Tran, S., P. J. DeGiovanni, B. Piel and P. Rai (2017). "Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery." Clin Transl Med **6**(1): 44.
- 240) Travis, W. D., E. Brambilla, M. Noguchi, A. G. Nicholson, K. R. Geisinger, Y. Yatabe, D. G. Beer, C. A. Powell, G. J. Riely, P. E. Van Schil, K. Garg, J. H. Austin, H. Asamura, V. W. Rusch, F. R. Hirsch, G. Scagliotti, T. Mitsudomi, R. M. Huber, Y. Ishikawa, J. Jett, M. Sanchez-Cespedes, J. P. Sculier, T. Takahashi, M. Tsuboi, J. Vansteenkiste, I. Wistuba, P. C. Yang, D. Aberle, C. Brambilla, D. Flieder, W. Franklin, A. Gazdar, M. Gould, P. Hasleton, D. Henderson, B. Johnson, D. Johnson, K. Kerr, K. Kuriyama, J. S. Lee, V. A. Miller, I. Petersen, V. Roggli, R. Rosell, N. Saijo, E. Thunnissen, M. Tsao and D. Yankelwitz (2011). "International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society

- international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma." J Thorac Oncol **6**(2): 244-285.
- 241) Truong, N. P., M. R. Whittaker, C. W. Mak and T. P. Davis (2015). "The importance of nanoparticle shape in cancer drug delivery." Expert Opin Drug Deliv **12**(1): 129-142.
- 242) Tuguntaev, R. G., C. I. Okeke, J. Xu, C. Li, P. C. Wang and X. J. Liang (2016). "Nanoscale Polymersomes as Anti-Cancer Drug Carriers Applied for Pharmaceutical Delivery." Curr Pharm Des **22**(19): 2857-2865.
- 243) Turner, M. C., Y. Chen, D. Krewski, E. E. Calle and M. J. Thun (2007). "Chronic obstructive pulmonary disease is associated with lung cancer mortality in a prospective study of never smokers." Am J Respir Crit Care Med **176**(3): 285-290.
- 244) Videtic, G. M., L. W. Stitt, A. R. Dar, W. I. Kocha, A. T. Tomiak, P. T. Truong, M. D. Vincent and E. W. Yu (2003). "Continued cigarette smoking by patients receiving concurrent chemoradiotherapy for limited-stage small-cell lung cancer is associated with decreased survival." J Clin Oncol **21**(8): 1544-1549.
- 245) Vieira, D. B. and L. F. Gamarra (2016). "Getting into the brain: liposome-based strategies for effective drug delivery across the blood-brain barrier." Int J Nanomedicine **11**: 5381-5414.
- 246) Villegas, C. A. R., D. M. (2015). "Las células Treg en la inmunomodulación e inflamación asociada al cáncer." Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM **58**(6): 5-17.
- 247) Vivek, R., R. Thangam, V. NipunBabu, C. Rejeeth, S. Sivasubramanian, P. Gunasekaran, K. Muthuchelian and S. Kannan (2014). "Multifunctional HER2-antibody conjugated polymeric nanocarrier-based drug delivery system for multi-drug-resistant breast cancer therapy." ACS Appl Mater Interfaces **6**(9): 6469-6480.
- 248) Von Hoff, D. D., M. M. Mita, R. K. Ramanathan, G. J. Weiss, A. C. Mita, P. M. LoRusso, H. A. Burris, 3rd, L. L. Hart, S. C. Low, D. M. Parsons, S. E. Zale, J. M. Summa, H. Youssoufian and J. C. Sachdev (2016). "Phase I Study of PSMA-Targeted Docetaxel-Containing Nanoparticle BIND-014 in Patients with Advanced Solid Tumors." Clin Cancer Res **22**(13): 3157-3163.
- 249) Von Roemeling, C., W. Jiang, C. K. Chan, I. L. Weissman and B. Y. S. Kim (2017). "Breaking Down the Barriers to Precision Cancer Nanomedicine." Trends Biotechnol **35**(2): 159-171.
- 250) Wang, F., Y. Shen, X. Xu, L. Lv, Y. Li, J. Liu, M. Li, A. Guo, S. Guo and F. Jin (2013). "Selective tissue distribution and long circulation endowed by paclitaxel loaded PEGylated poly(epsilon-caprolactone-co-L-lactide) micelles leading to improved anti-tumor effects and low systematic toxicity." Int J Pharm **456**(1): 101-112.
- 251) Wang, H., P. Agarwal, S. Zhao, R. X. Xu, J. Yu, X. Lu and X. He (2015). "Hyaluronic acid-decorated dual responsive nanoparticles of Pluronic F127, PLGA, and chitosan for targeted co-delivery of doxorubicin and irinotecan to eliminate cancer stem-like cells." Biomaterials **72**: 74-89.

BIBLIOGRAFÍA

- 252) Wang, X., Y. Wang, Z. G. Chen and D. M. Shin (2009). "Advances of cancer therapy by nanotechnology." Cancer Res Treat **41**(1): 1-11.
- 253) Wang, Y. X. (2011). "Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application." Quant Imaging Med Surg **1**(1): 35-40.
- 254) Warburg, O. (1956). "On respiratory impairment in cancer cells." Science **124**(3215): 269-270.
- 255) Warde, P. and D. Payne (1992). "Does thoracic irradiation improve survival and local control in limited-stage small-cell carcinoma of the lung? A meta-analysis." J Clin Oncol **10**(6): 890-895.
- 256) Weaver, B. A. (2014). "How Taxol/paclitaxel kills cancer cells." Mol Biol Cell **25**(18): 2677-2681.
- 257) Weiszhar, Z., J. Czucz, C. Revesz, L. Rosivall, J. Szebeni and Z. Rozsnyay (2012). "Complement activation by polyethoxylated pharmaceutical surfactants: Cremophor-EL, Tween-80 and Tween-20." Eur J Pharm Sci **45**(4): 492-498.
- 258) Wicki, A., D. Witzigmann, V. Balasubramanian and J. Huwyler (2015). "Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications." J Control Release **200**: 138-157.
- 259) Wong, H. L., R. Bendayan, A. M. Rauth, H. Y. Xue, K. Babakhanian and X. Y. Wu (2006). "A mechanistic study of enhanced doxorubicin uptake and retention in multidrug resistant breast cancer cells using a polymer-lipid hybrid nanoparticle system." J Pharmacol Exp Ther **317**(3): 1372-1381.
- 260) Wong, H. L., A. M. Rauth, R. Bendayan and X. Y. Wu (2007). "In vivo evaluation of a new polymer-lipid hybrid nanoparticle (PLN) formulation of doxorubicin in a murine solid tumor model." Eur J Pharm Biopharm **65**(3): 300-308.
- 261) Woodcock, D. M., S. Jefferson, M. E. Linsenmeyer, P. J. Crowther, G. M. Chojnowski, B. Williams and I. Bertocello (1990). "Reversal of the multidrug resistance phenotype with cremophor EL, a common vehicle for water-insoluble vitamins and drugs." Cancer Res **50**(14): 4199-4203.
- 262) World Health Organization, W. H. O. (2017). "The top 10 causes of death." Retrieved Feb 2018, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/>.
- 263) Wu, J., A. Lee, Y. Lu and R. J. Lee (2007). "Vascular targeting of doxorubicin using cationic liposomes." Int J Pharm **337**(1-2): 329-335.
- 264) Xin, H., X. Jiang, J. Gu, X. Sha, L. Chen, K. Law, Y. Chen, X. Wang, Y. Jiang and X. Fang (2011). "Angiopep-conjugated poly(ethylene glycol)-co-poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles as dual-targeting drug delivery system for brain glioma." Biomaterials **32**(18): 4293-4305.

- 265) Xu, G., H. Shi, L. Ren, H. Gou, D. Gong, X. Gao and N. Huang (2015). "Enhancing the anti-colon cancer activity of quercetin by self-assembled micelles." Int J Nanomedicine **10**: 2051-2063.
- 266) Yamashita, Y., N. Egashira, K. Masuguchi, S. Ushio, T. Kawashiri and R. Oishi (2011). "Comparison of peripheral neuropathy induced by standard and nanoparticle albumin-bound paclitaxel in rats." J Pharmacol Sci **117**(2): 116-120.
- 267) Yang, H. W., Y. J. Lu, K. J. Lin, S. C. Hsu, C. Y. Huang, S. H. She, H. L. Liu, C. W. Lin, M. C. Xiao, S. P. Wey, P. Y. Chen, T. C. Yen, K. C. Wei and C. C. Ma (2013). "EGRF conjugated PEGylated nanographene oxide for targeted chemotherapy and photothermal therapy." Biomaterials **34**(29): 7204-7214.
- 268) Yang, Q., T. Zhang, C. Wang, J. Jiao, J. Li and Y. Deng (2014). "Coencapsulation of epirubicin and metformin in PEGylated liposomes inhibits the recurrence of murine sarcoma S180 existing CD133+ cancer stem-like cells." Eur J Pharm Biopharm **88**(3): 737-745.
- 269) Yang, T., F. D. Cui, M. K. Choi, J. W. Cho, S. J. Chung, C. K. Shim and D. D. Kim (2007). "Enhanced solubility and stability of PEGylated liposomal paclitaxel: in vitro and in vivo evaluation." Int J Pharm **338**(1-2): 317-326.
- 270) Yang, W., Y. Xia, Y. Fang, F. Meng, J. Zhang, R. Cheng, C. Deng and Z. Zhong (2018). "Selective Cell Penetrating Peptide-Functionalized Polymersomes Mediate Efficient and Targeted Delivery of Methotrexate Disodium to Human Lung Cancer In Vivo." Adv Healthc Mater **7**(7): e1701135.
- 271) Yang, W., L. Yang, Y. Xia, L. Cheng, J. Zhang, F. Meng, J. Yuan and Z. Zhong (2018). "Lung cancer specific and reduction-responsive chimaeric polymersomes for highly efficient loading of pemetrexed and targeted suppression of lung tumor in vivo." Acta Biomater **70**: 177-185.
- 272) Yao, S., L. Li, X. T. Su, K. Wang, Z. J. Lu, C. Z. Yuan, J. B. Feng, S. Yan, B. H. Kong and K. Song (2018). "Development and evaluation of novel tumor-targeting paclitaxel-loaded nano-carriers for ovarian cancer treatment: in vitro and in vivo." J Exp Clin Cancer Res **37**(1): 29.
- 273) Yoon, H. Y., H. Koo, K. Y. Choi, I. Chan Kwon, K. Choi, J. H. Park and K. Kim (2013). "Photo-crosslinked hyaluronic acid nanoparticles with improved stability for in vivo tumor-targeted drug delivery." Biomaterials **34**(21): 5273-5280.
- 274) Yu, G., Q. Ning, Z. Mo and S. Tang (2019). "Intelligent polymeric micelles for multidrug co-delivery and cancer therapy." Artif Cells Nanomed Biotechnol **47**(1): 1476-1487.
- 275) Yu, M. and J. Zheng (2015). "Clearance Pathways and Tumor Targeting of Imaging Nanoparticles." ACS Nano **9**(7): 6655-6674.
- 276) Yuan, X., W. Ji, S. Chen, Y. Bao, S. Tan, S. Lu, K. Wu and Q. Chu (2016). "A novel paclitaxel-loaded poly(d,l-lactide-co-glycolide)-Tween 80 copolymer nanoparticle

- overcoming multidrug resistance for lung cancer treatment." Int J Nanomedicine **11**: 2119-2131.
- 277) Zakowski, M. F. (2003). "Pathology of small cell carcinoma of the lung." Semin Oncol **30**(1): 3-8.
- 278) Zappa, C. and S. A. Mousa (2016). "Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances." Transl Lung Cancer Res **5**(3): 288-300.
- 279) Zhang, C., L. Zhao, Y. Dong, X. Zhang, J. Lin and Z. Chen (2010). "Folate-mediated poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyoctanoate) nanoparticles for targeting drug delivery." Eur J Pharm Biopharm **76**(1): 10-16.
- 280) Zhang, H. and P. M. Dougherty (2014). "Enhanced excitability of primary sensory neurons and altered gene expression of neuronal ion channels in dorsal root ganglion in paclitaxel-induced peripheral neuropathy." Anesthesiology **120**(6): 1463-1475.
- 281) Zhang, X., Y. Lou, X. Zheng, H. Wang, J. Sun, Q. Dong and B. Han (2015). "Wnt blockers inhibit the proliferation of lung cancer stem cells." Drug Des Devel Ther **9**: 2399-2407.
- 282) 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.
- 283) Zhao, C., S. Setrerrahmane and H. Xu (2015). "Enrichment and characterization of cancer stem cells from a human non-small cell lung cancer cell line." Oncol Rep **34**(4): 2126-2132.
- 284) Zhao, M., C. Lei, Y. Yang, X. Bu, H. Ma, H. Gong, J. Liu, X. Fang, Z. Hu and Q. Fang (2015). "Abraxane, the Nanoparticle Formulation of Paclitaxel Can Induce Drug Resistance by Up-Regulation of P-gp." PLoS One **10**(7): e0131429.
- 285) Zhao, Y., E. B. Butler and M. Tan (2013). "Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics." Cell Death Dis **4**: e532.
- 286) Zhong, Y., F. Meng, C. Deng and Z. Zhong (2014). "Ligand-directed active tumor-targeting polymeric nanoparticles for cancer chemotherapy." Biomacromolecules **15**(6): 1955-1969.
- 287) Zhou, J., M. Sun, S. Jin, L. Fan, W. Zhu, X. Sui, L. Cao, C. Yang and C. Han (2019). "Combined using of paclitaxel and salinomycin active targeting nanostructured lipid carriers against non-small cell lung cancer and cancer stem cells." Drug Deliv **26**(1): 281-289.
- 288) Zugazagoitia, J., A. B. Enguita, J. A. Nunez, L. Iglesias and S. Ponce (2014). "The new IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification from a clinical perspective: current concepts and future prospects." J Thorac Dis **6**(Suppl 5): S526-536.

