



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO:
NOVEDADES EN EL USO DE LOS
ANTITUMORALES DE PLATINO

Autor: Esther Alonso Gil

Fecha: Junio de 2019

Tutor: Antonio Luis Doadrio Villarejo

Tabla de contenido

1. ABSTRACT	- 2 -
2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	- 2 -
3. OBJETIVOS	- 7 -
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	- 7 -
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 7 -
5.1. Procedimiento de obtención de las nanopartículas de sílice mesoporosa (MCM-41)...	- 9 -
5.2. Funcionalización de las MNP's	- 10 -
5.3. Entrada de los compuestos de platino en la nanopartícula	- 11 -
5.4. Dirección específica e introducción del fármaco en el interior celular.....	- 12 -
5.5. Liberación del fármaco	- 14 -
5.6. Sistemas para modular la liberación de fármacos - nanopuertas:.....	- 15 -
5.7. Limitaciones de las nanopartículas:.....	- 17 -
6. CONCLUSIÓN.....	- 18 -
7. BIBLIOGRAFÍA	- 19 -

1. ABSTRACT

Los antitumorales de platino son un grupo farmacológico de uso clínico debido a sus grandes propiedades anticancerígenas. Sin embargo, se trata de un grupo de moléculas con efectos adversos debido a su mecanismo de acción y su poca especificidad por las células tumorales, ya que generan toxicidad sistémica (nefrotoxicidad, mielosupresión y neurotoxicidad) y la seguridad del tratamiento se ve afectada. Además, existen distintos tipos de tumores que adquieren o desarrollan resistencia a estos fármacos, por lo que su uso se verá impedido.

Para solventar gran parte de estos problemas, aumentar la especificidad, facilidad, eficacia, efectividad y seguridad del tratamiento, así como para modular la liberación en el lugar idóneo, se han realizado una serie de novedades basadas en los transportadores de nanopartículas. Estas moléculas son compuestos inorgánicos de sílice con una estructura específica que, tras su funcionalización, son cargadas con los antitumorales de platino y los protegen de la degradación, inhiben la liberación prematura en la circulación sistémica, controlan la farmacocinética y distribución en el tejido tumoral e incrementan la penetración del fármaco celular.

En esta revisión, se analizarán los nuevos procesos de síntesis y preparación de nanotransportadores de sílice, su funcionalización, modulación, especificidad, entrada y cinética de la liberación del cisplatino en las nanopartículas.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La quimioterapia se basa en el uso de drogas citotóxicas para el tratamiento de tumores con el fin de conseguir la reducción o eliminación del tumor, impedir el desarrollo del mismo, enlentecer la progresión de la enfermedad y/o evitar o controlar la posible metástasis. Se utilizan distintos grupos farmacoterapéuticos, sin embargo, todos presentan una serie de efectos adversos graves. Esto, es debido a que los antitumorales utilizados, no son específicos y producen daño y muerte celular en distintos tejidos a parte de las células tumorales.

Los compuestos antitumorales basados en el platino han sido fármacos utilizados durante décadas para el tratamiento de tumores sólidos. Se descubrieron por casualidad al utilizar unos electrodos de platino en una investigación sobre la división celular. Inicialmente se identificaron el **cis-platino** (1a) y el cis-diaminatetracloroplatino (IV) y posteriormente el cis diamindicloroplatino (II). Los primeros ensayos clínicos se realizaron en 1971 y en 1978, tras los cuales, la FDA aprobó su uso. Se observó que producía nefrotoxicidad muy severa, ototoxicidad, neurotoxicidad, daño gastrointestinal, vómitos, náuseas y caída de cabello.

Además, se descubrió que las células tumorales poseían resistencia a los tratamientos con cisplatino, tanto tras una serie de ciclos (en cáncer de ovario) como por un tipo de resistencia intrínseca (en el cáncer colonrectal).

Tiempo después, se intentó eliminar o disminuir la nefrotoxicidad impredecible y severa que generaba, para hacer una terapia más segura y sin resistencias, por este motivo, se investigaron segundas y terceras generaciones de antitumorales de platino.

Uno de ellos es el **carboplatino** (1b), un fármaco de base platino que disminuye la toxicidad sin disminuir la eficacia antitumoral porque presenta grupos más estables que el cloro. Se aprobó en 1989 y es un anticancerígeno que genera aductos en el DNA de forma más lenta. Aun así, el carboplatino produce mielosupresión (trombocitopenia), que es un efecto adverso severo.

Otro de ellos, y posiblemente el fármaco más utilizado actualmente, es el **oxaliplatino** (1c). Se trata de un fármaco que es más soluble en agua cuya acumulación se ve menos influenciada por el transportador CRT-1, lo que aumenta su concentración en el interior celular y disminuye las posibles resistencias al mismo. Además, el sistema de reconocimiento de fallos en el DNA no detecta los aductos formados por este fármaco por lo que es más eficaz en la parada del ciclo celular y por tanto en el tratamiento de los tumores, ya que se evita el reconocimiento del DNA dañado y se produce la muerte de las células. Se ha observado que es más eficaz y es utilizado en determinados cánceres que presentan resistencia al cisplatino y carboplatino, como los cánceres de colón.

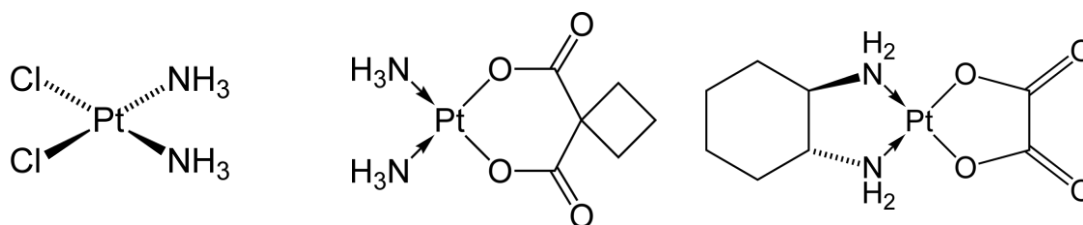


Fig. 1. A. Cisplatino, B. Carboxiplatino y C. Oxaliplatino, de izquierda a derecha.

Los fármacos antitumorales de platino son comúnmente utilizados como primera línea en los cánceres de ovario, cervix, testículos, vejiga, próstata, esófago, pulmón, linfomas no Hodgkin, cabeza y cuello (cervical). (Dhar, Kolishetti, Lippard, & Farokhzad, 2011). Como segunda línea, el cisplatino se utiliza en cánceres en estado avanzado de páncreas, hígado, riñón, glioblastoma y melanoma. (Khati et al., 2011)

Sin embargo, el uso en España está regulado por la Agencia Española del Medicamento (AEMPS) y las indicaciones terapéuticas para estos tres fármacos de platino son las siguientes:

- **Cisplatino:** cáncer testicular, de ovario, vejiga, células escamosas de cabeza y cuello, de pulmón microcítico y no microcítico, todos en estado avanzado o metastásico. Además, está indicado en combinación con radioterapia en el tratamiento del carcinoma cervical.
- **Carboxiplatino:** carcinoma avanzado de ovario de origen epitelial, carcinoma pulmonar de células pequeñas (en asociación) y en poliquimioterapia para carcinomas epidermoides avanzados de cabeza y cuello, así como neoadyuvante en el de vejiga invasivo.
- **Oxaliplatino:** se utiliza en una terapia de combinación con 5 fluorouracilo y ácido folínico, conocida como FOLFOX, está indicado para el cáncer de colón en estadio III y colorrectal metastásico.

Mecanismo de acción del cisplatino:

La replicación y transcripción del DNA es esencial para la división celular y la producción de proteínas, por lo que la interrupción de estos procesos conllevará una posible citotoxicidad.

El mecanismo de acción del cisplatino se produce tras su entrada en el interior celular. Dos moléculas de agua se adicionan al cisplatino, eliminando los dos cloros conectados al átomo central de Pt, proceso facilitado por la baja concentración de iones cloro en el interior celular. La forma acuosa de cisplatino es más reactiva, por lo que una vez está sustituido, actúa como aducto de DNA, es decir, su mecanismo de acción es la unión de forma covalente al nitrógeno N7 del anillo imidazólico de las bases púricas (mayoritariamente guanina y excepcionalmente de adenina) del DNA.

La unión se puede producir con N7 de bases contiguas en la misma hebra de ADN (intrahebra) o con una hebra distinta (interhebra). Aproximadamente: 60-65% de los compuestos son intrahebra Guanina – Guanina, 25-35% intrahebra Guanina – Adenina, 5-10% intrahebra Guanina – Nucleótido – Guanina y entre un 1-3% diaductos interhebra Guanina – Guanina (Chaney, Campbell, Bassett, & Wu, 2005).

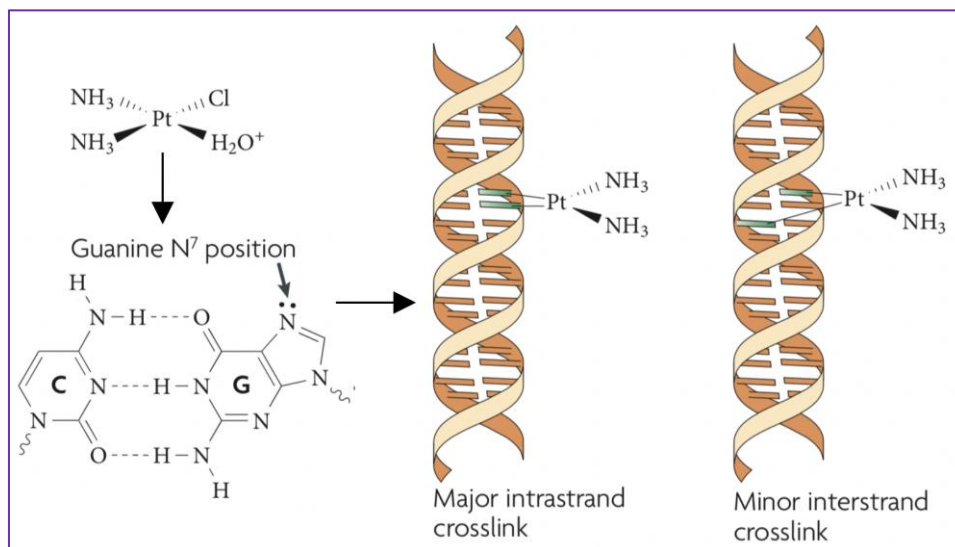


Fig. 2. Mecanismo de acción del cisplatino (Kelland, 2007)

Los efectos que produce la generación de aductos son los siguientes (Jamieson & Lippard, 1999):

- Inhibición de la replicación del DNA, es decir, como no se permite la separación de las dos hebras del DNA necesarias para generar una nueva hebra, se consigue que la célula tumoral no se pueda dividir.
- Inhibición en la transcripción del DNA.
- Daño en las zonas teloméricas del DNA (con 3 guaninas consecutivas que podría aumentar la posibilidad de unión del cisplatino), produciendo un acortamiento del mismo y provocando que la célula entre en senescencia y muera, por lo que también se evitaría que el tumor siguiese dividiéndose.

Es decir, la unión de Pt con el N7 activa señales en las vías de transducción como las que impiden el reconocimiento de daño y reparación del DNA, propiciando la parada del ciclo celular y la apoptosis (muerte celular programada). Además, como se ha comentado, la transcripción y replicación se ven impedidas, ya que no permite la separación de las hebras de ADN (Kelland, 2007).

Es decir, la generación de este tipo de aducto provoca que la célula en la que se ha introducido muera y por tanto consigue evitar la proliferación celular de los tumores.

Mecanismo de resistencia al cisplatino y carboplatino

La resistencia a este tipo de fármacos puede ser de dos tipos: la primera es la resistencia adquirida, generada tras una serie de ciclos con estos fármacos, mientras que la segunda es una resistencia intrínseca que se da en algunos tipos de cánceres e impiden el tratamiento oncológico con platino. Los dos mecanismos por los que se puede producir resistencia son:

- A. Una **reducción de la acumulación de cisplatino en el interior celular**, es decir, no hay suficiente cantidad para generar aductos. Este mecanismo se debe a otros tres mecanismos subyacentes:
 - a. La entrada de platino en la célula, siendo una molécula muy polar, se da por difusión pasiva o utilizando transportadores (como el CTR1 o transportador de Cooper). Si este transportador está disminuido, disminuirá la entrada del fármaco.
 - b. Dentro del citoplasma, las moléculas de cisplatino que ya presentan H₂O reaccionan con metalotionina y glutatión por lo que no llegan a acceder al núcleo y no generarán aductos.
 - c. Existen mecanismos de expulsión del platino, llevados a cabo por receptores ATP7 y MRP2, principalmente .

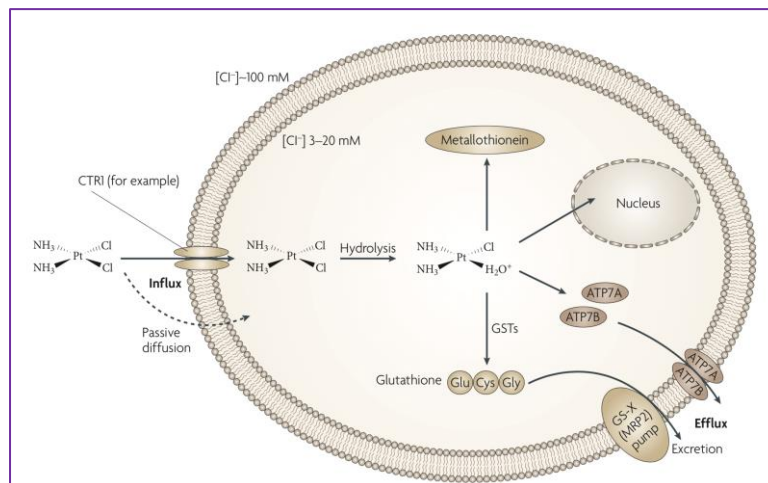


Fig. 3. Resistencia debido a inadecuados niveles de Pt en el DNA(Kelland, 2007)

- B. Se da un fallo, tras la generación del aducto, en el mecanismo que logra que la célula entre en apoptosis. Este mecanismo se puede explicar debido a que la célula presenta una serie de vías que arreglan el daño generado en el DNA, que suelen estar incrementadas en aquellas células con resistencia. Estas vías son la vía NER (reparación

por escisión de nucleótidos) y MMR (errores de inserción, delección e incorrecta incorporación de nucleótidos) entre otras (Li, 2007).

Además, en el estudio Chaney et al. (2005) se observó que la variación en la formación de aductos de cisplatino y carboplatino (aductos en cis) vs. la forma del oxaliplatino (aductos RR-trans) explicaba porque las resistencias se producían sobretodo en los dos primeros fármacos y no tanto en el segundo, lo que ha propiciado que sea el más usado a día de hoy en clínica terapéutica.

Por lo tanto, como se ha visto anteriormente, los fármacos de platino presentan varios inconvenientes. Generan altas toxicidades ya que se administran de forma sistémica y no son específicos por las células tumorales, además pueden generar resistencias. Para ello se han buscado distintas estrategias que permitan solventar estos problemas:

- Formular nuevas y mejores moléculas que contengan platino. Se han creado más de 200 moléculas con núcleo de platino, como pueden ser:
 - o Satraplatino – ofrece la posibilidad de ser usado vía oral y en células con un nivel bajo del transportador CTR-1 (ya que se introduce mejor que el carboplatino).
 - o Picoplatino – debido a que presenta un grupo abultado entorno al centro Pt disminuye la posible inactivación por glutatión o metiltionina, por lo que aumenta el espectro de acción sobre todo en tumores con resistencia adquirida al cisplatino.
- Aumentar la llegada y entrada de los compuestos de Pt en las células.
- Co-administrar el Pt con moduladores que impidan la resistencia.
- **Diseño de transportadores o nanocarriers que vayan cargadas de Pt.**

Esta cuarta y última estrategia será en la que se base este trabajo, ya que, debido a la gran versatilidad de las nanopartículas, se podrían incluir las 3 estrategias anteriores en una sola e incluso añadir nuevas estrategias para lograr mayor seguridad, eficacia y efectividad en el tratamiento de tumores con platino.

Este diseño de transportadores comenzó en 2001 en un estudio acerca de la liberación de ibuprofeno a partir de MCM-41 un tipo de nanopartícula de sílice (Vallet-Regi, Rámila, Del Real, & Pérez-Pariente, 2001).

A partir de ese año, un avance extraordinario en la investigación de la sílice mesoporosa y en la liberación de fármacos, permitió descubrir que se trataba de un material de grandes cualidades y características para que se le introdujeran los fármacos de Pt.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal es analizar las nuevas formas y diseño de nanopartículas que contengan platino como tratamiento antitumoral. Se analizarán las características de este tipo de partículas, las ventajas que presentan respecto a la quimioterapia habitual, la cinética de liberación del fármaco y la funcionalización del exterior y el interior de las nanopartículas.

Todo ello con el objetivo de intentar comprender cómo es posible evitar la toxicidad sistémica y la resistencia a los antitumorales de platino, así como conseguir la disminución de la dosis, permitir nuevas vías de administración (diferentes a las actuales) y modular la liberación del fármaco.

Este trabajo gira entorno al cisplatino debido a que es la molécula más pequeña y la que más se ha utilizado en los estudios científicos, sin embargo, todo podrá ser utilizado también para carboplatino y oxaliplatino.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un trabajo de fin de grado en el que se realiza una revisión bibliográfica acerca del nuevo uso de los antitumorales de platino, concretamente de las nanopartículas o nanotransportadores.

La información se ha recabado a partir de una serie de artículos y estudios recogidos en la bibliografía de este trabajo y sobre todo, se ha basado en la investigación del Dr. Antonio Luis Doadrio Villarejo, acerca del uso de nanopartículas para modular la liberación y salida de un conjunto de fármacos introducidos en una multipíldora.

Además, se han utilizado una serie de programas (Jmol[®], HexLoria[®] y Avogadro[®]) para realizar la simulación de la introducción y unión de los fármacos de platino a las nanopartículas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La sílice mesoporosa será el material utilizado para la fabricación de los transportadores específicos que permitan acceder al platino a las células cancerígenas, evitando la gran citotoxicidad sistémica que produce (nefrotoxicidad, neurotoxicidad y mielosupresión), incrementando la seguridad y eficacia del fármaco durante su administración y consiguiendo evitar las posibles resistencias que se generan ante este grupo de fármacos.

Estos tipos de transportadores deben presentar ciertas características para poder ser utilizados en clínica humana:

1. Ser biocompatibles y biodegradables.
2. Presentar grandes superficies de acumulación del fármaco.
3. Especificidad celular o tisular y la capacidad de dirigirse a la zona deseada, excluyendo la liberación en células no tumorales y a lo largo de todo el organismo.
4. Liberación controlada del fármaco para proporcionar una dosis eficaz y ser capaces de disminuir la misma.

Es, por tanto, muy importante que el transportador del fármaco no se degrade hasta que alcance el destino deseado, ya que la seguridad del fármaco podría verse comprometida, al liberarse altas concentraciones del mismo (Slowing, Vivero-Escoto, Wu, & Lin, 2008).

La sílice mesoporosa es el material que consigue estas características porque tras determinados procesos, se obtiene un material sólido con poros en su estructura (mesoporos) que son capaces de absorber/encapsular grandes cantidades de fármaco. Las ventajas que presentan las nanopartículas de sílice mesoporosa (MSN) son las siguientes:

1. Son partículas de tamaño modificable: entre 50 y 300 nm, permitiendo que, al introducirse en las células animales por endocitosis, la membrana celular no sufra daño.
2. Presentan una alta resistencia a la temperatura, variaciones de pH, estrés mecánico e hidrólisis.
3. Tienen uniformidad en el tamaño de los poros, además de una gran superficie y volumen de poros, lo que permitirá una elevada carga de fármacos.
4. Pueden distinguirse dos superficies funcionales: externa e interna que permite la funcionalización de ambas con diferentes moléculas.
5. Los poros internos (MCM-41) presentan una estructura en 2D hexagonal y no están interconectados entre ellos, lo que permite que cada poro se convierta en un reservorio de fármaco independiente.
6. Son inertes, no tóxicas, biodegradables y biocompatibles.
7. Son fácilmente sintetizables y con una mesoestructura estable.

Por lo tanto, este tipo de estructura será muy útil para integrar fármacos de platino en su interior y ser dirigidas a las células cancerígenas que se quieran tratar, consiguiendo mayor eficacia y seguridad. Disminuyendo, de esta manera, la dosis del fármaco, ya que al estar dirigido y la liberación regulada, con poca dosis se conseguirá el mismo efecto que con una alta dosis administrada de forma sistémica

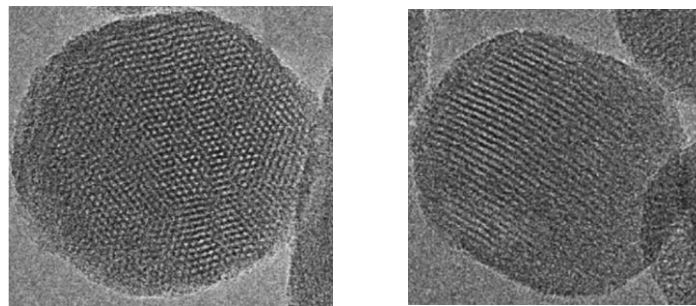


Fig. 4. Imagen de MSN realizadas en un microscopio electrónico de transmisión (Slowing et al., 2008). En la primera imagen desde la izquierda se observa desde un plano paralelo mientras que en la segunda se observa desde un plano perpendicular.

Existen distintos tipos de estructuras, sin embargo, la mayor parte presenta una forma amorfa de sílice con mesoporos ordenados en forma de canales. Por ejemplo, el MCM-41 son moléculas con poros bidimensionales de estructura hexagonal, mientras que el MCM-48 es un tipo de estructura tridimensional cúbica bicontinua, también está el SBA-15, muy similar a MCM-41 pero con poros de mayor tamaño. Por lo tanto, hay una gran variedad de estructuras, aunque este trabajo se centrará en la primera sintetizada, MCM-41.

5.1. Procedimiento de obtención de las nanopartículas de sílice mesoporosa (MCM-41)

Para la obtención de las nanopartículas de sílice, en este caso, se definirá la producción de MCM-41 a partir del estudio realizado *“Mesoporus silica nanoparticles as a new carrier methodology in the controlled release of the active components in a polypill”* (A. L. Doadrio, Sánchez-Montero, Doadrio, Salinas, & Vallet-Regí, 2017).

El procedimiento se realiza como una modificación del método de Stöber (1968) con los siguientes reactivos:

- Tetraetilortosilicato (TEOS) como fuente de sílice.
- Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) como surfactante o tensioactivo catiónico que permite la formación de micelas que sirven de molde para los poros.
- Hidroxido sódico como catalizador básico
- Agua como solvente.

La mezcla de CTAB con agua e hidróxido sódico se calienta a 80°C y 600 r.p.m. Atemperando la mezcla se añade TEOS y se produce una suspensión que debe ser agitada durante 2h a 80°C. Durante este proceso, se llevan a cabo dos reacciones:

1. Hidrolisis del alcoxido, proceso donde se forman grupos silanol.
2. Condensación de los grupos silanol al polimerizar formando enlaces siloxano

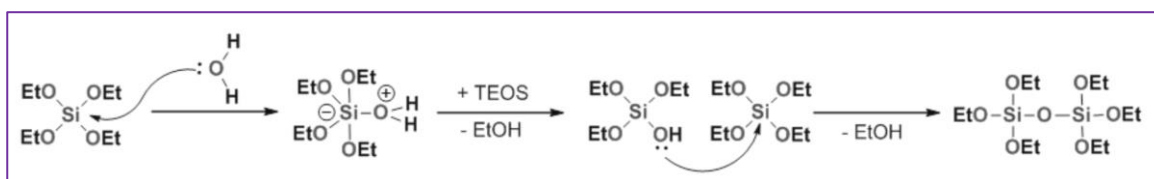


Fig. 5. Mecanismo polimerización (Llinàs & Sánchez-garcía, 2014)

Gracias al surfactante catiónico, las cargas negativas de la sílice son atraídas y se genera una estructura de sílice tubular. Durante este proceso se observa que existe un aumento de la turbidez en la solución-gel, lo que indica que la polimerización está activa y que se está produciendo una evolución de las nanopartículas.

Posteriormente, es necesario eliminar el surfactante del interior de los poros. Se puede utilizar calcinación, alcohol con ácido clorhídrico o con una mezcla de nitrato amónico, etanol y agua. Esta última, fue la utilizada en el proceso de elaboración del estudio anteriormente mencionado. Para ello se filtra y lava con agua, se adiciona NH₄NO₃ en etanol y se termina de lavar 3 veces con etanol y agua (A. L. Doadrio et al., 2017).

Las dimensiones, tipología y la naturaleza química del esqueleto inorgánico de este tipo de moléculas determinan las propiedades fisicoquímicas de estas moléculas. Y éstas, dependen de la fabricación, ya que, se deben realizar protocolos concretos donde la variación en la concentración de surfactante y/o en las condiciones de síntesis como la temperatura, pH y concentraciones pueden modificar la estructura obtenida.

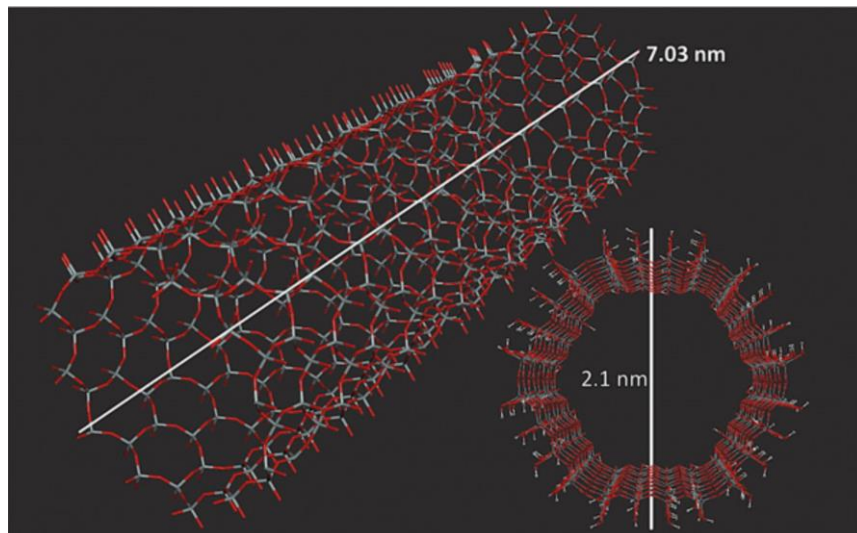


Fig.6. Modelo molecular de MCM-41 con las distancias de diámetro y largo, realizado por A. L. Doadrio et al., 2017.

5.2. Funcionalización de las MNP's

La funcionalización de nanopartículas es la adición tanto a la parte interna como a la externa de grupos funcionales para adquirir unas características concretas que permiten mejorar la unión del fármaco y la posibilidad de regular la liberación del mismo. Normalmente se funcionaliza con:

- Moléculas alquílicas de 8-18 C
- Moléculas inorgánicas como los grupos $-NH_2$ y $-SH$
- Moléculas orgánicas, sobretodo los grupos ácido carboxílico ($-COOH$)
- Moléculas metálicas como el zirconio o titanio (A. L. Doadrio et al., 2017).

La funcionalización provoca una disminución en el diámetro y volumen del poro y aumenta la tortuosidad del mismo. Al modificar el carácter hidrófilo o lipófilo también se puede modificar el tipo de fármaco que se va a introducir en la matriz.

Para permitir que las nanopartículas sean funcionales, se pueden modificar la superficie por tres métodos distintos:

- Co-condensación
- Adición de grafito "grafting"
- Formulación de una capa que recubra la nanopartícula.

Además, existe una funcionalización regioselectiva que permite distinguir la zona externa de la interna (poros), por lo que se conseguiría añadir distintos grupos funcionales en una misma nanopartícula (Wan, Zhang, & Liu, 2011).

Se pueden utilizar elementos anclados de forma reversible en la superficie de la MSN que mejoren la selectividad (uso de anticuerpos en la superficie) o la biodisponibilidad (uso de polímeros catiónicos que permitan cruzar membranas citoplasmáticas y que el platino se introduzca en la células de manera más efectiva) o incluso que localicen dónde se encuentra la nanopartícula para estimularla específicamente en el tejido deseado, de forma externa y

que se produzca la apertura de las puertas de salida del fármaco que se le pueden adicionar, como se explicará más adelante (Llinàs & Sánchez-garcía, 2014).

Se deben, por tanto, realizar otros ajustes y modificaciones en las MSN para modular la salida del fármaco en la localización deseada.

5.3. Entrada de los compuestos de platino en la nanopartícula

La entrada del antitumoral en la nanopartícula, se realiza con una disolución de cisplatino en la que se introducen las nanopartículas de MCM-41 previamente fabricadas y se mantienen 24h a 37°C. Posteriormente se filtran, lavan con agua y se dejan secar. Este proceso está cuantificado mediante espectroscopia UV-visible.

Los factores que influyen en la entrada son:

- Tamaño de poro: debido a que los antitumorales de platino son moléculas pequeñas el MCM-41 es una buena elección, aun así, el hecho de que la droga pueda acceder no implica necesariamente que suceda, ya que existen factores que incapacitan la entrada del fármaco en los canales de la matriz.
- Superficie: a mayor superficie, mayor es el contacto del fármaco en la pared interna del mesoporo, y por lo tanto mayor es la interacción y unión del mismo. Esto produce que la liberación del fármaco sea más lenta que en aquellos con superficies más pequeñas.
- Volumen del poro: determina el espacio efectivo para cargar fármaco.
- Tortuosidad de los canales: cuanto más tortuosos más difícil será para el fármaco escapar de la nanopartícula, por lo que disminuirá la velocidad de liberación del mismo. Sin embargo, se ha comprobado que este factor no modifica tanto la velocidad de liberación.
- Fuerzas electrostáticas: este punto es el más importante. Debido a las fuerzas electrostáticas las moléculas se unen a las nanopartículas. La superficie interna del MCM-41 está cargada negativamente antes de añadirle la funcionalización. Si las cargas del fármaco fuesen positivas o parcialmente positivas quedaría fijado fuertemente. Sin embargo, si el fármaco presentase cargas negativas, se podría dar el fenómeno de repulsión y que el fármaco no se introdujese en la MSN.
- Coeficiente de reparto.
- Otro tipo de factores son la hidrofilia de la matriz y el pH, temperatura y presión a los que se introduzca el fármaco, así como el tipo de sílice que se utilice en la construcción de la partícula.

El cisplatino, es una molécula de 0,5nm, por lo que el tamaño del poro no influirá en exceso, sin embargo, en este trabajo se definirá la utilización de MCM-41 con un tamaño de poro de entre 2-50nm cargado negativamente. En el cisplatino, el ion de platino (II) tiene dos enlaces permanentes con dos grupos amino y otros dos con dos moléculas de cloro (este enlace es mucho más lábil que el anterior y forma parte del mecanismo).

Mediante una simulación realizada por el Dr. Antonio Luis Doadrio Villarejo, conocida como docking molecular, se observó que entre el cisplatino y el MCM-41 se produjeron enlaces por puentes de Hidrogeno (con N, Si y O) y enlaces Pt-Si.

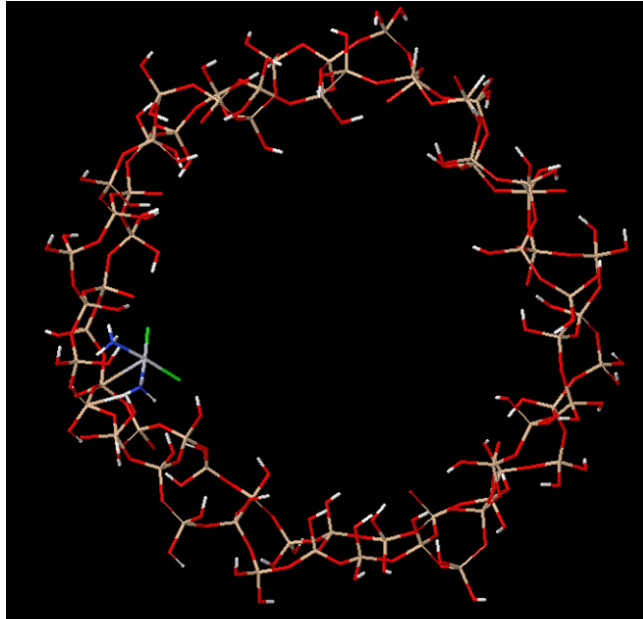


Fig. 7. Poro de MCM-41 cargado de cisplatino

En la imagen (7), se observa un montaje de uno de los poros de MCM-41 de forma reducida, en la esquina inferior izquierda se observa la molécula de cisplatino unida a la matriz, dónde el platino corresponde al color gris, los grupos verdes son los dos cloros y los dos nitrógenos están representado por el color azul.

5.4. Dirección específica e introducción del fármaco en el interior celular

Una vez administrado el fármaco por vía oral (una de las ventajas de usar nanopartículas), idealmente, debería alcanzar el tejido tumoral para el cual ha sido diseñado y actuar sobre el mismo, y no en la circulación sanguínea. Una vez alcanzada la zona, debería dañar selectivamente las células tumorales sin afectar a las normales. Al producir nanopartículas funcionalizadas se puede lograr esta especificidad de la quimioterapia.

Para ello, las nanopartículas deben poder mantenerse estables en la circulación sin ser degradadas ni eliminadas por el hígado, para ello se realiza la funcionalización con grupos pegilados. Además, no deben ser ni demasiado grandes (evita la captura por los macrófagos) ni demasiado pequeñas (para poder evitar la rápida salida de los capilares sanguíneos). Se dan entonces dos mecanismos por los que las nanopartículas pueden ser dirigidas a células específicas, una pasiva y otra activa.

La **forma pasiva** se debe a que los tumores presentan unas características fisiopatológicas concretas, lo que puede permitir la acumulación del fármaco en los tejidos tumorales.

Se produce un aumento de la permeabilidad y retención de los fármacos, ya que, al ser células de rápido crecimiento, necesitan más vascularización (neovascularización) para obtener oxígeno y nutrientes. Se genera una descompensación de los sistemas angiogénicos, se elevan los factores de crecimiento y las metaloproteinasas y se produce una gran cantidad de poros, lo que compromete al drenaje linfático.

A su vez, los tumores presentan un microambiente distinto al de las células no tumorales, son más ácidos debido a que utilizan la glicolisis para producir energía extra debido a la necesidad de rápido crecimiento, lo que permitirá utilizar moduladores de pH para que se liberen en el tumor. Además, suelen expresar enzimas distintas o más abundantes que las que tienen las células no tumorales, por lo que también se puede modular la liberación específica mediante la cobertura con enzimas de los poros de las nanopartículas.

La forma **activa** es aquella en la que mediante la modificación de la superficie de la nanopartícula se hace más selectiva a distintos factores de los tumores, como por ejemplo aquellos involucrados con el receptor de folatos, los aptámeros, la transferrina y las lecitinas.

Las células tumorales presentan una mayor expresión para el receptor de folatos, por lo que, al adicionar a la nanopartícula cargada de platino, una molécula de folato en su superficie, mediante endocitosis, se puede aumentar la entrada del fármaco en la célula. En el estudio de Castillo, Colilla, & Vallet-Regí (2017), se funcionalizó con grafting de ácido fólico y se aumentó la interacción debido a la sobreexpresión del receptor de folato en determinados tumores HeLa.

Los aptámeros son ácidos oligonucléicos que tienen una estructura tridimensional única capaz de interactuar con antígenos específicos, lo que aumenta la afinidad y especificidad, como por ejemplo el utilizado en el estudio de Farokhzad et al., 2006.

Lo mismo ocurriría con la transferrina (glicoproteína sérica) y las lecitinas que reconocen glicanos en la membrana extracelular del plasma. Los tejidos tumorales expresan distintos receptores de transferrina y distintos glicanos, que permiten distinguirlas de las células normales y ser una posible diana para la dirección de los fármacos antitumorales (Cho, Wang, Nie, Chen, & Shin, 2008).

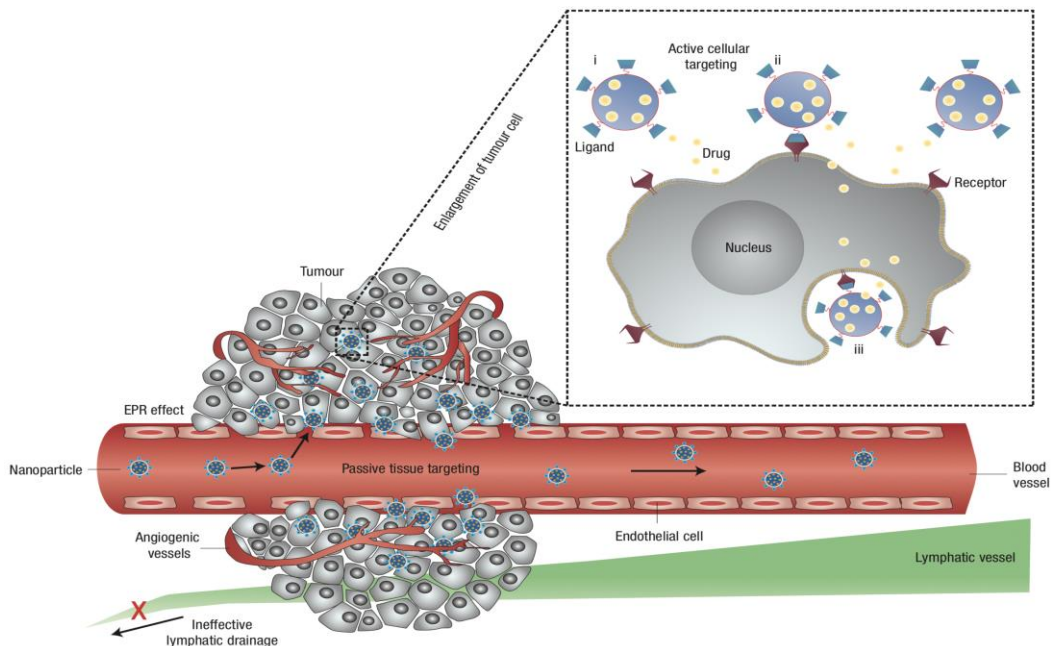


Fig. 8. Imagen representativa de los mecanismos de dirección específica de las nanopartículas, pasiva y activamente (Peer et al., 2007).

Existen, por lo tanto, diferentes mecanismos de liberación del fármaco por parte de los nanotransportadores. Como se ve en la imagen 8, gracias al mecanismo pasivo, se produce un aumento de extravasación de las nanopartículas, incrementado por el aumento de la permeabilidad y la ineficacia del drenaje linfático y gracias al mecanismo activo, las nanopartículas pueden: (I) Liberar su contenido cerca de las células tumorales; (II) adicionarse a la superficie de la membrana celular y actuar como un depósito que permita la liberación progresiva y mantenida del fármaco; e incluso (III) es capaz de internalizarse en el interior celular y liberar allí el fármaco (Peer et al., 2007).

5.5. Liberación del fármaco

La explicación de la liberación del fármaco se basa en la cinética. Los factores que influyen en la liberación son similares a los que influyen en la entrada. Se utiliza agua, sueros isotónicos, buffers y líquidos que simulen a los del cuerpo humano (simulador biológico). Además, se realizarán los estudios a 37°C y presión atmosférica para que se acerquen a las condiciones fisiológicas. Lo que se produce es la liberación del fármaco tras la imbibición de las nanopartículas y rupturas de los enlaces matriz-cisplatino al acceder los solventes a los mesoporos.

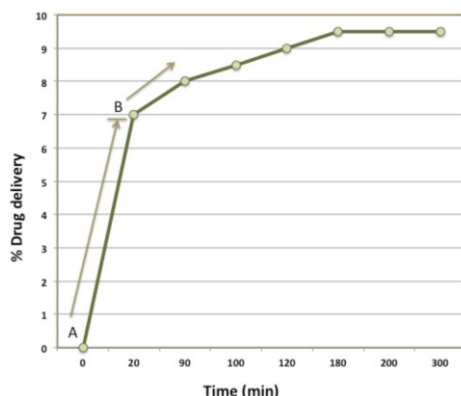
La ecuación que rige este tipo de cinética, fue realizada por Higuchi y es la siguiente:

$$a = k t^{1/2}$$

Donde “k” la constante de liberación que depende de “a” (la concentración de la droga) y el tiempo al 1/2. Como se ha mencionado, la liberación también estará influenciada por diversos factores. Por lo que la ecuación que los engloba es la siguiente: $k = f(D, \epsilon, \tau, C, A)$,

Siendo D la difusión de la droga en el disolvente, ϵ la porosidad de la matriz, τ la tortuosidad del sistema, C la solubilidad de la droga en el solvente usado y A la cantidad de droga total en la matriz. (A. Doadrio, Salinas, Sánchez-Montero, & Vallet-Regí, 2015)

Para analizar esta liberación se realiza una espectrofotometría, se adiciona MCM-41 con el platino cargado y el simulador biológico a 37°C. Se agita y se van sacando muestras a los 0, 5, 30 min, 1, 3, 12, 24 y 48 h. Y se realiza una gráfica con los valores obtenidos:



Se trata de un modelo cinético no lineal exponencial. Es dependiente del tiempo y se observan dos etapas diferenciadas de liberación (Gráfica 1):

- La primera, en la que en los 5-10 primeros minutos se libera una parte del fármaco de forma rápida y exponencial. Este fármaco correspondería a aquel situado en la parte externa de la nanopartícula
- En la segunda, se da una liberación más lenta y progresiva del fármaco anclado a la matriz de los poros.

Graf.1. Liberación del fármaco de MCM-41
(A. Doadrio et al., 2015)

Como se ha mencionado anteriormente, la funcionalización de la matriz de la nanopartícula permite controlar la liberación del cisplatino, y conseguir que la velocidad de liberación se vea modificada. En el estudio Arean, Vesga, Parra, & Delgado (2013), se analizó la salida de cisplatino tras la funcionalización con los grupos amino (-NH₂) y carboxilo (-COOH).

En estos casos, se observó que el cisplatino introducido en las partículas funcionalizadas con grupos amino presentaba una liberación mucho más lenta ya que después de 50h sólo se había liberado el 20% del fármaco cargado.

Sin embargo, en el caso de la funcionalización con grupos carboxilos, se observó que se producía una liberación muy controlada y progresiva en comparación con MCM-41 sin funcionalizar. Además, esta funcionalización permite liberar el 57% de la droga cargada, por lo que no sería necesario introducir mucha dosis del fármaco en la nanopartícula.

5.6. Sistemas para modular la liberación de fármacos - nanopuertas:

Como ya se ha mencionado, los sistemas de liberación de fármacos basados en el uso de MSNs son de gran utilidad porque a parte de permitir la introducción de grandes cantidades de fármaco, son capaces de bloquear reversiblemente la salida, lo que produce un transporte selectivo y una liberación eficaz.

Para ello se puede utilizar un diseño mediante el cual los poros de los nanotransportadores presenten una puerta de entrada-salida, activada mediante estímulos externos, internos o combinados que permitan una liberación controlada del fármaco. Esto supone un gran avance, ya que se puede modular completamente en qué momento y dónde se libera el platino.

A continuación, se definirán algunos tipos de nanopuertas a utilizar y los estímulos a los que responden como el pH, enzimas y anticuerpos, entre otros.

5.6.1. Modulación por el pH

La modulación en la liberación por modificación del pH, se realiza mediante el uso de moléculas que bloquean los poros de salida del fármaco. Estas moléculas, polímeros de conversión de carga, se desintegran parcialmente al modificar la acidez del medio permitiendo la liberación del fármaco, que está adsorbido en el interior de la nanopartícula. Para ello se elaboran unas películas o capas con los agentes encapsuladores.

En este estudio Wan et al. (2011), se utilizó la rodamina para poder caracterizar correctamente la liberación del cisplatino y los siguientes agentes encapsuladores: PAH (polielectrolito catiónico) y P(DMA-co-TPAMA) (polielectrolito negativo).

El mecanismo de acción de este proceso queda reflejado en la siguiente imagen:

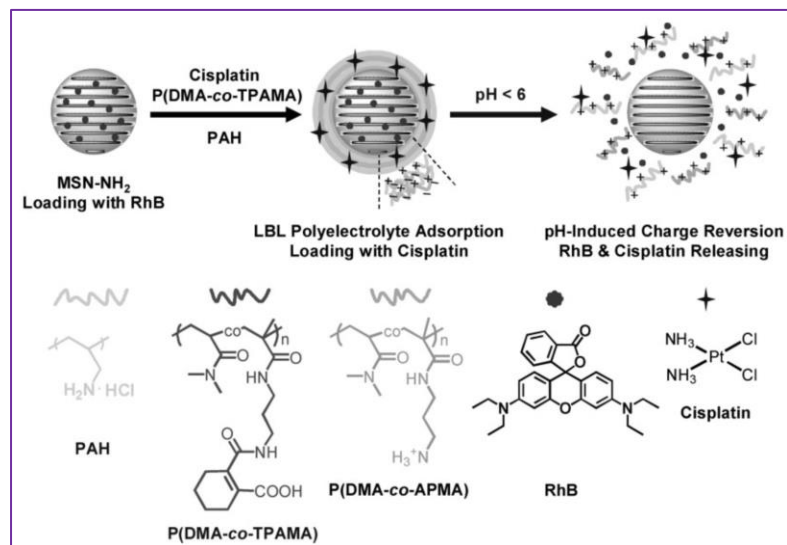


Fig. 9. Foto de la liberación de cisplatino mediante estímulo bajada de pH. (Wan et al., 2011)

En el MSN se introduce el cisplatino y a continuación se añade PAH y P(DMA-co-TPAMA) para su adsorción. Una vez que se ha obtenido la molécula modificada, se produce una disminución del pH y el polielectrolito negativo pierde parte de su grupo quedando positivo (P(DMA-co-AMPA), dando lugar a la conversión de carga necesaria para la desintegración de las multicapas y permitir la posterior liberación del fármaco.

En este mismo estudio, se analizaron los pH en los que se produce la liberación del cisplatino y se observó que el óptimo se encuentra entorno a un pH de 5-6, mientras que a pH de 7,4 (sanguíneo) casi no se libera fármaco. (Wan et al., 2011)

5.6.2. Modulación por enzimas

Para el encapsulamiento del cisplatino, también se puede utilizar un sistema de válvulas con enzimas. Lo primero que se realiza es una funcionalización de la superficie con un grupo amino, al que se le adicionará una cadena alquílica (trietilenglicol) con un grupo azida en la terminación. Posteriormente se cargarán las moléculas de cisplatino en la nanopartícula mediante difusión. Por último, el proceso de cierre del poro se realiza a baja temperatura durante 24h con la adición de α -ciclodextrina, formando un pseudorotaxano (tipo de arquitectura molecular entrelazada).

De esta manera, el poro cerrado será abierto a través de una reacción enzimática concreta (hidrolisis normalmente), que dependerá de qué tipo de moléculas se han utilizado para el cierre de la misma, permitiendo así, una especificidad alta, ya que en diversos tumores se expresan algunos grupos enzimáticos concretos o más abundantes que en las células no tumorales.

Con este sistema se consigue un transporte a localizaciones específicas y una liberación controlada tras un estímulo externo o interno. Además, al controlar esta liberación y no producirse a lo largo del transporte se reducirían los efectos adversos asociados al cisplatino.

La ventaja es que no es necesario una modificación en el fármaco a administrar y que se podrían liberar varios fármacos de una sola vez. (Patel et al., 2008)

5.6.3. Modulación por reacciones con anticuerpos

En un estudio realizado por Climent et al., 2009, hicieron una funcionalización de nanopartículas con anticuerpos. Lo primero fue anclar un hapteno y posteriormente, la superficie externa de la sílice mesoporosa fue tapada con un anticuerpo de alta afinidad y selectividad. Esto llevo a que tras la presencia de un antígeno concreto (complementario al anticuerpo) se produjera la apertura de los poros previamente tapados y la liberación del contenido de la nanopartícula.

Es un proceso de posible aplicación clínica, ya que algunas células tumorales presentan un grupo de antígenos específicos y que sólo se expresan en este tipo de células y no en las no tumorales o normales (Cho et al., 2008). Por lo que el hecho de añadir anticuerpos no solo permitiría la apertura de la nanopartícula específicamente, sino que también podrían dirigir los nanotransportadores a las zonas tumorales. Incluso podrían añadirse anticuerpos monoclonales, como el del estudio de Sandler et al., 2006 que utilizó Bevacizumab (AM del factor de crecimiento vascular-endotelial (VEGF)) junto con platicitaxel y carboplatino para mejorar la respuesta clínica, ya que reduce la vascularización del tumor y, por tanto, reduce la entrada de nutrientes y oxígenos, disminuyendo la velocidad de crecimiento del mismo.

5.7. Limitaciones de las nanopartículas:

Las MSN sufren interacciones con el organismo que dificultan el proceso de optimización y evaluación para ser usadas en clínica. La toxicidad dependerá en gran parte de los grupos que se le haya añadido, por lo que será necesario un análisis individual de los distintos tipos de partículas funcionalizadas. Además, las MSN tienden a agruparse en agregados pudiendo suponer un riesgo por la formación de trombos y generar embolias en los estudios *in vivo* (Llinàs & Sánchez-garcía, 2014).

Existen limitaciones como la citotoxicidad generada por las nanopartículas (concretamente MCM-41) sin funcionalizar, las cargas positivas que se encuentran en los mesoporos (aminas cuaternarias) producen enlaces con las cargas positivas de la membrana, lo que impide la correcta internalización en el citoplasma y el consecuente daño en la membrana celular. Es un proceso concentración y tiempo dependiente, que ocurría a altas concentraciones. Realmente, en este estudio, al tratarse de un tratamiento anticancerígeno dirigido a células tumorales, el factor importante sería la internalización del fármaco en la célula y no tanto el posible daño de la membrana. (Tao, Toms, Goodisman, & Asefa, 2009).

Sin embargo, aun no se han determinado los efectos a largo plazo que pueden presentar este tipo de moléculas, aunque si se han realizado estudios en los que se demostró que no existía toxicidad en un periodo de 42 días con el implante de MSN en animales. (Slowing et al., 2008)

6. CONCLUSIÓN

Las nanopartículas al poder ser moduladas completamente, tanto su estructura molecular como la superficie externa e interna, ser biocompatibles y biodegradables, no tóxicas y poder captar en su interior fármacos de platino, aportan muchas ventajas en el tratamiento cancerígeno. Además, son de fácil fabricación y modulación, y aunque hay que tener en cuenta varios factores, la elaboración de las nanopartículas así como la introducción del fármaco en las mismas son procesos ya estudiados y analizados que constituyen una forma de gran utilidad para adaptar la quimioterapia a un individuo y tumor concreto.

Esto es así, porque permiten una liberación controlada, localizada, específica y progresiva en la zona tumoral, ya que, aprovechando las características fisiopatológicas de los tumores, junto con la funcionalización de las partículas se generan unas moléculas con capacidades mucho más versátiles que la quimioterapia habitual.

Definitivamente mediante el uso de las nanopartículas obtendremos una terapia antitumoral mucho más:

- **Eficaz y efectiva**, ya que las nanopartículas pueden liberar su contenido en el tejido tumoral e incluso en el interior celular de las células tumorales. Además, con ello se pueden evitar determinadas resistencias a este grupo de fármacos.
- **Segura**, al disminuir la dosis y aumentar la especificidad por los tumores se podrá disminuir los efectos adversos generados por la quimioterapia.
- **Tolerable y cómoda** para el paciente, debido a que las nanopartículas pueden ser administradas por vía oral una vez encapsuladas. Además, con la funcionalización también se conseguiría que el tratamiento se mantenga durante más tiempo e incluso actuar como reservorio en el propio tejido tumoral, disminuyendo las veces de administración del fármaco.

Por todo ello, se conseguiría aumentar la calidad de vida del paciente y la eficacia en el tratamiento antitumoral con compuestos de platino.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Arean, C. O., Vesga, M. J., Parra, J. B., & Delgado, M. R. (2013). Effect of amine and carboxyl functionalization of sub-micrometric MCM-41 spheres on controlled release of cisplatin. *Ceramics International*, 39(7), 7407–7414. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.02.084>
- Castillo, R. R., Colilla, M., & Vallet-Regí, M. (2017). Advances in mesoporous silica-based nanocarriers for co-delivery and combination therapy against cancer. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 14(2), 229–243. <https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1211637>
- Chaney, S. G., Campbell, S. L., Bassett, E., & Wu, Y. (2005). Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 53(1), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2004.08.008>
- Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z., & Shin, D. M. (2008). Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(5), 1310–1316. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1441>
- Climent, E., Bernardos, A., Martínez-Mañez, R., Maquieira, A., Marcos, M. D., Pastor-Navarro, N., ... Amorós, P. (2009). Controlled delivery systems using antibody-capped mesoporous nanocontainers. *Journal of the American Chemical Society*, 131(39), 14075–14080. <https://doi.org/10.1021/ja904456d>
- Dhar, S., Kolishetti, N., Lippard, S. J., & Farokhzad, O. C. (2011). Targeted delivery of a cisplatin prodrug for safer and more effective prostate cancer therapy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(5), 1850–1855. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011379108>
- Doadrio, A. L., Sánchez-Montero, J. M., Doadrio, J. C., Salinas, A. J., & Vallet-Regí, M. (2017). Mesoporous silica nanoparticles as a new carrier methodology in the controlled release of the active components in a polypill. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.11.002>
- Doadrio, A., Salinas, A., Sánchez-Montero, J., & Vallet-Regí, M. (2015). Drug release from ordered mesoporous silicas. *Current Pharmaceutical Design*, 21(42), 6213–6819. <https://doi.org/10.2174/1381612822666151106121419>
- Farokhzad, O. C., Cheng, J., Teply, B. A., Sherifi, I., Jon, S., Kantoff, P. W., ... Langer, R. (2006). Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *PNAS*, 6(6), 6315–6320. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.0601755103>
- Jamieson, E. R., & Lippard, S. J. (1999). Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin–DNA Adducts. *Chemical Reviews*, 99(9), 2467–2498. <https://doi.org/10.1021/cr980421n>
- Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews*

Cancer, 7(8), 573–584. <https://doi.org/10.1038/nrc2167>

Khiati, S., Luvino, D., Oumzil, K., Chauffert, B., Camplo, M., & Barthe, P. (2011). *Nanoparticles for Cisplatin Delivery*. (11), 8649–8655.

Li, G.-M. (2007). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research*, 18, 85. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/cr.2007.115>

Llinàs, M. C., & Sánchez-garcía, D. (2014). *Silice* (2). 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2008.04.048>

Patel, K., Angelos, S., Dichtel, W. R., Coskun, A., Yang, Y. W., Zink, J. I., & Stoddart, J. F. (2008). Enzyme-responsive snap-top covered silica nanocontainers. *Journal of the American Chemical Society*, 130(8), 2382–2383. <https://doi.org/10.1021/ja0772086>

Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R., & Langer, R. (2007). 84 Nat nanotech 2007 R Langer Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy.pdf. *Nature Nanotechnology*, 2, 751–760. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.387>

Slowing, I. I., Vivero-Escoto, J. L., Wu, C. W., & Lin, V. S. Y. (2008). Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(11), 1278–1288. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.012>

Tao, Z., Toms, B. B., Goodisman, J., & Asefa, T. (2009). Mesoporosity and functional group dependent endocytosis and cytotoxicity of silica nanomaterials. *Chemical Research in Toxicology*, 22(11), 1869–1880. <https://doi.org/10.1021/tx900276u>

Vallet-Regi, M., Rámila, A., Del Real, R. P., & Pérez-Pariente, J. (2001). A new property of MCM-41: Drug delivery system. *Chemistry of Materials*, 13(2), 308–311. <https://doi.org/10.1021/cm0011559>

Wan, X., Zhang, G., & Liu, S. (2011). PH-disintegrable polyelectrolyte multilayer-coated mesoporous silica nanoparticles exhibiting triggered co-release of cisplatin and model drug molecules. *Macromolecular Rapid Communications*, 32(14), 1082–1089. <https://doi.org/10.1002/marc.201100198>

Ficha técnica:

- Cisplatino: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/62107/FT_62107.html
- Carboxiplatino https://cima.aemps.es/cima/pdfs/ft/62123/FT_62123.pdf
- Oxaliplatino: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/69518/FT_69518.html