



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO
MODELADO MOLECULAR Y DOCKING DEL
CISPLATINO EN NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE
MESOPOROSAS

Autor: GUSTAVO POSTIGO MARTÍN

Fecha: Febrero 2020

Tutor: ANTONIO LUIS DOADRIO VILLAREJO

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1.- RESUMEN..... | 3 |
| 2.- INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1.1 El cisplatino y sus derivados:..... | 4 |
| 1.2 Mecanismo de acción del cisplatino:..... | 5 |
| 3.- OBJETIVOS | 6 |
| 4.- MATERIAL Y MÉTODOS..... | 7 |
| 5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 7 |
| 5.1.- Modelado Molecular y Docking del cisplatino. | 7 |
| 5.2.- Nanopartículas Mesoporosas de Sílice (MNP'S)..... | 9 |
| Propiedades de las nanopartículas. | 9 |
| Síntesis de las nanopartículas. | 10 |
| Funcionalización de las nanopartículas..... | 12 |
| Las nanopartículas en el organismo. Administración dirigida de las nanopartículas y selectividad por células tumorales. | 13 |
| Liberación del fármaco de la nanopartícula. | 15 |
| Ventajas que aportan las nanopartículas para superar la resistencia a la quimioterapia. . | 16 |
| Posibles mejoras en las nanopartículas. Creación de nanopuertas. | 17 |
| 6.- CONCLUSIÓN..... | 18 |
| 7.- BIBLIOGRAFÍA..... | 19 |

1.- RESUMEN

El tratamiento con cisplatino ha supuesto un enorme avance en la quimioterapia desde que se descubrió su uso en la década de los 60 del siglo XX.

Sin embargo, a raíz de los efectos adversos derivados de su administración por vía parenteral y a las resistencias que aparecen en muchos tipos de cáncer, se han intentado buscar alternativas que causaran menor toxicidad a los pacientes y una mayor especificidad por las células tumorales.

Una de estas alternativas es la administración del cisplatino y compuestos análogos a este vehiculizados en nanopartículas mesoporosas de sílice. Gracias a esto consigo una menor toxicidad y una mayor especificidad, liberando el fármaco en su lugar de acción. Esta ventaja hace que pueda administrar menor dosis del fármaco, ya que la nanopartícula se orienta hacia el lugar de acción, lo que conlleva mayor seguridad del tratamiento, y superar resistencias que aparecen en diversos tumores frente a la quimioterapia.

Gracias al modelado molecular y docking hemos conseguido desarrollar hipótesis y un avance mayúsculo en investigación, ya que nos permite observar las interacciones ligando receptor a nivel molecular. Podemos aprovechar esto para observar las interacciones entre el fármaco y la nanopartícula.

ABSTRACT

Treatment with cisplatin has been a tremendous advance in chemotherapy since its use was discovered in the 60s of the twentieth century.

However, due to the adverse effects of parenteral administration and the resistance that appear in many types of cancer, attempts have been made to find alternatives that will cause less toxicity to patients and greater specificity for tumor cells.

One of these alternatives is the administration of cisplatin and cisplatin analogs vehicle in mesoporous silica nanoparticles. Thanks to this I get a lower toxicity and a greater specificity, releasing the drug in its place of action. This advantage makes it possible to administer a lower dose of the drug, since the nanoparticle is oriented towards the place of action, which entails greater safety of the treatment, and overcome resistance that appears in various tumors against chemotherapy.

Thanks to molecular modeling and docking we have managed to develop hypotheses and a major advance in research, since it allows us to observe the receptor ligand interactions at the molecular level. We can take advantage of this to observe the interactions between the drug and the nanoparticle.

2.- INTRODUCCIÓN

El cisplatino o cis-diaminodicloroplatino (II) es un fármaco muy conocido como quimioterápico por su uso en diversos tipos de cáncer. Fue sintetizado por primera vez por M. Peyrone en

1844, pero no se descubrieron sus propiedades citotóxicas hasta la década de 1960, gracias a Rosenberg, profesor de la Universidad Estatal de Michigan. Su mecanismo de acción se relaciona con la capacidad del cisplatino de unirse con las bases púricas del DNA. El cisplatino impide la reparación del DNA, lo que provoca daños en este y favorece su apoptosis, por lo que si aprovechamos esta capacidad sobre las células tumorales obtenemos un potente antitumoral. Sin embargo, tanto el cisplatino como algunos de sus derivados presentan importantes efectos secundarios (problemas renales, reacciones alérgicas, hemorragias, problemas gastrointestinales, etc) sobre todo en pacientes jóvenes.

Propiedades del cisplatino: el cisplatino es un compuesto de coordinación metálico con el platino y tiene una geometría plana cuadrada. Es estable a temperatura y presión normal, pero con el tiempo se transforma en su isómero *trans*.

- Pm: 301,1 mg/mol
- Densidad: 3,74 g/cm³
- Punto de fusión: 270°C
- Solubilidad en agua: 2,53 g/L a 25°C

1.1 El cisplatino y sus derivados:

Se han estudiado multitud de análogos al cisplatino para mejorar su índice terapéutico, pero solo uno, el carboplatino, ha demostrado ser mejor que el cisplatino y ha sido aprobado a nivel mundial. Actualmente hay nueve análogos del platino en ensayos clínicos: enloplatino, lobaplatino, ormaplatino (tetraplatino), oxaliplatino, DWA2114R, CI-973 (NK-121), 254-S, JM-216 y cis-bis-neodecanoato atrapado en liposomas trans-R,R-1,2-diaminociclohexano platino II (LNDDP).

El cisplatino, el carboplatino y el oxaplatino están compuestos de iones platino doblemente cargados y rodeados de 4 ligandos. Los enlaces con las aminas son interacciones más fuertes, en cambio los enlaces con el cloro son más débiles, lo que hacen que estos sean grupos salientes que permiten al ion platino formar enlaces con el DNA.

El carboplatino difiere del cisplatino en dos ligandos, ya que en lugar de los dos cloruros tiene un dicarboxilato de dimetilo. Tanto los cloruros como el dicarboxilato son grupos salientes, sin embargo, el carboplatino presenta menor reactividad y una cinética de unión al DNA más lenta. Debido a esto, la tasa de excreción del carboplatino es más baja, y por tanto sus efectos son mucho más duraderos (vida media del cisplatino son 1,5-3,6 horas y la del carboplatino son 30 horas). Algunos estudios afirman que el cisplatino y el carboplatino presentan diferentes cambios morfológicos al ejercer su acción citotóxica.

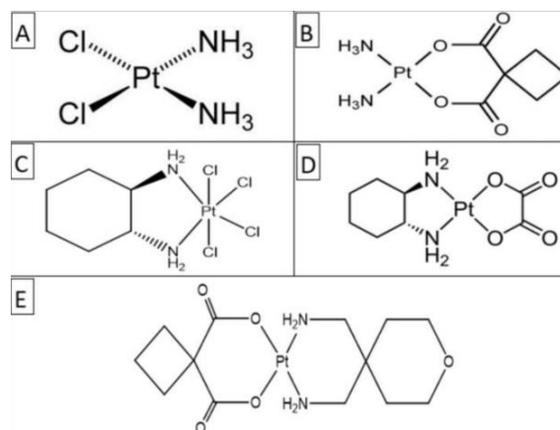


Fig 1. Estructuras químicas de derivados del platino. A-cisplatino, B-carboplatino, C-oxaliplatino, D-ormaplatino, E-enloplatino (Weiss y Christian, 1993)

En relación con el cisplatino, el carboplatino tiene menos efectos secundarios, sobre todo a nivel renal. Sin embargo, el carboplatino suprime enormemente la producción de células sanguíneas a nivel de médula ósea. Además, el carboplatino es menos potente que el cisplatino, si quiero el mismo efecto, para una dosis que tengo que dar de cisplatino, necesito cuatro del carboplatino.

Como hemos dicho antes, además del carboplatino se han estudiado muchos otros análogos al cisplatino, con la intención de reducir los efectos secundarios de este. Otra corriente de estudios se ha basado en buscar derivados del platino fluorescentes para ver el modo de unión del compuesto al DNA. Estos derivados han demostrado que la molécula se dirige al núcleo celular y es allí donde se une al DNA. El inconveniente de estos compuestos es su mayor citotoxicidad, ya que además de atacar a las células que se están multiplicando, también atacan a las células en reposo.

1.2 Mecanismo de acción del cisplatino:

El cisplatino y sus análogos van a entrar en las células a través del transportador CTR1, de modo que en células humanas con baja proporción de este habrá resistencia al tratamiento con cisplatino. Este transportador aparece tanto en levaduras como en mamíferos, y pertenece a la familia de las glicoproteínas P, al igual que el SLC o el AQP2.

Una vez que el cisplatino entra a la célula va a activarse, se produce por el ataque de moléculas de agua, liberándose iones cloruro. El primer intermedio se conoce como monoacuo y el segundo se conoce como diacuo, haciendo referencia al número de moléculas de agua que tienen en su estructura. El intermedio diacuo tiene dos cargas positivas, por lo que es un electrófilo muy potente que va a ser atraído por los grupos fosfatos de las bases nitrogenadas del DNA.

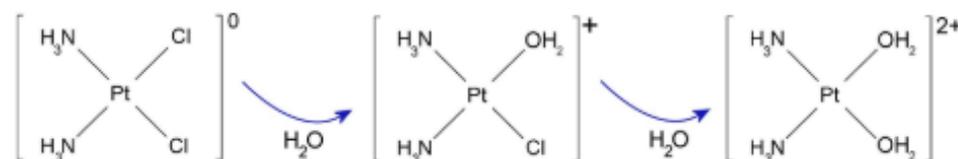


Fig 2. Mecanismo de activación del cisplatino

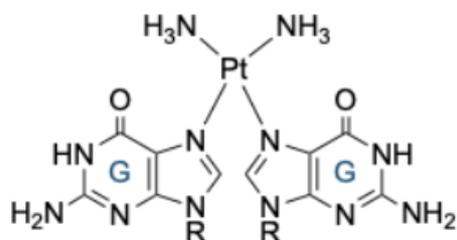


Fig 3. Interacción cisplatino - N7 de la guanina

Recordemos que el DNA es una molécula compuesta por multitud de nucleótidos unidos entre sí. Los nucleótidos a su vez están compuestos por una base nitrogenada (Adenina (A), Guanina (G), Citosina (C) y Timina (T)), una desoxirribosa y un grupo fosfato.

El intermedio diacuo interacciona a nivel del nitrógeno 7 de los residuos de purina del DNA, formando un enlace covalente que detiene el ciclo celular y produce desorganización y ruptura en la

estructura del DNA. Se establecen interacciones covalentes muy fuertes entre el Pt (II) y el N de guaninas y adeninas, formando enlaces cruzados intra e intercatenarios que desencadenan cambios estructurales en el DNA. Debido a esto se forman complejos DNA-DNA y DNA-proteína.

En el organismo existen sistemas de reparación celular que intentan corregir los daños producidos en el DNA. En este caso interviene el sistema NER, que repara los daños que aparecen en el DNA debidos a mutaciones, radiación ultravioleta y quimioterapia. En función de si estos mecanismos de reparación funcionan o no sobre las mutaciones producidas por el cisplatino, vamos a tener sensibilidad o resistencia al tratamiento quimioterápico con este fármaco y sus derivados.

Si las células no consiguen reparar los daños producidos por el cisplatino, va a activarse el proceso de apoptosis celular, que puede ser de dos tipos:

- Extrínseco: mediado por el TNF-alfa y posterior reclutamiento de caspasas para generar un complejo de señalización inductor de muerte celular (DISC).
- Intrínseco: iniciado por el estrés oxidativo celular (ej. Daño en el DNA) que produce la liberación del citocromo C, lo que produce la activación de la procaspasa 9 y la formación del apoptosoma.

El proceso de apoptosis celular acaba produciendo la muerte celular, de modo que si aplicamos este mecanismo a las células tumorales podremos usar el cisplatino y sus derivados como potentes agentes quimioterápicos.

3.- OBJETIVOS

Una de las terapias más importantes para el tratamiento de tumores en la actualidad es la administración de cisplatino vía intravenosa, teniendo un elevado porcentaje de éxito en ciertos tumores. A pesar de que esta terapia da excelentes resultados comparada con otras anteriores, va a provocar daños en el individuo tratado derivados de la toxicidad del fármaco.

En la búsqueda de soluciones al problema se ha intentado administrarlo en menor dosis, pero buscando conseguir los mismos efectos. Esto va a ser posible gracias a los nuevos avances que existen a nivel de la química inorgánica, con la aparición de las nanopartículas.

La finalidad de esta revisión bibliográfica va a ser mostrar el modelado molecular y docking del cisplatino para ver como interacciona con su vehículo, las nanopartículas mesoporosas de sílice. Además, vamos a estudiar las propiedades de las nanopartículas, su síntesis, funcionalización y selectividad por las células tumorales, el recorrido que realizan en el interior del organismo y el proceso de liberación del fármaco una vez que llega al sitio de acción. También veremos las ventajas que tiene esta terapia frente a la terapia convencional, consiguiendo superar las resistencias de muchos tumores a los fármacos antitumorales.

4.- MATERIAL Y MÉTODOS.

Para la realización de este trabajo se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica de distintos artículos científicos, tesis doctorales y libros que tratan sobre las nanopartículas y el desarrollo y perfeccionamiento de las mismas, así como del docking y el modelado molecular presentados en los últimos años. Para acceder a dichos artículos, se han consultado bases de datos on-line, como Pubmed o Google Scholar.

Además de esto, se han apoyado las evidencias encontradas en algunos artículos con simulaciones llevadas a cabo con los programas Spartan '14, Avogadro y Hex.8.0.0, teniendo especial importancia el último de ellos.

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1.- Modelado Molecular y Docking del cisplatino.

El modelado molecular es una técnica de la química computacional que permite interpretar de manera racional la interacción entre un ligando y su receptor, obteniéndose con ello datos fiables para predecir su comportamiento. Gracias a este método se pueden plantear hipótesis, diseñar experimentos e interpretar resultados usando información experimental y teórica.

La importancia del modelado molecular fue reconocida con el Nobel de Química en el año 2013 a Martin Karplus, Michael Levitt y Arieh Warshel.

Dentro de los métodos computacionales en diseño de fármacos podemos tener directos e indirectos. Los directos serían la modelización, el docking y el binding, y los indirectos serían la diversidad molecular, el farmacóforo y el QSAR.

En los métodos directos se tienen que conocer las características tridimensionales de un receptor y se pone de manifiesto la actividad o inactividad de las moléculas con relación a su complementariedad con el receptor, a esto se le conoce como "docking". El objetivo del docking es obtener la estructura ligando-receptor de energía más baja ($\Delta E < 0$) y analizar las principales interacciones implicadas en la unión ligando-receptor. Además, este docking me permite comparar los valores de energía con análogos desarrollados en nuestra investigación, diseñados a ordenador, pudiendo extrapolar los resultados y diseñar nuevos ligandos con uniones más potentes.

En los métodos indirectos no se conoce la estructura tridimensional del receptor, por lo tanto, se lleva a cabo un análisis comparado de la estructura de sustancias conocidas, activas o inactivas, para buscar la parte de la molécula que produce los efectos fisiológicos (grupo farmacóforo) adecuados para la aplicación que busco. Un ejemplo de este tipo de métodos sería el QSAR 3D, que usa propiedades estructurales de distintas moléculas (adquiridas mediante simulaciones) como base para un análisis estadístico, que pretende relacionar un ligando con su receptor.

En función de la molécula que esté estudiando y de su complejidad (a mayor número de núcleos y de electrones, mayor número de funciones de base precisas para construir los orbitales moleculares) mayor dificultad para hacer los cálculos. Por ello podemos usar métodos ab initio o métodos semiempíricos. Los métodos ab initio de la Mecánica Cuántica (QM) solo pueden usarse en dianas químicas con pocas decenas de átomos, ya que reproducen datos experimentales sin emplear parámetros empíricos. Para interacciones más complejas se usan métodos de Mecánica Molecular Clásica (MM), basados en unas ecuaciones y parámetros denominados Campos de Fuerza. La MM simula los átomos de una molécula como un conjunto de masas que interactúan entre sí. Sin embargo, la naturaleza empírica de estos campos de fuerza hace que el tratamiento de cualquier efecto electrónico sea inviable. Los programas de modelado molecular pueden elegir entre varios campos de fuerza (MM2, Amber o CHARMM). Los métodos de la Mecánica Cuántica pueden superar estas limitaciones debido a que se basan en la ecuación de Schrödinger. Un punto intermedio podría ser el uso de métodos QM-MM, que tratan la parte reactiva relativamente pequeña de los sistemas biocatalíticos a nivel de QM y el resto a nivel de MM.

Gracias al modelado molecular voy a poder conocer como interacciona cualquier fármaco a nivel molecular con un receptor. Esto es interesante para saber el tipo de enlaces que se forman fármaco-receptor, la energía de enlace, etc. Además, supone un gran avance en la interpretación del mecanismo de liberación de los fármacos del sistema transportador.

Aplicado al estudio de las nanopartículas de sílice cargadas con cisplatino, voy a poder comprobar si mi fármaco puede introducirse en el interior de la nanopartícula o por el contrario es demasiado grande, y además podré ver como interactúan, prediciendo el docking del cisplatino en la nanopartícula, calculando sus interacciones y su energía de interacción.

Mediante una simulación realizada con el programa Hex 8.0.0 podemos observar la nanopartícula de sílice mesoporosa MCM-41 con el fármaco en su interior. La figura 4 representa el fármaco cisplatino en el interior de la nanopartícula mesoporosa de sílice, con las interacciones presentes entre ambos. Para la realización del docking se usaron los datos que aparecen en la tabla 1.

Gracias al docking vemos que hay una energía total de enlace de -103,36 unidades de energía y también podemos observar que entre el cisplatino y el MCM-41 se producen tres enlaces de hidrógeno. Al conocer las interacciones entre el fármaco y la matriz de sílice, voy a poder suponer modificaciones en la molécula de cisplatino que mejoren la unión con el transportador.

| | | | |
|------------------|--------------|-----------|------|
| Correlation Type | Shape Only | | |
| Compute Device | CPU | | |
| FFT Mode | 3D | | |
| Sampling Method | Range Angles | | |
| Post Processing | None | | |
| Grid Dimension | 0.6 | Solutions | 2000 |
| Receptor Range | 180 | Step Size | 7.5 |
| Ligand Range | 180 | Step Size | 7.5 |
| Twist Range | 360 | Step Size | 5.5 |
| Distance Range | 40 | Box Size | 10 |
| Translation Step | 0.8 | SubSteps | 0 |
| Score Threshold | 0.0 | | |
| Steric Scan | 18 | | |
| Final Search | 25 | | |
| Soln | 0 | | |

Tabla 1. Datos para la realización del docking

En la figura 5 podemos ver el cisplatino en la parte inferior de la imagen, en el interior de la nanopartícula de sílice. El platino aparece de color gris, los cloros de color azul claro y los nitrogénos de color azul oscuro.

Estos modelos teóricos deben ser comparados con datos experimentales, como informó el catedrático Antonio Doadrio en un modelo de vancomicina/SBA-15.

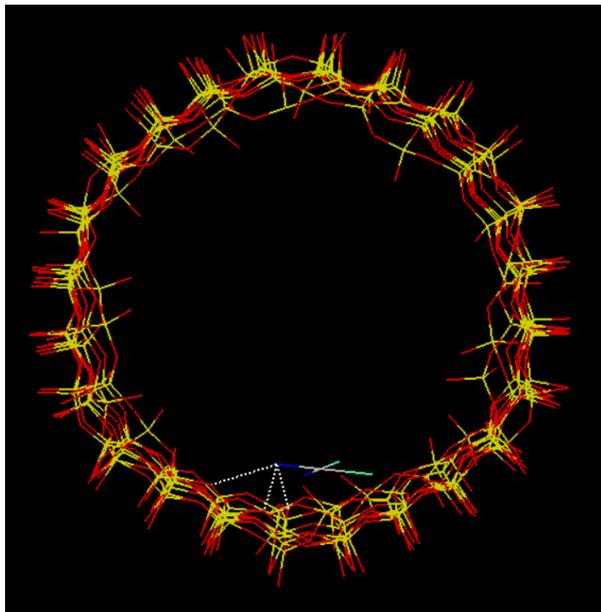


Fig 4. Simulación del MCM-41 con el cisplatino en su interior (I)

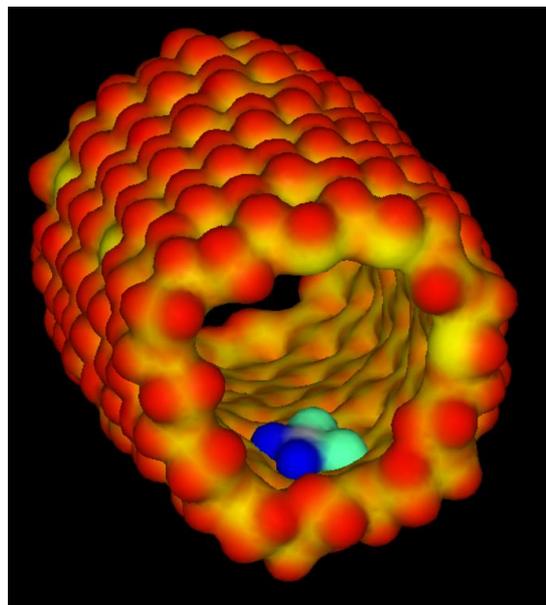


Fig 5. Simulación de nanopartícula de sílice mesoporosa con cisplatino en su interior (II)

5.2.- Nanopartículas Mesoporosas de Sílice (MNP'S)

Propiedades de las nanopartículas.

En los últimos años ha aumentado mucho el uso de nanopartículas para multitud de aplicaciones como medicina, investigación, electrónica, energía y medio ambiente, e incluso en el sector textil.

La aplicación de materiales mesoporosos ordenados como matrices en sistemas de administración de fármacos se inició en 2001. En un inicio, los fármacos investigados para ser cargados en las nanopartículas eran principalmente antibióticos y antiinflamatorios, pero con el tiempo la investigación se ha ido extendiendo a otros tipos de fármacos.

Las nanopartículas tienen un tamaño de entre 50 y 300 nm, de distinta naturaleza, pudiendo ser liposomas, micelas, sistemas poliméricos, nanotubos de distintos metales o dendrímeros. Y se van a clasificar de acuerdo a su naturaleza:

- Orgánicas: polímeros, bicapas lipídicas y estructuras repetitivas.
- Inorgánicas: formadas por metales y materiales inertes como la sílice o el dióxido de titanio.

En esta revisión bibliográfica nos centraremos en las nanopartículas de sílice. Estas tienen una matriz de sílice con poros de un diámetro de entre 2 y 50 nm, por lo que van a tener dos dominios: interno (en el interior de los poros) y externo. La medida de las nanopartículas no es algo casual, sino que está estudiado que los materiales microporosos (tamaño de poro < 2 nm) tienen alta superficie específica pero bajo acceso a los poros, en cambio los materiales macroporosos (tamaño de poro > 50 nm) tienen alto acceso al poro pero baja superficie específica. De modo que los materiales mesoporosos suponen una alternativa más adecuada para multitud de aplicaciones, al tener una alta superficie específica y un gran acceso al poro.

Características principales de las nanopartículas de sílice:

- Elevada área superficial, que permite almacenar gran cantidad de carga (fármacos, sensores o proteínas).
- Elevado volumen de poro, gran porosidad y elevado orden del poro.
- Se pueden modificar fácilmente en forma y tamaño (tamaño del poro modificable entre 2 y 10 nm) y fácilmente sintetizables.
- Buena estabilidad química y térmica. Comparadas con otros polímeros transportadores de fármacos, las MNP'S son más resistentes al calor, pH, tensión mecánica y a diversas reacciones de hidrólisis.
- Biocompatibles con el organismo humano (no toxicidad). Además, las moléculas huésped en el interior de los poros están protegidas de una posible degradación en ambientes hostiles como el estómago o el intestino.
- Tienen dos superficies funcionales (interna y externa). Esta característica permite la funcionalización selectiva de las superficies internas y/o externas con distintos restos.
- Estructura de poro única. A diferencia de otros transportadores como dendrímeros o liposomas, que van a tener estructuras imperfectas en las que algunas moléculas transportadas pueden liberarse a través de la matriz cuando algunos poros no están cerrados, las nanopartículas mesoporosas de sílice están compuestas por un panel hexagonal con poros cilíndricos, de modo que los poros son individuales y no hay interconectividad entre ellos, evitando los inconvenientes que aparecen en otras formas de transporte de fármacos.

La aplicación de estas nanopartículas a las terapias antitumorales consiste en conseguir un vehículo biocompatible, que permita una alta carga de moléculas del fármaco sin liberación prematura antes de llegar al sitio de acción.

Síntesis de las nanopartículas.

Se ha logrado un rápido progreso en la síntesis de MNP'S gracias a que disponemos de multitud de tensioactivos y a la tecnología sol-gel.

El MCM-41 es el tipo de nanopartícula en la que nos vamos a centrar. Usamos como surfactante el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), como precursor de sílice el ortosilicato de tetraetilo (TEOS) o metasilicato sódico (Na_2SiO_3) y como catalizador el álcali.

Se producen dos reacciones clave:

1. Hidrólisis del alcóxido, obteniendo una suspensión coloidal que contiene partículas de tamaño inferior a 100 nm y grupos silanol (Si-OH).
2. Condensación de los grupos silanol formando estructuras tridimensionales (Si-O-Si). En esta segunda etapa se forma un gel. Las micelas formadas por la presencia del surfactante actúan a modo de molde y formarán los poros. El surfactante catiónico atrae las cargas negativas de las estructuras de sílice, por lo que las especies de sílice se concentran alrededor de las micelas formando una estructura de sílice tubular. La nanopartícula aumenta de tamaño hasta que la carga negativa neta es tan elevada que no crece más.

Finalmente hay que liberar el surfactante del interior de los poros y para ello se pueden seguir 3 métodos: una mezcla de nitrato amónico, etanol y agua, usando alcohol con HCl, o mediante calcinación. Los tres conllevan la ruptura de la interacción electrostática entre el surfactante catiónico y los silicatos aniónicos

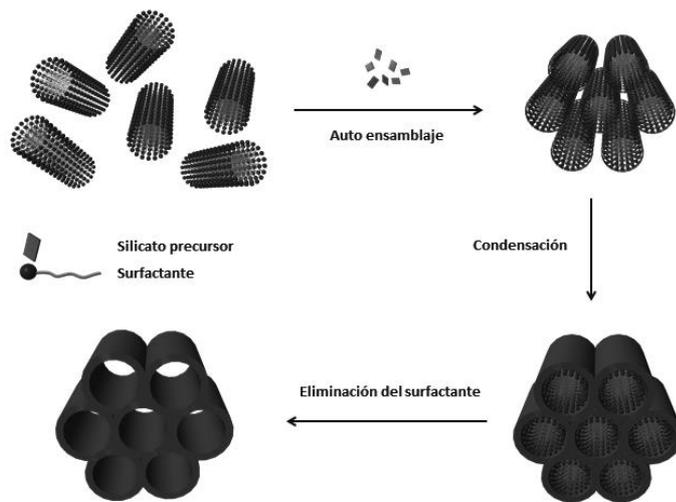


Fig 6. Fases para la preparación de nanopartículas

El tamaño del poro y su orientación vienen determinados por la naturaleza de las platillas de surfactante, y el tamaño y morfología adecuados para la nanopartícula se consiguen adaptando la relación molar de precursores de sílice y tensioactivos, añadiendo codisolventes y precursores de organoalcoxisilicano durante la reacción de condensación.

Si por ejemplo usamos Na_2SiO_3 como precursor de sílice, el MCM-41 sintetizado va a tener unos poros más grandes y con un área superficial mayor que si usamos TEOS (Na_2SiO_3 - superficie específica = $1.379 \text{ m}^2/\text{g}$, tamaño de poro = $3,3 \text{ nm}$ / TEOS - superficie específica = $848 \text{ m}^2/\text{g}$, tamaño de poro = $2,8 \text{ nm}$).

Una vez sintetizadas, podemos caracterizar las nanopartículas para determinar si tienen el tamaño adecuado para su aplicación, tanto a nivel de tamaño de poro como su morfología general. Existen 4 métodos que me permitirán caracterizar las nanopartículas:

- Dispersión de la luz dinámica (DLS): me permite conocer su tamaño. Me permite relacionar el desplazamiento aleatorio de las partículas con su diámetro hidrodinámico.
- Métodos de BET y BJT: permiten conocer la superficie específica y la porosidad.
- Difracción de Rayos X (XRD): técnica no destructiva que me permite conocer la estructura interna mesoporosa de las nanopartículas.

- Microscopía de transición electrónica (TEM): me permite conocer la estructura y el tamaño de una nanopartícula en concreto o de un conjunto de ellas.

Funcionalización de las nanopartículas.

Las MNP'S tienen tres dominios funcionales posibles donde incorporar el agente activo: la superficie de la nanopartícula, la parte interna de los poros y la matriz de sílice de la nanopartícula.

Hay tres estrategias que permiten incorporar cualquier agente activo en una MNP: oclusión, injerto o co-condensación.

- a. Oclusión: se usa para moléculas fluorescentes, como agentes de contraste que permiten localizar las nanopartículas en el organismo. El agente activo está disperso en la matriz polimérica sin unirse mediante enlaces covalentes. Al estar el agente activo dentro de la matriz es más difícil que se degrade.
- b. Injerto: método post-sintético que modifica la superficie de la nanopartícula para incorporar grupos funcionales por silanización. En la silanización, los grupos silanol (Si-OH) presentes en la superficie de la NP actúan como puntos de anclaje.
- c. Co-condensación: método basado en el proceso de sol-gel, pero se añade un siloxano funcionalizado junto con el precursor de sílice. Este método a diferencia del anterior es capaz de distribuir homogéneamente grupos orgánicos en la superficie interna de los poros. Además, en este método se controla más fácilmente la morfología de las MNP'S.

Si quiero una funcionalización regioselectiva, discriminando entre la superficie externa y los poros, después de eliminar el tensioactivo se aplica el método del injerto con un silano. Como la superficie externa es más accesible al silano, se funcionalizará preferentemente respecto al interior.

Dependiendo de la funcionalización de los grupos silanol de las mesoporas tendremos los poros más o menos obstruidos. La Doctora Izquierdo-Barba informó de que la funcionalización del MCM-48 con cadenas C18 cubría todos los poros del transportador, impidiendo el acceso de la droga al interior de los canales.

En el caso del cisplatino, este va a introducirse al interior de la nanopartícula poniendo en contacto el fármaco con las nanopartículas MCM-41, en disolución. Pasadas 24 horas se obtendrá el transportador cargado. A continuación, tendremos que filtrar y dejar secar para obtener el resultado final.

La funcionalización de las MNP'S, incluyendo el tamaño, la forma, las propiedades de superficie, etc, va a jugar un papel fundamental en la biotransformación y biocompatibilidad de la MNP'S dentro del organismo.

- El tamaño de partícula es uno de los factores determinantes para la distribución en el organismo, la vida media del fármaco y la excreción de este. A mayor tamaño de las

- MNP'S, mayor distribución en hígado y bazo y mayor excreción, por lo que las nanopartículas tendrán menor vida media.
- Las propiedades de superficie influyen en la biocompatibilidad de las nanopartículas. Las MNP'S con carga positiva activan el sistema inmune y tienen mayor citotoxicidad que las de carga neutra o negativa. Además, se sabe que las nanopartículas con carga neutra tienen tiempos de circulación muy largos. La estrategia de modificación de superficie más eficiente es la pegilación (unión de PEG a un fármaco generando un derivado muy estable), que enmascara los grupos silanol, aumentando la vida media del sistema y retrasando su opsonización.
 - La forma también tiene importancia. Las partículas esféricas tienen un mayor tiempo de distribución y sufren menos fagocitosis por macrófagos. Se cree que en función de la forma de la MNP va a internalizarse en las células mediante un mecanismo u otro, lo que determina el destino intracelular de las nanopartículas como sistemas de administración de fármacos. Un ejemplo de esto se describe en un estudio reciente, en el cual se descubrió que una MNP con forma de varilla de 15 nm de diámetro y 54 nm de longitud penetraba 4 veces más rápido en tumores que otra de forma esférica con 35 nm de diámetro.

Las nanopartículas en el organismo. Administración dirigida de las nanopartículas y selectividad por células tumorales.

Cuando las nanopartículas llegan al torrente sanguíneo, estas van a ser secuestradas por el sistema retículo-endotelial (RES). Las nanopartículas establecen fuerzas de Van der Waals, interacciones iónicas o electrostáticas con distintas proteínas de la sangre. Posteriormente interactúan con receptores específicos que se encuentran en la membrana de células fagocíticas, especialmente las células de Kupffer del hígado. Esta es la principal vía de eliminación de nanopartículas. Para evitarlo, se añade PEG (polietilenglicol) a la superficie de estas, de modo que va a formar una capa que les permite repeler la adsorción de proteínas e impide que sean reconocidas por las células fagocíticas.

Como hemos dicho antes, podemos regular el tamaño de la nanopartícula a nuestro gusto. El tamaño de esta debe ser lo suficientemente grande para evitar su filtración excesiva a través de capilares sanguíneos, pero debe ser lo suficientemente pequeño para escapar a la captura de los macrófagos endoteliales de hígado y bazo. El tamaño de los sinusoides de las células de Kupffer en las paredes del hígado es de 150-200 nm y el tamaño de las brechas que aparecen en el tejido vascular permeable del tumor es de 100-600 nm, por lo tanto, el tamaño de las nanopartículas debe ser de hasta 100 nm para alcanzar los tejidos tumorales, pasando a través de las dos estructuras vasculares mencionadas.

Además, la superficie también es importante. Las nanopartículas deberán tener una superficie hidrofílica para escapar de la captura de los macrófagos, esto se consigue cubriendo la estructura con un polímero hidrofílico, como el PEG, o formándose a partir de copolímeros con dominios hidrofílicos.

Los antitumorales deben llegar a su lugar de acción y eliminar selectivamente a las células cancerígenas sin afectar a las normales. Ayudándonos de las características de las células

tumorales, que no van a aparecer en células normales, voy a intentar guiar a mis nanopartículas.

- Orientación pasiva: las células cancerígenas favorecen la creación de nuevos vasos sanguíneos para así conseguir un suministro elevado de oxígeno y nutrientes que les facilite un crecimiento rápido. Estos nuevos vasos tumorales están altamente desorganizados y por ello tienen mayor permeabilidad y una capacidad de retención mayor que los vasos normales. Además, el microambiente que se crea en el tumor es diferente al de las células normales. Como las células tumorales necesitan mucha energía, van a usar la glucólisis para obtener energía extra, creando un ambiente ácido. Por ejemplo, existen lisosomas estables a pH fisiológicos, que al llegar al ambiente ácido del tumor se van a degradar.
- Orientación activa: se añade un ligando o anticuerpo en el complejo fármaco-nanopartícula que tenga afinidad por el lugar de acción. Estos ligandos o anticuerpos deben tener afinidad por receptores o antígenos que solamente se expresen en células tumorales y no en células normales, además, deben expresarse de manera homogénea en todas las células tumorales y no deben salir a circulación sistémica, sino quedarse en el tumor. Existen algunos ejemplos de orientación activa, la mayoría todavía en fase de experimentación:
 - El receptor de folatos está sobreexpresado en algunos tumores, por lo que se están probando nanopartículas dirigidas a este receptor.
 - La transferrina es un transportador del hierro en sangre. El receptor de transferrina está sobreexpresado en tejidos tumorales en comparación con tejidos normales, por lo que puede ser diana para el diseño de nuevas nanopartículas.
 - Las células cancerosas expresan diferentes oligosacáridos que las células normales. Usando esto podríamos utilizar nanopartículas con lecitinas que interaccionan con los oligosacáridos tumorales y así guiaríamos al fármaco hacia el tumor.

El problema deriva de que los receptores de folato y transferrina también se expresan en células normales. Por ejemplo, hay receptores de transferrina en el endotelio capilar cerebral, para mediar el transporte del hierro a través de la BHE. Otra estrategia de orientación activa consiste en unir ligandos específicos que se asocian a receptores de células del endotelio vascular tumoral. Como por ejemplo los péptidos de arginina-glicina-aspartato, que se unen a la $\alpha\beta_3$ -integrina sobreexpresada en el tejido vascular tumoral.

Una vez que las nanopartículas pasan al intersticio tumoral, tienen que entrar en las células cancerosas y liberar el fármaco. Esta internalización normalmente se lleva a cabo por endocitosis mediada por receptor. Cuando ingresan en el interior de la célula, las nanopartículas liberan el fármaco quimioterápico (en este caso el cisplatino).

Liberación del fármaco de la nanopartícula.

Una vez que el fármaco llega al lugar de acción, tiene que liberarse. Hay que establecer la cinética que sigue el proceso.

Existen dos etapas de liberación en función de si el fármaco estaba en el interior o en la parte externa de la matriz. Si el fármaco se encuentra adsorbido en la parte externa la liberación es rápida, en cambio si el fármaco aparece en el interior de la nanopartícula, la liberación va a ser más lenta.

Como no podemos establecer cinéticas de orden 0, 1 o 2, es muy difícil comparar las cinéticas de liberación de distintas nanopartículas mesoporosas. Debido a esto, vamos a recurrir a Higuchi. La ecuación de Higuchi establece que la cantidad cedida por unidad de superficie (a) va a ser igual a una constante (k), que sería constante de difusión, por el tiempo elevado a $\frac{1}{2}$.

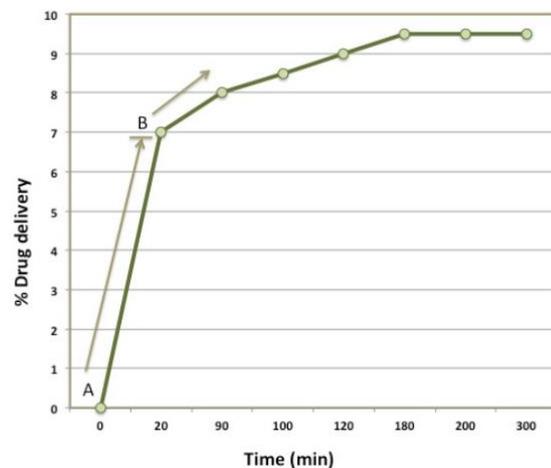
$$a = kT^{\frac{1}{2}}$$

Este modelo es adecuado para liberaciones de fármaco desde la matriz, cuando los poros están llenos de disolvente, y la ecuación va a depender de los factores principales que influyen en la liberación del fármaco: D (difusión del fármaco en el disolvente), τ (factor de tortuosidad del sistema), ϵ (porosidad de la matriz), A (cantidad total de fármaco en la matriz) y C (solubilidad del fármaco en el disolvente usado).

Por tanto, la liberación del fármaco puede evaluarse experimentalmente mediante cálculo de cinéticas de liberación. El porcentaje o cantidad de fármaco liberado se puede representar en una recta.

Como se muestra en la gráfica 1, primero hay una liberación rápida del fármaco, que se atribuye a la interacción débil con la superficie de la matriz. Pero a medida que pasa el tiempo, la liberación se reduce y se vuelve constante.

La funcionalización de la matriz a base de sílice nos permite un control efectivo sobre la cinética de liberación del fármaco debido al tamaño de los poros (a menor diámetro y volumen de poro, mayor tortuosidad del canal). Además, el carácter hidrófilo de la matriz de sílice se puede modificar añadiendo cadenas de hidrocarburo, que la harán más lipófila, o añadiendo grupos hidrófilos. Con la funcionalización también se establecen nuevas interacciones electrostáticas entre los fármacos y la matriz. También se ha demostrado que la cinética de liberación es más lenta en la matriz funcionalizada que en la no funcionalizada.



Gráfica 1. Liberación de un fármaco desde una nanopartícula

Ventajas que aportan las nanopartículas para superar la resistencia a la quimioterapia.

La resistencia a fármacos anti quimioterápicos supone un enorme problema para la curación del paciente. Tenemos varios tipos de resistencia a fármacos, como se indica en la figura 7, pero el más importante está mediado por bombas de flujo que sacan el fármaco de la célula tumoral. Esto lo llevan a cabo transportadores dependientes de ATP o transportadores ABC.

Dentro de los transportadores ABC, cabe destacar la glicoproteína P. La glicoproteína P se expresa en gran cantidad de tumores, siendo esta una causa importante de resistencia a fármacos antitumorales. Se trata de una bomba de flujo de salida de fármacos dependiente de ATP, por lo que expulsa al fármaco de la célula tumoral evitando que este ejerza su acción. Se cree que las nanopartículas no son reconocidas por la glicoproteína P y esto permite altas concentraciones intracelulares de fármaco. Además, como hemos visto anteriormente, administrar los fármacos en nanopartículas facilita la entrada del fármaco en la célula tumoral, aumentando las concentraciones intracelulares de fármaco.

Las vías de señalización antiapoptótica siempre implican la sobreexpresión de Bcl-2, la activación de MDR1, NF-κB y de HIF-1α y la mutación del gen supresor de tumores p53. Por lo tanto, otra ventaja para superar la resistencia del tumor a los fármacos, es administrar en las nanopartículas fármacos y genes citotóxicos que estén dirigidos a moléculas que intervienen en las resistencias, como la familia Bcl-2, o los factores de transcripción HIF-1α y NF-κB.

Además, la enorme capacidad de carga que tienen las nanopartículas hace que entreguen en el lugar de acción varios fármacos antitumorales, multiplicando así la eficacia del tratamiento. Un ejemplo de esto es la administración del gen Bcl-2 siRNA con el antitumoral DOX. La administración de ambos de forma conjunta puede aumentar la eficacia anticancerígena hasta 132 veces en cánceres de ovario resistentes en comparación con la terapia convencional con DOX libre.

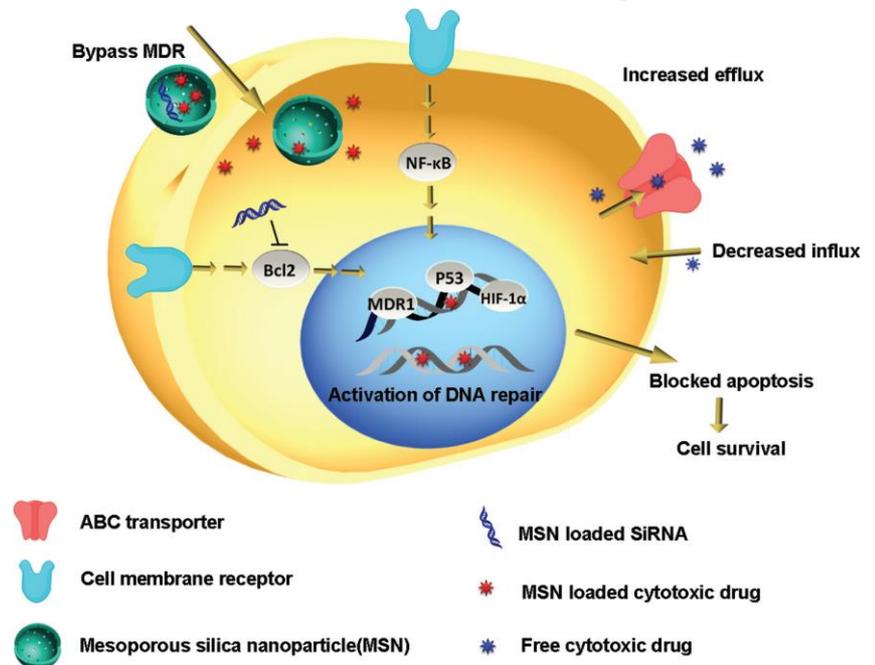


Fig 7. Tipos de resistencia a los fármacos antitumorales y estrategias para superarlos

Posibles mejoras en las nanopartículas. Creación de nanopuertas.

Hemos visto multitud de ventajas en el tratamiento quimioterápico derivadas de las nanopartículas, pero podemos ir un paso más con la posibilidad de abrir y cerrar el poro. De esta manera el poro solo se abrirá en el lugar de acción, por lo que podemos reducir enormemente la dosis de fármaco, dando solo la cantidad necesaria para ejercer el efecto deseado.

Para lograr esto, vamos a recurrir a la creación de nanopuertas. Estas nanopuertas se abren ante un estímulo. Principalmente tenemos dos tipos de estímulos:

- Estímulos internos: cambios de pH, medios reductores y actividad de ciertas enzimas.
- Estímulos externos: luz, ultrasonidos o campos magnéticos. La ventaja de los estímulos externos es que puedo controlarlos y aplicarlos cuando quiera.

Vamos a describir tres tipos de nanopuertas:

1. Apertura por eliminación de un grupo covalente: añadido un grupo bloqueante voluminoso (como nanocrisales de CdS) o una molécula fotoisomerizable (como el azobenceno). Este grupo bloqueante tiene que ser capaz de separarse ante un determinado estímulo, permitiendo así la liberación del fármaco del interior de la nanopartícula.
2. Apertura mediante polímeros: el polímero se une a la superficie de las nanopartículas de sílice mesoporosas por absorción o por unión covalente. Su función va a ser taponar la salida de los poros y ante un determinado estímulo sufre una modificación en su disposición que permite liberar el poro y con ello la salida del fármaco.
3. Apertura mediante válvulas: se usa una molécula inmovilizada unida covalentemente a la matriz de sílice y una molécula cíclica que actúa como tapón. Cuando la nanopuerta está cerrada, la molécula cíclica se une al eje y el conjunto sirve como barrera para evitar que se libere el fármaco. Pero cuando se separan la molécula cíclica y el eje, se abre la válvula, liberando el fármaco.

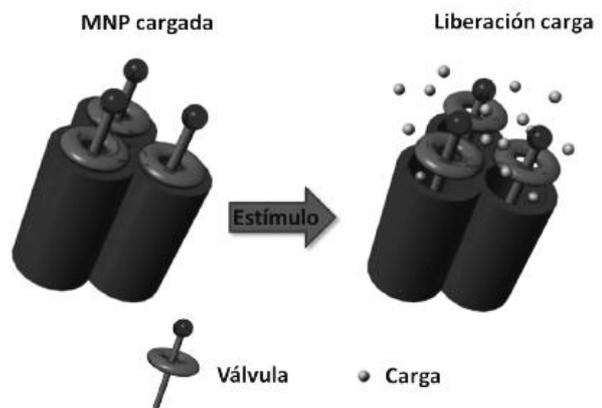


Fig 8. Apertura mediante válvulas

6.- CONCLUSIÓN.

El modelado molecular y docking nos ha permitido un enorme avance en investigación y desarrollo de nuevas hipótesis, ahorrándonos muchísimo tiempo en cálculos y resolución de ecuaciones. Gracias a estas técnicas de la química computacional podemos obtener estructuras ligando-receptor de baja energía y ver las interacciones que aparecen a nivel molecular. Sin embargo, no debemos olvidar que estos modelos teóricos deben ser comparados con datos experimentales.

Además administrar el fármaco en el interior de nanopartículas mesoporosas de sílice va a suponer una gran ventaja. Gracias a la capacidad de funcionalizar las nanopartículas vamos a resolver los principales problemas asociados a la administración de fármacos a nivel sistémico, ya que aumenta la afinidad por el lugar de acción, podemos reducir la dosis de fármaco consiguiendo el efecto deseado y además vamos a reducir la toxicidad debida a esa alta concentración y a la actuación del antitumoral en diferentes lugares del organismo. También vamos a conseguir superar las resistencias que presentan muchos tumores a fármacos quimioterápicos, aumentando la capacidad de curación de muchos pacientes, y gracias a las nanopuertas, el fármaco solo se liberará ante un estímulo específico que se da en el tejido tumoral.

Si unimos la capacidad de crear hipótesis, que me brinda el modelado molecular y el docking, con todas las mejoras que suponen la administración del fármaco en nanopartículas, voy a conseguir un enorme avance en la terapia antitumoral, aumentando la esperanza de vida de los pacientes y pudiendo hacer frente a diversos tipos de cánceres que en la actualidad producen una mortalidad cercana al 100%.

7.- BIBLIOGRAFÍA

Dasari S, Tchounwou P.B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanism of action. *Eur J Pharmacol.* 2014; 0: 364-378. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4146684/>

Germá-Lluch J.R, Piulats J.M. Bases moleculares de la resistencia a cisplatino en cáncer de testículo. *Arch. Esp. Urol.* 2013; 66 (5): 524-535. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1810/181031087014.pdf>

Jing Y, Jing X, Yifan Y, Bangwei C. Oxaliplatin-based doublets versus Cisplatin or Car-boplatin-based doublets in the first-line treatment of advanced nonsmall cell lung cancer. *Me-dicine.* 2015; 94(27). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4504603/>

Lucas F. Fármacos dirigidos al ADN ¿pertenece al pasado o al futuro?. *SEBBM.* 2014; 0: 1-2. Disponible en: https://www.sebbm.es/web/images/archivos/archivos_tinymce/septiembre2014_fatimalucas_2.pdf

Rowland M, Tozer TN. *Clinical Pharmacokinetics: Concepts and Applications.* 3ª ed. Lea & Febiger. Philadelphia, 1994.

Sánchez-Montero, J. M. Molecular modeling methodologies in the design, synthesis and rational explanation of results. *An Real Acad Farm.* 2016; 82(2): 168-184. Disponible en: <http://www.analesranf.com/index.php/aranf/article/view/1708/1731>

Gago Baena F. Métodos computacionales de modelado molecular y diseño de fármacos. *RAF.* 1993; 0: 253-327. Disponible en: http://www3.uah.es/farmamol/Public/PDF_files/RAF_1993.pdf

Llinas M.C, Sánchez-García D. Nanopartículas de sílice: preparación y aplicaciones en biomedicina. Grup d'Enginyeria Molecular, Institut Quimic de Sarria, Universitat Ramon Llull. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/39152365.pdf>

Nieto Peña A. Aplicaciones biomédicas de materiales mesoporosos de sílice y de carbón [dissertation]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2011. 245 p.

Doadrio A.L, Salinas A.J, Sánchez-Montero J.M, Vallet-Regí M. Drug Release from Ordered Mesoporous Silicas. *Current Pharmaceutical Design.* 2015; 21(42), 6189-6213. Disponible en: <http://www.eurekaselect.com/136698/article>

Tang F, Li L, Chen D. Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Biocompatibility and Drug Delivery. *Adv. Mater.* 2012; 24: 1504-1534. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30686075>

Slowing I.I, Vivero-Escoto J.L, Wu C.W, Lin Y. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008. 60: 1278-1288. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18514969>

Peer D, Karp J.M, Hong S, Farokhzad O.C, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Publishing Group*. 2007. 2: 751-760. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18654426>

Cho K, Wang X, Nie S. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 1310-1316. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18316549>

Doadrio A.L, Sánchez-Montero J.M, Doadrio J.C, Salinas A.J, Vallet.Regí M. Mesoporous silica nanoparticles as a new carrier methodology in the controlled release of the active components in a polypill. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017; 97: 1-8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27818251>