

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III



TESIS DOCTORAL
**Nanohidrogeles con respuesta a estímulos del microambiente tumoral
para vehiculización del paclitaxel**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Elena Pérez Izquierdo

Directores

María Dolores Blanco Gaitán
Rosa Olmo López
César Teijón López

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento Bioquímica y Biología Molecular III



TESIS DOCTORAL

**NANOHIDROGELES CON RESPUESTA A ESTÍMULOS DEL MICROAMBIENTE
TUMORAL PARA LA VEHICULIZACIÓN DE PACLITAXEL**

Elena Pérez Izquierdo

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento Bioquímica y Biología Molecular III



**NANOHIDROGELES CON RESPUESTA A ESTÍMULOS DEL MICROAMBIENTE
TUMORAL PARA LA VEHICULIZACIÓN DE PACLITAXEL**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Elena Pérez Izquierdo

Programa de Doctorado en Investigación Biomédica

Directores

María Dolores Blanco Gaitán

Rosa Olmo López

César Teijón López

Madrid, 2015

Dra. Dña. MARÍA DOLORES BLANCO GAITÁN, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, **Dra. Dña. ROSA OLMO LÓPEZ**, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y el **Dr. D. CÉSAR TEIJÓN LÓPEZ**, Profesor Titular del Departamento de Enfermería de la Facultad de Enfermería, Fisioterapia y Podología de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN: Que el presente trabajo titulado: *Nanohidrogeles con respuesta a estímulos del microambiente tumoral para la vehiculización de paclitaxel* llevado a cabo por Dña. **ELENA PÉREZ IZQUIERDO**, ha sido realizado bajo nuestra dirección.

Creemos que el mencionado Trabajo reúne las características necesarias para ser defendido ante un Tribunal para la obtención del Grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, firmamos el presente certificado en Madrid a x de Noviembre de 2015.

Fdo:

Dra. Dña. M^a Dolores Blanco
Gaitán

Fdo:

Dra. Dña. Rosa Olmo López

Fdo:

Dr. D. César Teijón López

A MI FAMILIA

(en especial a mi abuelo Fernando)

Prometí que algún día llegaría el momento de presentar mi famoso *trabajo de laboratorio*, al que tantos años he dedicado y espero poder seguir haciendo en un futuro... un gratificante proyecto que me encandiló desde el primer día que me lo propusieron y que no hubiera sido posible sin la ayuda de muchas personas, a las que me gustaría agradecer su apoyo incondicional a lo largo de todo este tiempo.

En primer lugar, me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores. A la Dra. María Dolores Blanco, a la Dra. Rosa Olmo y al Dr. César Teijón, por todo lo que me han enseñado en todo este tiempo, por luchar a contracorriente día a día, por su gran humildad y calidad profesional, y por mostrarme el *nano-mundo* que nos rodea y permitirme jugar con él para conseguir cosas tan maravillosas como las *partículas inteligentes*. Gracias a la Dra M^º Dolores Blanco por abrirme las puertas de este gran laboratorio y permitirme desarrollar este trabajo en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina que dirige.

Gracias al Dr. José María Teijón, Excelentísimo Académico, por mostrarme todo su apoyo y su ánimo aun cuando todo parecía complicarse más que lo que realmente me gustaría y demostrarme su pasión por la docencia. Nunca hubiera imaginado poder formar parte del magnífico grupo de investigación que codirige junto a la Dra. Blanco.

Gracias a la Dra. Enriqueta Muñiz por ser *la mejor profesora que he tenido en toda mi vida* y por creer en mí desde el primer día, dándome la oportunidad de conocer y formar parte de este maravilloso grupo de investigación. A las dos grandes especialistas en cortes con microtomo, las técnicas Isabel y Mar, por su colaboración y su gran ayuda en la realización de los estudios histológicos.

Por supuesto, no podía olvidarme de mis compañeras del laboratorio, sin vosotras no hubiera sido posible llevar a cabo este proyecto. A Sandra, la quería dar las gracias por su sabia ayuda y su paciencia inagotables; a Ana, por su meticulosa manera de llevar a cabo los experimentos y por contar conmigo en todo momento; a Anita, por la búsqueda de soluciones cuando parecía que todo estaba perdido y las *largas horas* en el animalario; a Marta, por recordarme y poner en práctica todo aquello que algún día nos explicaron en la carrera de biología y a Nuria, por ayudarme a seguir adelante cuando los ánimos flojeaban. Así mismo, no me gustaría olvidarme del *otro lado del pasillo*: Carmen, Verónica, Pilar, Ana, Ángel y Yanik. Gracias a todos por estar siempre ahí cuando os necesito y poner una sonrisa en los momentos amargos. Espero poder contar con todos vosotros durante muchos años.

Además de mis compañeros del ámbito científico, me gustaría extender los agradecimientos a todas aquellas personas que han estado a mi lado en este proyecto y no han dejado de creer en mí en los momentos buenos y en los malos.

Gracias a mis padres, Fernando y Conchi, por confiar siempre en mí y permitirme llevar a cabo mis sueños. Sois mi modelo a seguir y espero poder enseñar algún día todo lo que me habéis transmitido vosotros, os debo lo que soy. A mi hermana Ana, porque siempre está ahí cuando la necesito y la quiero muchísimo, a pesar de la distancia. A mi querido Fernando, gracias por quererme tanto y confiar en mí desde el primer día, eres fundamental en mi vida. A mis abuelos porque, aunque no entiendan de qué va esto de la nanotecnología, cada día me enseñan una nueva lección de superación que me hace crecer como persona. Y en particular... a mi abuelo Fernando, me hubiera gustado agradecerle tantas cosas...pero sobre todo le debo ese afán por saber más que me inculcó desde niña, sé que estaría muy orgulloso de poder ver a su nieta rodeada de tanta gente inteligente..y a mi tía Rosi, siempre presente en mi corazón. A todos aquellos familiares (de Madrid y Alicante) y amigos que me han apoyado siempre: Maribel, Eduardo (siempre estás en mi mente), Pili, Emilio,... Y, por último, también quería dar las gracias a mi segunda familia: Magdalena, Fernando, Raquel y M^o Elena por quererme como una hija y una hermana desde el primer momento y hacerme sentir como en casa.

En definitiva, gracias a todos los que habéis aportado vuestro granito de arena para que haya podido llegar hasta aquí y hacerme sentir orgullosa de quién soy y del trabajo realizado. Este proyecto también es vuestro.

A todos, mil gracias.

“La nanotecnología curará el cáncer, limpiará la polución y aliviará el hambre del mundo”

Eric Drexler

GLOSARIO DE ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN	17
1. CÁNCER EN LA ACTUALIDAD	19
1.1. Características fisiológicas de los tumores sólidos.....	20
1.2. Tratamientos convencionales en el cáncer.....	24
1.3. Nuevas estrategias para el tratamiento del cáncer.....	27
1.4. Paclitaxel.....	33
1.5. Aplicaciones de la nanomedicina en la terapia del cáncer.....	35
2. NANOHIIDROGELES	44
2.1. Evolución del uso de los hidrogeles.....	44
2.2. Definición actual y propiedades de la estructura los nanohidrogeles.....	46
2.3. Métodos de síntesis.....	51
2.3.1. Polimerización en disolución.....	53
2.3.2. Polimerización por precipitación.....	54
2.3.3. Polimerización por emulsión.....	55
2.3.3.1. Polimerización por miniemulsión inversa.....	57
2.3.3.2. Polimerización por microemulsión inversa.....	58
2.4. Aplicación de los nanohidrogeles en la liberación de fármacos.....	60
2.5. <i>Nanohidrogeles inteligentes</i> en la liberación de fármacos.....	63
2.5.1. Nanohidrogeles sensibles a cambios de temperatura.....	65
2.5.2. Nanohidrogeles sensibles a cambios de pH.....	66
2.5.3. Nanohidrogeles sensibles a cambios en el potencial redox.....	68
OBJETIVOS	71
METODOLOGÍA Y RESULTADOS	77

ARTÍCULO 1. NANOHIDROGELES BIORESPUESTA BASADOS EN HEAA Y NIPA PARA LA LIBERACIÓN DE FÁRMACOS POCO SOLUBLES. [<i>International Journal of Pharmaceutics</i> , 470: 107–119 (2014)].....	81
ARTÍCULO 2. HIDROGELES SENSIBLES A PH Y GLUTATION PARA LA LIBERACIÓN LOCALIZADA DE PACLITAXEL. [<i>Colloids and Surfaces B: Biointerfaces</i> , 116: 247–256 (2014)].....	109
ARTÍCULO 3. EVALUACIÓN DE LA BIOCOMPATILIDAD DE LOS NANOHIDROGELES SENSIBLES A PH Y GLUTATION DESPUÉS DE SU ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA. [<i>Colloids and Surfaces B: Biointerfaces</i> , 136: 222-231 (2015)].....	131
ARTÍCULO 4. EFECTO ANTITUMORAL MEJORADO DEL PACLITAXEL TRAS SU ADMINISTRACIÓN <i>IN VIVO</i> EN NANOHIDROGELES SENSIBLES A PH Y GLUTATION [<i>International Journal of Pharmaceutics</i> , 492: 10–19 (2015)].....	147
DISCUSIÓN	165
CONCLUSIONES	203
BIBLIOGRAFÍA	209
ANEXOS	227

ZAAECM	2-acril-amido-etil-carbamato
ALP	Alkaline Phosphatase; fosfatasa alcalina
ALT	Alanine Aminotransferase; alanina-aminotransferasa
ANOVA	Análisis de varianza
AST	Aspartate Aminotransferase; aspartato-aminotransferasa
ATIII	Antitrombina III
BOC	Di-tert-butil dicarbonato
BUN	Blood Urea Nitrogen; nitrógeno procedente de la urea en sangre
CAT	Catalase; catalasa
CBA	N-N'-cistaminbisacrilamida
CRE	Creatinine; creatinina
DsNa	Disulfuro sódico
DLS	Dynamic Light Scattering; difusión de luz quasilástica
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetracético
EPR	Enhanced Permeability and Retention Effect; efecto de permeabilidad y retención aumentadas
Fbg	Fibrinogen; fibrinógeno
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy; espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier
GSH	Molécula de glutation en forma reducida
GSSG	Molécula de glutation en forma oxidada
GSSG/GSH	Glutation total
GSSG-R	Glutation reductasa
H-E	Tinción hematoxilina-eosina
HEAA	N-hidroxietilacrilamida
HeLa	Línea celular de carcinoma de cérvix humano
HPLC	High Performance Liquid Chromatography; cromatografía líquida de alto rendimiento
LCST	Lower Critical Solution Temperature; temperatura de disolución crítica inferior
MCF7	Línea celular de carcinoma de mama humano
MCV	Mean Corpuscular Volume; volumen corpuscular medio

MCH	Mean Corpuscular Hemoglobin; hemoglobina corpuscular media
MCHC	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration; concentración promedio de hemoglobina corpuscular
MTT	(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5- diphenyltetrazolium bromide
NaCl	Cloruro sódico
NGs	Nanohidrogeles
NHA 80/15/5-CBA	Nanohidrogeles compuestos por NIPA:HEAA:2AAECM en la proporción 80/15/5, usando CBA como agente entrecruzante.
NHA 80/10/10-CBA	Nanohidrogeles compuestos por NIPA:HEAA:2AAECM en la proporción 80/10/10, usando CBA como agente entrecruzante.
NHA 80/15/5-NMBA	Nanohidrogeles compuestos por NIPA:HEAA:2AAECM en la proporción 80/15/5, usando NMBA como agente entrecruzante.
NHA 80/10/10-NMBA	Nanohidrogeles compuestos por NIPA:HEAA:2AAECM en la proporción 80/10/10, usando NMBA como agente entrecruzante.
NH-BOC	N-tert-butoxicarbonil-etilen diamina
NIPA	N-isopropilacrilamida
NMBA	N-metilenbisacrilamida
PBS	Phosphate Buffered Saline; tampón fosfato salino
PTX	Paclitaxel
RBC	Red Blood Cells; hematíes
RES	Reticuloendothelial System; sistema retículo endotelial, también conocido como sistema fagocítico mononuclear
SEM	Scanning Electron Microscope; microscopía electrónica de barrido
SOD	Superóxido dismutasa
T47D	Línea celular de carcinoma de mama humano
TEM	Transmission Electron Microscopy; microscopía electrónica de transmisión
TGA	Thermogravimetric Analysis; análisis termogravimétrico
TP	Tiempo de Protrombina
WBC	White Blood Cells; leucocitos

RESUMEN/ABSTRACT

❖ Introducción

Actualmente, el cáncer constituye una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Los avances conseguidos en los últimos años han permitido perfeccionar las técnicas de detección, diagnóstico y tratamiento, incrementando la calidad de vida de los pacientes y disminuyendo la tasa de mortalidad.

Sin embargo, la creciente incidencia del cáncer demuestra que dichos avances son insuficientes ya que la mayoría de los fármacos antineoplásicos actuales no sólo actúan sobre las células altamente proliferativas, como las células propias del tumor, sino que también actúan sobre las células en continua división de los tejidos normales.

La aplicación de la nanotecnología en el tratamiento del cáncer ha supuesto un gran avance debido a las ventajas que ofrece el uso de sistemas de tamaño nanométrico como transportadores de fármacos hidrófobos. Entre las múltiples nanoestructuras disponibles, los nanohidrogeles ofrecen la posibilidad de expandir su red tridimensional y liberar su contenido bajo unas condiciones predeterminadas. Los llamados *nanohidrogeles inteligentes* son capaces de responder a varios estímulos del medio tumoral induciendo cambios en la conformación de su estructura tridimensional (estado hinchado/colapsado) y promoviendo la salida del agente terapéutico principalmente en las condiciones establecidas en el diseño de dichos nanosistemas. Además, el uso de polímeros biocompatibles y biodegradables en la síntesis de los nanohidrogeles reduce la toxicidad que pudiera producir la administración de estos nanomateriales.

❖ Objetivo

El paclitaxel (PTX) es un fármaco muy utilizado en cáncer de mama, pulmón, cuello de cérvix y ovario. Sin embargo, su elevada hidrofobicidad implica la administración conjunta con

surfactantes como el Cremophor®EL, y etanol, que desencadenan efectos secundarios severos como reacciones de hipersensibilidad, nefrotoxicidad, neurotoxicidad, dificultad en la respiración, letargia e hipotensión. Por tanto, resulta imprescindible el diseño de nuevas formulaciones farmacológicas que permitan incrementar el tiempo de residencia en sangre de dicho principio activo y liberarlo en la diana específica de acción.

Teniendo en cuenta lo anterior, el **objetivo principal** de este trabajo fue la *síntesis, caracterización y evaluación biológica de nanohidrogeles basados en polímeros sensibles a estímulos (pH, temperatura y potencial redox) para la liberación controlada de paclitaxel.*

❖ Metodología y resultados

Se obtuvieron cuatro formulaciones de nanohidrogeles variando la proporción de monómeros sensibles a estímulos y el tipo de entrecruzante (NHA 80/15/5-CBA, NHA 80/10/10-CBA, NHA 80/15/5-NMBA y NHA 80/10/10-NMBA) mediante el método de microemulsión inversa. Los resultados obtenidos por TEM y DLS mostraron una morfología esférica y un tamaño nanométrico. Otras técnicas de caracterización *in vitro* incluidas en este trabajo fueron la espectroscopia FTIR, el análisis termogravimétrico, el estudio de hinchamiento dependiente de pH y el potencial zeta. Respecto a este último, los NGs entrecruzados con CBA mostraron una carga superficial negativa (-2,75 mV en NHA 80/15/5-CBA y -9,98 mV en NHA 80/10/10-CBA) mientras que los NGs entrecruzados con NMBA revelaron una carga superficial positiva (9,44 mV en NHA 80/15/5-NMBA y 10,96 mV en NHA 80/10/10-NMBA), lo que implica diferencias en las interacciones biológicas establecidas por las partículas.

El PTX fue encapsulado con éxito en todas las formulaciones de NGs (67,8% en NHA 80/15/5-CBA; 84,9% en NHA 80/10/10-CBA; 73,8% en NHA 80/15/5-NMBA y 72,2% en NHA 80/10/10-

NMBA), observándose una liberación rápida a pH ácido (pH 5), similar al presente en el medio lisosomal, y una liberación más lenta en medios básicos (pH 7,4), con pH similar al observado en el medio extracelular. Además, la liberación de PTX desde los NGs entrecruzados con CBA resultó ser dependiente del potencial redox debido a la reducción de los enlaces disulfuro de la molécula CBA ante la presencia de GSH. En todas las formulaciones se observó una liberación rápida del fármaco en las primeras 5-5,5 horas, mientras que en las horas siguientes dicha liberación fue más controlada en el tiempo. Además, la liberación del fármaco fue incompleta en el tiempo del experimento. Este hecho demostró que los NGs copoliméricos son capaces de reducir el efecto *burst* y obtener una liberación prolongada del PTX a lo largo del tiempo.

Los estudios celulares se llevaron a cabo en tres líneas celulares tumorales: MCF7, T47D y HeLa. La inclusión celular de estos NGs se midió por la señal fluorescente emitida por los NGs cargados de cumarina y la viabilidad celular fue evaluada por el método MTT. Los resultados demostraron que los NGs sin fármaco tenían una baja citotoxicidad y una elevada citocompatibilidad. Además, se evaluó el efecto de estos nanosistemas en el ciclo celular, revelando una parada de la división celular en la fase G₂/M ante la presencia de NGs cargados con PTX. Todos estos resultados indicaron que los nuevos NGs sintetizados podrían actuar como eficaces sistemas de liberación de fármacos antitumorales como el PTX.

La posible respuesta toxicológica desencadenada tras la inyección de los NGs sin fármaco fue evaluada en ratas hembras *Wistar* tras la inyección intravenosa por la vena de la cola de una única dosis de 20 mg/kg.

Después de la administración de los NGs, se analizaron parámetros hematológicos como el número de eritrocitos, plaquetas, leucocitos (linfocitos) y los índices sanguíneos derivados

de éstos (MCV, MCH and MCHC) mediante un contador automático. Así mismo fueron evaluados parámetros relacionados con la coagulación sanguínea (tiempo protrombina, fibrinógeno y antitrombina III) y con las funciones hepáticas (AST, ALT, ALP) y renales (BUN y creatinina). Los resultados hematológicos demostraron la ausencia de hemolisis y respuesta inmune tras la inyección de los NGs y los parámetros de coagulación sanguínea fueron muy similares en todos los grupos de tratamiento. Por otro lado, los datos obtenidos del estudio del resto de parámetros bioquímicos coincidían con el intervalo normal de referencia, lo que podría interpretarse como la ausencia de un efecto de toxicidad severa en hígado y riñón.

Al finalizar el tratamiento, los órganos extraídos fueron congelados para la determinación posterior de las defensas antioxidantes, que revelaron diferencias entre los distintos grupos de tratamiento. Por un lado, se observaron cambios esplénicos en el contenido de GSSG/GSH y la actividad de GSSG-R en aquellas ratas tratadas con NGs entrecruzados con CBA, respuesta relacionada con la reducción de los enlaces disulfuro de la molécula CBA. Por otro lado, los NGs NHA 80/10/10-NMBA indujeron una disminución de la actividad SOD y GSSG-R en el hígado y riñón de las ratas tratadas, lo que podría indicar una acumulación de estos NGs no bio reducibles en dichos órganos pertenecientes al sistema fagocítico mononuclear. Sin embargo, el análisis histopatológico posterior indicó la ausencia de daño tisular, inflamación o cambios morfológicos relevantes en los órganos analizados.

El efecto antitumoral de la formulación de NGs seleccionada (NHA 80/15/5-CBA-PTX) fue evaluado en modelos xenográficos tumorales desarrollados tras la inyección subcutánea de células HeLa en ratones hembra atímicos. Cuando el volumen del tumor alcanzó un tamaño de $\sim 140 \text{ mm}^3$, los animales fueron divididos en cuatro grupos de tratamiento: control, PTX en solución, NHA 80/15/5-CBA NG sin PTX y NHA 80/15/5-CBA NG con PTX. Todos los

tratamientos se administraron subcutáneamente en los alrededores del tumor en una dosis única de 30 mg/kg (concentración de PTX equivalente). El peso corporal y la evolución del tumor fueron monitorizados durante todo el experimento. Al finalizar el tratamiento, los tumores extraídos se utilizaron para el análisis histopatológico e inmunohistoquímico (usando Ki67). Además, se evaluaron los parámetros bioquímicos y las defensas antioxidantes de los órganos pertenecientes al sistema fagocítico mononuclear.

Los resultados mostraron una mayor eficacia antitumoral de los NGs cargados con PTX, como corroboró la detección del antígeno Ki67. En las imágenes histológicas de los tumores tratados con PTX se observó un elevado contenido de figuras mitóticas defectivas y cuerpos apoptóticos. La inyección de los NGs no provocó cambios en los parámetros bioquímicos sanguíneos analizados, lo que permitió descartar un daño hepático o renal agudo después de la inyección de los NGs. Sin embargo, los resultados del análisis de las defensas antioxidantes mostraron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento en los órganos estudiados.

❖ Conclusiones

La vehiculización del paclitaxel mediante estos nanohidrogeles sintetizados a partir de combinaciones de monómeros capaces de responder a diferentes estímulos del medio intratumoral condujo a la optimización del tratamiento antitumoral con este fármaco.

De esta forma se confirmó el gran potencial que ofrecen dichos nanosistemas en la lucha contra el cáncer, capaces de actuar de forma más específica y controlada en el tiempo. Estos resultados abren la posibilidad de estudiar nuevas formas de administración del paclitaxel en humanos que permitan una mejora en la eficacia farmacológica así como una mayor calidad de vida de los pacientes tratados.

❖ Introduction

Cancer is the leading cause of death worldwide. The progress made in recent years have allowed the development of detection, diagnosis and treatment techniques in several types of cancer, improving the life quality of the patients and reducing the mortality rate.

However, the current incidence of cancer shows that the progress made during the last decades is not enough. Most antitumor drugs affect not only rapidly dividing cells, such as those in tumors, but also highly proliferative cells in normal tissues. This nonspecific drawback has limited the clinical application of most anticancer drugs.

In the last decades, nanotechnology has emerged to improve the therapeutic index of existing chemotherapies and radiotherapy treatments due to the advantages of these nanoscale size vehicles as drug delivery systems. Many vehicles types have been proposed as good candidates for their use as controlled delivery systems. However, nanohydrogels have emerged as diverse material platforms capable to stimulate and react to specific cellular responses on the molecular level. Thus, *smart nanohydrogels* can modify their structural composition/conformation specific cellular/extracellular in response to chemical, biochemical, or physical stimulus, promoting release of the active species to specific biological environment. This property facilitates the localized and sustained release of an active compound, thereby decreasing the number of administrations, preventing damages and allowing for relatively low doses, as they have the ability to target at the site of disorder in the damaged tissues.

❖ Objective

Paclitaxel (PTX) exhibits a significant activity against various solid tumors, including advanced ovarian carcinoma, metastatic breast cancer, non-small cell lung cancer, and head and neck carcinomas. However, its formulation with Cremophor®EL and ethanol, due to its high hydrophobicity, supposes several side effects such as hypersensitivity reactions, nephrotoxicity and neurotoxicity. For these reasons, development of alternative formulations of paclitaxel is needed in order to enhance aqueous solubility and decrease its side effects.

According to that, the **main goal** of this work was the *preparation, characterization and bioevaluation of nanohydrogels systems based on environmentally sensitive polymers (pH, temperature and redox response) to be used as controlled release devices of paclitaxel.*

❖ Methodology y results

Four different compositions were obtained by microemulsion polymerization technique, varying the amount of monomers and the crosslinking agent: two CBA-crosslinked NGs (NHA 80/15/5-CBA and NHA 80/10/10-CBA) and two NMBA-crosslinked NGs (NHA 80/15/5-NMBA and NHA 80/10/10-NMBA) were synthesized.

Results from TEM and DLS analysis showed a spherical shape and a nanometer size. Other *in vitro* characterization techniques included FTIR spectroscopy, thermogravimetry analysis, pH swelling study and zeta potential analysis. Thus, CBA-cross-linked NG showed negative surface charge (-2.75 mV from NHA 80/15/5-CBA and -9.98 mV from NHA 80/10/10-CBA) while NMBA-cross-linked NG revealed positive surface charge (9.44 mV from NHA 80/15/5-

NMBA and 10.96 mV from NHA 80/10/10-NMBA), which means different biological interactions of these nano-devices.

The PTX loading capacity, encapsulation efficiency and drug release were analyzed by HPLC. *In vitro* release studies were carried out at different pH levels and GSH amount. That *in vitro* release data were fitted to various mathematical kinetic models. Results revealed that PTX was successfully encapsulated in all NGs formulation (67.8% for NHA 80/15/5-CBA; 84.9% for NHA 80/10/10-CBA; 73.8% for NHA 80/15/5-NMBA and 72.2% for NHA 80/10/10-NMBA) and a faster drug release was observed at acid pH (pH 5), similar to those observed at lysosome compartment, whereas a fewer PTX amount was released from NGs at pH similar to plasma levels. PTX release from CBA-crosslinked NGs also revealed to be redox dependent, according to the reduction of its disulfide linkages in the presence of GSH. In all formulations, a rapid drug release was observed within the first 5-5.5 h, while it changed to a controlled release in the following hours. Furthermore, an incomplete PTX release was observed in the time of the experiment. This fact demonstrated that copolymeric NGs were able to reduce *burst* release and prolong the release of PTX for a long period of time, being a great promise for the development of drug administration.

Besides, cellular studies were developed in three tumor cell lines: MCF7, T47D and HeLa. Cellular uptake was measured by the fluorescent signal emitted from coumarin-6-loaded-NGs and cell viability was evaluated by MTT method. Results demonstrated that synthesized nanogels had low cytotoxicity, high cytocompatibility and an ability to assist the endocytic action of an antitumor drug. In addition, the effect of these nanosystems on the cell cycle was evaluated using flow cytometry, which revealed cell cycle arrest at the G₂/M phase in

the presence of PTX-loaded NGs. All these results indicate that these new NIPA-HEAA-2AAECM-based NGs could serve as antitumor drug delivery systems for PTX delivery.

The toxicological response of unloaded-NGs was assessed in *Wistar* female rats after their intravenous tail vein injection at a single dose of 20 mg/kg.

Erythrocytes, platelets, leukocytes (lymphocytes) and the derived blood indexes (MCV, MCH and MCHC) were analyzed by an automated hematology counter. Three different coagulation parameters (PT, Fbg and ATIII) and various biochemical parameters related to liver (AST, ALT, ALP) and kidney functions (BUN, CRE) were also analyzed. Hematology results suggested that NGs did not induce hemolysis or immune response and coagulation parameters did not show relevant changes after NGs injection. Moreover, biochemical blood parameters were all in accordance with reference normal values, which might be interpreted as the absence of severe hepatic and renal toxicity after the intravenous injection of these NGs.

Following the completion of treatment schedule, organs were removed and frozen for later antioxidant defenses analysis. One sample portion of each treatment group was post-fixed and stained by hematoxylin–eosin technique for histopathological analysis. A different response of antioxidant defenses was observed by varying the monomer NG composition. Thus, it was observed a modification in the spleen GSSG/GSH content and GSSG-R activity in CBA-cross-linked NG treated rats, related with the reduction of disulfide CBA network linkages. Besides, NHA 80/10/10-NMBA NG formulation induced a decrease in liver SOD activity and in liver and kidney GSSG-R activity, which may indicate an accumulation of these non-bioreducible nanohydrogels in those RES organs. However, histology images showed no tissue damage, inflammation or morphological change in those organs.

The *in vivo* anti-tumor effect of the selected NHA 80/15/5-CBA-PTX nanohydrogel formulation was investigated in female athymic nude mice bearing HeLa tumor xenografts. HeLa cells were subcutaneously injected. When the tumor volume reached $\sim 140 \text{ mm}^3$, mice were randomly allotted to four treatment groups: control, free PTX, unloaded-NHA 80/15/5-CBA NG and PTX-loaded NHA 80/15/5-CBA NG. All treatments were subcutaneously administered in the surroundings of tumor at a single dose of 30 mg/kg (PTX concentration equivalent). Body weight and tumor evolution were monitored during the whole experiment. Following the completion of treatment schedule, tumors were post-fixed for histopathological and immunohistochemical analysis (using Ki-67). Blood biochemistry parameters and antioxidant defenses were also evaluated.

Results from *in vivo* tumor evolution study showed a better antitumor effect in PTX-loaded NGs-treated mice, as Ki67 detection also demonstrated. Histological tumor images revealed a higher content of defective mitotic figures and apoptotic bodies in PTX-treated tumors than in control or unloaded-NG treated tumors. NGs injection did not change any biochemical blood parameters, which means no liver or kidney damage after NG injection. However, differences in antioxidant defenses in RES systems (liver, kidney and spleen) were observed among treatments, which may indicate an oxidative stress response after PTX injection.

❖ Conclusions

The passive targeting of paclitaxel using the nanohydrogels synthesized from a mixture of stimuli-responsive monomers revealed an optimization in the antitumoral treatment with this drug.

Our results confirmed the great potential of these systems within the cancer treatment, as they are able to function in a more specific and time-controlled way. Thus, the results obtained in the present work could serve as preliminary studies to design new ways of paclitaxel administration in humans, achieving an effectiveness improvement in the pharmacology of that drug and in the quality of the patient life.

1. CÁNCER EN LA ACTUALIDAD

En la actualidad, el cáncer se ha convertido en una de las principales causas de muerte a nivel mundial, independientemente de la situación económica de los países (Jemal *et al.*, 2011). A pesar de los avances conseguidos en los últimos años, la Organización Mundial de la Salud estima en 84 millones las muertes producidas por cáncer entre los años 2005 y 2015 a nivel mundial (Danhier *et al.*, 2010), registrándose 306 nuevos casos de muerte por cáncer en el año 2012, según el proyecto EUCAN desarrollado por el Observatorio de Cáncer Europeo (ECO) (Steliarova-Foucher *et al.*, 2015). La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) explica dicho incremento como consecuencia del crecimiento y envejecimiento de la población, así como la disminución en la mortalidad infantil y la mortalidad por enfermedades infecciosas en los países en desarrollo (American Cancer Society).

La incidencia de dicha enfermedad a nivel mundial varía en función del género, detectándose, a su vez, variaciones en el tipo de cáncer y la situación económica del país. A nivel global, estudios recientes demostraron una mayor incidencia de cáncer en hombres que en mujeres en todos los tipos de cáncer analizados (Jemal *et al.*, 2011). Sin embargo, en los países desarrollados, dicha diferencia entre géneros se reduce y se observan claras diferencias en la prevalencia de desarrollar distintos tipos de cáncer. En Europa, el tipo de cáncer más frecuentemente diagnosticado en hombres es el cáncer de próstata (382.000, 22,2% del total) seguido del cáncer de pulmón (291.000, 17,0%) y colorrectal (231.000, 13,5%). Sin embargo, en el caso de las mujeres, el tipo de cáncer que se desarrolla con mayor frecuencia es el cáncer de mama (421.000, 28,2% del total), seguido por el cáncer

colorrectal (204.000, 13,7%) y el de útero (82.000, 5,5%) (Ferlay *et al.*, 2010; Jemal *et al.*, 2011).

1.1. Características fisiológicas de los tumores sólidos

El conocimiento y la comprensión de la fisiología del tumor y de su microambiente son imprescindibles para el diseño de nuevas terapias contra el cáncer. Por ello, el uso reciente de modelos tumorales *in vitro* proporciona información muy valiosa sobre el comportamiento celular, la regulación del crecimiento tumoral, la migración de las células durante la metástasis y los procesos dependientes de la interacción entre células, como la morfogénesis (Håkanson *et al.*, 2014). Asimismo, el crecimiento de células en estructuras tridimensionales permite reproducir los vasos sanguíneos y la matriz extracelular propios de un tumor (Seo *et al.*, 2014), que aportarán nuevos datos sobre la fisiología del tumor y a su vez, ampliar el conocimiento de nuevas dianas terapéuticas.

Los avances conseguidos en los últimos años nos permiten reconocer patrones morfológicos y fisiológicos propios de un tejido tumoral (Fig. 1), como las anomalías vasculares, la hipoxia de las células tumorales o los cambios de pH, que pueden ser utilizados para conseguir un tratamiento más específico, y evitar así los efectos secundarios de la terapia convencional (Danhier *et al.*, 2010).

Un tumor sólido es considerado una entidad independiente con características similares a la de un órgano, ya que es originado a partir de poblaciones de células madre y está compuesto por varios tipos de tejidos: células cancerígenas, células del estroma no transformadas, vasos sanguíneos y espacio intersticial (Jain, 1994). Como cualquier tejido maduro, los tumores sólidos son capaces de renovar constantemente sus diferentes líneas

celulares a partir de una población de células madre, que se caracterizan por su prolongada vida media y la presencia de transportadores de la familia ABC, lo que explica la resistencia de los tumores a multitud de fármacos y otras toxinas (Danquah *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2013).

Los tumores surgen a partir de un crecimiento celular descontrolado, en el que la masa de células necesita un aporte de nutrientes y una eliminación constante de los productos de desecho (Narang & Varia, 2011). Dicho crecimiento tumoral también requiere una remodelación de la matriz extracelular, como demuestra la unión de fibroblastos, células endoteliales, células del músculo liso y células inmunitarias a la matriz extracelular de las células tumorales (Radisky *et al.*, 2011).

En los primeros estadios de desarrollo del tumor, el suministro de sangre procede predominantemente de los tejidos sanos adyacentes al tumor; sin embargo, cuando los tumores sólidos alcanzan un determinado tamaño (1-2 mm³), la hipoxia que sufren las células tumorales debido al elevado metabolismo tisular, la hipoxemia y la expansión celular, que incrementa la distancia de difusión del oxígeno para llegar a las células, es suplida por un proceso conocido como angiogénesis (Danquah *et al.*, 2011). Dicho proceso consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos que aportan los nutrientes y el oxígeno necesario para que las células tumorales continúen dividiéndose. Como consecuencia, la presencia de angiogénesis es vital para la supervivencia de las células tumorales y facilita su diseminación a través del organismo, lo que contribuye a la aparición de la metástasis (Bergers & Benjamin, 2003; Naumov *et al.*, 2006). Dicho proceso se encuentra altamente regulado por la presencia de varios factores, activadores e inhibidores de la angiogénesis, como por ejemplo, la presencia del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF), que estimula la sobreexpresión de otras proteínas pro-angiogénicas como el factor de crecimiento endotelial

(VEGF); el factor derivado de plaquetas (PDGF) o el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Carmeliet, 2000; Narang & Varia, 2011).

A pesar de dicha regulación, el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en el tumor es un proceso caótico y se caracteriza por la ausencia de células musculares lisas y pericitos en las paredes de los vasos (Eberhard *et al.*, 2000), inexistencia de inervaciones adrenérgicas, una membrana basal irregular (Paku & Paweletz, 1991), un endotelio discontinuo y la ausencia de plexos sinusoidales vasculares. Además, el complejo entramado vascular carece de la jerarquía propia de los vasos sanguíneos propios de los tejidos normales y presenta un patrón muy ramificado (Gillies *et al.*, 1999).

Por otro lado, el drenaje linfático dentro del tumor no es constante y presenta alteraciones en su estructura debido a la compresión que ejerce la masa tumoral sobre los vasos linfáticos, lo que contribuye a la presencia de turbulencias y un reflujo de la linfa en dichos vasos, favoreciendo el desarrollo de metástasis dentro el sistema linfático tras la invasión de las células tumorales (Danquah *et al.*, 2011).

El resultado de un drenaje linfático insuficiente y unos vasos sanguíneos irregulares es la acumulación de sustancias en el espacio intersticial del tumor, efecto llamado EPR (*efecto de permeabilidad y retención aumentada*) que unido a la capacidad de contracción del estroma tumoral, produce un aumento de la presión intersticial, modificando así los gradientes de presión implicados en el transporte normal de macromoléculas desde la luz de los vasos al medio intercelular (Heldin *et al.*, 2004). Varios estudios han demostrado que dicha situación se produce fundamentalmente en el centro del tumor (con una presión superior a 100 mmHg) (Gutmann *et al.*, 1992; Milosevic *et al.*, 2004), lo que favorece el movimiento del

fluido intersticial a través de los tejidos adyacentes y, a su vez, desplaza las sustancias terapéuticas lejos de los tumores diana.

Así mismo, el pH del medio extracelular es ligeramente inferior en el tumor que en los tejidos sanos. Se ha demostrado que en los tejidos sanos el pH se encuentra en torno a 7,4, mientras que en los tumores dicho parámetro puede oscilar entre 6-7 (Cardone *et al.*, 2005; Van Sluis *et al.*, 1999).

La disminución de pH y la disminución de la presión parcial de oxígeno en los tumores se encuentran íntimamente relacionadas, ya que la acidificación del medio extracelular se debe principalmente a la elevada tasa de glucólisis de las células tumorales en estado de hipoxia (Danhier *et al.*, 2010; Danquah *et al.*, 2011) y el transporte de los protones al compartimento extracelular por las bombas de ATP de las membranas celulares (Izumi *et al.*, 2003). Además de la glucólisis de las células tumorales, existen otros mecanismos implicados en la acidificación del medio extracelular como la hidrólisis del ATP, la producción del CO₂ y ácido carbónico, el metabolismo de glutamina y de los cuerpos cetónicos (Helmlinger *et al.*, 2002; Stubbs *et al.*, 2000; Vaupel, 2009). Este gradiente de pH generado en el tumor facilita la acumulación de fármacos sensibles a un medio ácido, como es el caso de la mitomicina C, y permite el uso de nuevas estrategias terapéuticas utilizando polímeros sensibles a pH (Stubbs *et al.*, 2000; Ulbrich & Subr, 2004).

En las últimas décadas, los avances conseguidos en el conocimiento de la biología del tumor han supuesto una mejora de los métodos de detección, diagnóstico y tratamiento convencionales del cáncer. Sin embargo, dichos avances continúan siendo insuficientes debido a las grandes limitaciones que aún existen en la terapia, como muestra la gran mortalidad y morbilidad asociadas a dicha enfermedad.

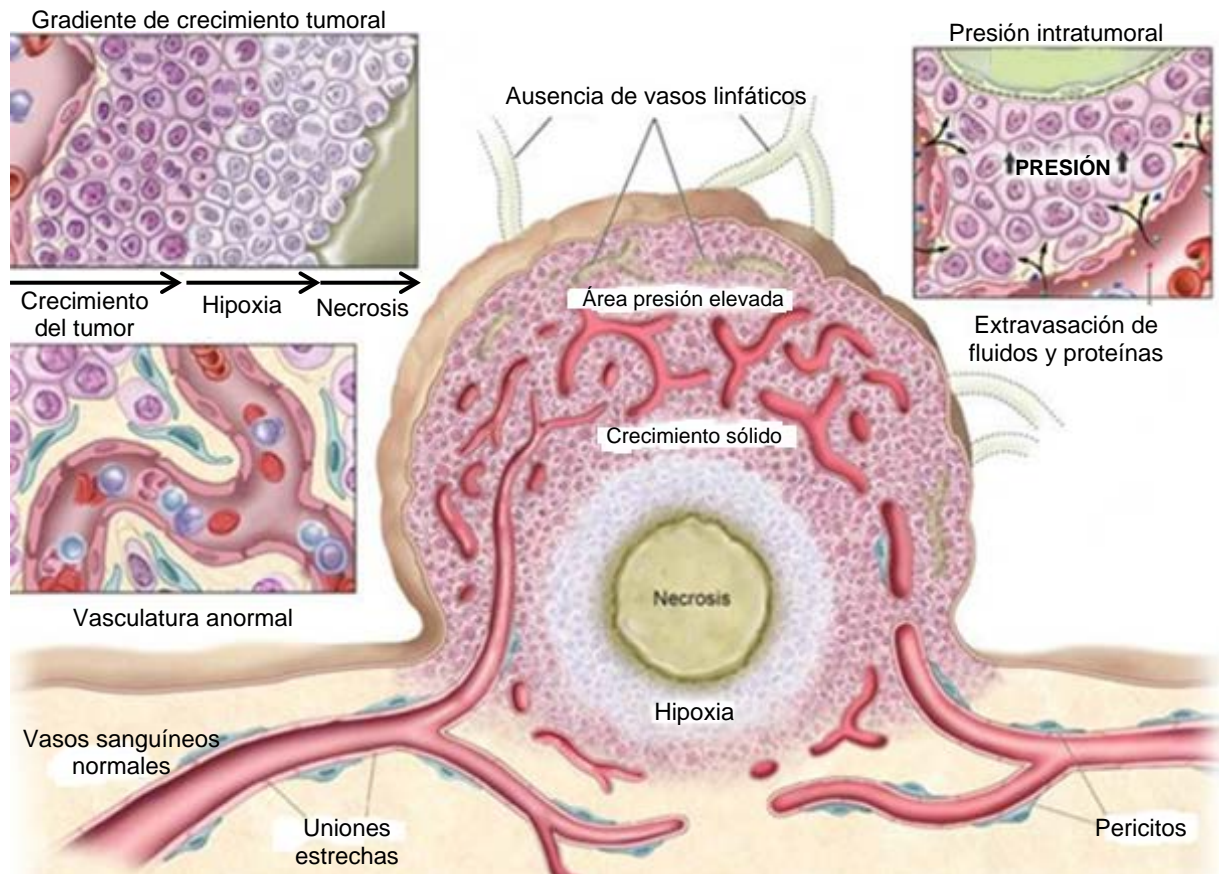


Figura 1. Características fisiológicas de un tumor sólido (Kobayashi et al., 2014).

1.2. Tratamientos convencionales en el cáncer

Actualmente, las estrategias terapéuticas de la mayoría de los tipos de cáncer se basan en una combinación de métodos quirúrgicos, para la resección total o parcial de los tumores, radioterapia y quimioterapia, los cuales se basan en mecanismos inespecíficos, ya que son incapaces de discernir entre las células normales y las células cancerosas (Steichen *et al.*, 2013).

La resección quirúrgica suele ser el tratamiento de elección en los estadios iniciales o intermedios de tumores sólidos localizados, asociados a una región linfática (Wolinsky *et al.*, 2012). Además, dicho tratamiento ha demostrado tener un efecto paliativo en pacientes con tumores difusos o tumores en estadios tardíos (Fornaro *et al.*, 2010; Sciubba *et al.*, 2010).

Sin embargo, a pesar de la resección quirúrgica completa del tumor, siempre existe la posibilidad de que permanezca oculta una pequeña masa microscópica, por lo que dicho tratamiento suele alternarse con quimioterapia y radioterapia, con el objetivo de evitar una recidiva tumoral posterior (Wolinsky *et al.*, 2012). No obstante, el uso rutinario de dichas terapias adyuvantes está desaconsejado en la actualidad, ya que pueden causar una toxicidad aguda en el paciente debido a la eficacia limitada que presentan (Wolinsky *et al.*, 2012). Como alternativa, la terapia localizada mediante braquiterapia ha demostrado resultados positivos en aquellos pacientes en los que no existe la posibilidad de extracción del tumor y se quiera prevenir la recurrencia del mismo (Wolinsky *et al.*, 2012). Dicho tratamiento consiste en la implantación subcutánea de semillas sensibles a la radiación en los alrededores del tumor o en los márgenes de la resección quirúrgica. Actualmente, se administra de forma rutinaria en los tumores de próstata de crecimiento lento y ha demostrado su utilidad en otros tipos de cáncer como el de pulmón, cervix y mama (Odell *et al.*, 2010; Polgar & Major, 2009; Toita, 2009).

Por otro lado, la radioterapia se emplea como alternativa a la resección quirúrgica en pacientes con tumores en estadios tardíos, principalmente en cáncer de próstata, mama y pulmón, o en aquellos pacientes en los que no sea posible llevar a cabo un proceso quirúrgico (Wolinsky, *et al.*, 2012). Los avances técnicos recientes como la radioterapia guiada por imagen (IGRT) y la radioterapia de intensidad modulada (IMRT) permiten establecer tratamientos más adecuados y reducir la dosis de radiación de los tejidos sanos (Jaffray, 2012). A pesar de ello, la radioterapia sigue teniendo gran cantidad de limitaciones y muestra una supervivencia cinco veces menor que los métodos quirúrgicos (Wolinsky *et al.*, 2012). Algunas de las razones de estas limitaciones es el uso de radiofármacos que presentan gran cantidad de efectos secundarios, la ausencia de potentes biomarcadores

predictivos y el uso de pacientes inadecuados en los estudios clínicos (Higgins *et al.*, 2015). Además, estudios recientes han demostrado que la radiación iónica afecta de forma indirecta a las células sanas provocan un efecto conocido como *bystander*, caracterizado por un incremento de la frecuencia de apoptosis, disminución del tamaño del núcleo, rotura de la cadena de ADN y las consecuentes mutaciones, alteraciones en la actividad y número de proteínas reguladoras y enzimas, así como un incremento de la posibilidad de transformación oncogénica. Dichas respuestas generadas en las células sanas tras la radiación son atribuidas a las señales intercelulares transmitidas a través de las uniones *gap* y a los factores liberados en el medio de crecimiento celular (Marín *et al.*, 2015). Por todo ello, es necesario reducir la dosis de radioterapia utilizada y combinarla con otras técnicas como, por ejemplo, la quimioterapia.

En el caso de la quimioterapia, su uso está aconsejado en pacientes que se encuentran en un estadio intermedio o tardío de cáncer y su administración se puede realizar antes o después de la resección quirúrgica, acompañada o no de radioterapia (Wolinsky *et al.*, 2012). La mayoría de los fármacos anticancerígenos comúnmente usados presentan una baja solubilidad en medio acuoso y se degradan fácilmente (Vergaro *et al.*, 2011), lo que implica necesariamente una modificación química de los mismos o una administración conjunta con tensioactivos, como el uso de Cremophor®/etanol en el caso de la administración del paclitaxel (Gelderblom *et al.*, 2001). Sin embargo, ambas estrategias pueden conducir a una baja biodisponibilidad, reacciones de sensibilización y otros efectos secundarios no deseados (Gelderblom *et al.*, 2001). Igual que ocurre con la radioterapia, la quimioterapia no es un tratamiento específico, de forma que la administración intravenosa de los principios activos conlleva una acumulación de grandes cantidades de estos fármacos en los tejidos sanos produciendo efectos secundarios severos en los

pacientes y una toxicidad elevada (Wolinsky *et al.*, 2012). Este hecho se debe a que los mecanismos citotóxicos y citostáticos de los agentes terapéuticos no son selectivos y, como consecuencia de su bajo índice terapéutico, se suelen administrar en dosis muy elevadas (Vergaro *et al.*, 2011). Por ejemplo, en estudios realizados en ratones como modelos tumorales de pulmón se ha demostrado que, tras el tratamiento con paclitaxel, más de la mitad de la dosis inicial del fármaco fue eliminada durante las primeras horas del experimento, y tan solo el 0,5% de la dosis total permaneció localmente disponible en los alrededores del tumor (Sparreboom *et al.*, 1996).

Además de las limitaciones terapéuticas mencionadas, el uso de radiación y quimioterapia en el tratamiento del cáncer supone unos elevados costes económicos, debido al material empleado, la necesidad de un equipo médico especializado en la administración de dichas terapias, así como un prolongado seguimiento y tratamiento de los efectos secundarios (Wolinsky *et al.*, 2012).

1.3. Nuevas estrategias para el tratamiento del cáncer

El objetivo final de la terapia del cáncer consiste en aumentar la calidad de vida de los pacientes, reduciendo la toxicidad sistemática de la quimioterapia actual e incrementando la especificidad de acción de los agentes anticancerígenos en los órganos diana. Los avances logrados en los últimos años permiten reconocer algunos de los receptores o mediadores implicados en las cascadas de señalización, cuya sobreexpresión o desregulación está presente en las células cancerosas. De esta forma, dichos componentes celulares podrían actuar como dianas farmacológicas de nuevos agentes terapéuticos favoreciendo un tratamiento más selectivo sobre las células cancerosas y evitando los efectos secundarios asociados a los daños producidos en las células y tejidos sanos.

Uno de los principales problemas de las células tumorales es la posibilidad de desarrollar metástasis y diseminarse por todo el organismo. Este proceso de metástasis se puede originar de varias formas: invasión de un tejido normal cercano a la zona del tumor, infiltración de las células tumorales en el sistema linfático o invasión del torrente sanguíneo. Sin embargo, para que la metástasis tenga éxito, se tienen que tener en cuenta los siguientes factores: la capacidad de migración de las células tumorales; las interacciones entre las células tumorales y el órgano diana; la estructura del tejido diana y la biomecánica del sistema sanguíneo, ya que van a determinar la biodistribución de las células tumorales circulantes; y la adquisición de determinantes moleculares pro-metastásicos, ausentes en el tejido tumoral de partida. La identificación reciente de un gran número de moléculas implicadas en estos procesos ha permitido diseñar estrategias de vehiculización de fármacos con el objetivo de reducir el desarrollo de metástasis en los tumores, algunos de ellos en las últimas fases clínicas (Palmer *et al.*, 2011). Por ejemplo, Cilengitide® (EMD121974; Merck) es un inhibidor de la migración celular en fase III de estudio usado en pacientes con cáncer de próstata que actúa como antagonista de las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ presentes en la matriz extracelular de las células tumorales (Alva *et al.*, 2010). Otro ejemplo es el Bosutinibi® (SKI-606; Wyeth) que es un fármaco en fase III de estudio usado en pacientes con leucemia mielógena crónica, que actúa como inhibidor de las quinasas Src y Abl, implicadas en la autonomía y el crecimiento celular (Boschelli *et al.*, 2010).

Por otro lado, se han identificado varias dianas terapéuticas específicas del tipo de tumor desarrollado, las cuales están implicadas en las distintas fases de evolución de los tumores. Como consecuencia de ello, los nuevos agentes terapéuticos diseñados son dirigidos a los marcadores asociados con un tipo de cáncer concreto en lugar de utilizar dianas más

generales, como se describe brevemente a continuación en los cuatro tipos de cáncer más frecuentes:

▪ **Cáncer de pulmón**

Según los últimos datos obtenidos por el Observatorio de Cáncer Europeo, el cáncer de pulmón representa el 17% del total de los tipos de cáncer desarrollados en el hombre, lo que supuso 291.000 nuevos casos en Europa en 2008 (Ferlay *et al.*, 2010) y más de 1,4 millones de muertes al año a nivel mundial (Wood *et al.*, 2015).

La exposición diaria a sustancias carcinogénicas como el tabaco modifica el patrón de desarrollo de los cánceres pulmonares, ya que las múltiples mutaciones que se producen en el ADN inactivan su capacidad de autoreparación. Por ello, el cáncer de pulmón es una enfermedad muy heterogénea en la que se distinguen distintos tipos de cáncer en función del patrón de desarrollo: carcinoma de pulmón de células pequeñas (microcítico) y carcinoma de pulmón de células no pequeñas (no microcítico) (Wood *et al.*, 2015). Gracias a los estudios en genómica y proteómica llevados a cabo en los últimos años es posible identificar biomarcadores tumorales característicos de cada tipo de cáncer, así como explicar los mecanismos de resistencia a los fármacos.

Dos de los oncogenes mutados con más frecuencia en el adenocarcinoma son el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) y el oncogen KRAS. Se ha visto que en el 10-15% de los carcinomas de pulmón no microcíticos aparecen mutaciones en el gen que transcribe para EGFR y su presencia tiene peor pronóstico, cuyo tratamiento convencional se basa en una combinación de carboplatino–paclitaxel. Actualmente, la terapia convencional está siendo sustituida progresivamente por la terapia dirigida con fármacos

como el Gefitinib® (inhibidor de la tirosina quinasa del receptor EGFR) y el Vandetanib® (inhibidor de varias señales: VEGF, EGFR and RET).

▪ **Cáncer colorrectal**

A pesar de los avances conseguidos en los últimos años, el cáncer colorrectal continúa siendo uno de los tipos de cáncer más frecuente en hombres (231.000, 13,5%) y mujeres (204.000, 13,7%) (Ferlay *et al.*, 2010), debido principalmente a la elevada tasa de recurrencia y al desarrollo de la metástasis. Por ello, gran parte de las nuevas terapias dirigidas se basan en la destrucción de las células madre del cáncer, consideradas un subgrupo especial de células en el carcinoma colorrectal y caracterizadas por la expresión del marcador CD34 en su superficie. Algunas de estas terapias se dirigen a la cascada de señalización *Wnt*, la cual parece jugar un papel crucial en la carcinogénesis colorrectal (Song *et al.*, 2015).

▪ **Cáncer de próstata**

El cáncer de próstata continúa siendo el tipo de cáncer más frecuente en hombres (22,2% de los casos de cáncer), responsable de más de 382.000 muertes en Europa en 2008 (Ferlay *et al.*, 2010).

Actualmente la determinación del antígeno sérico específico de próstata (PSA) ha demostrado tener ciertas limitaciones en el *screening* rutinario debido a su ineficacia como marcador predictivo en un gran número de pacientes (Cetnar & Beer, 2014). Por ello, el estudio de nuevos biomarcadores del cáncer de próstata permite desarrollar en un futuro terapias dirigidas capaces de ejercer un efecto antitumoral más específico. Así pues, el reciente descubrimiento de la sobreexpresión de genes como el PCA3 o la fusión de los

genes Tmprss2-ETS en el cáncer de próstata supone un gran avance en la predicción de este tipo de tumores.

Además de los avances conseguidos en la predicción, varios estudios actuales se centran en el desarrollo de nuevas técnicas para el tratamiento local de la enfermedad como la fototerapia dirigida a los vasos sanguíneos (vaporización fotodinámica), la cual ha demostrado resultados muy positivos en otros campos de la medicina: ginecología, gastroenterología y dermatología (DeLongchamps, 2014). Dicha técnica consiste en la administración intravenosa de una molécula, concretamente WST11, que al ser activada por un haz de luz láser produce una isquemia en el tumor mediante vasoconstricción y lisis de las células endoteliales.

En pacientes con riesgo a padecer metástasis a partir del cáncer de próstata y resistentes a la castración, la quimioterapia actual se basa en la administración continuada de docetaxel (75 mg/m^2), combinado con prednisona (10 mg/día) cada 3 semanas, y un tratamiento supresor de andrógenos (Cetnar & Beer, 2014). El uso de nuevas terapias hormonales como el acetato de abiraterona (Zytiga®) o el MDV 3100 podrían desplazar dicha quimioterapia en un futuro cercano. Dichos compuestos son inhibidores de la biosíntesis de andrógenos. El primero de ellos bloquea el enzima citocromo P450 c17, clave en la producción de testosterona, mientras que el segundo impide la translocación del receptor de andrógenos al núcleo, evitando así su unión al ADN (DeLongchamps, 2014).

▪ **Cáncer de mama**

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente en mujeres a nivel mundial, siendo responsable de más de 129.000 muertes (17 % del total de muertes registradas por cáncer) en Europa en el año 2008, de las cuáles 6.000 mujeres eran españolas, según las últimas

estimaciones realizadas por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (Ferlay *et al.*, 2010).

El carcinoma invasivo de mama se ha clasificado tradicionalmente en varios tipos, teniendo en cuenta las características histológicas del tumor (tamaño del tumor, presencia de nódulos y presencia de metástasis). Debido a la composición molecular tan heterogénea que muestran los distintos tipos de carcinoma de mama, se pueden diferenciar varios subtipos en función de la presencia de receptores de estrógenos (ER), receptores de progesterona (PgR) y receptores del factor de crecimiento epidermal humano (HER 2). Dichos biomarcadores permiten determinar el grado de supervivencia de un individuo, siendo el triple negativo (ER-/PgR-/HER2-) el de peor pronóstico. Por otro lado, la detección del marcador de proliferación Ki67, así como la expresión de otros marcadores como el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) y la citoqueratina (CK) 5/6 permiten diferenciar las distintas variantes de carcinoma: luminal A y luminal B y, de esta forma, seleccionar el tipo de tratamiento más adecuado para estos pacientes (Di Leo *et al.*, 2015).

Actualmente existen gran cantidad de dianas farmacológicas en varias fases clínicas de estudio que nos permiten dirigir los agentes terapéuticos de forma más específica hacia el interior o hacia el estroma del tumor. Las nuevas dianas intratumorales descubiertas incluyen el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento de insulina (IGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y su receptor (c-MET), así como varios mensajeros secundarios (PI3K/AKT/mTOR) (Curigliano, 2012; Di Leo *et al.*, 2015). Por otro lado, los componentes del estroma que pueden actuar como posibles dianas farmacológicas son: el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), las

metaloproteinasas de la matriz (MMP) y el ligando inductor de apoptosis relacionado con la necrosis tumoral (TRAIL), entre otros (Curigliano, 2012; Di Leo *et al.*, 2015).

El tipo de tratamiento administrado en el cáncer de mama depende de varios factores: la respuesta a tratamientos anteriores, el estadio en el que se encuentra el tumor, el subtipo histológico y molecular (la expresión de biomarcadores), la presencia de síntomas y la edad de la paciente (estado menopáusico), entre otros (Di Leo *et al.*, 2015). Como ya se ha indicado anteriormente, la resección quirúrgica y la radioterapia juegan un papel importante en aquellos tumores en estadios tempranos, mientras que la quimioterapia suele ser el tratamiento de elección en las fases más avanzadas del cáncer. En el caso de la quimioterapia, los fármacos de elección suelen ser aquellos que pertenecen a la familia de las antraciclinas y los taxanos (Goldhirsch *et al.*, 2011).

1.4. Paclitaxel

Los taxanos representan una importante familia de fármacos antineoplásicos, que exhiben un efecto citotóxico en una amplia variedad de tumores, entre los que destacan el paclitaxel (PTX) y el docetaxel (Javeeda *et al.*, 2009).

El paclitaxel fue descubierto en 1960 al comprobar que el extracto procedente del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*) presentaba efectos anticancerígenos (Wani *et al.*, 1971). A pesar de la escasez de dicho recurso natural, el agente activo fue aislado y recibió el nombre de paclitaxel (Taxol™; Bristol-Myers Squibb Company, Princeton, NJ). El paclitaxel es un diterpeno (Fig. 2) con un peso molecular de 853 Da, altamente hidrófobo (Singla *et al.*, 2002). Su mecanismo citotóxico se basa en la unión a los microtúbulos, concretamente al extremo N-terminal de la subunidad β de la tubulina, suprimiendo el dinamismo propio de

dichas estructuras. Como consecuencia de esta unión, la división celular queda detenida en la fase G₂/M, se modifica la forma normal de las células, se altera la motilidad celular y el transporte intracelular (Marchetti *et al.*, 2002). Estudios antitumorales recientes parecen indicar que el paclitaxel también ejerce un efecto sobre el sistema inmune y, por tanto, su mecanismo de acción no se basa estrictamente en la inhibición de la división celular. Por ejemplo, se ha demostrado que el paclitaxel es capaz de regular la producción de diversas citoquinas y suprimir o estimular diferentes tipos de linfocitos, inhibiendo el desarrollo de algunas neoplasias y enfermedades autoinmunes (Javeeda *et al.*, 2009).

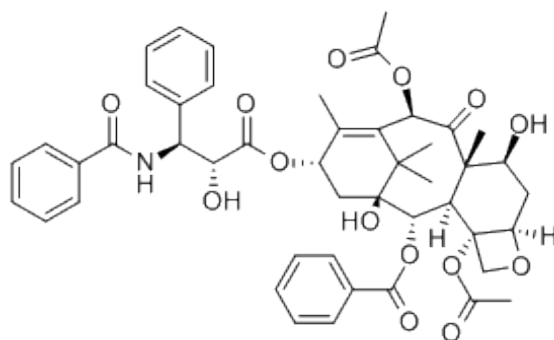


Figura 2. Estructura química del paclitaxel.

El paclitaxel ha mostrado una gran eficacia en una amplia variedad de tipos de cáncer como el cáncer de mama, pulmón, cuello de cérvix y ovario. Otros tipos de cáncer menos comunes como el cáncer de endometrio, testículo, cáncer esofágico y el sarcoma de Kaposi han revelado resultados positivos ante el tratamiento único con PTX o en combinación con otros agentes terapéuticos (Spratlin & Sawyer, 2007).

Debido a su escasa solubilidad en un medio acuoso y la posibilidad de disolverlo en disolventes orgánicos, el paclitaxel es administrado en una formulación compuesta por un mezcla homogénea de Cremophor EL[®] (aceite de castor) y etanol, diluido en solución salina o dextrosa (5%); formulación que permanece estable durante 5 años a 4°C. Sin embargo, la

administración de dicha formulación se encuentra asociada a una serie de efectos secundarios. El uso del Cremophor EL® en dosis superiores a las utilizadas en la administración de otros fármacos produce reacciones de hipersensibilidad, nefrotoxicidad y neurotoxicidad. Además, su acción sobre las células endoteliales y musculares causa vasodilatación, dificultad en la respiración, letargia e hipotensión (Singla *et al.*, 2002; Spratlin & Sawyer, 2007). Estas reacciones anafilácticas descritas se han reducido con el uso de corticosteroides (dexametasona) y antihistamínicos (antagonistas de los receptores H₁- H₂) antes de la administración de paclitaxel (Spratlin & Sawyer, 2007). Por otro lado, la elevada concentración de fármaco recomendado en las formulaciones clínicas (0,3-1,2 mg/ml) crean una solución inestable que tiende a precipitar en un medio acuoso.

La dosis de PTX generalmente aceptada se encuentra en el intervalo de 200-250 mg/m² y suele ser eliminado por heces, con una farmacocinética muy variable, ya que la vida media de dicho principio activo se sitúa entre las 1,3-8,6 horas y los principales órganos donde se acumula son el hígado, riñón, bazo y los pulmones, (Singla *et al.*, 2002; Spratlin & Sawyer, 2007).

1.5. Aplicaciones de la nanomedicina en la terapia del cáncer

En las últimas décadas se ha producido un amplio desarrollo de la nanotecnología en el campo de la medicina, con diversas aplicaciones en el ámbito farmacéutico, detección y diagnóstico de enfermedades, tratamiento del cáncer y regeneración tisular, entre otros (Etheridge *et al.*, 2013). El uso tan extendido de la nanotecnología en medicina se debe principalmente a las ventajas que ofrecen los materiales de tamaño nanométrico, ya que las

propiedades físico-químicas, la relación superficie/tamaño y las interacciones fisiológicas de dichos materiales se ven modificadas a escala nanométrica.

Actualmente existe una gran variedad de sistemas nanométricos diseñados para diversas aplicaciones biomédicas. A continuación se explica brevemente las aplicaciones de estos nanosistemas en la enfermedad del cáncer:

- **Imagen y detección del cáncer**

La aplicación de nanocristales o nanopartículas conocidas como *quantum dots* (QDs) permite estudiar la biología del cáncer y determinar la eficacia de las terapias antitumorales. Se trata de sondas fluorescentes de un tamaño comprendido entre 1-100 nm, lo que las hace únicas y tremendamente efectivas frente al uso de tintes orgánicos comunes y proteínas fluorescentes convencionales (Kawasaki & Player, 2005). Dependiendo de su tamaño, dichas partículas son excitadas con una longitud de onda variable y emiten luz en distintas regiones del espectro (Vasudevana *et al.*, 2015). Su elevada estabilidad, la gran capacidad de emisión de fluorescencia y la variabilidad de longitud de onda de emisión convierte a estas nanopartículas en excelentes alternativas de uso para la imagen *in vivo* a distintos niveles (molecular, celular y tisular) (Vasudevana *et al.*, 2015).

Otro tipo de partículas con capacidad de detección de tumores pequeños son las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro (SPIONs) ya que actúan como agentes de contraste muy potentes en la técnica de imagen por resonancia magnética. Las SPIONs adquieren propiedades paramagnéticas al aplicar un campo magnético externo y el contraste de imagen se consigue con pequeñas cantidades de dichas nanopartículas, por lo que se reduce considerablemente la toxicidad asociada a este tipo de técnica. Además, la superficie de estas partículas se puede modificar para incrementar su biocompatibilidad y

biodegradación en las diferentes aplicaciones biomédicas (Nazir *et al.*, 2014; Veisheh *et al.*, 2010).

- **Liberación de fármacos**

Los nanosistemas ofrecen gran cantidad de ventajas en la liberación de fármacos, ya que son capaces de modular los perfiles farmacocinéticos de diversos agentes terapéuticos, incrementando así el índice terapéutico y, como consecuencia, disminuyendo las dosis necesarias para que se consiga el efecto deseado. La protección que ejerce estos sistemas sobre el fármaco encapsulado permite incrementar su estabilidad y prolongar su presencia en la circulación sanguínea, ya que se reduce considerablemente la hidrólisis enzimática que sufren los fármacos convencionales. Por otro lado, los nanosistemas son capaces de modificar la biodistribución del compuesto activo y liberarlo de forma controlada en el sitio específico de acción (Wicki *et al.*, 2015).

En los últimos años, el avance conseguido en la nanotecnología ha permitido el desarrollo de nuevas formulaciones de fármacos antineoplásicos que mejoran el índice terapéutico y disminuyen los efectos secundarios de la terapia convencional.

Un ejemplo de nanotecnología aplicada a la liberación de fármacos anticancerígenos es el nab-paclitaxel (ABI 007 o Abraxane®; Celgene Inc., Odenton, MD), que consiste en la encapsulación del paclitaxel (a una concentración del 3-4%) en nanopartículas de albúmina. Estas nanopartículas presentan un núcleo hidrófobo, formado por los aminoácidos de albúmina cargados negativamente, a los que se une el paclitaxel, y una envoltura hidrófila, constituyendo una estructura micelar. Las interacciones electrostáticas que se establecen entre las cadenas de albúmina permite la formación de una suspensión homogénea. Esta suspensión de nanopartículas coloidal de 130 nm es administrada por vía intravenosa y una

vez que se ponen en contacto con el torrente sanguíneo, las nanopartículas son dispersadas en complejos de unos 10 nm. El uso de este nanosistema comercializado ha demostrado resultados prometedores, pues se ha visto una mejora significativa en el tratamiento del cáncer de mama metastásico y en otro tipo de cánceres, tales como el cáncer de páncreas metastásico, el cáncer de pulmón de células no microcítico y el melanoma metastásico (Viúdez *et al.*, 2014).

En el diseño de nanosistemas capaces de liberar fármacos antineoplásicos se deben tener en cuenta los siguientes requisitos (Lehner *et al.*, 2013):

- Controlar el tamaño de la partícula, ya que puede modificar la biodistribución del fármaco encapsulado, reduciendo su biodisponibilidad. Se ha comprobado que partículas de un tamaño mayor a 200 nm pueden ser eliminadas por filtración esplénica mientras que aquellas menores de 10 nm son eliminadas por el sistema de filtración renal (Moghimi *et al.*, 2001). Además, el tamaño de los nanosistemas determina el mecanismo de entrada en las células: las partículas menores de 500 nm pueden ser internalizadas por endocitosis mientras que aquellas superiores a 500 nm podrían entrar en las células mediante fagocitosis (Rejman *et al.*, 2004). Asimismo, el tamaño nanométrico favorece la acumulación de estos nanosistemas en el entorno tumoral debido al efecto de retención y permeabilidad aumentada (EPR) propia de la desestructuración vascular de los tumores sólidos (Xu *et al.*, 2015).
- Asegurar la biocompatibilidad, de forma que el beneficio alcanzado supere al riesgo que conlleva la administración de estos nanosistemas. A pesar del enorme desarrollo de la nanomedicina en los últimos años y la efectividad mostrada *in vivo* e *in vitro* de

muchos de los nanosistemas diseñados, el número de dichos transportadores de fármacos se reduce considerablemente durante las fases clínicas. La elevada variabilidad que se consigue modificando las propiedades de los nanomateriales dificultan su caracterización antes y después de la administración. Por ello, resulta imprescindible mejorar la calidad de estos nanosistemas mediante el desarrollo de normas bien definidas y reproducibles (Wicki *et al.*, 2015). De este modo, surge la nanotoxicología como un campo de investigación independiente cuyo objetivo es el estudio de los problemas de toxicidad que el uso de estos nanomateriales puede producir en la salud humana y el medio ambiente (Lehner *et al.*, 2013; Veisoh *et al.*, 2010; Wicki *et al.*, 2015).

- Evitar una respuesta inmune y reducir las interacciones con las proteínas plasmáticas.

Después de su administración intravenosa, los nanosistemas interaccionan directamente con la sangre, una solución heterogénea que puede inducir la aglomeración de las partículas y la unión de proteínas plasmáticas y/o células sanguíneas (opsonización). Dicha unión inespecífica viene determinada principalmente por la carga eléctrica y el carácter hidrófobo que muestra la superficie de las partículas. Por ejemplo, las partículas hidrófobas cargadas positivamente son rápidamente secuestradas por el sistema retículo endotelial (RES) reduciendo su tiempo de residencia en sangre (Veisoh *et al.*, 2010).

- Conseguir que el tiempo de residencia en la circulación sanguínea sea la óptima para las aplicaciones específicas que se quieran conseguir en cada tipo de tratamiento. Una de las estrategias más utilizadas para ampliar el tiempo de residencia en sangre consiste en unir polietilenglicol (PEG) a la superficie de los nanosistemas, ya que la naturaleza hidrófila del PEG dificulta la opsonización, por impedimento estérico, y el secuestro de los nanosistemas por el sistema retículo endotelial (Yang *et al.*, 2014).
- Aumentar la especificidad de acción de los agentes terapéuticos limitando su liberación de manera exclusiva en las células diana. Por este motivo, en los últimos años se han utilizado nuevas estrategias en la obtención de nanosistemas como son: la vehiculización activa y el uso de polímeros sensibles a estímulos (Fig. 3).

En el primer caso, las moléculas unidas a la superficie de los nanosistemas (anticuerpos, proteínas, péptidos, aptámeros) (Bertrand *et al.*, 2014) actúan como ligandos, capaces de unirse a los biomarcadores sobreexpresados en las células tumorales y, como consecuencia, facilitan la internalización celular del nanosistema por el mecanismo de endocitosis (Xu *et al.*, 2015).

En el segundo caso, el uso de polímeros capaces de responder a estímulos físicos y químicos concretos permite liberar el fármaco de forma exclusiva bajo las condiciones propias del microambiente tumoral (Fleige *et al.*, 2012).

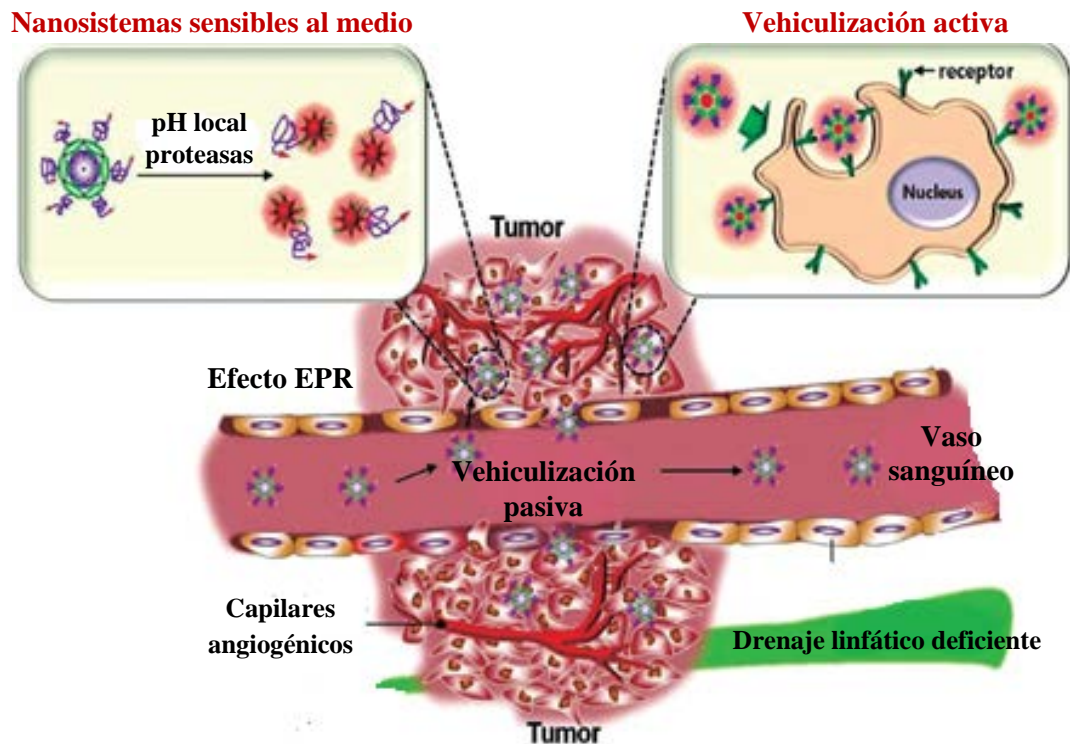


Figura 3. Estrategias de vehiculización activa y pasiva de nanosistemas para aumentar la especificidad de acción (Park, K., 2012).

- Liberar el fármaco de forma controlada en el tiempo y disminuir así la dosis de fármaco necesaria y los efectos secundarios asociados a su administración.

El principal problema que presentan los sistemas convencionales de administración de medicamentos es el pobre control que ejercen sobre las concentraciones necesarias de dichas sustancias en la diana terapéutica. Este hecho provoca una alternancia de períodos de toxicidad, si la concentración supera la máxima tolerable (CMT), y de ineficacia, en el caso de no alcanzar la concentración mínima eficaz (CME) (Fig. 4) (Freiberg & Zhu, 2004).

Sin embargo, la administración de fármacos mediante sistemas de liberación controlada permite mantener durante tiempos controlados y prolongados la

concentración del principio activo dentro del nivel óptimo, sin llegar a alcanzar niveles tóxicos e ineficaces (Fig. 4).

En general, la tasa de liberación del fármaco desde los nanosistemas va a depender de varios factores: la cantidad de fármaco adsorbido a la superficie del nanosistema, la solubilidad del agente terapéutico, la difusión del fármaco a través de la matriz del nanosistema, la velocidad de erosión o degradación de la dicha matriz y la combinación de dichos procesos (Singh & Lillard, 2009).

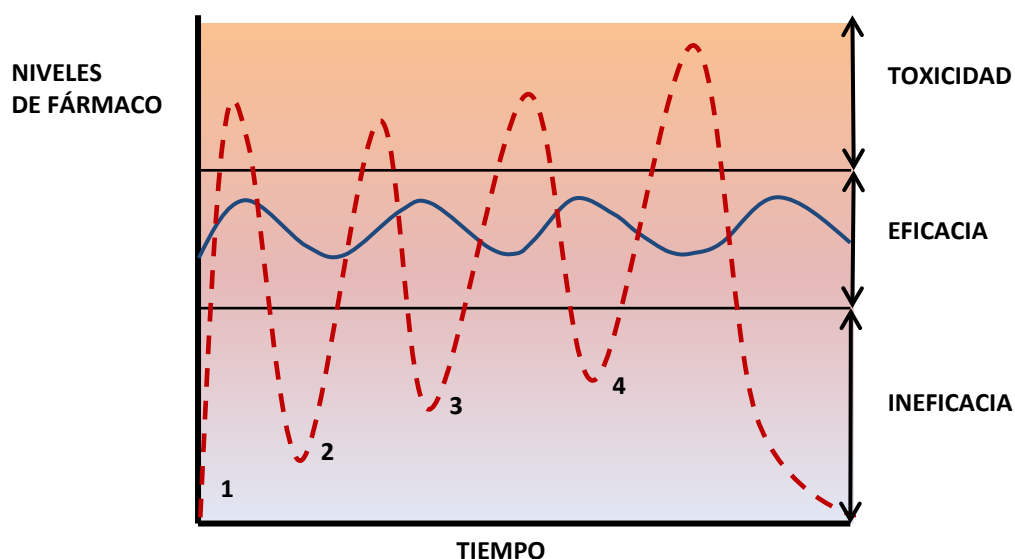


Figura 4. Comparación de un sistema de liberación controlada (línea azul continua) con un tratamiento convencional de cuatro dosis sucesivas (línea roja discontinua).

En las últimas décadas, el amplio desarrollo de nanotransportadores para la vehiculización de fármacos ha dado lugar a una amplia variedad de nanoestructuras, incluyendo vectores virales, fármacos conjugados, nanosistemas lipídicos, nanosistemas poliméricos y nanopartículas inorgánicas como SPIONs, QDs o partículas metálicas (Fig. 5).

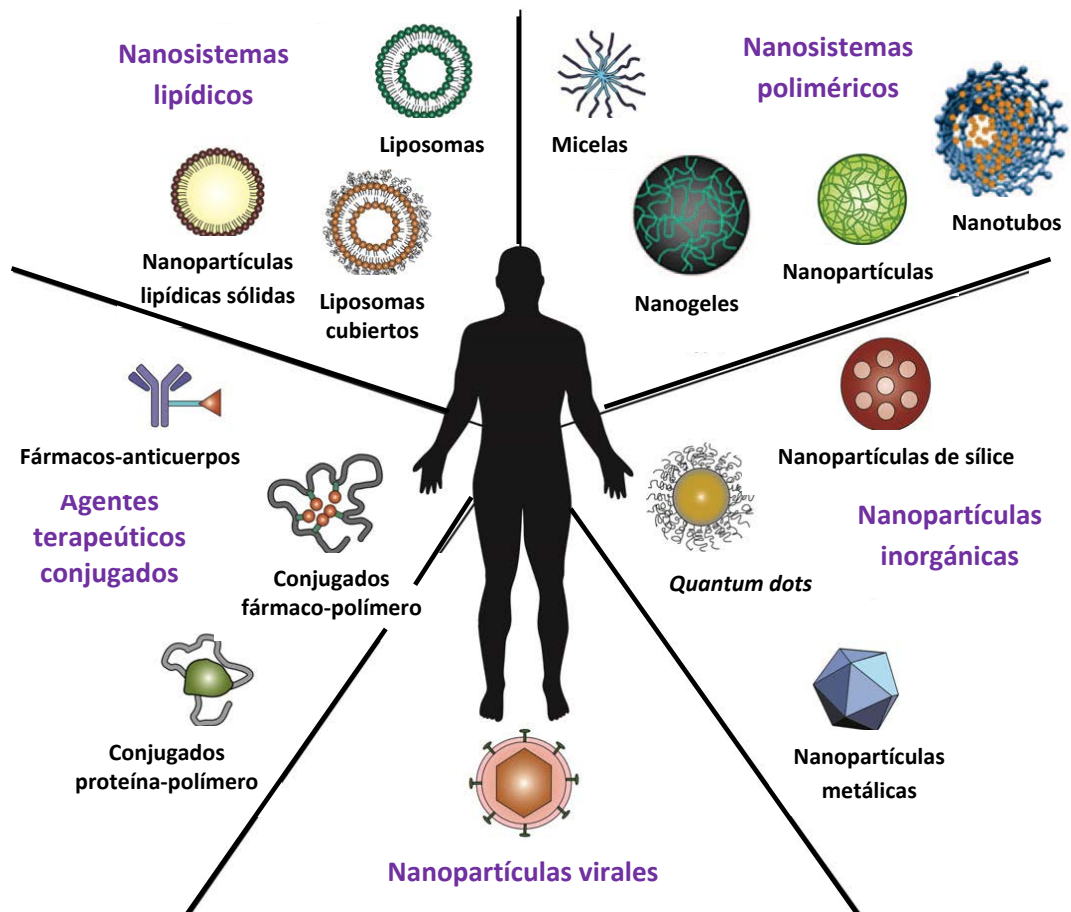


Figura 5. Ejemplos de nanotransportadores usados actualmente en la terapia del cáncer (Wicki et al., 2015).

2. NANOHIDROGELES

2.1. Evolución del uso de los hidrogeles

La primera referencia del uso de hidrogeles apareció a principios del año 1894 (Fig. 6). Sin embargo, en esta época los hidrogeles eran considerados geles coloidales formados a partir de sales inorgánicas, lo que difiere bastante del concepto actual (Van Bemmelen & 1894). Años más tarde, el término hidrogel se empezó a utilizar para describir una red tridimensional formada a partir de polímeros naturales y resinas modificadas por mecanismos químicos o físicos. No obstante, la primera aplicación de estos sistemas en el campo de la medicina data de 1960, año en el que los investigadores Wichterle y Lim demostraron el uso de hidrogeles sintéticos basados en poli-2-hidroxietilmetacrilato (pHEMA) como lentes de contacto (Wichterle & Lim, 1960) consiguiendo su aprobación por la FDA (*Food and Drug Administration*) en el año 1971 (Maldonado-Codina & Efron, 2003).

A partir de ese descubrimiento, la investigación de nuevos hidrogeles se centró principalmente en el desarrollo de redes sencillas entrecruzadas por procesos químicos a partir de polímeros sintéticos para su aplicación como lentes de contacto o sistemas de liberación de fármacos. La mayoría de estos hidrogeles, considerados de primera generación, se pueden obtener por dos técnicas: a) polimerización de monómeros solubles en agua (monómeros con un grupo vinilo en su estructura, pHEMA) con la presencia de entrecruzantes multifuncionales; b) entrecruzamiento de polímeros hidrófilos (polivinil alcohol, polietilenglicol) (Buwalda *et al.*, 2014). Un ejemplo del primer tipo de hidrogeles son los obtenidos a partir del polímero poliacrilamida, inicialmente muy utilizados en la industria agrícola y actualmente reconocidos como materiales muy efectivos en el relleno de tejidos blandos (Orbay *et al.*, 2011). Por otro lado, los hidrogeles obtenidos a partir de polivinil

alcohol fueron ampliamente estudiados para su uso en cirugía cardiovascular u otros procedimientos de manipulación de la sangre (Goosen *et al.*, 1980), mientras que los hidrogeles sintetizados por entrecruzamiento de polietilenglicol han sido utilizados frecuentemente como biomateriales anti-adhesivos y sistemas de liberación de fármacos (Buwalda *et al.*, 2014).

A principios de 1970 surgió una segunda generación de hidrogeles, capaces de responder a las condiciones ambientales como el pH, la temperatura y la concentración de sustancias. La posibilidad de responder ante dichos estímulos permitía diseñar hidrogeles capaces de modificar su configuración ante las condiciones deseadas y desencadenar un evento específico como la liberación del fármaco o la formación de gel (Kopeček, 2009). La obtención de este tipo de hidrogeles se basaba principalmente en el entrecruzamiento de polímeros (poli(N-isopropilacrilamida), poliláctico, poli(ϵ -caprolactona), poli(N-(2-hidroxipropil) acrilamida)) por uniones hidrófobas e iónicas (Buwalda *et al.*, 2014).

A mediados de los años 90, el desarrollo de nuevas técnicas de entrecruzamiento permitió mejorar el diseño de los hidrogeles y definir de forma más precisa sus propiedades mecánicas, térmicas y de degradación, dando lugar a una tercera generación de hidrogeles. El avance conseguido en los últimos años ha permitido obtener los llamados *hidrogeles inteligentes*, que se caracterizan principalmente por presentar una gran estabilidad mecánica, debido al entrecruzamiento mediante uniones covalentes, y una cinética de liberación del fármaco muy bien definida, lo que facilita su uso en gran variedad de aplicaciones (Buwalda *et al.*, 2014).

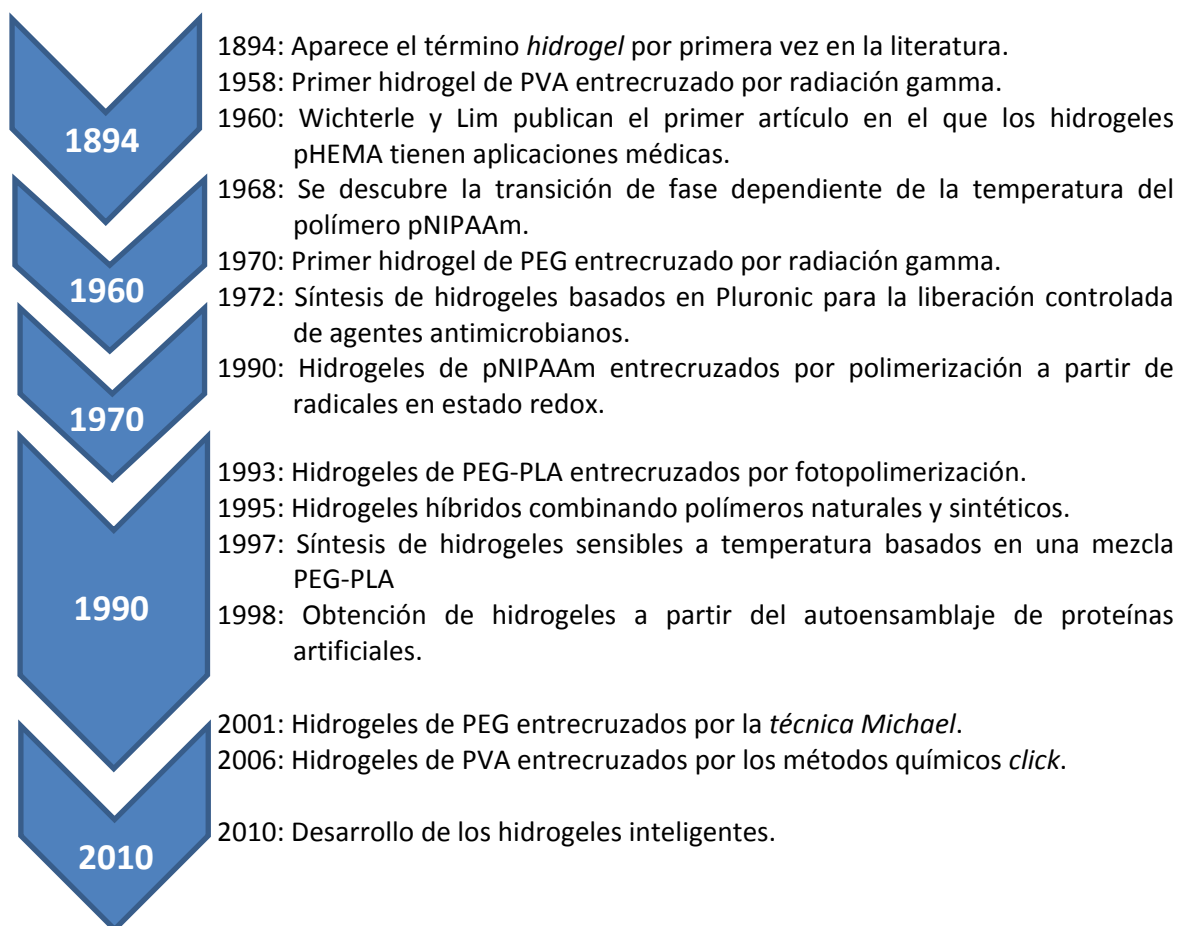


Figura 6. Evolución de los hidrogeles en los últimos años (Buwalda *et al.*, 2014).

2.2. Definición actual y propiedades de la estructura de los nanohidrogeles

Los hidrogeles (en forma de microgeles o nanogeles) son redes poliméricas con una configuración tridimensional capaces de hincharse en contacto con el agua o fluidos biológicos y retenerlos en su estructura molecular sin disolverse (Hamidi *et al.*, 2008; Kirschner & Anseth, 2013). Su elevado contenido en agua, su porosidad y su consistencia esponjosa les asemejan a tejidos vivos, a diferencia de otro tipo de biomateriales sintéticos (Blanco *et al.*, 2002; Caló & Khutoryanskiy, 2015).

El grado de hidratación de un hidrogel va a depender fundamentalmente del entorno acuoso que le rodea y de la composición polimérica (Hamidi *et al.*, 2008). Aquellos hidrogeles que

contienen grupos hidrófilos en su estructura como $-\text{OH}$, $-\text{CONH}-$, $-\text{CONH}_2-$, y $-\text{SO}_3\text{H}$ se hinchan en mayor grado que aquellos que contienen grupos hidrófobos como el ácido poliláctico o el poliláctico-co-glicólico. Estos últimos se colapsan en presencia de agua, minimizando su interacción con las moléculas de la misma y dando como resultado hidrogeles mucho menos hinchados (Peppas & Khare, 1993).

Por otro lado, la densidad de reticulación (q_x ; Fig. 7), es decir, la relación entre los moles de agente entrecruzante y los de las unidades repetidas de monómero, determina el número de uniones químicas o físicas que se establecen entre los polímeros de la red tridimensional en un volumen dado. Dicha relación de entrecruzamiento controla muchas de las propiedades fundamentales de los hidrogeles y tiene gran importancia debido a su repercusión en las diversas aplicaciones sanitarias (Mason *et al.*, 2001; Metters *et al.*, 2001). Entre estas propiedades se incluyen la relación volumétrica de hinchamiento (Q), el coeficiente de difusión (D) de las moléculas atrapadas en la red tridimensional y la capacidad de recuperación de la estructura original (G) (Fig. 7)(Bryant & Anseth, 2006). El conocimiento de las relaciones establecidas entre estos parámetros permite optimizar las propiedades del hidrogel para aplicaciones específicas.

La relación volumétrica de hinchamiento (Q ; Fig. 7), es decir, la relación que existe entre el volumen de gel hinchado en agua respecto al volumen que ocupa el polímero seco, determina el contenido de agua del hidrogel en estado hinchado, y depende de la estructura del gel y la interacción polímero-disolvente (Flory & Rehner, 1943). Por otro lado, el coeficiente de difusión (D ; Fig. 7) está inversamente relacionado con la cantidad de entrecruzante y directamente relacionado con el tamaño de los poros de la red tridimensional (ϵ), que es una medida del espacio disponible entre las cadenas

macromoleculares para la difusión de las moléculas secretada por las células, cuando los hidrogeles son aplicados en la regeneración de tejidos, o para la difusión de fármacos, en su aplicación como nanosistemas transportadores de moléculas.

Como se observa en el gráfico (Fig. 7), a mayor entrecruzamiento, mayor cantidad de agente entrecruzante es incorporado en la estructura del hidrogel, por lo que su estructura es más compacta y se hinchan mucho menos, comparándolos con el mismo hidrogel con un entrecruzamiento menor. Por tanto, el entrecruzamiento dificulta la movilidad de las cadenas de polímero, disminuyendo así la capacidad volumétrica de hinchamiento y la difusión de las sustancias atrapadas en la red polimérica.

Así mismo, la capacidad de recuperación de la estructura original (G ; Fig. 7) está directamente relacionada con la densidad de la red de reticulación por la *teoría de la elasticidad de la goma* enunciada por Flory (Flory & Rehner, 1943; Shen & Blatz, 1968). La capacidad de soportar altas deformaciones de volumen y recuperar completamente la estructura original, al eliminar la tensión responsable de dichas deformaciones, es una propiedad que se manifiesta en sustancias poliméricas con largas cadenas moleculares cuando las propiedades son las adecuadas.

La premisa básica de la teoría de elasticidad afirma que el estrés al que se ve sometido un elastómero en su estado tenso se origina dentro de las cadenas moleculares de su estructura, formada típicamente por una red covalente, y que las contribuciones de las interacciones entre las cadenas son insignificantes (Flory, 1985).

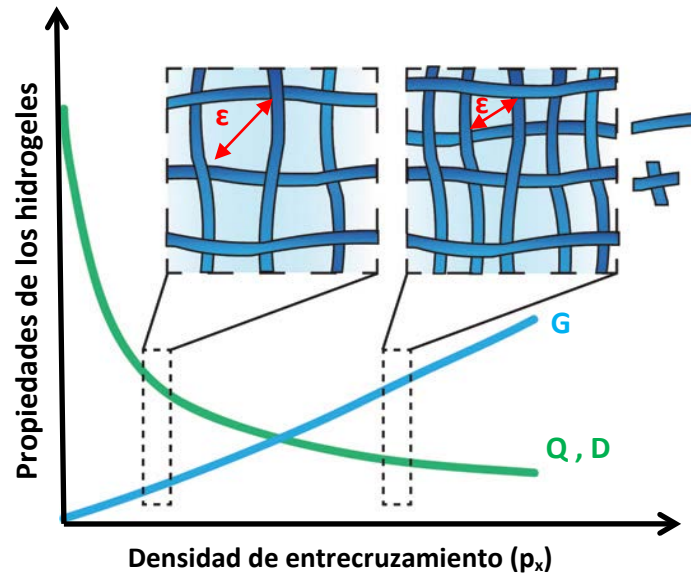


Figura 7. Relación entre la densidad de entrecruzamiento y las propiedades del hidrogel. Se representan dos redes con una densidad de reticulación diferente para demostrar su relación con la capacidad de volver a su estado original al aplicar una tensión (G), la relación volumétrica de hinchamiento (Q) y la difusión (D). ϵ representa el tamaño de poro de la red polimérica (Kirschner & Anseth, 2013).

Teniendo en cuenta el tipo de uniones de la red polimérica, podemos establecer varios grupos de hidrogeles (Sood *et al.*, 2013). Los hidrogeles *reversibles* (también llamados hidrogeles *físicos*) se caracterizan por presentar interacciones físicas transitorias entre sus componentes poliméricos como los enlaces de hidrógeno o las interacciones hidrófobas o iónicas. En este tipo de hidrogeles es posible la reestructuración de la red tridimensional mediante la modificación de las condiciones del medio, como el pH, la fuerza iónica o la temperatura. Por el contrario, en los hidrogeles *irreversible* (también llamados hidrogeles *químicos*), la red tridimensional está formada por interacciones químicas permanentes, ya que las cadenas macromoleculares se encuentran unidas por enlaces covalentes (Hamidi *et al.*, 2008; Hoffman, 2012), lo que dificulta la desestructuración de la red tridimensional, generando partículas más estables.

Teniendo en cuenta las características ya mencionadas, las propiedades más importantes de los nanogeles son las siguientes (Ulijn *et al.*, 2007):

- Son insolubles en medio acuoso. Sin embargo, son capaces de absorber gran cantidad de agua, aumentando considerablemente su volumen sin perder la forma. El estado hinchado es el resultado del balance entre las fuerzas dispersivas y las cohesivas intermoleculares que actúan en las cadenas hidratadas (Jhon *et al.*, 1976). Las fuerzas cohesivas son principalmente debidas a entrecruzamientos covalentes, aunque también contribuyen las fuerzas electrostáticas, hidrófobas, o interacciones dipolo-dipolo. El grado y la naturaleza del entrecruzamiento, la tacticidad y la cristalinidad del polímero son responsables de las características en el estado hinchado. La forma no hidratada se denomina xerogel.
- Su estructura tridimensional húmeda facilita las interacciones biológicas, a pesar de que algunos hidrogeles proporcionan superficies inertes que evitan la adsorción inespecífica de proteínas y, por tanto, la opsonización.
- Presentan una consistencia suave y elástica la cual está determinada por el monómero hidrófilo de partida y la baja densidad de entrecruzamiento del polímero.
- Es posible la unión covalente de gran cantidad de moléculas biológicas a la estructura del hidrogel, utilizando multitud de técnicas químicas bien definidas.
- Las propiedades mecánicas del hidrogel (entrecruzamiento, hinchamiento, etc.) se pueden modificar en función de su aplicación posterior. Es posible diseñar hidrogeles capaces de responder a estímulos externos como la temperatura, fuerza iónica, la polaridad del disolvente, campos eléctricos o magnéticos, luz, etc.

- Su tamaño nanométrico incrementa la relación superficie/volumen y, con ello, las interacciones con el medio. Además, permite atravesar la mayoría de las barreras biológicas, a diferencia de las macromoléculas.

2.3. Métodos de síntesis

La obtención de estructuras tridimensionales covalentemente unidas se puede conseguir por dos vías (Fig. 8): a) entrecruzamiento directo entre los polímeros hidrófilos previamente formados y b) polimerización tridimensional, en la que varios monómeros son polimerizados con la presencia de un agente entrecruzante en el medio de polimerización (Caló & Khutoryanskiy, 2015).

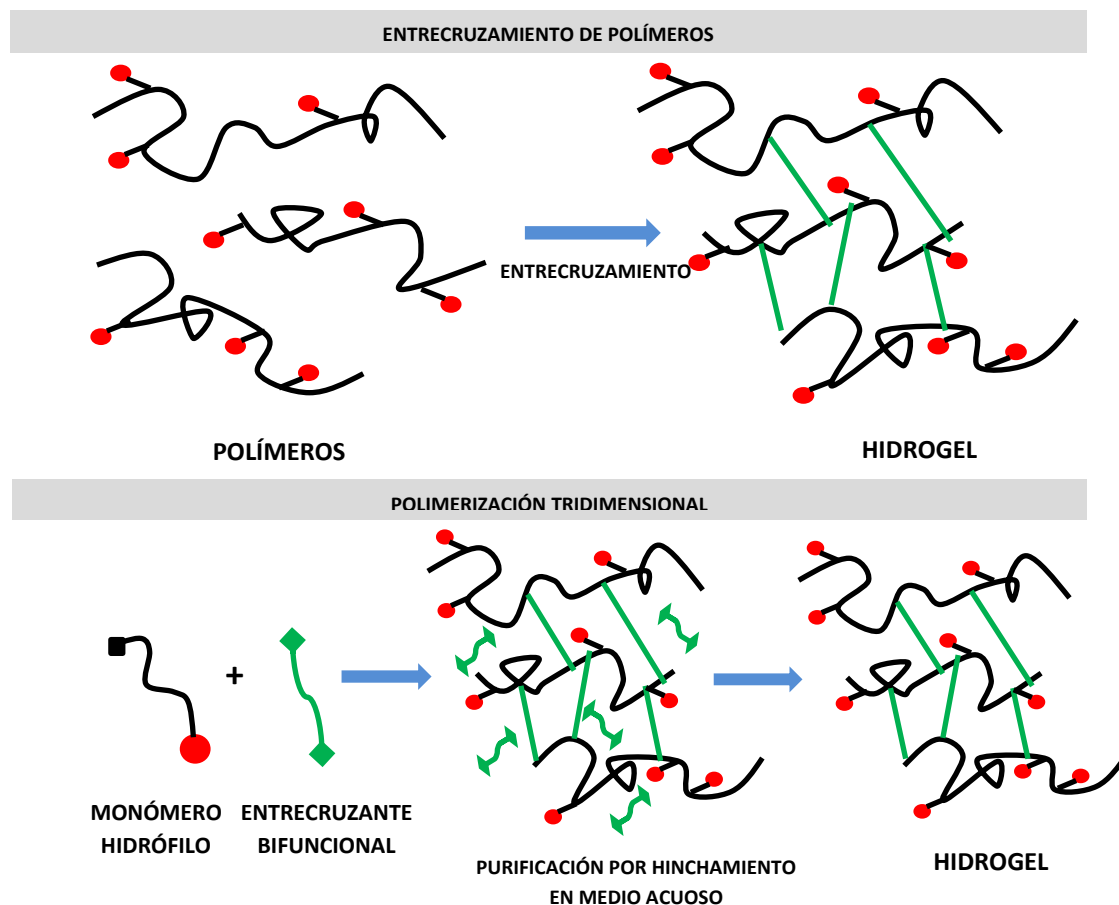


Figura 8. Síntesis de hidrogeles por entrecruzamiento de polímeros hidrófilos previamente formados y por polimerización tridimensional, a partir de monómeros unidos por el entrecruzante.

En el primer caso, los hidrogeles se preparan a partir de precursores poliméricos anfipáticos capaces de autoensamblarse, formando estructuras de tamaño nanométrico. En la actualidad existen varias técnicas de entrecruzamiento de las cadenas poliméricas para originar la red tridimensional del hidrogel (Chacko *et al.*, 2012). Una de las técnicas más recientes para la preparación de los hidrogeles a partir de polímeros pequeños es la llamada *técnica click*, que se caracteriza por presentar un alto rendimiento, elevada especificidad y gran biocompatibilidad, ya que se puede llevar a cabo dentro de un sistema vivo sin interferir con sus procesos bioquímicos (Jiang *et al.*, 2014).

En el segundo caso, la polimerización se suele iniciar con la formación de radicales libres en los monómeros reactivos, utilizando para ello un compuesto con capacidad redox, como el disulfuro de sodio (DsNa), el peróxido de benzoilo o el peroxodisulfato de amonio, o mediante la incidencia de radiación UV, rayos gamma o haces de electrones. Después de llevar a cabo la polimerización tridimensional es necesario un último paso de purificación, ya que parte de los monómeros añadidos no son capaces de reaccionar y podrían atravesar la red polimérica del hidrogel de forma continua, produciendo una toxicidad no deseada. Por ello, la purificación de los hidrogeles ya formados suele ser un proceso largo en el que la extracción de los monómeros residuales se realiza en un medio acuoso.

Actualmente existen varios tipos de reacciones de polimerización a partir de monómeros hidrófilos, con la presencia de entrecruzantes bifuncionales o multifuncionales, que permiten la obtención de hidrogeles sintéticos bien definidos. A continuación se explican brevemente los distintos métodos utilizados para la polimerización y obtención de la red tridimensional del hidrogel.

2.3.1. Polimerización en disolución

Este tipo de técnica permite la preparación de partículas de tamaño micrométrico con una distribución de tamaños estrecha. En este proceso, la mayoría de los componentes, incluyendo monómeros, estabilizadores poliméricos e iniciadores, se encuentran perfectamente disueltos en el medio de reacción formando una única fase homogénea (Oh *et al.*, 2008). A medida que avanza el proceso de síntesis, los polímeros formados se hacen insolubles en el medio de reacción, lo que conduce a la formación de una dispersión estable de partículas poliméricas con la ayuda de estabilizadores coloidales.

Esta técnica se utiliza principalmente para la obtención de microesferas homogéneas a partir de polímeros hidrófobos como el poliestireno y el polimetacrilato de metilo (Oh *et al.*, 2008).

En una polimerización radicalaria con entrecruzamiento en disolución, la concentración del medio de reacción va a determinar el grado de entrecruzamiento intramolecular y las uniones intermoleculares (Fig. 9). Así pues, cuando el medio de reacción se encuentra diluido, aumenta la probabilidad de entrecruzamientos intramoleculares y disminuye la tendencia a formar entrecruzamientos intermoleculares, lo que limita el tamaño de los sistemas entrecruzados en crecimiento. Por el contrario, en condiciones de elevada concentración de monómero reactivo es muy probable que se produzca la macrogelación y, por tanto, un aumento del tamaño de partícula. Debido a estas limitaciones, la polimerización en disolución es un método menos utilizado que la emulsión en la obtención de nanohidrogeles.

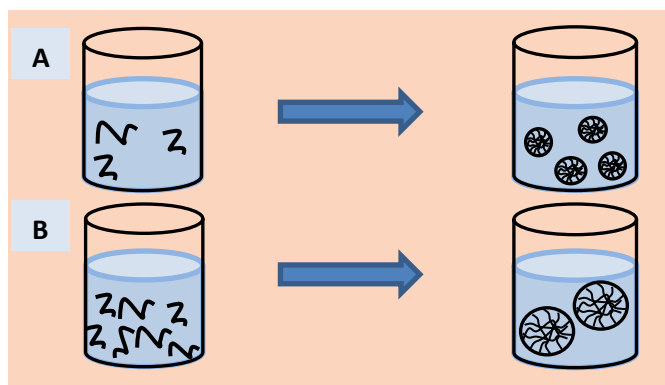


Figura 9. A) Formación de hidrogel por polimerización en disolución diluida;
B) Formación de macrogel por polimerización en disolución concentrada.

2.3.2. Polimerización por precipitación

Similar a la técnica anterior, la polimerización por precipitación implica la formación de una mezcla homogénea en su etapa inicial. A medida que se produce el crecimiento de las cadenas poliméricas, éstas precipitan, ya que el polímero formado es insoluble o muy poco soluble en el medio, creando dos fases heterogéneas. Por ello, es necesario el uso de un entrecruzante para unir las cadenas poliméricas y formar partículas. Como consecuencia, las partículas resultantes suelen presentar una forma irregular con una elevada polidispersidad (Oh *et al.*, 2008).

Sin embargo, este método de polimerización resulta ventajoso por permitir elevadas conversiones de monómeros, como consecuencia de la precipitación del polímero. Esta separación del polímero del medio hace que la mezcla de reacción no se vuelva viscosa, facilitando la agitación y el control de la temperatura. Así, por ejemplo, la polimerización en disolución de acrilamida presenta una capacidad de conversión en torno al 10-15%, mientras que la polimerización de acrilamida mediante polimerización por precipitación alcanza el 100% de conversión.

2.3.3. Polimerización por emulsión

El primer uso conocido de este tipo de técnicas se remonta a 1932 por Luther y Heuck (Luther & Heuck, 1932). Actualmente es la técnica más usada a nivel industrial, ya que permite obtener gran variedad de polímeros de alto peso molecular a una velocidad elevada (Kakran & Antipina, 2014). Como el resto de las técnicas anteriormente descritas, la polimerización por emulsión es un sistema heterogéneo formado por una fase acuosa y una fase oleosa. Los componentes básicos de dicho sistema son agua, monómero(s), agente emulsionante o tensioactivo, e iniciador.

Dependiendo del papel que realice (fase de dispersión o fase continua) cada uno de los componentes de la emulsión, tendremos varios tipos de emulsión:

- **Emulsión inversa:** Conocida también como de agua en aceite (w/o), ya que se forma a partir de una solución acuosa, constituida por una dispersión de monómeros o polímeros hidrófilos (fase acuosa), la cual es goteada sobre la fase continua (fase oleosa) con la ayuda de agentes tensioactivos solubles en el aceite (Fig. 10A). Como se observa en la imagen, el tensioactivo es una molécula anfótera que orienta las cadenas hidrocarbonadas hidrófobas hacia el exterior, donde se encuentran las moléculas de aceite (fase oleosa), y la cabeza hidrófila hacia el interior, es decir, hacia las moléculas de agua (fase acuosa). Este tipo de emulsión se lleva a cabo en un medio orgánico continuo, que puede progresivamente ser reemplazado por un medio acuoso al eliminar el tensioactivo del medio de reacción. Varios estudios han demostrado la síntesis de partículas hidrófilas a partir de polihidroxiethylacrilato, poliacrilamida, ácido poliacrílico o N-isopropilacrilamida. Además, esta técnica también ha sido utilizada para preparar

partículas estables híbridas a partir de compuestos orgánicos e inorgánicos, como las nanopartículas magnéticas de óxido de oro (Oh *et al.*, 2008).

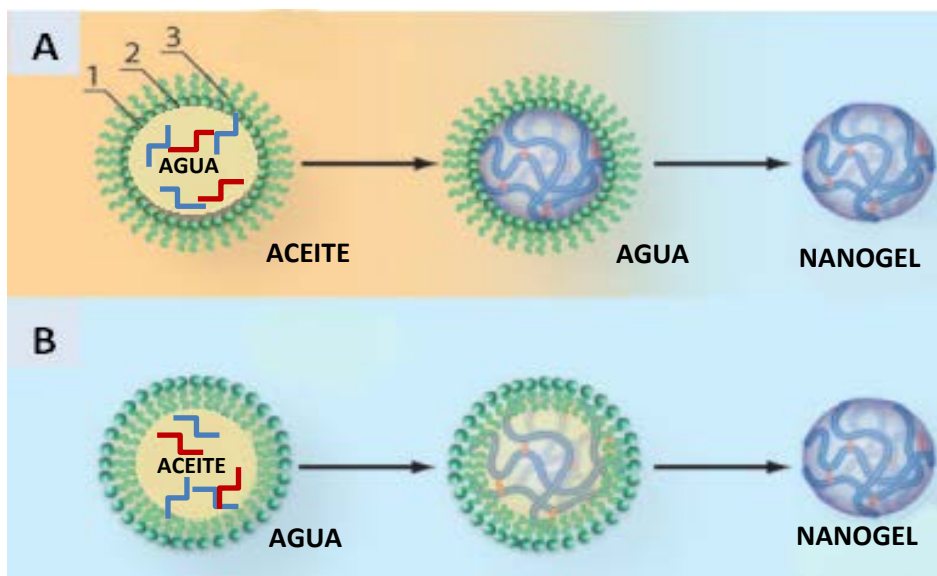


Figura 10. Obtención de nanogel mediante copolimerización de monómeros por la técnica de microemulsión: A) microemulsión inversa (agua/aceite; w/o) 1. monómeros reactivos; 2. entrecruzante bifuncional; 3. Tensioactivo; B) microemulsión convencional directa (aceite/agua; o/w) en presencia de un tensioactivo (Kabanov & Vinogradov, 2009).

- Emulsión directa:** También llamada de aceite en agua (o/w), ya que la fase oleosa o aceite es dispersada sobre la fase acuosa o fase continua (Fig. 10B). En este tipo de síntesis, los monómeros y polímeros forman parte de la fase oleosa, ya que los monómeros son poco solubles en un medio acuoso y, al reaccionar, generan polímeros insolubles en agua. Por el contrario, el iniciador de la reacción suele ser soluble en agua y, gracias a la presencia de moléculas de tensioactivo, es posible la reacción entre ambas fases. En este caso, el tensioactivo orienta las cadenas hidrófobas hacia el centro (fase oleosa) y dirige la cabeza hidrófila hacia el exterior (fase acuosa), formando agregados esféricos conocidos como micelas, que se crean a partir de una concentración crítica de tensioactivo, la concentración micelar crítica (CMC). Polímeros como los polimetil-

metacrilatos, polietil-cianoacrilatos y polibuti-cianoacrilatos pueden ser obtenidos a partir de esta técnica (Kakran & Antipina, 2014).

Debido a la gran aplicación industrial de la emulsión inversa en los últimos años, han surgido algunas variantes como la miniemulsión inversa o la microemulsión inversa, con pequeñas modificaciones (Fig.11).

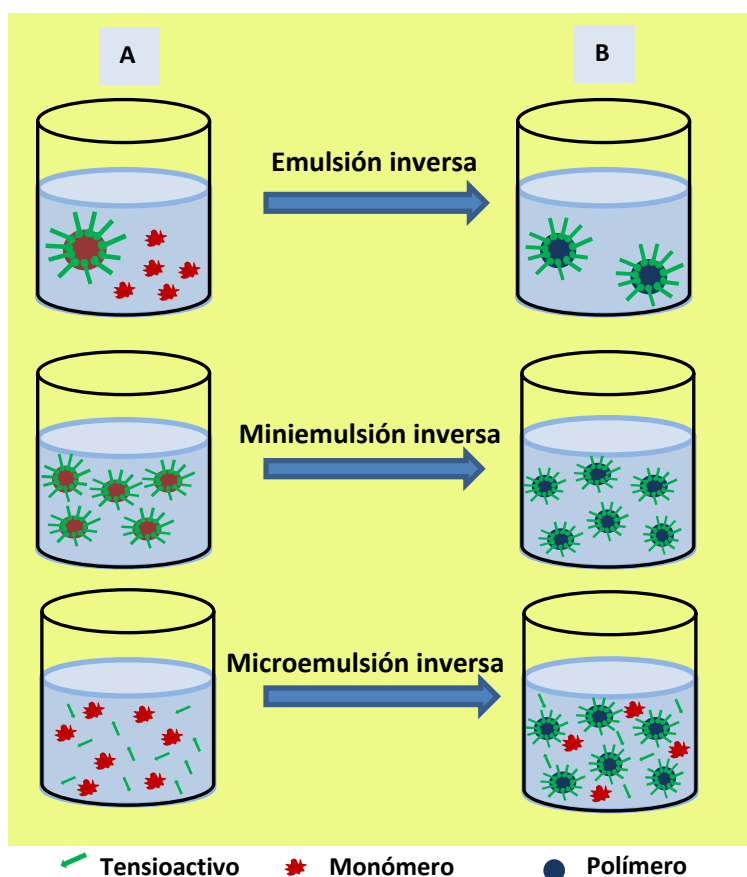


Figura 11. Diferentes tipos de polimerización por emulsión inversa. A) antes de la polimerización; B) después de la polimerización (Rao & Geckeler, 2011).

2.3.3.1. Polimerización por miniemulsión inversa

La diferencia más importante entre la polimerización por emulsión y la polimerización por miniemulsión reside en el uso de compuestos con bajo peso molecular como los co-estabilizadores y el uso de dispositivos con elevada capacidad de disgregación de las partículas como ultrasonidos, sonicadores, etc. (Klinger & Landfester, 2012). De hecho, el

uso de estos aparatos permite que las miniemulsiones generadas lleguen a un estado de equilibrio y tengan una tensión interfacial en la interfase aceite/agua mucho mayor que cero (Rao & Geckeler, 2011).

A pesar de que en este tipo de técnicas la cantidad de tensioactivo es muy reducido, parte de este compuesto puede permanecer en las partículas poliméricas formadas (Fig. 11). Dicho inconveniente se puede evitar utilizando moléculas hidrófobas como el SMA (estearil metacrilato) o el DMA (dodecil metacrilato) (Chern & Sheu, 2001).

La miniemulsión permite producir nanopartículas de un tamaño nanométrico, como muestra los estudios llevados a cabo por Landsfester y colaboradores en los que obtuvieron una dispersión estable de nanopartículas de polihidroxietilmetacrilato (PHEMA) de un tamaño de 50-200 nm (Landfester *et al.*, 2000) y de poliacrilonitrilo de un tamaño de 100-180 nm (Landfester & Antonietti, 2000) utilizando la técnica de polimerización en miniemulsión, con Span 80 o KLE3729 como tensioactivos y hexadecano (HD) como estabilizador.

2.3.3.2. Polimerización por microemulsión inversa

Una microemulsión se define como una dispersión isotrópica, microestructurada y termodinámicamente estable de dos líquidos inmiscibles, estabilizados por una película interfacial de moléculas superficialmente activas (Hoar & Schulman, 1943). Como se ha explicado anteriormente, la formación de una emulsión conlleva un aumento del área interfacial entre dos fases inmiscibles y está acompañado por un aumento de la energía libre. Por tanto, para la formación de una emulsión es necesario disminuir la tensión interfacial mediante la adsorción en la interfase de moléculas tensioactivas. Cuando la tensión interfacial decrece hasta casi cero, el sistema se emulsiona espontáneamente creando una microemulsión (Muñoz, 2002).

Así, mientras que la polimerización por emulsión inversa permite obtener macroemulsiones cinéticamente estables por debajo o cercanas al punto de concentración micelar crítica (CMC), la polimerización en microemulsión inversa origina microemulsiones termodinámicamente estables al añadir una cantidad de tensioactivo superior al umbral CMC (Oh *et al.*, 2008).

En la polimerización por microemulsión (Fig. 11) el iniciador suele estar disuelto en un medio acuoso y es añadido poco a poco a una microemulsión termodinámicamente estable que contiene micelas hinchadas (Rao & Geckeler, 2011). Las partículas formadas aparecen cubiertas con tensioactivo, debido a la gran cantidad de dicho compuesto necesario para llevar a cabo la reacción, que implica un incremento del coste de producción, por lo que este tipo de técnica no se aplica en todos los sectores de la industria (Candau, 1992).

Inicialmente, las cadenas poliméricas solo se forman en algunas gotas, ya que el iniciador no puede actuar simultáneamente en todas las gotas formadas por monómeros reactivos. A medida que avanza la reacción, la influencia osmótica y elástica de las cadenas poliméricas desestabilizan la frágil microemulsión, lo que típicamente conduce a un aumento en el tamaño de la partícula, la formación de micelas vacías y la nucleación secundaria (Rao & Geckeler, 2011).

Con esta técnica se pueden obtener partículas coloidales hidrófilas con un diámetro de 50–100 nm. McAllister y colaboradores (McAllister *et al.*, 2002) prepararon nanogeles catiónicos basados en una mezcla copolimérica de polihidroxietil-acrilato y cloruro de acril-oxi-etil-trimetil-amonio en presencia de polietilenglicol dimetacrilato como agente entrecruzante para la liberación de genes. Los resultados obtenidos mostraron un tamaño entre 40-150 nm, en función de la cantidad de entrecruzante utilizado.

2.4. Aplicación de los nanohidrogeles en la liberación de fármacos

El diseño de los hidrogeles es fundamental para conseguir una liberación controlada o sostenida de fármacos en los tejidos y órganos. En los últimos años, se ha incrementado el interés en el uso de los hidrogeles como sistemas capaces liberar el fármaco u otros agentes terapéuticos a través de diferentes rutas como la transdérmica, subcutánea, intravenosa, implantable, ocular, rectal, vaginal, pulmonar, cutánea y nasal (Sood *et al.*, 2013).

El nanohidrogel ideal para su uso en la liberación de fármacos debería cumplir los siguientes requisitos: tener un pequeño tamaño (10-200 nm), ser biodegradable y/o biocompatible, poder prolongar el tiempo de circulación en sangre del fármaco encapsulado, presentar una elevada eficacia de encapsulación del agente terapéutico y proteger al principio activo del sistema inmune y de la degradación enzimática (Yallapu *et al.*, 2011).

Una vez sintetizados los hidrogeles, los agentes terapéuticos pueden ser encapsulados por diversas vías: atrapamiento físico, unión covalente o autoensamblaje controlado (Kabanov & Vinogradov, 2009). En general, las técnicas de encapsulación de compuestos activos en la matriz del hidrogel se puede realizar por dos vías principales: encapsulación después de la formación del hidrogel o encapsulación *in situ*. En el primer caso, las matrices preformadas del hidrogel son embebidas en una solución concentrada de fármacos y la carga se consigue por absorción (Perez *et al.*, 2014) (Perez *et al.*, 2014). Por el contrario, en el segundo caso las sustancias terapéuticas son embebidas en el hidrogel durante la formación de la red tridimensional (Klinger & Landfester, 2012).

Independientemente del tipo de interacción que se establezca entre el fármaco y la red polimérica, el fármaco encapsulado se encuentra uniformemente disperso en la estructura tridimensional del hidrogel y cuando el hidrogel entra en contacto con un fluido biológico las

cadena polimérica se expanden, permitiendo la salida del fármaco por difusión. El gradiente existente entre el fármaco dispersado en el hidrogel y el medio ambiente circundante permite la difusión del principio activo a favor de gradiente de concentración a través de la red tridimensional del hidrogel (Caló & Khutoryanskiy, 2015). Además de la difusión, la liberación del fármaco se puede realizar por otros mecanismos como la degradación polimérica (liberación controlada por cambios químicos) o la respuesta a estímulos del medio (liberación controlada por hinchamiento) (Fig.12) (Kabanov & Vinogradov, 2009; Klinger & Landfester, 2012).

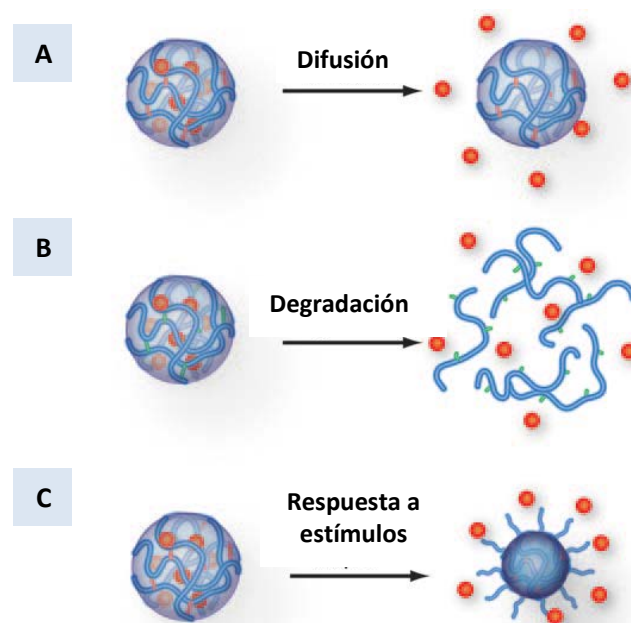


Figura 12. Mecanismos de liberación del fármaco encapsulado en los hidrogeles (Kabanov & Vinogradov, 2009).

Una de las ventajas que ofrecen los hidrogeles en su aplicación como vehículos de fármacos es la posibilidad de liberar dichos fármacos de forma controlada, lo que supone el mantenimiento local de elevadas concentraciones del agente terapéutico a lo largo del tiempo (Caló & Khutoryanskiy, 2015).

Además, los hidrogeles pueden ser diseñados con el objetivo de conseguir propiedades bioadhesivas, lo que facilita la vehiculización de fármacos administrados por vías no invasivas como la difusión por contacto en las membranas mucosas. Actualmente existen numerosos hidrogeles sintetizados a partir de polímeros naturales y sintéticos que muestran dicha propiedad adhesiva (Lin & Metters, 2006).

Otra de las ventajas del uso de hidrogeles en la liberación de fármacos se debe a su similitud con otras estructuras biológicas como consecuencia de su elevada naturaleza hidrófila. De esta forma, los hidrogeles son capaces de evadir la respuesta inmune del hospedador y reducir la captura por el sistema retículo endotelial (RES), lo que se traduce en un incremento del tiempo de circulación de los hidrogeles en sangre (Lin & Metters, 2006).

Por otro lado, las laxas condiciones para la gelificación y la capacidad de polimerización *in situ* de los hidrogeles, permiten la encapsulación simultánea de células y factores de crecimiento, fundamentales para su aplicación en la regeneración de tejidos. La liberación controlada de los factores de crecimiento y otros agentes terapéuticos encapsulados es crítica para proporcionar las señales necesarias para la migración celular, la diferenciación, la angiogénesis, y la regulación de la producción de la matriz extracelular, necesaria para el crecimiento o regeneración del tejido nuevo (Lin & Metters, 2006).

Por último, como ocurre con el resto de nanosistemas, la posibilidad de unir ligandos a la superficie de los nanohidrogeles permite la vehiculización activa de los fármacos encapsulados en su interior, favoreciendo el efecto terapéutico específico del principio activo. Una de las estrategias utilizadas para la unión de estos ligandos a la red polimérica covalentemente unida es el uso de monómeros de cadenas carbonadas largas durante la síntesis, como es el caso del tert-butil 2-acril-amido-etil-carbamato (2AAECM), sintetizado

por Guerrero *et al.* (Guerrero-Ramírez & Katime, 2011) para la obtención de *hidrogeles inteligentes*.

2.5. Nanohidrogeles inteligentes en la liberación de fármacos

El fundamento teórico de los *nanohidrogeles inteligentes* se basa en un cambio de volumen (reversible) de la red tridimensional como consecuencia de las variaciones en los parámetros físico-químicos de los polímeros en respuesta a un estímulo externo. La respuesta de los hidrogeles a los estímulos externos se puede llevar a cabo por diversos mecanismos (Fig. 13) y, en todos los casos, la respuesta es inducida por cambios de solvatación de las cadenas poliméricas como resultado de las modificaciones en las interacciones disolvente-disolvente, disolvente-polímero y polímero-polímero (Klinger & Landfester, 2012). Estas interacciones pueden verse modificadas por varias causas: cambios en los parámetros fisicoquímicos del hidrogel inducidos por estímulos externos (Fig. 13A); como consecuencia de la desintegración de la red tridimensional por la ruptura de los enlaces implicados en el entrecruzamiento (Fig. 13B); por un mecanismo de degradación de los agregados formados entre varias cadenas de hidrogeles (Fig. 13C) o incluso liberar compuestos activos incluidos en la red polimérica como respuesta a un estímulo externo, sin variar el volumen del hidrogel (Fig. 13D) (Klinger & Landfester, 2012).

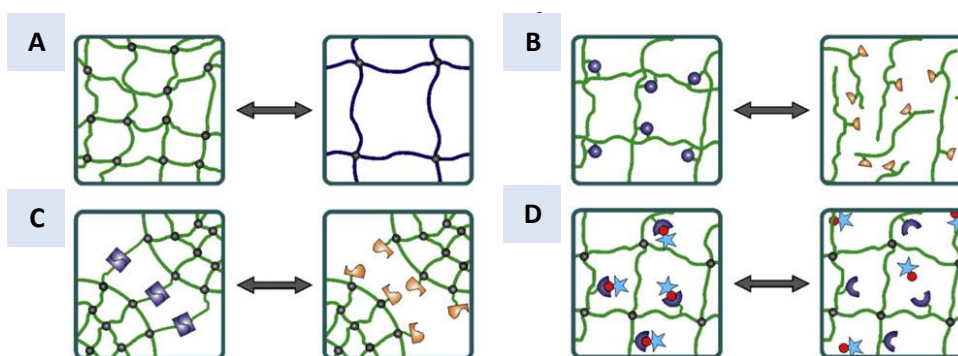


Figura 13. Representación esquemática de los diferentes mecanismos de respuesta a los estímulos por los nanohidrogeles (detalles explicativos en el texto).

El mecanismo de respuesta de estos nanomateriales depende de dos características importantes. En primer lugar, la sensibilidad global de los hidrogeles se define por el tipo de estímulo específico que desencadena una respuesta en estos materiales, que viene determinado por la naturaleza de los grupos funcionales de los polímeros y los monómeros utilizados durante la síntesis. En segundo lugar, la localización de estos grupos funcionales en la estructura de la red, así como su mecanismo de respuesta específico determina el comportamiento general de este tipo de hidrogeles (Klinger & Landfester, 2012).

Los *nanohidrogeles inteligentes* permiten incrementar la eficacia terapéutica de los fármacos encapsulados, disminuyendo los efectos secundarios de las terapias convencionales, y mejorar el diagnóstico de las enfermedades con técnicas de imagen más efectivas. La capacidad de respuesta de estos nanohidrogeles a estímulos internos como el pH, potencial redox y enzimas permite la liberación del fármaco en función de las características moleculares específicas de la enfermedad que se quiera tratar. Por otro lado, la respuesta de estos nanosistemas a estímulos externos como la luz, ultrasonidos, campos electromagnéticos o radiación ionizante permite focalizar el tratamiento en la zona responsable de la patogénesis desde el exterior. Sin embargo, el principal inconveniente de usar nanosistemas controlados externamente es la posibilidad de dañar otros órganos o tejidos que son atravesados por el nanosistema en su camino hacia las células diana (Lehner *et al.*, 2012).

A continuación se describe el fundamento teórico de algunos de estos *nanohidrogeles inteligentes* y su aplicación en la liberación controlada de fármacos.

2.5.1. Nanohidrogeles sensibles a cambios de temperatura

Los hidrogeles sensibles a la temperatura son probablemente el tipo de sistemas sensibles más estudiado en la administración de fármacos. Estos hidrogeles son capaces de hincharse o colapsarse como resultado del cambio en la temperatura del fluido circundante (Bajpai *et al.*, 2008).

La característica común de los polímeros termosensibles es la presencia de grupos hidrófobos, tales como el metilo, etilo y propilo. Además, la *temperatura de disolución crítica inferior* (LCST) de dichos polímeros va a determinar el comportamiento del hidrogel. En un medio con temperatura por debajo del valor LCST, el hidrogel aparece en estado hinchado como consecuencia de los enlaces de hidrógeno establecidos entre el polímero y el medio acuoso. Por el contrario, cuando la temperatura supera el valor LCST, el hidrogel se colapsa, debido a las interacciones hidrófobas que se establecen entre las cadenas poliméricas. Por tanto, el valor de LCST va a determinar el tipo de hidrogeles: a) negativos, cuando los hidrogeles se obtienen a partir de polímeros con baja LCST y b) positivos, cuando los hidrogeles se obtienen a partir de polímeros con elevada LCST (Bajpai *et al.*, 2008). Dicho valor LCST se puede modificar ajustando la relación de segmentos hidrófilos e hidrófobos del polímero o mediante la formación de copolímeros a partir de monómeros hidrófobos e hidrófilos (Sood *et al.*, 2013).

De los muchos polímeros sensibles a la temperatura que existen, el N-isopropilacrilamida (NIPA; LCST $\approx 32^{\circ}\text{C}$) es uno de los más utilizados en terapia debido a su baja temperatura de solución crítica (LCST) y a la posibilidad de liberar el fármaco de forma controlada en función de la temperatura corporal (Sood *et al.*, 2013). A temperaturas inferiores a 32°C , las interacciones entre el polímero y el medio acuoso se ven favorecidas, promoviendo el hinchamiento del hidrogel.

Sin embargo, al aumentar la temperatura por encima de 32°C, las interacciones hidrófobas que se establecen entre los grupos isopropilo de la cadena polimérica favorecen la expulsión del agua de la red polimérica y el hidrogel se colapsa (Klinger & Landfester, 2012).

2.5.2. Nanohidrogeles sensibles a cambios de pH

El organismo se ve sometido a variaciones de pH en estado fisiológico y en situaciones patológicas, como la enfermedad isquémica del corazón, que genera un microambiente ácido local (pH 6-7)(Kirschner & Anseth, 2013). Lo mismo ocurre con las diferencias de pH que existen entre los tejidos tumorales (pH 6,5) y los tejidos sanos (pH 7,4). A nivel celular, los compartimentos celulares formados por endosomas y lisosomas también muestran un pH ácido (pH 5-6), utilizado para la degradación de moléculas internalizadas en la célula (Lehner *et al.*, 2012). Estas variaciones de pH pueden ser utilizadas para desencadenar respuestas dinámicas (hinchamiento/colapso) en los nanohidrogeles sensibles a pH y, como consecuencia, liberar agentes terapéuticos de forma específica.

El mecanismo subyacente al hinchamiento/colapso de estos materiales como respuesta a los cambios del pH del medio circundante es la protonación/desprotonación de los grupos funcionales a lo largo de la cadena de los polímeros que forman la red tridimensional. El parámetro clave que determina el comportamiento de los nanohidrogeles sensibles al pH es el valor de pH crítico (pH_c) a partir del cual se produce la transición de fase (estado hinchado-estado colapsado). Aunque este parámetro se rige por la naturaleza química del polielectrolito (pK_a o pK_b de los grupos funcionales), el valor de pH crítico se define como el punto donde el grado de ionización de la red polimérica cambia (Bajpai *et al.*, 2008; Klinger & Landfester, 2012).

Teniendo en cuenta la respuesta de los hidrogeles a los niveles de pH en función de su composición polimérica, podemos establecer dos grandes grupos: hidrogeles aniónicos e hidrogeles catiónicos (Fig.14 y 15).

Los hidrogeles aniónicos se encuentran en estado colapsado cuando los valores de pH son inferiores al pKa del polielectrolito, debido a la ausencia de cargas y las uniones hidrófobas resultantes. En este tipo de hidrogeles, el incremento de pH por encima del pKa provoca la desprotonación de los grupos ácidos, incrementando el carácter hidrófilo del polímero. Además, la repulsión electrostática y la presión osmótica generada como consecuencia de los grupos aniónicos originados producen un incremento en el grado de hinchamiento del hidrogel (Bajpai *et al.*, 2008; Klinger & Landfester, 2012). Ejemplos de este tipo de hidrogeles son los obtenidos a partir de polímeros aniónicos como el ácido acrílico y el ácido metacrílico (Bajpai *et al.*, 2008; Kirschner & Anseth, 2013).

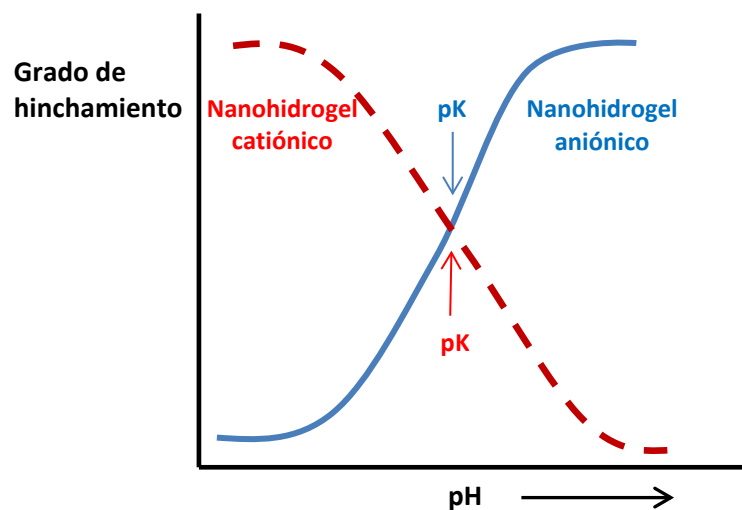


Figura 14. Grado de hinchamiento de los nanohidrogeles catiónicos y los nanohidrogeles aniónicos en función del pH (Lin & Metters, 2006).

Los hidrogeles catiónicos se encuentran en estado colapsado cuando los valores de pH son superiores al pKb del polielectrolito, debido a la ausencia de cargas. Al contrario de lo que ocurría en los hidrogeles aniónicos, la disminución del pH por debajo del pKb induce

la protonación de los grupos básicos del polímero y, como consecuencia, el hinchamiento del hidrogel (Klinger & Landfester, 2012). Ejemplos de este tipo de hidrogeles son los obtenidos a partir de polímeros catiónicos como el poli N-N´dietilaminoetil metacrilato y N-hidroxietilacrilamida.

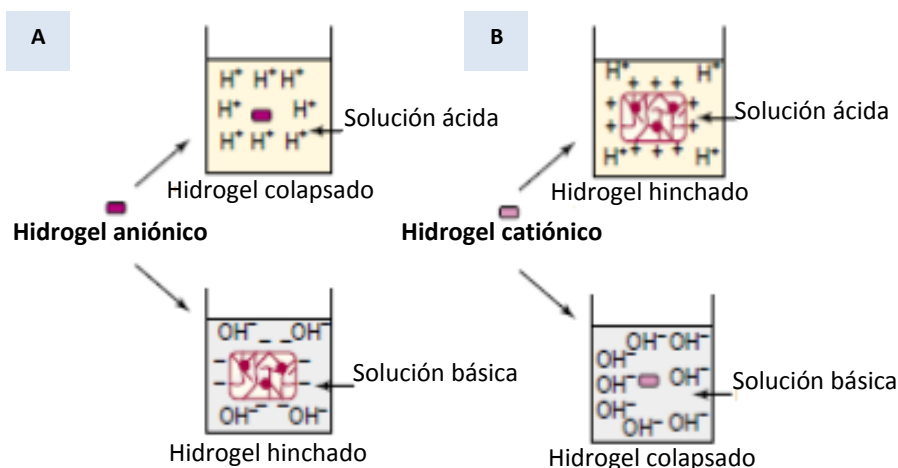


Figura 15. Comportamiento de los hidrogeles aniónicos (A) y catiónicos (B) ante cambios de pH del medio (Gupta et al., 2002).

2.5.3. Nanohidrogeles sensibles a cambios en el potencial redox

La gran diferencia que existe en el potencial redox entre el espacio extracelular y el interior celular puede ser empleada para la liberación del fármaco en el interior celular. De hecho, esta estrategia es muy utilizada en la liberación de genes ya que evita la degradación prematura de moléculas tan frágiles como ADN o ARN mediante la protección de los nanosistemas hasta el lugar óptimo para su liberación, el núcleo (Mintzer & Simanek, 2009).

El espacio extracelular es considerado un medio oxidativo, mientras que el interior celular es un medio reductor (Fleige et al., 2012). Este hecho se debe fundamentalmente a la diferencia de concentración de tioles, en concreto glutathion reducido (GSH), cisteína libre

y homocisteína en ambos medios. Actualmente, la diferencia en la concentración de GSH se establece en 2-3 órdenes de magnitud. En un entorno oxidativo como el plasma sanguíneo, los grupos tiol forman enlaces disulfuro, que son escindidos en un entorno reductor como el citosol. De este modo, la formación y reducción de los enlaces disulfuro en entornos oxidados y reducidos respectivamente, permite el diseño de nanosistemas capaces de responder a dicho estímulo. Además, Lehner y colaboradores demostraron que las nanopartículas basadas en copolímeros sensibles al potencial redox eran capaces de superar la resistencia múltiple a fármacos de las células cancerígenas (Lehner *et al.*, 2012).

El uso de polímeros bio reducibles en el diseño de nanohidrogeles permite limitar la liberación del fármaco al interior celular. Actualmente, una de las estrategias más utilizadas es el uso de entrecruzantes con puentes disulfuro en su estructura, como el N, N'-cistaminbisacrilamida (CBA) (Fig.16). Al añadir este tipo de entrecruzantes, la estructura del nanohidrogel permanece estable en el medio extracelular y sólo se desestabiliza al entrar en contacto con el medio reductor del interior celular. Dicha desestabilización se debe a la reducción de los puentes disulfuro de la red polimérica, lo que implica finalmente la liberación del compuesto activo (Fleige *et al.*, 2012).

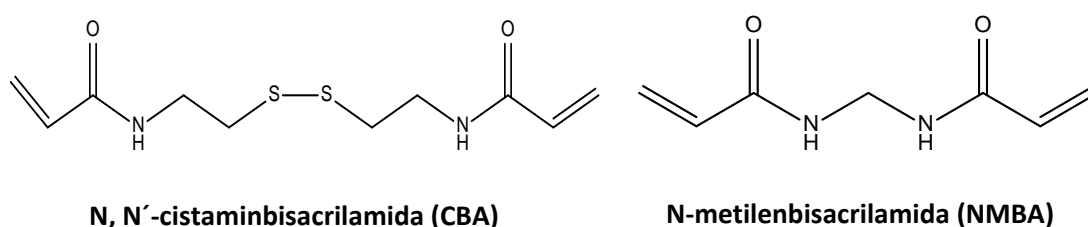


Figura 16. Diferentes tipos de entrecruzantes con grupos vinílicos en sus extremos. Estructura química de N, N'-cistaminbisacrilamida y de N-metilenbisacrilamida.

Además de los estímulos explicados previamente, existen otras señales físicas y químicas capaces de actuar sobre los nanohidrogeles y producir una respuesta, como la presencia de ciertas enzimas, la luz o los ultrasonidos (Caló & Khutoryanskiy, 2015; Fleige *et al.*, 2012). La posibilidad de combinar la respuesta a varios de los estímulos citados limita en gran medida la liberación del fármaco en las condiciones deseadas, lo que supone uno de los retos actuales en la terapia del cáncer, como así lo demuestran las patentes recientes de nanosistemas multirespuesta (Caló & Khutoryanskiy, 2015).

OBJETIVOS

Actualmente, el cáncer constituye una de las principales causas de muerte en todo el mundo, con mayor incidencia en los países desarrollados. Los avances conseguidos en los últimos años han permitido perfeccionar las técnicas de detección, diagnóstico y tratamiento (radioterapia y quimioterapia) de la mayoría de los tipos de cáncer conocidos, mejorando la calidad de vida de los pacientes y disminuyendo la tasa de mortalidad.

Sin embargo, la creciente incidencia del cáncer demuestra que dichos avances son insuficientes, pues actualmente no existen tratamientos totalmente efectivos capaces de erradicar el tumor de forma específica sin dañar los órganos y tejidos sanos. Para solucionar dicho problema, resulta necesario ampliar el conocimiento científico sobre los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo del tumor y diseñar nuevos fármacos capaces de actuar exclusivamente sobre los órganos diana.

La aplicación de la nanotecnología en la detección y tratamiento del cáncer ha supuesto un gran avance debido a las ventajas que ofrece el uso de sistemas de tamaño nanométrico. Las propiedades físico-químicas que ofrecen los nanosistemas y la facilidad del transporte a través de las membranas biológicas, justifican su uso en la vehiculización de fármacos. La protección que ofrece el nanosistema evita la degradación enzimática del fármaco encapsulado, aumentando el tiempo de circulación en sangre. Además, la gran variedad de nanomateriales y los múltiples métodos de obtención de los sistemas, permiten modificar las propiedades de estos vehículos (tamaño, velocidad de liberación, capacidad de degradación, carga de fármaco, etc.) en función de sus aplicaciones posteriores. Por último, su pequeño tamaño favorece la acumulación de estos sistemas en los alrededores del tumor como consecuencia de su desorganizada estructura, fenómeno conocido como EPR (*efecto de permeabilidad y retención aumentadas*). El tamaño nanométrico facilita el paso de estos

sistemas a través de las membranas desestructuradas de los vasos sanguíneos del tumor y, debido a una circulación sanguínea y linfática ineficientes, son retenidos en las proximidades de la masa tumoral. Como resultado de todo ello, la administración de fármacos encapsulados en nanosistemas consigue incrementar el índice terapéutico del fármaco y reducir las dosis necesarias, con el coste económico que ello conlleva, para alcanzar el efecto deseado.

Entre las múltiples nanoestructuras disponibles, los nanohidrogeles han sufrido un rápido desarrollo en los últimos años como consecuencia de su amplia variedad de aplicaciones médicas posibles (ingeniería de tejidos, sistemas de liberación de fármacos, apósitos, etc.). Respecto a su utilidad como sistemas de liberación de fármacos, los nanohidrogeles ofrecen la posibilidad de expandir su red tridimensional y liberar su contenido bajo unas condiciones predeterminadas. Así pues, los llamados *nanohidrogeles inteligentes* son capaces de responder a varios estímulos del medio tumoral induciendo cambios en la conformación de su estructura tridimensional (estado hinchado/colapsado) y promoviendo la salida del agente terapéutico principalmente en las condiciones establecidas en el diseño de dichos nanosistemas. Además, el uso de polímeros biocompatibles en la síntesis de los nanohidrogeles reduce la toxicidad que pudiera producir la administración de estos nanomateriales.

De acuerdo con las consideraciones expuestas, el objetivo principal de este trabajo ha sido la síntesis, caracterización y evaluación biológica de nanohidrogeles basados en polímeros sensibles a estímulos (pH, temperatura y potencial redox) para la liberación controlada de paclitaxel. El paclitaxel es un fármaco muy utilizado en cáncer de mama, pulmón, cuello de cérvix y ovario. Sin embargo, su elevada hidrofobicidad implica la administración conjunta

con tensioactivos como el Cremophor®EL, y etanol, que desencadenan efectos secundarios severos como reacciones de hipersensibilidad, nefrotoxicidad, neurotoxicidad, dificultad en la respiración, letargia e hipotensión. Por tanto, es necesario el diseño de nuevas formulaciones farmacológicas que permitan incrementar el tiempo de residencia en sangre del principio activo y liberar el fármaco en la diana específica de acción. Una alternativa esperanzadora para mejorar la terapia convencional consiste en el uso de *nanohidrogeles inteligentes*.

Para la consecución de este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Síntesis por microemulsión inversa de nanohidrogeles sensibles a cambios de pH, temperatura y estado redox, basados en N-isopropilacrilamida (NIPA; sensible a temperatura), N-hidroxietilacrilamida (HEAA; sensible a pH) y 2-acril-amido-etil-carbamato (2AAECM) en distintas proporciones y dos agentes entrecruzantes: N-metilenbisacrilamida (NMBA; no sensible a cambios redox) y N,N'-cistamin-bisacrilamida (CBA; sensible a potencial redox).
2. Caracterización de los nanohidrogeles sintetizados mediante la evaluación de su tamaño, morfología, grado de hinchamiento, potencial zeta y estabilidad térmica, así como de su utilidad como sistemas transportadores de fármacos hidrófobos como el paclitaxel, teniendo en cuenta la cuantificación del fármaco encapsulado y la cinética de liberación *in vitro*, bajo condiciones simuladas de pH y de concentración de glutatión reducido propias del interior de las células tumorales.

Objetivos

3. Determinación de la citocompatibilidad y la efectividad de los nanosistemas sintetizados en líneas celulares de cáncer de mama (MCF7, T47D) y cáncer de ovario (HeLa), mediante el estudio de la viabilidad celular, la inclusión de los sistemas nanoparticulados en las células y la acción del fármaco en el ciclo celular.

4. Caracterización *in vivo* de la hemocompatibilidad y biocompatibilidad de los nanohidrogeles mediante la evaluación de parámetros hematológicos y de coagulación y la valoración de marcadores de daño hepático y renal y defensas antioxidantes.

5. Evaluación *in vivo* de la actividad antitumoral de los nanohidrogeles cargados con PTX en un modelo de cáncer de mama xenográfico desarrollado en ratones atímicos, mediante el análisis de la evolución del volumen del tumor, el índice organosomático, los efectos toxicológicos asociados a la administración del fármaco y la histología del tumor.

La metodología llevada a cabo en este trabajo así como los resultados obtenidos de los diferentes estudios realizados, se describen de forma detallada en las publicaciones de varias revistas científicas, las cuales se adjuntan a continuación, con los siguientes títulos:

1. Nanohidrogeles biorespuesta basados en HEAA y NIPA para la liberación de fármacos poco solubles.

[Bioresponsive nanohydrogels based on HEAA and NIPA for poorly soluble drugs delivery. E. Pérez, A. Martínez, C. Teijón, J.M. Teijón, M. D. Blanco. *International Journal of Pharmaceutics*, 470: 107–119 (2014)].

2. Hidrogeles sensibles a pH y glutatión para la liberación localizada de paclitaxel.

[pH and glutathione-responsive hydrogel for localized delivery of paclitaxel. E. Pérez, A. Fernández, R. Olmo, J.M. Teijón, M.D. Blanco. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 116: 247–256 (2014)].

3. Evaluación de la biocompatibilidad de los nanohidrogeles sensibles a pH y glutatión después de su administración intravenosa.

[Biocompatibility evaluation of pH and glutathione-responsive nanohydrogels after intravenous administration. E. Pérez, R. Olmo, C. Teijón, E. Muñíz, N. Montero, J.M. Teijón, M.D. Blanco. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136: 222-231 (2015)].

4. Efecto antitumoral mejorado del paclitaxel tras su administración *in vivo* en nanohidrogeles sensibles a pH y glutatión.

[Improved antitumor effect of paclitaxel administered in vivo as pH and glutathione-sensitive nanohydrogels. E. Pérez, A. Martínez, C. Teijón, R. Olmo, J. M. Teijón, M. D. Blanco. *International Journal of Pharmaceutics*, 492: 10–19 (2015)].

Con el objetivo de facilitar el seguimiento del trabajo, se ha procedido a resumir brevemente el objetivo, la metodología y los resultados de cada uno de los artículos publicados.

1. Nanohidrogeles biorespuesta basados en HEAA y NIPA para la liberación de fármacos poco solubles.

[Bioresponsive nanohydrogels based on HEAA and NIPA for poorly soluble drugs delivery.

E. Pérez, A. Martínez, C. Teijón, J.M. Teijón, M. D. Blanco. *International Journal of Pharmaceutics*, 470: 107–119 (2014)].

Objetivo

El objetivo de este trabajo fue la síntesis y caracterización *in vitro* de nanohidrogeles copoliméricos no biodegradables y sensibles a cambios de pH y temperatura, obtenidos mediante la técnica de microemulsión inversa a partir de N-isopropilacrilamida (NIPA), N-hidroxietilacrilamida (HEAA) y 2-acril-amido-etil-carbamato (2AAECM), entrecruzados con N-metilenbisacrilamida (NMBA). Una vez sintetizados y caracterizados, los nanohidrogeles fueron cargados con paclitaxel para su evaluación como posibles sistemas de liberación controlada de dicho fármaco.

Metodología:

En primer lugar, se prepararon los monómeros utilizados en la síntesis de nanohidrogeles.

El monómero 2-acril-amido-etil-carbamato (2AAECM) fue diseñado y sintetizado con la finalidad de actuar de brazo extensor para la unión futura de ligandos implicados en la vehiculización activa de los nanotransportadores. La síntesis de dicho monómero requiere la obtención previa de un compuesto intermedio, N-tert-butoxicarbonil-etilen diamina (NH-BOC) (Fig. 17), que se lleva a cabo en dos etapas. Este producto intermedio presenta dos aminas terminales: una de ellas queda protegida con un grupo protector (NH-BOC) y la otra

queda libre, ya que es responsable de la reacción implicada en la obtención del monómero 2AAECM (Fig. 18).

A continuación se detalla el procedimiento llevado a cabo en la síntesis de dicho monómero con el objetivo de entender mejor la síntesis de los nanohidrogeles:

- Síntesis de NH-BOC: La solución constituida por el compuesto BOC (di-tert-butil dicarbonato) disuelto en diclorometano (0,20 g/ml) fue añadida lentamente sobre una solución de etilendiamina disuelta en diclorometano (0,11 g/ml), controlando la temperatura por debajo de -20°C con un termopar. La reacción resultante dió lugar a una solución blanquecina y homogénea, que se dejó atemperar a temperatura ambiente. Los residuos de diclorometano presentes en la solución fueron eliminados por rotaevaporación, quedando un precipitado blanco constituido por los subproductos de reacción (compuesto monosustituido y el bisustituido). La purificación del compuesto monosustituido se llevó a cabo por filtración del precipitado en agua milli-Q debido a la solubilidad de dicho compuesto en este medio. A continuación, se realizaron sucesivas extracciones del compuesto monosustituido en un medio orgánico (50 ml de acetato de etilo), añadiendo cloruro sódico para favorecer la extracción. Finalmente, se eliminaron los residuos de acetato de etilo por rotaevaporación, obteniendo el monómero NH-BOC en estado sólido.

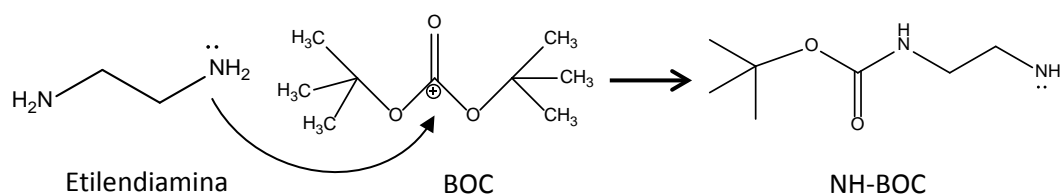
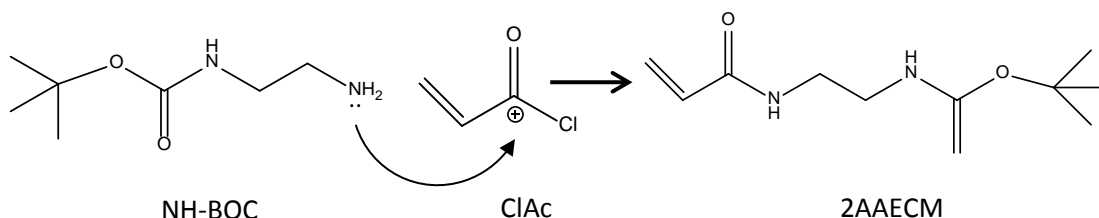


Figura 17. Reacción química de síntesis del NH-BOC (N-tert-butoxicarbonil-etilen diamina).

- Síntesis del 2AAECM: En primer lugar, se disolvieron 7,21 g del NH-BOC obtenido en el paso anterior en diclorometano (30 ml) y trietilamina (TEA; 6,27 ml). Por otro lado, se disolvieron 4,54 ml de cloruro de aciloilo (ClAc) en 50 ml de diclorometano en un matraz de reacción de fondo redondo. La solución constituida por el compuesto NH-BOC fue añadida gota a gota sobre la solución de cloruro de aciloilo previamente enfriado a -20°C con nitrógeno líquido y agitación magnética constante. La variación de la temperatura durante la reacción fue monitorizada con el uso de un termopar. Tras la adición total del NH-BOC, la solución resultante fue atemperada a temperatura ambiente y el diclorometano residual fue eliminado mediante rotaevaporación. El precipitado blanco resultante fue purificado con agua milli-Q y sucesivas extracciones orgánicas con acetato de etilo. Finalmente, la eliminación del disolvente orgánico por rotaevaporación permitió obtener el monómero deseado (2AAECM) (Fig. 18).

A)



B)

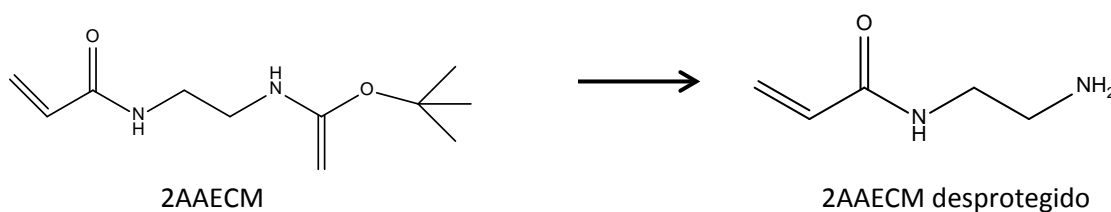


Figura 18. Reacción de síntesis del 2AAECM. A) Síntesis del 2AAECM a partir del NH-BOC; B) Desprotección del NH-BOC.

El resto de monómeros empleados en la síntesis de los nanohidrogeles se utilizaron directamente a partir del producto ya comercializado. Como excepción, previamente al uso

del monómero N-hidroxietilacrilamida (HEAA), fue necesaria la eliminación del inhibidor monometil éter hidroquinona mediante cromatografía de intercambio iónico (DeHibit-200). Una vez obtenidos los monómeros necesarios, se llevó a cabo la polimerización por microemulsión inversa, siguiendo el protocolo descrito en la Fig. 16. Se adicionó la fase oleosa, gota a gota, sobre la fase acuosa con agitación magnética constante. La fase acuosa está constituida por la mezcla de monómeros (NIPA, HEAA, 2AAECM), entrecruzante (NMBA) y una sal (KNO_3) para disminuir el diámetro micelar. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en estudios previos, se obtuvieron dos formulaciones diferentes (NIPA/HEAA/2AAECM-NHA 80/15/5-NMBA y NHA 80/10/10-NMBA), variando la proporción de monómeros utilizados en la síntesis, sin modificar la cantidad de entrecruzante utilizado (CBA, 5%). Por otra parte, la fase oleosa consta de una mezcla de aceite (Isopar M) y sistema tensioactivo (Atlas G[®]1086 y Arlancel[®]83) en una relación en peso determinada en estudios previos. Al adicionar la fase oleosa sobre la disolución de monómero, la muestra inicial se torna turbia, y va desapareciendo dicha turbidez (transformación de macroemulsión en microemulsión) con la adición constante de fase oleosa. A continuación, la mezcla que contenía las micelas preformadas se traspasó a un reactor donde se llevó a cabo la unión covalente entre las cadenas de monómeros. A partir de este momento, la síntesis se realizó mediante agitación magnética y flujo de nitrógeno constantes para eliminar el oxígeno del medio de reacción, controlando la temperatura a lo largo de todo el proceso. Una vez eliminado todo el oxígeno, se añadió poco a poco el iniciador diluido en agua (DsNa) y se controló la variación de temperatura de la reacción de polimerización. La mezcla polimérica se purificó por precipitación selectiva en acetona y dietil éter, con el objetivo de eliminar los monómeros que no han reaccionado y transferir los nanohidrogeles sintetizados a un medio acuoso. A continuación, el NH-BOC (protector del grupo amino del

2AAECM) fue eliminado al embeber los nanohidrogeles en medios ácidos (tampón fosfato citrato pH2) con el objetivo de obtener un grupo funcional libre para la vehiculización activa futura de estos nanosistemas. Finalmente, los nanohidrogeles fueron purificados de nuevo en agua destilada y liofilizados para su utilización posterior. Además, se registró el peso de los nanohidrogeles obtenidos para comprobar la eficiencia del método de síntesis.

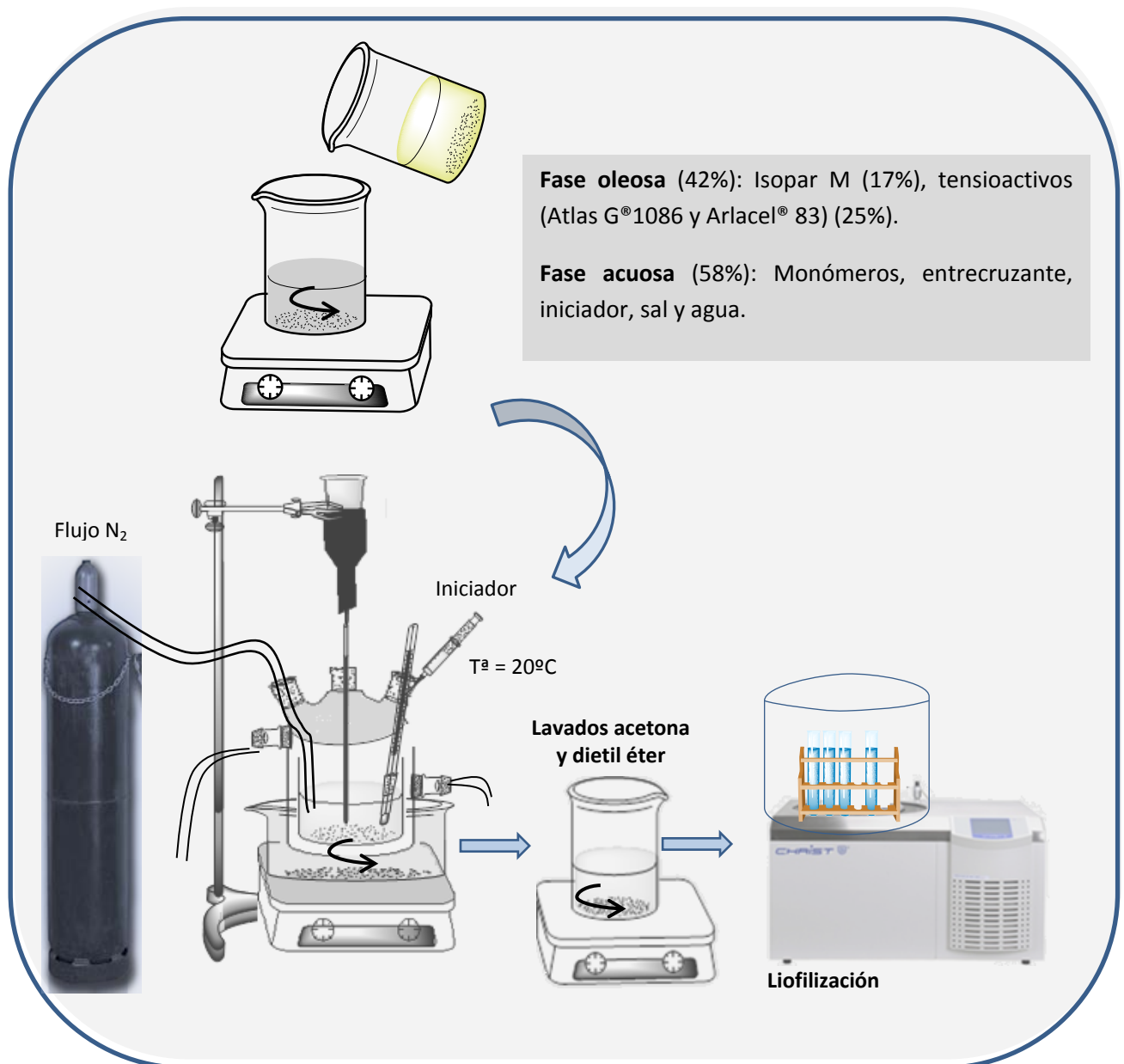


Figura 19. Protocolo de síntesis de nanohidrogeles.

Una vez sintetizados los nanohidrogeles, el paclitaxel fue encapsulado en su interior mediante inmersión de 50 mg de nanohidrogeles en una solución de PTX-etanol (5 mg/ml) a temperatura ambiente (22°C) y en oscuridad durante 24h. El remanente de fármaco no encapsulado fue eliminado por centrifugación y evaporación del precipitado hasta la completa eliminación de etanol. La cantidad de fármaco incluido en los nanohidrogeles fue cuantificado mediante la extracción directa en etanol. Para ello, se sumergieron los nanohidrogeles cargados con PTX en etanol absoluto (0,1 mg/ml) a temperatura ambiente para favorecer el hinchamiento de los hidrogeles (LCST=32°C), agitación magnética constante para facilitar la salida del fármaco y oscuridad, con el objetivo de evitar la degradación del fármaco en presencia de luz. Posteriormente, la suspensión resultante fue centrifugada para favorecer aún más la salida del PTX de los hidrogeles y la cantidad de fármaco contenida en el sobrenadante fue cuantificada por cromatografía líquida de alta sensibilidad (HPLC).

Tras la síntesis de nanohidrogeles cargados con PTX, se procedió a la caracterización *in vitro* de los sistemas con carga y sin carga de fármaco. En primer lugar, se llevó a cabo el estudio de tamaño y morfología mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y dispersión dinámica de luz (DLS) a distintas temperaturas para valorar el comportamiento de estos hidrogeles ante dicho estímulo. En el caso de las muestras analizadas por TEM, los nanohidrogeles fueron dispersados en una solución acuosa a una temperatura superior (37°C) a la temperatura crítica del monómero NIPA (LCST=32°C). Por otro lado, el estudio de tamaños realizado por DLS se llevó a cabo en un medio acuoso con una temperatura inferior (25°C) a la temperatura crítica del monómero NIPA (LCST=32°C).

Posteriormente se realizó un estudio de espectroscopia infrarroja (FTIR) de los materiales originales y de los materiales modificados, con el objetivo de comprobar las alteraciones inducidas en los monómeros y analizar las interacciones que se establecen entre ellos para formar las partículas copoliméricas.

A continuación, se analizó la estabilidad térmica de los nanohidrogeles obtenidos mediante termogravimetría (TGA), analizando los perfiles de degradación térmica de los materiales originales y de los materiales modificados, formando nanohidrogeles. Asimismo, se analizó el efecto del PTX en la estabilidad térmica de estos hidrogeles al comparar los sistemas sin fármaco y con fármaco. Se estudió la temperatura de degradación máxima y el porcentaje de pérdida de masa en el proceso de descomposición térmica.

La estabilidad de las cadenas poliméricas que forman la red tridimensional de estos hidrogeles entrecruzados con NMBA se encuentra determinada fundamentalmente por dos estímulos: temperatura y pH. Como consecuencia de ello, se consideró necesario determinar el comportamiento de estos hidrogeles en un medio acuoso con variaciones de pH y temperatura. El estudio de hinchamiento dependiente de la temperatura se realizó de forma cualitativa mediante las técnicas TEM y DLS, como se explicó anteriormente. Sin embargo, en el caso del estudio de hinchamiento dependiente de pH, se realizó un ensayo adicional mediante la inmersión de los nanohidrogeles en tampón fosfato citrato (pH 4-7,4) a una temperatura constante de 37°C, para evitar interferencias con el hinchamiento debido a cambios de temperatura. Tras dos horas de agitación constante, los nanohidrogeles hinchados fueron filtrados con una bomba de vacío y pesados para calcular la cantidad de agua retenida en la red polimérica.

Los estudios de liberación del fármaco se llevaron a cabo en medios fisiológicos simulados en agitación orbital, variando el pH, pero sin variaciones en el contenido de GSH, ya que el entrecruzante utilizado no es sensible al potencial redox. Aunque el Tween 80® del medio de liberación (PBS-Tween 80 0,5%) no se encuentra presente en condiciones fisiológicas, su uso facilita la salida del fármaco de los sistemas debido a la elevada hidrofobicidad del PTX y evita la unión del fármaco a las paredes del recipiente usado durante el estudio de liberación. Las muestras recogidas a diferentes tiempos se procesaron por HPLC y los resultados obtenidos a partir de los distintos medios de liberación se ajustaron a los modelos matemáticos pertinentes para comprobar el mecanismo principal implicado en la salida del fármaco desde los nanohidrogeles. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Para los estudios con cultivos celulares, se seleccionaron tres líneas celulares de cáncer humano: MCF7 y T47D (células de cáncer de mama); y HeLa (células de cáncer de ovario), ya que el tratamiento con PTX en pacientes que desarrollan dichos tipos de cáncer ha mostrado resultado muy positivos. A partir de dichas líneas celulares, se ha evaluado la viabilidad celular, la internalización de los nanohidrogeles por parte de las células y el efecto del fármaco sobre el ciclo celular. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

El estudio de internalización de los nanohidrogeles en las líneas celulares indicadas se llevó a cabo mediante dos tipos de ensayos: cuantitativo y cualitativo. Se prepararon los nanohidrogeles cargados con un fluoróforo (6-cumarina) para poder determinar la señal fluorescente emitida después de ser internalizados por las células. La carga se llevó a cabo siguiendo la metodología empleada en la encapsulación del fármaco, centrifugando los nanohidrogeles resultantes para evitar la presencia de cumarina libre. La determinación cuantitativa de la internalización se valoró mediante espectrofluorimetría tras la incubación

de las tres líneas celulares con los nanohidrogeles cargados con cumarina (1 mg/ml) a diferentes tiempos (4, 24 y 48 horas). Por otro lado, la determinación cualitativa se realizó mediante imágenes obtenidas con un microscopio de fluorescencia tras el lavado del excedente de nanosistemas no internalizados.

El ensayo de viabilidad celular se realizó con los nanohidrogeles sin fármaco, para estudiar la citocompatibilidad de los sistemas, y con los nanohidrogeles con fármaco, para evaluar la actividad citotóxica de los mismos. Se seleccionaron tres concentraciones de fármaco (10, 20 y 30 μM) y sus correspondientes equivalentes en masa de nanohidrogeles, y se valoró la viabilidad celular mediante el método MTT después de 24 y 72 horas de incubación.

Finalmente, se procedió a la evaluación del efecto del paclitaxel sobre el ciclo celular de todas las líneas celulares. Se seleccionaron las mismas concentraciones de fármaco libre empleadas en el estudio de viabilidad celular (10, 20, 30 μM) y el equivalente en peso a la concentración de 30 μM de fármaco para el caso de los nanohidrogeles sin fármaco y con fármaco. Tras 24 horas de incubación, se analizó el efecto del fármaco sobre el ciclo celular mediante citometría de flujo.

Resultados:

Las imágenes de los nanohidrogeles obtenidas por microscopía electrónica (TEM; Figura 1) mostraron una morfología esférica y una superficie irregular al analizar los dos tipos de composiciones (NHA 80/15/5-NMBA y NHA 80/10/10-NMBA), con un tamaño comprendido entre 20-80 nm, que corresponde a las condiciones del estado colapsado. Este tamaño disminuía en los nanohidrogeles cargados con fármaco. Por otro lado, el tamaño de los hidrogeles sin fármaco en condiciones de temperatura correspondientes al estado

hinchado ($T^a = 25^{\circ}\text{C}$) analizado con DLS (Figura 2) fue superior en ambas formulaciones, con una media de 286 nm para los nanohidrogeles NHA 80/15/5-NMBA y 332 nm para los nanohidrogeles NHA 80/10/10-NMBA. Bajo estas condiciones de temperatura, el tamaño de los sistemas disminuyó ligeramente al incorporar el fármaco, obteniendo unos valores de 207 nm y 243 nm, respectivamente. Además, los resultados del estudio DLS mostraron una estrecha distribución de tamaños, sin la presencia de agregados.

El estudio de espectroscopia infrarroja (FTIR) (Figura 3) permitió confirmar la unión de los monómeros mediante sus grupos vinílicos y la presencia de bandas correspondientes a cada uno de los monómeros utilizados en el proceso de síntesis. Además, el espectro obtenido a partir de ambas composiciones poliméricas (NHA 80/15/5-NMBA y NHA 80/10/10-NMBA) fue muy similar.

El estudio de estabilidad térmica de los nanohidrogeles sin fármaco mostró un único pico de degradación térmica a la temperatura de $386,7\text{-}380,8^{\circ}\text{C}$, correspondiente a una pérdida de masa de 65,84% para el caso de NHA 80/15/5-NMBA y 63,59% en los nanohidrogeles NHA 80/10/10-NMBA. Dicho espectro fue muy similar al analizar los nanohidrogeles cargados con PTX. A su vez, el fármaco puro reveló un único pico de degradación a $240,8^{\circ}\text{C}$ mientras que dicho espectro de degradación se desplazó a la temperatura de 390°C cuando el fármaco es encapsulado en los nanohidrogeles (Figura 4).

Los resultados obtenidos del estudio de hinchamiento llevado a cabo a temperatura constante (37°C) mostraron una relación inversa entre el grado de hinchamiento del hidrogel y los niveles de pH del medio en el rango analizado (pH 4-7,4) (Figura 5).

Respecto al fármaco incorporado en estos nanosistemas, la cuantificación del PTX después de su extracción directa en etanol mostró una capacidad de carga de $37 \pm 0,1$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ en los nanohidrogeles NHA 80/15/5-NMBA y $35,9 \pm 0,9$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ en los nanohidrogeles NHA 80/10/10-CBA, correspondiente a una eficacia de encapsulación de 73,8% y 72,2%, respectivamente (Tabla 1).

Los estudios de liberación del PTX (Figura 6) mostraron una liberación incompleta en el tiempo considerado en el experimento (144 horas) y la ausencia de efecto *burst*. Cuando los hidrogeles fueron dispersados en medio ácido, se obtuvo una cantidad máxima de fármaco liberado fue del 77,1% ($28,5 \pm 1,4$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ NG) en los nanohidrogeles NHA 80/15/5-NMBA y 68,1% ($24,4 \pm 1,4$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ NG) en los nanohidrogeles NHA 80/10/10-NMBA. Por otro lado, la liberación del PTX fue más lenta en medios de liberación con pH fisiológico y la cantidad de fármaco liberado en el tiempo del experimento fue inferior: 31,8% ó $11,8 \pm 0,6$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ en el caso de los nanohidrogeles NHA 80/15/5-NMBA y 28,1% ó $10,1 \pm 1,5$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ en el caso de los nanohidrogeles NHA 80/10/10-NMBA.

En el estudio de la velocidad de liberación del fármaco a partir de los nanohidrogeles se distinguieron dos fases (Tabla 2). En todos los casos, se observó una primera fase de liberación rápida (0-5,5 horas), seguida por una segunda fase de liberación más lenta (5,5-144 horas). Por otro lado, el ajuste de las cinéticas de liberación a los modelos matemáticos seleccionados (Tabla 3) permitió comprobar que la liberación se ajustaba siguiendo el orden: Korsmeyer–Peppas > Higuchi > Hixson–Crowell y orden cero.

La evaluación del grado de internalización de estos nanosistemas en las tres líneas celulares seleccionadas se muestra en las Figuras 7 y 8. En primer lugar, los resultados de la determinación cuantitativa (Figura 7) mostraron una mayor internalización al aumentar el

tiempo de incubación en las tres líneas celulares, alcanzando un máximo a las 48h. Teniendo en cuenta las líneas celulares utilizadas en el ensayo, se observó una internalización superior en las células MCF7 de ambas formulaciones de nanohidrogeles. Por otro lado, al comparar dichas formulaciones, se observó una mayor eficiencia de internalización de los nanohidrogeles NHA 80/10/10-NMBA (43,63–141,24 ng/cm²) al compararlos con la formulación NHA 80/15/5-NMBA (25,29–95,55 ng/cm²) en todas las líneas celulares. En segundo lugar, las imágenes captadas para la determinación cualitativa de la internalización celular (Figura 8) revelaron la presencia de cumarina en el interior celular como consecuencia de la señal de fluorescencia emitida alrededor del núcleo.

Los ensayos de viabilidad celular (Figura 9) llevados a cabo con los nanohidrogeles sin fármaco mostraron una mayor citocompatibilidad de los nanosistemas NHA 80/15/5-NMBA, con variaciones en función del tiempo de incubación y la concentración de nanohidrogeles utilizada. Dichos nanohidrogeles mostraron una viabilidad celular superior al $77,97 \pm 2,55\%$ a la concentración de 0,69 mg/mL (equivalente a una concentración de PTX encapsulado de 30 mM) después de 72 horas de tratamiento, disminuyendo a valores de $4,60 \pm 1,69\%$ en células HeLa después de 144 horas de incubación. Por el contrario, la viabilidad celular tras la administración de los nanohidrogeles NHA 80/10/10-NMBA mostró valores por debajo de $72,32 \pm 3,97\%$ en todas las líneas celulares. Al utilizar nanohidrogeles cargados con fármaco (Figura 9) se observó que la citotoxicidad de las formulaciones ensayadas era dependiente de la concentración y del tiempo de incubación, con una viabilidad celular inferior al $6,46 \pm 0,68\%$ cuando se utilizaron los nanohidrogeles NHA 80/15/5-NMBA y $4,14 \pm 0,78\%$ al emplear nanohidrogeles NHA 80/10/10-NMBA, después de 144 horas de incubación. Además, los resultados mostraron diferencias entre las líneas celulares ensayadas, ya que a las 72 horas de incubación se alcanzó el 100% de citotoxicidad en las

células HeLa utilizando ambas formulaciones de nanohidrogeles, mientras que la citotoxicidad mostrada por las líneas celulares MCF7 y T47D fue menor.

Por último, los resultados obtenidos del estudio del ciclo celular por citometría de flujo (Figura 10, Tabla 4) no revelaron diferencias significativas entre las células control y las tratadas con nanohidrogeles sin fármaco (45–62% de las células en fase G_0/G_1 y 34–58% de las células en fase G_2/M). Sin embargo, al analizar el efecto del fármaco en el ciclo celular, se observó un incremento del número de células en fase G_2/M al utilizar el fármaco en solución (74–80% a 10 μM , 84–86% a 20 μM y 80–83% a 30 μM), con resultados muy parecidos a los obtenidos tras la administración de los nanohidrogeles a una concentración de 30 μM .

Todos los resultados cuantitativos obtenidos a lo largo de este trabajo fueron analizados con el programa SPSS (versión 19.0) para determinar las diferencias estadísticas existentes entre las dos formulaciones ensayadas, considerando los valores obtenidos a partir del triplicado de cada una de las determinaciones.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

Bioresponsive nanohydrogels based on HEAA and NIPA for poorly soluble drugs delivery



Elena Pérez^a, Ana Martínez^a, César Teijón^b, Jose M. Teijón^a, M. Dolores Blanco^{a,*}

^a Polymeric Materials Group for the Controlled Release of Bioactive Compounds in Biomedicine, Biochemistry and Molecular Biology Department, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid 28040, Spain

^b Nursing Department, Facultad de Enfermería, Universidad Complutense de Madrid, Madrid 28040, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 March 2014
Received in revised form 1 May 2014
Accepted 3 May 2014
Available online 9 May 2014

Keywords:

Controlled release
Paclitaxel
Hydrogel
Stimuli-responsive
Passive targeting
Tumor cell

ABSTRACT

Environmentally sensitive hydrogels have gained considerable attention in recent years as one of the most promising drug delivery systems. In the present study, two new formulations of pH and temperature stimuli-responsive nanogels (NGs) based on poly-*N*-isopropylacrylamide (NIPA), *N*-hydroxyethyl acrylamide (HEAA) and *tert*-butyl 2-acrylamidoethyl carbamate (2AAECM) were synthesized and evaluated for passive targeting of paclitaxel (PTX). Nanogels were prepared by microemulsion polymerization method using *N*-methylenebis(acrylamide) (NMBA) as crosslinking agent. TEM images and DLS results showed nanosized spherical hydrogels. FTIR spectra confirmed the synthesis of nanogels by radical polymerization among vinyl groups of monomers. The PTX loading capacity, encapsulation efficiency and *in vitro* release were analyzed by HPLC. The cumulative release profile of the PTX-loaded nanohydrogels within 144 h showed a faster drug release at acid pH (pH 5), similar to those observed at lysosome compartment, whereas a fewer PTX amount was released from NGs at pH similar to plasma levels. Cellular uptake assays revealed rapid penetration and intracellular accumulation of those nanogels in MCF7, HeLa and T47D cells after 48 h incubation. MTT assays showed cell viability dependence on concentration and time incubation. Finally, the PTX effect on cell viability showed a G₂/M cell arrest after using PTX-loaded NGs and pure PTX.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cancer is a major public health problem worldwide and breast cancer is the most frequently diagnosed cancer in women of all female cancers (Siegel et al., 2013). Thus, administration of therapeutic agents selectively to the targeted sites without adverse effects on healthy tissue is the major focus in cancer research.

Prominent chemotherapeutic agents include paclitaxel, a taxane which has been considered the most significant advance in chemotherapy for the past 15–20 years by National Cancer Institute (NCI) (Singla et al., 2002; Zhang et al., 2014) and its use in palliative therapy was approved for patients with ovarian and breast cancers (Rowinsky and Donehower, 1995). Paclitaxel (taxol) was isolated in the early 1960s from the bark of Pacific yew (*Taxus brevifolia*; family *Taxaceae*) and it has cytotoxic activity against many tumors as it promotes tubulin polymerization, causing cell death by disrupting the dynamics necessary for cell division (Brannon-Peppas and Blanchette, 2012; Alken and Kelly, 2013;

Zhang et al., 2014). Taxol is poorly soluble in an aqueous medium; therefore, it is currently formulated in a vehicle composed of 1:1 blend of Cremophor EL[®] (polyethoxylated castor oil) and ethanol for its administration. However, the allergic reactions and systemic toxicity compromises its clinical applications (Dhanikula and Panchagnula, 1999). For these reasons, development of alternative formulations of paclitaxel is needed in order to enhance aqueous solubility and decrease its side effects.

Nanogels are presently under investigation as drug delivery formulations (Ganta et al., 2008; Hoare and Kohane, 2008) to reduce the problems of conventional dosage forms molecules. These nano-size vehicles can reach tumors via passive targeting resulting in progressive accumulation based on the enhanced permeability and retention (EPR) effect, which can passively accumulate macromolecules and increase their tumor concentration by 70-fold (Duncan, 2003). Hydrogels are three-dimensional, cross-linked networks with several advantages above other nanovehicles due to their similar physical properties as that of living tissue, based on their high water content, soft and rubbery consistency and low interfacial tension with water or biological fluids (Blanco et al., 2002; Sood et al., 2013). Furthermore, nanogels are very promising as drug delivery carriers due to their high

* Corresponding author. Tel.: +34 91 394 1447; fax: +34 91 394 1691.
E-mail address: mdb5235@ucm.es (M. D. Blanco).

2. Hidrogeles sensibles a pH y glutation para la liberación localizada de paclitaxel.

[pH and glutathione-responsive hydrogel for localized delivery of paclitaxel. E. Pérez, A. Fernández, R. Olmo, J.M. Teijón, M.D. Blanco. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 116: 247–256 (2014)].

Objetivo:

El objetivo de este trabajo fue la síntesis y caracterización *in vitro* de nanohidrogeles copoliméricos biodegradables y sensibles a cambios de pH, temperatura y potencial redox obtenidos mediante la técnica de microemulsión inversa a partir de N-isopropilacrilamida (NIPA), N-hidroxietilacrilamida (HEAA) y 2-acril-amido-etil-carbamato (2AAECM), entrecruzados con N-N'-cistaminbisacrilamida (CBA). Una vez sintetizados y caracterizados, el paclitaxel fue encapsulado en dichos nanosistemas para su evaluación como posibles sistemas de liberación controlada del fármaco.

Metodología:

La metodología utilizada en este segundo artículo publicado fue muy similar a la empleada en el artículo anteriormente descrito. Sin embargo, la diferente composición de los hidrogeles sintetizados, utilizando un entrecruzante bio reducible (CBA), supuso la adaptación de algunos estudios anteriormente descritos, entre los que destaca el ensayo de liberación del fármaco, ya que en dichos estudios se modificó el contenido de GSH del medio para comprobar la respuesta de estos hidrogeles al potencial redox.

Resultados:

Las imágenes de los nanohidrogeles obtenidas por microscopía electrónica (TEM; Figura 1) mostraron una morfología esférica de los dos tipos de composiciones (NHA 80/15/5-CBA y NHA 80/10/10-CBA) y un tamaño comprendido entre 10-80 nm, que corresponde a las condiciones del estado colapsado ($T^{\circ} = 37^{\circ}\text{C}$). Este tamaño disminuía en los nanohidrogeles cargados con fármaco. Por otro lado, el tamaño de los hidrogeles sin fármaco en condiciones de temperatura correspondientes al estado hinchado ($T^{\circ} = 25^{\circ}\text{C}$) analizado con DLS (Figura S2) fue superior en ambas formulaciones, con una media de 286 nm para los nanohidrogeles NHA 80/15/5-CBA y 256 nm para los nanohidrogeles NHA 80/10/10-CBA. Bajo estas condiciones de temperatura, el tamaño de los sistemas aumentó al incorporar el fármaco, obteniendo unos valores de 564 nm y 318 nm, respectivamente.

El estudio de espectroscopia infrarroja (FTIR) (Figura 2) permitió confirmar la unión de los monómeros mediante sus grupos vinílicos y la presencia de bandas correspondientes a cada uno de los monómeros utilizados en el proceso de síntesis. Además, el espectro obtenido a partir de ambas composiciones poliméricas (NHA 80/15/5-CBA y NHA 80/10/10-CBA) fue muy similar.

El estudio de estabilidad térmica de los nanohidrogeles sin fármaco mostró un único pico de degradación térmica a la temperatura de $392,5^{\circ}\text{C}$, correspondiente a una pérdida de masa de 62,88% para el caso de NHA 80/15/5-CBA y 69,76% en los nanohidrogeles NHA 80/10/10-CBA. Dicho espectro fue muy similar al obtenido por los nanohidrogeles cargados con PTX. A su vez, el fármaco puro reveló un único pico de degradación a $240,8^{\circ}\text{C}$ mientras que dicho espectro de degradación se desplazó a la temperatura de 390°C cuando el fármaco es encapsulado en los nanohidrogeles (Figura 3).

Respecto al fármaco incorporado en estos nanosistemas, la cuantificación del PTX después de su extracción directa en etanol mostró una capacidad de carga de $33,6 \pm 1,3 \mu\text{g}/\text{mg}$ en los nanohidrogeles NHA 80/15/5-CBA y $42,3 \pm 0,6 \mu\text{g}/\text{mg}$ en los nanohidrogeles NHA 80/10/10-CBA, correspondiente a una eficacia de encapsulación de 67,8% y 84,9%, respectivamente.

Los estudios de liberación del PTX (Figura 4) mostraron una liberación incompleta en el tiempo considerado en el experimento (50 horas), obteniendo una cantidad máxima liberada del 58,8% ($19,74 \pm 2,39 \mu\text{g}/\text{mg NG}$) en los nanohidrogeles NHA 80/15/5-CBA y 64,0% ($24,56 \pm 2,99 \mu\text{g}/\text{mg NG}$) en los nanohidrogeles NHA 80/10/10-CBA. Además, en ninguno de los sistemas de liberación estudiados se observó un efecto *burst*. Cuando se analizaron las liberaciones del fármaco en función del pH del medio, se observó que la liberación del PTX a partir de nanohidrogeles NHA 80/15/5-CBA era más lenta a pH fisiológico (32,1% del fármaco liberado, a pH 7,4; $10,78 \pm 0,49 \mu\text{g}/\text{mg NG}$) que a pH ácido (40,2% del fármaco liberado, a pH 5; $13,51 \pm 1,42 \mu\text{g}/\text{mg NG}$). Por otro lado, cuando los niveles de GSH del medio de liberación corresponden a los niveles extracelulares (0,002 mM), la cantidad de fármaco liberado fue superior ($14,09\text{--}19,48 \mu\text{g PTX}/\text{mg NG}$) a la cantidad de fármaco liberado en un medio sin GSH ($10,78\text{--}16,64 \mu\text{g PTX}/\text{mg NG}$). Por último, cuando los niveles de GSH corresponden a la concentración a nivel intracelular (10 mM), la liberación del fármaco fue superior e independiente del pH del medio.

En el estudio de la velocidad de liberación del fármaco en los distintos medios analizados se distinguieron dos fases (Tabla 1). En todos los casos, se observó una primera fase de liberación rápida (0-5 horas), seguida por una segunda fase de liberación más lenta (5-50 horas). Por otro lado, los resultados obtenidos del ajuste de los modelos matemáticos a las

cinéticas de liberación (Tabla S3), permitió comprobar que la liberación se ajustaba siguiendo el orden: Korsmeyer–Peppas > Higuchi > Hixson–Crowell y orden cero.

Respecto a los ensayos de internalización celular (Figura 5), los resultados de la determinación cuantitativa mostraron una dependencia entre la cantidad de nanohidrogeles incluidos en las células y el tiempo de incubación en las líneas celulares MCF7 y HeLa, mientras que la internalización en células T47D se mantuvo constante a lo largo del tiempo de estudio. Teniendo en cuenta las líneas celulares utilizadas en el ensayo, se observó una internalización superior en las células MCF7 de ambas formulaciones de nanohidrogeles. Por otro lado, al comparar dichas formulaciones, los resultados demostraron una mayor internalización de los nanohidrogeles NHA 80/10/10-CBA en todos los tipos celulares. Por otro lado, las imágenes captadas para la determinación cualitativa de la internalización celular (Figura S4) revelaron la presencia de cumarina en el interior celular como consecuencia de la señal de fluorescencia emitida alrededor del núcleo.

Los ensayos de viabilidad celular llevados a cabo con los nanohidrogeles sin fármaco demostraron la citocompatibilidad de dichos nanosistemas (Figura 6), con variaciones en función del tiempo de incubación y la concentración. En el caso de los nanohidrogeles NHA 80/15/5-CBA, la viabilidad celular de las tres líneas celulares fue superior al 72% al utilizar una concentración de 30 μM y después de 72 horas de incubación. Por el contrario, la viabilidad celular tras la administración de los nanohidrogeles NHA 80/10/10-CBA mostró valores cercanos al 20% en las mismas condiciones. Por otro lado, al utilizar nanohidrogeles cargados con fármaco (Figura 6) se observó que la citotoxicidad de las formulaciones ensayadas era dependiente de la concentración y del tiempo de incubación. Además, la

citotoxicidad mostrada por los nanohidrogeles cargados con PTX fue superior que la citotoxicidad del mismo fármaco en solución.

Por último, los resultados obtenidos del estudio del ciclo celular por citometría de flujo (Figura S5) no revelaron diferencias significativas entre las células control y las tratadas con nanohidrogeles sin fármaco (45,01–49,41% de las células en fase G_0/G_1 y 45,30–50,35% de las células en fase G_2/M). Sin embargo, al analizar el efecto del fármaco en el ciclo celular, se observó un incremento del número de células en fase G_2/M al utilizar el fármaco en solución (74–80% a 10 μM , 84,25–86% a 20 μM y 79,81–82,82% a 30 μM), con resultados muy parecidos a los obtenidos tras la administración de los nanohidrogeles a una concentración de 30 μM .

Todos los resultados cuantitativos obtenidos a lo largo de este trabajo fueron analizados con el programa SPSS (versión 19.0) para determinar las diferencias estadísticas existentes entre las dos formulaciones ensayadas, considerando los valores obtenidos a partir del triplicado de cada una de las determinaciones.



pH and glutathione-responsive hydrogel for localized delivery of paclitaxel



Elena Pérez, Ana Fernández, Rosa Olmo, Jose M. Teijón, M. Dolores Blanco*

Polymeric Materials Group for the Controlled Release of Bioactive Compounds in Biomedicine, Biochemistry and Molecular Biology Department, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid 28040, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 October 2013

Received in revised form

31 December 2013

Accepted 2 January 2014

Available online 9 January 2014

Keywords:

Nanohydrogels

Stimuli-responsive

Paclitaxel

Drug release

Cancer cells

Passive targeting

ABSTRACT

pH and glutathion (GSH)- responsive nanogels (NGs) based on poly-N-isopropylacrylamide (NIPA), N-hydroxyethyl acrylamide (HEAA) and *tert*-butyl 2-acrylamidoethyl carbamate (2AAECM) were synthesized by a microemulsion polymerization method using N, N'-cystaminebisacrylamide (CBA) as a crosslinking agent and evaluated for passive targeting of paclitaxel (PTX). Physicochemical characterizations of unloaded and PTX-loaded NGs, such as particle size, morphology, encapsulation efficiency and *in vitro* PTX release were also assessed. Electron microscopy techniques (SEM and TEM) as well as dynamic light scattering (DLS) analysis showed nanosized spherical hydrogels. FTIR spectra confirmed the synthesis of nanogels by free radical polymerization among vinyl groups of monomers. *In vitro* release was analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) and differences between two NG formulations were obtained. Nanogels released almost 64% of PTX after 50 h at GSH concentrations equivalent to that in the cellular cytosol, whereas less PTX was released from NGs at pH and GSH levels similar to plasma. Cellular uptake and cytotoxicity were also demonstrated by using coumarin-6 and MTT assays, respectively, for three tumor cell lines (MCF7, HeLa and T47D). Cellular uptake assays revealed rapid uptake within 2 h and intracellular accumulation of coumarin-6-loaded nanogels after 48 h incubation. MTT assays showed changes in cell viability at different concentrations of PTX formulations, as well as pure PTX (10 μ M, 20 μ M and 30 μ M). To investigate PTX effect on cell viability, changes in cell cycle were examined by flow cytometry and a G₂/M cell arrest was demonstrated. Overall, synthesized nanogels may be used as potential carriers for hydrophobic anticancer drugs.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Since 1960, when Wichterle and Lim first proposed the use of hydrophilic networks of poly (2-hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA) in contact lenses [1,2] the use of hydrogels has been extended to several biomedical fields such as sensing, diagnostics, bioengineering and drug delivery applications [3–6]. In comparison to other synthetic biomaterials, hydrogels resemble living tissues closely in their physical properties because of their relatively high water content and soft and rubbery consistency. Moreover, their low interfacial tension reduces their tendency to adsorb proteins from body fluids and three-dimensional structure facilitates to different molecule sizes a faster diffusion into (drug loading) and out of (drug release) hydrogels, which allows the possible use of these polymeric networks as drug delivery systems [7].

Drug delivery vehicles insure maximal therapeutic efficacy with minimal side effects by encapsulating drugs, increasing drug

residence at the target site and improving cellular uptake and intracellular stability [8]. Nanogels and other nanosized drug delivery systems have several advantages over macro-sized delivery systems, due to their small size. Nanosystems have a large surface area, which can achieve finer temporal control over drug release rates. Also, the size allows nanosystems to affect the diseased area by passive targeting, based on the enhance permeation retention effect (EPR) [9,10] which achieves 10–100 fold higher concentrations of drug-polymer conjugates in the tumor area compared to free drug administration [8].

The design and preparation of hydrogels have attracted a great deal of interest. Hydrogels can be prepared from a wide variety of materials using different techniques. Free radical polymerization (FRP) of water-soluble monomers (mainly vinyl polymers) allows the preparation of synthetic hydrogels in water [3,11,12]. Inverse microemulsion polymerization produces thermodynamically stable emulsions upon the addition of emulsifier above the critical micellar concentration (CMC), creating stable hydrophilic chemical-crosslinking nanogels [11,13,14].

Inefficient drug release into the cytoplasm from nanosystems results in insufficient anticancer drug concentration at cancer

* Corresponding author.

E-mail address: mdblanco@med.ucm.es (M.D. Blanco).

3. Evaluación de la biocompatibilidad de los nanohidrogeles sensibles a pH y glutathion después de su administración intravenosa.

[Biocompatibility evaluation of pH and glutathione-responsive nanohydrogels after intravenous administration. E. Pérez, R. Olmo, C. Teijón, E. Muñiz, N. Montero, J.M. Teijón, M.D. Blanco. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136: 222-231 (2015)].

Objetivo:

El objetivo de este estudio fue la evaluación de la biocompatibilidad *in vivo* de los nanohidrogeles sintetizados y caracterizados previamente. Para ello, se utilizaron ratas Wistar hembras como modelo experimental, a las que se inyectó por vía intravenosa una única dosis (20 mg/kg) de las cuatro formulaciones de nanohidrogeles sintetizados, con el objetivo de comparar el efecto toxicológico de los distintos tipos de entrecruzantes y la proporción de monómeros utilizado en cada caso.

Metodología:

El estudio de biocompatibilidad se llevó a cabo en ratas *Wistar* hembras (8-10 semanas, 200 ± 15 g) de acuerdo con el protocolo aprobado por el Comité Ético de Experimentación de la Universidad Complutense de Madrid. Los animales fueron aclimatados a una temperatura 25 ± 2°C y una humedad relativa de 70 ± 5%, en condiciones de ciclo natural de luz/oscuridad, con un suministro de comida y agua ad libitum y monitorizando su peso a lo largo de todo el período del experimento. Las ratas fueron divididas aleatoriamente en cinco grupos (4 ratas por grupo): ratas control (solución salina NaCl 0.9% p/v), ratas tratadas con nanohidrogeles NHA 80/15/5-CBA, ratas tratadas con nanohidrogeles NHA 80/10/10-CBA, ratas tratadas con

nanohidrogeles NHA 80/15/5-NMBA y ratas tratadas con nanohidrogeles NHA 80/10/10-NMBA. Los distintos tratamientos fueron administrados por la vena de la cola en una dosis única de 20 mg/kg, dispersando los nanohidrogeles en solución salina mediante ultrasonidos hasta obtener una solución homogénea para evitar los agregados. Los animales fueron anestesiados con una mezcla de gases (isoflurano-oxígeno) durante la inyección de los diferentes tratamientos y la extracción de sangre.

A lo largo del experimento, se extrajeron alícuotas de sangre a distintos tiempos a partir de la vena yugular de las ratas anestesiadas, utilizando varios anticoagulantes dependiendo de la determinación posterior. Por un lado, se hizo un estudio hematológico completo a partir de la sangre extraída en los días 0, 9 y 30 días en los tubos EDTA (12,5 µl/tubo). Se analizaron los niveles de eritrocitos, hematocrito, hemoglobina, plaquetas, leucocitos y linfocitos utilizando un contador hematológico automático (KX-21N Sysmex). A partir de los valores obtenidos, se calcularon los índices VCM (volumen corpuscular medio), HCM (hemoglobina corpuscular media) y CHCM (concentración de hemoglobina corpuscular media). Por otro lado, las alícuotas de sangre extraídas en tubos de citrato (94 µL/tubo) en los tiempos 0, 1 y 3 días se utilizaron para el estudio de la cascada de coagulación. Para ello, se analizaron tres parámetros: tiempo de protrombina, fibrinógeno y antitrombina III. Los dos últimos parámetros se determinaron utilizando las placas Easy Rid (Liofilchem®). En el caso del tiempo de protrombina, se cronometró el tiempo que tardó la sangre en formar el coágulo. Por último, la sangre extraída con heparina (15 µl/tubo) fue centrifugada a 3500 rpm durante 15 minutos, a 4°C y el plasma obtenido se utilizó para la determinación cuantitativa de varios parámetros bioquímicos relacionados con el hígado (AST, ALT, ALP) y el riñón (BUN y creatinina), siguiendo los protocolos de ensayos enzimáticos establecidos en los kits comerciales (Biosystem®).

Una vez sacrificados los animales, se extrajeron los principales órganos implicados en la eliminación de los nanosistemas (hígado, bazo y riñón) y se calculó el índice organosomático. Una porción de dichos órganos fue embebida en paraformaldehído 4% (v/v) para su inclusión posterior en parafina (Paraplast®) y la tinción con hematoxilina-eosina, con el objetivo de evaluar la histopatología de los órganos por microscopía óptica. El resto del órgano se congeló a -80°C para la determinación cuantitativa de las defensas antioxidantes. Para ello, los órganos extraídos se homogeneizaron a 1200 rpm en solución salina NaCl 0,9% (p/v) y 10 µl de heparina. El homogeneizado resultante se mezcló con cuatro volúmenes de Tritón X-100 (1%, v/v) y los fragmentos residuales se eliminaron por centrifugación a 12.500 rpm durante 15 minutos. Las muestras obtenidas se congelaron a -80°C hasta la determinación posterior de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD Oxiselect™, Cell Biolabs, Inc.), la actividad enzimática de la glutatión-reductasa (Abnova, UK) y el contenido de glutatión total (Oxiselect™, Cell Biolabs, Inc.) utilizando los kits comerciales correspondientes. En el caso de la determinación cuantitativa de la actividad enzimática de la catalasa, se siguió el método Aebi, que consiste en la mezcla de 60 µl de muestra con 1 ml de peróxido de hidrógeno 3% (v/v) diluido en tampón fosfato (50 mM, pH 7). Por último, se determinó la cantidad de proteína total presente en cada uno de los órganos extraídos siguiendo el método Bradford y utilizando una curva estándar de BSA (albúmina de suero bovino) en concentraciones conocidas.

Todos los resultados fueron analizados con el programa SPSS (versión 22.0) para determinar las diferencias estadísticas existentes entre los tres grupos de tratamiento, teniendo en cuenta los valores obtenidos de las determinaciones enzimáticas por triplicado.

Resultados:

El incremento del peso de los animales mostró un comportamiento normal a lo largo del período del experimento, sin observarse cambios significativos de los índices organosomáticos entre los diversos grupos de tratamiento (Figura 1).

Los resultados obtenidos del estudio hematológico se muestran en la Figura 2. Como se puede observar en la gráfica, el nivel de eritrocitos, hemoglobina y el porcentaje de hematocrito, así como los índices hematológicos relacionados con dichos parámetros (Tabla 1), no revelaron diferencias significativas entre los cinco grupos de tratamiento. Así mismo, al comparar los factores relacionados con la respuesta inmune (leucocitos y porcentaje de linfocitos) tampoco se observaron diferencias significativas entre las cinco formulaciones de nanohidrogeles analizadas y el grupo control. Sin embargo, las ratas tratadas con los nanohidrogeles NHA 80/15/5-CBA mostraron un incremento del número de plaquetas 9 días después de la inyección.

Los datos del estudio de coagulación sanguínea revelaron un incremento significativo del tiempo de protrombina y la antitrombina III en las ratas tratadas con los nanohidrogeles 7 días después de la inyección (Figura 3). Sin embargo, en el caso del fibrinógeno, los valores obtenidos a partir de la sangre de las ratas tratadas con los nanosistemas fueron similares a los obtenidos en el grupo control, sin observarse diferencias significativas entre los grupos.

La evaluación de los niveles de transaminasas hepáticas en sangre (Tabla 2) no reveló diferencias significativas entre los distintos tratamiento evaluados. Por otro lado, el estudio bioquímico de los parámetros renales en sangre mostró la presencia de diferencias significativas en los niveles de creatinina entre las ratas tratadas con los nanohidrogeles

entrecruzados con NMBA (NHA 80/15/5-NMBA y NHA 80/10/10-NMBA) y el grupo control 30 días después de la inyección.

Los resultados obtenidos del análisis de las defensas antioxidantes en los órganos homogeneizados se muestran en la Figura 4. El análisis de la actividad SOD reveló un incremento de dicha actividad enzimática en el hígado y riñón de las ratas tratadas con NHA 80/15/5-CBA y una disminución de la actividad SOD en el hígado de ratas tratadas con los nanohidrogeles NHA 80/10/10-NMBA. Por otro lado, los resultados obtenidos del estudio de la actividad CAT mostraron un incremento significativo de dicha actividad enzimática en el hígado procedente de ratas tratadas con nanohidrogeles NHA 80/15/5-NMBA. Sin embargo, los niveles de CAT obtenidos en el resto de los órganos analizados fueron muy similares a los del grupo control. Respecto al contenido de glutatión total (GSSG/GSH), se observó un incremento significativo de dicha molécula en el hígado de las ratas tratadas con los nanohidrogeles NHA 80/10/10-NMBA. Sin embargo, el homogeneizado hepático procedente de ratas tratadas con nanohidrogeles entrecruzados con CBA (NHA 80/15/5-CBA y NHA 80/10/10-CBA) reveló una disminución de los niveles de glutatión total (GSSG/GSH) al compararlo con el grupo control y los nanohidrogeles entrecruzados con NMBA. Por último, el estudio de GSSG-R reveló una disminución de dicha actividad enzimática en las muestras de hígado y riñón extraídas de las ratas tratadas con los nanohidrogeles NHA 80/15/5-NMBA; mientras que las ratas tratadas con los nanohidrogeles entrecruzados con CBA (NHA 80/15/5-CBA y NHA 80/10/10-CBA) mostraron un incremento significativo de la actividad GSSG-R en el bazo.

Las imágenes histológicas no revelaron anomalías histopatológicas en los órganos analizados (Figura 5). En las imágenes captadas por microscopía óptica no se observaron

rasgos de degeneración tisular ni la presencia de áreas de necrosis o áreas de inflamación en los órganos tratados con los nanohidrogeles.



Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfb

Biocompatibility evaluation of pH and glutathione-responsive nanohydrogels after intravenous administration



Elena Pérez^a, Rosa Olmo^a, César Teijón^b, Enriqueta Muñiz^c, Nuria Montero^a, Jose. M. Teijón^a, M. Dolores Blanco^{a,*}

^a Dpto. Bioquímica y Biología Molecular III, Facultad de Medicina, Ciudad Universitaria s/n, UCM, 28040 Madrid, Spain

^b Dpto. Enfermería, Facultad de Enfermería, Fisioterapia y Podología, Ciudad Universitaria s/n, UCM, 28040 Madrid, Spain

^c Dpto. Biología Molecular (Morfología Microscópica), Facultad de Biología, Ciudad Universitaria s/n, UCM, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 June 2015

Received in revised form 21 August 2015

Accepted 10 September 2015

Available online 14 September 2015

Keywords:

Stimuli-responsive nanohydrogels

Biocompatibility

Haematology

Coagulation

Antioxidant defences

ABSTRACT

Nanotoxicology has emerged as an important subdiscipline of nanotechnology due to the new healthy risks associated with the use of nanosystems for therapy and diagnostic. The biocompatibility of four stimuli-responsive nanohydrogel (NG) formulations based on different proportions of *N*-isopropylacrylamide (NIPA), *N*-hydroxyethyl acrylamide (HEAA) and 2-acrylamidoethyl carbamate (2AAECM), and cross-linked with *N,N*-cystaminebisacrylamide (CBA) or *N*-methylenebisacrylamide (NMBA) has been evaluated after intravenous injection in *Wistar* rats. All nanohydrogels were pH-sensitive, and those with CBA were also glutathione-responsive. Haematological and coagulation parameters revealed most nanogel formulations did not cause modification, only the NHA 80/15/5-CBA formulation induced a transitory light increase in platelets. Prothrombin time was in the reference normal range, there were no modifications of fibrinogen concentration and an increase in antithrombin III was observed on the last day of the study. Blood biochemical parameters such as AST, ALT, ALP, BUN, and creatinine were in the standard range for rats. The activity of enzyme antioxidant defences (SOD, CAT and GSSG-R) and total glutathione were evaluated in liver, kidney and spleen samples. Nanohydrogels cross-linked with the disulphide reducible CBA-cross-linker caused a decrease in GSSG/GSH content and an increase in GSSG-R activity in the spleen. The antioxidant response is also reflected by modifications of SOD activity in liver and kidney of NHA 80/15/5-CBA and NHA 80/10/10-NMBA groups. Histology showed no tissue damage, inflammation or morphological change in liver, kidney and spleen. Overall, the results demonstrated modifications of antioxidant defences; however, no acute or very significant changes in biomarkers of liver or kidney damage were observed.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Hydrogels have emerged as diverse material platforms capable to stimulate and react to specific cellular responses on the molecular level. These biocompatible devices are characterized by their high water content, soft and rubbery consistency and low interfacial tension with water or biological fluids, which make them resemble to living tissues [1,2]. Therefore, these cross-linked

polymer networks have evolved from static, bio-inert materials to dynamic, bioactive microenvironments, with several applications in biomedical fields such as scaffolds [3,4], controlled delivery of biologically active agents [5,6], wound dressing [4,7] and tissue engineering [5,8].

The incorporation of stimuli-responsive properties into hydrogel devices has gained increasing attention in the last decades, especially in loading and drug release applications [2,9]. This property facilitates the localized and sustained release of an active compound, thereby decreasing the number of administrations, preventing damages and allowing for relatively low doses, as they have the ability to target at the site of disorder in the damaged tissues [10].

The increasing production and use of nanomaterials has given rise to many concerns regarding their safety and final fate in bio-

* Corresponding author. Fax: +34 91 394 1691.

E-mail addresses: elenpe01@ucm.es (E. Pérez), rmolmo@med.ucm.es (R. Olmo), teijon@enf.ucm.es (C. Teijón), hernan@bio.ucm.es (E. Muñiz), nmpastor@estumail.ucm.es (N. Montero), jmt@med.ucm.es (Jose.M. Teijón), mdblanco@med.ucm.es (M.D. Blanco).

4. Efecto antitumoral mejorado del paclitaxel tras su administración *in vivo* en nanohidrogeles sensibles a pH y glutathion.

[Improved antitumor effect of paclitaxel administered in vivo as pH and glutathione-sensitive nanohydrogels. E. Pérez, A. Martínez, C. Teijón, R. Olmo, J. M. Teijón, M. D. Blanco. *International Journal of Pharmaceutics*, 492: 10–19 (2015)].

Objetivo:

El objetivo de este trabajo fue la evaluación de la eficacia antitumoral *in vivo* de los nanohidrogeles NHA 80/15/5-CBA cargados con PTX, mediante la administración subcutánea de los nanosistemas en un modelo tumoral xenográfico (HeLa) desarrollado en ratones atómicos, basándose en los resultados *in vitro* e *in vivo* previos. La efectividad de dichos sistemas se comparó con la acción del fármaco en disolución, teniendo en cuenta el efecto toxicológico producido tras la administración.

Metodología:

En primer lugar, se volvió a encapsular el fármaco (PTX) en los nanohidrogeles NHA 80/15/5-CBA utilizando el doble de concentración (10 mg/ml) para incrementar la carga y disminuir así la cantidad de nanohidrogeles necesarios para alcanzar la dosis de fármaco requerida. La inclusión del fármaco y su cuantificación se llevaron a cabo siguiendo el protocolo detallado previamente. En segundo lugar, se determinó el potencial zeta de los nanohidrogeles sin fármaco y con fármaco a partir de una dispersión de dichos sistemas en agua destilada.

La línea celular seleccionada para el desarrollo de los tumores xenograft fue las células HeLa de cáncer de ovario humano. Dichas células se cultivaron siguiendo el procedimiento rutinario y se resuspendieron en medio de cultivo frío hasta ser inoculadas en los ratones.

Respecto a los animales empleados en el estudio, se seleccionaron ratones hembra atímicos nu/nu de 4 semanas de edad, mantenidos en condiciones de esterilidad y una administración de comida y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales llevados a cabo con dichos animales de experimentación fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación de la Universidad Complutense de Madrid. Después del tiempo de adaptación recomendado para los ratones, las células resuspendidas en medio de cultivo (9×10^6 células/0,2 ml) se inyectaron subcutáneamente en el lateral derecho de los animales anestesiados con isoflurano. El peso de los ratones y el tamaño del tumor fueron determinados a lo largo de todo el experimento. Una vez que los ratones desarrollaron un tumor palpable de un volumen aproximado de 140 mm^3 , fueron distribuidos aleatoriamente en cuatro grupos de tratamiento (seis ratones en cada grupo): control (suero salino), PTX en solución (30 mg/kg), nanohidrogeles sin fármaco (cantidad equivalente a 30 mg/kg de PTX) y nanohidrogeles con fármaco (cantidad equivalente a 30 mg/kg de PTX). Las inyecciones se llevaron a cabo por vía subcutánea en una única dosis. Tras la administración del tratamiento, el volumen del tumor fue monitorizado a lo largo del experimento tres veces por semana, calculado a partir de la medida del largo y ancho registrados por un caliper electrónico, según se indica en el apartado de metodología del artículo.

Cuando el tratamiento finalizó, los ratones fueron sacrificados, pesados y diseccionados para extraer los órganos de interés y la masa del tumor. Así mismo, se extrajeron varias alícuotas de sangre en tubos de heparina para la determinación bioquímica, siguiendo el protocolo explicado previamente. Los órganos extraídos se pesaron y se mantuvieron a -80°C para su posterior utilización en el análisis de las defensas antioxidantes, siguiendo el protocolo explicado en los trabajos anteriores. En el caso de la masa tumoral, una porción de tumor de cada grupo de tratamiento fue embebido en paraformadehído para su posterior inclusión en

parafina y la obtención de cortes histológicos con el microtomo. A partir de estos cortes histológicos, se llevaron a cabo dos técnicas diferentes: tinción histológica e inmunohistoquímica.

El análisis histológico de los tumores extraídos se llevó a cabo mediante la visualización por microscopía óptica utilizando varias tinciones básicas: hematoxilina-eosina, azul de toluidina y el tricrómico hemalumbre-picrocarmín de índigo-azul alcian.

Por último, el estudio de inmunohistoquímica se basó en la detección de Ki-67, un antígeno nuclear presente en las células en proliferación y ausente en células quiescentes. Para ello, se utilizó un anticuerpo anti-Ki 67 humano obtenido en ratón. Para comprobar la presencia de dicho antígeno por microscopía de fluorescencia, las muestras histológicas se volvieron a incubar con un anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo (anticuerpo obtenido en conejo anti-ratón y unido a rodamina). Para asegurar la especificidad de unión del anticuerpo primario, se prepararon controles negativos, en los que el corte histológico es incubado en presencia del anticuerpo secundario exclusivamente.

Todos los resultados fueron analizados con el programa SPSS (versión 22.0) para determinar las diferencias estadísticas existentes entre los tres grupos de tratamiento, teniendo en cuenta los valores obtenidos de las determinaciones enzimáticas por triplicado.

Resultados:

Como se ha explicado anteriormente, la carga de PTX presente en los nanohidrogeles NHA 80/15/5-CBA fue optimizada para conseguir mayor cantidad de fármaco por unidad de nanohidrogel y reducir así la cantidad de nanosistemas utilizada para alcanzar la dosis

necesaria. La cuantificación del fármaco por HPLC mostró una capacidad de carga de $47,4 \pm 5,4$ μg PTX/mg NG, correspondiente a una eficiencia de encapsulación del 48,5%.

Por otro lado la determinación del zeta potencial reveló una superficie aniónica en los nanohidrogeles sin fármaco (-2,75 mV) y con fármaco (-18,11 mV).

Respecto al estudio de la eficacia antitumoral, todos los ratones desarrollaron el tumor a partir de la inoculación de la línea celular HeLa y no se registró ninguna muerte a lo largo del periodo de estudio. Además, el peso de los ratones se incrementó de forma gradual con el paso del tiempo, sin observarse diferencias significativas entre los grupos de tratamiento (Figura 1). Por su parte, el índice organosomático calculado a partir de los órganos extraídos no mostró alteraciones significativas entre los tipos de tratamiento estudiados (Figura 2).

Teniendo en cuenta la evolución del tumor a lo largo del experimento, el grupo control y el grupo tratado con los nanohidrogeles sin fármaco mostraron un crecimiento rápido del tumor, distinguiéndose dos fases de crecimiento (Figura 3; Tabla 1). En la primera fase (14-30 días) la velocidad de crecimiento del tumor fue menor ($21,9 \text{ mm}^3/\text{día}$ para el grupo control y $42,6 \text{ mm}^3/\text{día}$ para el grupo de nanohidrogeles sin fármaco) que en la segunda fase (30-39 días), donde la velocidad tomó valores de $94,5$ - $58,5 \text{ mm}^3/\text{día}$, respectivamente. Por otro lado, al comparar los tratamientos con fármaco, el volumen de los tumores tratados con los nanohidrogeles con fármaco fue inferior que el volumen de los tumores tratados con fármaco en disolución (Figura 3), como así lo demuestra el estudio de las velocidades de crecimiento. En una primera fase (14-30 días), la velocidad de crecimiento del tumor tratado con los nanohidrogeles con fármaco ($20,6 \text{ mm}^3/\text{día}$) fue inferior que la velocidad registrada en el grupo de ratones tratados con fármaco en disolución ($20,6 \text{ mm}^3/\text{día}$) (Tabla 1). Por otro lado, en la segunda fase (30-39 días) se observó un descenso considerable de la velocidad de

crecimiento del tumor tratado con nanohidrogeles ($8,01 \text{ mm}^3/\text{día}$) y un incremento en los tumores tratados con fármaco en disolución ($36,9 \text{ mm}^3/\text{día}$).

El estudio histológico de los tumores extraídos reveló un aspecto diferente en función del tipo de tratamiento (Figura 4). Como se observa en las imágenes por microscopía óptica, los tumores tratados con suero salino o nanohidrogeles sin fármaco mostraron la presencia de células heterogéneas, predominantemente poliédricas, con pérdida de cohesividad y una relación núcleo/citoplasma elevada. En el núcleo de algunas de las células tumorales se observó la presencia de cromatina condensada dispersa y nucléolo prominente. Además, durante el barrido de las preparaciones se visualizaron áreas de necrosis, infiltración linfocitaria y poco contenido de tejido conectivo. Por otro lado, los tumores tratados con el fármaco en disolución o con los nanohidrogeles con fármaco mostraron un aumento de figuras mitóticas defectuosas, numerosos cuerpos apoptóticos y áreas de necrosis. Además, las preparaciones tisulares mostraban una retracción del tejido y una desorganización tisular superior que los tumores sin tratar.

Con el objetivo de diferenciar las células en proliferación de la población de células muertas, se llevó a cabo un estudio inmunohistoquímico para detectar uno de los marcadores tumorales más usados (Ki-67). Las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia (Figura 5) permitieron comprobar una mayor señal fluorescente en aquellos tumores tratados con el fármaco en disolución, con un aspecto similar al obtenido en los tumores tratados con los nanohidrogeles sin fármaco o los tumores del grupo control (Material complementario).

Los resultados del estudio bioquímico de los parámetros hepáticos y renales se recogen en la Tabla 2. Como se puede comprobar en la tabla, no se observaron diferencias significativas en

AST, ALP, BUN y creatinina entre el grupo control y los animales tratados con nanohidrogeles. Sin embargo, en los animales tratados con el fármaco en disolución, se observó un incremento significativo de la actividad ALT y una disminución significativa en los niveles de creatinina en sangre.

Por último, el análisis de algunos de los parámetros implicados en la respuesta antioxidante se muestra en la Figura 6. A nivel hepático, se observó un descenso significativo de la actividad superóxido dismutasa (SOD) y de la catalasa (CAT) en dos de los grupos de tratamiento: fármaco en disolución y nanohidrogeles con fármaco. Al analizar las defensas antioxidantes del riñón, los niveles de SOD y CAT fueron muy parecidos a los obtenidos en el grupo control pero se observó un incremento significativo del contenido de glutathion reducido (GSH). Respecto al bazo, se observaron diferencias significativas en la actividad glutathion reductasa (GSSG-R) en los ratones tratados con los nanohidrogeles con fármaco.



Improved antitumor effect of paclitaxel administered *in vivo* as pH and glutathione-sensitive nanohydrogels



Elena Pérez^a, Ana Martínez^b, César Teijón^c, Rosa Olmo^a, José María Teijón^a,
María Dolores Blanco^{a,*}

^a Dpto. Bioquímica y Biología Molecular III, Facultad de Medicina, Ciudad Universitaria s/n, UCM, 28040 Madrid, Spain

^b Facultad de Farmacia, Universidad Francisco de Vitoria, Madrid, Spain

^c Dpto. Enfermería, Facultad de Enfermería, Fisioterapia y Podología, Ciudad Universitaria s/n, UCM, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 May 2015

Received in revised form 29 June 2015

Accepted 1 July 2015

Available online 6 July 2015

Keywords:

Anti-tumor efficacy

In vivo toxicity

Paclitaxel

Stimuli responsive nanohydrogel

Histopathology

Oxidative stress

ABSTRACT

Most antitumor drugs usually affect not only rapidly dividing cells, such as those in tumors, but also highly proliferative cells in normal tissues. This nonspecific drawback could be successfully solved by using nanocarriers as controlled drug delivery systems. In this work, pH and redox-responsive nanohydrogels (NG) based on *N*-isopropylacrilamide (NIPA), *N*-hydroxyethyl acrylamide (HEEA) 2-acrylamidoethyl carbamate (2AAECM) and *N,N'*-cystaminebisacrylamide (CBA) as crosslinker were evaluated as bioreducible paclitaxel (PTX) nanocarriers for improving the accumulation of the drug within the tumor tissue and avoiding its conventional side effects. A single dose of PTX solution, unloaded-NHA 80/15/5CBA NG and PTX-loaded NHA 80/15/5-CBA NG (30 mg/kg PTX equivalent) were subcutaneously injected in female athymic nude mice bearing HeLa human tumor xenografts. PTX-loaded nanohydrogels showed higher antitumor activity than free PTX, as tumor evolution and Ki67 detection demonstrated. Histological tumor images revealed a higher content of defective mitotic figures and apoptotic bodies in PTX- treated tumors than in control or unloaded NG treated tumor samples. Nanohydrogels injection did not change any biochemical blood parameters, which means no liver or kidney damage after NG injection. However, differences in antioxidant defenses in MPS systems (liver, kidney and spleen) were observed among treatments, which may indicate an oxidative stress response after PTX injection.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cancer is the leading cause of death in economically developed countries and the second leading cause of death in developing countries. The global impact of cancer continues to increase largely because of the aging and growth of the world population alongside an increasing adoption of cancer-causing behaviors, particularly smoking, in economically developing countries (Jemal et al., 2011). In the last decades, nanotechnology has emerged to improve the therapeutic index of existing chemotherapies and radiotherapy treatments which, in combination with cancer biology advances, can establish new methods for cancer care (Hull et al., 2014).

Most antitumor drugs affect not only rapidly dividing cells, such as those in tumors, but also highly proliferative cells in normal

tissues. This nonspecific drawback has limited the clinical application of most anticancer drugs (Li et al., 2009). For instance, paclitaxel (PTX) exhibits a significant activity against various solid tumors, including advanced ovarian carcinoma, metastatic breast cancer, non-small cell lung cancer, and head and neck carcinomas (Panchagnula, 1998; Spencer and Faulds, 1994). It interferes with mitosis by binding to the β -subunit of tubulin and forming stable, non-functional microtubule bundles, causing cell death by disrupting the dynamics necessary for cell division (Crown and O'Leary, 2000). However, its formulation with Cremophor[®] EL and ethanol, due to its high hydrophobicity, supposes several side effects such as hypersensitivity reactions, nephrotoxicity and neurotoxicity (Singla et al., 2002). Thus, to achieve the necessary therapeutic effect of PTX in the desired tumor tissue, suitable carriers for PTX are needed. Many vehicles have been proposed as good candidates for use as controlled delivery systems (Yared and Tkaczuk, 2012), but few have progressed to *in vivo* or clinical studies.

To reach the goal, stimuli-sensitive polymers have been recently studied for drug delivery (Fleige et al., 2012; Lee et al.,

* Corresponding author. Fax: +34 91 394 1691.

E-mail addresses: elenpe01@ucm.es (E. Pérez), am.martinez.prof@ufv.es (A. Martínez), cteijon@enf.ucm.es (C. Teijón), rmolmo@med.ucm.es (R. Olmo), jmt@med.ucm.es (J.M. Teijón), mdblanco@med.ucm.es (M.D. Blanco).

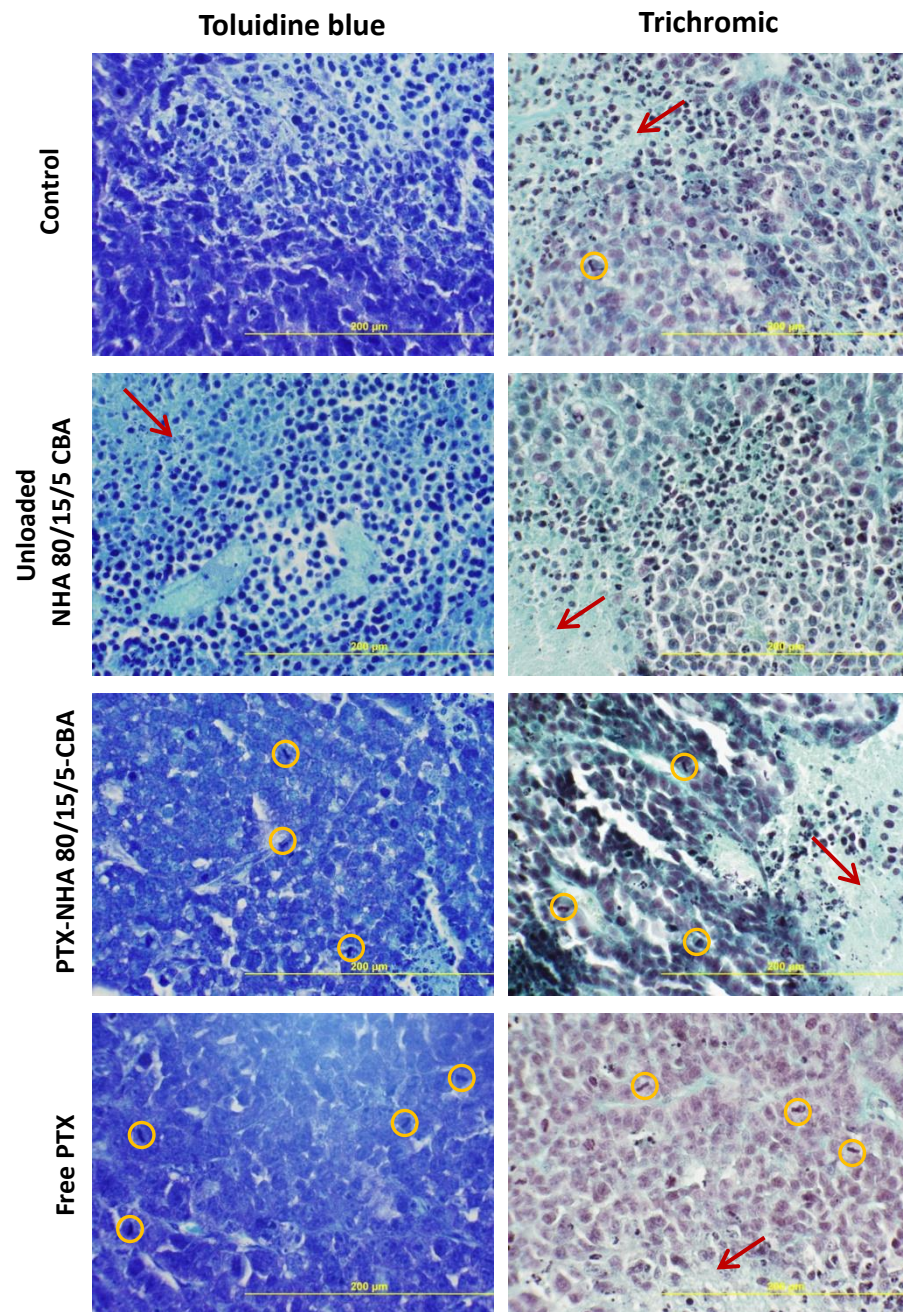


Fig. A.1. Histological appearance of the epithelial-like cortex of HeLa cell untreated tumor; unloaded NHA 80/15/5-CBA nanohydrogels treated tumor; PTX-loaded NHA 80/15/5-CBA nanohydrogels treated tumor and free PTX treated tumor, using different staining methods (magnification 40 \times). Yellow circles indicate the presence of cells in different stages of mitotic division, and arrows indicate the presence of necrosis areas. Yellow bars represent 200 μm .

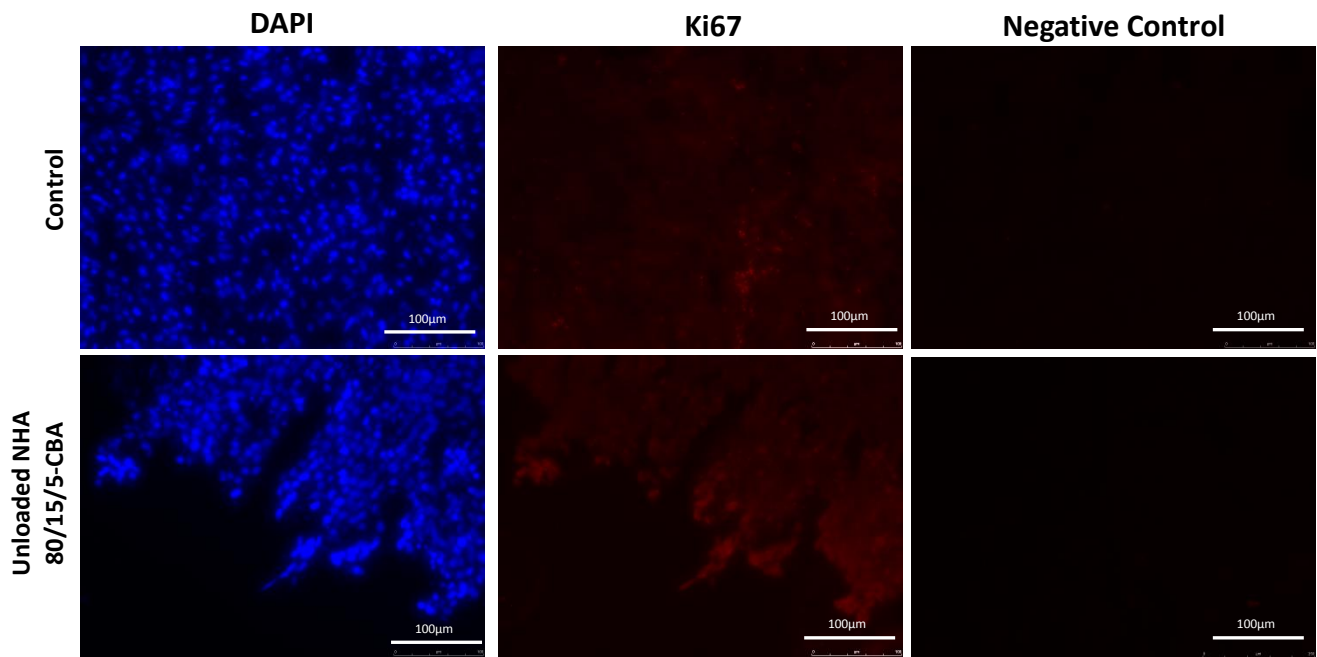


Fig. A.2. Representative images of the immunohistochemical detection of Ki-67 antigen (proliferation assay) in HeLa xenograft tumor samples using the fluorescent method: control tumor and unloaded nanohydrogels treated tumor tissues. In blue is represented the nuclear staining with DAPI. In red, the nuclear fluorescent signal due to the presence of Ki-67 proliferating antigen. White bars represent 100µm.

DISCUSIÓN

Los tratamientos convencionales del cáncer, basados en quimioterapia y radioterapia, presentan gran cantidad de limitaciones debido fundamentalmente a su inespecificidad de acción, lo que conlleva la aparición de graves efectos secundarios que repercuten en la calidad de vida del paciente. Por ello, gran parte de los estudios actuales se basan en el diseño de nuevas terapias capaces de actuar de forma más específica y efectiva sobre las células cancerígenas.

El uso de la nanotecnología en la liberación controlada de fármacos antineoplásicos constituye una herramienta muy útil para conseguir dicho objetivo, como así lo demuestra la gran cantidad de sistemas nanoparticulados comercializados en los últimos años (Caló & Khutoryanskiy, 2015; Etheridge *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta la diversidad de nanotransportadores utilizados en la liberación de fármacos, los nanohidrogeles constituyen una excelente opción debido a la multitud de ventajas que presentan. Características como su capacidad de alternar el estado colapsado e hinchado como respuesta a determinados estímulos externos, así como su elevado contenido en agua y su tamaño nanométrico les convierten en los candidatos perfectos para la liberación dirigida de fármacos con el mínimo efecto tóxico posible, debido a su semejanza con los órganos y tejidos sanos.

A día de hoy se han descrito múltiples monómeros y polímeros susceptibles de formar parte de un sistema de liberación controlada *inteligente*, capaz de responder a estímulos externos, por lo que existe gran flexibilidad y variedad en el diseño de dichos sistemas.

En este trabajo, los nanohidrogeles sintetizados se han diseñado con el objetivo de administrar el fármaco antineoplásico paclitaxel de forma específica y eficaz a las células tumorales, evitando, en el mayor grado posible, los efectos secundarios derivados de la administración convencional de dicho principio activo. Por tanto, resulta imprescindible

seleccionar los monómeros adecuados para conferir a los nanohidrogeles sintetizados las propiedades físicoquímicas que les permitan explotar al máximo las condiciones fisiológicas del tumor. Por ello, se seleccionaron finalmente varias formulaciones constituidas por una mezcla de los monómeros NIPA, HEAA y 2AAECM (Fig. 20) utilizando dos tipos de entrecruzantes (CBA y NMBA). La proporción de los monómeros y de los entrecruzantes empleados se estableció en función de las propiedades de la red polimérica obtenidas en estudios anteriores (Blanco *et al.*, 2011; Guerrero-Ramírez & Katime, 2011; Katime *et al.*, 2004)

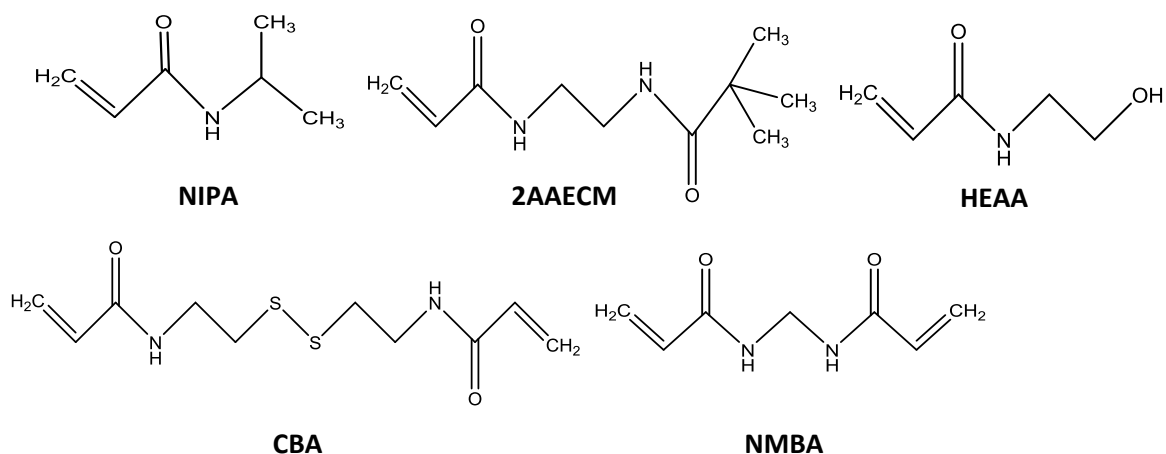


Figura 20. Estructura química de los monómeros y entrecruzantes utilizados en la síntesis de los nanohidrogeles.

El uso de N-isopropilacrilamida (NIPA) se debe a su conocida respuesta a cambios de temperatura del medio. A temperaturas inferiores a 32°C (temperatura de disolución crítica inferior = LCST) las interacciones entre el polímero y el medio acuoso se ven favorecidas, promoviendo el hinchamiento del hidrogel. Sin embargo, al aumentar la temperatura por encima de 32°C, las interacciones hidrófobas que se establecen entre los grupos isopropilo de la cadena polimérica favorecen la expulsión del agua de la red polimérica y el hidrogel se colapsa (Sood *et al.*, 2013).

Por otro lado, el uso de N-hidroxietilacrilamida (HEAA) confiere a la red polimérica la capacidad de responder a cambios de pH del medio. Al utilizar este tipo de monómeros en la síntesis, se obtienen hidrogeles catiónicos. Como consecuencia de ello, la disminución del pH por debajo del pK_b induce la protonación de los grupos básicos del polímero y, como consecuencia, el hinchamiento del hidrogel (Klinger & Landfester, 2012).

En el caso del monómero 2-acril-amido-etil-carbamato (2AAECM), su uso facilita la futura vehiculización activa de los nanohidrogeles, ya que su brazo extensor largo evitaría el impedimento estérico entre el ligando y la superficie del nanohidrogel. Además, dicho monómero permite ampliar la superficie de contacto de los nanohidrogeles, favoreciendo la interacción de estos nanosistemas con las células.

Por último, en este trabajo se ha optado por el uso de dos tipos de entrecruzantes diferentes, capaces de llevar a cabo la polimerización radicalaria: N-N'-cistaminbisacrilamida (CBA) y N-metilenbisacrilamida (NMBA). La diferencia entre ambos tipos de entrecruzantes radica en la presencia de puentes disulfuro en la cadena de CBA, lo que favorece la desestabilización de la red polimérica al entrar en contacto con el medio reductor del interior celular (GSH ~ 10 mM) como consecuencia de la reducción de los puentes disulfuro (Fleige *et al.*, 2012).

De acuerdo con todo lo anteriormente expuesto, el fundamento teórico que rige el comportamiento de los nanosistemas sintetizados en este trabajo se resume en la Fig. 21.

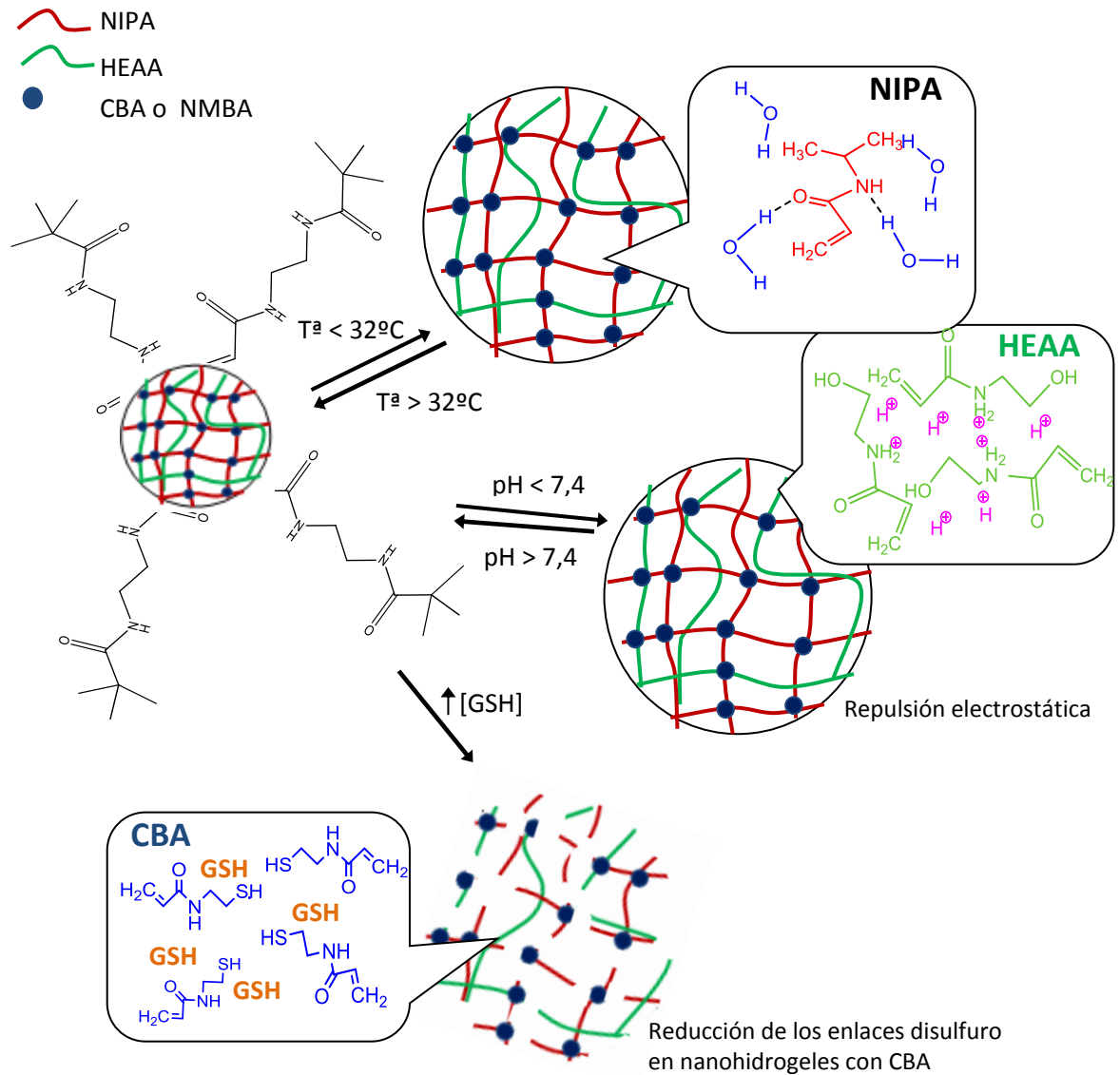


Figura 21. Fundamento teórico de la transición entre los estados hinchado/colapsado de los nanohidrogeles sintetizados.

Como se ha explicado anteriormente, los nanosistemas terapéuticos pueden acumularse en las células diana mediante vehiculización activa o pasiva. En el caso de la vehiculización pasiva, la concentración de dichos sistemas va a depender fundamentalmente del transporte por difusión en el interior del tumor (Steichen *et al.*, 2013). Por ello, el tamaño y la morfología, la carga superficial y la composición monomérica de los nanohidrogeles

sintetizados son factores determinantes de las interacciones establecidas entre dichos sistemas y los alrededores del tumor (Yoo *et al.*, 2011).

Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica a partir de las cuatro formulaciones de nanohidrogeles sin fármaco sintetizadas mostraron la presencia de partículas esféricas de tamaño nanométrico (10-80 nm) en condiciones de temperatura propias del estado colapsado ($T^a = 37^{\circ}\text{C}$) que, a su vez, coinciden con las condiciones de temperatura fisiológica. Estos resultados fueron muy similares a los obtenidos por otros autores utilizando la técnica de síntesis por microemulsión inversa (Deng *et al.*, 2003; McAllister *et al.*, 2002; Puig *et al.*, 2001) ya que dicha técnica es capaz de producir nanosistemas hidrófilos coloidales estables de un tamaño medio comprendido entre 50-100nm (Kwon *et al.*, 2008).

El tamaño de estos nanohidrogeles es óptimo para poder atravesar las fenestraciones capilares de un tumor sólido (50-100 nm), facilitando así su llegada a los alrededores de la masa tumoral (Danhier *et al.*, 2010). Una vez dentro del tumor, el tamaño que muestran estos nanosistemas favorecería su acumulación y retención como consecuencia del insuficiente flujo sanguíneo y drenaje linfático característico de los tumores sólidos, proceso conocido como EPR (Li *et al.*, 2012; Steichen *et al.*, 2013). Además, se ha comprobado que el uso de partículas de dicho tamaño consigue incrementar su difusión, ampliar su biodistribución y evitar una respuesta inmune por parte del organismo hospedador (Moghimi *et al.*, 2001). Por otro lado, la forma esférica de estos nanosistemas favorece el contacto entre la superficie de los nanohidrogeles y los receptores de la membrana celular, por lo que la adhesión celular es más eficiente, como demostró la mayor incorporación de nanopartículas de oro en células de mama en los estudios llevados a cabo por Chithrani *et al.* (Chithrani *et al.*, 2006).

El análisis por dispersión dinámica de luz (DLS) mostró un mayor tamaño de los nanohidrogeles sin fármaco. Este hecho se debe fundamentalmente a las condiciones de medida, pues dicha técnica se llevó a cabo en un medio acuoso a una temperatura correspondiente al estado hinchado ($25^{\circ}\text{C} < \text{LCST} = 32^{\circ}\text{C}$). En estas condiciones no fisiológicas, el diámetro hidrodinámico medio de los nanohidrogeles sin fármaco se situó en torno a 256-332 nm. Esta variación de tamaño de los nanosistemas en función de las condiciones de temperatura del medio en el que se encuentren dispersados se debe fundamentalmente a la presencia de N-isopropilacrilamida (NIPA) en la red polimérica. Como se ha explicado anteriormente, cuando la temperatura del medio supera la temperatura de transición de dicho monómero ($\text{LCST}=32^{\circ}\text{C}$) las interacciones hidrófobas que se establecen entre las cadenas laterales provocan el colapso del hidrogel. Por el contrario, cuando la temperatura del medio es inferior al LCST, la red polimérica se expande y se hidrata debido a la unión de moléculas de agua a los grupos amida de las cadenas laterales (Hamidi *et al.*, 2008; Raemdonck *et al.*, 2009).

Al comparar los resultados obtenidos por DLS a partir de los nanohidrogeles sin fármaco y con PTX, se observaron diferencias respecto al tipo de formulación analizada. En el caso de los nanohidrogeles entrecruzados con CBA (NHA 80/15/5-CBA y NHA 80/10/10-CBA) se observó un incremento de tamaño y una mayor amplitud en la distribución del diámetro hidrodinámico al incorporar el fármaco. Este hecho podría ser atribuido a la presencia de fármaco adsorbido a la superficie de los nanosistemas, que favorecería la presencia de interacciones hidrófobas entre las partículas y contribuiría a la formación de agregados

(Kumari *et al.*, 2010; Nkansah *et al.*, 2008). Por otro lado, los nanohidrogeles entrecruzados con NMBA mostraron una pequeña disminución de tamaño al incorporar el fármaco y una distribución de tamaños más estrecha. En este caso, las interacciones hidrófobas establecidas entre el fármaco y la red polimérica interna del hidrogel podrían conducir a la compresión de los nanohidrogeles, como han revelado los estudios realizados por otros autores al incluir fármacos hidrófobos en sistemas poliméricos (Perez *et al.*, 2012).

Por otro lado, la carga superficial que mostraron estos nanosistemas en agua destilada varió en función de la composición polimérica. Al analizar el potencial zeta de los sistemas obtenidos se observó que los nanohidrogeles entrecruzados con CBA revelaron una carga negativa (-2,75 mV en los NG NHA 80/15/5-CBA y -9,98 mV en los NG NHA 80/10/10-CBA) mientras que los nanohidrogeles entrecruzados con NMBA mostraron una carga positiva (9,44 mV en los NG NHA 80/15/5-NMBA y 10,96 mV en los NG NHA 80/10/10-NMBA). A pesar de que dicho parámetro puede variar con la presencia de sales, cambios de pH y la unión de proteínas (Sharifi *et al.*, 2012), estudios llevados a cabo por varios autores (Goodman *et al.*, 2004; Mayer *et al.*, 2009; Sharifi *et al.*, 2012) sugieren que partículas nanométricas aniónicas son menos tóxicas a nivel sanguíneo que las mismas partículas en versión catiónica, ya que una superficie positiva muestra mayor afinidad por las cadenas negativas de las cabezas de los fosfolípidos y otros dominios proteicos presentes en las membranas celulares.

El estudio FTIR mostró un perfil muy similar en las distintas formulaciones de nanohidrogeles analizadas, con pequeñas diferencias en función del tipo de entrecruzante utilizado en cada caso. En el espectro infrarrojo de los monómeros, la presencia de bandas en torno a 960 cm^{-1} y 1622 cm^{-1} se atribuye a la deformación y tensión del grupo vinílico, la cuales

desaparecían al analizar los nanohidrogeles ya formados. Este hecho confirmó la obtención de estos nanohidrogeles por polimerización, estableciendo enlaces covalentes entre los grupos vinílicos terminales de los monómeros utilizados en la síntesis. Además, los espectros obtenidos a partir de cada una de las formulaciones mostraron bandas características de los monómeros implicados en la síntesis. Por ejemplo, la presencia de una banda en 2950 cm^{-1} es característica del grupo isopropilo del NIPA; la banda de absorción situada en 1650 cm^{-1} sugiere la presencia de una amida primaria, característica del monómero 2AAECM tras la eliminación del NHBOC; y la banda situada a 1320 cm^{-1} determina la presencia del grupo hidroxilo del monómero HEAA. Respecto a los entrecruzantes utilizados, los nanohidrogeles entrecruzados con CBA mostraron una banda en torno a 1228 cm^{-1} , correspondiente a los enlaces disulfuro de su estructura, mientras que los nanohidrogeles entrecruzados con NMBA no mostraron ninguna banda particular, ya que su estructura química no presenta grupos funcionales característicos que nos permita distinguirlo del resto de monómeros.

Los estudios de termogravimetría (TGA) demostraron que todos los nanohidrogeles sintetizados eran estables a temperatura ambiente y a temperatura fisiológica. Además, la presencia del fármaco no modificó los perfiles de degradación térmica de los nanohidrogeles, los cuales mostraron un único pico de degradación a la temperatura de $392,5^{\circ}\text{C}$, con un porcentaje de pérdida de masa en torno al 65%. Sin embargo, la encapsulación del fármaco en estos sistemas poliméricos supuso un incremento de la temperatura necesaria para la degradación del principio activo (de $240,8^{\circ}\text{C}$ al analizar el fármaco libre a 390°C cuando se analizó el fármaco encapsulado en los nanosistemas).

Los nanohidrogeles sintetizados a partir del entrecruzante NMBA (NHA 80/15/5-NMBA y NHA 80/10/10-NMBA) mostraron un grado de hinchamiento superior al disminuir los niveles

de pH del medio acuoso en el que fueron dispersados. Este mismo comportamiento se observó en los estudios de liberación del fármaco en los cuatro tipos de nanohidrogeles, independientemente del tipo de entrecruzante utilizado en la síntesis. Este hecho se debe a la presencia del monómero N-hidroxietilacrilamida (HEAA), ya que en un medio acuoso ácido la amina primaria terminal forma un ión amonio protonado, provocando una repulsión de cargas entre las cadenas poliméricas que conforman la red tridimensional del nanohidrogel. Dicha repulsión electrostática produce la expansión del nanohidrogel en medios ácidos y es más evidente cuanto mayor sea la cantidad de monómero utilizado en la síntesis (Huang *et al.*, 2007), como se observó en los nanohidrogeles NHA 80/15/5-NMBA respecto a los nanohidrogeles NHA 80/10/10-NMBA. Esta característica es propia de los hidrogeles catiónicos (Klinger & Landfester, 2012), como se explicó anteriormente.

La capacidad de carga de los nanohidrogeles fue cuantificada por HPLC, mostrando unos valores en el intervalo 33,6-42,3 µg PTX/mg NG para los cuatro tipos de nanohidrogeles sintetizados. La eficiencia de encapsulación del PTX en estos nanohidrogeles fue superior al 69,8% en todos los casos. Estos resultados sugieren que fármacos hidrófobos como el PTX pueden ser encapsulados con éxito en este tipo de nanosistemas, como demostraron los estudios llevados a cabo por Blanco y colaboradores (Blanco *et al.*, 2011) al incluir fármacos hidrófobos como el tamoxifeno en hidrogeles constituidos por NIPA, NPAM y 2AAECM.

Respecto a los estudio de liberación del fármaco, la variación de las condiciones del medio de liberación supuso la obtención de resultados muy diferentes.

En el caso de los nanohidrogeles entrecruzados con NMBA (NHA 80/15/5-NMBA y NHA 80/10/10-NMBA), la máxima liberación del fármaco se alcanzó en un medio ácido (pH 5),

correspondiente al estado hinchado de los hidrogeles, como demostraron previamente los estudios de hinchamiento. Esta característica supone una ventaja en el uso de estos nanosistemas como dispositivos de liberación controlada de fármacos antineoplásicos, ya que se conseguiría aumentar la concentración del fármaco en los alrededores del tumor y en los lisosomas intracelulares, como consecuencia de la disminución de pH observada en dichos medios (Lehner *et al.*, 2012).

Por otro lado, en el caso de los nanohidrogeles entrecruzados con CBA (NHA 80/15/5-CBA y NHA 80/10/10-CBA), los niveles de GSH y pH del medio fueron determinantes para la liberación del paclitaxel desde la red polimérica. En ausencia de GSH, la acidificación del medio de liberación (pH 5) supuso un incremento en la velocidad y en la cantidad de fármaco liberado a partir de dichos nanosistemas, correspondiente al comportamiento esperado por hidrogeles catiónicos (Klinger & Landfester, 2012). Además, la liberación del fármaco en estas condiciones fue superior en aquellos nanosistemas que tenían mayor proporción de monómero HEAA en su composición (NHA 80/15/5-CBA), lo que demuestra la implicación de dicho monómero en la respuesta de estos nanohidrogeles al estímulo de pH, como ya se ha explicado anteriormente.

Al comparar dichos resultados con los obtenidos en un medio similar al fluido extracelular (GSH=0,002 mM), se observó que la cantidad de fármaco liberado fue superior en presencia de GSH en ambos tipos de nanosistemas, estableciendo un efecto sinérgico entre los niveles de pH y la concentración de GSH presente en el medio. Sin embargo, ante la presencia de niveles de GSH superiores, similares a los observados en el medio intracelular (GSH=10 mM), el hinchamiento inducido por las variaciones de pH del medio se vio enmascarado por la ruptura de las cadenas de la red polimérica. Bajo estas condiciones intracelulares simuladas

se consiguió obtener la máxima cantidad de fármaco liberado, con una velocidad de liberación superior a la obtenida en un medio extracelular. El comportamiento mostrado por estos nanosistemas está justificado por el uso de entrecruzantes bio reducibles como el CBA, con enlaces disulfuro en su estructura capaces de limitar la liberación de los agentes terapéuticos al interior celular (Mintzer & Simanek, 2009). Al añadir este tipo de entrecruzantes, la estructura del nanohidrogel permanece estable en el medio extracelular y sólo se desestabiliza al entrar en contacto con el medio reductor del interior celular, siguiendo un gradiente redox creciente desde el espacio endosomal al espacio lisosomal (Wang *et al.*, 2012). Dicha desestabilización se debe a la reducción de los puentes disulfuro de la red polimérica, lo que implica finalmente la liberación del compuesto activo (Fleige *et al.*, 2012). Por tanto, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los estudios de liberación del paclitaxel, el comportamiento de los nanohidrogeles en una patología tumoral sería similar a la reflejada en la Fig. 22.

Independientemente del tipo de medio utilizado durante la liberación del fármaco, no se consiguió una liberación completa en ninguno de los cuatro tipos de nanohidrogeles ensayados durante las horas del estudio. Además, tampoco se observó un efecto de liberación rápida inicial (*burst*) en ninguna de las formulaciones analizadas, a pesar de que el estudio de las velocidades de liberación reveló la presencia de una primera etapa de liberación correspondiente a las primeras 5-5,5 horas del estudio. Este comportamiento se atribuye principalmente al fármaco adsorbido a la superficie de los nanosistemas, debido a la elevada superficie de exposición al medio que presentan estos nanohidrogeles (Kumari *et al.*, 2010; Nkansah *et al.*, 2008), como se observó en los estudios DLS citados anteriormente. Además, se hicieron estudios adicionales sin presencia de Tween 80® en el medio de liberación con el objetivo de simular en mayor medida las condiciones existentes en los

fluidos biológicos y descartar la interferencia de dicho tensioactivo en la liberación del fármaco. Los resultados obtenidos mostraron una cinética de liberación mucho más lenta y estable en todos los medios acuosos analizados, lo que podría asemejarse al comportamiento de los sistemas de liberación controlada que conocemos hoy en día.

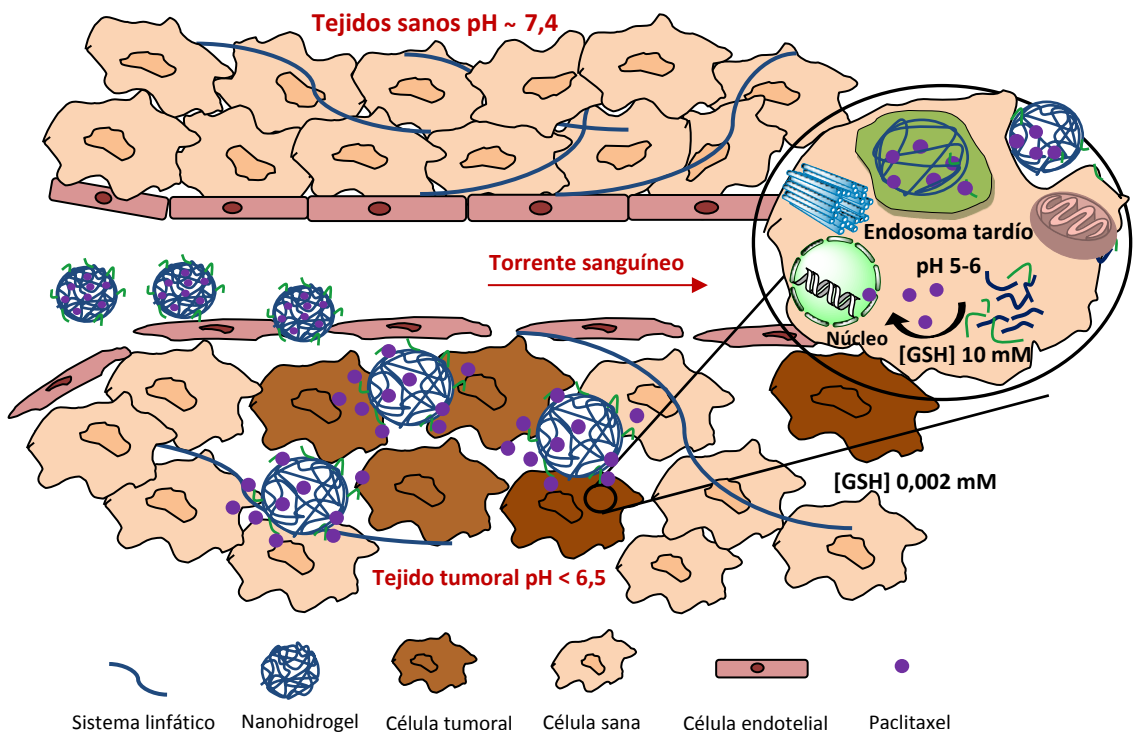


Figura 22. Fundamento teórico de la liberación de fármacos antineoplásicos (paclitaxel) en los alrededores del tumor a partir de nanohidrogeles NHA 80/15/5-CBA y NHA 80/10/10-CBA, sensibles a cambios de pH y contenido de GSH.

Con el objetivo de estudiar el mecanismo mediante el cual se lleva a cabo la liberación de PTX desde los nanohidrogeles, se ajustó la media de los perfiles de liberación obtenidos de todas las formulaciones a las ecuaciones propuestas por Higuchi en 1963 (Higuchi, 1963) y Korsmeyer y Peppas en 1983 (Korsmeyer *et al.*, 1983). Los coeficientes de correlación lineal (r^2) obtenidos en todos los casos evidenciaron que todas las formulaciones de nanohidrogeles presentan un buen ajuste a los modelos seleccionados. Además, en estas formulaciones, el coeficiente K calculado mediante el modelo propuesto por Higuchi es

diferente de cero y en el modelo propuesto por Korsmeyer y Peppas, el valor del exponente n ($0,13 < n < 0,36$) no corresponden a ninguno de los intervalos descritos por los autores, que establecen un fenómeno de difusión de fármaco de tipo fickiano (modelo matemático de Higuchi) si n es igual a 0,5; si, por el contrario, n toma valores entre 0,5 y 1 indica que la liberación del fármaco es debida a un mecanismo de difusión no fickiano o anómalo; y cuando n es igual a 1, el mecanismo de liberación del fármaco depende del proceso de relajación de las cadenas poliméricas. Por tanto, los resultados obtenidos en este estudio indican la existencia de varios procesos simultáneos al fenómeno de difusión del PTX, sin la participación de erosión y/o disolución de la matriz polimérica. Además, el ajuste a los modelos matemáticos corroboró la cinética de liberación de orden cero de los nanohidrogeles, propia de los sistemas de liberación controlada, en los que no suelen existir cambios bruscos en la concentración terapéutica del fármaco en el organismo, comparándolo con los cambios intermitentes de concentración en las dosificaciones convencionales (Sáez *et al.*, 2003)

Una vez realizada la caracterización *in vitro* de los nanosistemas sintetizados, se llevaron a cabo distintos estudios celulares utilizando tres líneas celulares humanas procedentes de cáncer de mama (MCF7 y T47D) y cáncer de ovario (HeLa). En primer lugar, la fluorescencia emitida por la cumarina incluida en los nanohidrogeles demostró la inclusión de estos nanosistemas en las tres líneas celulares seleccionadas. Los estudios revelaron que la entrada de los nanohidrogeles en las células depende fundamentalmente del tiempo de incubación, la concentración de nanosistemas utilizada y las interacciones establecidas entre los distintos tipos de células y las cuatro formulaciones ensayadas. Como era de esperar, la cantidad de nanosistemas incluidos en las células aumentó a medida que se incrementó el tiempo de incubación y la concentración utilizada, como consecuencia de la acumulación de

las partículas en el medio intracelular. Además, se observó que los nanosistemas NHA 80/10/10-CBA y NHA 80/10/10-NMBA fueron incorporados en las células en mayor proporción que sus homólogos NHA 80/15/5-CBA y NHA 80/15/5-NMBA. Este hecho podría explicarse por la mayor proporción de 2AAECM presente en su composición, ya que la larga cadena hidrocarbonada de dicho monómero podría establecer un mayor número de interacciones con las membranas celulares, lo que favorece la entrada de estos nanosistemas en las células (Amin *et al.*, 2015). Previsiblemente, estos hidrogeles de tamaño nanométrico entrarían en las células por dos mecanismos de endocitosis diferentes: fagocitosis o pinocitosis, dependiendo del tamaño concreto de cada partícula (Li *et al.*, 2012). Una vez en el interior de la célula, estos nanohidrogeles experimentarían un gradiente de pH desde la neutralidad de los fluidos extracelulares (pH ~ 7,4) a un medio cada vez más ácido: endosoma primario (pH ~ 6,2) y lisosoma (pH ~ 5), condiciones favorables para el hinchamiento de estos nanohidrogeles y la liberación del agente terapéutico incluido en su interior (Lehner *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012).

Además de cuantificar los nanohidrogeles incorporados en las células tumorales, se analizó el efecto citotóxico de estos nanosistemas con y sin fármaco, comparando los resultados con la viabilidad celular obtenida al poner en contacto las tres líneas celulares con el fármaco en disolución. Del mismo modo que en el estudio de inclusión celular, la citotoxicidad producida por los nanosistemas se encontró directamente relacionada con el tiempo de incubación y la concentración de nanohidrogeles utilizados. Al comparar la viabilidad de las células tratadas con los nanosistemas sin fármaco, los resultados revelaron una menor citocompatibilidad de los nanohidrogeles NHA 80/10/10-CBA y NHA 80/10/10-NMBA debido a la mayor inclusión celular observada en este tipo de nanosistemas. Además, en el caso de los nanohidrogeles entrecruzados con CBA, la rotura de las cadenas de dicho entrecruzante en un medio

reductor como es el medio intracelular, produce la desestabilización de la red tridimensional del nanohidrogel y la fragmentación de las cadenas poliméricas, generando residuos en un medio sin renovación que pueden ser tóxicos para las células. Por otro lado, la citotoxicidad producida por los nanosistemas cargados con el fármaco fue superior a la registrada cuando se utilizó el fármaco en disolución. Este hecho se explica por la posible degradación del fármaco en disolución y por el efecto citotóxico sinérgico que se establece entre el mecanismo de acción del fármaco y la entrada de los nanohidrogeles. Así pues, podríamos afirmar que, a nivel celular, los nanohidrogeles sintetizados presentan una actividad antitumoral superior al fármaco en disolución debido a la protección enzimática y la estabilidad del fármaco cuando es incorporado en los nanosistemas.

El paso siguiente fue comprobar el efecto citotóxico del PTX en las líneas celulares utilizadas. Los resultados obtenidos del estudio de citometría de flujo pusieron de manifiesto la parada de las células tumorales en la fase G_2/M del ciclo celular al ser tratadas con el fármaco en disolución o con los nanohidrogeles cargados con PTX. Sin embargo, las células en contacto con los nanohidrogeles sin fármaco mostraron un equilibrio entre las distintas fases del ciclo celular (G_0/G_1 , S y G_2/M), con resultados similares a los obtenidos por las células control, lo que descarta el efecto de estos nanohidrogeles en el ciclo celular. Estos resultados concuerdan con el efecto citotóxico esperado para el PTX. Como se ha mencionado anteriormente, el mecanismo de acción de este fármaco antineoplásico se basa en la interrupción del equilibrio dinámico propio de los microtúbulos al unirse a la subunidad β -tubulina. Como consecuencia de ello, el ciclo celular se encuentra bloqueado en la fase G_2/M , inhibiendo la división celular y favoreciendo la muerte celular mediante apoptosis (Ginnakakou *et al.*, 1997; Qi *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2014).

La elevada producción y uso de los nanomateriales en los últimos años ha dado lugar a un nuevo ámbito de la nanotecnología, la nanotoxicología, para dar respuesta a las dudas surgidas en torno a la seguridad en la aplicación biológica de estos materiales. Sin embargo, el comportamiento completo de muchos de estos nanotransportadores en sistemas vivos continúa siendo una incógnita y el conocimiento sobre los posibles efectos tóxicos tras su administración sigue resultando insuficiente (Sharifi *et al.*, 2012; Tiwari *et al.*, 2011). Estos nanosistemas pueden entrar en el cuerpo humano por diferentes vías: inhalación, ingestión, absorción dérmica o inyección, y su elevada relación superficie/volumen les confiere propiedades fisicoquímicas diferentes a las observadas en el resto de materiales (Hull *et al.*, 2014; Yah *et al.*, 2012)

Por todo ello, resulta imprescindible elucidar, en el mayor grado posible, las interacciones que se establecen entre estos nanomateriales y los fluidos biológicos para asegurar su efectividad y un comportamiento inocuo en sus aplicaciones clínicas posteriores (Naahidi *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2012).

Así pues, tras la caracterización *in vitro* de los nanohidrogeles sintetizados y su aplicación a nivel celular, se procedió al análisis toxicológico *in vivo* mediante la inyección intravenosa en ratas *Wistar* hembras de las cuatro formulaciones de nanohidrogeles sin fármaco. El uso de dicho modelo animal se debe principalmente al elevado conocimiento que existe actualmente de los parámetros fisiológicos y bioquímicos de estos animales, lo que nos permite comparar nuestros resultados con los obtenidos por otros autores. Así pues, la selección de la dosis de nanohidrogeles administrada (20 mg/kg) se determinó en función de la dosis establecida por otros autores en dicho modelo animal y en otros modelos (Rajana *et al.*, 2014; Tiwari *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2010). Una vez inyectados los nanohidrogeles

por la vena de la cola de ratas *Wistar* se determinaron las principales interacciones con los fluidos biológicos teniendo en cuenta el transporte más probable de estas partículas en los sistemas vivos (Fig. 23).

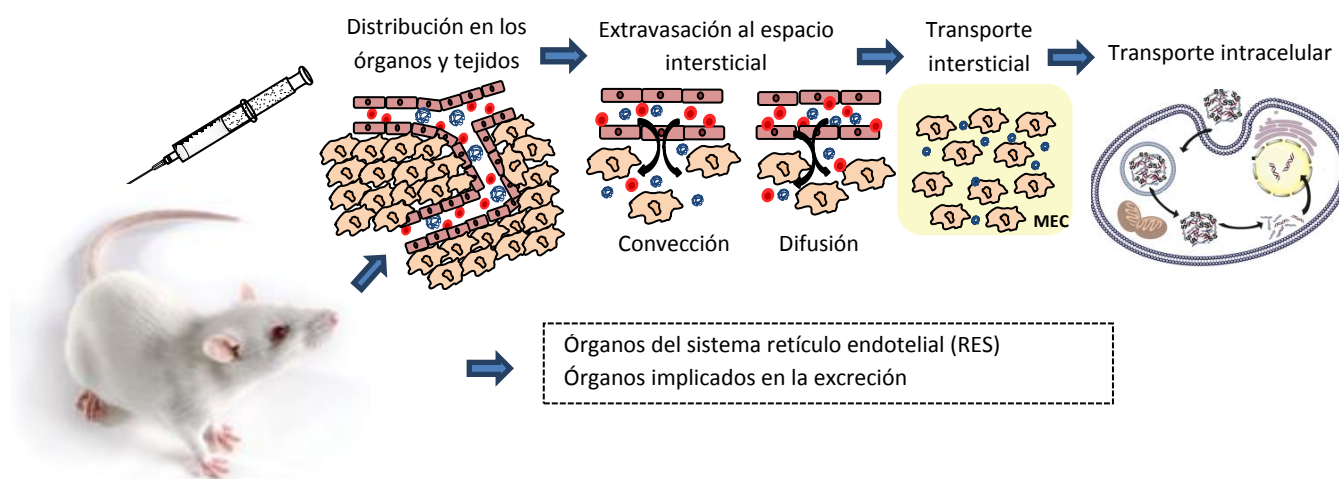


Figura 23. Transporte de los nanohidrogeles desde el sitio de inyección intravenosa hasta las dianas de acción. MEC: matriz extracelular.

Cuando los nanohidrogeles son inyectados por vía intravenosa, los nanomateriales interactúan directamente con las células y otros componentes sanguíneos. Por ello, el estudio de hemocompatibilidad así como la posible formación de coágulos sanguíneos, adhesión celular, adsorción de proteínas plasmáticas o respuesta inmune, es esencial para asegurar la inocuidad de los nanohidrogeles sintetizados (Sharifi *et al.*, 2012). Por tanto, una vez inyectados los nanosistemas, se determinaron varios parámetros relacionados con la hemocompatibilidad de los mismos (Fig. 24).

Los resultados obtenidos del estudio hematológico de la línea roja (cuenta de eritrocitos, nivel de hemoglobina, índices hematológicos VCM, HCM y CHCM) mostraron valores muy similares a los obtenidos por otros autores en ratas *Wistar* (Arcila *et al.*, 2010; Tiwari *et al.*, 2011). De dichos resultados se puede deducir que la administración intravenosa de las

confirmados posteriormente mediante el análisis histopatológico de órganos implicados en la respuesta inmune como es el caso del bazo. De nuevo, estos resultados obtenidos al administrar por vía intravenosa nanosistemas poliméricos contrastan con los observados por otros autores al administrar nanopartículas de plata a la misma concentración (Tiwari *et al.*, 2011).

Además de la hemólisis y la respuesta inflamatoria, los nanohidrogeles pueden inducir la agregación de plaquetas y la coagulación sanguínea cuando se ponen en contacto con la sangre (Jun *et al.*, 2011). Al analizar el número de plaquetas tras la inyección de los nanosistemas, se observó un incremento de dichas células en las ratas tratadas con la composición polimérica NHA 80/15/5-CBA, recuperando valores normales en días posteriores. Esta respuesta suele estar relacionada con la agregación plaquetaria; sin embargo, este efecto no causó la muerte ni la formación de trombos en ninguna de las ratas tratadas, por lo que la respuesta observada nueve días después de la administración de los nanosistemas podría deberse a la simple inyección intravenosa. Dichos resultados sugieren que la mayor parte de los nanohidrogeles administrados podrían ser retirados rápidamente de la circulación sanguínea (entre 1-4 semanas) por los órganos del sistema fagocítico mononuclear, tales como el hígado y el riñón (Park *et al.*, 2009).

Con el objetivo de confirmar el efecto de los nanohidrogeles a nivel sanguíneo, se determinaron varios parámetros implicados en la cascada de coagulación sanguínea. En primer lugar, se midieron el tiempo de protrombina y los niveles de antitrombina III en todos los grupos de tratamiento. El tiempo de protrombina (TP) es el tiempo requerido para formar un coágulo de fibrina a partir de la fracción de sangre líquida (Meng *et al.*, 2009); mientras que la antitrombina III (AT III) es una pequeña molécula proteica implicada en la

inactivación de las proteinasas de coagulación, las cuales juegan un importante papel en la prevención de la trombosis (Barrowcliff & Curtis, 1987). Los resultados obtenidos de estos ensayos mostraron valores similares a los obtenidos por otros autores (Bender *et al.*, 2012; Liu, X. & Sun, 2013). Como excepción, las ratas tratadas con los nanosistemas NHA 80/15/5-CBA y NHA 80/10/10-CBA que mostraron un incremento de TP en el séptimo día después de la administración de los nanohidrogeles, que podría estar relacionado con el incremento de ATIII observado en ese mismo intervalo de tiempo, ya que dicha molécula está relacionada con la inhibición de la coagulación sanguínea. Además de estos dos parámetros mencionados, también se analizó el nivel de fibrinógeno (Fbg) en la sangre de las ratas tratadas con los nanohidrogeles. El Fbg es un biomarcador de la activación de la cascada de coagulación, ya que dicha molécula, sintetizada por el hígado, es convertida en fibrina ante la presencia de trombina (Liu & Sun, 2013). La cantidad de Fbg de los grupos tratados con los nanohidrogeles fue muy similar a la observada en el grupo control, lo que demuestra que la inyección de estos nanosistemas no produjo ninguna reacción de fase aguda (Liu & Sun, 2013).

Después de la interacción de los nanohidrogeles con las proteínas plasmáticas y las células sanguíneas, estos nanosistemas pueden entrar en varios órganos, acumularse allí manteniendo su estructura original o ser modificados y metabolizados en el órgano de destino (Born *et al.*, 2006). Además, como se ha mencionado previamente, la mayoría de los nanotransportadores administrados por vía intravenosa son retenidos y eliminados por el sistema fagocítico mononuclear y otros órganos implicados en la excreción (Sharifi *et al.*, 2012). Por tanto, la evaluación bioquímica de la actividad de algunas de las enzimas plasmáticas relacionadas con la función hepática y renal constituye una herramienta interesante para conocer el estado de dichos órganos. Así pues, los niveles de las enzimas

hepáticas (AST, ALT, ALP) y los metabolitos renales (BUN y creatinina) son buenos indicadores de daño hepatocelular, inflamación hepática, deterioro de la función renal y colestasis, entre otros (Loeb & Quimby, 1999). Los valores de AST, ALT y ALP en la sangre extraída de las ratas tratadas con los nanohidrogeles fueron muy similares a los obtenidos en el grupo control y a los obtenidos por otros autores (Arcila *et al.*, 2010; Tiwari *et al.*, 2011). Al analizar los parámetros renales, se observó un incremento de los niveles de creatinina en sangre de ratas tratadas con los nanohidrogeles entrecruzados con NMBA (NHA 80/15/5-NMBA y NHA 80/10/10-NMBA), lo que podría interpretarse como un indicador del daño renal producido tras la administración intravenosa de dichos nanosistemas.

La acumulación y retención de los nanosistemas en los órganos del sistema fagocítico mononuclear y órganos implicados en la excreción de productos de desecho puede desequilibrar la homeostasis de las especies reactivas de oxígeno (del inglés ROS) y las defensas antioxidantes, lo que convierte a órganos como el hígado, bazo y riñón en principales dianas del estrés oxidativo (Sharifi *et al.*, 2012). El estrés oxidativo aparece cuando existe un exceso de radicales libres en el organismo, tales como el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), lo cuales son producidos constantemente durante las reacciones metabólicas llevadas a cabo por los diferentes sistemas biológicos vivos (Sharifi *et al.*, 2012). Una acumulación excesiva de especies reactivas de oxígeno puede conducir a una lesión celular y ser responsable del desarrollo de problemas fisiológicos graves como el envejecimiento, asma, artritis, diabetes, cáncer, inflamación o enfermedades cardiovasculares (Oberdörster *et al.*, 2005). Por ello, en condiciones normales, la presencia celular de especies reactivas de oxígeno se encuentra regulada por la acción de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) o la glutation-reductasa (GSSG-R), así como por moléculas redox (glutation total= GSSG/GSH) (Fig. 25). Por tanto, la

determinación de estos parámetros resulta esencial para conocer la posible respuesta oxidativa producida por la inyección de los nanohidrogeles.

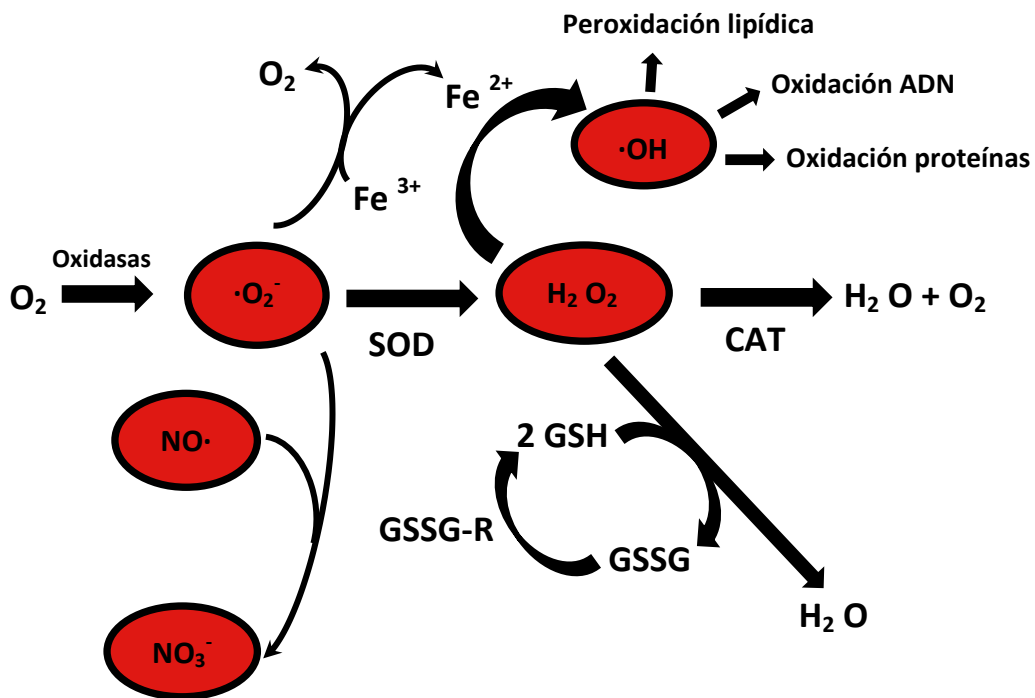


Figura 25. Esquema resumido de las principales reacciones redox en las que participan las defensas antioxidantes determinadas en este estudio (azul) ante la presencia de especies reactivas de oxígeno (rojo).

En primer lugar, se determinó la actividad SOD en todos los grupos de tratamiento. La superóxido dismutasa (SOD) constituye una de las enzimas antioxidantes más importantes, catalizando la conversión del anión superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2) (Reddy & Labhassetwar, 2009). Los ensayos enzimáticos llevados a cabo en ratas tratadas con nanohidrogeles mostraron distintos resultados en función del tipo de órgano analizado y la composición monomérica del nanosistema administrado. Así mismo, los resultados obtenidos en el grupo control fueron similares a los obtenidos por otros autores (Kalaria *et al.*, 2009; Szymonik-Lesiuk *et al.*, 2003). Por un lado, las ratas Wistar tratadas con nanohidrogeles NHA 80/15/5-CBA mostraron un incremento de la actividad SOD en hígado y riñón, que podría ser interpretado como resultado de la neutralización de

las especies reactivas de oxígeno generadas tras la inyección de estos nanohidrogeles. Por otro lado, las ratas tratadas con los nanohidrogeles NHA 80/10/10-NMBA mostraron una disminución de la actividad SOD en hígado, lo que podría indicar la desnaturalización de la estructura tridimensional de la proteína, modificaciones en el centro activo de la enzima o alteraciones en la expresión génica (Szymonik-Lesiuk *et al.*, 2003).

En segundo lugar, se determinó la actividad catalasa (CAT) en todos los grupos de tratamiento. La actividad de esta enzima se encuentra directamente relacionada con la actividad SOD, ya que ambas forman parte de un sistema antioxidante muy activo ante la presencia de elevadas concentraciones de ROS en el medio (Castrejón, 2007; Kono & Fridovich, 1982). La CAT cataliza la reacción de conversión del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua (H_2O) y oxígeno (O_2) y es inactivada por la presencia del anión superóxido (O_2^-) en el medio, por lo que se encuentra estrechamente relacionada con la SOD (Zhang & Kwong-Huat, 2000). Al analizar la actividad CAT en las ratas tratadas con los nanohidrogeles NHA 80/15/5-NMBA se observó un incremento significativo de la actividad de dicha enzima en el hígado. Del mismo modo que ocurría con la SOD, dicho resultado demuestra la neutralización enzimática de las especies reactivas de oxígeno generadas en el hígado tras la administración de estos nanohidrogeles. Estos resultados podrían indicar que estos nanohidrogeles (NHA 80/15/5-CBA y NHA 80/15/5-NMBA) son metabolizados y excretados a un ritmo más lento que sus equivalentes nanohidrogeles (NHA 80/10/10-CBA y NHA 80/10/10-NMBA), ya que los estudios de internalización celular demostraron una menor inclusión de estos nanosistemas en el tiempo de incubación analizado.

A continuación, se evaluó la actividad glutatión-reductasa (GSSG-R) en todos los grupos de tratamiento. En este caso, se observó un incremento de actividad enzimática en el bazo de

las ratas tratadas con los nanohidrogeles entrecruzados con CBA (NHA 80/15/5-CBA y NHA 80/10/10-CBA). La explicación de estos resultados se basa en la función que ejerce dicha enzima al catalizar la conversión del glutatión en forma oxidada (GSSG) en glutatión en forma reducida (GSH). Como se demostró en los estudios de liberación *in vitro*, los nanohidrogeles entrecruzados con CBA son sensibles a la presencia de GSH del medio, ya que los enlaces disulfuro presentes en la estructura del entrecruzante CBA se desestabilizan en un medio reductor. Como consecuencia de ello, el uso de GSH en dicha desestabilización polimérica reduce los niveles normales de dicha molécula redox a nivel tisular, por lo que es necesario incrementar la actividad GSSG-R para recuperar de nuevo los niveles originales. En cambio, en el caso de los nanohidrogeles NHA 80/10/10-NMBA se observó un descenso de la actividad enzimática a nivel hepático y renal. Dicho efecto es atribuido a la pérdida de la función normal de la enzima como consecuencia de la toxicidad inducida por la acumulación prolongada de este tipo de nanosistemas no biodegradables en los órganos analizados, como ocurre con la SOD.

Por último, los resultados del análisis del contenido GSSG/GSH mostraron una disminución de los niveles de glutatión total en el bazo de las ratas tratadas con nanohidrogeles NHA 80/15/5-CBA y NHA 80/10/10-CBA. Como se ha explicado anteriormente, este efecto podría deberse al uso de esta molécula en la reducción de los enlaces disulfuro del entrecruzante CBA. Sin embargo, al analizar los niveles de GSSG/GSH en el hígado de ratas tratadas con NHA 80/10/10-NMBA, el incremento de glutatión total observado podría deberse a la utilización de dicha vía de desintoxicación de las especies reactivas de oxígeno, ya que la actividad de las enzimas SOD, CAT (como consecuencia de la inactivación producida por el sustrato de SOD) y GSSG-R se ven alteradas ante la presencia de dicha composición polimérica.

Además de los ensayos cuantitativos explicados anteriormente, se llevó a cabo un estudio cualitativo mediante el análisis histopatológico de los principales órganos implicados en la eliminación y metabolismo de los nanosistemas. Todas las imágenes de microscopía óptica obtenidas a partir de los órganos extraídos (hígado, riñón y bazo) mostraron un aspecto similar, independientemente del tipo de tratamiento administrado. Estos resultados coinciden con el análisis del índice organosomático.

En las muestras de hígado, los hepatocitos aparecieron formando el patrón sinusoidal típico del lobulillo hepático. No se observaron signos de degeneración tisular ni anisonucleosis en las muestras analizadas. Así mismo, se descartó la presencia de reacciones inflamatorias y áreas de necrosis o fibrosis en el parénquima hepático. A nivel esplénico, las imágenes mostraron una proporción normal de pulpa blanca y pulpa roja, descartando así la presencia de reacciones inmunológicas. Del mismo modo que en el caso de las muestras de hígado, la morfología celular y tisular observada correspondía a un órgano sano, descartando cualquier tipo de patología. Por último, las muestras de riñón obtenidas de ratas tratadas con nanohidrogeles mostraron una disposición tisular normal, sin observarse áreas de necrosis ni inflamación.

Una vez analizada la biocompatibilidad y el efecto toxicológico *in vivo* tras la administración intravenosa de los cuatro tipos de nanohidrogeles sin fármaco, todos los nanosistemas analizados ofrecieron resultados esperanzadores para su uso como vehículos de fármacos hidrófobos como el PTX.

Por ello, el siguiente paso fue la evaluación de la actividad antitumoral de los nanohidrogeles cargados con PTX en modelos tumorales *in vivo* y de la capacidad de estos sistemas de

mejorar la efectividad del tratamiento actual, limitando la acción del fármaco a nivel local y disminuyendo así la posibilidad de desarrollar efectos adversos indeseables.

Teniendo en cuenta la biocompatibilidad mostrada por todos los nanosistemas ensayados y los resultados obtenidos del estudio *in vitro*, la composición polimérica seleccionada para llevar a cabo dicho experimento fue la mezcla formada por NHA 80/15/5-CBA, debido principalmente a la posibilidad de estos nanohidrogeles de desestabilizar su matriz tridimensional en el interior celular como consecuencia del entrecruzante bio reducible CBA.

En primer lugar, se desarrolló un modelo de tumor xenográfico de células HeLa en ratones atómicos mediante la inoculación subcutánea de las células. A diferencia de lo que ocurre con otro tipo de células tumorales como la línea celular MCF7 (Kyprianou *et al.*, 1991; Osborne *et al.*, 1985), todos los tumores inoculados se desarrollaron con éxito sin necesidad de administrar un aporte hormonal extra ni utilizar matrigel, por lo que el uso de estas células permite partir de un tamaño muestral representativo para que el experimento se pueda considerar significativo. Una vez desarrollado el tumor, los ratones fueron distribuidos en cuatro grupos de tratamiento: grupo control (suero salino), nanohidrogeles sin fármaco, nanohidrogeles cargados con PTX y PTX en disolución. Todos los tratamientos fueron inyectados subcutáneamente en los alrededores del tumor. La elección de la dosis del paclitaxel (30 mg/kg) se realizó teniendo en cuenta la dosis administrada por otros autores (Kim *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013; Xua *et al.*, 2005).

Durante el periodo del experimento, no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos en el control periódico del peso de los ratones. Así mismo, una vez finalizado el tratamiento, el índice organosomático calculado a partir de los principales órganos analizados fue muy similar en los cuatro grupos de estudio. La interpretación de

estos resultados podría indicar, de forma muy preliminar, un estado fisiológico similar en todos los ratones y la ausencia de respuesta toxicológica en los animales tras la administración de los nanohidrogeles. El estudio bioquímico y el análisis de las defensas antioxidantes realizadas posteriormente permitieron completar dicha información.

Debido a la importancia que las propiedades físicas de estos nanosistemas tienen en las interacciones biológicas, se analizó el potencial zeta de los nanohidrogeles utilizados en este experimento. Los resultados revelaron la presencia de cargas negativas en la superficie de los nanohidrogeles. Basándose en los estudios realizados por otros autores (Mayer *et al.*, 2009; Sharifi *et al.*, 2012) dichas superficies aniónicas se caracterizan por mostrar una menor toxicidad hemotológica que sus homólogos catiónicos, ya que estos últimos exhiben una gran afinidad por las cabezas de los fosfolípidos, cargadas negativamente, y por gran parte de los dominios proteicos presentes en las membranas celulares (Goodman *et al.*, 2004).

Al analizar la evolución del tumor en los cuatro grupos de tratamiento, se observó un rápido crecimiento de la masa del tumor en los ratones control y los ratones tratados con los nanohidrogeles NHA 80/15/5-CBA sin fármaco, lo que confirmó la ausencia de actividad antitumoral de la composición polimérica analizada. Por otro lado, al comparar los tumores tratados con los nanohidrogeles con fármaco y aquellos tratados con el fármaco en disolución, se comprobó una disminución de la velocidad de crecimiento tumoral en los ratones tratados con los nanohidrogeles con fármaco. Los tumores tratados con fármaco en disolución mostraron una primera etapa (14-30 días) en la que la velocidad de crecimiento fue inferior a la obtenida en el grupo tratado con los nanohidrogeles sin fármaco. No obstante, la disminución del crecimiento del tumor debido al efecto antitumoral del fármaco durante la primera fase del estudio no consiguió estabilizar el crecimiento de la masa

tumoral en la segunda fase del experimento (30-39 días). En esta segunda fase, la velocidad de crecimiento tumoral obtenida alcanzó valores similares a los registrados por el grupo control y el grupo placebo durante la primera fase del estudio. Este resultado demuestra la ineficacia antitumoral del paclitaxel en disolución y contrasta con la supresión del crecimiento conseguido en los tumores tratados con los nanohidrogeles NHA 80/15/5-CBA cargados con paclitaxel. Además, estos resultados coinciden con los resultados esperados en el uso de sistemas de liberación controlada de fármacos, ya que el fármaco en disolución se encuentra sometido a una rápida degradación enzimática, mientras que el fármaco incluido en los nanosistemas está protegido de dicha degradación por la matriz polimérica, manteniendo así la concentración del fármaco en los límites de la ventana terapéutica (Iqbal *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013). Sin embargo, la supresión del crecimiento tumoral observado en los tumores tratados con nanohidrogeles con fármaco comenzó a ser visible a partir de la segunda fase del estudio (30-39 días). Este hecho podría deberse a que los sistemas de liberación controlada deben ser incluidos en las células y, una vez allí, liberar lentamente el fármaco durante un periodo de tiempo prolongado, lo que requiere mayor tiempo que el fármaco en disolución para llevar a cabo la inhibición del crecimiento tumoral (Chun *et al.*, 2009).

Estos resultados obtenidos del análisis de evolución del tumor fueron corroborados con los estudios histológicos del tumor extraído de cada grupo de tratamiento. En primer lugar, el estudio patológico llevado a cabo por microscopía óptica confirmó la presencia de gran cantidad de células en fase de mitosis defectuosas, cuerpos apoptóticos y áreas de necrosis en los tumores tratados con paclitaxel (PTX en disolución o PTX incluido en los nanohidrogeles NHA 80/15/5-CBA). Este aspecto microscópico coincide con el proceso estabilización de los microtúbulos inducido por los taxanos. Como se observó en los estudios

in vitro, el paclitaxel actúa sobre los microtúbulos de las células en división causando la parada del ciclo celular en la fase G₂/M, inhibiendo la replicación celular y favoreciendo así la apoptosis de las células (Kumar *et al.*, 2015; Panchagnula, 1998). Por otro lado, estudios recientes llevados a cabo en células madre de glioma después del tratamiento con paclitaxel mostraron que algunos signos nucleares polimórficos como la presencia de figuras mitóticas defectuosas, fibras de cromatina no condensada, fragmentación y desestructuración de los cromosomas son dependientes del tiempo de incubación (Riva *et al.*, 2014).

Dicha actividad mitótica es un parámetro crucial para medir la agresividad de un tumor y, por tanto, está asociado con importantes consecuencias clínicas. Por ello, actualmente se lleva a cabo el estudio rutinario de varios marcadores tumorales con el objetivo de determinar la respuesta a la administración de fármacos antitumorales. Uno de los marcadores tumorales más utilizados en la actualidad es la proteína nuclear Ki67, la cual ha demostrado una elevada efectividad en el pronóstico de muchas enfermedades tumorales (Tozuka *et al.*, 2013). Por esta razón, se analizó la presencia de dicho marcador de proliferación en los cortes histológicos de los tumores extraídos de los ratones. Estos estudios de inmunohistoquímica revelaron una menor presencia de Ki67 en los tumores tratados con los nanohidrogeles cargados con paclitaxel respecto a los grupos control, nanohidrogeles sin fármaco y fármaco en disolución.

Por tanto, todos los estudios realizados hasta el momento confirmaron el efecto antitumoral *in vivo* de los nanohidrogeles NHA 80/15/5-CBA cargados con paclitaxel. Además, los diversos estudios llevados a cabo durante el experimento determinaron que dichos nanohidrogeles son capaces de mejorar la eficacia quimioterapéutica del fármaco en disolución a la concentración ensayada (30 mg/kg). Este efecto antitumoral es similar al

obtenido por Shim y colaboradores (Shim *et al.*, 2007) tras la inyección subcutánea de hidrogeles sensibles al pH y temperatura en ratones macho C57BL/6 en un rango de concentraciones de paclitaxel entre 25 y 50 mg/kg.

El éxito de los nanohidrogeles NHA 80/15/5-CBA en el efecto antitumoral reside en el incremento de la concentración del principio activo en la localización específica de acción debido a la elevada estabilidad del fármaco en estas condiciones y la gran capacidad de entrada de estos nanosistemas en las células tumorales, como demostraron los estudios *in vitro*. Tras la inyección subcutánea de estos nanohidrogeles en los alrededores de tumor, gran parte de los nanosistemas entrarán en las células tumorales adyacentes. El tamaño de estos hidrogeles (10-80 nm en estado colapsado) favorece su rápida extravasación por los poros de las células endoteliales (50-100 nm) y la acumulación en el espacio intersticial durante un tiempo prolongado, debido al ineficaz drenaje linfático propio de los tumores sólidos (Kwon *et al.*, 2008; Steichen *et al.*, 2013). Además, este tamaño favorece la difusión de las partículas, la ausencia de respuesta inmune y la habilidad de llegar a tejidos diana limitando la distribución a otros tejidos (Moghimi *et al.*, 2001).

Una vez dentro de la célula, una de las opciones más probables es que la partícula nanométrica sea transportada desde el endosoma primario al endosoma tardío y, finalmente al lisosoma para su degradación (Steichen *et al.*, 2013). A lo largo de este camino que realizan los nanohidrogeles, el pH disminuye desde un pH aproximado de 7,4 hasta un pH 5, lo que provocaría la expansión de la red tridimensional de estos nanogeles catiónicos como consecuencia de la repulsión electrostática establecida entre los grupos amino terminales protonados del monómero HEAA, como se comprobó en los estudios *in vitro*. Como resultado del hinchamiento de los nanohidrogeles en estas condiciones, se produciría

la liberación del fármaco por difusión a través de la red polimérica. Así mismo, la presencia de moléculas de GSH en el interior celular contribuirían a la reducción de los enlaces disulfuro del entrecruzante CBA, desestabilizando la red polimérica de los hidrogeles y favoreciendo la salida del fármaco. Por tanto, la liberación del fármaco a partir de estos nanohidrogeles inyectados subcutáneamente reduciría en gran parte los efectos adversos producidos por la quimioterapia convencional, ya que se conseguiría limitar la acción del fármaco a las células tumorales y se evitaría el uso de Cremophor®EL y etanol, tensioactivos utilizados en la formulación quimioterapéutica actual, los cuales son responsables del mayor número de efectos secundarios producidos (Singla *et al.*, 2002; Spratlin & Sawyer, 2007).

Por tanto, el siguiente paso fue la evaluación de un posible efecto tóxico desencadenado en los órganos relacionados con la fagocitosis y acumulación de estos nanosistemas (hígado, bazo y riñón) que además corresponden con los principales órganos diana del paclitaxel, como demuestran los estudios de biodistribución llevados a cabo por otros autores (Kim *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2008). Así pues, el análisis de las posibles patologías asociadas a la administración de los nanohidrogeles NHA 80/15/5-CBA con fármaco en dichos órganos resulta fundamental para la evaluación de estos nanosistemas como posibles formulaciones terapéuticas. Para ello, se determinaron varios parámetros bioquímicos sanguíneos y se analizaron las defensas antioxidantes en los órganos extraídos.

El análisis de los parámetros bioquímicos sanguíneos en los ratones tratados con nanohidrogeles (NHA 80/15/5-CBA sin fármaco y NHA 80/15/5-CBA con fármaco) reveló niveles de enzimas hepáticas (ALT, AST y ALP) y metabolitos renales (BUN y creatinina) dentro del intervalo de referencia que se considera normal (Chen *et al.*, 2003; Pagel *et al.*,

2003) y, a su vez, similares a los obtenidos en el grupo control, por lo que se podría descartar un daño agudo en hígado y riñón. Estos resultados fueron muy parecidos a los obtenidos por Wang y colaboradores (Wang *et al.*, 2013) al administrar por vía intravenosa micelas de poli(ϵ -caprolactona-co-L-láctico) y polietilenglicol cargadas con PTX (10, 20 y 30 mg/kg) en modelos de ratón tumorales S-180. Sin embargo, al analizar los parámetros bioquímicos de la sangre de ratones tratados con fármaco en disolución, se observó un incremento de la actividad alanina aminotransferasa (ALT) y un descenso de los niveles de creatinina. Estos resultados indican que la administración del fármaco en disolución altera la fisiología normal del hígado y del riñón respectivamente, lo que podría conducir al desarrollo de una patología en dichos órganos, como demostraron los estudios de Mo-ying y colaboradores (Mo-ying *et al.*, 2004) realizados con ratones S-180.

Por otro lado, la administración de estos nanosistemas puede desencadenar una respuesta de estrés oxidativo en estos órganos, que sería neutralizada por las defensas antioxidantes del organismo. Como se ha explicado anteriormente, a pesar de que estos nanosistemas se administraron por vía subcutánea en los alrededores del tumor, una pequeña proporción de estos hidrogeles nanométricos (10-80 nm en estado colapsado), así como los fragmentos residuales de su desintegración, podrían extravasarse al torrente sanguíneo atravesando los poros de la membrana endotelial (50-100 nm) y llegar a algunos órganos del sistema del retículo endotelial (hígado y bazo) y a órganos implicados en la excreción de productos de desecho (riñón).

Así pues, el siguiente paso que se llevó a cabo en este trabajo fue la evaluación de las defensas antioxidantes en dichos órganos tras la administración de los distintos tipos de tratamiento. Para ello, se seleccionaron los mismos parámetros de estudio mencionados

anteriormente: el metabolito glutation total (en su forma oxidada y reducida; GSSG/GSH), implicado en la neutralización de las especies reactivas de oxígeno, y tres enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa y glutation reductasa).

Los resultados obtenidos del análisis hepático revelaron un descenso de la actividad SOD y CAT en el hígado de los ratones tratados con PTX (PTX en disolución y nanohidrogeles NHA 80/15/5-CBA cargados con PTX), lo que indica un aumento del estrés oxidativo como consecuencia de la administración del fármaco. Kalaria y colaboradores (Kalaria *et al.*, 2008) obtuvieron resultados muy similares tras la administración oral e intravenosa de doxorubicina (en disolución e incluida en nanopartículas de poli-lácticoglicólico) en ratas Sprague-Dawley hembras. Como se ha explicado anteriormente, la enzima superóxido dismutasa (SOD) reacciona con el anión O_2^- (primer producto de los radicales de oxígeno) para formar H_2O_2 , disminuyendo así los efectos tóxicos derivados de los radicales libres generados en reacciones secundarias. Por otro lado, el anión O_2^- inactiva la CAT que, a su vez, ejerce un importante papel antioxidante desintoxicando las altas concentraciones de H_2O_2 generadas por la SOD (Zhang & Kwong-Huat, 2000). Como consecuencia de todo ello, un descenso en la actividad SOD implica necesariamente una disminución de la actividad CAT, como muestran los resultados obtenidos en este estudio. Por otro lado, la disminución observada en la actividad SOD hepática podría deberse a una alteración en la estructura enzimática o en la expresión genética (Szymonik-Lesiuk *et al.*, 2003).

El hígado es un órgano muy vascularizado implicado en numerosas reacciones metabólicas, respuestas inmunológicas y funciones endocrinas. A pesar de que el tamaño de los poros de la vasculatura hepática depende de las especies animales, numerosos autores establecen un tamaño aproximado de 141 nm para el caso de los ratones (Jacobs *et al.*, 2010), lo que

permitiría la entrada y salida de los componentes del plasma sanguíneo y de los nanohidrogeles al espacio sinusoidal, donde se encuentran situados los cordones formados por hepatocitos (Bertrand & Leroux, 2012). Una vez dentro de los capilares sinusoidales, los nanohidrogeles podrían ser fagocitados por las células de Kupffer, tras el reconocimiento de la superficie de los nanohidrogeles por las opsoninas (Champion *et al.*, 2008; Petros & DeSimone, 2010). Tras la ingestión, las vesículas fagocíticas formadas (fagosomas) se unen con orgánulos intracelulares que contienen proteínas digestivas y un pH interno ácido, lo que contribuiría a la rápida liberación del fármaco desde los nanohidrogeles catiónicos y a la desintegración de la red polimérica. Después de la desintegración de la partícula, los fragmentos residuales de los nanohidrogeles podrían ser eliminados por exocitosis o secuestrados en cuerpos residuales en las células, en caso de no poder ser digeridos (Bertrand & Leroux, 2012).

Al analizar el estado de las defensas antioxidantes en el bazo, se observó un incremento de la actividad GSSG-R en los ratones tratados con los nanohidrogeles con fármaco. La GSSG-R es una enzima implicada en el mantenimiento de los niveles de glutatión en su forma reducida (GSH) catalizando la reducción de GSSG a GSH ante la presencia de NADPH (Zhang & Kwong-Huat, 2000). Este metabolito reducido (GSH) protege a las células del daño inducido por los radicales libres actuando como agente antioxidante no enzimático. Además, una proporción del total de GSH generado por la enzima GSSG-R podría ser utilizado en la reducción de los enlaces disulfuro del entrecruzante CBA, por lo que la actividad de la enzima glutatión reductasa debe incrementarse para conseguir restablecer el equilibrio GSSG-GSH.

Por último, el riñón de los ratones tratados con el fármaco (PTX en disolución y PTX incluido en los nanohidrogeles NHA 80/15/5-CBA) reveló un incremento de los niveles GSSG/GSH. Este incremento en la síntesis de glutatión total es interpretado por otros autores como una respuesta al estrés oxidativo generado en dicho órgano (Mohamed *et al.*, 2014; Valko *et al.*, 2006). Los riñones son órganos implicados en la filtración sanguínea y excreción de los productos de desecho. El tamaño de poro de los capilares glomerulares se sitúa en torno a 60-80 nm, lo que dificulta la filtración de la mayoría de los sistemas de liberación utilizados y, como consecuencia, quedan retenidos en el riñón hasta que son degradados o fragmentados en porciones más pequeñas (Bertrand & Leroux, 2012). Como consecuencia de la retención de estas partículas en el riñón, se produce una alteración del balance normal de moléculas implicadas en la neutralización de las especies reactivas de oxígeno producidas como es el caso del glutatión total (GSSG/GSH) (Mohamed *et al.*, 2014).

En conclusión, la vehiculización del paclitaxel mediante estos nanohidrogeles sintetizados a partir de combinaciones de monómeros capaces de responder a diferentes estímulos del medio condujo a la optimización del tratamiento antitumoral con este fármaco.

De esta forma se confirmó el gran potencial que ofrecen dichos nanosistemas en la lucha contra el cáncer, capaces de actuar de forma más específica y controlada en el tiempo. Estos resultados abren la posibilidad de estudiar nuevas formas de administración del paclitaxel en humanos que permitan una mejora en la eficacia farmacológica así como una mayor calidad de vida de los pacientes tratados.

CONCLUSIONES

- Se han sintetizado cuatro formulaciones de nanohidrogeles sensibles a estímulos del medio intratumoral partiendo de mezclas con distinta proporción de los monómeros N-isopropilacrilamida (NIPA), N-hidroxietilacrilamida (HEAA) y tert-butil 2-acril-amido-etil carbamato (2AAECM) y dos entrecruzantes diferentes: N-N'-cistaminbisacrilamida (CBA) y N-metilenbisacrilamida (NMBA), cuya diferencia reside en la capacidad de reducción en un medio intracelular. Estos nanohidrogeles han demostrado ser sensibles a cambios de pH y temperatura; y en el caso de los entrecruzados con CBA, también al estado redox. Los hidrogeles sintetizados por microemulsión inversa tienen una morfología esférica y un tamaño comprendido entre 10 y 80 nm en condiciones de temperatura y pH fisiológicos, correspondiente al estado colapsado de la matriz polimérica.
- El fármaco antineoplásico paclitaxel, insoluble en medio acuoso, se encapsuló satisfactoriamente en los nanohidrogeles (33,6-42,3 µg PTX/mg NG) mediante el hinchamiento de estos sistemas en una solución etanólica del mismo. Parte del fármaco incorporado se localiza en la zona más superficial de los nanotransportadores, característica propia de la mayoría de fármacos hidrófobos.
- La liberación del fármaco *in vitro* depende de las condiciones del medio de liberación. En el caso de los nanohidrogeles entrecruzados con NMBA, la liberación está condicionada por el pH del medio, ya que a pH 5 se produce el máximo hinchamiento del nanohidrogel como consecuencia de la protonación del monómero HEAA. La liberación de paclitaxel desde los nanosistemas entrecruzados con CBA también está condicionada por el pH del medio por la presencia de HEAA en su composición y, además por la

concentración de glutathione reducido, que cuando es equivalente a la intracelular (10 mM) conduce a la desestructuración del nanogel por reducción de los enlaces disulfuro del entrecruzante. En ambos casos, la liberación sucede en dos etapas diferenciadas: una primera más rápida, como consecuencia de fármaco adsorbido a la superficie, y una segunda más lenta y prolongada, característica de los sistemas de liberación controlados.

- Los estudios en líneas celulares MCF7, HeLa y T47D demuestran que los nanohidrogeles sintetizados son capaces de interactuar y ser internalizados por dichas células tumorales, observando un incremento de dicha interacción al aumentar la cantidad de monómero 2AAECM en la matriz polimérica. Los estudios de viabilidad celular demuestran que la actividad citotóxica del paclitaxel es superior cuando es administrado en el interior de los nanohidrogeles que en disolución, y que, en todos los casos, el mecanismo de acción del paclitaxel se basa en la parada del ciclo celular en la fase G₂/M.
- La administración intravenosa de los nanosistemas sin fármaco en ratas *Wistar* induce una respuesta oxidativa diferente en función de la composición polimérica de los nanohidrogeles. Los nanosistemas entrecruzados con NMBA modifican la función enzimática de defensas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutathione reductasa (GSSG-R) en los órganos implicados en el metabolismo y excreción de las nanopartículas, así como los niveles de creatinina en sangre, asociados a un posible daño renal. Por el contrario, la respuesta toxicológica más destacable al inyectar los nanohidrogeles entrecruzados con CBA se debe a los cambios observados en la

actividad glutathion reductasa (GSSG-R) y el contenido de glutathion total (GSSG/GSH), relacionados con la reducción de los enlaces disulfuro de la molécula entrecruzante. El estudio de los parámetros hematológicos y de coagulación sanguínea, junto con los estudios histológicos, demuestran la hemocompatibilidad de las cuatro formulaciones de nanohidrogeles ensayadas, así como la ausencia de respuesta inmune y daños tisulares agudos tras su administración en ratas *Wistar* a la dosis seleccionada (20 mg/kg).

- La administración subcutánea en las inmediaciones del tumor de los nanosistemas NHA 80/15/5-CBA en un modelo de tumor xenográfico HeLa desarrollado en ratones atómicos produce la parada de crecimiento del tumor, a diferencia de lo que ocurre al administrar el fármaco en disolución. Así mismo, el análisis histológico de los tumores tratados con dichos nanosistemas muestra una mayor desorganización del tejido tumoral, con un incremento del número de células paradas en fase de mitosis y cuerpos apoptóticos. Todo ello, junto con la disminución del número de células proliferativas observada en los tumores tratados con los nanohidrogeles NHA 80/15/5-CBA, pone de manifiesto la mayor eficacia antitumoral *in vivo* de estos nanotransportadores de paclitaxel frente al fármaco sin vehicular.

BIBLIOGRAFÍA

Agüero, L., Cepero, Y., Guerrero-Ramirez, L., González, A., Silva, D., & Katime, I. (2014). Polymeric Nanohydrogels of Poly(N-Isopropylacrylamide) Combined with Others Functionalized Monomers: Synthesis and Characterization. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 5, 31-38.

Alva, A., Slovin, S., Daignault, S., Carducci, M., Dipaola, R., Pienta, K., et al. (2010). Phase II study of cilengitide (EMD 121974, NSC 707544) in patients with non-metastatic castration resistant prostate cancer, NCI-6735. A study by the DOD/PCF prostate cancer clinical trials consortium. *Investigational New Drugs*.

Amin, M.L., Joo, J.Y., Yi, D.K., & Soo, S. (2015). Surface modification and local orientations of surface molecules in nanotherapeutics. *Journal of Controlled Release*, 207, 131-142.

Arcila, V., Conde, C., Nieto, J., & Garcia, F. (2010). Comparison of hematology reference values of strain Wistar/UIS (*Rattus norvegicus*) with parameters established in standards laboratories. *Spei Domus*, 6.

Bajpai, A.K., Shukla, S., Bhanu, S., & Kankane, S. (2008). Responsive polymers in controlled drug delivery. *Progress in Polymer Science*, 33, 1088–1118.

Barrowcliff, T., & Curtis, A. (1987). *Haemostasis and thrombosis* (2nd ed.). Churchill Livingstone, Edinburgh.

Bender, E., Adorne, M., Colome, L., Abdalla, D., Guterres, S., & Pohlmann, A. (2012). Hemocompatibility of poly(ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. *International Journal of Pharmaceutics* 426, 271-279.

Bergers, G., & Benjamin, L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer*, 3, 401-410.

Bertrand, N., & Leroux, J.C. (2012). The journey of a drug-carrier in the body: An anatomophysiological perspective. *Journal of Controlled Release*, 161, 152-163.

Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N., & Farokhzad, O. (2014). Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 66, 2-25.

Blanco, M.D., Benito, M., Olmo, R., Teijón, C., Pérez, E., Katime, I., et al. (2011). Synthesis and in vitro biological evaluation as antitumour drug carriers of folate-targeted N-isopropylacrylamide-based nanohydrogels. *Wiley Online Library*.

Blanco, M.D., Olmo, R., & Teijón, J.M. (2002). *Hydrogels* (Vol. 1-25). New York: Marcel Dekker.

Born, P., Klaessig, F., Landry, T., Moudgil, B., Pauluhn, J., Thomas, K., et al. (2006). Research Strategies for Safety Evaluation of Nanomaterials, Part V: Role of Dissolution in Biological Fate and Effects of Nanoscale Particles. *Toxicological Sciences*, 90, 23-32.

Boschelli, F., Arndt, K., & Gambacorti-Passerini, C. (2010). Bosutinib: a review of preclinical studies in chronic myelogenous leukaemia. *European Journal of Cancer*, 46, 1781-1789.

Bryant, S.J., & Anseth, K.S. (2006). *Scaffolding in tissue engineering*. Boca Raton CRC Press.

Buwalda, S., Boere, K., Dijkstra, P., Feijen, J., Vermonden, T., & Hennink, W. (2014). Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials. *Journal of Controlled Release*, 190, 254–273.

Caló, E., & Khutoryanskiy, V. (2015). Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*, 65, 252–267.

Candau, F. (1992). *Polymerization in Organized Media* (Vol. 215). Philadelphia: Gordon and Breach Science.

Cardone, R.A., Casavola, V., & Reshkin, S.J. (2005). The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺exchanger in metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 5, 786-795.

Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Natural Medicine*, 6, 389-395.

Castrejón, M. (2007). Radicales libres y sistemas antioxidantes. In J. C. Diaz & M. A. Juarez (Eds.), *Bioquímica: un enfoque básico aplicado a las ciencias de la vida*. India: Mc Graw Hill.

Cetnar, J., & Beer, T. (2014). Personalizing prostate cancer therapy: the way forward *Drug Discovery Today* 19, 1482-1487.

Curigliano, G. (2012). New drugs for breast cancer subtypes: Targeting driver pathways to overcome resistance. *Cancer Treatment Reviews*, 38, 303–310.

Chacko, R., Ventura, J., Zhuang, J., & Thayumanavan, S. (2012). Polymer nanogels: A versatile nanoscopic drug delivery platform. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 836–851.

Champion, J.A., Walker, A., & Mitragotri, S. (2008). Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. *Pharmaceutical Research*, 25, 1815-1821.

Chen, P., Cameron, R., Wang, J., Vallis, K., & Reilly, R. (2003). Antitumor Effects and Normal Tissue Toxicity of ¹¹¹In-Labeled Epidermal Growth Factor Administered to Athymic Mice Bearing Epidermal Growth Factor Receptor-Positive Human Breast Cancer Xenografts. *Journal Nuclear Medicine*, 44, 1469-1478.

Chern, C.S., & Sheu, J.C. (2001). Effects of carboxylic monomers on the styrene miniemulsion polymerizations stabilized by SDS/alkyl methacrylates. *Polymer*, *42*, 2349-2357.

Chithrani, D., Ghazani, A., & Chan, C.W. (2006). Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Letters*, *6*, 662-668.

Chun, C., Lee, S.M., Kim, S.Y., Yang, H.K., & Song, S.C. (2009). Thermosensitive poly(organophosphazene)-paclitaxel conjugate gels for antitumor applications. *Biomaterials*, *30*, 2349-2360.

Danhier, F., Feron, O., & Préat, V. (2010). To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of Controlled Release*, *148*, 135-146.

Danquah, M., Zhang, X., & Mahato, R. (2011). Extravasation of polymeric nanomedicines across tumor vasculature. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *63*, 623-639.

Delongchamps, N. (2014). Prostate cancer: Review in 2014 *Diagnostic and Interventional Imaging* *95*, 739-742

Deng, Y., Wang, L., Yanga, W., Fua, S., & Elaïssarib, A. (2003). Preparation of magnetic polymeric particles via inverse microemulsion polymerization process. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, *257*, 69-78.

Di Leo, A., Curigliano, G., Dieras, V., Malorni, L., Sotiriou, C., Swanton, C., et al. (2015). New approaches for improving outcomes in breast cancer in Europe. *The Breast*, *24*, 1-10.

Eberhard, A., Kahlert, S., Goede, V., Hemmerlein, B., Plate, K.H., & Augustin, H.G. (2000). Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Research*, *60*, 1388-1393.

Etheridge, M., Campbell, S., Erdman, A., Haynes, C., Wolf, S., & McCullough, J. (2013). The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *9*, 1-14.

Ferlay, J., Parkin, D.M., & Steliarova-Foucher, E. (2010). Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *European Journal Cancer*, *46*, 765-781.

Fleige, E., Quadir, M., & Haag, R. (2012). Stimuli-responsive polymeric nanocarriers for the controlled transport of active compounds: Concepts and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *64*, 866-884.

Flory, P. (1985). Molecular Theory of Rubber Elasticity. *Polymer Journal*, *17*, 1-12.

Flory, P., & Rehner, J. (1943). Statistical Mechanics of Cross-Linked Polymer Networks II. Swelling. *Journal of Chemical Physics*, *11*, 521-526.

Fornaro, L., Masi, G., Loupakis, F., Vasile, E., & Falcone, A. (2010). Palliative treatment of unresectable metastatic colorectal cancer. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, *11*, 63-77.

Fraga, S., Brandao, A., Soares, M.E., Morais, T., Duarte, J.A., Pereira, L., et al. (2014). Short- and long-term distribution and toxicity of gold nanoparticles in the rat after a single-dose intravenous administration. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, *10*, 1757-1766.

Freiberg, S., & Zhu, X.X. (2004). Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, *282*, 1-18.

Gelderblom, H., Verweij, J., Nooter, K., & Sparreboom, A. (2001). Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *European Journal of Cancer*, *37*, 1590-1598.

Gillies, R.J., Schornack, P.A., Secomb, T.W., & Raghunand, N. (1999). *Neoplasia* (Vol. 1). New York.

Ginnakakou, P., Sackett, D.L., Kang, Y.K., Zhan, Z., Buters, J., Fojo, T., et al. (1997). Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant b-tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization. *Journal of Biological Chemistry*, *272*, 17118-17125.

Goldhirsch, A., Wood, W.C., Coates, A.S., Gelber, R.D., Thurlimann, B., & Senn, H.J. (2011). Strategies for subtypes dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of Oncology*, *22*, 1736-1747.

Goodman, C.M., McCusker, C.D., Yilmaz, T., & Rotello, V.M. (2004). Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate Chemistry*, *15*, 897-900.

Goosen, M.F.A., Sefton, M.V., & Hatton, M.W.C. (1980). Inactivation of thrombin by antithrombin III on a heparinized biomaterial. *Thrombosis Research*, *20*, 543-554.

Guerrero-Ramírez, L.G., & Katime, I. (2011). Nano-Engineering of Complex Systems: Smart Nanocarriers for Biomedical Applications. In R. Fazel-Rezai (Ed.), *Biomedical Engineering - From Theory to Applications*.

Gupta, P., Vermani, K., & Garg, S. (2002). Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discovery Today*, *7*, 569-579.

Gutmann, R., Leunig, M., Feyh, J., Goetz, A.E., Messmer, K., Kastenbauer, E., et al. (1992). Interstitial hypertension in head and neck tumors in patients: correlation with tumor size. *Cancer Research*, *52*, 1993-1995.

Håkanson, M., Cukiermanb, E., & Charnley, M. (2014). Miniaturized pre-clinical cancer models as research and diagnostic tools. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 69-70, 52–66.

Hamidi, M., Azadi, A., & Rafiei, P. (2008). Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 1638–1649.

Heldin, C.H., Rubin, K., Pietras, K., & Ostman, A. (2004). High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 4, 806-813.

Helmlinger, G., Sckell, A., Dellian, M., Forbes, N.S., & Jain, R.K. (2002). Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new insights into tumor metabolism. *Clinical Cancer Research*, 8, 1284-1291.

Higgins, G.S., O’Cathail, S.M., R. J. Muschel, & McKenna, W.G. (2015). Drug radiotherapy combinations: Review of previous failures and reasons for future optimism. *Cancer Treatment Reviews*, 41, 105–113.

Higuchi, T. (1963). Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 52, 1145–1149.

Hoar, T.P., & Schulman, J.H. (1943). Transparent Water-in-Oil Dispersions: the Oleopathic Hydro-Micelle. *Nature*, 152, 102-103.

Hoffman, A.S. (2012). Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 18–23.

Huang, Y., Yu, H., & Xiao, C. (2007). pH-sensitive cationic guar gum/poly (acrylic acid) polyelectrolyte hydrogels: Swelling and in vitro drug release. *Carbohydrate Polymers*, 69, 774-783.

Hull, L.C., Farrell, D., & Grodzinski, P. (2014). Highlights of recent developments and trends in cancer nanotechnology research-View from NCI Alliance for Nanotechnology in Cancer. *Biotechnology Advances*, 32, 666-678.

Iqbal, J., Sarti, F., Perera, G., & Bernkop-Schnürch, A. (2011). Development and in vivo evaluation of an oral drug delivery system for paclitaxel. *Biomaterials*, 32, 170-175.

Izumi, H., Torigoe, T., Ishiguchi, H., Uramoto, H., Yoshida, Y., Tanabe, M., et al. (2003). Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treatment Reviews*, 29, 541-549.

Jacobs, F., Wisse, E., & De Geest, B. (2010). The Role of Liver Sinusoidal Cells in Hepatocyte- Directed Gene Transfer. *The American Journal of Pathology*, 176, 14-21.

Jaffray, D.A. (2012). Image-guided radiotherapy: from current concept to future perspectives. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 9, 688-699.

Jain, R.K. (1994). Barriers to drug delivery in solid tumors. *Scientific American*, 271, 58-65.

Javeeda, A., Ashrafa, M., Riazb, A., Ghafoorc, A., Afzala, S., & Mahmood , M. (2009). Paclitaxel and immune system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38, 283–290.

Jemal, A., Bray, F., Center, M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global Cancer Statistics. *Cancer Journal for Clinicians*, 61, 69–90.

Jhon, M.S., Ma, S.M., Hattori, S., Gregonis, D.E., & Andrade, J.D. (1976). *Hydrogels for Medical and Related Applications*. Washington: American Chemical Society.

Jiang, Y., Chen, J., Deng, C., Suuronen, E., & Zhong, Z. (2014). Click hydrogels, microgels and nanogels: Emerging platforms for drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 35, 4969-4985.

Jun, E., Lim, K., Kim, K., Bae, O., Noh, J., Chung, K., et al. (2011). Silver nanoparticles enhance thrombus formation through increased platelet aggregation and procoagulant activity. *Nanotoxicology*, 5, 157-167.

Kabanov, A., & Vinogradov, S. (2009). Nanogels as Pharmaceutical Carriers: Finite Networks of Infinite Capabilities. *Angewandte Chemie International Edition*, 48, 5418 – 5429.

Kakran, M., & Antipina, M. (2014). Emulsion-based techniques for encapsulation in biomedicine, food and personal care. *Current Opinion in Pharmacology*, 18, 47–55.

Kalaria, D.R., Sharma, G., Beniwal, V., & Kumar, M.N. (2009). Design of Biodegradable Nanoparticles for Oral Delivery of Doxorubicin: In vivo Pharmacokinetics and Toxicity Studies in Rats. *Pharmaceutical Research*, 26, 492-501.

Katime, I., Katime, O., & Katime, D. (2004). *Los materiales inteligentes de este Milenio: los hidrogeles macromoleculares. Síntesis, propiedades y aplicaciones*. Bilbao Servicio Editorial Universidad del País Vasco.

Kawasaki, E., & Player, A. (2005). Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 1, 101–109.

Kim, S., Wook, D., Ho, Y., Seok, J., Seung, H., Wan, S., et al. (2001). In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy. *Journal of Controlled Release*, 72, 191-202.

Kirschner, C., & Anseth, K. (2013). Hydrogels in healthcare: From static to dynamic material microenvironments. *Acta Materialia*, *61*, 931–944.

Klinger, D., & Landfester, D. (2012). Stimuli-responsive microgels for the loading and release of functional compounds: Fundamental concepts and applications. *Polymer*, *53*, 5209–5231.

Kobayashi, H., Watanabe, R., & Choyke, P. (2014). Improving Conventional Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effects; What Is the Appropriate Target? *Theranostics* *4*, 81-89.

Kono, Y., & Fridovich, I. (1982). Superoxide Radical Inhibits Catalase. *The Journal of Biological Chemistry*, *257*, 5751-5754.

Kopeček, J. (2009). Hydrogels: from soft contact lenses and implants to self-assembled nanomaterials. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* *47*, 5929-5946.

Korsmeyer, R.W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., & Peppas, N.A. (1983). Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, *15*, 25-35.

Krajewski, S., Pucek, R., Panacek, A., Avci-Adali, M., Nolte, A., Straub, A., et al. (2013). Hemocompatibility evaluation of different silver nanoparticle concentrations employing a modified Chandler-loop in vitro assay on human blood. *Acta Biomaterialia*, *9*, 7460-7468.

Kumar, A., Hoskins, P.J., & Tinker, A.V. (2015). Dose-dense Paclitaxel in Advanced Ovarian Cancer. *Clinical Oncology*, *27*, 40-47.

Kumari, A., Yadav, S.K., & Yadav, S.C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, *75*, 1-18.

Kwon, J., Drumright, R., Siegwart, D., & Matyjaszewski, J. (2008). The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. *Progress in Polymer Science*, *33*, 448-477.

Kyprianou, N., English, H.F., Davidson, N.E., & Isaacs, J.T. (1991). Programmed cell death during regression of the MCF7 human breast cancer following estrogen ablation. *Cancer Research*, *51*, 162-166.

Landfester, K., & Antonietti, M. (2000). The polymerization of acrylonitrile in miniemulsions: “Crumpled latex particles” or polymer nanocrystals. *Macromol Rapid Commun*, *21*, 820-824.

Landfester, K., Willert, M., & Antonietti, M. (2000). Preparation of polymer particles in nonaqueous direct and inverse miniemulsions. *Macromolecules* *33*, 2370-2376.

Lehner, R., Wang, X., Marsch, S., & Hunziker, P. (2013). Intelligent nanomaterials for medicine: Carrier platforms and targeting strategies in the context of clinical application. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *9*, 742-757.

Lehner, R., Wang, X., Wolf, M., & Hunziker, P. (2012). Designing switchable nanosystems for medical application. *Journal of Controlled Release*, *161*, 307–316.

Li, F., Wua, H., Zhang, H., Li, F., Gu, C., & Yang, Q. (2009). Antitumor drug Paclitaxel-loaded pH-sensitive nanoparticles targeting tumor extracellular pH. *Carbohydrate Polymers*, *77*, 773–778.

Li, Y., Wang, J., Wientjes, M., & Au, J. (2012). Delivery of nanomedicines to extracellular and intracellular compartments of a solid tumor. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *64*, 29-39.

Lin, C., & Metters, A. (2006). Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *58*, 1379–1408.

Liu, X., & Sun, J. (2013). Time-Course Effects of Intravenously Administrated Silica Nanoparticles on Blood Coagulation and Endothelial Function in Rats. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* *13*, 222-228.

Liu, Z., Chen, K., Davis, C., Sherlock, S., Cao, Q., Chen, X., et al. (2008). Drug Delivery with Carbon Nanotubes for In vivo Cancer Treatment. *Cancer Research*, *68*, 6652-6660.

Loeb, W.F., & Quimby, F.W. (1999). *The clinical chemistry of laboratory animals*. Philadelphia.

Luther, M., & Heuck, C. (1932). Products of latex character and a process for producing the same USA Patent No. 1,864,078. US Patent.

Maldonado-Codina, C., & Efron, N. (2003). Hydrogel Lenses – Materials and Manufacture: A Review. *Optometry Practice*, *4*, 101-115.

Marchetti, P., Urien, S., Cappellini, G., Ronzino, G., & Ficorella, C. (2002). Weekly administration of paclitaxel: theoretical and clinical basis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *44*, S3-S13.

Marín, A., Martín, M., Liñán, O., Alvarenga, F., López, M., Fernández, L., et al. (2015). Bystander effects and radiotherapy. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*, *20*, 12–21.

Mason, M.N., Metters, A.T., Bowman, C.N., & Anseth, K.S. (2001). Predicting controlled-release behavior of degradable PLA-b-PEG-b-PLA hydrogels. *Macromolecules*, *34*, 4630-4635.

Mayer, A., Vadon, M., Rinner, B.A., Novak, A., Wintersteiger, R., & Frohlich, E. (2009). The role of nanoparticle size in hemocompatibility. *Toxicology*, *258*, 139-147.

McAllister, K., Sazani, P., Adam, M., Cho, M., M., R., Samulski, R., et al. (2002). Polymeric Nanogels Produced via Inverse Microemulsion Polymerization as Potential Gene and Antisense Delivery Agents. *Journal of the American Chemical Society*, *124*, 15198–15207.

Meng, S., Liu, Z., Shen, L., Guo, L., Zhong, W., Du, Q., et al. (2009). The effect of a layer by layer chitosan heparin coating on the endothelialization and coagulation properties of a coronary stent system. *Biomaterials*, *30*, 2276-2283.

Metters, A.T., Bowman, C.N., & Anseth, K.S. (2001). Verification of scaling laws for degrading PLA-b-PEG-b-PLA hydrogels. *Aiche Journal* *47*, 1432-1437.

Milosevic, M., Fyles, A., Hedley, D., & Hill, R. (2004). The human tumor microenvironment:invasive (needle) measurement of oxygen and interstitial fluid pressure. *Semin. Radiat. Oncol.*, *14*, 249-258.

Mintzer, M.A., & Simanek, E.E. (2009). Nonviral vectors for gene delivery. *Chemical Reviews*, *109*, 259-302.

Mo-ying, P., Xiu-xiong, N.I., Qui, Y.A.O., & Hong, Z.H. (2004). A comparative study on the liver injuries induced by Paclitaxel and Cyclophosphamide. *Medicine and Pharmacy*, *3*, 0-10.

Moghimi, S., Hunter, A., & Murray, J. (2001). Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacology Reviews*, *53*, 283.

Mohamed, M., Mohammad, M., Zakaria, A., Ghazali, N., Isa, M., Razak, H., et al. (2014). Induction of Oxidative Stress Following Low Dose Ionizing Radiation in ICR Mice. *World Journal of Medical Sciences*, *10*, 198-203.

Muñoz, M. (2002). *Desarrollo de Nuevos Floculantes por Polimerización en Microemulsión Inversa*. Tesis doctoral, Universidad de Alcalá de Henares, Alcalá de Henares.

Naahidi, S., Jafari, M., Edalat, F., Raymond, K., Khademhosseini, A., & Chen, P. (2013). Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, *166*, 182-194.

Narang, A.S., & Varia, S. (2011). Role of tumor vascular architecture in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *63*, 640–658.

Naumov, G.N., Akslen, L.A., & Folkman, J. (2006). Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. *Cell Cycle* *5*, 1779-1787.

Nazir, S., Hussain, T., Ayub, A., Rashid, U., & MacRobert, A. (2014). Nanomaterials in combating cancer: Therapeutic applications and developments. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *10*, 19–34.

Nkansah, M.K., Tzeng, S.Y., Holdt, A.M., & Lavik, E.B. (2008). Poly(lactic-co-glycolic acid). *Poly(lactic-co-glycolic acid) nanospheres and microspheres for short- and long-term delivery of bioactive ciliary neurotrophic factor*, 100, 1010–1019.

Oberdörster, G., Oberdörster, E., & Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives* 113(823-839).

Odell, D.D., Kent, M.S., & Fernando, H.C. (2010). Sublobar resection with brachytherapymesh for stage I non-small cell lung cancer. *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 22, 32-37.

Oh, J., Drumright, R., Siegwart, D., & Matyjaszewski, K. (2008). The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. *Progress in Polymer Science*, 33, 448–477.

Orbay, H., Ono, S., Ogawa, R., & Hyakusoku, H. (2011). A 5-year assessment of safety and aesthetic results after facial soft-tissue augmentation with polyacrylamide hydrogel (aquamid): a prospective multicenter study of 251 patients. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 128, 325-326.

Osborne, C.K., Hobbs, K., & Clark, G.M. (1985). Effect of estrogens and antiestrogens on growth of human breast cancer cells in athymic nude mice. *Cancer Research*, 45, 584-590.

Pagel, J., Hedin, N., Subbiah, K., Meyer, D., Mallet, R., Axworthy, D., et al. (2003). Comparison of anti-CD20 and anti-CD45 antibodies for conventional and pretargeted radioimmunotherapy of B-cell lymphomas. *Blood*, 101, 2340-2348.

Paku, S., & Paweletz, N. (1991). First steps of tumor-related angiogenesis, Laboratory Investigation. *A Journal of Technical Methods and Pathology*, 65, 334-346.

Palmer, T., Ashby, W., Lewis, J., & Zijlstra, A. (2011). Targeting tumor cell motility to prevent metastasis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 568–581.

Panchagnula, R. (1998). Pharmaceutical aspects of paclitaxel. *International Journal of Pharmaceutics*, 172, 1-15.

Park, J.H., Gu, L., von Maltzahn, G., Ruoslahti, E., Bhatia, S.N., & Sailor, M.J. (2009). Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for in vivo applications. *Nature Materials*, 8.

Park, K. (2012). Polysaccharide-based near-infrared fluorescence nanoprobes for cancer diagnosis. *Quant Imaging Medicine Surgery* 2, 106-113.

Peppas, N.A., & Khare, A.R. (1993). Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 11, 1-35.

Perez, E., Benito, M., Teijón, C., Olmo, R., Teijón, J.M., & Blanco, M.D. (2012). Tamoxifen-loaded nanoparticles based on a novel mixture of biodegradable polyesters: characterization and in vitro evaluation as sustained release systems. *Journal of Microencapsulation*, *29*, 309-322.

Perez, E., Fernandez, A., Olmo, R., Teijon, J.M., & Blanco, M.D. (2014). pH and glutathion-responsive hydrogel for localized delivery of paclitaxel. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, *116*, 247-256.

Perez, E., Martinez, A., Teijon, C., Teijon, J.M., & Blanco, M.D. (2014). Bioresponsive nanohydrogels based on HEAA and NIPA for poorly soluble drugs delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, *470*(1-2), 107-119.

Petros, R.A., & DeSimone, J.M. (2010). Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, *9*, 615-627.

Polgar, C., & Major, T. (2009). Current status and perspectives of brachytherapy for breast cancer. *International Journal of Clinical Oncology*, *14*, 7-24.

Puig, L.J., Sanchez-Diaz, J.C., Villacampa, M., Mendizabal, E., Puig, J.E., Aguiar, A., et al. (2001). Microstructured polyacrylamide hydrogels prepared via inverse microemulsion polymerization. *Journal of Colloid and Interface Science*, *235*, 278-282.

Qi, L., Xu, Z., & Chen, M. (2007). In vitro and in vivo suppression of hepatocellular carcinoma growth by chitosan nanoparticles. *European Journal of Cancer*, *43*, 184-193.

Radisky, D., Hagios, C., & Bissell, M.J. (2011). Tumors are unique organs defined by abnormal signaling and context. *Seminars in Cancer Biology*, *2001*, 87-95.

Raemdonck, K., Demeester, J., & Smedt, S. (2009). Advanced nanogel engineering for drug delivery. *Soft Matter*, *5*, 707-715.

Rajana, B., Sathishb, S., Balakumarb, S., & Devaki, T. (2014). Synthesis and dose interval dependent hepatotoxicity evaluation of intravenously administered polyethylene glycol-8000 coated ultra-small superparamagnetic iron oxide nanoparticle on Wistar rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *39*, 727-735.

Rao, J., & Geckeler, K. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters *Progress in Polymer Science* *36*, 887-913.

Reddy, M., & Labhassetwar, V. (2009). Nanoparticle-mediated delivery of superoxide dismutase to the brain: an effective strategy to reduce ischemia-reperfusion injury. *The FASEB Journal*, *23*, 1384-1395.

Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I., & Hoekstra, D. (2004). Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochemistry*, *159*.

Riva, G., Baronchellia, S., Paoletta, L., Butta, V., Biunob, I., Lavitrano, M., et al. (2014). In vitro anticancer drug test: A new method emerges from the model of glioma stem cells. *Toxicology Reports*, *1*, 188-199.

Sáez, V., Hernáez, E., & López, L. (2003). Liberación controlada de fármacos. Aplicaciones biomédicas. *Revista Iberoamericana de Polímeros* *4*, 111-121.

Sciubba, D.M., Petteys, R.J., Dekutoski, M.B., Fisher, C.G., Fehlings, M.G., Ondra, S.L., et al. (2010). Diagnosis and management of metastatic spine disease. *J. Neurosurgery Spine* *13* 94-108.

Seo, B., DelNero, P., & Fischbach, C. (2014). In vitro models of tumor vessels and matrix: Engineering approaches to investigate transport limitations and drug delivery in cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *69-70*, 205-216.

Sharifi, S., Bhezadi, S., Laurent, M., Forrest, S., Stroeve, P., & Mahmoudi, M. (2012). Toxicity of nanomaterials. *Chemistry Society Review*, *41*, 2323-2343.

Shen, M., & Blatz, P.J. (1968). Energy contribution to rubber elasticity. *Journal of Applied Physics*, *39*, 4937-4943.

Shim, W., Kim, J.H., Kim, K., Kim, Y.S., Park, R.W., Kim, I.S., et al. (2007). pH and temperature-sensitive, injectable, biodegradable block copolymer hydrogels as carriers for paclitaxel. *International Journal of Pharmaceutics*, *331*, 11-18.

Singh, R., & Lillard, J. (2009). Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology*, *86*, 215-223.

Singla, A., Garg, A., & Aggarwal, D. (2002). Paclitaxel and its formulations. *International Journal of Pharmaceutics* *235*, 179-192.

Song, L., Li, Y., He, B., & Gong, Y. (2015). Development of Small Molecules Targeting the Wnt Signaling Pathway in Cancer Stem Cells for the Treatment of Colorectal Cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, *14*, 133-145.

Sood, N., Nagpal, S., Nanda, S., Bhardwaj, A., & Mehta, A. (2013). An overview on stimuli responsive hydrogels as drug delivery system. *Journal of Controlled Release*.

Sparreboom, A., Telling, O.v., Nooijen, W.J., & Beijnen, J.H. (1996). Tissue distribution, metabolism and excretion of paclitaxel in mice. *Anticancer Drugs*, *7*, 78-86.

Spratlin, J., & Sawyer, M. (2007). Pharmacogenetics of paclitaxel metabolism. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *61*, 222-229.

Steichen, S., Caldorera-Moore, M., & Peppas, N.A. (2013). A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *48*, 416-427.

Steliarova-Foucher, E., O'Callaghan, M., Ferlay, J., Masuyer, E., Rosso, S., Forman, D., et al. (2015). The European Cancer Observatory: A new data resource. *European Journal of Cancer*, *51*, 1131–1143.

Stubbs, M., McSheehy, P.M., Griffiths, J.R., & Bashford, C.L. (2000). Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. *Molecular Medicine Today* *6*, 15-19.

Szymonik-Lesiuk, S., Czechowska, G., Stryjecka-Zimmer, M., Siomka, M., Madro, A., Celinski, K., et al. (2003). Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. *Journal Hepatobiliary Pancreatic Science*, *10*, 309-315.

Tiwari, D., Jin, T., & J., B. (2011). Dose-dependent in vivo toxicity assesment of silver nanoparticle in Wistar rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, *21*, 13-24.

Toita, T. (2009). Current status and perspectives of brachytherapy for cervical cancer. *International Journal of Clinical Oncology*, *14*, 25-30.

Tozuka, K., Horiguchi, J., Takata, D., Rokutanda, N., Nagaoka, R., Tokiniwa, H., et al. (2013). Collagen gel droplet-embedded culture-drug sensitivity test and Ki67 expression in estrogen receptor-positive and HER2-negative breast cancer. *Molecular Clinical Oncology*, *1*, 93-99.

Ulbrich, K., & Subr, V. (2004). Polymeric anticancer drugs with pH-controlled activation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *56*, 1023– 1050.

Ulijn, R., Bibi, N., Jayawarna, V., Thornton, P., Todd, S., Mart, R., et al. (2007). Bioresponsive hydrogels. *Material Today*, *10*, 40-48.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, *160*, 1-40.

Van Bemmelen, J.M., & (1894). Der Hydrogel und das kristallinische Hydrat des Kupferoxydes. *Z. Anorg. Chem.*, *5*, 466.

Van Sluis, R., Bhujwalla, Z.M., Raghunand, N., Ballesteros, P., Alvarez, J., Cerdan, S., et al. (1999). In vivo imaging of extracellular pH using ¹H MRSI. *Magnetic Resonance in Medicine*, *41*, 743-750.

Vasudevana, D., Gaddamb, R., Trinchic, A., & Cole, I. (2015). Core-shell quantum dots: Properties and applications. *Journal of Alloys and Compounds*, *636*, 395–404.

Vaupel, P. (2009). *Pathophysiology of Solid Tumors*. Berlin Heidelberg: Springer.

Veisheh, O., Gunn, J., & Zhang, M. (2010). Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 284–304.

Vergaro, V., Scarlino, F., Bellomo, C., Rinaldi, R., Vergara, D., Maffia, M., et al. (2011). Drug-loaded polyelectrolyte microcapsules for sustained targeting of cancer cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 847–864.

Viúdez, A., Ramírez, N., Hernández-García, I., Carvalho, F.L., Vera, R., & Hidalgo, M. (2014). Nab-paclitaxel: A flattering facelift *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 92, 166-180.

Wang, F., Shen, Y., Xu, X., Lv, L., Li, Y., Liu, J., et al. (2013). Selective tissue distribution and long circulation endowed by paclitaxel loaded PEGylated poly(e-caprolactone-co-L-lactide) micelles leading to improved anti-tumor effects and low systematic toxicity. *International Journal of Pharmaceutics* 456, 101- 112.

Wang, Y., Byrne, J.D., Napier, M.E., & DeSimone, J.M. (2012). Engineering nanomedicines using stimuli-responsive biomaterials. *Advanced drug delivery reviews*, 64, 1021-1030.

Wani, M.C., Taylor, H.L., Wall, M.E., Coggon, P., & McPhail, A.T. (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, 93, 2325-2327.

Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian, V., & Huwyler, J. (2015). Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. *Journal of Controlled Release*, 200, 138–157.

Wichterle, O., & Lim, D. (1960). Hydrophilic gels for biological use. *Nature* 185, 117-118.

Wolinsky, J., Colson, Y., & Grinstaff, M. (2012). Local drug delivery strategies for cancer treatment: Gels, nanoparticles, polymeric films, rods, and wafers. *Journal of Controlled Release*, 159, 14–26.

Wood, S., Pernemalm, M., Crosbie, P., & Whetton, A. (2015). Molecular histology of lung cancer: From targets to treatments. *Cancer Treatment Reviews*, 41, 361–375.

Xu, X., Ho, W., Zhang, X., Bertrand, N., & Farokhzad, O. (2015). Cancer nanomedicine: from targeted delivery to combination therapy. *Trends in Molecular Medicine*, 21, 223-232.

Xua, Z., Gua, W., Huang, J., Sua, H., Zhoud, Z., Yanga, Y., et al. (2005). In vitro and in vivo evaluation of actively targetable nanoparticles for paclitaxel delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, *288*, 361–368.

Yah, C., Simate, G., & Esayegbemu, S. (2012). Nanoparticles toxicity and their routes of exposures. *Journal Pharmaceutical Science*, *25*, 477-491.

Yallapu, M., Jaggi, M., & Chauhan, S. (2011). Design and engineering of nanogels for cancer treatment. *Drug Discovery Today*, *16*, 457-463.

Yang, K., Wan, J., Zhang, S., Zhang, Y., Lee, S.T., & Liu, Z. (2010). In Vivo Pharmacokinetics, Long-Term Biodistribution, and Toxicology of PEGylated Graphene in Mice. *ACS Nano*, *5*, 516-522.

Yang, Q., Jones, S.W., Parker, C.L., Zamboni, W.C., Bear, J.E., & Lai, S.K. (2014). Evading immune cell uptake and clearance requires PEG grafting at densities substantially exceeding the minimum for brush conformation. *Molecular Pharmaceutics*, *11*, 1250-1258.

Yoo, J.W., Doshi, N., & Mitragotri, S. (2011). Adaptive micro and nanoparticles: Temporal control over carrier properties to facilitate drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *63*, 1247–1256.

Zhang, C., Qu, G., Sun, Y., Wu, X., Yao, Z., Guo, Q., et al. (2008). Pharmacokinetics, biodistribution, efficacy and safety of N-octyl-O-sulfate chitosan micelles loaded with paclitaxel. *Biomaterials*, *29*, 1233-1241.

Zhang, D., Yang, R., Wang, S., & Dong, Z. (2014). Paclitaxel: new uses for an old drug. *Drug Design, Development and Therapy*, *8*, 279-284.

Zhang, X., Xu, X., Bertrand, N., Pridgen, E., Swami, A., & Farokhzad, O. (2012). Interactions of nanomaterials and biological systems: Implications to personalized nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *64*, 1363-1384.

Zhang, X.F., & Kwong-Huat, B. (2000). Antihyperglycaemic and anti-oxidant properties of *Andrographis paniculata* in normal and diabetic rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, *27*, 358-363.

Zhang, Y., Chan, H., & Leong, K. (2013). Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *65*, 104-120.

Zhao, Y., Alakhova, D., & Kabanov, A. (2013). Can nanomedicines kill cancer stem cells? *Advanced Drug Delivery Reviews*, *65*, 1763–1783.

**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Nov 01, 2015

This is a License Agreement between ELENA PÉREZ IZQUIERDO ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	ELENA PÉREZ IZQUIERDO
Customer address	MADRID, MADRID 28933
License number	3720981471165
License date	Oct 02, 2015
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	International Journal of Pharmaceutics
Licensed content title	Bioresponsive nanohydrogels based on HEAA and NIPA for poorly soluble drugs delivery
Licensed content author	Elena Pérez, Ana Martínez, César Teijón, Jose M. Teijón, M. Dolores Blanco
Licensed content date	15 August 2014
Licensed content volume number	470
Licensed content issue number	1-2
Number of pages	13
Start Page	107
End Page	119
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Intended publisher of new work	other
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Title of your thesis/dissertation	NANOHIROGELES CON RESPUESTA A ESTIMULOS DEL MICROAMBIENTE TUMORAL PARA LA VEHICULIZACION DEL PACLITAXEL

**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Nov 01, 2015

This is a License Agreement between ELENA PÉREZ IZQUIERDO ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	ELENA PÉREZ IZQUIERDO
Customer address	MADRID, MADRID 28933
License number	3720990021010
License date	Oct 02, 2015
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Colloids and Surfaces B: Biointerfaces
Licensed content title	pH and glutathion-responsive hydrogel for localized delivery of paclitaxel
Licensed content author	Elena Pérez, Ana Fernández, Rosa Olmo, Jose M. Tejjón, M. Dolores Blanco
Licensed content date	1 April 2014
Licensed content volume number	116
Licensed content issue number	n/a
Number of pages	10
Start Page	247
End Page	256
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Intended publisher of new work	other
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Title of your thesis/dissertation	NANOHIROGELES CON RESPUESTA A ESTIMULOS DEL MICROAMBIENTE TUMORAL PARA LA VEHICULIZACION DEL PACLITAXEL

**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Nov 01, 2015

This is a License Agreement between ELENA PÉREZ IZQUIERDO ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	ELENA PÉREZ IZQUIERDO
Customer address	MADRID, MADRID 28933
License number	3720990110860
License date	Oct 02, 2015
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Colloids and Surfaces B: Biointerfaces
Licensed content title	Biocompatibility evaluation of pH and glutathione-responsive nanohydrogels after intravenous administration
Licensed content author	Elena Pérez, Rosa Olmo, César Teijón, Enriqueta Muñiz, Nuria Montero, Jose. M. Teijón, M. Dolores Blanco
Licensed content date	1 December 2015
Licensed content volume number	136
Licensed content issue number	n/a
Number of pages	10
Start Page	222
End Page	231
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Intended publisher of new work	other
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Title of your thesis/dissertation	NANOHIROGELES CON RESPUESTA A ESTIMULOS DEL MICROAMBIENTE TUMORAL PARA LA VEHICULIZACION DEL PACLITAXEL

**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Nov 01, 2015

This is a License Agreement between ELENA PÉREZ IZQUIERDO ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	ELENA PÉREZ IZQUIERDO
Customer address	SALVADOR DALI Nº4 MADRID, MADRID 28933
License number	3720981360526
License date	Oct 02, 2015
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	International Journal of Pharmaceutics
Licensed content title	Improved antitumor effect of paclitaxel administered in vivo as pH and glutathione-sensitive nanohydrogels
Licensed content author	Elena Pérez, Ana Martínez, César Teijón, Rosa Olmo, José María Teijón, María Dolores Blanco
Licensed content date	15 August 2015
Licensed content volume number	492
Licensed content issue number	1-2
Number of pages	10
Start Page	10
End Page	19
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Intended publisher of new work	other
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Title of your thesis/dissertation	NANOHIDROGELES CON RESPUESTA A ESTIMULOS DEL MICROAMBIENTE TUMORAL PARA LA VEHICULIZACIÓN DEL PACLITAXEL

