



EMPLEO DE NANOPARTÍCULAS EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

YOLANDA BEATO SÁNCHEZ

TUTORA: ELIA MARÍA GRUESO MOLINA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
TRABAJO FIN DE GRADO
GRADO EN FARMACIA

EMPLEO DE NANOPARTÍCULAS EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

Yolanda Beato Sánchez

Curso 2020/2021

Departamento de Química Física

Tutora: Elia María Grueso Molina

Revisión Bibliográfica

RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Los tratamientos actuales son muy invasivos y no selectivos, por lo que no sólo afectan a las células cancerígenas, sino también a las células sanas de nuestro organismo. Esto produce numerosos efectos secundarios, los cuales, llegan a suponer para algunos pacientes, el abandono de la terapia. Una de las principales razones de fracaso en los tratamientos, se produce cuando los tumores se vuelven resistentes a los fármacos antineoplásicos. Estas multirresistencias se van a generar a partir de diferentes mecanismos, que se detallan en el presente trabajo.

Con el desarrollo de la nanotecnología, surge una nueva oportunidad para mejorar y crear nuevos tratamientos contra el cáncer. Para ello, se emplea el uso de nanopartícula. Estas presentan la ventaja de poder ser dirigidas hacia el tumor de manera más selectiva; esto es a través de dos tipos de direccionamiento: pasivo y activo.

Existen 8 tipos de medicamentos basados en nanopartículas orgánicas aprobadas para tratar el cáncer, entre ellas, los liposomas fueron los primeros nanomedicamentos que se aprobaron, destacando especialmente la formulación Doxil.

Actualmente no se ha aprobado ningún tipo de nanopartícula inorgánica para tratar al cáncer. No obstante, las nanopartículas de oro, destacan especialmente debido a sus excelentes propiedades fisicoquímicas y ópticas, así como su alta biocompatibilidad y baja toxicidad. De hecho, muy probablemente permitirán en un futuro próximo mejorar la capacidad tanto de diagnóstico como de tratamiento del cáncer.

Palabras clave: nanopartículas, cáncer, propiedades fisicoquímicas, liposomas, efecto fototérmico.

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN.....	4
1.1.- EL CÁNCER.....	4
1.2.- NANOMEDICINA Y NANOSISTEMAS.....	5
1.3.- LAS NANOPARTÍCULAS.....	6
1.4.- EL CÁNCER Y LAS NANOPARTÍCULAS.....	10
2.OBJETIVOS.....	13
3.METODOLOGÍA.....	13
4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
4.1.- TRATAMIENTOS ACTUALES DEL CÁNCER.....	14
4.2.- LA MULTIRRESISTENCIA SOBRE FÁRMACOS QUIMIOTERAPÉUTICOS.....	15
4.3.- NANOPARTÍCULAS ORGÁNICAS: LIPOSOMAS.....	19
4.3.1.- DEFINICIÓN Y GENERALIDADES.....	19
4.3.2.- LIPOSOMAS EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER.....	22
4.4.- NANOPARTÍCULAS INORGÁNICAS: NANOPARTÍCULAS DE ORO.....	26
4.4.1.- RESONANCIA DE PLASMÓN DE SUPERFICIE LOCALIZADA (LSPR).....	28
4.4.2.- ESPECTROSCOPIA DE RAMAN DE SUPERFICIE MEJORADA (SERS).....	31
4.4.3.- EFECTO FOTOTÉRMICO.....	33
5.CONCLUSIONES.....	36
6.BIBLIOGRAFÍA.....	37

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- **AgNPs:** Nanopartículas de plata
- **AuNPs:** Nanopartículas de oro
- **AuNR:** Nanorods
- **AuNS:** Nanocapas de sílice-oro
- **CTC:** Células tumorales circulantes
- **EGFR:** Receptor del factor de crecimiento epidérmico
- **EMA:** Agencia Europea de Medicamentos
- **EPR:** Efecto de permeabilidad y retención
- **FDA:** Asociación de Drogas y Alimentos de Estados Unidos
- **GSH:** Conjugación con glutatión
- **GST:** Glutatión S-transferasa
- **LSPR:** Resonancia de plasmón de superficie localizada
- **MDR:** Resistencia a múltiples fármacos
- **MPS:** Sistema fagocítico mononuclear
- **Mrp:** multidrug resistance-associated protein
- **NIR:** Región de infrarrojo
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **PEG:** Polietilenglicol
- **Pgp:** P-glicoproteína
- **PTT:** Terapia fototérmica
- **RES:** Sistema reticuloendotelial
- **SERS:** Espectroscopía de Raman de superficie localizada

1. INTRODUCCIÓN

1.1.-EL CÁNCER

El cáncer es un término que se utiliza para referirse a un conjunto de enfermedades que pueden afectar a cualquier zona del organismo, estas se caracterizan por un crecimiento celular descontrolado debido a la rápida multiplicación de células anormales que llegan a formar masas denominadas tumores. Estos tumores pueden diseminarse a otros sitios, invadiendo así a órganos y tejidos a través del sistema sanguíneo o linfático (Instituto Nacional del Cáncer, 2020). Este proceso de diseminación se denomina metástasis y es el causante mayoritario de las muertes sobrevenidas a consecuencia del cáncer.

Actualmente el cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2020). En 2015, por ejemplo, se registraron 8,8 millones defunciones. Esto implica, que en 2015 una de cada seis muertes registradas fueron causadas por el cáncer. Los cánceres que provocan mayor número de defunciones son el cáncer pulmonar, cáncer hepático, cáncer colorrectal, cáncer gástrico y cáncer mamario. Para reducir el número de casos por cáncer hay que evitar o disminuir en la medida de lo posible los factores de riesgo y aplicar estrategias para la detección precoz de la enfermedad (OMS,2020).

Algunos de los factores de riesgo más comunes son el tabaco, la obesidad, el consumo de alcohol, la inactividad física, la mala alimentación, la contaminación del aire, las radiaciones ionizantes y ultravioleta, infecciones genitales por papilomavirus humanos, infecciones por virus de la hepatitis y el envejecimiento (OMS,2020).

Como datos importantes procedentes de la Organización Mundial de la Salud (OMS,2020), dos de estos factores son posibles de evitar. Por un lado, con la vacunación de los papilomavirus humanos y de la hepatitis B se conseguirían prevenir 1 millón de casos al año. Por otra parte, eliminando el consumo del tabaco podría evitarse alrededor del 22% de muertes registradas. No obstante, el único factor imposible de evitar es el envejecimiento. Este forma parte de los principales causantes para la aparición de esta enfermedad debido a la pérdida de eficacia de los mecanismos de defensa en la reparación celular (OMS,2020).

La aplicación de nuevas estrategias para detectar el cáncer de manera precoz, reduciría de manera significativa el número de muertes, ya que los tratamientos tienden a ser muy pocos efectivos en las fases avanzadas del cáncer. Entre los problemas más frecuentes relacionados con la efectividad de los tratamientos contra el cáncer destaca la detección tardía de la enfermedad. Por ello, un diagnóstico precoz es de gran importancia para aumentar las

probabilidades de supervivencia, ya que esto último no sólo aumenta la eficacia del tratamiento, sino que también reduce la morbilidad de la población y el coste económico (Lollo et al., 2011).

Por otro lado, el tratamiento a emplear depende del tipo de cáncer y del estadio de la enfermedad. Estos tratamientos suelen abarcar distintas modalidades como son la radioterapia, quimioterapia o cirugía (OMS,2020). Estas son las terapias que se utilizan en mayor medida para combatir al cáncer siendo muy invasivas y provocando efectos desagradables a los pacientes. Existen numerosos impedimentos en este tipo de terapia como son: dificultad en la distribución de los fármacos antitumorales en el organismo, concentración insuficiente en la zona del tumor y desarrollo de resistencia de las células cancerígenas a la quimioterapia (Lollo et al., 2011).

En el campo de la medicina, se ha ido desarrollando una nueva estrategia terapéutica para combatir el cáncer: se trata de la asociación de fármacos antitumorales con nanopartículas. Esta novedosa estrategia está dirigida a mejorar la eficacia del tratamiento oncológico superando los mecanismos de resistencia y aumentando la selectividad hacia las células tumorales. Todo ello contribuirá a disminuir los efectos adversos y secundarios, así como la toxicidad en las células normales (Brigger et al., 2012).

1.2.-NANOMEDECINA Y NANOSISTEMAS

La nanotecnología es una ciencia multidisciplinar que se basa en el estudio, diseño, síntesis y aplicación de los materiales y sistemas funcionales mediante el control de la materia a nivel de la nanoescala. Una de las áreas más relevantes que surge a partir de la nanotecnología es la nanomedicina, la cual se encarga del diagnóstico, prevención y tratamiento de diferentes enfermedades con el diseño y síntesis de nuevos nanosistemas. Estos nanosistemas han provocado una revolución en las terapias convencionales y sobre todo en aquellas encaminadas a tratar el cáncer (Rojas-Aguirre et al., 2016).

La nanomedicina abarca 3 áreas que son las siguientes: a) *Liberación de fármacos e ingeniería de tejidos*, se dedica a la aplicación y desarrollo de sistemas contruidos por biomateriales nanoestructurados que se basan en que el transporte de fármacos o en conjunto con la biología celular, se emplean en la reparación o remplazo de tejidos u órganos dañados; b) *Diagnostico*, en esta área se emplean nanosistemas de imagen o nanobiosensores que tienen la capacidad de identificar una enfermedad. Esto se consigue con un componente biológico de alta sensibilidad capaz de detectar un analito determinado; c) *Terapia y diagnóstico*, en esta sección se utilizan nanomateriales capaces de identificar una patología determinada y se emplean moléculas terapéuticas para tratarla de forma controlada (Rojas-Aguirre et al., 2016).

Según los diversos materiales empleados para la síntesis de los nanosistemas y las diferentes tecnologías implementadas para ello, se distinguen dos grupos de nanopartículas (Figura 1):

-*Nanopartículas orgánicas*: dentro de este grupo se localizan las nanoesferas, nanocápsulas, micelas, liposomas, dendrímeros y conjugados polímero-fármaco que se forman con materiales poliméricos (Rojas-Aguirre et al., 2016).

-*Nanopartículas inorgánicas*: dentro de este grupo se encuentran las nanopartículas de oro, las nanopartículas de óxidos metálicos, nanopartículas de sílice mesoporosa y nanotubos de carbono (Rojas-Aguirre et al., 2016).

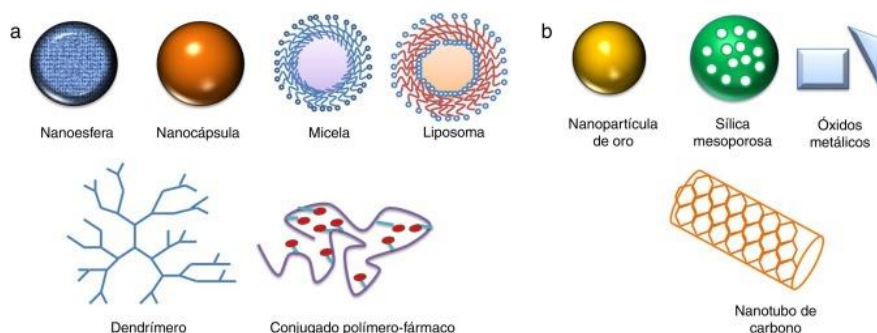


Figura 1.-Se representa a las nanopartículas orgánicas y b) nanopartículas inorgánicas. (Rojas-Aguirre et al., 2016)

1.3.-LAS NANOPARTÍCULAS

Las nanopartículas se consideran, de manera general según la IUPAC, como partículas de cualquier forma con dimensiones que se hallen en el rango de entre 1 a 100 nm, pero no existe argumento específico que indique que el tamaño de 100 nm separe a las nanopartículas de no nanopartículas; por lo que realmente no se basa en un tamaño particular sino también en las propiedades novedosas que pueden aportar (Lee et al., 2015). Otra manera en la que se pueden definir es como sistemas coloidales menores de 1 μ m, es decir como sistemas submicrónicos, que pueden estar formados por polímeros biodegradables o no. Esta última característica no es excluyente, aunque la existencia de polímeros en su formulación es bastante habitual (Brigger et al., 2012).

De acuerdo con las características y propiedades fisicoquímicas beneficiosas que presentan en su mayoría las nanopartículas como transportadores de fármacos, su administración persigue conseguir los siguientes objetivos: a) *Ayudar a mejorar la estabilidad de los principios activos que se encuentran encapsulados*; b) *Mejorar la biodisponibilidad favoreciendo el aumento de la absorción*; c) *Controlar de manera adecuada la concentración de principios activos en sangre utilizando sistemas de liberación controlada*; d) *Alcanzar el interior de células o tejidos con*

principios activos convencionales; e) Disminuir los efectos secundarios y los niveles tóxicos que provoca el fármaco libre, y f) Proteger a la molécula de la actividad enzimática, inmunológica o química para evitar su destrucción antes de llegar al sitio de interés (Gomez-Gaete, 2014).

1.3.1.-CARACTERÍSTICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS

-TAMAÑO. La internalización/eliminación de las nanopartículas como fármaco dentro del organismo es fuertemente dependiente del tamaño. Así, se ha comprobado que partículas esféricas con un tamaño menor a 5 nm son fácilmente eliminadas de la circulación por extravasación o por el aclaramiento renal. Por otra parte, desde ese rango hasta los 15 μm se produce el almacenamiento de la mayoría de las partículas en diferentes zonas, principalmente en hígado, bazo y médula ósea. Posteriormente estas son eliminadas de la circulación por las células del sistema reticuloendotelial (RES), donde también intervienen las células Kupffer del hígado ejerciendo un papel fundamental para la eliminación de las nanopartículas (Petros y Desimone, 2010). En definitiva, las nanopartículas deben poseer unas características determinadas de tamaño y estado de agregación para lograr que el tratamiento sea efectivo: por un lado, deben ser lo suficientemente grandes como para ser capaces de evitar su rápida eliminación a través de los capilares sanguíneos; y por otro, lo suficientemente pequeño como para no ser capturadas por los macrófagos del RES (Cho et al., 2008).

-PROPIEDADES SUPERFICIALES. Además del tamaño, las propiedades superficiales de las nanopartículas también son claves para su distribución por el organismo. Así, su hidrofobicidad va a determinar la adherencia de distintas proteínas a su superficie interviniendo en la circulación in vivo de estas (Oropesa y Jáuregui, 2012). El proceso de adsorción de estas proteínas llamadas opsoninas a la superficie de las nanopartículas se denomina opsonización y ocurre en el momento en el que las nanopartículas entran en contacto con el plasma, este proceso va a ocasionar su acumulación en las células del RES (Petros y Desimone, 2010). Por ello, se han propuesto algunas técnicas para evitar los efectos negativos de la opsonización y conseguir prolongar el tiempo de circulación in vivo de las nanopartículas para que puedan alcanzar su lugar específico y desempeñar su función. Esto último, se puede conseguir aumentando la hidrofilia de la superficie mediante la técnica de recubrimiento con polímeros hidrofílicos, tensioactivos o con polímeros biodegradables que contengan propiedades hidrofílicas. Un ejemplo de ello es el polietilenglicol (PEG), el óxido de polietileno y el Tween 80. La utilidad de estas cadenas de polímeros es que aportan resistencias a la adsorción de las opsoninas (Oropesa y Jáuregui, 2012; Petros y Desimone, 2010).

Por otra parte, dentro de las propiedades superficiales de los nanosistemas destaca la medida de la carga superficial por la técnica de potencial zeta. Esta propiedad además de servir para medir el tipo de carga del sistema, es clave para determinar la estabilidad del nanosistema en disolución. Así, si el potencial fluctúa por encima de ± 30 mV se puede confirmar que estas nanopartículas son estables en suspensión (Oropesa y Jáuregui, 2012). Además, su medida sirve para esclarecer si el material cargado se encuentra encapsulado o libre en disolución. El potencial eléctrico de estas partículas va a depender de su composición y del medio en el que se encuentre dispersado. Adicionalmente, la carga superficial está relacionada con el tiempo de permanencia de los nanomedicamentos en el organismo. Así, por ejemplo, las nanopartículas neutras o aniónicas evitan la adhesión de las opsoninas y de otras células sanguíneas a la superficie de las mismas. De esta forma, se podría prolongar el tiempo de circulación evitando ser eliminadas por el sistema fagocítico mononuclear (MPS) (Lollo et al., 2011).

1.3.2.-GENERACIONES DE NANOPARTÍCULAS. Dependiendo de las modificaciones realizadas en la superficie de las nanopartículas se distinguen tres tipos de generaciones, las cuales se han ido desarrollando con el tiempo. Las primeras que se emplearon son los liposomas y se incluyen en la primera generación; debido a su gran superficie, estos una vez administrados por vía intravenosa producen interacciones con las opsoninas, las cuales se fijan a su superficie mediadas por interacciones hidrófobas. Una actividad semejante, se registró en nanopartículas producidas con polímeros hidrófobos administradas por vía endovenosa. De esta forma, se detectó una alta adsorción de inmunoglobulinas y otras proteínas plasmáticas que provocaban la captura por los fagocitos mononucleares del hígado y del bazo. Por todo ello, esta primera generación se empleó para conseguir que distintos fármacos llegaran a la zona del hígado para abordar distintas patologías a este nivel, en concreto para tratar la metástasis hepática (Gomez-Gaete, 2014).

No obstante, para conseguir que las nanopartículas administradas sigan circulando a través de los vasos sanguíneos, es necesario que la superficie sea recubierta por polímeros hidrófilos. Estas nanopartículas recubiertas con polímeros hidrófilos son las de segunda generación. De esta forma, se impide que las opsoninas se adhieran a nivel superficial y se evita así su captura a nivel del hígado alcanzándose otras dianas farmacológicas. Estos polímeros no son reconocibles por las células Kupffer, por lo que el nanosistema prolonga su tiempo de circulación, alcanzando su objetivo. En el caso de presencia tumoral, o acción inflamatoria, se produce un aumento de la permeabilidad del endotelio, esto permite que este tipo de nanopartículas puedan atravesarlo consiguiendo así, utilidad a este nivel (Gomez-Gaete, 2014 Petros y Desimone,2010).

Por último, las nanopartículas de tercera generación contienen en su superficie ligandos (ácido fólico, biotina, etc.) que tienen como función la capacidad de dirigirse a sitios específicos. De esta forma se reconocen los diferentes receptores celulares. Un ejemplo de ello son los receptores tumorales que se encuentran sobreexpresados. Este tipo de generación de nanopartículas también deben de tener incorporada una capa de polímero hidrófilo para que los macrófagos del hígado no puedan reconocerlas. Una vez que se logra llegar a la célula y se fija a ella, se produce la liberación del fármaco, llevándose a cabo el proceso de internalización (Gomez-Gaete, 2014).

Cuando el objetivo farmacológico se encuentra a nivel intracelular es necesario que el agente terapéutico atraviese la membrana celular a través del proceso de internalización. La nanotecnología brinda la posibilidad de liberar diferentes tipos de moléculas, incluidas las proteínas y los ácidos nucleicos, al interior celular. La actividad farmacológica de las nanopartículas a este nivel dependerá de la capacidad de penetración celular y de la liberación del fármaco hacia el citoplasma, y todo ello se ve condicionado por sus características fisicoquímicas. Además, se conoce que el tamaño de las nanopartículas condiciona el tipo de mecanismos de internalización a nivel celular, entre los que distinguimos: *la fagocitosis, endocitosis mediada por caveolas, endocitosis mediada por clatrina y macropinocitosis* (Gomez-Gaete, 2014).

Cuando se trata de partículas con superficie hidrófoba y de gran tamaño (0.25 - 3.00 μm), la internalización es realizada por *fagocitosis*, en la cual intervienen los macrófagos. En el interior del macrófago, el fagolisosoma debido a la bomba de protones vacuolar se acidifica y adquiere distintas enzimas entre las que se destacan esterasas y catepsinas; todo ello permite que la nanopartícula se degrade sin generar toxicidad (Figura 2-a). Por otro lado, las partículas con tamaño mayor a 1 μm utilizan el mecanismo por *macropinocitosis*, el cual se caracteriza por crear proyecciones membranales que se sostienen a través de una red con filamentos de actina; forman grandes vesículas denominadas macropinosomas que se acidifican y se degradan (Figura 2-b). Por otra parte, las partículas con tamaño nanométrico se pueden internalizar de diversas maneras, entre ellas: i) *la endocitosis mediada por caveolas*, según la cual las partículas con un tamaño aproximado de 60 nm ingresan a través de invaginaciones por la membrana formando vesículas que ingresan al citosol. Al no existir actividad enzimática podría utilizarse para que las nanopartículas encapsulen a moléculas sensibles a las enzimas, como son los ácidos nucleicos o los péptidos (Figura 2-c); ii) *la endocitosis mediada por clatrina*, en este caso la endocitosis es mediada a través de receptores. Las nanopartículas, de aproximadamente unos 120 nm, contienen en su superficie ligandos específicos. Estos ligandos permiten que las nanopartículas

se unan al receptor, formándose así, la invaginación de la vesícula. La vesícula ofrece su contenido a los endosomas, los cuales se acidifican y generan un ambiente desfavorable provocando la degradación de la carga interna (Figura 2-d). (Gomez-Gaete,2014; Petros y Desimone,2010).

Por último, puede mencionarse otro tipo de mecanismo de internalización denominado *endocitosis independiente de clatrina e independiente de caveolinas*. Este tipo es característico de partículas de un tamaño de unos 90 nm (véase Figura 2-e) (Petros y Desimone,2010).

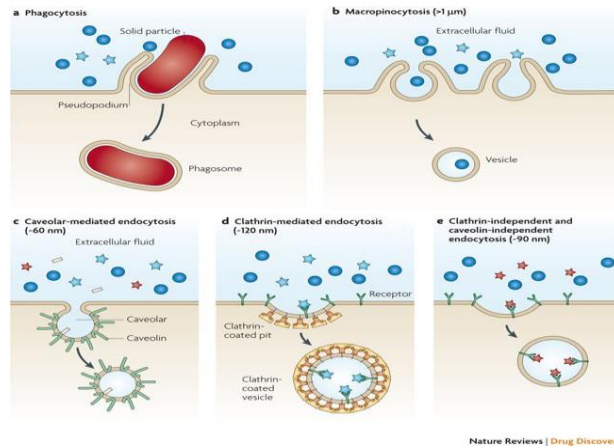


Figura 2.-Se muestran los distintos mecanismos de internalización a) fagocitosis, b) macropinocitosis, c) endocitosis mediada por caveolas, d) endocitosis mediada por clatrina y e) endocitosis independiente de clatrina e independiente de caveolinas (Petros y Desimone, 2010)

1.4.-EL CÁNCER Y LAS NANOPARTÍCULAS

En nuestro organismo existen varios mecanismos reguladores para controlar el mantenimiento y proliferación de las células normales, cuando estos se dañan se generan las células tumorales. Las nanopartículas, para conseguir llegar a las células tumorales y poder tratar el cáncer emplean dos tipos de direccionamiento: el direccionamiento pasivo y el direccionamiento activo (Martínez-Carmona et al., 2015).

1.4.1.-DIRECCIONAMIENTO PASIVO. Las células tumorales requieren una gran cantidad de nutrientes y oxígeno para su rápido crecimiento por lo que se genera la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los capilares, a este proceso se le denomina *angiogénesis*. La *angiogénesis* se origina de manera desequilibrada y muy rápida, tanto así que los vasos sanguíneos se forman de manera irregular. Estos vasos van a presentar un epitelio discontinuo y con fenestras de tamaño entre 200 - 2000 nm; (Martínez-Carmona et al., 2015) se produce el llamado efecto de permeabilidad y retención (EPR). Estas irregularidades, que se producen en

el endotelio de los capilares del tumor, van a permitir que las nanoestructuras puedan pasar por ahí fácilmente. Además, debido a que el drenaje linfático en los tumores es deficiente, las nanopartículas se acumulan al nivel del tejido tumoral (Lollo et al., 2011).

1.4.2.-DIRECCIONAMIENTO ACTIVO. En el direccionamiento activo, la nanopartícula con el fármaco va a llegar a un sitio en concreto, evitando el RES (Aftab et al., 2018). Las células tumorales, tal como se comentó anteriormente, necesitan un gran aporte de nutrientes para su crecimiento, para lograrlo tienen que llevar a cabo la sobreexpresión de diferentes tipos de receptores en su superficie. Este tipo de direccionamiento se basa en modificar la superficie de las nanoestructuras con distintos tipos de ligandos que sean específicos de estos receptores sobreexpresados, estos receptores se pueden encontrar tanto en las células cancerosas como en los vasos sanguíneos que irrigan el tejido tumoral (Martínez-Carmona et al., 2015).

Los receptores de membranas sobreexpresados más habituales en las células tumorales son:

-Receptor de ácido fólico: el ácido fólico es uno de los ligandos más estudiados, es el sustrato principal del receptor folato que es el que se encuentra sobreexpresado en el tejido tumoral de 100 a 300 veces más de lo normal. Quimioterapéuticos como el paclitaxel, docetaxel, doxorubicina y 5-FU, entre otros, han sido encapsulados en las nanopartículas empleando este ligando demostrando la mejoría sobre las células cancerosas con respecto a las mismas sin emplear al ligando.

-Receptor de transferrina: la transferrina se trata de una glicoproteína de membrana que con su receptor va a favorecer la absorción de hierro en la célula. En las células tumorales están sobreexpresados unas 100 veces más que en la normalidad y se encuentran en distintos cánceres como el de mama y el de próstata. El empleo de nanopartículas con paclitaxel “adornadas” con este ligando han demostrado una inhibición significativa del crecimiento tumoral.

-Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR): se trata de un receptor de tirosina quinasa que se encuentran en los tumores epiteliales altamente sobreexpresados. El empleo de las nanopartículas con EGF es una buena opción para llegar a este tipo de receptor y tratar el cáncer.

-Antígenos: los antígenos sobreexpresados que se encuentran en la superficie de las células tumorales son una diana específica para emplear una terapia contra el cáncer, que se basa en el empleo de nanopartículas con anticuerpos.

Los receptores sobreexpresados en la vasculatura tumoral son:

-Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFER): se encuentran sobreexpresados en la angiogénesis. Se emplean las nanopartículas junto con la proteína VEGF para dirigirse a los vasos sanguíneos del tumor.

-Metaloproteinasas de matriz: son enzimas necesarias para restaurar la matriz extracelular y degradan a todo tipo de proteínas que se encuentren en ella. Como se encuentran sobreexpresadas se van a utilizar como señal para emplear nanopartículas con anticuerpos capaces de reconocer a metaloproteinasas de tipo 1.

- $\alpha\beta$ integrinas: este tipo de receptor se encuentra sobreexpresado en la neovascularización del tejido tumoral y son poco frecuentes encontrarlos en células sanas. El péptido RGD (Arg-Gly-Asp) reconoce a este tipo de receptor y se ha empleado en un estudio in vivo con ratones junto a nanopartículas con paclitaxel para tratar el cáncer de mama, observándose una actividad apoptótica de las células tumorales, sin producir el efecto sistémico de las terapias convencionales (Gomez-Gaete, 2014; Martínez-Carmona et al., 2015).

Este tipo de estrategia se complementa con el direccionamiento pasivo para aportar mayor efectividad a la terapia contra el cáncer, disminuyendo así los efectos no deseados en comparación con las demás terapias convencionales (Cerqueira et al., 2015).

Es importante destacar que, a pesar de los avances conseguidos hasta la fecha en relación al uso de la nanotecnología contra el cáncer, actualmente existen sólo 8 nanopartículas comercializadas que están aprobadas por la Asociación de Drogas y Alimentos de Estado Unidos (FDA) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) para el tratamiento contra el cáncer (Cerqueira et al., 2015).

En general, se destaca hasta la fecha el empleo de nanopartículas orgánicas, como son: los liposomas, las nanopartículas poliméricas y las micelas. No obstante, aunque aún no existan nanopartículas inorgánicas en el mercado, hay múltiples estudios que apuntan a que dichos nanosistemas constituirán vectores muy prometedores y seguros en un futuro próximo (Wicki et al., 2015).

2. OBJETIVOS

En este trabajo se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica de las nanopartículas debido a su gran importancia actual y a los beneficios que pueden aportar en el tratamiento del cáncer, llegando a ser una alternativa real a los tratamientos actuales. Este estudio persigue lograr varios objetivos:

-Proporcionar una versión global de las nanopartículas y sus características fisicoquímicas y estructurales más importantes, así como el motivo por el cual son tan interesantes en el mundo de la biomedicina para tratar al cáncer.

-Estudiar los mecanismos fundamentales por los que aparecen las multirresistencias a los tratamientos actuales.

-Conocer a los nanomedicamentos que están aprobados y que se emplean para tratar diversos tipos de cáncer.

-Estudiar específicamente las propiedades de las nanopartículas de oro en relación con su empleo en la terapia contra el cáncer.

3. METODOLOGÍA

Para la realización de este trabajo, de carácter bibliográfico, se han llevado a cabo búsquedas bibliográficas de artículos científicos a través de distintas bases de datos como son: Web of Science, ScienceDirect, Elsevier, MDPI y Google académico. Las palabras claves que se emplearon en la búsqueda fueron escritas tanto en inglés como en español dependiendo de la base de datos que se estuviera consultando, entre ellas encontramos: “Nanopartículas” o “nanoparticles”, “nanomedicina” o “nanomedicine”, “nanotecnología o nanotechnology”, “cáncer o cancer”, “gold nanoparticles” o “nanopartículas de oro”, “liposomas o liposomes”, “aplicaciones de las nanopartículas” o “applications of nanoparticles”, estos términos se emplearon solos y de forma conjunta con los demás en la misma zona de búsqueda, por ejemplo: Nanoparticle and cancer, nanomedicina y cancer, etc.

Como criterios de selección se escogieron artículos publicados en los últimos 20 años, con el objetivo de exponer una información actualizada. Además, se han priorizado los artículos de revisión bibliográfica frente a los de investigación. Fueron seleccionados tanto artículos en inglés como en español que tuvieran libre acceso, o en su caso dicho acceso se consiguió a través de la Biblioteca de la Universidad de Sevilla. Además de la búsqueda de artículos científicos, también se incluyeron referencias procedentes del Instituto Nacional del Cáncer y de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

4. RESULTADO Y DISCUSIÓN

4.1.-TRATAMIENTOS ACTUALES DEL CÁNCER

El cáncer es tratado comúnmente con técnicas como la quimioterapia, radioterapia y la cirugía.

- *Quimioterapia*: es uno de los métodos más empleados en el tratamiento del cáncer. En él se utilizan diferentes tipos de medicamentos, destacando a los medicamentos

citotóxicos. Se administran antes de la cirugía con el fin de disminuir el tamaño del tumor, o después de esta, para evitar que se origine la metástasis. Los fármacos citotóxicos no son selectivos, por lo que dañan a las células cancerígenas y a su vez a las células sanas. Se administran a la dosis máxima tolerada (MTD), lo cual genera una alta toxicidad en el organismo que se manifiesta con efectos secundarios como mielosupresión, náuseas, vómitos y alopecia, entre otros. Además, se ha demostrado que la quimioterapia citotóxica causa daños permanentes en las células cardíacas, los riñones y el cerebro. En particular, en el 40% de los pacientes tratados para el cáncer de mama con doxorubicina y ciclofosfamida, se observaron deficiencias neurocognitivas entre las que pueden destacarse: problemas de aprendizaje, memoria y atención. Un problema añadido a este tipo de tratamiento es el fenómeno de resistencia a fármacos citotóxicos. Esto sucede en cuando los tumores empiezan a desarrollar resistencias contra la efectividad de los fármacos citotóxicos, es lo que se denomina, resistencia a múltiples fármacos (MDR) (Cerqueira et al., 2015).

- *Radioterapia:* Este método se emplea en combinación con la quimioterapia en el 60% de los cánceres. La radioterapia tiene como objetivo dañar al ADN de las células malignas. El daño es ocasionado por radiaciones ionizantes que inducen la apoptosis de las células, dando como resultado la reducción del tamaño del tumor.

Un estudio ha demostrado que alrededor del 57% de pacientes tratados con radioterapia pélvica, después de 6-11 años, sufrieron problemas moderados y graves en el funcionamiento del sistema urinario, intestinal y sexual; todo ello provocó en los pacientes una baja calidad de vida con trastornos psicológicos. Otro de los casos donde se han constatado efectos graves a largo plazo, es el de los pacientes tratados de cáncer rectal. Estos sufrieron problemas de la función anorrectal, especialmente provocando incontinencia fecal, disminuyendo consecuentemente la calidad de vida. El fracaso de la radioterapia se origina cuando aparecen efectos graves en el tejido normal. Por este motivo se tiene que disminuir la dosis, que conlleva en la mayoría de los casos a un mal pronóstico (Cerqueira et al., 2015).

- *Cirugía:* Este método es la base del tratamiento del cáncer. La técnica se basa en intentar extirpar el 100% de las células tumorales. No obstante, la cirugía no siempre está recomendada, esto va a depender del tipo de cáncer, su ubicación y el estadio en el que se encuentre. Especialmente, en el tratamiento del cáncer de mama (mastectomías, tumorectomía), cáncer de ovario, cáncer intestinal y en el cáncer de pulmón (neumonectomía, lobectomía), esta técnica es bastante común teniendo altos niveles de éxito. En cambio, su utilización trae consigo en la mayoría de los casos trastornos

psicológicos y un empeoramiento en la calidad de vida. Por ejemplo, se ha demostrado que el 25% de las mujeres que se habían sometido a una mastectomía sufrieron dolores crónicos y depresión (Cerqueira et al., 2015).

4.2.- LA MULTIRRESISTENCIA SOBRE FÁRMACOS QUIMIOTERAPÉUTICOS

Para desarrollar tratamientos efectivos contra el cáncer, es importante conocer y entender los mecanismos moleculares que provocan la multirresistencia.

Como se mencionó anteriormente, en el empleo de la quimioterapia, a veces los tumores desarrollan resistencias a los distintos tipos de fármacos citotóxicos. MDR, se define como la capacidad que tiene un tumor para evadirse de fármacos quimioterapéuticos con diferentes estructuras y mecanismos de acción. Se origina a causa de alteraciones, que dan lugar a la disminución de la captación del fármaco, mejoría en las bombas de salida que expulsan al fármaco, o producen cambios en la integridad de la membrana. Todo ello, conduce a una disminución en la concentración de estos fármacos en las células cancerígenas (Cerqueira et al., 2015).

Estas alteraciones provocan: *i) cambios en el ciclo celular y en los puntos de control, ii) bloqueo de la apoptosis, iii) bloqueo de mecanismos encargados en la reparación del ADN, o iv) un conjunto de todos ellos* (Cerqueira et al., 2015).

En general, la célula tumoral desarrolla mecanismos contra la quimioterapia, que se pueden dividir en 3 grupos, fundamentalmente: (i) aquellos que provocan que la concentración del fármaco en la diana molecular sea mínima, (ii) mecanismos que conllevan modificaciones en la diana molecular, y finalmente, (iii) aquellos que se activan una vez que llega el fármaco a la diana, evitando la muerte celular (Paredes et al., 2006). Estos mecanismos se detallan a continuación:

-(i) Mínima concentración de fármaco en la diana molecular. Se trata del mecanismo más común observado que reduce la efectividad de los fármacos quimioterápicos. La reducción en la acumulación intracelular de los fármacos, se puede deber a la expulsión del fármaco a través de la membrana celular, a alteraciones en el transporte entre núcleo y citoplasma, a cambios en el metabolismo intracelular del fármaco o a la retención del fármaco en las vesículas citoplasmáticas (Paredes et al., 2006).

- *Expulsión a través de la membrana celular:* Posiblemente, este sea el mecanismo más estudiado, y básicamente, tiene relación con la acción de determinadas proteínas transportadoras. En concreto se distinguen 3, Pgp (P-glucoproteína), Mrp (multidrug

resistance-associated protein) y Brcp (breast cancer resistance protein). Estas proteínas pertenecen a una familia de transportadores conocidos, como son los transportadores ABC (ATP-binding cassette), implicados en el transporte activo. Se ha demostrado que los transportadores ABC se unen a fármacos hidrófobos como la doxorubicina, el taxol, o la vincristina cuando se introducen en la membrana plasmática, expulsándolos así al espacio extracelular (Cerqueira et al., 2015; Paredes et al., 2006).

- *Retención del fármaco en vesículas citoplasmáticas y/o alteraciones en el transporte entre núcleo y citoplasma:* Estos mecanismos no son muy conocidos, pero probablemente alguna MDR-proteína esté involucrada en ellos. En concreto, la Lrp (lung resistance protein) (Paredes et al., 2006).
- *Cambios en el metabolismo intracelular del fármaco:* Cuando el fármaco llega al interior celular, este puede ser inactivado por oxidación y/o conjugación con glutatión (GSH), gracias al glutatión S-transferasa (GST). Para que la célula pueda expulsar al fármaco, necesita las denominadas bombas de GS-X, debido a que el conjugado que se forma GS-X a partir del proceso de conjugación es muy hidrófilo y no podría salir por difusión pasiva. Algunas de las proteínas transportadoras pueden funcionar como bombas GS-X. Este es el caso de las proteínas Mrp. Otras como la Pgp, ha demostrado poseer elementos reguladores comunes con la GST. En ambos casos, se ha detectado un aumento de la expresión de estas dos proteínas en tumores resistentes, y en tumores con baja actividad proliferativa (Paredes et al., 2006).

-(ii) Cambios en la diana molecular. Las alteraciones producidas en la topoisomerasa II constituyen un ejemplo fehaciente de cómo un cambio en la diana molecular de los fármacos puede dar lugar a resistencias. Las topoisomerasas tienen funciones de gran importancia relacionadas con el metabolismo del ADN: rompen y unen de una manera controlada las cadenas de nucleótidos. Además, las alteraciones en la enzima pueden modificar su sensibilidad a los inhibidores (Paredes et al., 2006).

Se conoce que existen dos tipos de topoisomerasas: la I y II. La topoisomerasa II tiene dos isoformas, denominadas α y β . Los fármacos inhibidores de las topoisomerasas se unen a estas isoformas y a su vez al ADN, estabilizando las roturas de este. De esta forma, al verse impedida una la mejora de la integridad del ADN se inicia el proceso de apoptosis. Más específicamente, se ha demostrado que los valores de topoisomerasa II tipo α son menores en adenocarcinomas y carcinomas de célula grande de pulmón que en carcinoma de célula pequeña, por lo que, esto podría contribuir a diferencias en la sensibilidad a la quimioterapia. Realmente, no hay estudios clínicos que encuentren que esta relación dependa de la respuesta

a la quimioterapia. No obstante, se ha detectado cómo los pacientes con valores de topoisomerasa IIa altos, tienen un bajo grado de supervivencia (Brigger et al., 2012; Paredes et al., 2006).

-(iii) Mecanismos que evitan la muerte celular. Según este tipo de mecanismo, aunque el fármaco alcance su diana y produzca un daño significativo, la célula tumoral es capaz de defenderse contra los efectos de la quimioterapia. Entre los diferentes mecanismos que cumplen esta premisa destacan dos tipos de alteraciones celulares: *alta capacidad de reparación del ADN* y *bloqueo de la apoptosis* (Paredes et al., 2006).

- *Alta capacidad de reparación del ADN:* La mayoría de los fármacos citotóxicos tienen en común la función de provocar alteraciones en la estructura del ADN. La capacidad que tienen las células tumorales de reparar el ADN, muestra otro mecanismo capaz de generar multirresistencia. Entre las causas posibles destacan: la aparición de anomalías en enzimas como la O6-alquilguanina-alquiltransferasa (ATasa), o alteraciones en los genes que reparan la escisión del ADN. Así, por ejemplo, un aumento en la expresión del gen ERCC1 (excision repair cross-complementing 1) da lugar a resistencia al cisplatino en el cáncer de pulmón (Paredes et al., 2006).
- *Bloqueo de la apoptosis:* Los tejidos normales no crean resistencia a la quimioterapia. La médula ósea y la mucosa gastrointestinal son los tejidos que más efectos adversos sufren debido a los fármacos citotóxicos y a pesar de ello, no se vuelven resistentes a ellos. Se cree que esto se debe a que los tejidos normales tienen la maquinaria genética en buen funcionamiento y controlan de manera correcta los puntos de chequeos del ciclo celular y la muerte celular programada. Así, cuando el ADN se daña, esta maquinaria tiende a parar el ciclo celular o a llevar a esa célula a realizar la apoptosis (Cerqueira et al., 2015; Paredes et al., 2006).

Una proteína especialmente relevante es la proteína p53. Esta proteína es activadora de la transcripción y posee efecto tumoral supresor. Su acción se basa en interrumpir la fase G1 o G2 del ciclo celular cuando la célula se expone a algún fármaco, que perjudica al ADN. También, activa el proceso de la apoptosis, por lo que, en células tumorales, si se produce alguna mutación del gen que codifica la p53, podría alterar los procesos de regulación del ciclo celular y de la apoptosis. Los cambios en esta proteína, se relacionan con la resistencia de algunos quimioterapéuticos, pero también con una alta sensibilidad a otros (Paredes et al., 2006).

La p53 en su estado normal, suprime los genes que codifican a las proteínas Mrp y Pgp, las cuales, como se explicó anteriormente, están relacionadas con la resistencia a la

quimioterapia. La Pgp, además de su función como bomba de membrana, también inhibe la apoptosis por otras vías distintas a la p53.

Existen otros factores que actúan sobre la apoptosis, que tienen probabilidades de causar resistencia a la quimioterapia. Entre ellos pueden destacarse aquellos que activan a los genes supresores de la apoptosis, por ejemplo, el Bcl-2. En este caso, se ha demostrado cómo su inhibición, en cultivos celulares de leucemia y linfomas, dio lugar a una disminución en la resistencia a los fármacos antineoplásicos. Otro ejemplo lo constituye la inhibición de las proteincinasas, las cuales se activan por el estrés e inducen la apoptosis, facilitando así este proceso en la quimioterapia. Por último, es destacable la inhibición de las caspasas, que si se activan por el empleo de varios antineoplásicos, son capaces de inducir la apoptosis (Paredes et al., 2006).

Como posible solución o mejora en el fenómeno de resistencia a antineoplásicos surge la nanotecnología aplicada a la medicina, que en este contexto tiene como objetivo desarrollar nanopartículas capaces de evadir el sistema inmunológico e introducir fármacos citotóxicos en la zona tumoral. De esta forma, se solventan algunas limitaciones de la quimioterapia. Así, debido a su tamaño reducido, con dimensiones en la nanoescala, y a las favorables características superficiales y fisicoquímicas, las nanopartículas presentan oportunidades únicas para atacar al tumor (Steichen et al., 2013; Cerqueira et al., 2015).

4.3.-NANOPARTÍCULAS ORGÁNICAS: LIPOSOMAS

4.3.1.-DEFINICIÓN Y GENERALIDADES. Los liposomas son vesículas con estructura esférica constituidas por fosfolípidos anfifílicos y colesterol. Estos compuestos se agrupan en bicapas, siendo su interior de carácter acuoso (Oropesa y Jáuregui, 2012). A su vez, los fosfolípidos están formados por cadenas de átomos de carbono e hidrógeno, y en los extremos por grupos fosfatos. Estos grupos forman parte de la cabeza o región hidrofílica, que se encuentra en contacto con el exterior e interior del liposoma. Por otra parte, las cadenas hidrocarbonadas forman parte de la cola o región hidrófoba de la molécula, la cual se encuentra situada entre las regiones hidrofílicas. Estas características físicas peculiares confieren la posibilidad de encapsular a fármacos hidrófobos en la membrana lipídica, y a fármacos hidrofílicos en el centro acuoso o en la superficie del liposoma (Figura 3) (Tovar y Maldonado, 2018).

Dependiendo del tamaño y el número de capas, los liposomas se pueden clasificar en 3 tipos: vesículas multilaminares (mayor de 200 nm), vesículas unilaminares grandes (100-400 nm), y vesículas unilaminares pequeñas (menor a 100 nm). (Mayoral et al., 2009). Además, los liposomas también se pueden clasificar dependiendo de su composición y del mecanismo de

administración intracelular. De esta forma se distinguen: liposomas convencionales, liposomas de elevada circulación, liposomas catiónicos, inmunoliposomas y liposomas sensibles a pH (Oropesa y Jáuregui, 2012).

Los liposomas han demostrado ser muy útiles para ser empleados en la administración de fármacos por múltiples razones, incluyendo entre ellas, su similitud con las membranas celulares tanto en composición como estructura (Steichen et al., 2013).

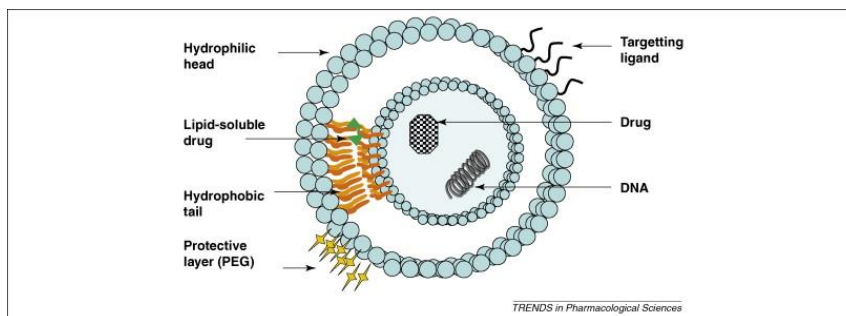


Figura 3.-La imagen representa a un liposoma bilaminar. En los liposomas existe la posibilidad de transportar fármacos en la región hidrofóbica y en la región hidrofílica (Malam et al., 2014).

Entre las ventajas del empleo de los liposomas como vectores de anticancerígenos destaca la capacidad de integrar en su estructura tanto moléculas hidrofóbicas, como hidrofílicas y de carácter anfifílico. Los liposomas protegen a distintos fármacos de la degradación provocada por agentes externos, como la luz y el agua. Además, actúan como vehículos de sustancias bioactivas o de fármacos sensibles a la degradación, evitando su oxidación. Sus propiedades físicas, como la carga superficial, el tamaño, la permeabilidad o la rigidez de la pared son fácilmente modificables. Por otro lado, rehúsan del empleo de disolventes en sus preparaciones, y poseen un amplio abanico de utilidades, ya que se pueden administrarse tanto por vía intravenosa, como por vía oral o por la piel (Steichen et al., 2013; Tovar y Maldonado, 2018).

Sin embargo, los liposomas también presentan algunas desventajas que dificulta su desarrollo y producción, como son: (i) su *baja estabilidad*, la producción a gran escala es muy costosa, es decir, tiene baja reproducibilidad, y (ii) su *complejo proceso de esterilización* (Tovar y Maldonado, 2018).

Los liposomas por sí solos, son bastantes inestables estéricamente y rápidamente eliminados del torrente sanguíneo por el sistema MPS. Para evitar este hecho, se realizan modificaciones de la superficie con el empleo de polímeros hidrofílicos. En concreto, se ha demostrado cómo el PEG, formando liposomas pegilados, incrementa la biocompatibilidad y supone una mejoría en el control de los perfiles de degradación. También, se puede modificar la superficie con el

empleo de ligandos para dirigirse a sitios específicos, que mejoran su selectividad. (Steichen et al., 2013; Tovar y Maldonado, 2018). Estos liposomas pegilados, han demostrado tener gran eficacia en el tratamiento contra el cáncer, debido a su capacidad de larga duración en el organismo, y a que no generan respuesta inmunitaria; con ello, consiguen alcanzar el intersticio del tumor donde liberan al fármaco, consiguiendo alcanzar su zona de interés (efecto EPR).

Para tratar el cáncer, también se emplea la administración de fármacos sensibles a estímulos, basándose en la naturaleza de la célula. Las células cancerígenas, poseen una temperatura más elevada y un pH más ácido que las células normales; por esta razón, se pueden emplear liposomas sensibles a estímulos, pudiendo liberar el fármaco de manera más selectiva y perfeccionar el tratamiento contra el cáncer (Saha et al., 2010). Sin embargo, para que los liposomas puedan liberar su contenido y ejercer su acción, tienen que ser capaces de interactuar con la célula de manera eficaz y sea captada por ella. Los mecanismos que utilizan los liposomas para ello son:

- *Intercambio o transferencia de lípidos*: Se basa en el intercambio de lípidos entre la célula y el liposoma, sin ser necesario un contacto previo entre ambos. Se piensa que este intercambio puede estar mediado por una proteína específica que se encuentra en la superficie externa, ya que estos cambios se dan solo en distintos tipos de fosfolípidos; en concreto, la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina.

Los liposomas y las lipoproteínas del suero también pueden interactuar por este mecanismo, provocando la destrucción o la pérdida del contenido del liposoma. Todo ello, dependerá del tipo de liposoma y de su composición. Por ejemplo, las vesículas laminares pequeñas formadas únicamente por fosfatidilcolina se desintegra ligeramente en el plasma. En cambio, si se incorpora un pequeño porcentaje de colesterol (30%) la desintegración puede ser inhibida (Vitas et al., 2017).

- *Adsorción*: Este mecanismo permite que se lleve a cabo el proceso de internalización de los liposomas por fusión o endocitosis. Se basa en el contacto del liposoma y la superficie celular mediante la participación de fuerzas hidrofóbicas o electrostáticas, o también, por receptores específicos de la superficie celular, como las proteínas de membrana. Cuando se produce la adsorción del liposoma en la superficie celular, lo que se produce a continuación es la ingestión, en la cual intervienen también, determinadas proteínas de membrana (Vitas et al., 2017).
- *Fusión*: Se basa en la fijación de la membrana del liposoma en la membrana celular, esto permite liberar el contenido de la vesícula al citoplasma celular. Si este proceso lo ejerce vesículas multilaminares, utiliza una de las bicapas lipídicas, la cual pierde, mientras el resto de la vesícula se introduce en el interior de la célula. Muchos estudios *in vitro*, han

supuesto avances en la formulación de los liposomas, como conseguir la fusión de estos a la superficie celular mediante fusógenos (lisolecitina, fosfatidilserina), o la fusión de vesículas multilaminares que presentan carga superficial negativa con linfocitos humanos no fagocíticos y fibroblastos. Por otra parte, también se han conseguido resultados prometedores utilizando fosfatidiletanolamina, ácido oleico y lípidos con carga positiva. En cambio, en estudios *in vivo*, la fusión no se suele llevar a cabo debido a que los liposomas son eliminados del torrente sanguíneo por fagocitosis. Este proceso se llevará a cabo en sitios donde el MPS tenga menor actividad (humor acuoso de los ojos, líquido cerebroespinal) (Vitas et al., 2017).

- **Endocitosis:** El liposoma se introduce en el interior de la célula por fagocitosis. En este proceso, se produce una invaginación en la membrana celular que atrapa por completo al liposoma, formando una vesícula denominada fagosoma o endosoma. Esta vesícula, se une con los lisosomas primarios, formando lisosomas secundarios o fagolisosomas, donde a continuación, se produce la acción de enzimas hidrolíticas a un pH aproximado de 4,5. Dicha acción provoca la digestión del liposoma y la liberación de su contenido. Las vesículas que pueden realizar el proceso de internalización por endocitosis son por lo general, las que poseen carácter neutro, o las que se hallan en estado de gel. Tanto la carga como la fluidez del liposoma, va a influir en los procesos de endocitosis y de fusión. Los mecanismos que más predominan en los liposomas para interactuar con las células, según estudios *in vitro* e *in vivo*, son la adsorción y la endocitosis (Vitas et al., 2017).

4.3.2.-LIPOSOMAS EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER. Los liposomas han sido investigados profundamente como portadores de fármacos para aplicarlos al tratamiento del cáncer, consiguiendo así, ser los primeros nanomedicamentos aprobados para este fin. Existen varias formulaciones de liposomas comercializadas e indicadas para distintos tipos de cáncer. En este trabajo nos centraremos en la formulación Doxil® (Lollo et al., 2011; Bedoya, 2012).

*DOXIL®. Doxil® fue aprobada en 1995 por la FDA, se trata de un compuesto liposomal pegilado que se desarrolló con el fin de encapsular la antraciclina doxorubicina. (Wicki et al., 2011; Malam et al., 2009).

La doxorubicina ejerce su acción sobre los ácidos nucleicos en células que se encuentran en proceso de división, empleando dos mecanismos. Uno de ellos, se basa en evitar la replicación y la transcripción de células tumorales en crecimiento acelerado, inhibiendo la síntesis de ADN y ARN (Barenholz, 2012). Este mecanismo es posible gracias a las propiedades fisicoquímicas de la molécula de doxorubicina, gracias a las cuales su amina cargada positivamente se une de

manera eficaz al grupo fosfato del ácido nucleico cargado negativamente. El segundo mecanismo que emplea, es la inhibición de la enzima topoisomerasa II, que evita que el ADN que se encuentra superenrollado se relaje, por lo que no se realiza el proceso de replicación ni transcripción del ADN (Barenholz, 2012; Malam et al., 2009).

Un dato importante a destacar, es que la doxorubicina forma radicales libres que provocan daño oxidativo al ADN, a las proteínas y a los lípidos de la membrana celular. En concreto, este efecto es mayor sobre las membranas mitocondriales, las cuales poseen un alto contenido en cardiolipina (fosfolípido difosfatidilglicerol) cargada negativamente. Así la doxorubicina, de carga positiva, tiene una alta afinidad electrostática por estos fosfolípidos. Este daño que causa la oxidación, explica la razón de la toxicidad y de los efectos secundarios de la doxorubicina. De esta forma, el fármaco genera una alta cardiotoxicidad ya que el corazón contiene un gran número de mitocondrias (Barenholz, 2012).

A diferencia de la doxorubicina libre, la formulación Doxil[®], presenta una menor cardiotoxicidad y ha demostrado tener una mayor eficacia. Estas ventajas que presenta el Doxil[®] se atribuyen al direccionamiento pasivo, que se debe a la presencia de fugas en la vasculatura del tumor y al efecto EPR. (Malam et al., 2009; Oropesa y Jáuregui, 2012).

Para lograr que los liposomas realicen de manera eficaz un direccionamiento pasivo y lleguen a los tejidos cancerosos, se necesitan algunos requisitos principales:

- Una circulación plasmática prolongada con su forma intacta, para ello se desarrollan liposomas estabilizados estéricamente, formados por fosfolípidos, colesterol y polímeros (PEG).
- Liposomas con niveles suficientes de fármaco que le permita llegar a su objetivo de manera eficaz, y además con la carga estabilizada. Este requisito tiene algunos problemas, ya que los liposomas tienen un tamaño nanométrico y en el caso de la doxorubicina, se necesita una dosis muy elevada para lograr la eficacia terapéutica. Además, es complicado lograr una carga pasiva suficiente en la parte acuosa del liposoma, sobre todo debido a la baja solubilidad de la doxorubicina. La solución a esto, es el uso de gradiente de iones amonio o pH para la carga remota (activa) de bases o ácidos anfipáticos débiles en los liposomas.
- Extravasación al tejido tumoral, se consigue con el empleo de liposomas con un tamaño aproximado de < 120 nm, capaz de atravesar la vasculatura del tumor gracias al efecto EPR.

- Conseguir llevar el fármaco activo a las células dianas, esto se logra con liposomas capaces de liberar el fármaco basándose en las propiedades del tejido tumoral, o también, empleando liposomas sensibles a las fosfolipasas, liposomas termosensibles, o por internalización debido al direccionamiento activo, entre otros.

Como se ha comentado anteriormente en los requisitos, conseguir una carga estable era necesario para que la formulación de Doxil[®] fuera eficaz. Debido al tamaño nanométrico de los liposomas y a la gran concentración de fármaco necesaria, fue imposible de lograr mediante carga pasiva, ya que la baja solubilidad de doxorubicina lo impedía (Vitas et al., 2017).

En los análisis realizados sobre la carga, se demostró que la única opción para que la formulación fuera viable era mediante carga remota (activa). El desarrollo de Myocet[®] surgió así, con los estudios sobre la carga remota de doxorubicina empleando liposomas mediante gradiente de pH. Para el desarrollo de Doxil[®], donde la doxorubicina se encuentra en la fase acuosa intraliposomal en forma de sal, se empleó otro tipo de carga remota, basada en el gradiente transmembranal de sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4]_{\text{liposoma}} \gg [(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4]_{\text{medio}}$, este descubrimiento posibilitó el uso clínico de Doxil[®]. Esta estrategia se basa en la fabricación de liposomas con un gradiente de iones transmembrana, que se encuentra de manera elevada en el interior del liposoma y baja en el exterior, esto va a actuar como una fuerza para impulsar la carga remota del fármaco anfipático de base débil. Si se empleara ácidos débiles anfipáticos, la fuerza que lo impulsaría sería un gradiente transmembrana de acetato de calcio. Esto es así, ya que dichos iones se intercambian con el fármaco anfipático (si es ácido débil se intercambia con el ion acetato liposómico, y si se trata de una base débil con el ion amonio liposómico). El contraíón que se forma (sulfato en el caso de amonio, calcio en el caso de acetato) va a controlar la agregación y precipitación del fármaco que se encuentra en la fase acuosa del liposoma, controlando así, la estabilidad, la velocidad de liberación y la eficacia de la carga remota.

Esta formulación ha demostrado la importancia de la química-física, la biofísica de los lípidos y el empleo de la nanotecnología para desarrollar con éxito el empleo de fármacos basados en liposomas (Vitas et al., 2017; Barenholz, 2012).

En el caso de Doxil[®], el fármaco que se encuentra circulando por el plasma, se mide mayoritariamente como fármaco asociado a liposomas, y así con esta forma llega al tumor. Si no es capaz de liberar el fármaco de manera correcta, no habrá efectividad. Esta formulación se puede comparar respecto al tamaño, composición y distribución con el cisplatino Stealth, donde su diferencia es que está cargado pasivamente con cisplatino (nombramos esta comparación

para que a continuación podamos explicar los posibles mecanismos que lleva a cabo la formulación Doxil®) (Solomon y Gabizon, 2008).

Para comprobar que el fármaco es correctamente liberado, se mide el nivel y la presencia de los metabolitos que se forman, esto es posible mediante HPLC. Se conoce que la doxorubicina para formar metabolitos lo tiene que hacer intracelularmente, por lo que, si se haya metabolitos del fármaco en los tejidos tumorales, indica que el fármaco es absorbido de manera eficaz por las células cancerígenas. Aunque no se conoce exactamente el mecanismo que utiliza el fármaco, se pueden predecir dos para aclarar el proceso de internalización que emplea, i) la célula capta a los liposomas con su forma intacta y después se libera el fármaco al interior de la célula, ii) el fármaco se libera en el líquido intersticial del tumor y a continuación, es absorbido por las células. Los nanoliposomas de cisplatino Stealth, no son captados de manera intacta por las células, por lo que el primer mecanismo descrito podría ser descartado, ya que como dijimos anteriormente, el cisplatino Stealth y Doxil® tienen muchas similitudes. Así, la liberación del fármaco puede estar relacionado con la existencia de un gradiente de sulfato de amonio, o por degradación de los lípidos por la acción de las fosfolipasas. Aunque esta última aseveración es cuestionable, ya que entre los componentes que forma la membrana del liposoma se encuentra el colesterol, y este dificulta la actividad de las fosfolipasas, inhibiéndolas. Concluyamos con esto, que el mecanismo posible que puede seguir la formulación Doxil® es el segundo que se nombró, siendo liberado por el colapso del gradiente de sulfato de amonio. No obstante, el esclarecimiento de esta cuestión requiere de más investigaciones al respecto (Solomon y Gabizon, 2008; Barenholz, 2012).

En los ensayos clínicos de Doxil®, se estudió la farmacocinética plasmática y la acumulación de doxorubicina. Esta fue administrada por vía intravenosa, y se observó de forma muy clara que los niveles de doxorubicina en las células tumorales y en los fluidos intersticiales tumorales, eran más elevados con la administración de doxorubicina liposomal que con la administración de doxorubicina libre. Los niveles de fármaco lograron su punto más alto entre los tres y siete días después de su administración, esto muestra, que la célula tumoral está expuesta un mayor tiempo y con unos niveles de fármaco más altos con la administración de Doxil® (Solomon y Gabizon, 2008).

También, se encontraron otras diferencias, con respecto al volumen de distribución: 4 litros para Doxil® y 254 L para la doxorubicina libre; así como también en la tasa de eliminación: 0,1L/h para Doxil® y 45L/h para la doxorubicina libre, siendo la cinética de liberación de Doxil® mucho más lenta. Doxil® presentó una cinética biexponencial en relación al tiempo de eliminación

plasmática, cuyas semividas fueron 2 y 45h para 25 y 50 mg /m² de doxorubicina, respectivamente. Así, gran parte de la dosis fue eliminada del plasma en la semivida más prolongada (Solomon y Gabizon, 2008; Barenholz, 2012).

Más recientemente, se ha investigado el efecto de la doxorubicina liposomal pegilada en un modelo de tumor de ratón macho, inoculado con células de cáncer de colon (C26) y con células C26 resistentes a la doxorubicina, las cuales tenían sobreexpresadas las bombas de salida de P-glicoproteínas. Los resultados que se obtuvieron, verificaron que la doxorubicina liposomal pegilada posee efectos antitumorales contra las células C26 no resistentes y contra las células C26 resistentes a la doxorubicina, por lo que puede ser una opción muy interesante para emplearse en casos de multirresistencia por la quimioterapia (Malam et al., 2009).

Actualmente Doxil[®], se emplea para tratar el cáncer de ovario, en monoterapia para tratar el sarcoma de Kaposi, para el tratamiento del cáncer de mama y junto a bortezomib para tratar el mieloma múltiple (Lollo et al., 2011; Malam et al., 2009).

*OTRAS FORMULACIONES LIPOSOMALES

Myocet[®], encapsula a la doxorubicina al igual que Doxil[®], con la diferencia de que es una formulación liposomal no pegilada, es decir no presenta un recubrimiento con PEG en su superficie. Por ello, su eliminación del plasma es más rápida que en Doxil[®], eliminándose hasta un 90% en 24 h. La formulación Myocet[®], se emplea para tratar el cáncer de mama metastásico y el cáncer de ovario (Jerez, 2013; Lollo et al., 2011).

Daunoxome[®], se emplea para tratar el Sarcoma de Kaposi, se trata de un sistema liposomal no pegilado con un tamaño aproximado de 35-60 nm, que encapsula a la daunorrubicina. Este transportador, consigue una mejoría en los perfiles farmacocinéticos y en la eficacia, lo que repercute en una mayor esperanza de vida en los pacientes tratados.

Por último, el Marqibo[®], es también un sistema liposomal no pegilado con un tamaño aproximado de 115 nm, que encapsula a la vincristina. Este nanosistema, logra disminuir la neurotoxicidad que produce el fármaco en el organismo y aumenta su semivida. Se emplea para el tratamiento del linfoma no- Hodgkin en combinación con otros fármacos citostáticos (Lollo et al., 2011; Gomez-Gaete,2014).

4.4.-NANOPARTÍCULAS INORGÁNICAS: NANOPARTÍCULAS DE ORO

La aplicación de las nanopartículas de oro (AuNPs) se remontan a la antigüedad. Así, existen evidencias de que en el año 2500 antes de Cristo se empleó el oro coloidal en China (Mateo et al., 2013). En la Edad Media, donde entonces se conocía como oro potable, se empleó como

sustancia curativa en diversas enfermedades, como en problemas cardíacos, venéreos, epilepsia, artritis, y para el diagnóstico de la sífilis (Bai et al., 2020).

Otra de las pruebas que tenemos para saber que hubo evidencias del uso de las nanopartículas hace miles de años, es la copa de Licurgo, originaria del siglo IV después de Cristo. Esta copa tiene una característica muy curiosa, el cristal de la copa es de color verde pero cuando se ilumina por dentro se vuelve de color rojo, es decir, posee propiedades dicroicas. La copa está compuesta por trazas de dos tipos de nanopartículas metálicas: por nanopartículas de plata (AgNPs) y de oro, que poseen un tamaño de entre 50 nm y 100 nm. Estas nanopartículas, son las responsables de esta característica óptica, las AgNPs le proporcionan el color verde y las AuNPs el color rojo. Detrás de este fenómeno está la resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR) (Oliva, 2013).

El oro es un metal noble conocido por su gran resistencia a la oxidación y a la corrosión, es el único metal elemental que tiene color y mantiene su brillo de manera excepcional. Su naturaleza bioinerte, hace que el oro sea un gran aspirante para emplearse en aplicaciones biomédicas, tanto in vitro como in vivo (Yang et al., 2015).

Con el desarrollo de la nanotecnología, se han conseguido grandes avances referente a las AuNPs. Como vimos al principio, existen varios tipos de nanopartículas inorgánicas, pero las AuNPs han demostrado tener mayor aplicabilidad en diferentes tipos de terapias contra el cáncer, entre las que destacamos: la radioterapia (RT), la terapia fototérmica (PTT), la hipertermia inducida por radiofrecuencia (RFHT), la hipertermia inducida por ultrasonido (USHT), la terapia fotodinámica (PDT) y la terapia sonodinámica (SDT). En definitiva, estas nanoestructuras han demostrado ser extraordinarias, capaces de combinar varios tratamientos para mejorar los resultados en las terapias (Beik et al., 2019).

Al igual que otras nanoestructuras, las AuNPs también son capaces de dirigirse directamente al tumor, bien sea por direccionamiento pasivo o direccionamiento activo. Dichas nanopartículas, se acumulan en el sitio del tumor de manera pasiva debido a las fugas y fenestraciones de los vasos sanguíneos, pudiendo permanecer largos periodos de tiempo por el bajo drenaje linfático que presenta la zona tumoral. Para evitar la captura de la nanopartícula por el RES y prolongar su tiempo de circulación, se utiliza el PEG. Todo ello, consigue que los niveles del fármaco que llegan al tumor sean de 10 y 100 veces mayor en comparación con el fármaco libre (Claire et al., 2010; Jain, 2012).

Por otra parte, una de las ventajas de estas nanopartículas es la posibilidad de realizar cambios en su superficie de manera sencilla al ser recubiertas con diferentes ligandos o estabilizadores.

Así, las AuNPs son capaces de formar enlaces covalentes con grupos tiol, además de enlaces fuertes con grupos amina. Con esta ventaja, se puede utilizar el direccionamiento activo, para que se dirija directamente a los tumores, enlazando ligandos específicos (EGFR, la transferrina, el ácido fólico, anticuerpos) a la superficie de la nanopartícula. Por ejemplo, en un primer paso, se puede unir en un extremo del PEG un grupo como N-hidroxisuccinimida (NHS) y en el otro extremo, un grupo como el disulfuro de ortopiridilo (OPSS). El OPSS se unirá a la superficie de la nanopartícula rompiendo un enlace disulfuro y formando un enlace de tiolato. Después, se puede añadir un anticuerpo, donde su amina primaria reacciona con el grupo NHS del PEG, completando así la bioconjugación (Claire et al., 2010; Jain, 2012; Ferro-Flores et al., 2010).

Realmente, el enorme interés que ha supuesto el uso de AuNPs en la actualidad se debe a que estas tienen propiedades únicas, su síntesis es fácil de ejecutar y poseen una gran estabilidad química (Siddique y Chow, 2020). Las propiedades únicas que caracterizan a estas nanoestructuras se deben a sus características físicas (resonancia de plasma de superficie localizada, radioactividad, número atómico alto) y a sus características químicas (capacidad de unirse a grupos amina y tiol, actividad y aplicaciones catalíticas y actividad biológica). Debido a estas características físico-químicas, y a la biocompatibilidad y la baja toxicidad de las AuNPs, se encuentran múltiples aplicaciones en el diagnóstico y en el tratamiento del cáncer (Bai et al., 2020; Shelar et al., 2020).

4.4.1. RESONANCIA DE PLASMÓN DE SUPERFICIE LOCALIZADA (LSPR). Este fenómeno se produce cuando una fuente de luz incide sobre la AuNP. El término LSPR o resonancia plasmática de superficie localizada, es la oscilación resonante que sufren los electrones libres de las nanopartículas en presencia de luz. Eso sucede porque sus electrones forman una "nube" alrededor de los núcleos atómicos, que es móvil, lo que permite que las nanopartículas de oro transporten carga. Como puede deducirse de la mecánica cuántica, estos electrones podrían actuar como partículas o como ondas con un valor de energía definido y finalmente producir resonancia. Cuando un metal en su superficie absorbe luz de una longitud de onda resonante, la nube de electrones vibrará y disipará energía (Figura 4). Esas oscilaciones de la nube de electrones del metal se llaman "plasmones" (Long y Jing, 2014).

Cuando se produce la LSPR, se generan campos electromagnéticos en la superficie de la nanopartícula, los cuales pueden emplearse para mejorar las señales espectrales de sustancias cercanas, a esto se le conoce como espectro de mejora de la superficie (SES). En otras palabras, mejoran las señales ópticas (fluorescencia, dispersión de Raman). Las investigaciones de SES

para el empleo en la oncoterapia, se basan principalmente en la espectroscopia de Raman de superficie mejorada (SERS) (Bai et al., 2020).

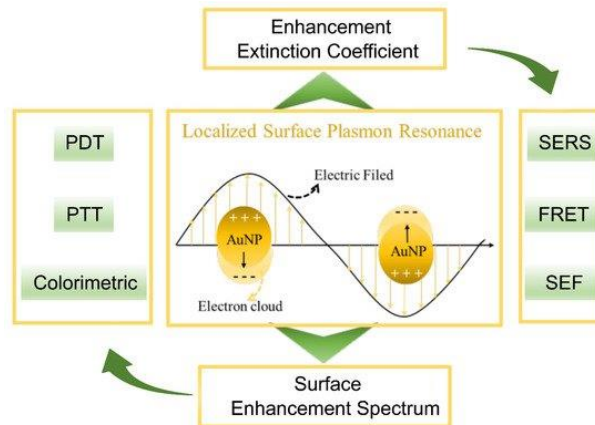


Figura 4.- Imagen representativa del fenómeno de resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR), el cual tiene dos efectos importantes en las nanopartículas de oro (AuNPs): mejora del campo electromagnético local y mejora el coeficiente de extinción (Bai et al., 2020).

El fenómeno LSPR en las nanopartículas origina dos procesos: i) de *dispersión*: en el que se produce la irradiación de la luz incidente a la misma frecuencia, pero en varias direcciones, esto último se emplea en el mapeo de imágenes, y ii) de *absorción*: la luz se absorbe y provoca la conversión de fotones en calor, se emplea en PTT. Estas interacciones entre la luz y la materia, se van a emplear para desarrollar nuevas herramientas aplicables en la biomedicina, empleándose en el diagnóstico y en tratamientos de tumores (Mar et al., 2019; Cruz et al., 2012; Yang et al., 2015). El LSPR puede variar dependiendo del tamaño, forma, composición y del microambiente o entorno en el que se encuentre la nanopartícula.

Para emplear las AuNPs en aplicaciones biomédicas nos interesa conseguir bandas de LSPR en la región de infrarrojo (NIR) entre 650-900 nm, ya que, a estas longitudes de ondas, la luz incidente que se emplea logra alcanzar a los tejidos blandos. Esto se debe a que la sangre y el agua tiene una baja absorción, además de una dispersión baja en los tejidos blandos (Yang et al., 2015).

En general, en una AuNP la banda de LSPR varía y se desplaza de manera significativa cuando se altera la constante dieléctrica (ϵ) del medio en que está inmerso la nanopartícula. A medida que esta constante aumenta, la banda de absorción del plasmón de superficie (SPR) se ensancha desplazándose a mayores longitudes de ondas. Por otra parte, una variación en el tamaño del nanosistema de oro supone cambios en la posición del máximo de la banda SPR. Así, por ejemplo, nanoesferas de Au de 5 nm de diámetro reflejan un pico de LSPR de unos 520 nm y nanoesferas de Au de 70 nm de diámetro, un pico de 530 nm, lo que supone un claro

desplazamiento hacia el rojo a medida que el diámetro de la nanopartícula aumenta. Sería imposible ajustar el LSPR al NIR en nanoesferas de Au empleando solo un cambio de tamaño por debajo de 100 nm (Yang et al., 2015; Bai et al., 2020).

Por otra parte, la agregación de nanopartículas implica interacciones entre los campos eléctricos de cada una de ellas, de manera que este fenómeno afecta también a la posición del LSPR. Por ejemplo, una disolución de AuNPs se tornará roja, cuando la distancia entre las partículas es mayor que su diámetro medio, mientras que la misma suspensión aparecerá de color azul cuando la distancia entre las partículas sea menor que su diámetro medio. Dicho de otra manera, cuando las nanopartículas se agregan, el LSPR se desplaza a longitudes de onda más largas, a esto se le conoce como “desplazamiento hacia el rojo”, mientras que cuando se encuentran adecuadamente dispersadas en el disolvente empleado, se desplaza a longitudes de ondas más cortas, se denomina, “desplazamiento hacia el azul”. En ambos casos, el sistema experimenta un cambio de color. Dicha característica se emplea frecuentemente para la detección colorimétrica de diferentes analitos, como son el ADN o proteínas (Yang et al., 2015).

Para ajustar la banda de LSPR al NIR, debemos tener en cuenta otros parámetros como la forma del nanosistema. En este sentido, son más eficientes las nanoestructuras con formas no esféricas, demostrando que estas pueden ser más ajustables al NIR, sin tener que aumentar su tamaño de manera excesiva, como en el caso de las nanopartículas esféricas. Entre las diversas formas existentes de AuNPs, los nanorods (AuNR) son los que más se han estudiado (Yang et al., 2015).

Los AuNR se caracterizan por su forma de barra. Su resonancia se asocia con longitudes de ondas NIR debido a su relación: largo-ancho. Esto va a generar que presente dos tipos de resonancia, una longitudinal y otra transversal (Jauffred et al., 2019). Estas resonancias son independientes entre sí. Suponiendo que todas las partículas están en la misma dirección, se puede medir cada una de las resonancias, empleando una luz polarizada dirigida de forma paralela y otra de forma perpendicular al eje de la barra (0°). Incidiendo el haz de luz de forma paralela al eje de la barra (0°) se excitará el plasmón de superficie longitudinal, que es el que se desplaza a la región NIR. Por otro lado, si se incide la luz de forma perpendicular al eje (90°), se obtiene el plasmón de superficie transversal, que presenta similitud con el de las nanoesferas (Figura 5) (Pérez-Juste et al., 2005). En definitiva, este comportamiento de la resonancia de los AuNR se debe a la relación del largo y ancho, es decir del aspect-ratio (AR). Debido a su capacidad de absorción extraordinariamente alta, los AuNR se emplean en aplicaciones biomédicas como agentes fototérmicos (Jauffred et al., 2019).

Además, específicamente, las bandas de LSRP de las AuNPs pueden ser ajustadas a la región NIR para poder ser útiles en las aplicaciones biomédicas, teniendo en cuenta y modificando con precisión, su tamaño, estructura, y sus propiedades superficiales (Yang et al., 2015).

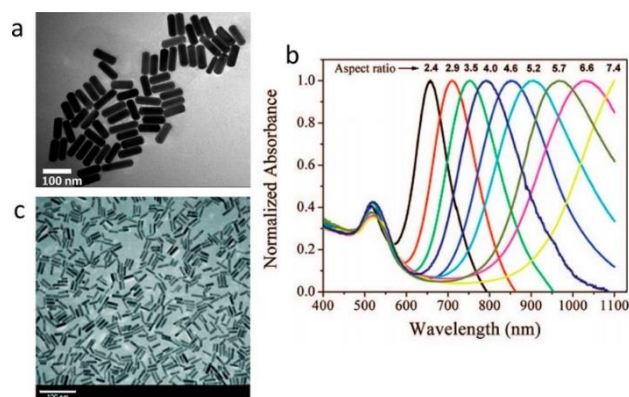


Figura 5.- A) Imagen de nanorods (AuNR) por microscopio electrónico de transmisión (TEM) (72 x 16 nm). B) Plasmón de superficie longitudinal dependiendo del aspecto ratio. C) Imagen TEM de AuNR (25 x 5,5 nm) (Ali et al., 2019).

4.3.2.-ESPECTROSCOPIA DE RAMAN DE SUPERFICIE MEJORADA (SERS). Cuando una luz monocromática incide en la superficie de una partícula, las moléculas que se encuentran en ella vibran al recibir esta luz incidente, y generan la dispersión de esta luz en diferentes frecuencias. La dispersión de Raman se define como la diferencia de energía entre el fotón disperso y el fotón incidente. La espectroscopía de Raman, es una técnica fotónica que es capaz de suministrar en muy poco tiempo, datos químicos y estructurales de muestras y compuestos. Esta técnica posee algunas limitaciones. Así, cuando la concentración del analito es muy baja, la señal de Raman es demasiado débil, y no es capaz de detectarlo, demostrando así una baja eficiencia en este tipo de muestras. Otra de las limitaciones, es la existencia de fluorescencia en la muestra, la cual no permite un análisis claro de las señales Raman. Estas limitaciones se solucionaron con el hallazgo de SERS. Esta última técnica, tiene la capacidad de que la señal de Raman mejora y disminuye la interferencia de la fluorescencia. Con ella, la señal de Raman se aumenta en varios ordenes de magnitud (de 10^6 a 10^{15}), por lo que es muy útil en diversas aplicaciones como: la detección y obtención de imágenes de tumores o la distinción entre células tumorales y las normales (Valera-fonseca et al., 2019; Beik, 2019; Rivera y Guzmán, 2015).

Las señales SERS, superan de manera significativa la capacidad de detección de imagen de tecnologías como, la resonancia magnética, tomografía por emisión de positrones y tomografía computarizada por rayos X (Lane et al., 2015). A continuación, se muestra un ejemplo de detección basado en SERS (Figura 6).

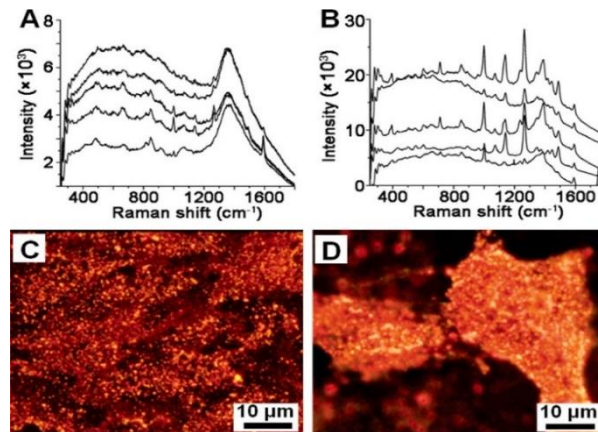


Figura 6.- Representa el empleo de SERS para diferenciar a células sanas (A y C) de células tumorales (B y D) (Yang et al., 2015).

En este ejemplo, se emplean AuNR modificadas con anti-EGFR. Este ligando va a tener fuerte afinidad por los receptores que se encuentran sobreexpresados en las células tumorales. Esta técnica se emplea para identificar y diferenciar a células tumorales y células sanas. En la imagen A y B se muestran espectros Raman de células normales y células cancerígenas. Las imágenes de campo oscuro, muestran AuNR marcadas con anti-EGFR; en C, se visualizan células normales, y en D, células cancerígenas. Las señales de SERS son más nítidas y fuertes en D, debido a la unión de las AuNR con los receptores de la célula tumoral (Yang et al., 2015).

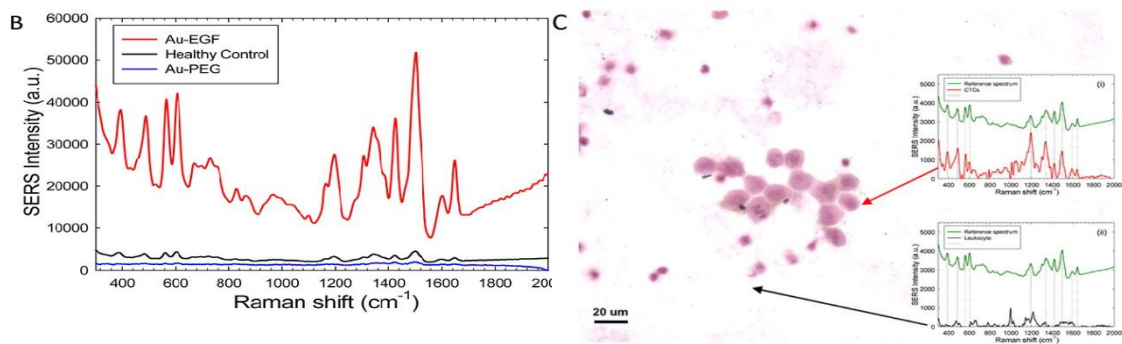


Figura 7.-B) Nanopartículas de oro dirigidas con EGF en muestra de sangre de paciente con cáncer (rojas), nanopartículas no dirigidas (azul) y grupo control empleando nanopartículas dirigidas en paciente sano (negro). C) CTC teñidas con hematoxilina, la línea roja representa un espectro SERS de una célula cancerígena, y la línea negra, representa a un glóbulo blanco (Lane et al., 2015).

Por otro lado, la metástasis tumoral es la causa que provoca más muertes en los pacientes con cáncer. Se produce cuando el tumor se disemina e invade a otros tejidos del organismo. Esta invasión ocurre normalmente a través de los vasos sanguíneos, por lo que la detección de células tumorales circulantes (CTC), se podría emplear para diagnosticar la capacidad de invasión del

cáncer o para observar la respuesta al tratamiento. Esas células son muy difíciles de detectar ya que existe un bajo número con respecto a los demás componentes sanguíneos. Las CTC se detectan en la clínica actual con el empleo de la plataforma CellSearch, aprobada por la FDA, la cual, consiste en el empleo de partículas magnéticas marcadas con anticuerpos que se dirigen a los receptores EpCAM presentes en las CTC, y no a las células sanas. Este método es aún muy mejorable, ya que su empleo puede dar lugar a grandes tasas de falsos positivos. Esto se debe a la necesidad de enriquecer la muestra de sangre, además de realizar un etiquetado de inmunofluorescencia después de extraerlas con el empleo de un campo magnético (Lane et al., 2015).

Existe un método que podría evitar las limitaciones de la plataforma CellSearch, y es el empleo de nanoetiquetas SERS. Posee la capacidad de detectar alrededor de 50 CTC por mililitro, consiguiendo una confianza alrededor del 99,7%. En esta investigación, se tomaron muestras procedentes de pacientes con cáncer de cabeza y cuello, además de un grupo control con pacientes sanos (Figura 7). En este método, el único pretratamiento que se realizó fue un proceso de centrifugación en gradiente, para eliminar los glóbulos rojos. Este ensayo de etiquetas SERS, ha demostrado la capacidad de detectar 1 célula tumoral en 10 millones de células sanas, lo que le confiere una gran sensibilidad. Por tanto, esta técnica tiene un gran potencial para superar al método actual de la plataforma CellSearch, en la detección de CTC. (Lane et al., 2015).

4.3.3.- EFECTO FOTOTÉRMICO. Como se mencionó anteriormente, gracias al fenómeno LSPR, la luz absorbida por las nanopartículas metálicas puede transformarse en calor, a esto se le denomina, “efecto fototérmico”. Este efecto tiene aplicación en diferentes áreas de la medicina, como: la liberación de fármacos antineoplásicos encapsulados en AuNPs, el empleo de calor directamente sobre las células cancerígenas a través de las AuNPs, o para detectar tumores por imagen fototérmica (Aizpirarte, 2016).

***TERAPIA FOTOTÉRMICA.** El proceso de hipertermia, consiste básicamente, en aumentar la temperatura en una zona del cuerpo que presente células tumorales. El objetivo de esta técnica es conseguir aplicar en la masa tumoral, una temperatura estabilizada que se encuentre entre 41-42°C (Hernando, 2014). Este aumento de temperatura, que es mayor a la fisiológica, va a producir cambios en las células, generando un mal plegamiento de las proteínas y aglomeraciones, interferencias en las señales de transducción, y una baja oxigenación del tumor, provocando que la célula aplique el proceso de apoptosis.

Gracias al desarrollo de la nanotecnología, surge la terapia fototérmica (PTT), la cual se diferencia de la hipertermia convencional, en que emplea AuNPs que generan calor específicamente en la zona tumoral (Aizpirarte, 2016). Los AuNR son las nanopartículas que tienen una mayor eficiencia fototérmica, pero, existen otros tipos de estructuras no esféricas que también son capaces de absorber la luz NIR, como las nanoestrellas, nanocapas y nanocajas, por lo que son unos candidatos ideales para aplicarlos en la PTT (Liu et al., 2020; Ali et al., 2019). La energía óptica que se produce por los electrolitos oscilantes en el fenómeno LSPR, se convierte en calor, y se transfieren por la red de partículas, aumentando la temperatura en el medio en el que se localizan las AuNPs. Esta propiedad termofísica además de la capacidad de conseguir un direccionamiento activo hacia el tumor, hace que la PTT sea muy poco invasiva y altamente precisa (Beik et al., 2019).

Actualmente existen ensayos clínicos referentes a este tipo de terapia, se trata de nanocapas de sílice-oro (AuNS) envueltas por PEG, su tamaño es de 150 nm, el núcleo es de sílice (120 nm) y está envuelta por una capa de oro (15 nm). Esta terapia se denomina AuroLase®, y ha sido desarrollada por Nanospectra Biosciences, Inc (Leung et al., 2013). Los ensayos clínicos de AuroLase® se basan en transferir por vía intravenosa las AuNS, las cuales viajan a través de la circulación sanguínea hasta llegar a la zona tumoral por el EPR. Estas nanoestructuras, se han diseñado para absorber en la región NIR, por lo que, con el empleo de un láser, se irradian a las AuNS, haciendo que el tumor sufra un calentamiento fototérmico. Esto último induce la muerte celular sin dañar a los tejidos sanos. Dependiendo de la cantidad de AuNS que tenga el tumor en ese momento, la energía producida por el láser, dará lugar a una hipertermia leve, pero si la cantidad es muy alta, estas nanopartículas tienen la capacidad de producir suficiente energía fototérmica para producir la muerte celular, llegando a producir necrosis (Rastinehad et al., 2019). La administración intravenosa expone al organismo a la toxicidad asociada a las nanopartículas. Los órganos dianas que tienden a acumular estas AuNS son principalmente, el bazo, el hígado y el riñón, además del corazón y los pulmones (Rastinehad et al., 2019; Gad et al., 2012).

El uso clínico en cáncer de próstata, solamente requiere una infusión, y después de 12 a 24 horas, que es cuando la mayor parte de las nanopartículas se focalizan en la zona tumoral, se aplica la fuente de energía láser (Gad et al., 2012). La ablación selectiva proporcionada por las nanopartículas, va a proteger al tejido sano, ya que las nanopartículas solo se van a encontrar en el lugar del tumor, minimizando así los efectos secundarios que se producen en el cáncer de próstata, debido a otros tipos de terapia, estos son, la aparición de fístula uretral, incontinencia urinaria, disfunción eréctil o lesiones rectales (Rastinehad et al., 2019).

La seguridad preclínica de estas nanopartículas, se establecieron en estudios *in vivo* e *in vitro* en animales de manera aguda (28 días) y crónica (10 meses). La evaluación en las AuNS no demostró indicios de toxicidad, ni falta de tolerancia, además no produjeron efectos inmunológicos. Todo ello demostró la seguridad de estas formulaciones en la terapia fototérmica asociada al cáncer de próstata, que es un tipo de cáncer muy frecuente en los hombres (Leung et al., 2013). De los 16 pacientes estudiados, 15 completaron el protocolo de tratamiento, y se sometieron a resonancia magnética multiparamétrica de alta resolución (mpMRI), con biopsia dirigida a los 3 y 12 meses después del tratamiento. Según los resultados obtenidos, el 75% (12/16) fueron exitosos a los 3 meses, y el 87,5% (14/16) a los 12 meses (Rastinehad et al., 2019).

***TRANSPORTE DE FÁRMACOS.** La administración de fármacos quimioterapéuticos con el empleo de AuNP, puede abordar los problemas y disminuir los riesgos asociados a la quimioterapia convencional (Beik et al., 2019).

Entre otros, destacan los sistemas poliméricos capaces de experimentar cambios en su estructura como consecuencia de un aumento en la temperatura por encima de un valor crítico. Estos sistemas poliméricos ensamblados en la superficie de nanopartículas de oro pueden ser de interés para transportar fármacos. De esta forma, la apertura y cierre de sus poros, permitiría liberar el fármaco de forma controlada (Claire et al., 2010).

El polímero, por debajo de la temperatura de transición, se encuentra en un estado hidrofílico y en forma extendida, que bloquea la salida del fármaco. Cuando esta temperatura se aumenta por encima del estado de transición, las cadenas del polímero colapsan y se vuelven hidrófobas, abriendo los poros y permitiendo el paso del fármaco al medio. El cambio conformacional que sufren las cadenas del polímero es inducido a través del efecto fototérmico de la radiación láser (Claire et al., 2010). Dicho polímero se diseña para que la temperatura de transición se encuentre por encima de la fisiológica (37°C) y por debajo de la temperatura de hipertermia (42°C). En este sentido, se ha realizado un experimento *in vitro* para mostrar la capacidad de liberación. Para ello, se emplearon nanocajas de oro encapsulando a doxorubicina, en células de cáncer de mama. Los resultados obtenidos para el grupo control no mostraron muerte celular, un grupo de nanocajas de Au sin doxorubicina mostraron un mínimo de muerte celular, y nanocajas de Au con doxorubicina originaron un 40% de muerte celular; en este experimento se mantuvo la irradiación laser durante 2 y 5 minutos (Claire et al., 2010).

Por otro lado, es importante destacar cómo la capacidad de transportar fármacos quimioterapéuticos de manera específica a través de AuNPs, puede ser útil para abordar el

problema de la MDR, inhibiendo a las proteínas que bombean a estos fármacos fuera de la célula, en concreto la P-gp. Además, se ha demostrado cómo el empleo de la hipertermia inhibe a diferentes vías que provocaban daño al ADN inducida por los agentes quimioterapéuticos, lo que da como resultado una menor citotoxicidad y disminución de los efectos adversos relacionados (Beik et al., 2019).

***DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER POR IMAGEN FOTOTÉRMICA.** Por un lado, el aumento de la temperatura en pocos grados celsius en las AuNPs, dirigidas específicamente al tumor, permite distinguir a células sanas de las células cancerígenas (Figura 8) (Aizpirarte, 2016). Por otra parte, gracias a numerosas investigaciones, se han desarrollado nanopartículas que mejoran la dispersión o absorción en la NIR. En particular, las AuNR, debido a su alta biocompatibilidad, sus propiedades ópticas y su fácil fabricación, se han empleado como agentes de contrastes de imagen. Esta técnica utiliza las propiedades de absorción en vez de sus propiedades de dispersión, ya que así, se logra un mayor contraste entre las células cancerígenas con el tejido sano. Todo ello es posible, con el uso de un láser y de una cámara térmica, la cual, evade la señal de fondo causada por la dispersión de luz de los tejidos (Jakobsohn et al., 2012).

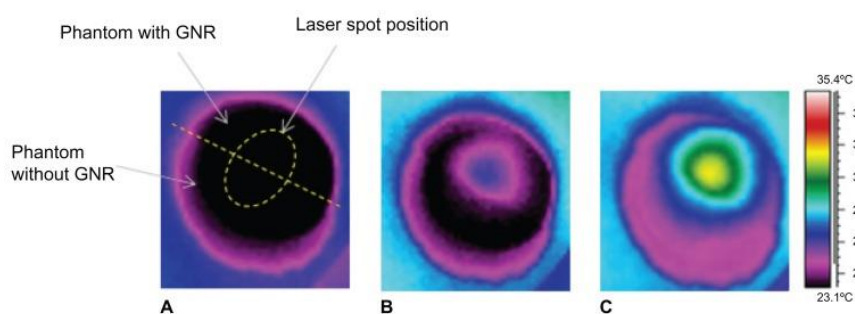


Figura 8.- Representación de una imagen térmica de una muestra que contiene a nanorods. A) Imagen antes de la irradiación con láser. B y C) Imagen después de 10 segundos y 5 minutos con el empleo del láser (Jakobsohn et al., 2012).

5. CONCLUSIONES

Las nanopartículas suponen un gran avance en la terapia del cáncer por sus diversas ventajas, como son su tamaño nanométrico, y la capacidad de modificar su forma y superficie. Estas características hacen que se consiga una mayor selectividad hacia las células tumorales.

Dentro de las nanopartículas orgánicas, los liposomas han demostrado ser una de las nanopartículas más exitosas, por su gran biocompatibilidad y similitud con las células del organismo. De hecho, actualmente existen diversas formulaciones aprobadas que se emplean para tratar a diversos tipos de cáncer.

En cambio, en relación con las nanopartículas inorgánicas destacan claramente las nanopartículas de oro. No obstante, a pesar de que se están estudiando en profundidad en diversas aplicaciones referentes al cáncer, estas aún no han sido aprobadas para su uso médico. El fenómeno de resonancia de plasmón superficial está implicado en sus diversas aplicaciones médicas relacionadas con la cura y diagnóstico del cáncer, entre otras: la capacidad de aplicarse como agentes de imagen, como agentes para transportar fármacos antineoplásicos, y como agentes fototérmicos.

En concreto, y en relación con la terapia fototérmica se están llevando a cabo actualmente numerosos ensayos clínicos que están teniendo mucho éxito, demostrando ser una terapia muy eficaz y poco invasiva para nuestro organismo. Por todo ello, las nanopartículas de oro brindan un futuro muy prometedor y alentador en el tratamiento y diagnóstico del cáncer.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Aftab S, Shah A, Nadhman A, Kurbanoglu S, Aysil Ozkan S, Dionysiou DD, et al. Nanomedicine: An effective tool in cancer therapy. *Int J Pharm.* 2018; 540(2): 132–149.
2. Aizpirarte Morán I. Terapia Fototérmica en Cáncer mediante Nanopartículas de Oro. *Moleq̃la Nanotecnología.* 2016; 24(3): 1–4.
3. Ali MRK, Wu Y, El-Sayed MA. Gold-Nanoparticle-Assisted Plasmonic Photothermal Therapy Advances Toward Clinical Application. *J Phys Chem C.* 2019; 123(25): 15375–15393.
4. Bai X, Wang Y, Song Z, Feng Y, Chen Y, Zhang D, et al. The basic properties of gold nanoparticles and their applications in tumor diagnosis and treatment. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(7): 1-17.
5. Barenholz Y. Doxil® - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *J Control Release.* 2012; 160(2): 117–134.
6. Bedoya DM. Visualización de liposomas por resonancia magnética: una oportunidad para mejorar las terapias liposomales antitumorales. *Rev Cuba Investig Biomédicas.* 2012; 31(4): 417–428.
7. Beik J, Khateri M, Khosravi Z, Kamrava SK, Kooranifar S, Ghaznavi H, et al. Gold nanoparticles in combinatorial cancer therapy strategies. *Coord Chem Rev.* 2019; 387: 299–324.
8. Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64:24–36.
9. Cerqueira BBS, Lasham A, Shelling AN, Al-Kassas R. Nanoparticle therapeutics:

- Technologies and methods for overcoming cancer. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015; 97: 140–151.
10. Cho K, Wang X, Nie S, Chen Z, Shin DM. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(5): 1310–1316.
 11. Claire M. Cobley, Leslie Au, Jingyi Chen YX. Targeting Gold Nanocages to Cancer Cells for Photothermal Destruction and Drug Delivery. *NIH-PA.* 2010; 7(5): 577–587.
 12. Cruz DA, Rodríguez MC, López JM, Herrera VM, Orive AG, Creus AH. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS Y PLASMONES DE SUPERFICIE: UNA RELACIÓN PROFUNDA. *Av en Cienc e Ingeniería.* 2012; 3(2): 67–78.
 13. Ferro Flores G, Ramírez de la Cruz F de M, Ocamo García BE, Morales Ávila EM, Mendoza Sánchez AN, Santos Cuevas CL. Radiofármacos : nanopartículas como sistemas multifuncionales para la obtención in vivo de imágenes moleculares. *Contrib del Inst Nac Investig Nucl al Av la Cienc y la Tecnol en México.* 2010; 21(3): 29–36.
 14. Gad SC, Sharp KL, Montgomery C, Payne JD, Goodrich GP. Evaluation of the toxicity of intravenous delivery of auroshell particles (Gold-Silica Nanoshells). *Int J Toxicol.* 2012; 31(6): 584–594.
 15. Gomez-Gaete C. Nanopartículas poliméricas: Tecnología y aplicaciones farmacéuticas. *Soc Farm Chile.* 2014; 7(2): 7–16.
 16. Hernando Grande A. Nanotecnología y nanopartículas magnéticas: la física actual en lucha contra la enfermedad. *Rev Acad Cienc Exact Fís Nat.* 2014; 101(2): 321–327.
 17. Instituto Nacional del Cáncer. Diccionario de cáncer [en línea]. [Consultado en Septiembre de 2020] Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario>
 18. Jain S, Hirst DG, O’Sullivan JM. Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *Br J Radiol.* 2012; 85(1010): 101–113.
 19. Jakobsohn K, Motiei M, Sinvani M, Popovtzer R. Towards real-time detection of tumor margins using photothermal imaging of immune-targeted gold nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7: 4707–4713.
 20. Jauffred L, Samadi A, Klingberg H, Bendix PM, Oddershede LB. Plasmonic Heating of Nanostructures. *Chem Rev.* 2019; 119(13): 8087–8130.
 21. Jerez Gilarranz Y. Antraciclinas en primera línea en cáncer de mama metastásico: experiencia clínica. *Hitos oncológicos.* 2013; 8(21): 80–82.
 22. Lane LA, Qian X, Nie S. SERS Nanoparticles in Medicine: From Label-Free Detection to Spectroscopic Tagging. *Chem Rev.* 2015; 115(19): 10489–10529.
 23. Lee BK, Yun YH, Park K. Smart nanoparticles for drug delivery: Boundaries and

- opportunities. Chem Eng Sci. 2015; 125: 158–64.
24. Leung J, Wu S, Chou K, Signorell R. Investigation of Sub-100 nm Gold Nanoparticles for Laser-Induced Thermotherapy of Cancer. Nanomaterials. 2013; 3(1): 86–106.
 25. Leung J, Wu S, Chou K, Signorell R. Investigation of Sub-100 nm Gold Nanoparticles for Laser-Induced Thermotherapy of Cancer. Nanomaterials. 2013; 3(1): 86–106.
 26. Liu Y, Kangas J, Wang Y, Khosla K, Pasek-Allen J, Saunders A, et al. Photothermal conversion of gold nanoparticles for uniform pulsed laser warming of vitrified biomaterials. Nanoscale. 2020; 12(23): 12346–12356.
 27. Lollo G, Rivera-Rodriguez G, Torres D, Alonso MJ. Nanoterapias oncológicas: Aplicaciones actuales y perspectivas futuras. An la Real Acad Nac Farm. 2011;77(4):76–98.
 28. Malam Y, Loizidou M, Seifalian AM. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. Trends Pharmacol Sci. 2009; 30(11): 592–599.
 29. Mar A, Anaya O, Fajardo M. Theoretical study of the plasmon in gold. RevSocQuím Perú. 2019; 85(4): 432–439
 30. Martínez-Carmona M, Colilla M, Vallet-Regí M. Smart mesoporous nanomaterials for antitumor therapy. Nanomaterials. 2015; 5(4): 1906–1937.
 31. Mateo D, Morales P, Ávalos A, Haza A. Nanopartículas de oro: aplicaciones y citotoxicidad in vitro. Acta toxicológica argentina. 2013; 21(2): 102–109.
 32. Mayoral JB, Moreno AC, San Martín-Martínez E. Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. Am J Phys Educ. 2014; 8(4): 4319-4324.
 33. Oliva Montero JM. *Copa de Licurgo: cuando ciencia y arte se dan la mano para hacer historia*. MOLEQLA, 2013; 11.
 34. Organización Mundial de la Salud. Cáncer. [en línea]. [Consultado en Septiembre de 2020] Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
 35. Oropesa R, Jáuregui U. Las nanopartículas como portadores de fármacos: características y perspectivas Nanoparticles as drug carriers: characteristics and perspectives. CENIC Ciencias Biológicas. 2012; 43(3): 1-20.
 36. Paredes A, Blanco JL, Echenique-Elizondo M. Expression of multidrug resistance (MDR)-associated proteins in solid tumors. Cir Esp. 2006; 79(4): 202–214.
 37. Pérez-Juste J, Pastoriza-Santos I, Liz-Marzán LM, Mulvaney P. Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications. Coord Chem Rev. 2005; 249(17–18): 1870–901.
 38. Petros RA, Desimone JM. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. Nat Rev Drug Discov. 2010; 9(8): 615–627.

39. Rastinehad AR, Anastos H, Wajswol E, Winoker JS, Sfakianos JP, Doppalapudi SK, et al. Gold nanoshell-localized photothermal ablation of prostate tumors in a clinical pilot device study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019; 116(37): 18590–18596.
40. Rivera A, Guzmán R. Espectroscopia Raman de Nanopartículas de Oro y usos Biomédicos. *Jovenes en la Cienc*. 2015; 1(2): 1481–1485.
41. Rojas-Aguirre Y, Aguado-Castrejón K, González-Méndez I. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer?. *Educación Química*. 2016; 27: 286-291.
42. Saha RN, Vasanthakumar S, Bende G, Snehalatha M. Nanoparticulate drug delivery systems for cancer chemotherapy. *Mol Membr Biol*. 2010; 27(7): 215–231.
43. Shelar SB, Gawali SL, Barick KC, Kunwar A, Mohan A, Priyadarsini IK, et al. Electrostatically bound lanreotide peptide - gold nanoparticle conjugates for enhanced uptake in SSTR2-positive cancer cells. *Mater Sci Eng C*. 2020; 117: 1–12.
44. Siddique S, Chow JCL. Gold nanoparticles for drug delivery and cancer therapy. *Appl Sci*. 2020; 10(11): 1-21.
45. Solomon R, Gabizon AA. Clinical pharmacology of liposomal anthracyclines: Focus on pegylated liposomal doxorubicin. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2008; 8(1): 21–32.
46. Steichen SD, Caldorera-Moore M, Peppas NA. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *Eur J Pharm Sci*. 2013; 48(3): 416–427.
47. Tovar GN, Maldonado LA. Liposomas : nanoburbujas de lípidos con aplicaciones en biomedicina. 2018; 229(1): 4–10.
48. Varela-fonseca S, Montero-zeledón E, Rojas- L, Varela-fonseca A, Gutiérrez-fallas D. Análisis de ADN mediante espectroscopía Raman utilizando el método SERS Raman spectroscopy analysis of DNA using the SERS method. *Tecnol en Marcha*. 2019; 32(3): 118–125.
49. Vitas AU de N, Díaz R, Gamazo C. Liposomas. Aplicaciones en terapia antimicrobiana y en inmunoprofilaxis. *Rev Med Univ Navarra*. 2017; 40(2): 100-109.
50. Wicki A, Witzigmann D, Balasubramanian V, Huwyler J. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. *J Control Release*. 2015; 200: 138–157.
51. Yang X, Yang M, Pang B, Vara M, Xia Y. Gold Nanomaterials at Work in Biomedicine. *Chem Rev*. 2015; 115(19): 10410–10488.
52. Yi-Tao Long and Chao Jing. Localized Surface Plasmon Resonance Based Nanobiosensors. 1th edition. New York: Springer; 2014.