

NUEVAS ESTRATEGIAS EN LA ADMINISTRACIÓN Y LIBERACIÓN DE DOXORRUBICINA



Alumna: Nerea Rebollo Moro

**TRABAJO FIN DE GRADO
FACULTAD DE FARMACIA**

Tutor: Julia Álvarez Malmagro

Co-tutor: Dr. Francisco Prieto Dapena



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
GRADO EN FARMACIA

TRABAJO FIN DE GRADO

**NUEVAS ESTRATEGIAS EN LA ADMINISTRACIÓN Y
LIBERACIÓN DE DOXORRUBICINA**

Alumna: Nerea Rebollo Moro

Sevilla, 7 de Septiembre de 2016

Departamento de Química-Física

Tutor: Julia Álvarez Malmagro

Co-tutor: Dr. Francisco Prieto Dapena

Trabajo de Revisión Bibliográfica

ABREVIATURAS

ALN: alendronato

AuNPs: nanopartículas de oro

AuNPs-DOX: nanopartículas de oro con doxorubicina

BHE: barrera hematoencefálica

CS: quitosano

DLNP: doxorubicina liposomal no pegilada

DLP: doxorubicina liposomal pegilada

DNR: daunorrubicina

DOX: doxorubicina

EPP: eritrodistesia palmo-plantar

ERO: especies reactivas de oxígeno

FEVI: fracción de eyección ventricular izquierda

FOL: folato

GST: glutatión S-transferasa

Hyd: hidrazona

IRM: imagen de resonancia magnética

IV: vía intravenosa

mAb: anticuerpo monoclonal

MDOX: doxorubicina micelar

MNPs: nanopartículas magnéticas

MNPs-DOX: nanopartículas magnéticas con doxorubicina

NIR: regiones cercanas al infrarrojo

NPs: nanopartículas

PE: fosfatidiletanolamina

PEG: polietilenglicol

PLA: poliácido láctico

PP: *Peltophorum pterocarpum*

SMF: sistema mononuclear fagocítico

SPIONs: nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético

topo II: topoisomerasa II

Vd: volumen de distribución

INDICE

1. RESUMEN	5
2. INTRODUCCIÓN	6
2.1. Doxorubicina.....	6
2.2. Técnicas clásicas de administración y liberación de DOX.....	8
2.3. Problemas de las técnicas clásicas de administración y liberación de DOX.....	10
2.4. Técnicas modernas usadas para la administración y liberación de fármacos y ventajas que presentan	12
3. OBJETIVOS	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS	14
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
5.1. Administración y liberación liposomal de Doxorubicina	15
5.1.1. Doxorubicina liposomal no pegilada (DLNP).....	16
5.1.2. Doxorubicina liposomal pegilada (DLP).....	18
5.1.3. Diferencias entre las doxorubicinas liposomales.....	21
5.1.4. Liposomas multifuncionales.....	21
5.2. Administración y liberación de Doxorubicina a través de nanopartículas metálicas	22
5.2.1. Nanopartículas de oro con doxorubicina (AuNPs-DOX).....	22
5.3. Nanopartículas magnéticas con doxorubicina (MNPs-DOX).....	25
5.4. La administración y liberación micelar de Doxorubicina	27
5.4.1. Micelas conjugadas con DOX.....	28
6. CONCLUSIONES	31
7. BIBLIOGRAFÍA	33

1. RESUMEN

La doxorubicina es una antraciclina que se utiliza para el tratamiento del cáncer. Plantea desventajas potenciales tales como la toxicidad debido a la baja permanencia plasmática y distribución indiscriminada en el organismo, que hace que las células sanas resulten también afectadas. También provoca incapacidad de alcanzar concentraciones lo suficientemente elevadas en el sitio de acción y fenómenos de resistencia. En base a esto, surge la doxorubicina liposomal no pegilada que a pesar de tener ventajas con respecto a doxorubicina convencional, presenta el inconveniente de la captación de liposomas por el sistema fagocítico mononuclear que impide su distribución en los tumores sólidos por su eliminación rápida de la circulación. Entonces, se desarrolla la doxorubicina liposomal pegilada que resuelve el problema de la rápida eliminación aumentando su vida media en la sangre.

Ambas formulaciones aumentan el aporte en la localización de la enfermedad en comparación con la dosis equivalente a doxorubicina convencional. Pero el reto sigue siendo lograr la acumulación de doxorubicina liposomal en el tejido tumoral, por ello la doxorubicina se conjuga con inmunoliposoma.

Para alcanzar estos objetivos de forma específica se diseñan nanopartículas recubiertas con polímeros, gracias a los cuales permanecen en el torrente circulatorio sin ser eliminadas y aumentan la acumulación de doxorubicina en el tejido tumoral. Este tipo de nanopartículas presentan mayores ventajas que las formas liposomales ya que superan y aumentan la selectividad de doxorubicina hacia las células tumorales, mientras que reducen la toxicidad en los tejidos sanos. Producen gran apoptosis del tejido tumoral y también mejoran la resistencia del fármaco convencional. Por otro lado, se han desarrollado también micelas conjugadas con doxorubicina que al igual que las nanopartículas anteriores destaca entre ellas su gran captación intracelular, permeabilidad, resistencia, menor citotoxicidad y mayor capacidad de inhibición del ciclo celular que la doxorubicina convencional.

Palabras claves: Doxorubicina, liposomas, nanopartículas metálicas y micelas

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Doxorrubicina

A principio de la década de los sesenta se obtuvo el primer antibiótico de la serie de las antraciclinas con actividad citotóxica, la daunorrubicina (DNR), obtenida del *Streptomyces peucetius*. Su derivado, la doxorrubicina (DOX), fue obtenida de una mutante (var *peucetius*) que mostró mayor y más extensa actividad biológica (Flórez y cols., 2014).

Estructura química

La DOX es un glicósido con carácter anfótero ya que por un lado posee grupos fenólicos del anillo que le aportan carácter ácido y por otro lado presenta una función básica en el anillo de amino-azúcar. Finalmente el anillo de antraciclina le aporta a la molécula carácter lipofílico.

DOX y DNR (*Figura 1*) comparten restos aglicónico y azúcar. La aglicona consiste en un anillo tetracíclico (responsable del color rojo típico de las antraciclinas) con grupos quinona-hidroquinona adyacentes en los anillos C-B, un sustituyente metoxi en C-4 en el anillo D, y una cadena lateral corta en C-9 con un carbonilo en C-13. El azúcar, llamado daunosamina, se une mediante un enlace glucosídico al C-7 del anillo A y se compone de un resto de 3-amino-2, 3, 6- tridesoxi-L-fucosiltransferasa. La única diferencia entre DOX y DNR es que la cadena lateral de DOX termina con un alcohol primario, mientras que la DNR termina con un metilo. Esta pequeña diferencia tiene consecuencias importantes en el espectro de actividad de DOX y DNR (Minotti y cols., 2004).

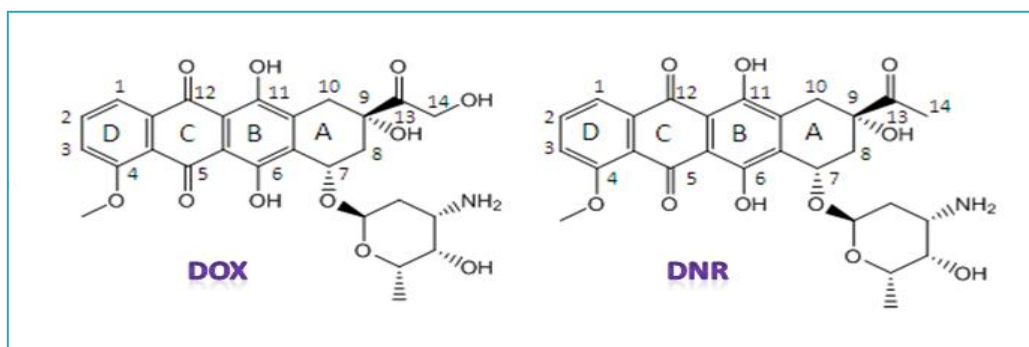


Figura 1: Estructura de DOX y DNR. Adaptado de ref (Minotti y cols., 2004)

La aglicona policíclica es esencial para la intercalación de DOX entre las hebras del ADN, mientras que el amino-azúcar, estabiliza la intercalación por interacciones electrostáticas con los grupos fosfatos cargados negativamente en la cadena de ADN (Kubeček y cols., 2015).

Mecanismo de acción

La DOX bloquea la síntesis de ARN y ADN. Las células en fase S son más sensibles a éste agente debido a que en esta fase se sintetiza el ADN de la célula hija y cuando la DOX se une, la célula no puede continuar el ciclo celular ni dividirse.

Destaca su capacidad para intercalarse entre los pares de bases adyacentes de ADN y fijarse con intensidad diversa. Esta acción modifica las propiedades del ADN, pero por sí misma no es suficiente para ejercer su acción letal. Una de las acciones que actualmente se considera crítica es la inhibición de la topoisomerasa II (topo II). La actividad funcional de esta enzima es necesaria para la replicación de ADN, transcripción, recombinación y remodelación de la cromatina (Flórez y cols., 2014).

DOX se fija al complejo binario ADN-topo II formando un complejo ternario, de gran estabilidad que facilita la rotura irreversible tanto de cadenas sencillas como de cadenas dobles de ADN. De hecho, células en las que una mutación provoca una alteración de la topo-II (at-mdr) se hace resistente a la DOX (y a otros antineoplásicos, originando así una de las formas de resistencia múltiple); por el contrario, células con aumento de los niveles de topo II se vuelven hipersensibles a DOX (Flórez y cols., 2014).

El metabolismo de ésta molécula también genera radicales libres de oxígeno que causan daño al ADN que puede dar lugar a mutaciones si no se repara adecuadamente (Gajewski y cols., 2007).

- **Ciclo de oxidoreducción de DOX:** la DOX reacciona con la NADPH-citocromo P450 reductasa, para formar radicales intermediarios de semiquinona (*Figura 2*). Además, la DOX posee una tendencia marcada para formar un complejo estable con el hierro (III), favoreciendo la reducción de éste hasta hierro (II) y originando en el proceso el radical libre de semiquinona. Estos radicales libres, pueden reaccionar rápidamente con el oxígeno para producir el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Estas especies reactivas de oxígeno (ERO) causan la peroxidación de los lípidos de

membrana y otros componentes celulares e inhiben la respiración celular, por daño a los componentes de la cadena de fosforilación oxidativa y a la membrana de la mitocondria (Muraoka y Miura, 2003; Minotti y cols., 2004).

También puede inhibir diversas enzimas relacionadas con el ADN y el ARN: polimerasas, helicasas y enzimas reparadoras.

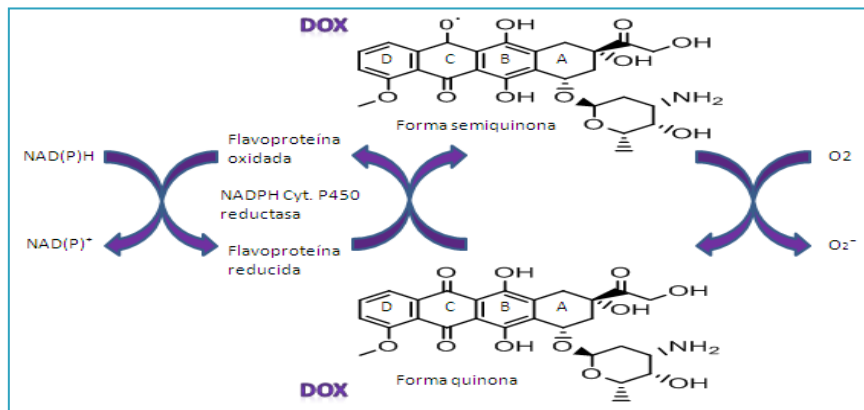


Figura 2: Ciclo de oxidoreducción de DOX. Adaptado de ref (Muraoka y Miura, 2003)

El resultado final de las interacciones y daños que producen las ERO con el entorno, será la apoptosis de la célula, aunque por varios mecanismos posibles.

Aplicaciones terapéuticas

Las antraciclinas se caracterizan por su amplio espectro. La DOX es la más empleada. Su actividad es máxima en leucemias aguda linfocítica y no linfocítica, cáncer de mama, pulmón (células pequeñas), linfoma, mieloma, neuroblastoma, sarcomas de hueso y tejido blando, timoma y tumor de Wilms. Es de segunda línea en el cáncer de ovario y de testículo, y tiene una actividad marginal en cáncer de vejiga, estómago, cabeza y cuello, tiroides, próstata y pulmón (cuando las células no son pequeñas). En cambio la DNR se reserva para casos de leucemia aguda (Flórez y cols., 2014).

2.2. Técnicas clásicas de administración y liberación de DOX

Administración

DOX se administra por vía intravenosa (IV) e intravesicalmente, pues se inactiva en el aparato digestivo, y no debe administrarse por vía oral, subcutánea, intramuscular o intratecal.

- **Administración por vía intravenosa:** se puede administrar en forma de inyección durante unos minutos, por perfusión corta de hasta una hora o continua de hasta 96 horas. La solución se administra mediante un sistema de tubo de flujo uniforme para perfusión intravenosa con una solución inyectable de cloruro de sodio a 9 mg/ml (0.9%) o con una solución inyectable de dextrosa a 50 mg/ml (5%) durante 2-15 minutos. Esta técnica minimiza el riesgo de tromboflebitis o extravasación perivenosa, que puede producir celulitis local, formación de vesículas y necrosis tisular grave (AEMPS, 2016).

La pauta posológica de la administración de DOX puede variar de acuerdo con la indicación (tumores sólidos o leucemia aguda) y de acuerdo con su uso en el régimen de tratamiento específico. Si es como agente único se suele calcular en base a la superficie corporal (mg/m^2). Sobre esta base, se recomienda una dosis de 60-75 mg/m^2 de superficie corporal cada tres semanas. Si es en combinación con otros agentes citotóxicos, tales como ciclofosfamida por vía IV a dosis altas o compuestos de antraciclina relacionados, como daunorubicina, idarubicina y/o epirubicina, la dosis de DOX debe reducirse a 30-60 mg/m^2 cada 3-4 semanas. En los pacientes que no pueden recibir la dosis completa por ejemplo, en caso de inmunosupresión, edad avanzada, una posología alternativa es de 15-20 mg/m^2 de superficie corporal por semana (AEMPS, 2016).

- **Administración intravesical:** se realiza mediante instilación intravesical en el tratamiento del carcinoma superficial de vejiga urinaria o en la profilaxis de la recidiva del tumor posterior a resección transuretral en pacientes con alto riesgo de recidiva. La dosis recomendada de DOX para el tratamiento intravesical local de los tumores superficiales de la vejiga urinaria es la instilación de 30-50 mg en 25-50 ml de solución de cloruro de sodio 9 mg/ml (0.9%) para inyección. La concentración óptima es de aproximadamente 1 mg/ml (0.1%). En general, la solución debe mantenerse intravesicalmente entre 1 y 2 horas. La instilación puede repetirse con un intervalo de entre 1 semana y 1 mes, dependiendo de si el tratamiento es terapéutico o profiláctico (AEMPS, 2016).

Liberación

La DOX se une a las proteínas plasmáticas y a otros componentes de los tejidos, donde se distribuye ampliamente. Su vía de eliminación principal es el sistema hepatobiliar.

2.3. Problemas de las técnicas clásicas de administración y liberación de DOX

Existen problemas de administración tanto intravenosa como intravesical y también en la liberación de DOX, produciendo como consecuencia numerosos efectos adversos y resistencia al fármaco:

- **Administración intravenosa**

No se recomienda una inyección intravenosa directa, debido al riesgo de extravasación (puede producir necrosis hística), que puede ocurrir incluso en presencia de retorno sanguíneo adecuado mediante aspiración con aguja. Una inyección perivenosa incorrecta se traduce en necrosis local y tromboflebitis (AEMPS, 2016).

- **Administración intravesical** puede causar síntomas de la cistitis química (es decir, disuria, polaquiuria, nicturia, estranguria, hematuria, necrosis de la pared de la vejiga) (AEMPS, 2016).

La DOX se absorbe mal por vía oral y atraviesa mal la barrera hematoencefálica (BHE): el 70% se une a proteínas plasmáticas y se metaboliza extensamente, uno de cuyos metabolitos, el doxorrubinol es más cardiotoxico y menos antitumoral que la DOX. Ambos se eliminan por bilis en el 40-50% y por la orina en el 5%. La vida media es de 18-30 horas (Flórez y cols., 2014).

Efectos adversos

Inicialmente si hay extravasación aparecen náuseas/vómitos, diarrea, signos de irritación local, estomatitis, y alopecia. Durante la segunda semana la mielodepresión alcanza su mayor grado, afectando en mayor proporción la serie blanca que la roja o las plaquetas. Existe una sinergia o sensibilidad entre antraciclinas y radiaciones, incrementando la toxicidad en órganos aunque no hayan sido irradiados directamente (Flórez y cols., 2014).

Las antraciclinas producen una **miocardiopatía tóxica** que es dependiente de la dosis, por lo que nunca debe sobrepasarse un umbral de dosis acumulada, que se ha establecido en 450-550 mg/m² para DOX. La toxicidad presenta varias formas:

-La cardiotoxicidad de DOX puede ser aguda, que ocurre durante los 2-3 días de su administración. La incidencia es aproximadamente del 11% y las manifestaciones

suelen ser dolor de pecho debido a la pericarditis, arritmias y disfunción ventricular (Chatterjee y cols., 2010).

-La cardiotoxicidad de DOX crónica es mucho más baja, con una incidencia estimada de aproximadamente 1.7%. Es evidente por lo general dentro de los 30 días de la administración de su última dosis, pero puede ocurrir incluso después de los 6-10 años de su administración. Los efectos crónicos de DOX son irreversibles y devastadores para el paciente e incluyen el desarrollo de cardiomiopatía y la insuficiencia cardíaca congestiva en última instancia (Chatterjee y cols., 2010).

El riesgo cardiotoxico puede disminuir si se administran las dosis de DOX con un ritmo semanal, en infusión continua o en asociación con desrazoxano. Se trata de un producto quelante intracelular que impide que el hierro intervenga en la transferencia de un electrón desde la DOX hasta el oxígeno molecular para generar radical libre de oxígeno; con ello disminuye la toxicidad cardíaca sin alterar la actividad antitumoral. Sin embargo, esta posible reducción del riesgo cardiológico origina otros problemas como leucopenia ligera, hipotensión, vida media de 2-4h y eliminación por orina sin modificar del 35-50% (Flórez y cols., 2014).

- **Otros efectos:**

Función hepática: los pacientes con concentraciones elevadas de bilirrubina pueden experimentar un aclaramiento más lento del fármaco, lo que conlleva un aumento general de la toxicidad (AEMPS, 2016).

Toxicidad hematológica: puede producir mielosupresión.

Leucemia secundaria: se han documentado casos de leucemia secundaria, con o sin fase preleucémica, en pacientes tratados con antraciclinas (DOX incluida). La leucemia secundaria es más común cuando estos medicamentos se administran en combinación con otros agentes antineoplásicos susceptibles de dañar al ADN, cuando los pacientes hayan recibido un intenso tratamiento previo con medicamentos citotóxicos o cuando se haya intensificado la dosis de antraciclinas. Estas leucemias pueden tener un período de latencia de 1 a 3 años (AEMPS, 2016).

Efectos gastrointestinales: puede producir náuseas, vómitos y mucositis. Se recomienda una profilaxis antiemética y no utilizar DOX en presencia de inflamaciones, ulceraciones o diarrea (AEMPS, 2016).

Infertilidad: puede tener efectos genotóxicos y puede causar infertilidad durante la administración del fármaco. En las mujeres, DOX puede causar amenorrea. DOX es mutagénica y puede provocar lesiones cromosómicas en los espermatozoides humanos.

Interacción con antineoplásicos: DOX puede potenciar la toxicidad de otros tratamientos antineoplásicos. Se han registrado casos de exacerbación de la cistitis hemorrágica inducida por ciclofosfamida y una mayor hepatotoxicidad de 6-mercaptopurina (AEMPS, 2016).

Síndrome de lisis tumoral: DOX puede inducir hiperuricemia como consecuencia del intenso catabolismo de la purina que acompaña a la rápida lisis de las células neoplásicas inducida por el fármaco (síndrome de lisis tumoral) (AEMPS, 2016).

Resistencia

Una causa importante del fracaso del tratamiento con DOX y otras antraciclinas es el desarrollo de resistencia por el organismo receptor, que puede ser causada por las administraciones repetidas.

Existen muchos mecanismos que podrían actuar simultáneamente para proteger las células cancerígenas de los agentes quimioterapéuticos tales como la DOX. Los cambios moleculares más frecuentemente identificados en la resistencia a la DOX son, la reducción en la concentración intracelular del fármaco, el aumento de las enzimas metabólicas del fármaco, tales como glutatión S-transferasa (GST), disminución de la actividad de topo II (se debe a modificaciones a anomalías en la topo II) y la insuficiencia de las vías de apoptosis (AbuHammad y Zihlif, 2013).

2.4. Técnicas modernas usadas para la administración y liberación de fármacos y ventajas que presentan

La nanotecnología es un campo multidisciplinar que tiene una gran importancia en la administración y liberación de fármacos a nanoescala. Ha permitido el desarrollo de vehículos de administración de fármacos a nanoescala, con la capacidad de encapsular una gran variedad de agentes terapéuticos.

Dentro de este amplio campo de investigación se incluyen las nanopartículas poliméricas, los dendrímeros, las nanocápsulas, los liposomas, las nanopartículas

inorgánicas / metálicas, las nanopartículas híbridas, las micelas y las nanopartículas magnéticas y bacterianas.

Esta tecnología es una alternativa prometedora para superar la toxicidad dependiente de la dosis (mielosupresión y cardiotoxicidad), la aparición de resistencia a múltiples fármacos y su baja especificidad contra las células cancerosas en la terapia del cáncer (Prados y cols., 2012).

Nanopartículas

Las nanopartículas (NPs) son sistemas matriciales elaborados a partir de una gran variedad de materiales de origen natural, semisintético o sintético, en su mayoría polímeros. Estas partículas microscópicas tienen una dimensión aproximada de decenas de nanómetros. Normalmente, el fármaco de interés es disuelto, encapsulado, adsorbido o adherido dentro o sobre nanocápsulas (sistema vesicular, en el cual el fármaco es confinado a una cavidad rodeada por una membrana polimérica) o nanoesferas (sistema matricial en el que el fármaco es física y uniformemente dispersado (Oropesa y Jáuregui, 2012).

Se ha demostrado que estas nuevas estrategias reducen los efectos secundarios sistémicos y aumentan la eficacia terapéutica del fármaco. De hecho, han resultado ser adecuadas para la administración IV, liberación sostenida del fármaco, orientación molecular y funciones terapéuticas (Prados y cols., 2012).

Otras ventajas de las NPs incluyen la facilidad en la modificación de la superficie, mayor encapsulación, la eficiencia y protección de la carga útil, gran área superficial en relación con el volumen, y la erosión del polímero lento o rápido para el control temporal sobre la liberación de fármacos (Susa y cols., 2009).

3. OBJETIVOS

DOX sigue siendo una herramienta esencial para la investigación, precisamente porque la molécula, su química, sus mecanismos de actividad, su comportamiento y eficacia son bien conocidos.

Es la antraciclina que más se utiliza para el tratamiento del cáncer, se administra por vía intravenosa e intravesicalmente y se elimina principalmente por la vía hepato-biliar. Su uso está limitado ya que este agente quimioterapéutico plantea desventajas potenciales tales como la toxicidad (cardiotoxicidad aguda y crónica, hepatotoxicidad, toxicidad

hematología, leucemia secundaria, efectos gastrointestinales, infertilidad y síndrome de lisis tumoral). Esto es debido a la baja permanencia plasmática (vida media 18-30 h) y distribución indiscriminada en el organismo, que hace que las células sanas resulten también afectadas. También puede producir fenómenos de resistencia causada por las administraciones repetidas.

El objetivo de esta revisión bibliográfica es conocer la situación actual de las nuevas estrategias de administración de DOX, especialmente aquellas diseñadas para:

- Mejorar la dirección específica de DOX a la zona patológica
- Aumentar la capacidad de alcanzar concentraciones de DOX lo suficientemente elevadas en el sitio de acción
- Minimizar los efectos secundarios de DOX
- Vencer la resistencia de DOX desarrollada por las células cancerosas

4. MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica de las principales fuentes y bases de datos (FAMA, Pubmed, Medline, CSIC, ProQuest, Dialnet, SciFinder y Scopus). También nos hemos basado en la información de la AEMPS y EMA. Hemos incluido datos de revistas y editoriales científicas como Pharmaceutical Journal, Royal Society of Chemistry, Elsevier, Cancer Biology & Therapy entre otras. Se han seleccionado artículos y documentos relevantes publicados en los últimos años, todos relacionados con el tema de este estudio.

Se ha incidido principalmente en aquellos artículos que tratan de la administración y liberación de DOX. La búsqueda ha sido realizada en inglés principalmente por ser la lengua universal en el campo científico, así como en castellano. Las palabras más relevantes utilizadas en estas búsquedas han sido: Doxorubicin, nanotechnology, liposomal doxorubicin, non-pegylated liposomal doxorubicin, pegylated liposomal doxorubicin, doxorubicin micelles, gold nanoparticles doxorubicin y magnetic nanoparticles doxorubicin.

Se han incluido artículos, revisiones y documentos publicados en los últimos años (2011-2016) ya que se pretende estudiar la situación actual de las nuevas estrategias de administración y liberación de DOX. Sin embargo, también se han incluido algunos

artículos relacionados con nuestro tema de estudio de años anteriores por su gran número de citas y con el objetivo de poder comparar la evolución de las técnicas.

Por último para gestionar todas las referencias bibliográficas y documentos hemos utilizado Mendeley para identificar, gestionar, clasificar y referenciar los artículos científicos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Administración y liberación liposomal de Doxorubicina

Los liposomas son vesículas esféricas compuestas de fosfolípidos y colesterol. Debido a la naturaleza anfifílica de los fosfolípidos, en medios acuosos se pueden autoasociar en bicapas, cuya estructura puede permitir encapsular un interior acuoso. Las moléculas anfifílicas de los fosfolípidos forman una bicapa cerrada de manera que intentan proteger sus grupos hidrófobos del medio acuoso, mientras se mantiene en contacto con la fase acuosa a través del grupo de la cabeza hidrofílica. Los medicamentos muy hidrofóbicos, como DOX, pueden ser encapsulados en estos liposomas, en el interior de la bicapa fosfolipídica o en su interfase. Aunque los liposomas varían mucho en tamaño, la mayoría son menores de 400 nm y han demostrado ser útiles para la entrega de agentes farmacéuticos. Además, presentan un carácter inerte, elevada biocompatibilidad, perfiles de toxicidad y antigenicidad bastante aceptables (Oropesa y Jáuregui, 2012).

Por otro lado se desarrollan nuevas formulaciones de la DOX, con los mismos efectos antitumorales, pero con menor toxicidad cardíaca. Entre estas opciones destacan la asociación de DOX con otras moléculas, por ejemplo, con complejos liposomales o la pegilación.

Concretamente la pegilación consiste en la unión covalente del polietilenglicol (PEG) a la membrana lipídica y sirve para mejorar las propiedades fisicoquímicas de los fármacos ya que evita que los liposomas sean detectados por sistema mononuclear fagocítico (SMF), aumentando así el tiempo de permanencia en sangre.

Se ha encontrado que estas formulaciones dificultan la distribución en los tejidos normales y serían más selectivas para los tejidos con vascularización tumoral. Sin embargo los estudios sobre la DOX liposomal se han desarrollado principalmente para

abordar los problemas de toxicidad aguda y crónica que se producen como consecuencia del uso de este medicamento (Abraham y cols., 2005).

Estos sistemas tienden a secuestrar el fármaco lejos de órganos como el corazón, con mayor acumulación en el hígado, el bazo y tumores (Waterhouse y cols., 2001). Además permiten que los pacientes puedan recibir dosis más altas del fármaco en el tumor (Flórez y cols., 2014).

En esta línea surgieron las formas liposomales: doxorubicina liposomal no pegilada (DLNP), doxorubicina liposomal pegilada (DLP) y liposomas multifuncionales.

5.1.1. Doxorubicina liposomal no pegilada (DLNP)

Aplicaciones terapéuticas

Se puede combinar con ciclofosfamida y está indicado para el tratamiento de primera línea del carcinoma de mama metastásico en mujeres adultas (EMA, 2016).

Posología y forma de administración

DLNP es administrado por vía intravenosa durante 1 hora y debe reconstituirse con sodio y posteriormente diluirse antes de la administración. Se requiere una concentración final de entre 0.4 y 1.2 mg/ml de DOX. Cuando se administra DLNP en combinación con ciclofosfamida (600 mg/m²), la dosis inicial recomendada es de 60 a 75 mg/m² cada tres semanas, en cambio si se administra DOX la dosis sería de 30-60 mg/m² (EMA, 2016).

Toxicidad

Puede producir mielosupresión y además se considera irritante en el lugar de inyección. También puede ocasionar numerosas reacciones agudas relacionadas con las perfusiones liposómicas cuando la perfusión se ha realizado de forma rápida. Los síntomas incluyen: sofocos, disnea, fiebre, hinchazón facial, cefalea, dolor de espalda, escalofríos, opresión en el pecho y garganta y/o hipotensión (EMA, 2016).

Un metaanálisis mostró una tasa inferior de trastornos gastrointestinales, de manera estadísticamente significativa, de náuseas/vómitos y de diarrea en los pacientes tratados con DLNP versus DOX convencional (EMA, 2016).

Los análisis de cardiotoxicidad en los ensayos clínicos han demostrado una reducción estadísticamente significativa de los episodios cardíacos en los pacientes tratados con DLNP, en comparación con los pacientes tratados con la misma dosis (en mg) de DOX. Un metaanálisis mostró una tasa inferior, de manera estadísticamente significativa, tanto de la insuficiencia cardíaca clínica (RR = 0.20, p = 0.02) como de la insuficiencia

cardíaca clínica y subclínica combinada (RR = 0.38, $p < 0.0001$) en los pacientes tratados con DLNP versus DOX convencional. Un análisis retrospectivo en pacientes que habían recibido previamente DOX en adyuvancia (log-rank $P = 0.001$, razón de riesgo (hazard ratio) = 5.42), ha mostrado también la reducción del riesgo de toxicidad cardíaca. Sin embargo no se dispone de experiencia DLNP en pacientes con antecedentes de enfermedad cardiovascular. Por consiguiente, se debe tener precaución en pacientes con insuficiencia cardíaca (EMA, 2016).

DLNP-ciclofosfamida y taxanos demostraron eficacia y buena tolerancia en pacientes con cáncer de mama con contraindicación a las antraciclinas convencionales. El tratamiento fue bien tolerado, el único efecto secundario posiblemente relacionado con la administración de DLNP era eritrodisestesia palmo-plantar (EPP) que se observó en el 8% de los pacientes. Este efecto por lo general estaba relacionado con la dosis acumulativa que se produce con dosis mayores de 180 mg/m^2 (Vici y cols., 2014).

La ausencia de cualquier toxicidad cardíaca sintomática, la baja incidencia del (8%) y la disminución de la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) parecen confirmar la seguridad cardíaca de DLNP como tratamiento neoadyuvante, incluso en pacientes de edad avanzada. Al ser desprovisto de cardiotoxicidad significativa y con un índice terapéutico favorable, incluso en los pacientes de edad avanzada, puede ser de importancia en la práctica clínica habitual (Vici y cols., 2014).

Se confirmó un perfil de toxicidad favorable, lo que sugiere que DLNP como la quimioterapia primaria puede mejorar el índice terapéutico en pacientes no aptos a la recepción de DOX convencional.

En general DLNP es tolerado, sin nueva o inesperada toxicidad y sin aumento en la incidencia o gravedad de la toxicidad conocida de DOX (Airoldi y cols., 2011).

Farmacocinética

Los niveles en plasma de DOX total son considerablemente más altos con DLNP que con DOX convencional. Los datos farmacocinéticos disponibles imposibilitan las conclusiones con respecto a la relación entre los niveles plasmáticos de DOX libre/total y su influencia en la eficacia/seguridad de DLNP. La eliminación de la DOX total fue de $5.1 + 4.8 \text{ l/h}$ y el volumen de distribución (Vd) en estado de equilibrio fue de $56.6 + 61.5 \text{ l}$ mientras que, después de la DOX convencional, la eliminación y el Vd fueron de $46.7 + 9.6 \text{ l/h}$ y $145 \text{ l} + 258 \text{ l}$, respectivamente. El principal metabolito circulante de la DOX, el doxorubicinol. Se sabe que la DOX es excretada principalmente por el hígado

y que la eliminación urinaria es baja. Demostrándose que es conveniente disminuir la dosis de DLNP en pacientes con insuficiencia hepática (EMA, 2016).

También DOX encapsulada en liposomas en comparación con la convencional no resultó ser más activa en las líneas celulares resistentes a la DOX in vitro (EMA, 2016).

En general:

- 1) Puede ser administrado de forma segura hasta alta dosis acumulada y puede representar un fármaco atractivo para los pacientes que requiere la reexposición antraciclina.
- 2) Puede ser considerado una opción en el tratamiento adyuvante para los pacientes con mayor riesgo cardiológico.
- 3) En combinación con ciclofosfamida, está indicado para el tratamiento de primera línea del carcinoma de mama metastásico debido a la baja cardiotoxicidad, que permite una mayor acumulación de dosis (Airoldi y cols., 2011).

Un problema de los liposomas de primera generación es que pueden ser detectados por el sistema mononuclear fagocítico (SMF) y como consecuencia es eliminado rápidamente de la circulación, impidiendo la distribución a tumores sólidos. Por lo tanto, se están desarrollando liposomas con la superficie modificada, por lo general derivados de PEG. Esto resolverá un problema, ya que aumentará la vida media en la sangre (Wang y cols., 2008).

5.1.2. Doxorrubicina liposomal pegilada (DLP)

Representa una formulación mejorada de la DOX convencional. Es DOX clorhidrato encapsulada en liposomas cuya superficie se cubre con una capa densa de PEG unido covalentemente a la membrana lipídica.

Esta formulación conduce a un significativo cambio en el perfil de toxicidad, farmacocinética y propiedades del fármaco original (Kubeček y cols., 2015).

Aplicaciones terapéuticas

Está indicado actualmente para el tratamiento de sarcoma de Kaposi asociado a SIDA, cáncer de ovario y de mama metastásicos en los que existe un riesgo cardíaco aumentado. También en combinación con bortezomib se aplica para el tratamiento de mieloma múltiple progresivo en pacientes que hayan recibido al menos un tratamiento

previo y que ya hayan recibido un trasplante de médula ósea o no sean candidatos a recibirlo (EMA, 2016).

Posología y forma de administración

La dosis de administración es 35-70 mg/m².

No se debe administrar en forma de inyección en bolus o en solución sin diluir. Se recomienda que el gotero se conecte lateralmente a una perfusión intravenosa de glucosa al 5 % (50 mg/ml) para conseguir una mayor dilución y reducir el riesgo de trombosis y extravasación (EMA, 2016).

Toxicidad

El perfil toxicológico es bastante diferente de la de DOX convencional, los efectos adversos más comunes son EPP (síndrome mano-pie) y mucositis. La incidencia de mucositis principalmente es por la cantidad de DLP que se administra como una dosis única, a diferencia del síndrome que se asocia más bien con la intensidad de dosis (Kubeček y cols., 2015).

EPP fue notificada con mayor frecuencia en ensayos clínicos en mujeres con cáncer de mama/ovario (50 mg/m² cada 4 semanas). La incidencia global notificada de EPP fue del 44.0% - 46.1 %. Estas reacciones fueron principalmente leves, siendo graves (grado 3) entre un 17% y un 19.5 % de las mismas. Esta reacción se caracteriza por erupciones cutáneas dolorosas con enrojecimiento macular y aparece generalmente tras dos o tres ciclos de tratamiento. Los pacientes suelen experimentar mejoría en una o dos semanas, aunque en algunos casos, la recuperación completa puede llevar hasta 4 semanas o más. También se detectaron frecuentemente en las poblaciones de pacientes con cáncer de mama/ovario casos de estomatitis/mucositis y náuseas, mientras que en los pacientes con sarcoma de Kaposi asociado con SIDA (20 mg/m² cada 2 semanas), la reacción adversa más frecuente fue la mielosupresión, principalmente leucopenia (EMA, 2016).

El empleo profiláctico de pyridosina, inhibición de vasodilatación y la inducción de actividades (duchas calientes, la exposición de sol), entre otros reducen estas toxicidades (Kubeček y cols., 2015).

En pacientes con tumores sólidos, incluyendo un subgrupo de pacientes con cáncer de mama y de ovario, tratados a una dosis de 50 mg/m²/ciclo con dosis acumuladas de antraciclina de por vida de hasta 1532 mg/m², la incidencia de alteración cardíaca clínicamente significativa fue baja. De los 418 pacientes tratados con 50 mg/m²/ciclo de DLP, y con una medida basal de FEVI, 88 pacientes recibieron una dosis acumulada de antraciclina > 400 mg/m², nivel de exposición asociado con un aumento del riesgo de

toxicidad cardiovascular con DOX convencional. Sólo 13 de estos 88 pacientes (15 %) presentaron una alteración en su FEVI clínicamente significativa, definida como un valor de FEVI menor del 45 % o una disminución de por lo menos 20 puntos respecto al basal. No obstante, en pacientes con enfermedad cardíaca que requiera tratamiento, sólo se administrará DLP cuando el beneficio supere el riesgo para el paciente (EMA, 2016). Por lo tanto, la cardiotoxicidad, el efecto secundario principal de DOX, es significativamente reducida en DLP, así como la incidencia de la alopecia, mielosupresión, náuseas y vómitos (Kubeček y cols., 2015).

Otros efectos que puede producir son: reacción de perfusión como reacción alérgica, reacción anafilactoide, asma, edema facial, hipotensión, vasodilatación, etc.

También se han notificado casos muy raros de cáncer oral secundario en pacientes expuestos a DLP durante un periodo de tiempo prolongado (más de un año) o en aquellos que reciben una dosis acumulada de DLP mayor de 720 mg/m^2 . Los casos de cáncer oral secundario fueron diagnosticados durante el tratamiento con DLP así como hasta 6 años después de la última dosis. Por último, se debe tener precaución en pacientes diabéticos, ya que cada vial de DLP contiene sacarosa y la dosis se administra en solución para perfusión intravenosa de glucosa al 5 % (50 mg/ml) (EMA, 2016).

Farmacocinética

Los liposomas pegilados contienen grupos PEG unidos a la superficie que crean una capa protectora que ayuda a reducir las interacciones lipídicas y los componentes del plasma. Esto permite que los liposomas de DLP circulen durante períodos prolongados de tiempo por el flujo sanguíneo. Al ser suficientemente pequeños pasan intactos (extravasación) a través de los vasos sanguíneos defectuosos que riegan los tumores. Los liposomas pegilados también tienen una matriz lipídica de baja permeabilidad y un sistema regulador acuoso interno que se combinan para mantener la DOX clorhidrato encapsulada durante el tiempo de permanencia del liposoma en circulación.

A diferencia de DOX convencional, el volumen de distribución (Vd) de DLP es muy pequeño (2.72 l/m^2) limitándose fundamentalmente al volumen del fluido vascular (EMA, 2016).

En general, estas propiedades incluyen una vida media prolongada de 60-90 horas (en comparación a la de DOX con sólo 20-30 horas), pérdida mínima del fármaco desde la circulación de los liposomas, y distribución preferente en el tejido tumoral. Casi el 100% de la dosis administrada permanece encapsulado en liposomas después de infusión intravenosa de DLP (Kubeček y cols., 2015).

La eliminación no está influenciada por la función renal. El 5% de la dosis se excreta en la orina como DOX, doxorubicinol u otros metabolitos.

5.1.3. Diferencias entre las doxorubicinas liposomales

La diferencia más significativa radica en las alteraciones que causan los liposomas en la rapidez de eliminación de DOX del plasma. DLP incluye una vida media más prolongada, una pérdida mínima del fármaco desde la circulación de los liposomas, y además presenta un mayor aporte del fármaco a zonas de crecimiento tumoral en comparación con DLNP. Casi el 100% de la dosis administrada permanece encapsulado en liposomas después de infusión intravenosa.

Esto refleja un perfil de toxicidad del fármaco en el que la reacción adversa de EPP no aparece descrita en la ficha técnica de la DLNP, pero sí lo hace con baja incidencia en los ensayos clínicos previos a su comercialización. Por el contrario, este efecto adverso es mucho más frecuente con DLP.

Ambas formulaciones aumentan el aporte en la localización de la enfermedad en comparación con las dosis equivalentes de DOX convencional.

Estas formulaciones están actualmente comercializadas DLNP (**Myocet®**) y DLP (**Caelyx®**).

El problema que surge con los liposomas de larga circulación es que pueden presentar una liberación lenta de DOX, entonces se desarrollan numerosas estrategias para superar este problema.

5.1.4. Liposomas multifuncionales

Estos liposomas tienen la capacidad de dirigirse específicamente y reconocer algunas células y órganos del cuerpo, gracias a la presencia de varios elementos como péptidos que penetran en las células, y sobre todo por el uso de inmunoliposomas dirigidos a antígenos intracelulares (Torchilin, 2006).

En un estudio se obtuvieron liposomas multifuncionales modificando la DLP. Estos presentaban un péptido de penetración celular (TAT) que estaba conjugado por un enlace sensible al pH ácido del tumor con polietilenglicol-fosfatidiletanolamina (PEG-PE), para proteger el péptido de la degradación. Además este complejo también contenía un anticuerpo monoclonal anti-nucleosoma (2C5) (Apte y cols., 2014).

Estos liposomas multifuncionales administrados por inyección intravenosa mostraron una menor citotoxicidad que DLP en las líneas celulares sensibles y resistentes al

fármaco. Por otra parte, tuvieron un efecto anticancerígeno superior a DLP, por la reducción del volumen, el peso final del tumor, y la mayor apoptosis, ya que se demostró que los liposomas multifuncionales con el péptido TAT sensible al pH presentaba una mayor acumulación de DOX en el tejido tumoral que DLP y que los liposomas multifuncionales conjugados no sensibles al pH (Apte y cols., 2014).

También se han desarrollado liposomas sensibles a otros estímulos como la temperatura, campo magnético, sistemas redox o formación de complejos moleculares.

De esta forma, la modificación de liposomas multifuncionales cargados con DOX resulta ser una herramienta eficaz para superar la resistencia a DOX y para la entrega segura del fármaco en los tejidos tumorales.

5.2. Administración y liberación de Doxorrubicina a través de nanopartículas metálicas

Los materiales inorgánicos han sido ampliamente estudiados para formación de imágenes mediante resonancia magnética nuclear, mientras que sus propiedades intrínsecas han sido exploradas para terapia. Existen varios tipos de nanopartículas metálicas, dentro de los cuales cabe destacar las nanopartículas de oro (AuNPs) y las nanopartículas magnéticas (MNPs).

5.2.1. Nanopartículas de oro con doxorrubicina (AuNPs-DOX)

Las AuNPs suscitan gran interés tanto por sus propiedades como por sus posibles aplicaciones en biomedicina. Vienen siendo ampliamente estudiadas tanto desde el punto de vista de sus propiedades químicas: reconocimiento molecular, reactividad; como de sus propiedades biológicas: bioconjugados, ensamblajes ADN-AuNPs, sensores de glucosa, etc o de sus propiedades físicas: ópticas, electroquímicas o electrostáticas (Villanueva, 2012).

Las AuNPs poseen un enlace covalente de alta afinidad química entre el grupo tiol y el oro. De forma general se sintetiza mediante reacciones de óxido-reducción, partiendo de soluciones diluidas de ácido tetracloroáurico: $\text{H}[\text{AuCl}_4] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ como precursor, en presencia de reductores orgánicos, (citrato trisódico: $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; tartrato de sodio y potasio: $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) y utilizando borohidruro sódico: NaBH_4 como agente reductor inorgánico. En función del agente reductor utilizado es relativamente sencillo controlar el tamaño de las nanopartículas que se obtiene (Corzo, 2012).

Como consecuencia de la diversidad de tamaños las nanopartículas van a presentar diferentes propiedades. En el caso concreto de la DOX al ser las NPs biocompatibles y altamente estables en diversos medios fisiológicos, se ha podido diseñar y desarrollar un sistema eficiente de administración para este fármaco. De esta forma las AuNPs se utilizan como vehículos, que contiene DOX (B-Au-PP-400-DOX) como se esquematiza en la *figura 3*. Para su diseño primeramente se usó 400µl de un extracto de hoja de la planta medicinal *Peltophorum pterocarpum* (PP). Dicho extracto acuoso se utilizó para la biosíntesis de las AuNPs. Para ello, se le adicionó H[AuCl₄] y NaBH₄ para llevar a cabo el proceso de reducción. Después, a esta mezcla de reacción se añadió gota a gota PEG-6000 y por último para preparar dicho sistema de administración de fármacos se incubó con DOX durante 1h. (Mukherjee y cols., 2015).

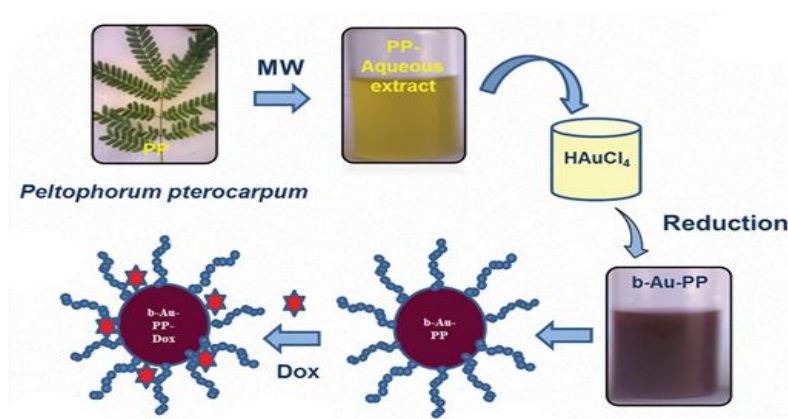


Figura 3: Diseño y desarrollo de B-Au-PP-400-DOX. Tomado de ref (Mukherjee y cols., 2015)

Este complejo (B-Au-PP-400-DOX) en comparación con la DOX convencional, mostró a través de estudios *in vitro* e *in vivo* una inhibición significativa de la proliferación celular de las células cancerígenas y una reducción del crecimiento del tumor respectivamente. También, demostró la captación celular rápida y liberación sostenida de DOX en forma de oro nanoconjugado en comparación con la DOX no conjugada. Además, el estudio *in vivo* no mostró cambios significativos en la hematología, bioquímica clínica en suero, o de la histopatología. Asimismo se estudió la biodistribución de DOX convencional y DOX nanoconjugada *in vivo*, para ello fueron administradas por vía intraperitoneal en dos ocasiones (2h y 24h), al cabo de este tiempo se tomaron muestras del hígado, riñón, bazo y pulmón. Al comparar ambas

administraciones, fue evidente que la administración del nanoconjugado mostraba una mayor concentración de DOX en los tumores aislados (Mukherjee y cols., 2015).

Otro estudio también comprueba la baja toxicidad que demuestra estas NPs conjugadas, demostrando ser cardioprotectoras, debido a la alteración de la farmacocinética y farmacodinámica de esta formulación. El efecto mejorado de permeabilidad y retención hace que estas NPs se acumulen selectivamente en tejidos tumorales. Mientras que, DOX convencional (en células B16) se ajusta a un modelo de acumulación de fármaco lenta, Au-DOX se ajusta a un patrón de alta eficacia. En la captación de DOX y Au-DOX en células, Au-DOX era capaz de entrar en los núcleos de células B16 después de aproximadamente 4 h de incubación, mientras que DOX convencional entra en núcleos de cardiomiocitos ya que muestran mayor sensibilidad que Au-DOX. Además, se sugiere que el conjugado Au-DOX es un agente útil para superar la resistencia de DOX de las células cancerosas resistentes a la apoptosis, y que podría reducir la toxicidad en otros órganos, en particular el corazón (Tawagi y cols., 2015).

Con este tipo de AuNPs, también es muy común utilizar diversas estrategias para obtener eficacia suficiente y lograr compensar la cinética de liberación lenta y la falta de especificidad de la célula. Concretamente la estrategia más popular es la liberación desde nanovehículos dependiente del pH que generalmente se internalizan en las células por endocitosis, y terminan en endosomas / lisosomas, donde los valores de pH disminuyen (6.5 a 4.5) y pueden acelerar la liberación. Además, se sabe que el tumor es más ácido (6.8 hasta 6.9) que los tejidos sanos (7.4), por lo que la liberación dependiente del pH es especialmente atractiva para el logro de la orientación del tumor (Gautier y cols., 2013). Otra estrategia importante, es la terapia fototérmica de tumores, que utiliza la capacidad de las AuNPs para absorber la luz en el espectro visible y en las regiones cercanas al infrarrojo (NIR). Se ha demostrado que los láseres NIR se pueden usar para excitar electrónicamente y vibracionalmente las NPs metálicas. La posterior relajación energética se produce transmitiendo calor al entorno, aumentando la temperatura e induciendo la liberación de DOX de los nanocompuestos. Las nanocápsulas de Au cargadas con DOX mataron a las células cancerosas después de haber sido irradiado por luz NIR y mostraron un efecto sinérgico de la quimioterapia y la terapia fototérmica (Wu y cols., 2011).

Finalmente es posible ampliar el rango de aplicación de estas AuNPs funcionalizando su superficie. En concreto ha sido muy estudiada la modificación con PEG que permite

prolongar el tiempo de circulación del nanotransportador, evitar la agregación y mejorar la absorción y la eliminación de las AuNPs.

5.3. Nanopartículas magnéticas con doxorrubicina (MNPs-DOX)

Puede que las MNPs sean las más interesantes en el transporte y en la liberación controlada de fármacos antitumorales como DOX.

Las MNPs están compuestas por elementos magnéticos tales como hierro, níquel, cobalto y sus óxidos. Están formadas por magnetita (Fe_3O_4) o maghemita (Fe_2O_3) nanocristalinas aislada por una cubierta polimérica. Presentan alta biocompatibilidad y fácil degradación en el organismo. Los recubrimientos de estas NPs suelen ser diversos entre ellos se pueden destacar el polisacárido de dextrano, PEG, polivinilglicol, con buenas propiedades emulsionantes y el quitosano que proporciona una envoltura catiónica e hidrofílica. En ausencia de estos recubrimientos se producen agregados de gran tamaño incompatibles con su uso terapéutico, ya que producen obstrucción de pequeños capilares. Por lo tanto, se utiliza una barrera polimérica biodegradable mostrando una menor toxicidad y mayor biocompatibilidad.

Para abordar algunos de los problemas convencionales de DOX, se desarrollaron las Nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético (SPIONs), que constan de un núcleo magnético de Fe_3O_4 . Este es un portador de fármaco, que posee propiedades magnéticas específicas, como ser un agente de contraste para imagen de resonancia magnética nuclear (IRM) eficaz para aumentar la detección y caracterización de los tumores en el cuerpo, pero tiene muchas desventajas, tales como baja solubilidad en agua y la falta de capacidad de orientación. Por lo tanto, es importante combinarlo para reducir los efectos secundarios de DOX en los tejidos sanos. Se combina con PEG, en el que una de las principales ventajas para SPIO con PEG (SPIO-PEG) como un portador de medicamentos es que se prolongó la vida media de DOX en la circulación de la sangre mediante la conjugación de DOX en la superficie de SPIO con PEG para reducir su degradación en el organismo. Se forma un enlace amida entre los grupos carboxilo de SPIO-PEG y los grupos amino de DOX. Esta conjugación es estable en medio acuoso. El grado de libertad de DOX en SPIO-PEG se limitó aún de evitar su distorsión molecular y por lo tanto aumentar su vida media. El experimento in vitro mostró que SPIO-PEG-DOX podría causar la reticulación del ADN, lo que resulta en una menor expresión del ADN y una mayor apoptosis de las células cancerosas (Liang y cols., 2016).

Un campo magnético local podría ayudar SPIO-PEG-DOX a dirigirse al tumor y a tener una mejor retención en el tiempo (*Figura 4*). El estudio mostró que los tumores tratados con SPIO-PEG-DOX bajo un campo magnético tenían una densidad de hierro intratumoral mucho más altos. También se demostró que se alcanzaba un tamaño del tumor significativamente menor con el empleo de un campo magnético local y que podía reducir los efectos secundarios de cardiotoxicidad y hepatotoxicidad (Liang y cols., 2016).

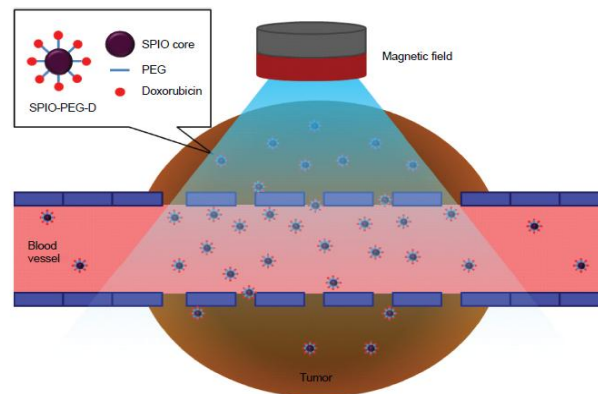


Figura 4: NPs SPIO conjugada con PEG y DOX bajo un campo magnético durante el tratamiento del tumor. Tomado de ref (Liang y cols., 2016)

Las MNPs revestidas de quitosano (CS), con enlace sensible al pH, presentan un carácter catiónico y solubilidad en medio de solución acuosa, de una alta biodegradabilidad y bioadhesividad. Se sintetizaron en diversos tamaños (CS-MNPs cargados con DOX) para la administración dirigida de DOX en las células (MCF-7) del cáncer de mama. Además, presentaron óptima eficiencia de carga y estabilidad. Las imágenes de microscopía de fluorescencia de este estudio revelaron que este complejo (DOX-MNPs-CS) fue absorbido por las células y se acumularon alrededor del núcleo, de manera que la DOX se dirige correctamente cerca del núcleo, donde el fármaco muestra su actividad anticancerígena. Son dirigidos a células tumorales bajo un campo magnético y parece ser un sistema eficaz para eliminar la resistencia a la DOX convencional en células de cáncer de mama (Unsoy y cols., 2014).

Las MNPs pueden responder a un campo magnético produciendo calor, esto es una propuesta interesante para eliminar las células tumorales mediante la terapia de hipertermia (basada en el aumento de la temperatura en la zona tumoral). Para ello se produce la inyección intratumoral del material magnético. Las ventajas son que MNPs

se depositan directamente en el sitio diana y la cantidad de MNPs se puede modular selectivamente basado en el tamaño del tumor.

Se propone una estrategia para mejorar el rendimiento y el resultado del tratamiento de calor para los tumores por hipertermia magnética, utilizando MNPs funcionalizadas a través de una interacción electrostática. Se utiliza nucleolina (N6L) la cual, selectivamente forma un complejo con el receptor sobreexpresado en la superficie celular de las células tumorales, esta molécula una vez internalizada, media los efectos letales de las células cancerosas. In vitro, el N6L mejoró la captación intracelular de MNPs, este requisito es fundamental para la liberación prolongada de DOX unida a MNPs. Los principales parámetros que influyen en la liberación de DOX y N6L son la fuerza iónica y la concentración de otras moléculas en el entorno de las MNPs. También este enfoque representa una estrategia sencilla en la práctica clínica cuando se inyecta por vía intratumoral ya que inhibe el crecimiento del tumor (Kossatz y cols., 2015).

En general, estos estudios demuestran que estas NPs mediante métodos físicos como el magnetismo y la hipertemia, pueden conseguir dirigir y desencadenar la liberación de DOX de las partículas en el tejido tumoral. De esta forma superan y aumentan la selectividad de DOX hacia las células tumorales, mientras que reducen la toxicidad en los tejidos sanos. Además, producen gran apoptosis del tejido tumoral y también mejoran la resistencia de DOX.

5.4. La administración y liberación micelar de Doxorrubicina

Las micelas son partículas coloidales nanométricas, generalmente esféricas, con un interior hidrofóbico y un exterior hidrofílico (*Figura 5*). Son ampliamente utilizadas en la preparación de formulaciones farmacéuticas como agentes solubilizantes. Los fármacos pueden ser atrapados en el interior de las micelas o adherirse covalentemente a las superficies de ellas. El tamaño de estas partículas es inferior a 50 nm de diámetro (Oropesa y Jáuregui, 2012).

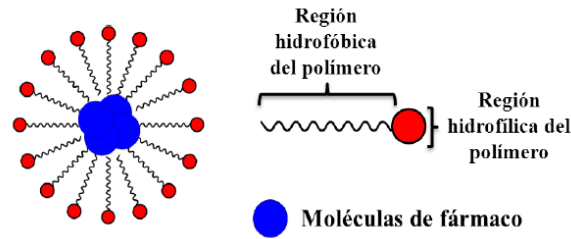


Figura 5: Esquema de una micela polimérica. Tomado de ref (Lollo, 2012)

Entre las ventajas que poseen los sistemas micelares se encuentran: su diámetro apropiado para un período prolongado de vida media en sangre evadiendo el sistema inmunológico del paciente, excreción completa por la ruta renal, capacidad de atravesar la BHE, no acumulación a largo plazo evitando el efecto de toxicidad, gran solubilidad en agua, elevada estabilidad estructural, microdepósito en el núcleo hidrófobo y funcionalidad separada.

Para facilitar simultáneamente la entrega de fármacos y el diagnóstico pueden diseñarse micelas poliméricas multifuncionales.

5.4.1. Micelas conjugadas con DOX

En la actualidad numerosos estudios demuestran las ventajas que poseen estos sistemas micelares.

La mayoría de los pacientes en fase clínica avanzada con cáncer de ovario podrían desarrollar resistencia a la terapia estándar. Sin embargo, se desarrolló una nueva formulación donde DOX se encapsuló en micelas de polieno fosfatidil etanolamina (PEG-PE) y se le adicionó un anticuerpo monoclonal de anti-nucleosoma (mAb 2C5) que es específico de este tipo de células cancerígenas. El conjugado PEG-PE combina PEG 2000 hidrófilo para evitar su rápida eliminación de la sangre, con PE hidrófobo del núcleo de la micela, para solubilizar DOX. Esta nueva formulación mejoró la distribución de DOX y se correlacionó con una inducción mayor en la muerte celular en comparación con las micelas no funcionalizadas (MDOX, DOX convencional). Se trata de una administración intraperitoneal de 2C5-MDOX el cual podía representar una modalidad terapéutica mejor del carcinoma de ovario primario (Perche y Torchilin, 2012).

En otro estudio se demostró tanto in vivo como in vitro que un tipo de micela polimérica cargada con DOX con sensibilidad al pH resultó ser eficaz para suprimir tumores sensibles y resistentes a múltiples fármacos de las células del cáncer de mama (MCF-7) (Lee y cols., 2005).

Al igual que los inmunoliposomas, las micelas poliméricas pueden modificarse con ligandos para la administración dirigida hacia células específicas.

Para reducir los efectos secundarios mínimos y aumentar la máxima eficacia terapéutica, se utiliza selectivamente folato (FOL), que se dirige específicamente a las células tumorales, ya que su receptor se encuentra sobreexpresado en dichas células. Este FOL presenta varias ventajas sobre diversos ligandos de orientación como transferrina, péptidos y anticuerpos. Estas ventajas son su pequeño tamaño, no inmunogenicidad, bajo peso molecular y estabilidad. Por lo tanto los sistemas micelares han sido modificados con el ligando específico FOL, para mejorar la especificidad del tumor y la captación tumoral de FOL mediada por el receptor.

Se sintetizó una micela caracterizada por el copolímero poliácido láctico (PLA)-PEG con FOL y DOX unido a través del enlace hidrazona sensible al pH (DOX-Hyd-PLA-PEG-FOL). Este copolímero fue comparado con DOX convencional y con las micelas DOX-Hyd-PLA-PEG. Como resultado se mostraba que los tres compuestos disminuían la viabilidad de las células (*Figura 6*). Pero, la concentración de DOX que inhibía el crecimiento celular en un 50% fue de DOX convencional 0.08 g/ml, de las micelas conjugada con DOX más FOL 4.65 g/ml y de las micelas con DOX 13.51 g / ml (Hami y cols., 2014).

En general, DOX convencional muestra mayor citotoxicidad debido a la rápida difusión en las células. También se demuestra que las micelas conjugadas con DOX más FOL presentan mayor citotoxicidad que las micelas sin FOL.

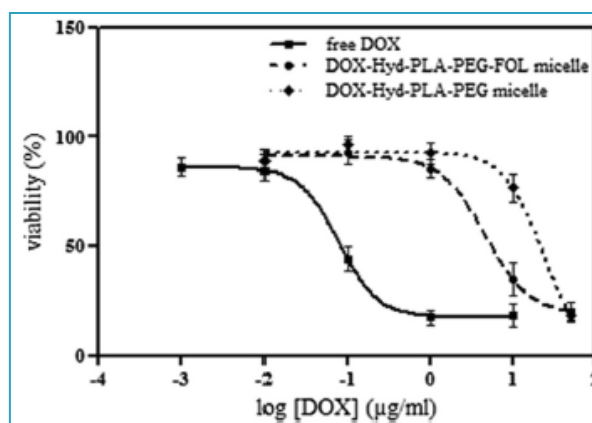


Figura 6: Citotoxicidad in vitro de DOX convencional y micelas DOX-Hyd-PLA-PEG conjugadas con FOL y sin FOL contra la línea celular (SKOV3) después 72 h. Tomado de ref (Hami y cols., 2014)

Otro ensayo demostró que el copolímero poli-DOX (Etilenglicol) –alendronato (DOX-hyd-PEG-ALN) aumentaba el efecto terapéutico de DOX en metástasis óseas. En este copolímero se empleó el alendronato (ALN), un bisfosfonato amino, que se utiliza para la prevención y tratamiento de osteoporosis, metástasis óseas de tumores y para otras enfermedades relacionadas con los huesos ya que se trata de un ligando de dirección ósea (Ye y cols., 2015). También se le atribuye la alta captación intracelular y la permeabilidad de las partículas poliméricas con el pequeño tamaño de las micelas. Además, este copolímero tuvo más capacidad de inhibición del ciclo celular que la DOX convencional.

Se verificó la capacidad de orientación activa de DOX-hyd-PEG-ALN. La micela DOX-hyd-PEG-ALN se administró por vía intravenosa (IV), redujo la distribución de DOX en el corazón y en el riñón en comparación con el tratamiento de DOX convencional y se acumuló en el sitio del tumor del hueso de la pierna, aumentando su actividad antitumoral y disminuyendo la toxicidad sistémica in vivo. Sin embargo, también había DOX en órganos perfundidos de la sangre, como el hígado y el pulmón, debido a la cantidad de sangre que pasa a través de estos órganos (Figura 6) (Ye y cols., 2015).

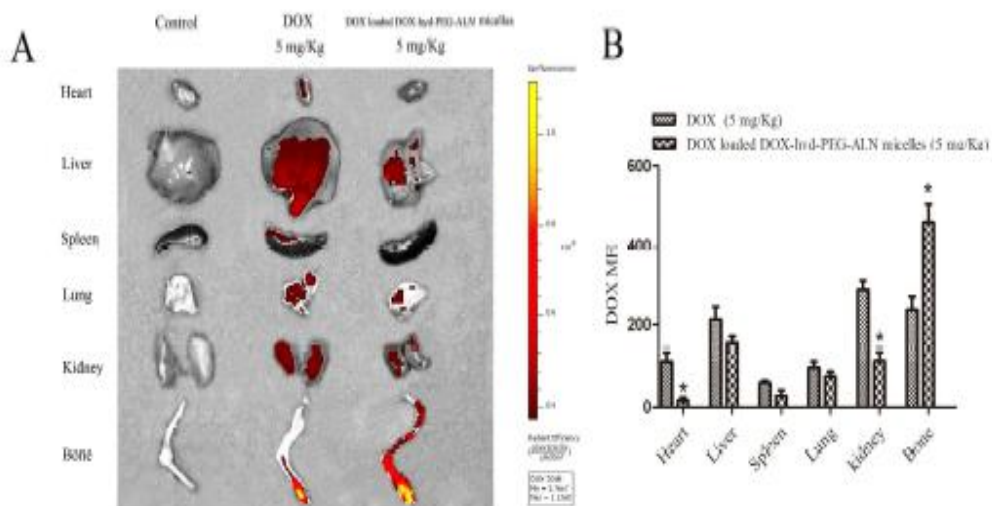


Figura 6. Distribución de DOX en tejidos a las 24h después de administrar por vía IV DOX convencional y la micela DOX-hyd-PEG-ALN (A). El análisis cuantitativo de imágenes in-vivo (B). Tomado de ref (Ye y cols., 2015)

En este caso los ratones objetos de ensayo que fueron tratados con las micelas DOX-hyd-PEG-ALN mostraron un retraso significativo en el crecimiento del tumor en comparación con los ratones tratados por la DOX convencional, sugiriendo que las micelas (DOX-hyd-PEG-ALN) podrían actuar como una plataforma ideal para ofrecer en tejidos tumorales de hueso una menor toxicidad sistémica (Ye y cols., 2015).

6. CONCLUSIONES

-DOX convencional es una antraciclina que se utiliza para el tratamiento del cáncer, pero su uso está limitado por la toxicidad (cardiotoxicidad, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad), la escasa especificidad tumoral, la baja acumulación del fármaco en la zona cancerosa y por fenómenos de resistencia. En base a esto surgen nuevos sistemas de administración y liberación de DOX que presentan grandes ventajas al compararse con la DOX convencional.

-La DLNP puede recibir dosis más alta de DOX en el tumor ($30-60 \text{ mg/m}^2$) y confirma un perfil de toxicidad favorable con mejora del índice terapéutico, ya que un metaanálisis mostró una tasa inferior, de manera estadísticamente significativa, tanto de la insuficiencia cardíaca clínica (RR = 0.20, p = 0.02) como de la insuficiencia cardíaca clínica y subclínica combinada (RR = 0.38, p < 0.0001) en los pacientes tratados con DLNP versus DOX convencional. Pero, el problema es que puede ser detectado por el

SMF y por lo tanto es eliminado rápidamente de la circulación. Además, no resultó ser más activa en las líneas celulares resistente a DOX *in vitro*.

-La DLP presenta baja cardiotoxicidad, tan sólo el 15 % de los pacientes presentaron una alteración cardiaca. Sin embargo, hay que destacar la reacción adversa de EPP que fue notificada del 44.0% - 46.1%. Este fármaco evita ser detectada por SMF, lo que aumenta su permanencia en la sangre con una vida media de 60-90 horas (en comparación a la de DOX con sólo 20-30 horas), produciendo un aumento de DOX en el tejido tumoral mayor que DLNP. Pero, el problema es la lenta liberación de DOX y poca especificidad.

-Los liposomas multifuncionales superan la liberación lenta de DOX utilizando un enlace sensible al pH ácido del tumor. Es una herramienta eficaz para superar la resistencia y la entrega segura de DOX en los tejidos tumorales, muestra un efecto terapéutico superior a la DLP.

-Las AuNPs y MNPs conjugadas con DOX presentan mayores ventajas que las formulaciones liposomales (DLNP y DLP), ya que son sistemas eficientes para la administración de DOX, siendo interesantes en el transporte y liberación controlada de DOX en los tejidos tumorales. Presentan ventajas de degradación enzimática, biocompatibilidad, aumentan la acumulación del fármaco convencional en el tejido tumoral, mejoran la resistencia, presentan reducción de la toxicidad sistémica, producen una gran apoptosis de las células cancerígenas y mejoran la direccionalidad de DOX hacia el tumor.

-El sistema micelar conjugado con DOX, utiliza ligandos al igual que los inmunoliposomas para la especificidad tumoral. Los resultados de la concentración de DOX que inhibía el crecimiento celular en un 50% fue de DOX convencional 0.08 g/ml, las micelas conjugada con DOX más FOL 4.65 g/ml y las micelas con DOX 13.51 g / ml queriendo decir, que DOX convencional muestra mayor citotoxicidad debido a la rápida difusión en las células y que las micelas conjugadas con DOX más FOL presentan mayor citotoxicidad que las micelas sin FOL. También este conjugado presenta una gran captación intracelular, permeabilidad, resistencia y mayor capacidad de inhibición del ciclo celular que la DOX convencional. En definitiva, aumenta la distribución y liberación selectiva de DOX al tumor produciendo mayor muerte celular y mejorando la actividad antitumoral *in vivo*.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abraham SA, Waterhouse DN, Mayer LD, Cullis PR, Madden TD, Bally MB. The Liposomal Formulation of Doxorubicin. *Methods Enzym.* 2005;391:71–97.
- AbuHammad S, Zihlif M. Gene expression alterations in doxorubicin resistant MCF7 breast cancer cell line. *Genomics.* 2013;101(4):213–20.
- Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios. CIMA: Centro de información Online de Medicamentos de la AEMPS [Internet]. [Consultado en Junio 2016]. Available from: http://aemps.gob.es/cima/dohtml/ft/73266/FichaTecnica_73266.html
- Agencia Europea del Medicamento. Human medicines [Internet]. [Consultado en Junio 2016]. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Product_Information/human/000297/WC500031811
- Agencia Europea del Medicamento. Human medicines. [Consultado en Junio 2016] [Internet]. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Product_Information/human/000089/WC500020180
- Airoldi M, Amadori D, Barni S, Cinieri S, De Placido S, Leo A Di, et al. Clinical activity and cardiac tolerability of non-pegylated liposomal doxorubicin in breast cancer: A synthetic review. *Tumori.* 2011;97(6):690–2.
- Apte A, Koren E, Koshkaryev A, Torchilin, Vladimir P . Doxorubicin in TAT peptide-modified multifunctional immunoliposomes demonstrates increased activity against both drug-sensitive and drug-resistant ovarian cancer models. *Cancer Biol Ther.* 2014;15(1):69–80.
- Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner, Joel S. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology.* 2010;115(2):155–62.
- Corzo Lucioni A. Síntesis de nanopartículas de oro obtenidas por reducción de H[AuCl₄]. *Rev la Soc Química del Perú.* 2012;78(2):79–90.
- Flórez Beledo J, Armijo Simón JA, Mediavilla Martínez A. *Farmacología humana.* 6^a

edición. Elsevier Masson; 2014.

- Gajewski E, Gaur S, Akman SA, Matsumoto L, van Balgooy JN, Doroshow JH. Oxidative DNA Base Damage in MCF-10A Breast Epithelial Cells at Clinically Achievable Concentrations of Doxorubicin. *Biochem Pharmacol.* 2007;73(12):1947–56.
- Gautier J, Allard-Vannier E, Munnier E, Soucé M, Chourpa I. Recent advances in theranostic nanocarriers of doxorubicin based on iron oxide and gold nanoparticles. *J Control Release.* 2013;169(1-2):48–61.
- Hami Z, Amini M, Ghazi-Khansari M, Rezayat SM, Gilani K. Synthesis and in vitro evaluation of a pH-sensitive PLA-PEG-folate based polymeric micelle for controlled delivery of docetaxel. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2014;116(1):309–17.
- Kossatz S, Grandke J, Couleaud P, Latorre A, Aires A, Crosbie-Staunton K, et al. Efficient treatment of breast cancer xenografts with multifunctionalized iron oxide nanoparticles combining magnetic hyperthermia and anti-cancer drug delivery. *Breast cancer Res BCR.* 2015;17:66.
- Kubeček O, Bláha M, Diaz-Garcia D, Filip S. Extracorporeal Elimination of Circulating Pegylated Liposomal Doxorubicin (PLD) to Enhance the Benefit of Cytostatic Therapy in Platinum-Resistant Ovarian Cancer Patients. *Acta medica (Hradec Králové) / Univ Carolina, Fac Medica Hradec Králové.* 2015;58(1):3–8.
- Lee ES, Na K, Bae YH. Doxorubicin loaded pH-sensitive polymeric micelles for reversal of resistant MCF-7 tumor. *J Control Release.* 2005;103(2):405–18.
- Liang P, Chiang C, Hsieh W. Doxorubicin-modified magnetic nanoparticles as a drug delivery system for magnetic resonance chemotherapy. 2016;2021–37.
- Lollo G. Nanocápsulas de poliaminoácidos para la liberación selectiva de fármacos antitumorales [Internet]. Universidad de Santiago de Compostela; 2012. Available from: https://dspace.usc.es/bitstream/10347/6082/1/rep_223.pdf
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and

- cardiotoxicity. *Pharmacol Rev.* 2004;56(2):185–229.
- Mukherjee S, Sau S, Madhuri D, Bollu. Green Synthesis and Characterization of Monodispersed Gold Nanoparticles: Toxicity Study , Delivery of Doxorubicin and Its Bio-Distribution in Mouse Model Green Synthesis and Characterization of Monodispersed Gold Nanoparticles: Toxicity Study , Deliver. 2015;165–81.
- Muraoka S, Miura T. Free radicals mediate cardiac toxicity induced by adriamycin. *Yakugaku Zasshi.* 2003;123(10):855–66.
- Oropesa Nuñez R, Jáuregui Haza UJ . Las nanopartículas como portadores de fármacos: características y perspectivas. *CENIC ciencias biológicas.* 2012;43(3).
- Perche F, Torchilin VP. Accumulation and toxicity of antibody-targeted doxorubicinloaded PEG-PE micelles in ovarian cancer cell spheroid model. *J Control Release.* 2012;164(1):95–102.
- Prados J, Melguizo C, Ortiz R, Velez C, Alvarez PJ, Arias JL, et al. Doxorubicin-Loaded Nanoparticles: New Advances in Breast Cancer Therapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 2012;12(9):1058–70.
- Susa M, Iyer AK, Ryu K, Hornicek FJ, Mankin H, Amiji MM, et al. Doxorubicin loaded Polymeric Nanoparticulate Delivery System to overcome drug resistance in osteosarcoma. *BMC Cancer.* 2009;9:399.
- Tawagi E, Massmann C, Chibli H, Nadeau JL. Differential toxicity of gold-doxorubicin in cancer cells vs. cardiomyocytes as measured by real-time growth assays and fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). *Analyst.* 2015;140(16):5732–41.
- Torchilin VP. Recent approaches to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting. *Annu Rev Biomed Eng.* 2006;8:343–75.
- Unsoy G, Khodadust R, Serap Yalcin, Mutlu P, Gunduz U. Synthesis of Doxorubicin loaded magnetic chitosan nanoparticles for pH responsive targeted drug delivery. *Eur J Pharm Sci.* 2014;62:243–50.
- Vici P, Pizzuti L, Gamucci T, Sergi D, Conti F, Zampa G, et al. Non-pegylated liposomal doxorubicin-cyclophosphamide in sequential regimens with taxanes as

- neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *J Cancer*. 2014;5(6):398–405.
- Villanueva Barrio J. Síntesis de nanopartículas de oro y plata y estudio de su deposición sobre nanoestructuras de base silícea [Internet]. Universidad de la Rioja; 2012. Available from: biblioteca.unirioja.es/tfe_e/TFE000187.pdf
- Wang X, Yang L, Chen ZG, Shin, Dong M. Application of nanotechnology in cancer therapy and imaging. *CA Cancer J Clin*. 2008;58(2):97–110.
- Waterhouse DN, Tardi PG, Mayer LD, Bally MB. A comparison of liposomal formulations of doxorubicin with drug administered in free form: changing toxicity profiles. *Drug Saf*. 2001;24(12):903–20.
- Wu C, Yu C, Chu M. A gold nanoshell with a silica inner shell synthesized using liposome templates for doxorubicin loading and near-infrared photothermal therapy. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:807–13.
- Ye W, Zhao Y, Li H, Na R, Li F, Mei Q, et al. Doxorubicin-poly (ethylene glycol)-alendronate self-assembled micelles for targeted therapy of bone metastatic cancer. *Sci Rep*. 2015;5:14614.