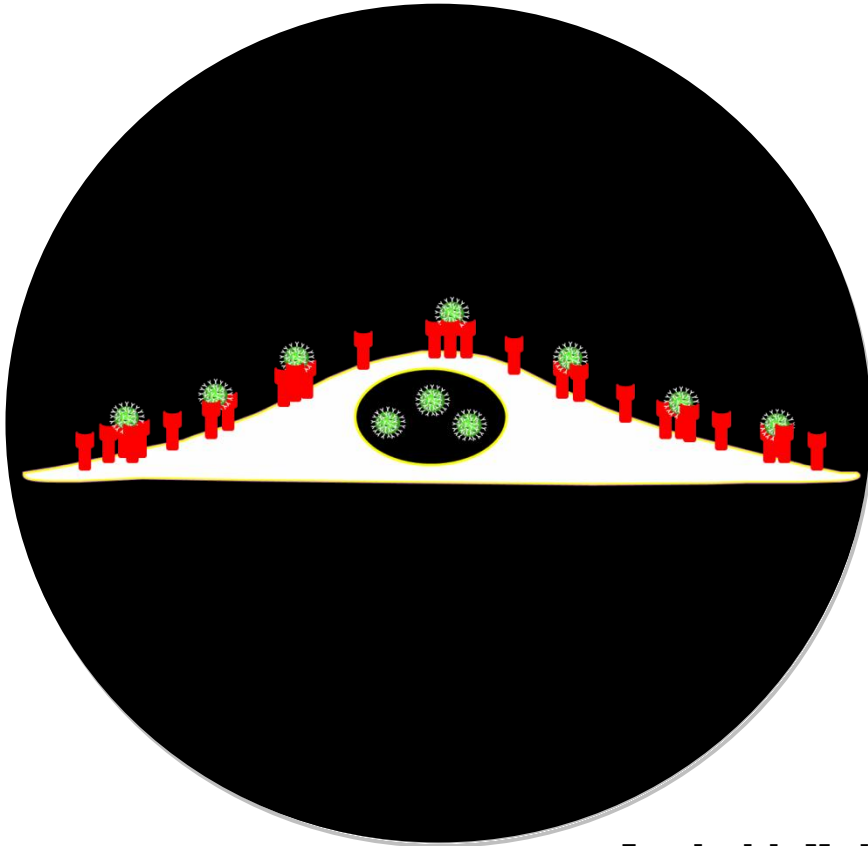


Desarrollo *in vitro* de nuevas terapias dirigidas con nanopartículas para el tratamiento del cáncer de tiroides



Facultad de Medicina
Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica
PROGRAMA DE DOCTORADO: Biología Molecular y Biomedicina

Memoria para optar al título de Doctor:

Flora M^a Gordillo Martínez

Directoras:

Carmen Garnacho Montero

Inés Martín Lacave

Tutor:

Juan José Toledo Aral



**Dpto. de Citología e Histología
Normal y Patológica**

Doña Carmen Garnacho Montero, Profesora Contratada Doctor de Biología Celular, y **Doña Inés Martín Lacave**, Catedrática de Histología, pertenecientes al *Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica* de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “**DESARROLLO “IN VITRO” DE NUEVAS TERAPIAS DIRIGIDAS CON NANOPARTÍCULAS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE TIROIDES**”, presentada por la Licenciada en Biología **Flora M^a Gordillo Martínez** para optar al **Grado de Doctor** por la Universidad de Sevilla, ha sido realizada bajo su dirección y en el *Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica*.

Y para que así conste, firman el presente certificado en Sevilla a 29 de Septiembre de 2014.

Fdo: Carmen Garnacho Montero

Fdo: Inés Martín Lacave

Con el Visto Bueno del Tutor:

Fdo: Juan José Toledo Aral

*La vida es un ensamblaje átomo a átomo, molécula a molécula,
de células que se organizan en un organismo complejo*
(entrevista de Eduard Punset a Harold Kroto, 2011)

AGRADECIMIENTOS

Desde aquella llamada telefónica a Isabel López Calderón a finales de septiembre del 2009, entrevista con los jefes del grupo de investigación en octubre, aceptación de la beca PIF para comenzar en enero del 2010, hasta el día de hoy, son muchas las personas que, de una manera u otra, han contribuido al desarrollo de esta tesis doctoral.

En primer lugar, quiero agradecer a Inés Martín Lacave su apoyo y confianza, por apostar por mí entre todos los candidatos, por su infinita paciencia para soportar mis peores momentos y gestionarlos. Porque el camino de la investigación es un trabajo arduo y lleno de dificultades, gracias por sus sabios consejos, entre ellos... “paciencia, paso a paso, unos pasos hacia delante y otros hacia atrás, pero siempre sumando”. Gracias por guiarme y asentar una buena base de Histología, su enseñanza ha permitido que una materia que en un principio rechazaba, actualmente me apasione, ha sido un auténtico placer comenzar este viaje alucinante al interior del cuerpo. Además, cuenta con mi más profunda admiración, por haber llegado tan lejos en un ambiente bastante hostil, tanto en el ámbito académico, como en el científico, espero que llegue el día en el que yo sea capaz también de tener su capacidad de trabajo. Pero sobre todo, gracias por su amistad que junto a la de Isabel, mi profesora de Genética preferida, son las mejores con las que alguien pueda contar.

En segundo lugar, a Carmen Garnacho Montero, responsable de iniciar esta nueva línea de investigación con nanopartículas, gracias por atreverse y encontrar la financiación necesaria para llevar a cabo este proyecto, porque si es complicado este camino, aún más el iniciarlo. Gracias por enseñarme a manipular los cultivos celulares, la microscopía de fluorescencia, a montar paneles de fotografías, libertad del diseño, a ser rigurosa y estricta con la toma de datos, más práctica y crítica... Gracias por su paciencia ante mi continuo escepticismo, porque soportar mis excesivas energías en algunos momentos, sobre todo en la recta final, no ha sido una tarea fácil, así como por entenderme cuando digo tan solo una parte de lo que pienso. Gracias por su exhaustiva y meticulosa corrección del presente manuscrito, porque como me enseñó en su momento mi padre, “las cosas bien hechas, bien aparecen” y he de reconocer que no he sido dotada con el don de la escritura, pero estoy satisfecha de todo lo que he aprendido y progresado. Gracias, Garnacho.

A Jose Carmelo Utrilla Alcolea (“Señor Utrilla”) agradecerle su apoyo incondicional, sus consejos sensatos en los mejores y peores momentos, su amparo, abrazos y confianza, porque ha sido una de las pocas personas que han logrado canalizar mis energías y alentarme para seguir hasta el final. Por demostrarme que se puede alcanzar el equilibrio entre la investigación-docencia-gestión, enseñarme la técnica de Inmuno-Histoquímica, observar e interpretar los cortes de los tejidos, las clases de Histología, los péptidos reguladores y sobre todo el cilio primario. Gracias, Utrilla, por impulsarme a ser mejor persona, profesora e investigadora.

A Jose M^a Fernández Santos (“El Maqui”) agradecerle su participación activa en el desarrollo de esta tesis, pendiente de los controles de los experimentos, también destacar su disponibilidad (en raras ocasiones es un holograma) y paciencia para solucionar todo tipo de problemas en el laboratorio, desde cambiar la bombilla del microscopio de fluorescencia, arreglar el autoclave, el dispensador de parafina... gracias por sus cursos intensivos de F.P., inteligencia, y, sobre todo, por contarme “las verdades de la vida”. ¡Salud! y que fluya la energía.

A mis compañeras de grupo Rocío y Viti. A Rocío agradecerle sus aportaciones durante las reuniones de investigación, ayuda para el mantenimiento del laboratorio, su apoyo moral, cante y baile en las celebraciones navideñas... al final terminamos juntas. A Viti por su ayuda para prepararme las clases prácticas de Histología, intentar prestarme un vestido en los servicios del Dpto., cantar conmigo de la uva sale el vino... en el autobús de Logroño, preocuparse por mi situación y por esas agradables charlas. Muchas gracias.

Al resto de profesores del Departamento, a Manolo de Miguel agradecerle su amabilidad y paciencia para enseñarme a manipular los animales, y que el sacrificio de éstos no me supusiera un trauma. A Amparo, por sus clases de Embriología y mi cuarto en Constantina (por estrenar). A Maite, Viki y Mati por sus palabras de ánimo. A Ana Moreno por sus clases de Histología, disposición y apoyo. A Ana Fernández (“la tita Ana”) por hacer del Departamento nuestra casa e integrarnos en una gran familia. Así como a los miembros que conforman el P.A.S.: Rosa, Auxi, Ana Mayoral, Loli y Manolo agradecerles su cariño y preocupación, sin ellos no seríamos una auténtica familia.

A Jesús, mi compañero de vida, grupo, piso, mi complemento perfecto y “sensei” particular, agradecerle su compañía, amor y aguante durante este camino. Porque “es más importante el camino que un destino” y sin ti no habría destino porque me hubiera caído en el camino, gracias *love*, juntos somos mucho más que dos.

A mis compañeros de despacho, Edu y Rafa. A Edu, agradecerle muchas cosas, la más importante, su continua ayuda para todo, con el tiempo se ha convertido en una de las personas con la que puedes contar. He de pedirle perdón por alguna que otra bronca... pero me suele ocurrir con mis seres más queridos. De la misma manera, a Rafa, nuestro revolucionario del grupo, agradecerle su apoyo y consejos. ¡Sin Ciencia no hay futuro! Gracias, chicos, por todos los momentos compartidos: ciencia, café, comida, música, la clase de expresión corporal en el curso de profesores noveles...

To Mr. John Leslie Brown, I want to thank him for his never ending patience in teaching English to gordillo's gene, a very complicated task. Thanks for all the coffees, talks, advices, celebrations, in that sense, it is awesome how the generations pass by while he is the only one who stays in the first line of fire. Above all, thanks for looking after me as father does. I will miss you a lot, especially to shout at You Cuckold! when you express yourself as a barbarian.

No me olvido de todas las personas que han formado parte del Dpto. durante estos años, a Inés Carmona, M^a José, Rosa Bautista, Reyes, Simona, Joaquín... que de una manera u otra, me han facilitado el día a día durante este periodo de mi vida. Así como de los últimos fichajes, Jéssica, Dévora y Natalia, en especial a Jéssica por no permitir que me quedara sin cenar los días de experimentos largos.

El camino de la tesis doctoral hubiese sido un auténtico calvario sin la cooperación y amistad con muchos miembros del Dpto. de Bioquímica: Victor, Flori, Ketama, Antonio, Isa, Jenni, Rocío, M^a Carmen Naranjo, Carmen González, Javi, Gonzalo... A los miembros del “San-e-Drink”, gracias por todas las celebraciones, cervezas al medio día, charlas, consejos, discusiones científicas y no tan científicas, bailes, caídas... sois unos auténticos “Makanes”, mio-loko.

A Antonio Carrillo, casi un jefe más, agradecerle sus consejos sobre la investigación, al final he conseguido llegar a la cima de la montaña, tan solo queda “poner la bandera”.

A Pinto, Ramón, Manolo y Tomás agradecerles su buen trato, cariño y amistad. Junto a los clientes habituales, Carmen Osuna, Leo, Juan Ramón, Ángel... gracias por las charlas y risas compartidas.

A mis compañeros del Máster en Investigación Biomédica agradecerles su colaboración para conseguir llegar a las clases en el lugar y hora adecuados, prácticas, seminarios, copas... Asimismo, a todos los profesores, en especial a Juan José Toledo Aral, por su confianza y facilitar todo el trámite administrativo de esta tesis doctoral.

A Eduardo Villalobo Polo (“Er Jefe”), y a todo el personal del Dpto. de Microbiología, agradecerles su acogida durante el año que tuve la beca de colaboración. A “Er Jefe” quiero darle las gracias por iniciarme en este mundo, a mantener el laboratorio limpio y ordenado, a ser metódica, disminuir el azar estandarizando reactivos, salidas a bares... Del mismo modo, a todos mis compañeros de la carrera.

A mis amigos de Usagre, agradecerles su apoyo, ánimos y comprensión, por hacer como si el tiempo no pasase, porque es una suerte contar con ellos. También, a todos los vecinos del pueblo, estoy orgullosa de pertenecer a un lugar con mucha calidad humana y hospitalidad. Usagre, sorpresa de Extremadura.

Termino con la familia, el origen de todo, a mi madre por enseñarme qué es la fortaleza, a pesar de todos los obstáculos que le pone la vida siempre saca la fuerza de voluntad necesaria para seguir adelante, además, con mucho estilo. Mamá, estoy muy orgullosa de ti, al igual que de mis hermanos Toni, Jaime y Miguel. A mis sobrinos, pedirles perdón por mis ausencias y agradecerles su amor. A mis cuñadas, tíos y primos gracias por vuestra paciencia y cariño. Espero que todos os sintáis orgullosos de mi, al igual que lo estaría mi padre y “los titos”.

A mi familia adoptiva, Jaime-Bueno y Mora-Bueno, en especial a Mechi, por ser tan buena persona y tratarme como a una más de la familia, no tengo suficientes palabras de agradecimiento. Y, por supuesto, a María, Loli y Manuel, por todo el amor, risas... gracias por hacerme entender la importancia que tiene el diseño y la presentación del trabajo.

A todos, mi más sincero agradecimiento:

Flora

...y que fluya la energía...

A MI FAMILIA, COMPAÑERO, AMIGOS Y PROFESORES

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Nanotecnología y Nanomedicina	1
1.1. Áreas de aplicación de la Nanomedicina	2
1.1.1. Nanoterapia	3
1.1.2. Nanodiagnóstico	6
1.1.3. Nanomedicina regenerativa	8
1.2. Nanotransportadores en Nanomedicina	9
2. Nanoterapia en cáncer	13
2.1. Direccionamiento pasivo de fármacos	15
2.1.1 Efecto de aumento de permeabilidad y retención	16
2.1.2. Aclaramiento plasmático de los NTs	18
2.2. Direccionamiento activo de los NTs	20
2.2.1. Selección de la diana	21
2.2.2. Selección del vector de direccionamiento	22
2.2.3. Internalización de los NTs	24
2.2.4. Transporte intracelular de los NTs	27
3. Tiroides y cáncer de tiroides	29
3.1. Estructura de la glándula tiroides	29
3.2. Tumores tiroideos	32
3.3. Dianas potenciales para el cáncer de tiroides	36
3.3.1. Receptor de TSH	38
3.3.2. Receptor del factor de crecimiento epidérmico	39
3.3.3. Receptor del factor de crecimiento vascular endotelial	41
4. Nanotransportadores en clínica	43
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	45
1. Planteamiento del tema e hipótesis	45
2. Objetivos	46

III. MATERIALES Y MÉTODOS	48
III.1. Materiales	48
1. Cultivos celulares	48
2. Anticuerpos	49
3. Fármacos	50
4. Otros materiales	51
III.2. Métodos	52
1. Detección de las dianas en la superficie celular	52
2. Preparación de las NPs	53
3. Unión de las NPs a las células	55
4. Método de doble marcaje fluorescente	56
5. Endocitosis de las NPs	59
6. Tráfico intracelular hacia los lisosomas	60
7. Cálculo del número de NPs unidas e internalizadas por la célula	62
8. Viabilidad/Citotoxicidad celular	62
9. Análisis estadístico	64
IV. RESULTADOS	65
1. Análisis de la expresión en superficie de las dianas celulares	65
2. Preparación de las NPs dirigidas	67
3. Unión específica de las NPs	69
4. Validación del método de doble marcaje fluorescente	72
5. Endocitosis de las NPs anti-EGFR por las células	75
5.1. Internalización tras 1h de incubación a 37°C	75
5.2. Cinética de internalización de las NPs anti-EGFR	78
5.3. Acumulación de NPs anti-EGFR en la superficie y en el interior celular	80
6. Tráfico hacia los lisosomas	87

7. Fármacos	90
7.1. Preparación y unión de las NPs anti-EGFR dirigidas conteniendo diferentes fármacos	90
7.2. Efecto citotóxico de las NPs anti-EGFR transportando diferentes fármacos	92
V. DISCUSIÓN	102
1. Selección de la diana y las NPs dirigidas.	104
1.1. Expresión de la diana en la superficie celular	104
1.2. Preparación de las diferentes NPs y estudio de su unión a las dianas celulares	106
1.3. Internalización de las NPs anti-EGFR	109
1.4. Tráfico intracelular de las NPs anti-EGFR hacia los lisosomas	113
2. Estudio con fármacos	114
2.1. Unión de las diferentes NPs con los fármacos	114
2.2. Efecto citotóxico	115
VI. CONCLUSIONES	121
VII. BIBLIOGRAFÍA	122
VIII. ANEXOS	i
1. Índice de Abreviaturas	i
2. Tablas de datos	iii



I INTRODUCCIÓN



I. INTRODUCCIÓN

1. Nanotecnología y Nanomedicina

La nanotecnología tiene sus raíces en la conferencia que ofreció en 1959 el premio Nobel de Física Richard Feynman, en el CalTech de California. Durante su famoso discurso titulado *“There is Plenty of Room at the Bottom”*, Feynman auguró nuevos descubrimientos en el caso de poder fabricar materiales de dimensiones atómicas o moleculares [1].

Sin embargo, no fue hasta años después cuando Eric Drexler, físico también de CalTech, introdujo el término nanotecnología en su libro *“Engines of Creation: The coming Era of Nanotechnology”* publicado en 1986, donde describe la idea de crear máquinas a escala nanométrica que operan a escala molecular [2].

La principal ventaja que ofrece el tamaño nanométrico es que la relación entre el número de átomos en la superficie con respecto al total (superficie/volumen) es de tipo exponencial, de tal manera que, a medida que disminuye el tamaño de la partícula, el área superficial por unidad de masa aumenta, lo que se traduce en un mayor número de átomos en la superficie [3-5]. El estudio y explotación de estas propiedades de la materia a escala nanométrica ha permitido el desarrollo de la **Nanotecnología** como un campo emergente de las ciencias aplicadas [6, 7].

El enorme avance de la nanotecnología durante las últimas décadas ha permitido el desarrollo de muchos campos diferentes, entre los que destacan la electrónica, el desarrollo de nuevos materiales, la energía y la medicina [4, 8, 9] (Figura 1). La aplicación de los conocimientos procedentes de la nanotecnología en el campo de la medicina, recibe el nombre de **Nanomedicina** [5,



7, 8, 10-12], caracterizada por ser un campo esencialmente multidisciplinar, en continuo crecimiento, y cohesionado exclusivamente por la escala de la materia con la que trabaja [5, 10-26].

1.1. Áreas de aplicación de la Nanomedicina

La aplicación de la nanotecnología en el campo de la Medicina tiene como principal objetivo aumentar la calidad de vida de los pacientes mediante el desarrollo de tratamientos más efectivos y personalizados [5, 14, 18-21, 23, 25, 27-38], técnicas más sensibles de detección de enfermedades [5, 6, 14, 18, 19, 29, 30, 34, 39], así como el desarrollo de la ingeniería tisular [16, 17, 40, 41]. Por lo tanto, la Nanomedicina se puede agrupar en tres áreas principales: nanoterapia, nanodiagnóstico y medicina regenerativa (Figura 1).

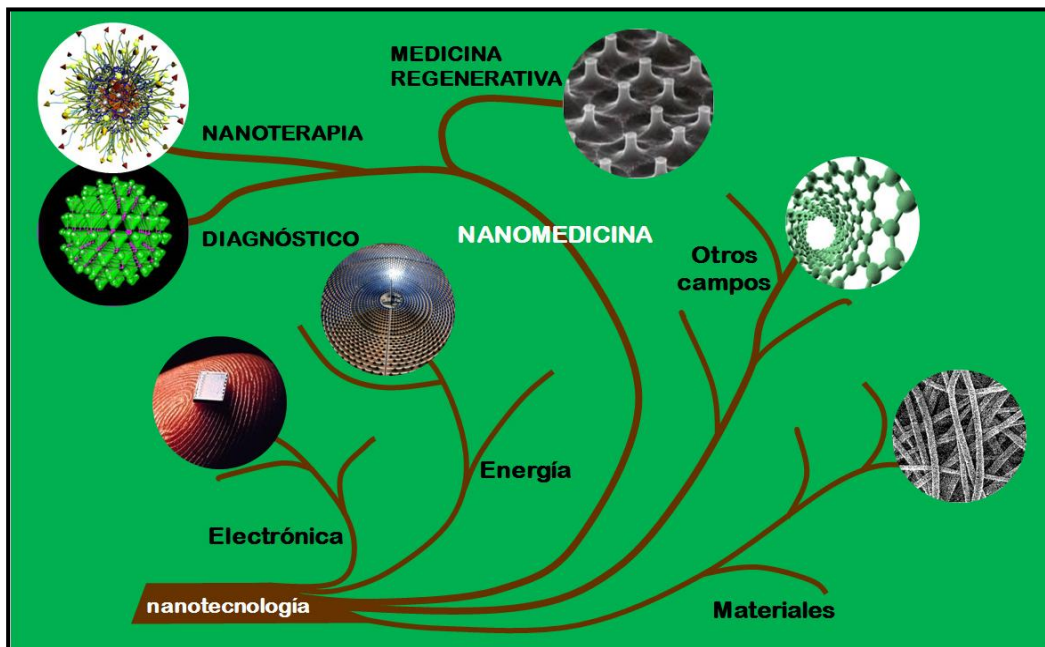


Figura 1. Nanotecnología y Nanomedicina. Representación esquemática de algunos campos donde se aplica la nanotecnología y áreas de aplicación de la nanomedicina.



1.1.1. Nanoterapia

La nanoterapia tiene como finalidad el desarrollo de nanosistemas activos que transporten y liberen el agente terapéutico en la zona afectada, con el fin de conseguir aumentar la eficacia terapéutica, a la vez que se minimizan los efectos secundarios [9, 14, 18-21, 23, 25, 27-35, 38].

En los sistemas de transporte de fármacos, el tamaño de los nanotransportadores (NTs) oscila entre 3 y 200 nm y pueden ser de distinto tipo, dependiendo del material utilizado para su fabricación: proteínas (albúmina), lípidos (liposomas), polímeros [polimerosomas, micelas, nanopartículas (NPs) o dendrímeros], virus (NTs virales), metales (NPs metálicas) y compuestos organometálicos (nanotubos) entre otros [4, 8, 20, 31-33, 38].

El uso de NTs de fármacos para el tratamiento de diversas enfermedades ofrece múltiples ventajas farmacológicas [24, 33, 36, 37, 42]. Cuando un fármaco o molécula biológicamente activa se administra de forma convencional (intravenosa, oral, etc.), el fármaco es liberado rápidamente al medio biológico y su comportamiento en el organismo es completamente dependiente de su estructura química. Por tanto, la absorción del fármaco a través de las membranas y su distribución en el organismo están determinadas por las propiedades físico-químicas de la molécula (tamaño, lipofilia, ionización, etc.) [36, 37]. Por el contrario, cuando la molécula activa se administra mediante NTs, son las propiedades físico-químicas de éstos (tamaño, características superficiales, etc.) las que condicionan su comportamiento en el organismo [24].

Además de las propiedades físico-químicas de la molécula en sí, la capacidad terapéutica de un fármaco viene determinada por



procesos relacionados con su comportamiento en el organismo, como son la vida media en circulación, su eliminación por ciertos órganos, transformación metabólica y su degradación. El desarrollo de NTs capaces de llevar el fármaco al lugar donde se necesita de manera más segura y eficiente, mejoraría el resultado terapéutico global [42].

Por un lado, la utilización de NTs retrasa la degradación e inactivación del agente terapéutico en el torrente sanguíneo. La inclusión en NTs protege la estructura del fármaco durante la circulación sanguínea al aislarlos de factores del medio externo que interfieren con su estructura, como son los cambios de pH y/o temperatura, la acción de proteasas, etc. Este retraso de la inactivación del fármaco aumenta la posibilidad de que pueda ejercer su actividad [8, 36, 37].

Además de estabilizar la estructura del fármaco, el uso de ciertos tipos de NTs ofrece la posibilidad de transportar agentes terapéuticos pocos solubles o hidrofóbicos. Esta ventaja es importante ya que existe una gran variedad de fármacos cuya efectividad se ha comprobado en estudios *in vitro*, pero que, debido a su naturaleza hidrofóbica, ocasionan serios problemas de toxicidad local e incluso embolia al agregarse tras su administración *in vivo*. Así pues, el uso de NTs de fármacos hidrofóbicos abre todo un frente de nuevas posibilidades terapéuticas [8, 12, 38].

Por otro lado, el uso de NTs permite aumentar la concentración del fármaco administrado. El hecho de que los fármacos se encuentren aislados o poco accesibles al ambiente externo, hace que se pueda aumentar la concentración por encima de la concentración tóxica, ya que el fármaco no interacciona o



interacciona poco durante su tránsito por el organismo hasta llegar al lugar afectado [36, 37].

Otra ventaja que ofrece el uso de NTs es el aumento del tiempo de circulación del fármaco en sangre. La administración del fármaco libre presenta un rápido aclaramiento renal, debido principalmente a su bajo peso molecular, mientras que el mayor tamaño de los NTs permite reducir la filtración renal [18], y por tanto, aumentar el tiempo de circulación en sangre. Por el contrario, los NTs son reconocidos por el sistema fagocítico mononuclear (SFM), previamente denominado sistema retículo-endotelial, principalmente en el hígado y en el bazo. Para evadir dicho reconocimiento, una de las estrategias más empleadas consiste en recubrir la superficie de los NTs con polietilenglicol (PEG) o polisacáridos [43, 44]. Este revestimiento con macromoléculas hidrofílicas proporciona una capa de hidratación que crea un “efecto tipo máscara”, que además de evitar la interacción del NT con el SFM, el sistema inmunitario y las células sanguíneas, también estabiliza estéricamente la partícula, previene la adsorción de proteínas y la interacción con otros NTs, evitándose así la formación de agregados [5, 43-45].

Todas las características anteriores hacen que la proporción de fármaco activo que llega al área patológica sea mayor al emplear NTs, por lo que la biodisponibilidad del fármaco es mayor y, por tanto, también es mayor el efecto terapéutico [33, 35, 37, 46, 47].



1.1.2. Nanodiagnóstico

El objetivo del nanodiagnóstico es el desarrollo de nuevos dispositivos de diagnóstico y pronóstico más eficaces que permitan detectar una enfermedad o un mal funcionamiento celular en los estadios más tempranos posibles. La detección temprana de la patología permitiría la inmediata aplicación de un tratamiento específico y personalizado, y un preciso seguimiento posterior de su evolución, consiguiéndose así un mejor pronóstico para el paciente. Las principales áreas de trabajo son dos: nanosistemas de imagen y nanobiosensores [5, 6, 9, 14, 18, 29, 30, 39].

Estos métodos de diagnóstico se pueden utilizar tanto *in vitro* como *in vivo*. El diagnóstico *in vitro* se puede aplicar a pequeñas muestras de fluidos corporales o de tejidos, a partir de las cuales se obtiene una detección específica (de patógenos o defectos genéticos, por ejemplo) en tiempos muy cortos, con gran precisión y sensibilidad [5]. Los principales dispositivos que se están desarrollando son los nanobiosensores, dispositivos capaces de detectar en tiempo real cualquier tipo de sustancia química o biológica. Están compuestos por un receptor biológico (proteínas, ADN, células, etc.), diseñado para detectar específicamente una sustancia, y un transductor o sensor capaz de medir la reacción de reconocimiento molecular biológico y traducirla en una señal cuantificable [39].

El diagnóstico *in vivo* implica que los nanodispositivos puedan penetrar en el organismo para, por ejemplo, identificar zonas patológicas como tumores, o la presencia de un determinado patógeno. La principal limitación que tienen las técnicas clásicas de diagnóstico, como son la imagen por resonancia magnética



(IRM) o la tomografía computerizada (TC), es que requieren de una señal suficientemente intensa procedente del área de interés para diferenciarla del resto de tejidos. Como consecuencia, la detección de la patología se produce generalmente en un estado avanzado de la enfermedad. Para solucionar este problema, se utilizan agentes de contraste específicos para cada modalidad de imagen que aumentan la señal del área patológica [18]. Sin embargo, ha sido el desarrollo de las herramientas nanotecnológicas lo que ha permitido la creación de técnicas de imagen más sensibles. Por ejemplo, el empleo de NPs semiconductoras (*quantum dots*, QDs) y NPs metálicas o magnéticas (oro para la IRM) como agentes de contraste permite detectar la zona de interés con alta resolución y mayor sensibilidad. Los QDs son un ejemplo de cómo la escala puede cambiar las propiedades de la materia. Cuando se reduce a unos pocos nanómetros (entre 1-10 nm) el tamaño de algunos materiales (CdSe, CdTe, etc.), se produce una modificación de su estructura electrónica que les confiere la capacidad de emitir fluorescencia en diferentes longitudes de onda. Por lo tanto, se pueden fabricar QDs del mismo material con distintos tamaños que emitan fluorescencia a diferentes longitudes de ondas [5, 9, 13].

Otra estrategia que se está utilizando para la identificación precisa de la región patológica es el empleo de vectores de direccionamiento que dirigen de forma específica los NTs conteniendo el agente de contraste al sitio patológico [39]. Para el transporte de agentes de contraste, los NTs que se han propuesto son principalmente los liposomas y las micelas, por el fácil control de sus propiedades y sus buenas características farmacológicas [18, 39].



La última tendencia en los estudios de nanoterapia y nanodiagnóstico consiste en la multifuncionalización de los NTs, de manera que se están investigando formulaciones que contienen el vector de direccionamiento, el agente de contraste y el agente terapéutico de manera simultánea, con la finalidad de detectar, monitorizar y tratar la patología en una misma estrategia. Este uso combinado de terapia y diagnóstico se ha denominado “theranostic” [14, 30].

1.1.3. Nanomedicina regenerativa

La nanomedicina regenerativa tiene como objetivo la reparación o sustitución de tejidos y órganos dañados usando herramientas nanotecnológicas [9, 16, 17, 40, 41].

La estrategia utilizada consiste en la estimulación de los propios mecanismos reparadores del organismo, mediante la aplicación de métodos procedentes de la terapia génica, la terapia celular y la dosificación de sustancias biorregenerativas. Se pretende favorecer el crecimiento tisular en la zona dañada, dirigiendo la proliferación y diferenciación celular, así como la producción y organización de la matriz extracelular de la zona dañada [41].

El primer reto de la ingeniería tisular es la generación de tejidos, y su finalidad última es la generación de órganos completos [17]. Para ello, se necesita, por un lado, el desarrollo a escala nanométrica de estructuras de soporte adecuadas que imiten a la matriz extracelular y que puedan actuar como incubadoras de líneas celulares [41] y, por otro lado, se precisa el desarrollo de la tecnología de células madre que mediante, principalmente, la manipulación del ambiente se induzca el proceso de diferenciación celular adecuado [48].



1.2. Nanotransportadores en Nanomedicina

Los NTs son los vehículos donde se transportan los fármacos. Actualmente, se están estudiando diversos tipos de NTs [4, 8, 13, 25, 27, 31, 33] que se pueden clasificar, atendiendo a la naturaleza del material utilizado para su fabricación, en orgánicos e inorgánicos (metálicos). Los NTs orgánicos pueden estar compuestos por lípidos (liposomas), polímeros (NPs poliméricas, polimerosomas, micelas o dendrímeros), virus, compuestos organometálicos (nanotubos), etc. [4, 8, 13, 25, 27, 31, 33].

Todos los NTs pueden ser, en mayor o menor medida, funcionalizados. Es decir, es posible añadir determinadas moléculas en la superficie del NT para modificar sus características. Por ejemplo, como se expondrá más adelante, con el fin de dirigirlos de forma específica al sitio de la enfermedad, los NTs pueden funcionalizarse superficialmente con el vector de direccionamiento [27] y, con la finalidad de aumentar el tiempo de circulación en sangre, se les puede incorporar una cubierta de polímeros hidrofílicos como el PEG (efecto máscara) [43].

En la Figura 2 se representan los NTs de fármacos que se utilizan con más frecuencia en experimentación.

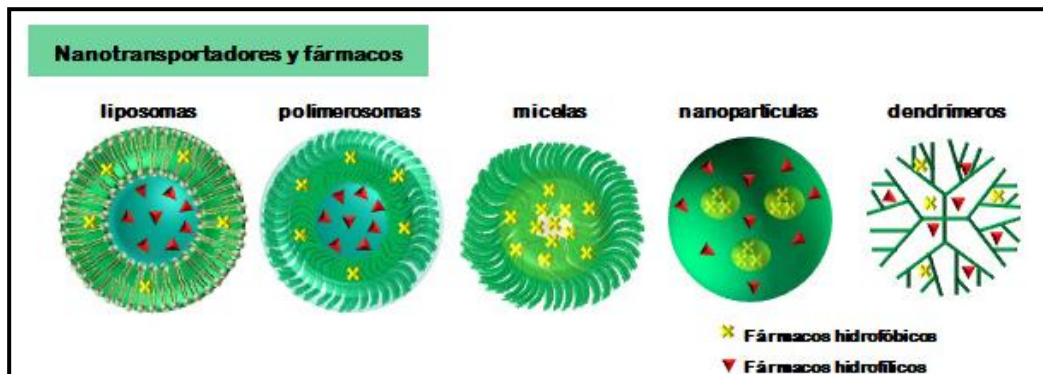


Figura 2. Representación esquemática de algunos tipos de NTs de fármacos utilizados en Nanomedicina.



Los **liposomas** son vesículas esféricas, con un tamaño aproximado de 100-200 nm, delimitados por una membrana formada por una bicapa de fosfolípidos. El liposoma presenta dos compartimentos diferentes, uno interno acuoso, y otro hidrofóbico en la bicapa lipídica, por lo que son capaces de transportar moléculas hidrofílicas (en el interior) y/o hidrofóbicas (en la membrana) simultáneamente. Las principales desventajas que presentan los liposomas son su inestabilidad en el plasma y un grado limitado de modificación de su superficie [18, 49].

Los **polimerosomas** son semejantes a los liposomas, pero en lugar de estar delimitados por una membrana de fosfolípidos presentan una bicapa formada por co-polímeros anfifílicos. A pesar de presentar, en comparación con los liposomas, la capacidad de cargar una mayor cantidad de agentes terapéuticos hidrofóbicos y una mayor versatilidad en las modificaciones de su superficie, sólo son recomendables para fármacos pequeños. Además, también presentan una estabilidad limitada en el plasma [50].

Las **micelas poliméricas** son estructuras esféricas de 10-100 nm de diámetro, formadas mediante el autoensamblaje de bloques de co-polímeros anfifílicos en un medio acuoso. Durante el proceso de micelización, los bloques hidrofóbicos, que típicamente son polímeros similares a la caprolactona o el ácido láctico, se asocian para formar un núcleo, mientras que los segmentos hidrofílicos de PEG se sitúan entre el núcleo y el medio acuoso externo. Esta estructura convierte a las micelas poliméricas en sistemas ideales para la encapsulación y liberación de fármacos de carácter hidrófobo. Al igual que los polimerosomas, no son muy estables en el plasma [25, 50].



Las **NPs** son estructuras sólidas y generalmente esféricas (aunque pueden ser de formas muy diferentes), con un tamaño que varía desde 10 nm hasta 1000 nm, constituidas por polímeros naturales o sintéticos, como el ácido poli-láctico (PLA) o el ácido poli-láctico-co-glicólico [51]. Los fármacos pueden estar disueltos, atrapados, o encapsulados en el interior, o adsorbidos en la superficie de la NP. Dependiendo del proceso seguido en su elaboración, se pueden obtener básicamente dos tipos de estructuras: nanoesferas o nanocápsulas. Las nanoesferas tienen una estructura tipo matriz polimérica en la que el fármaco hidrofóbico puede quedar disuelto durante la formación. La liberación del fármaco vendrá determinada por el tiempo que tarde en degradarse el polímero utilizado en la fabricación de la nanoesfera [52]. Por el contrario, las nanocápsulas poseen un núcleo de carácter oleoso que contiene el fármaco, rodeado de una cubierta polimérica. Debido a la elevada superficie específica de estos sistemas, el fármaco también puede ser adsorbido en la superficie de la nanopartícula [53]. Una de las principales ventajas de las NPs es su estabilidad en el plasma [46, 51].

Los **dendrimeros**, las nanoestructuras más pequeñas de aproximadamente 10 nm de diámetro, son uniformes en el tamaño y pueden alcanzar altas masas moleculares (mayor a los 1000 kD). Están compuestos por polímeros que forman un núcleo central de donde parten ramificaciones de manera periódica, generando un gran número de terminaciones donde se pueden incorporar múltiples agentes terapéuticos y grupos funcionales. Dado su alto y ordenado grado de ramificación, la morfología que adopta es esférica [20].

Las características claves principales para la selección del NT adecuado [54] son:



- **Plasticidad** para transportar el agente terapéutico y el vector de direccionamiento [21].
- **Tamaño, geometría y carga superficial.** Estas características pueden influir durante el tránsito a través del organismo, así como en el proceso de internalización celular [55].
- **Biocompatibilidad,** que implica que el NT no provoque ninguna respuesta sistémica mediante la activación del sistema inmunitario, ni local mediante la inflamación y/o formación de tejido fibroso en el lugar de acumulación [54].
- **Material biodegradable** [54].

Todas estas particularidades han de ser tenidas en cuenta a la hora del desarrollo de un sistema de transporte de fármacos para el tratamiento de una determinada patología.



2. Nanoterapia en cáncer

El cáncer es en la actualidad uno de los problemas de salud prioritarios, ya que a pesar de los importantes avances de los últimos años, los diversos tratamientos actuales siguen presentando varios problemas. La terapia contra el cáncer se encuentra mayoritariamente limitada a la radiación y quimioterapia, técnicas altamente invasivas e incómodas para el paciente y que en muchos casos conducen a la alteración de su salud. Los tratamientos de quimioterapia tradicionales empleados contra el cáncer presentan además importantes limitaciones relativas a la reducida especificidad de los agentes quimioterapéuticos por las células tumorales, la vida media corta que presentan los fármacos en circulación debido al rápido aclaramiento *in vivo*, y la resistencia a muchos fármacos ejercida por las células tumorales [19, 20, 23-25, 27, 35].

La eficacia de un tratamiento contra el cáncer se mide como la habilidad para reducir el tamaño del tumor o eliminarlo, sin ocasionar daños en la salud [35]. El objetivo principal es aumentar el tiempo de supervivencia y la calidad de vida del paciente [35], y para conseguir este fin, tras comprobar la efectividad de un fármaco *in vitro*, es importante que su biodisponibilidad y biodistribución en el organismo sean óptimos [35].

La biodisponibilidad de un fármaco depende de la cantidad de fármaco activo que llega al tumor, teniendo en cuenta a su vez que la dosis de administración no debe superar nunca la dosis tóxica letal [23, 24]. El uso de NTs permite aumentar la concentración del fármaco, minimizar su inactivación y/o reducir la toxicidad, además de mejorar características como la estabilidad y solubilidad [23, 24, 33].



Por otro lado, con los métodos convencionales, las moléculas del fármaco libre, además de llegar al tejido enfermo, también alcanzan regiones o tejidos sanos, produciéndose efectos secundarios indeseables (Figura 3). En este sentido, la biodistribución de un fármaco puede ser alterada en tumores sólidos cuando se utilizan NTs mediante el denominado efecto de “aumento de la permeabilidad y retención” (EPR, del inglés *Enhanced Permeability and Retention effect*) [22, 34, 56-62].

Hasta el momento, las estrategias utilizadas para conseguir la acumulación en el tumor de los NTs conteniendo el fármaco se basan en dos mecanismos: el direccionamiento pasivo y el activo [33, 42].

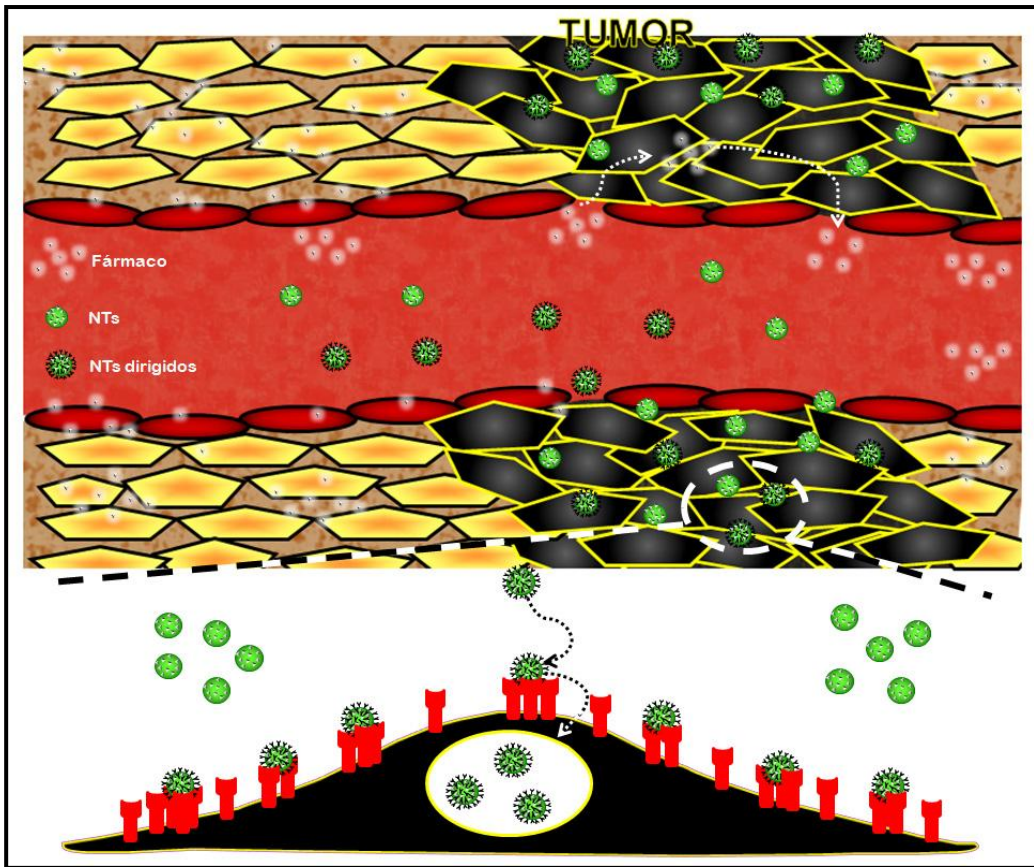


Figura 3. Efecto de aumento de permeabilidad y retención (EPR). Terapia pasiva y dirigida en cáncer. Se representan los fármacos administrados de manera clásica (libre) y vehiculizados en NTs con y sin direccionamiento.

2.1. Direccionamiento pasivo de fármacos

El direccionamiento pasivo hace referencia a la acumulación de los NTs en regiones particulares del cuerpo, debido a las características fisiológicas del propio tejido [63]. El ejemplo más común de direccionamiento pasivo se explica por el efecto EPR asociado a la vasculatura de los tumores sólidos [33, 42].



2.1.1 Efecto de aumento de permeabilidad y retención

Las características patofisiológicas que presentan los tumores sólidos, así como las áreas inflamadas e infartadas, contribuyen a la acumulación y retención prolongada de macromoléculas en estas zonas (Figura 3) [22, 34, 56-62].

El efecto EPR se demostró por primera vez en tumores de roedores, mediante la inyección intravenosa de un colorante azul (Evans blue) unido a albúmina (67 kDa), o con Lipiodol (agente de contraste lipídico). La distribución de los compuestos inyectados fue bastante diferente entre el tejido normal y el tejido tumoral, apareciendo un intenso color azul en la zona tumoral en comparación con el tejido sano sin color [56].

Cuando los agregados de células tumorales alcanzan un diámetro de 1-2 mm se dificulta la difusión de nutrientes y oxígeno, lo que activa el proceso de angiogénesis que conlleva a la formación de nuevos vasos sanguíneos [22, 58, 59, 61, 62]. Los vasos recién formados en el tumor presentan una estructura irregular e incompleta: la capa endotelial presenta discontinuidades (poros) causadas por la ausencia de uniones intercelulares estrechas, a diferencia de la vasculatura normal en los tejidos sanos [22, 34, 58, 59, 61, 62].

Varios estudios en los que se utilizaron tumores trasplantados en ratones demostraron que el tamaño de poro en el endotelio de los vasos sanguíneos varía desde 200-1200 nm de diámetro, dependiendo de la localización anatómica del tumor (por ejemplo, más pequeños en el cráneo comparados con los subcutáneos) y del crecimiento tumoral (más pequeños en tumores en regresión) [22, 64]. En la misma línea, Yuan y col. determinaron que el tamaño de poro de un adenocarcinoma de colon humano implantado



subcutáneamente en el dorso de ratones inmunodeprimidos puede alcanzar un diámetro de $0,4 \mu\text{m}$ [65]. Si lo comparamos con el tejido normal, las uniones estrechas entre las células endoteliales que forman la microvasculatura tienen normalmente menos de 2 nm, mientras que el tamaño de poro en las vénulas postcapilares es mayor de 6 nm. Por otra parte, el endotelio fenestrado de los glomérulos renales, así como el endotelio de los sinusoides hepáticos y esplénicos muestra un tamaño de poro mayor (40-60 nm y 150 nm, respectivamente) [22].

Además, la pared de los vasos sanguíneos que se forman en el tumor no presenta células musculares lisas que permitan regular el flujo sanguíneo, y tampoco expresan el receptor de angiotensina II. Otra característica patofisiológica de los tumores es la alta producción de mediadores vasculares como la bradiquinina, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), prostaglandinas, colagenasas, etc., que facilitan la extravasación de sustancias [22, 34, 58, 59, 61, 62].

Todas las características mencionadas aumentan la permeabilidad de la vasculatura en el tejido tumoral. Además, la casi ausencia de sistema linfático intratumoral provoca la retención de las macromoléculas acumuladas en el intersticio del tejido patológico [22, 34, 56-62]. En general, las macromoléculas mayores de 40 KDa y las partículas con un tamaño comprendido entre 10-500 nm son capaces de acumularse en el tejido patológico debido al efecto EPR [33] (Figura 3).



2.1.2. Aclaramiento plasmático de los NTs

Para un mejor aprovechamiento del efecto EPR, los NTs deben permanecer estables en circulación el tiempo suficiente para que se produzca la acumulación en el tumor.

Con este fin, tras la inyección de los NTs de fármacos en sangre, el primer requisito que debe cumplir es que no interaccionen con los componentes sanguíneos [66], por lo que debe de evitarse, principalmente, el desarrollo de NTs cuya superficie presente moléculas hidrofóbicas [34].

Durante el transporte por la circulación sanguínea, los órganos donde principalmente pueden ser eliminados los NTs son el riñón, el hígado y el bazo. El conocimiento de la función y la estructura de estos órganos nos permite diseñar las propiedades físico-químicas que deben de poseer los nanosistemas para que puedan escapar o disminuir el atrapamiento en estos órganos [34].

La función fisiológica del riñón es la filtración del plasma sanguíneo a través de la barrera de filtración glomerular, cuya superficie se encuentra cargada negativamente y posee un tamaño de poro de aproximadamente 6 nm [34]. La utilización de NTs con un tamaño superior de 6 nm en cualquiera de sus dimensiones evitaría el aclaramiento renal. En cuanto a la carga, se debe de evitar utilizar nanosistemas cargados positivamente, ya que independientemente del tamaño pueden ser atraídos eléctricamente hacia la barrera de filtración. Adicionalmente, la forma y flexibilidad también pueden condicionar su excreción renal de manera que las estructuras muy hidrodinámicas pueden modificar el diámetro efectivo dependiendo de las fuerzas físicas a las que estén sometidas [34]. Por lo tanto, para evitar la excreción



renal, se deben de utilizar nanosistemas poco maleables, con un tamaño mayor de 6 nm y con carga eléctrica neutra o negativa.

Por su parte, el hígado y el bazo son órganos que se caracterizan por presentar capilares discontinuos (sinusoides) con un alto desarrollo del SFM. Los nanosistemas son sustancias extrañas para el organismo, de tal manera que, principalmente, el tamaño (>300 nm) y una carga excesivamente negativa favorecen el rápido reconocimiento por los macrófagos [34]. Además, los compuestos hidrofóbicos tienden a asociarse a proteínas séricas por lo que son reconocidos por los macrófagos y eliminados, sobre todo, en el hígado [34]. Por ello, el principal parámetro a tener en cuenta para disminuir el atrapamiento de los NTs por el SMF es su tamaño, que debe ser inferior a 300 nm (en torno a 200nm) ya que los poros de los sinusoides tienen aproximadamente 150 nm [34].

Tanto la estabilidad en sangre como la reducción del reconocimiento por los macrófagos se consiguen mediante el revestimiento de los NTs con polímeros hidrofílicos (PEG o carbohidratos), que proporcionan una capa de hidratación, como se ha comentado anteriormente [43, 44].

El desarrollo adecuado de los nanosistemas de fármacos permite aumentar el tiempo de circulación en sangre, y por tanto, la acumulación de éstos en el intersticio del tumor debido al efecto EPR de macromoléculas. Este fenómeno, común en todos los tumores sólidos, permite el direccionamiento pasivo de fármacos. Actualmente, se comercializan diferentes formulaciones de fármacos de manera nanoestructurada, como se comentará más adelante.



2.2. Direccionamiento activo de los NTs

La capacidad del NT de dirigirse a una localización específica, concepto al que el visionario Paul Ehrlich se refirió como “bala mágica”, se conoce actualmente como direccionamiento activo de fármacos [33]. Esta terapia dirigida al sitio de la enfermedad puede ser de baja especificidad, cuando se utilizan péptidos cargados positivamente que se unen, mediante interacciones electrostáticas, a los residuos de azúcares con carga negativa de la superficie de la membrana celular [42]. Por el contrario, la terapia dirigida de alta especificidad consiste en la utilización de NTs de fármacos funcionalizados en su superficie con moléculas que tienen la capacidad de reconocer específicamente la diana en la superficie de la célula (vector de direccionamiento) [18, 21, 33, 34, 53, 67, 68].

Es importante resaltar que no existe ningún sistema de direccionamiento que se pueda considerar universal, sino que en cada caso es necesario desarrollar una estrategia diferente para conseguir las mayores ventajas en el tratamiento de una patología determinada. Para ello, en el desarrollo de un sistema dirigido específico es necesario la correcta selección de la diana y del vector de direccionamiento que reconoce de forma específica la diana escogida, así como del tipo de NT que vehiculice el agente terapéutico (Figura 2) [69].



2.2.1. Selección de la diana

La diana es la molécula que se expresa en las células de interés [18, 21, 67-76].

Los criterios que debe cumplir una diana idónea son:

- **Expresión espacial.** Es necesario que la diana esté accesible en la **superficie** de las células a tratar. También es importante el nivel de expresión en superficie, ya que el número de moléculas de la diana debe ser suficiente para promover la unión de los NTs dirigidos [18, 21, 68, 69].
- **Expresión temporal.** Una característica importante a tener en cuenta a la hora de la elección de la diana es que ésta se exprese en el momento adecuado. Se pueden utilizar dianas con expresión constitutiva o, preferentemente, que se **sobre-expresen** en la zona patológica a tratar [18, 21, 69-71].
- **Especificidad de órgano o tejido.** La diana puede presentar una expresión ubicua o, preferentemente, específica restringida a la célula tumoral. En los casos en los que no sea posible, es conveniente, al menos, que las células que expresen la diana no se encuentren expuestas al torrente sanguíneo [69].
- **Seguridad.** La unión del NT a la diana no debe provocar ningún efecto secundario perjudicial [21].

Siguiendo con el desarrollo de una terapia dirigida, una vez seleccionada la diana de la célula, el segundo paso es seleccionar el vector de direccionamiento más apropiado.



2.2.2. Selección del vector de direccionamiento

El vector de direccionamiento es la molécula que tiene afinidad por la diana [29, 69, 77, 78].

Existe una variedad de moléculas que presentan la capacidad de reconocer epítomos específicos de la diana, y el acoplamiento de dichos vectores al NT permite dirigirlos de manera específica [69]. Los vectores de direccionamiento más utilizados son:

- **Ligandos naturales** o análogos de los ligandos naturales. La unión de un ligando a su receptor en la superficie celular, generalmente, promueve la activación del receptor mediante un cambio conformacional y, en ocasiones, desencadena una endocitosis mediada por receptor [77, 79].
- **Anticuerpos.** Debido a la alta afinidad que presentan por su diana, son los vectores de direccionamiento más utilizados, específicamente las inmunoglobulinas tipo G (IgG) [69, 80]. Sin embargo, los anticuerpos presentan una región constante Fc que es reconocida por el sistema inmunitario, lo que aceleraría la eliminación de los NTs por el SFM [80]. El uso de las técnicas de recombinación génica permite, por un lado, mejorar la afinidad de la región variable del anticuerpo, mejorándose así el reconocimiento de la diana y, por otro lado, eliminar la región constante o diseñar una región con baja capacidad inmunogénica (por ejemplo, humanización de anticuerpos murinos). Ello permite disminuir o anular la activación del complemento y, por lo tanto, evitar los efectos secundarios derivados del empleo de anticuerpos [77, 80].
- **Péptidos de afinidad.** Péptidos derivados de forma aleatoria, a partir de la tecnología de presentación de péptidos en la



superficie de fagos (phage-display) [42]. Presentan pequeño tamaño, alta estabilidad y baja inmunogenicidad [77, 81, 82].

Otros tipos de moléculas de afinidad son los aptámeros (oligonucleótidos), las vitaminas y las lectinas (carbohidratos) [77].

Las características fundamentales que debe presentar el vector de direccionamiento son el reconocimiento específico, alta afinidad por su diana, estabilidad y reducida capacidad inmunogénica [77]. Cada tipo de vector de direccionamiento presenta una serie de ventajas e inconvenientes. En general, los ligandos naturales tienen una menor afinidad por su diana en comparación con los anticuerpos pero, por el contrario, no producen reacciones inmunológicas y presentan un menor tamaño [77]. Por su parte, los péptidos de afinidad presentan un grado de afinidad similar a los anticuerpos y son de tamaño más pequeño, lo que permite un mayor número de vectores de direccionamiento en la superficie del NT. Sin embargo, al tratarse de moléculas con una naturaleza proteica, son susceptibles a la desnaturalización y pérdida de la afinidad por su diana, y su pequeño tamaño los hace aún más susceptibles [82].

La unión específica del vector de direccionamiento a la diana puede o no tener efecto sobre la misma [80], promoviendo en algunos casos cambios conformacionales que activen la internalización del NT.



2.2.3. Internalización de los NTs

La capacidad de los NTs de ser internalizados por la célula diana es también un criterio importante a la hora del desarrollo de un sistema de direccionamiento, ya que en la mayoría de casos es necesario que el fármaco llegue al interior de la célula para que pueda ejercer su efecto [33, 73, 74]. Para ello es necesario utilizar dianas internalizables. Normalmente, esta internalización ocurre vía endocitosis mediada por receptor. Se ha descrito, en ocasiones, que receptores no relacionados con la endocitosis son internalizados por la célula diana cuando el ligando se presenta de una forma multivalente [67, 75]. Del mismo modo, diversos vectores de direccionamiento contra distintos epítomos de una misma molécula diana pueden tener un efecto diferente, permitiendo la internalización en algunos casos, mientras que en otros el NT se une a su diana, pero permanece en la superficie de la célula [67, 76]. Por lo tanto, de nuevo es necesaria la caracterización de cada sistema de terapia dirigida.

La endocitosis se puede clasificar en dos tipos: fagocitosis y pinocitosis. La fagocitosis es llevada a cabo por células fagocíticas profesionales (macrófagos, monocitos, neutrófilos y células dendríticas) en un proceso especializado de internalización de partículas tan grandes como 20 μm [83]. Sin embargo, la pinocitosis, que se encuentra presente en todos los tipos celulares, es un proceso de internalización de fluido y solutos [83-85]. La clasificación de los diferentes tipos de pinocitosis se realiza atendiendo a la proteína específica involucrada en la internalización: endocitosis dependiente o mediada por clatrina, dependiente de caveolas, independiente de clatrina y caveolas (dependiente de Arf6, Cdc42 y RhoA), y macropinocitosis [83, 84].



Los principales factores conocidos que influyen en la endocitosis de los NTs son:

- **El tamaño.** Las diferentes rutas de pinocitosis forman unas invaginaciones en la membrana con un tamaño determinado. Por ejemplo, en las vías canónicas como son la dependiente de clatrina y la dependiente de caveolas el diámetro corresponde a 120 nm y 60-80 nm, respectivamente. En cambio, la macropinocitosis permite la internalización de partículas de mayor tamaño (0,5-10 μm) [83]. Por lo tanto, aunque el tamaño del NT no siempre influye en la capacidad de internalización, aquellos NTs con un mayor tamaño no podrán internalizarse a través de ciertas vías específicas de endocitosis [86].
- **La carga superficial.** Hacia el exterior, la membrana plasmática está cargada negativamente, por lo que los NTs catiónicos presentan una unión más rápida que los aniónicos, debido a la fuerte interacción electrostática entre los NTs y la membrana plasmática. Los NTs sin carga pueden interactuar con la célula por puentes de hidrógeno y los aniónicos pueden interactuar con proteínas cargadas positivamente.
- **Forma.** En general, la forma puede influir en la velocidad de endocitosis y principalmente depende de los puntos de contactos que la morfología del NT permita establecer con la membrana plasmática [86]. Las formas esféricas son más favorables para ser internalizadas, debido a que su morfología permite generar puntos de contacto de manera regular y homogénea en todas las orientaciones del espacio, mientras que una forma elíptica o cilíndrica presenta dos ejes muy diferentes, generando dos posibles



superficies de contacto. En el caso de que la interacción del NT con la membrana se establezca a través del eje menor, la superficie de contacto es menor y además la membrana debe alcanzar una altura mayor (aproximadamente la longitud del eje mayor) para poder envolver a la partícula, lo que dificulta la reorganización de los filamentos de activa y, por tanto, provoca una internalización bastante más lenta [86].

- **Tipo celular.** Como las células están equipadas con diferentes maquinarias de endocitosis, la presencia y/o abundancia de alguna vía específica depende del tipo celular en estudio. Concretamente, la endocitosis mediada por clatrina es una ruta de internalización presente e inherentemente activa en todas las células de mamíferos. Esta vía es responsable de la entrada de nutrientes esenciales como el colesterol (LDL), hierro (transferrina), etc. [83]. En el caso de la endocitosis mediada por caveolas, aunque está presente en casi todos los tipos celulares, se ha observado una predominancia de esta vía en células endoteliales, musculares, fibroblastos y adipocitos. En células polarizadas esta vía está relacionada con el proceso de transcitosis, lo que no implica que en otros tipos celulares se siga el mismo mecanismo de transporte [83].

Es difícil establecer conclusiones generales sobre cómo diseñar NTs para lograr una internalización celular óptima. Sin embargo, el desarrollo de una terapia dirigida permite que los nanosistemas reconozcan y se unan a su diana celular de manera específica, y esta unión puede promover la internalización de los mismos a través de una ruta de endocitosis, asegurando así la entrada del fármaco en la célula.



2.2.4. Transporte intracelular de los NTs

Además de la internalización, otra característica importante que hay que tener en cuenta a la hora de diseñar un sistema dirigido es el tráfico intracelular hacia los lisosomas. Este orgánulo posee un pH ácido y contiene enzimas degradativas, por lo que es importante determinar el tiempo que tardan los fármacos en alcanzar dicho orgánulo, puesto que es el principal lugar de inactivación y degradación del agente terapéutico [28].

Una vez en el interior celular, los endosomas que contienen los NTs vehiculizando el fármaco pueden dirigirse hacia diferentes compartimentos intracelulares, reciclarse hacia la membrana, y en el caso de células polarizadas, atravesarla mediante el proceso de la transcitosis. Aunque no se sabe con exactitud qué mecanismos participan en el tráfico intracelular, son importantes la ruta de entrada del NT, así como el tipo celular [83, 87]. En general, los fagosomas trafican hacia los lisosomas, y los macropinosomas se dirigen hacia los cuerpos multivesiculares (CMV), y desde este compartimento, hacia los lisosomas. En el caso del resto de rutas pinocíticas, los endosomas generados tras la internalización se fusionan con endosomas tempranos, y a partir de este compartimento, se pueden dirigir hacia el aparato de Golgi, CMV y lisosomas [83].

De todas formas, independientemente del tráfico intracelular que sigan los NTs, generalmente el destino final son los lisosomas. Con el fin de evitar esta ruta degradativa, se han empleado diferentes estrategias, como por ejemplo moléculas (principalmente péptidos y lípidos fusogénicos) que, una vez cargados en la superficie de los NTs, son capaces de



interaccionar con la membrana de los endosomas alterándola, provocando la liberación de éstos [33].

Por último, la liberación del fármaco depende del tipo de NT empleado. En el caso de las NPs poliméricas, la liberación de los fármacos incluidos dentro del polímero depende de la propia degradación del polímero. En general, el tiempo de degradación será menor cuanto menor sea su peso molecular, más hidrófilo y amorfo sea [51].

Por lo tanto, la optimización máxima de un tratamiento podría conseguirse asegurando que el destino final del fármaco sea el apropiado para que pueda ejercer su acción [18, 21, 29, 33, 47, 53, 77, 88].

En conclusión, la principal ventaja que ofrece el desarrollo de una terapia dirigida con NTs en comparación con una terapia pasiva es que permite la unión específica de los NTs a la superficie de la célula diana, favoreciendo la entrada de los agentes terapéuticos dentro de la célula y, por tanto, optimizando su efecto terapéutico [18, 21, 29, 33, 47, 53, 77, 88].



3. Tiroides y cáncer de tiroides

3.1. Estructura de la glándula tiroides

La glándula tiroides recibe su nombre por su forma de escudo (*thyreos*, escudo; *eidós*, forma) y por su proximidad al cartilago tiroides de la laringe [89]. Esta glándula endocrina es conocida principalmente por la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas triyodotironina (T_3) y tiroxina o tetrayodotironina (T_4), encargadas de regular el metabolismo basal [89, 90].

Consta de dos lóbulos que se sitúan a ambos lados de la tráquea y que están unidos mediante una estrecha porción de tejido denominada istmo que queda situada en posición anterior [89, 91](Figura 4, panel de la izquierda). Es frecuente que a partir del istmo se origine un tercer lóbulo que se denomina lóbulo piramidal o medio [89]. La glándula tiroides es un órgano muy vascularizado y con un gran flujo sanguíneo aportado por las arterias tiroideas superiores e inferiores. Presenta una extensa red capilar de tipo fenestrado que se dispone en plexos profundos situados alrededor de los folículos tiroideos. El drenaje venoso está organizado en abundantes plexos localizados en las superficies lateral y medial de los lóbulos y que van a originar las venas tiroideas superior, media e inferior. A la extensa red capilar se une una abundante red de capilares linfáticos organizados, al igual que los sanguíneos, en forma de ricos plexos situados alrededor de los folículos [89, 91].

La unidad estructural y funcional son los folículos tiroideos (Figura 3, panel de la derecha). Los folículos son estructuras esféricas cuya pared está formada, principalmente, por las células foliculares que se organizan formando un epitelio simple cúbico en torno al coloide [89, 90]. El coloide es el compartimento interno del



folículo donde se almacena la tiroglobulina (Tg), una glucoproteína precursora de las hormonas yodadas T_3 y T_4 . Íntimamente asociadas a las células foliculares pueden localizarse las células C o parafoliculares, conocidas por la secreción del péptido calcitonina (CT). Los dos tipos celulares quedan envueltos externamente por la membrana basal y las células C nunca entran en contacto con el coloide [90].

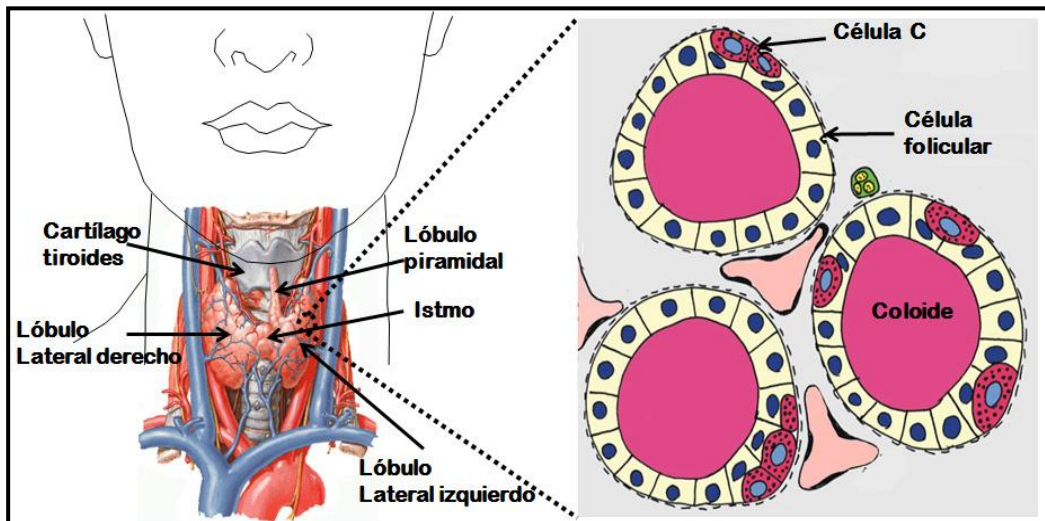


Figura 4. Representación esquemática de la anatomía e histología de la glándula tiroides. Imágenes modificadas del F.H.NETTER (izquierda) y Fernández-Santos, 2012 (derecha).

Las células foliculares o tirocitos son el componente epitelial mayoritario y son las encargadas de sintetizar y secretar las hormonas tiroideas T_3 y T_4 . Para ello, en un primer paso sintetizan y secretan Tg hacia el coloide, donde tendrá lugar la yodación y almacenamiento de dicha molécula. En segundo lugar, tras el estímulo adecuado, se endocitan grandes cantidades de coloide para llevar a cabo la escisión de la Tg en los lisosomas con la consecuente formación de las únicas hormonas yodadas de nuestro cuerpo que serán liberadas hacia el torrente sanguíneo.



Para poder llevar a cabo este proceso, las células foliculares presentan una fuerte polarización [89, 90].

Las células C o parafoliculares son el segundo tipo celular que podemos encontrar en la glándula tiroides, en un número mucho menor. Son conocidas por su función endocrina hipocalcemiante, consecuencia de la síntesis y liberación del péptido CT [90]. Sin embargo, recientemente se ha demostrado la síntesis de un número elevado de péptidos reguladores cuya función sería el control paracrino de la célula folicular [92-96].

La regulación principal de la función tiroidea depende del eje hipotálamo-hipofiso-tiroideo mediante la secreción de la hormona liberadora de tirotropina o TRH en el hipotálamo, y de la tirotropina o TSH, en la hipófisis [89-91]. En la glándula tiroides, la TSH actúa estimulando múltiples procesos morfológicos y funcionales orientados a promover el desarrollo glandular y la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas [89]. El receptor de TSH (TSHR) se expresa tanto en las células foliculares como en las células C [97]. Además, se ha demostrado que ambas poblaciones celulares evolucionan paralelamente ante alteraciones del estado funcional tiroideo [98]. El TSHR en las células foliculares estimula la expresión de los genes específicos necesarios para la síntesis y secreción de las hormonas T_3 y T_4 , así como la proliferación [89, 90]. El TSHR en las células C es funcional pero no está clara su función en este tipo celular [97].



3.2. Tumores tiroideos

El cáncer de tiroides representa la neoplasia endocrina más frecuente en humanos, afectando aproximadamente al 1% de la población [89]. La incidencia de estos tipos de cáncer se ha incrementado desde los años setenta, probablemente debido a la detección precoz con los nuevos métodos de diagnóstico [89, 99].

Los tratamientos actuales incluyen la cirugía total o parcial, tratamiento con yodo radiactivo ($I-131$), radioterapia y quimioterapia [89].

El uso de NTs de fármacos en aquellos pacientes con necesidad del tratamiento con quimioterapia permitiría minimizar la degradación e inactivación del agente terapéutico tras la administración, aumentar la fracción del fármaco que llega al área patológica, y disminuir los efectos secundarios, incrementándose así la acumulación del agente terapéutico en el tumor.

Las neoplasias tiroideas se clasifican en nódulos benignos o adenomas y tumores malignos o carcinomas [89, 100]. Aunque los adenomas son más frecuentes que los carcinomas, el cáncer de tiroides es el más frecuente dentro del sistema endocrino [89].

De acuerdo al origen celular de los tumores tiroideos, se clasifican en dos grandes grupos: carcinomas originados a partir de las células foliculares (aproximadamente el 95% de los tumores tiroideos) y carcinomas originados a partir de las células C (5% restante). La subclasificación de los cánceres tiroideos consta de cuatro categorías con significado clínico [89, 101]:

√ Tumores con origen en las células foliculares

- Diferenciados:



Carcinoma papilar de tiroides (CPT)

Carcinoma folicular de tiroides (CFT)

- **Indiferenciados**

Carcinoma anaplásico de tiroides (CAT)

√ **Tumores con origen en las células C**

Carcinoma medular de tiroides (CMT)

Esta clasificación está respaldada por estudios moleculares que demuestran el papel de determinados oncogenes asociados a cada tipo de tumor [102]. En el CPT, se describen reordenamientos cromosómicos de RET (RET/CPT), mutaciones que activan la vía de la fosfatidil inositol 3´quinasa (Pi3K), o mutaciones en el BRAF y RAS. En el caso de los carcinomas foliculares, se han descrito mutaciones de RAS o reordenamientos de PAX8/PPAR γ . En CMT existen mutaciones de RET en la línea germinal en los casos hereditarios y mutaciones somáticas en los esporádicos, y en el carcinoma anaplásico, además de las mutaciones descritas para los carcinomas diferenciados (BRAF y RAS), mutaciones de TP53 y β -catenina [25, 89, 100, 103, 104]. No obstante, esta clasificación es básica y deja sin cubrir aspectos anatomopatológicos donde se incluyen cada una de las variantes asociadas a cada tipo tumor [89].

El CPT es el más frecuente de los tumores tiroideos (80%), con una incidencia de dos a cuatro veces superior en mujeres que en hombres [105]. Las metástasis en los ganglios linfáticos del cuello son frecuentes, pero sólo en raras ocasiones se propagan a órganos distantes [106, 107].



El CFT es el segundo más común, y también presenta una mayor incidencia en mujeres [105]. A diferencia del CPT, las metástasis en los ganglios linfáticos del cuello aparecen con menos frecuencia, mientras que las metástasis sistémicas (pulmón, hueso, cerebro, hígado, vejiga, piel, etc.) son más comunes [106, 107].

Los carcinomas diferenciados tienen, en general, un buen pronóstico. Presentan un crecimiento lento y, aunque las metástasis son relativamente frecuentes, la supervivencia es elevada. En ambos casos, el tratamiento requiere la tiroidectomía total o parcial, seguida de tratamiento con I-131 [106, 107]. Además, en estos tipos de tumores se puede potenciar la captación de I-131 mediante la administración de TSH, ya que la activación del TSHR induce la expresión de la proteína de membrana NIS (bomba simporter Na⁺/I⁻) en la membrana basolateral, siendo ésta la proteína encargada de incorporar activamente yodo en los tirocitos [108].

Los CMT también presentan metástasis frecuentemente y, a diferencia de los de origen folicular, ni las células C ni las metástasis derivadas de ellas son capaces de incorporar 131-I, ya que no presentan NIS en su membrana [108]. A pesar de ello, la supervivencia tras la tiroidectomía es elevada, sobre todo en los casos sin metástasis [106].

Por el contrario, el CAT está entre los tumores más agresivos y no responde a la terapia con 131-I. Este tumor, que está compuesto por células indiferenciadas, representa el 5-14% de los tumores tiroideos y es extremadamente letal, con una media de supervivencia de dos a seis meses, dependiendo de la presencia de invasión local y metástasis [109-111]. Se presenta,



generalmente, a partir de los 65 años, y aparece como una masa cervical de crecimiento rápido con invasión de las estructuras vecinas y metástasis ganglionares y a distancia. El pulmón es la localización principal de las metástasis distales (80%), seguido por los huesos (6-15%) y el cerebro (5-13%) [111-113]. Actualmente, está considerado uno de los tumores sólidos más agresivos y letales que afectan al hombre. Pese a su baja frecuencia, es causa de la mayoría de las muertes por cáncer de tiroides [114]. El tratamiento se realiza mediante cirugía más o menos extensa, radioterapia externa, adriamicina, o la combinación de éstos, pero desafortunadamente no parece eficaz globalmente [89].

Aunque actualmente no se sabe con exactitud el origen de este tipo de tumor indiferenciado, existen dos modelos que explican el desarrollo del CAT: el modelo clásico, a partir de la dediferenciación de un carcinoma diferenciado (CPT o CFT) [103, 115] y origen de *novo* [116, 117]. Según el primero, las mutaciones iniciadoras van a definir el tipo de carcinoma, mientras que las segundas mutaciones van a promover la progresión hacia el carcinoma pobremente diferenciado de tiroides (CPDT) o hacia el anaplásico. Los CPDT, una entidad controvertida, son neoplasias originadas a partir de células foliculares del tiroides que por su comportamiento, morfología y mutaciones, ocupan una posición intermedia entre los tumores diferenciados y los que han perdido la diferenciación [102].

Numerosos estudios han contribuido a un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en los procesos que conducen a la transformación tiroidea [102, 103, 115]. Las mutaciones de genes relacionados con las principales vías de señalización intracelular que se le han atribuido hasta el momento al CAT son p53 (55%), RAS (22%), BRAF (26%), β -catenina (38%),



Pi3K (17%) y PTEN (12%) [102, 114, 118-120]. Adicionalmente, se ha observado la amplificación en el número de copias de los genes que codifican para los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) [121-123], receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR) tipo 1 y 2, y el receptor del factor crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), entre otros [114, 124]. Por lo tanto, las dianas potenciales para este tipo de tumor son EGFR y VEGFR.

Todas estas moléculas podrían ser de interés en el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer de tiroides y, en concreto, las que se expresan en la superficie de la célula son potenciales dianas para el desarrollo de terapias dirigidas.

3.3. Dianas potenciales para el cáncer de tiroides

Como se ha expuesto anteriormente, los receptores que se sobreexpresan en la superficie de las células tumorales, como HER2, receptor de transferrina (TfR), o receptor de folato, entre otros, son dianas potenciales para el desarrollo de un sistema dirigido de NPs para el tratamiento del cáncer [18, 27, 29, 35].

En nuestro estudio, las posibles dianas potenciales seleccionadas para el desarrollo de una terapia dirigida con NPs frente al cáncer de tiroides han sido el TSHR, EGFR y VEGFR (Figura 5).

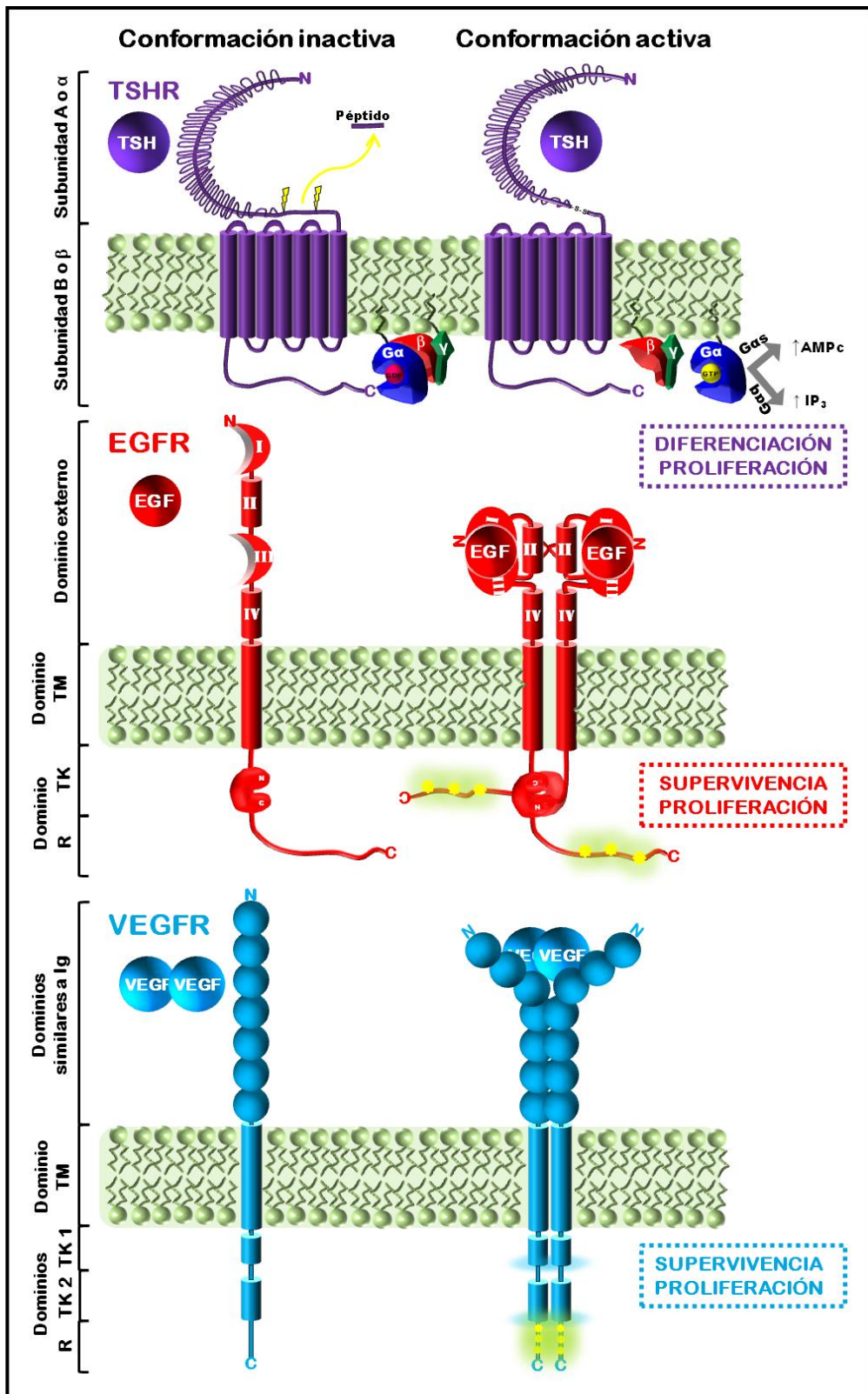


Figura 5. Representación esquemática de las dianas potenciales para el cáncer de tiroides.



3.3.1. Receptor de TSH

El TSHR se clasifica dentro de la superfamilia de los receptores acoplados a proteína G. Es una glicoproteína con siete dominios transmembrana, con su extremo amino orientado hacia el espacio extracelular y el carboxilo hacia el intracelular [89, 107, 125].

El receptor está constituido por dos subunidades: A o α y B o β . La subunidad A o α , más grande, corresponde principalmente al dominio extracelular. La mayor parte, con una región rica en leucina que le proporciona una conformación característica con forma de herradura, es el dominio de reconocimiento de la TSH, que se acopla en el espacio cóncavo de la herradura [125]. La subunidad B o β , más pequeña, corresponde al dominio transmembrana e intracelular. La unión de los siete dominios transmembrana genera tres lazos externos y tres internos, algunos de los cuales son importantes para la activación del receptor. El dominio intracelular interacciona con la proteína G [107].

Durante la síntesis proteica, los TSHRs oligomerizan en el RE-Golgi y se transportan hasta la membrana plasmática donde se encuentran agrupados en oligómeros. La unión de la TSH provoca la disociación de los receptores en monómeros. Los monómeros activos se mueven por la membrana hasta localizarse en los rafts lipídicos donde interaccionan con la proteína G heterotrimérica [107]. La proteína G heterotrimérica es la responsable de transmitir la señal desde el receptor hasta diferentes moléculas efectoras, dando lugar a la activación de varias rutas de transducción de señales mediadas tanto por la subunidad α como por el complejo $\beta\gamma$. Mediante la vía clásica se activa la subunidad $G_{\alpha s}$ activadora de la adenilato ciclasa, lo que genera un aumento



del AMPc intracelular, aunque también se puede estimular la $G_{\alpha s}$ inhibitoria y la cascada Gq/PLC (fosfolipasa C) [89].

El TSHR sufre un proceso postraduccional en la membrana que consiste en la escisión y eliminación de aproximadamente 50 aminoácidos dentro de la subunidad A (péptido C, Figura 5). Entonces, las subunidades A y B se mantienen unidas por puentes disulfuro. La reducción de dichos puentes disulfuro provoca la liberación de la subunidad A, lo que provoca la activación del receptor en ausencia del ligando [125].

Una vez transducida la señal, el TSHR es rápidamente internalizado vía clatrina, y posteriormente devuelto a la membrana por endosomas de reciclaje [126].

El TSHR está implicado en la proliferación celular y se expresa en la mayoría de los tumores tiroideos [107].

3.3.2. Receptor del factor de crecimiento epidérmico

El EGFR es una glicoproteína transmembrana tirosina quinasa de 170 KDa. Presenta cuatro dominios funcionales: dominio extracelular, dominio transmembrana (TM), dominio tirosina quinasa (TK) y dominio regulador (R) C-terminal. El dominio extracelular se divide en cuatro subdominios denominados I, II, III y IV, también conocidos como L1, S1, L2 y S2. Los dominios II y IV son ricos en cisteína (CR1 y CR2). El ligando interacciona con los dominios I y III, mientras que el dominio II está involucrado en la dimerización del receptor [127]. EGFR presenta un único dominio transmembrana que conecta los dominios externos e interno. El dominio intracelular contiene el dominio TK y el dominio R C-terminal. El dominio TK está constituido por dos lóbulos N y C, cuya unión forma un “bolsillo” que corresponde al lugar de unión



del ATP. El dominio C-terminal regulatorio tiene varios residuos de tirosina que son fosforilados específicamente tras la unión del ligando [127, 128].

EGFR pertenece a la familia de los receptores ErbB que presenta cuatro miembros: EGFR1/ERBB1/HER1, ERBB2/HER2/NEU, ERBB3/HER3 y ERBB4/HER4. ERBB2, ERBB3 y ERBB4 muestran una alta homología en el dominio extracelular con EGFR1, correspondiendo a 44, 36 y 48 %, respectivamente. La homología en el dominio tirosina quinasa es del 82, 59 y 79%, mientras que en el dominio C regulador el porcentaje de homología es de 33, 24 y 28% respectivamente [128].

La unión del ligando al receptor provoca cambios conformacionales en los dominios externo e interno, de tal manera que los dominios I y II rotan cambiando la conformación del receptor desde un estado extendido a uno “atado”. Esta rotación hace que el dominio de dimerización se exponga de tal manera que tras la unión del ligando se produce una homo o heterodimerización del receptor [79]. En el citoplasma, los dominios tirosina quinasa dimerizan asimétricamente en una orientación de los lóbulos “cabeza-cola”, estimulando la actividad tirosina quinasa intrínseca del receptor que dispara la fosforilación de los residuos específicos de tirosina dentro del dominio regulador [79, 128].

La fosforilación del dominio regulador activa a varias moléculas efectoras en cascada, de forma directa o mediante proteínas adaptadoras. Las principales vías de señalización son las MAP quinasas, mediante la activación de la proteína de unión a GTP Ras (RAS-RAF-MEK-ERK), y la vía Pi3K, que activa Akt implicada en proliferación y supervivencia celular por inhibición de la



apoptosis. La señalización de las diferentes vías resulta en proliferación celular, migración y activación de la angiogénesis [121, 124, 129].

La expresión de EGFR y su relación con el pronóstico del cáncer ha sido investigada en varios tumores humanos. Aunque existen algunas controversias, en general, los pacientes que muestran una alta expresión del EGFR tienen peor pronóstico [128].

3.3.3. Receptor del factor de crecimiento vascular endotelial

El VEGFR se clasifica dentro de la superfamilia de los receptores tirosina quinasa. Presenta tres miembros (VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3) relacionados con la familia PDGFR y el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) [130]. La región extracelular está constituida por siete dominios parecidos a la inmunoglobulina (Ig), seguido de un único dominio transmembrana y la región intracelular, formada por un dominio tirosina quinasa y la cola C-terminal.

Los dímeros de ligandos (familia de los VEGFs) interaccionan con los dominios Ig2 e Ig3 del VEGFR, provocando la homo o heterodimerización del receptor. En la región citoplasmática se activa la actividad tirosina quinasa que finaliza con la fosforilación del receptor. La fosforilación del dominio regulador activa a varias moléculas efectoras en cascada, de forma directa o mediante proteínas adaptadoras. La señalización depende tanto del tipo de receptor implicado, así como del tipo de ligando. En general, la fosforilación de VEGFR induce procesos celulares que son comunes a algunos receptores de factores de crecimiento, incluyendo la migración, supervivencia y proliferación. Específicamente, VEGFR1 es un regulador positivo de la



migración de monocitos y macrófagos; VEGFR2 está implicado en todos los aspectos biológicos (migración, supervivencia, proliferación, etc.) en las células endoteliales, tanto en condiciones normales como en patológicas; mientras que VEGFR3 está implicado en el desarrollo y la función del endotelio de los vasos linfáticos [130].

Al igual que el EGFR, tras la señalización el receptor es rápidamente internalizado vía clatrina [131].

En la situación patológica, la activación y sobreexpresión de VEGFR estimula el proceso de angiogénesis. La sobreexpresión de VEGFR2 en células endoteliales promueve la migración celular, supervivencia, proliferación y permeabilidad vascular [130]. Además se ha demostrado su expresión en algunos CAT [124].



4. Nanotransportadores en clínica

A lo largo de esta sección se han descrito con detalle las ventajas farmacológicas que proporcionan el empleo de NTs de fármacos con respecto a la administración del mismo de manera clásica (libre). Actualmente, existen algunas formulaciones de NTs de fármacos aprobadas por la FDA (*Food and Drug Administration*) y muchas otras formulaciones en diferentes fases de desarrollo clínico [33, 57]. En la tabla I se muestran algunas formulaciones disponibles para el tratamiento contra el cáncer [33].

Tabla I. Formulaciones de NTs de fármacos disponibles en el tratamiento contra el cáncer.

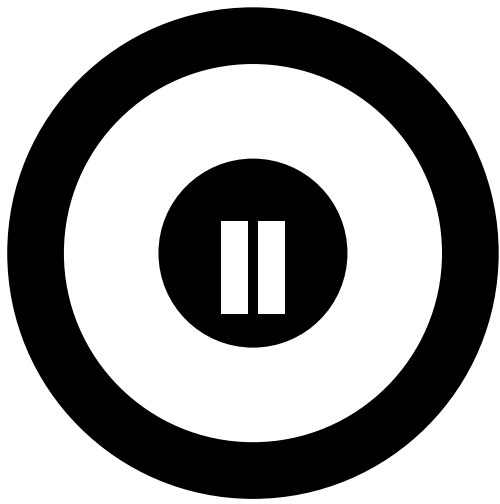
Nanosistema	Fármaco	Nombre comercial	Tipo de cáncer	Estado
Liposomas	Doxorubicina	Doxil®/Caelyx/ Lipodox	Ovario, Mama y Sarcoma de Kaposi	FDA
Liposomas	Doxorubicina	Myocet®	Mama	FDA
Conjugado con albúmina	Paclitaxel	Abraxen®	Pulmón y Mama	FDA
Liposomas	Doxorubicina	ThermoDox®	Varios tipos	FDA
Liposomas	Vincristina	Marqibo®	Varios tipos	FDA
Liposomas	Cisplatino	Lipoplatin y LiPlaCis	Varios tipos	III y I
Micelas poliméricas (PEG-polyD,L- lactide)	Docetaxel	Nanoxel®	Mama	I
Micelas poliméricas (PEG-polyD,L- lactide)	Paclitaxel	Genexol®-PM	Mama, Pulmón y Páncreas	II



Estudios *in vivo* han demostrado que la funcionalización de los NTs con vectores de direccionamiento adecuados, incrementa el índice terapéutico de los fármacos con respecto a los NTs sin direccionamiento, al aumentar la acumulación dentro de las células tumorales. Es decir, el desarrollo de una terapia dirigida incrementa la eficacia del tratamiento con respecto a la terapia pasiva [57, 132-138]. Sin embargo, solo hay algunos ejemplos de formulaciones de NTs dirigidos que se encuentren en las primeras etapas de ensayo clínico, como son liposomas dirigidos hacia el EGFR (Ab, Cetuximab) cargados con Doxorubicina (anti-EGFR-ILs-dox Doxil®/ Caelyx® [47]), y hacia el TfR dirigido con el ligando natural cargado con Oxaliplatino (MBP-426 [57]), entre otros [33].

A pesar de que en el campo de la nanotecnología se trabaja intensamente en la búsqueda de nuevos tratamientos para una amplia variedad de tipos de cáncer, el cáncer de tiroides aún no se encuentra en esa amplia lista.

Como consecuencia de lo expuesto anteriormente, en la presente tesis doctoral hemos desarrollado una terapia dirigida con NPs para el tratamiento contra el cáncer de tiroides. Para ello, en una primera etapa *in vitro* se ha seleccionado la diana y la NP dirigida con las mejores características para, a continuación, comprobar el efecto citotóxico de dichas NPs al incorporarle diferentes agentes quimioterapéuticos.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Planteamiento del tema e hipótesis

A pesar de que la nanotecnología está siendo aplicada intensamente en la búsqueda de nuevos tratamientos para una amplia variedad de tipos de cáncer, el cáncer de tiroides aún no se encuentra en esa amplia lista.

El uso de NTs de fármacos permitiría minimizar la degradación e inactivación del agente terapéutico tras la administración, aumentar la fracción del fármaco que llega al área patológica, y disminuir los efectos secundarios, incrementándose así la acumulación del agente terapéutico en el tumor.

Además, el desarrollo de una terapia dirigida permitiría aumentar la especificidad contra el tumor, y optimizar así el tratamiento contra el cáncer. Para ello, es importante realizar un estudio exhaustivo del direccionamiento específico y efectivo de los NTs. Los factores que determinan la interacción de los nanosistemas dirigidos con su diana son, principalmente, la densidad de la diana en la superficie de la célula y la densidad de los vectores de direccionamiento funcionales en la superficie de los NTs, así como la afinidad del vector por su diana. De la misma manera, es importante determinar la respuesta celular tras la unión de los NTs dirigidos ya que, sólo en el caso de que el agente terapéutico alcance el compartimento celular adecuado, podrá llevar a cabo su acción y, de esa forma, aumentar la eficacia de la terapia.



Hipótesis

La utilización de terapias dirigidas mediante NTs en el cáncer de tiroides podría mejorar la efectividad de los tratamientos actuales, al aumentar la especificidad, disminuir los posibles efectos secundarios de los fármacos y aumentar la concentración de éstos específicamente en la célula cancerosa. Para ello, la evaluación de un sistema *in vitro* es el primer paso necesario.

Los receptores de TSH, EGF y VEGF presentan características favorables para que alguno o varios de ellos proporcionen una diana adecuada para el envío de agentes anticancerígenos en modelos *in vitro* de cáncer tiroideo.

2. Objetivos

El principal objetivo de este trabajo es el desarrollo *in vitro* de una terapia dirigida con NPs contra el cáncer de tiroides, para el direccionamiento de agentes quimioterapéuticos.

Para la consecución de este objetivo global se han planteado los siguientes objetivos específicos:

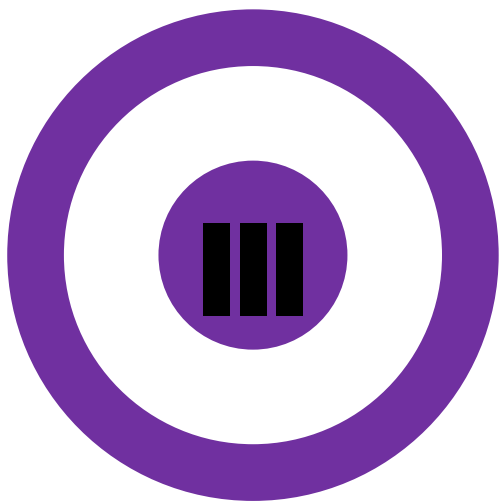
Objetivo I: caracterización del direccionamiento de NPs en líneas celulares:

- 1 Análisis de la expresión en superficie de las diferentes dianas potenciales seleccionadas (TSHR, EGFR y VEGFR).
- 2 Estudio de la capacidad y especificidad de la unión de diferentes formulaciones de NPs dirigidas con anticuerpos.
- 3 Evaluación de la capacidad de las NPs de inducir su internalización.
- 4 Estudio del destino intracelular de las NPs.



Objetivo II: Valoración *in vitro* del efecto citotóxico de las NPs desarrolladas en el primer bloque conteniendo diferentes agentes terapéuticos:

- 1. Análisis de la unión a las células de las NPs conteniendo los fármacos (doxorubicina, ácido retinoico y AMG-706).**
- 2. Demostración del efecto citotóxico de las NPs dirigidas con los distintos fármacos.**



MATERIALES Y MÉTODOS



III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Materiales

1. Cultivos celulares

Para este proyecto de tesis doctoral, hemos utilizado las siguientes líneas celulares humanas:

- **Nthy-ori 3-1 (Thy)**: células foliculares, procedentes de un cultivo primario de epitelio folicular tiroideo normal. (European Collection of Cell Cultures, ECACC No. 90011609. Sigma-Aldrich, Reino Unido). Estas células fueron utilizadas como control.
- **FTC-133**: células foliculares neoplásicas, procedentes de un CFT (European Collection of Cell Cultures, ECACC No. 94060901. Sigma-Aldrich, Reino Unido).
- **8505C**: células foliculares anaplásicas, procedentes de un CAT (European Collection of Cell Cultures, ECACC 94090184. Sigma-Aldrich, Reino Unido).

Las diferentes líneas celulares fueron mantenidas en frascos de 75 cm² (SPL Life Sciences Co. Ltd. Corea), en un incubador a 37°C y con 5% de CO₂. Los medios de cultivo empleados fueron RPMI 1640 para las líneas Thy y 8505C, y Ham's F12 para la línea FTC-133. Todos los medios fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino (SFB), L-glutamina (2 mM), penicilina (50 U/mL) y estreptomycin (50 µg/mL). Los medios de cultivo y suplementos fueron de PAA Laboratories GmbH, Austria.



2. Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados han sido:

- **anti-TSHR:**
 - ✓ anticuerpo monoclonal de ratón contra el TSHR humano, de Serotec (MCA1571), Reino Unido.
 - ✓ anticuerpo policlonal de conejo contra el TSHR humano, de Sigma-Aldrich (T5325), USA.
- **anti-EGFR:** anticuerpo monoclonal de ratón contra el EGFR-1 humano, de Cell Signaling Technology, Inc. (2256), USA.
- **anti-VEGFR:** anticuerpo monoclonal de ratón contra el VEGFR-2 humano, de Abcam (ab42228), Reino Unido.
- **Anticuerpos IgG de ratón:** anticuerpo de control isotópico, de Cell Signaling Technology, Inc. (5415), USA.
- **anti-EAA1:** anticuerpo policlonal de conejo, contra la proteína EAA1, un marcador de los endosomas tempranos, de Cell Signaling Technology, Inc. (2411), USA.

Los anticuerpos secundarios utilizados han sido:

- **anti-IgG de ratón**, producido en cabra, conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Jackson ImmunoResearch, USA.
- **anti-IgG de cabra**, producido en conejo, conjugado con FITC. Jackson ImmunoResearch, USA.
- **anti-IgG de ratón**, producido en cabra, conjugado con Texas red. Jackson ImmunoResearch, USA.
- **anti-IgG de ratón**, producido en cabra, conjugado con Alexa Fluor 350. Invitrogen, USA.



- **anti-IgG de ratón**, producido en cabra, conjugado con Alexa Fluor 594. Invitrogen, USA.
- **anti-IgG de conejo**, producido en cabra, conjugado con Texas red. Invitrogen, USA.

3. Fármacos

Los fármacos utilizados han sido:

- **Doxorubicina**. Fármaco quimioterapéutico de la familia de las antraciclinas, inhibidor de la topoisomerasa II. AppliChem GmbH (A4361), Alemania.
- **Ácido retinoico**. Metabolito de la vitamina A que induce diferenciación celular e inhibición de la proliferación. AppliChem GmbH (A6947), Alemania.
- **Motesanib difosfato (AMG-706)**. Inhibidor tirosín quinasas, principalmente de VEGFR1/2/3, PDGFR, c-Kit y Ret. Santa Cruz Biotechnology (sc-364541), USA.

Para la preparación de las soluciones madre, los fármacos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO), de acuerdo con la ficha técnica proporcionada por la casa comercial.



4. Otros materiales

Otros materiales utilizados han sido:

- Nanopartículas (NPs) esféricas de látex fluorescente (FITC) de 100 nm de diámetro. Polysciences Inc (17150), USA.
- Dextrano de 10 KDa marcado con Texas red. Invitrogen (D1828), USA.
- Placas para inmunofluorescencia de 8 pocillos. Thermo Fisher Scientific Inc. (System 154534), USA.
- Placas para cultivo de 24 pocillos. Starstedt, USA.
- Paraformaldehído (PFA). MP Biomedicals, USA.
- Tampón salino fosfato (PBS). BD, USA.
- Albúmina de suero bovino (BSA). PAA The cell culture Company, Austria.
- Tritón X-100 de Boehringer Mannheim, Alemania.
- DAPI de Thermo Fisher Scientific Inc., USA.
- Medio de montaje Mowiol 4-88. Sigma-Aldrich, Alemania.

Salvo que se especifique lo contrario, el resto de reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich, USA.



III.2. Métodos

1. Detección de las dianas en la superficie celular

La detección de las dianas en la superficie celular se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia. Para ello, las diferentes líneas celulares fueron sembradas en placas para inmunofluorescencia de 8 pocillos, y tras dos días de cultivo para alcanzar el 90% de confluencia, se realizó el siguiente protocolo:

1. Se lavaron las células dos veces con 800 μ L de PBS.
2. Se fijaron con 200 μ L de PFA frío al 2% durante 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Las células sin permeabilizar fueron lavadas tres veces con 800 μ L de PBS.
4. Se incubó cada pocillo con el anticuerpo primario correspondiente (anti-TSHR [1:200], anti-EGFR [1:250] o anti-VEGFR [1:20]), preparado en 200 μ l de una solución de bloqueo con 1% de BSA en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente.
5. Se lavaron las células tres veces con 800 μ L de PBS.
6. Se incubó cada pocillo con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con FITC [1:250] (anti-ratón para los primarios anti-EGFR, anti-VEGFR y anti-TSHR, éste último de Serotec, y anti-conejo para la detección del primario anti-TSHR de Sigma), preparados también en 200 μ L de solución de bloqueo con 1% de BSA, durante 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Se lavaron las células tres veces con 800 μ L de PBS.



8. Se tiñeron los núcleos con 200 μL de DAPI [1:10.000] durante 5 minutos.
9. Finalmente, tras lavar las células con 800 μL de PBS, las preparaciones fueron montadas con medio de montaje Mowiol.

Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia Olympus BX50, objetivo UPlanFL 40x, con filtros U-MWIBA3 (excitación BP460-495 nm, dicroico DM505 nm, emisión BA515-550 nm), U-MNG2 (excitación BP530-550 nm, dicroico DM570 nm, emisión BA590-800+ nm). U-MNU2 (excitación BP360-470 nm, dicroico DM400 nm, emisión BA420 nm), y cámara digital Hamamatsu ORCA-03G. El procesamiento de la imagen digital se llevó a cabo usando el software Image Pro-Plus 7.0 (Media Cybernetics, USA).

2. Preparación de las NPs

Como prototipo de NP hemos utilizado partículas esféricas de látex fluorescente (FITC) de 100 nm de diámetro. Estas partículas son muy homogéneas en tamaño y forma, y fácilmente trazables mediante microscopia de fluorescencia, por lo que, a pesar de no ser biodegradables, y por tanto, no utilizables en humanos, constituyen un modelo muy apropiado para el desarrollo de sistemas dirigidos.

Las NPs se prepararon mediante adsorción de uno de los vectores de direccionamiento (anticuerpo anti-TSHR, anti-EGFR o IgG control) a su superficie. Para ello:

1. Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad una solución conteniendo una mezcla de 7,5 μL de NPs ($3,4 \times 10^{11}$ NPs), 25 μg de anticuerpo y PBS hasta alcanzar un volumen final de 35 μL .



2. Transcurrido este tiempo, se lavaron las NPs con 1 ml de PBS.
3. Se centrifugó la muestra a 12.000 g durante 3 min.
4. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 500 μ L de PBS conteniendo un 1% de BSA.
5. Por último, con el fin de romper los agregados, la solución fue sonicada con 25 pulsos a potencia media.

Con el fin de comprobar la presencia de los diferentes anticuerpos adsorbidos a las NPs, llevamos a cabo el siguiente protocolo:

1. Sobre un portaobjetos se pipetearon 10 μ L de las diferentes soluciones de NPs con los diferentes vectores de direccionamiento.
2. Se dejó secar durante al menos 30 minutos, para permitir la adhesión de las NPs al cristal.
3. Se incubó con 20 μ L de un anticuerpo secundario conjugado con Texas Red durante 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Se lavó suavemente con 100 μ L de PBS.
5. Las diferentes preparaciones fueron montadas con Mowiol.

Se tomaron imágenes con el microscopio de fluorescencia.

En el caso de las NPs dirigidas conteniendo los distintos fármacos, se preparó una mezcla de 7,5 μ L de NPs, 12,5 μ g de anticuerpo, 12,5 μ g del fármaco y PBS hasta alcanzar un volumen final de 35 μ L y se siguió el mismo procedimiento. Finalmente, las NPs no dirigidas conteniendo el fármaco doxorubicina se prepararon de la misma manera pero sustituyendo el volumen de anticuerpo por PBS.



3. Unión de las NPs a las células

Para examinar la capacidad de unión específica de las NPs a las células tiroideas, se sembraron las diferentes líneas celulares en placas para inmunofluorescencia. Cuando los diferentes cultivos alcanzaron aproximadamente el 90% de confluencia se siguió el siguiente protocolo:

1. Se lavaron las células dos veces con 800 μL de su respectivo medio de cultivo frío.
2. Se incubaron las células 30 minutos a 4°C en 200 μL de medio completo con un 1% de BSA, conteniendo una proporción 1:10 de la preparación de NPs ($1,36 \times 10^{10}$ NPs/pocillo) con el vector de direccionamiento anti-TSHR, anti-EGFR, o IgG (control).

La incubación a 4°C permite la unión del vector de direccionamiento a su ligando, pero la célula se encuentra en un estado metabólicamente inactivo, por lo que no puede producirse endocitosis.

3. Se lavaron las células tres veces con 800 μL de su respectivo medio de cultivo.
4. Se fijaron con 200 μL de PFA frío al 2% durante 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Se lavaron las células tres veces con 800 μL de PBS.
6. Se tiñeron los núcleos celulares con DAPI [1:10.000] en PBS durante 5 minutos.
7. Por último, las células fueron lavadas con PBS y montadas con medio de montaje Mowiol.

Las imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia fueron cuantificadas con el procesador Image Pro-Plus 7.0.



4. Método de doble marcaje fluorescente

Para detectar si las células estudiadas son capaces de internalizar nuestras NPs, hemos utilizado un método de doble marcaje fluorescente, previamente descrito (Figura 6) [75]. Este método nos permite diferenciar las NPs internalizadas por la célula de las NPs adheridas a la superficie celular. Tras la incubación de las células con las NPs fluorescentes verdes (FITC) conteniendo el vector de direccionamiento, se lleva a cabo una fijación sin permeabilizar las membranas celulares. Posteriormente, las células se incuban con un anticuerpo secundario conjugado con Texas Red (rojo) que reconoce la fracción constante Fc del vector de direccionamiento. Debido a que las células no están permeabilizadas, este anticuerpo secundario sólo podrá marcar las NPs que estén en la superficie celular. En el microscopio de fluorescencia, en el canal verde pueden visualizarse todas las NPs asociadas a las células (NPs totales), mientras que en el canal rojo sólo se detectan las NPs que quedan en la superficie. En la superposición de las imágenes, las NPs que han sido internalizadas por las células se observan en verde, mientras que las localizadas en la superficie celular se observan en amarillo (doble marcaje).

Para validar el método de doble marcaje, se llevaron a cabo dos estrategias diferentes. Por una parte, para comprobar la correcta detección de las NPs unidas a la superficie celular, se siguió el protocolo de unión (punto 3), ya que la incubación a 4°C permite sólo la unión de las NPs a la superficie celular. Tras la fijación de las células se realizó una tinción con el anticuerpo secundario fluorescente marcado en rojo. Bajo estas condiciones, las imágenes superpuestas obtenidas con el microscopio de fluorescencia deben mostrar todas las NPs en amarillo (doble



marcaje). La estimación del porcentaje de internalización bajo estas condiciones permite calcular el *background* del método de doble marcaje.

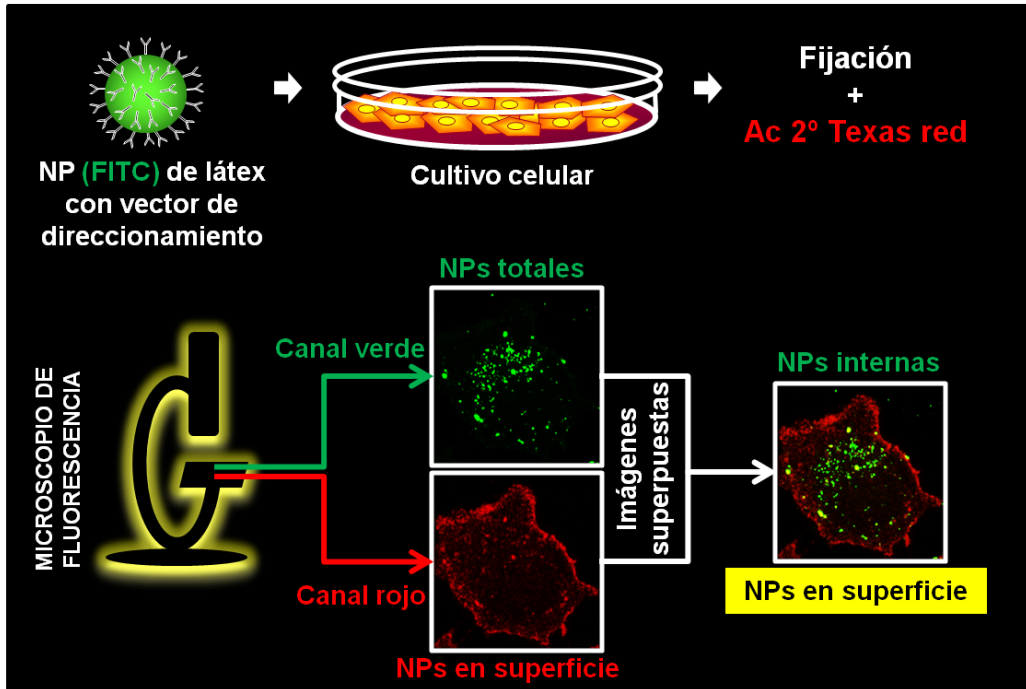


Figura 6. Método de doble marcaje fluorescente.

Por otra parte, para que el método de doble marcaje detecte de forma correcta las NPs endocitadas por la célula, es imprescindible que los anticuerpos secundarios marcados con Texas Red no tengan acceso al interior de la célula, por lo que mantener la integridad de las membranas celulares durante el proceso de fijación es de suma importancia. Para comprobar que durante nuestro proceso de fijación no se permeabilizan las membranas de las células utilizamos como control el marcaje fluorescente de los endosomas tempranos, usando el anticuerpo anti-EAA1.



Las diferentes líneas celulares fueron sembradas en placas para inmunofluorescencia. Tras 48 horas de cultivo para alcanzar aproximadamente el 90% de confluencia, se realizó el siguiente protocolo de inmunofluorescencia:

1. Se lavaron las células dos veces con 800 μ L de PBS.
2. Se utilizaron tres condiciones de fijación diferentes: 10 minutos con 200 μ L de PFA frío al 2%, 4%, o al 2% seguido de permeabilización con Tritón X-100 al 0,2% durante otros 10 minutos (control de permeabilización).
3. Las células fueron lavadas tres veces con 800 μ L de PBS.
4. Se incubó con el anticuerpo primario EAA1 [1:100] preparado en 200 μ l de una solución de bloqueo con 1% de BSA durante 1 hora a temperatura ambiente.
5. Se lavaron las células tres veces con 800 μ L de PBS.
6. Se incubaron las células con el anticuerpo secundario anti-conejo marcado con Texas Red [1:250], preparado en 200 μ L de la solución de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Se lavaron las células tres veces con 800 μ L de PBS.
8. Se tiñeron los núcleos con DAPI [1:10.000] durante 5 minutos.
9. Finalmente, se lavaron las células con 800 μ L de PBS y las preparaciones fueron montadas con medio de montaje Mowiol. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio de fluorescencia y procesadas con el software Image Pro-Plus 7.0.



5. Endocitosis de las NPs

El análisis de la internalización de las NPs por las células tiroideas se realizó en placas de cultivos para inmunofluorescencia. Se utilizaron cultivos al 90% aproximadamente de confluencia:

1. Se lavaron dos veces con 800 μ L de medio de cultivo.
2. Se incubaron a 37°C durante 1 hora en 200 μ L de medio de cultivo completo con 1% BSA conteniendo una proporción 1:10 ($1,36 \times 10^{10}$ NPs/pocillo) de la preparación de NPs con el vector de direccionamiento. La incubación a 37°C permite la unión y, en su caso, la endocitosis de las NPs.
3. Posteriormente, se lavaron las células tres veces con 800 μ L de medio de cultivo para eliminar las NPs no adheridas a la superficie celular.
4. Se fijaron las células con 200 μ L de PFA frío al 2% durante 10 minutos.
5. Se incubaron 30 minutos con 200 μ L de un anticuerpo secundario [1:100] marcado con Texas Red que reconoce la fracción constante Fc del vector de direccionamiento, preparado en PBS con un 1% de BSA.
6. Se lavaron las células tres veces con 800 μ L de PBS.
7. Se tiñeron los núcleos con DAPI [1:10.000].
8. Por último, las células fueron lavadas con PBS y montadas con Mowiol.

Las imágenes fueron tomadas con el microscopio de fluorescencia y procesadas con el software Image Pro-Plus 7.0.



Para el estudio de la cinética de internalización se siguió el mismo protocolo pero, tras la hora de incubación, se eliminaron mediante lavados con PBS las NPs no unidas a las células y se permitió la endocitosis de las adheridas a la superficie celular incubando a 37°C durante 30 minutos, 1, 3 y 5 horas.

De modo similar, para la determinación de la acumulación intracelular y superficial de NPs por célula se siguió el mismo protocolo, pero con incubación continua en presencia de las NPs, tanto a tiempos cortos (5, 15 y 30 minutos), como a tiempos prolongados (3 y 5 horas).

6. Tráfico intracelular hacia los lisosomas

El estudio del destino intracelular de las NPs endocitadas por la célula se realizó mediante la determinación de la colocalización de dichas NPs con los lisosomas:

1. Las células se lavaron dos veces con 600 μ L de medio de cultivo.
2. Se incubaron a 37°C durante 1 hora en 200 μ L de medio de cultivo completo conteniendo 25 μ g de dextrano marcado con Texas Red.
3. Se lavaron tres veces con 800 μ L de medio de cultivo para eliminar el dextrano en suspensión y se incubaron las células durante 1 hora a 37°C con medio de cultivo completo para permitir el tráfico del dextrano hacia los lisosomas.
4. Posteriormente, se incubaron a 37°C durante otra hora en 200 μ L de medio de cultivo completo con 1% BSA conteniendo una proporción 1:10 ($1,36 \times 10^{10}$ NPs/pocillo) de la preparación de las NPs con el vector de direccionamiento.



5. Después de la incubación, se lavaron las células tres veces con 800 μL de medio de cultivo para eliminar las NPs no adheridas a la superficie celular.
6. A continuación se incubaron las células en 500 μL de medio completo a 37°C durante 30 minutos, 1, 3 y 5 horas para permitir el tráfico intracelular de las NPs.
7. Trascurridos los diferentes tiempos de incubación, se fijaron las células con 200 μL de PFA frío al 2% durante 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Se lavaron las células tres veces con 800 μL de PBS.
9. Se incubaron con 200 μL de un anticuerpo secundario [1:100] marcado con Alexa Fluor 350 que reconoce la fracción constante Fc del vector de direccionamiento, para marcar las partículas en la superficie celular.
10. Se lavaron las células tres veces con 800 μL de PBS.
11. Por último, las células fueron montadas con medio de montaje Mowiol.

Las imágenes fueron tomadas con el microscopio de fluorescencia Olympus y procesadas con el software Image Pro-Plus 7.0.



7. Cálculo del número de NPs unidas e internalizadas por la célula

La cuantificación del número de NPs totales y el porcentaje de internalización se estimó a partir del análisis de las imágenes con el procesador Image Pro-Plus 7.0. En primer lugar, se determinó el área correspondiente al total de las NPs (señal verde) y a las NPs localizadas en superficie (señal amarilla).

El cálculo del número de NPs totales se estimó dividiendo el área total verde por el área máxima que puede presentar una esfera de 100 nm de diámetro ($\pi r^2 = 7,854 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$). Por otro lado, se realizó el recuento de células a partir de los núcleos teñidos con DAPI. Por último, se dividió el número de NPs totales entre el total de células, estimándose así el número de NPs por célula (NPs/cel).

El porcentaje de internalización se calculó mediante la fórmula $(1-r) \times 100$, siendo r el ratio entre el área superficial amarilla y el área total verde.

A partir de los datos del número de NPs/cel y el porcentaje de internalización se calcularon, tanto el número de NPs/cel internalizadas como el número de NPs/cel en superficie.

8. Viabilidad/Citotoxicidad celular

La viabilidad/citotoxicidad celular se determinó utilizando el método de exclusión de azul de tripano, el cual permite diferenciar las células vivas de las células muertas. Este método se fundamenta en la integridad de las membranas celulares que presentan las células viables, en contraste con su desorganización en las células muertas. En las células vivas, la membrana está intacta y, por lo tanto, es selectiva al paso del



colorante azul de tripano, que es excluido. Por el contrario, en las células muertas, como presentan una membrana desorganizada, el colorante es capaz de atravesarla, tiñendo estas células de un azul distintivo. Para determinar la viabilidad/citotoxicidad de las células incubadas con las NPs conteniendo distintos fármacos, se sembraron las células en placas de 24 pocillos al 80% de confluencia:

1. Las células se lavaron dos veces con 1 mL de PBS.
2. Se incubaron las células durante 5h, 10h y 24h con 400 μ L de una de las siguientes preparaciones en PBS con 1% de BSA:
 - a. Medio completo con DMSO (control).
 - b. NPs anti-EGFR sin fármaco.
 - c. NPs anti-EGFR con doxorubicina (NPs doxo/anti-EGFR).
 - d. NPs no dirigidas con doxorubicina (NPs doxo).
 - e. NPs anti-EGFR con ácido retinoico (NPs retinoico/anti-EGFR).
 - f. NPs anti-EGFR con AMG-706 (NPs AMG/anti-EGFR).
 - g. Doxorubicina libre en medio completo [4,3 μ M].
 - h. Ácido retinoico libre en medio completo [8,4 μ M].
 - i. AMG706 libre en medio completo [4,4 μ M].

En todos los casos, con o sin fármaco, se utilizaron $2,72 \times 10^{10}$ NPs por pocillo, y la cantidad final de cada fármaco por pocillo fue la misma tanto en NPs dirigidas, sin dirigir o libre (1 μ g).



3. Transcurrido los diferentes tiempos de incubación, se retiró y guardó el sobrenadante.
4. Se añadió 300 μL de tripsina y se incubaron las células a 37°C hasta que se despegaron de la placa.
5. Se añadió 300 μL del medio de cultivo completo.
6. Se recogió la suspensión celular y se añadió a su respectivo sobrenadante, con el fin de obtener todas las células, tanto las vivas (adheridas) como las muertas (en el sobrenadante).
7. Se mezclaron 12 μL de la suspensión celular con 10 μL de azul de tripano y se incubó la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Se pipeteó 10 μL de la mezcla en una cámara de conteo y se insertó en el contador celular automático TC10 de Bio-Rad (USA).

De esa forma se obtuvieron tanto el número de células totales como el porcentaje de viabilidad celular.

9. Análisis estadístico

Para comparar dos muestras independientes, tras contrastar la normalidad e igualdad de varianzas de los datos, se compararon las medias aplicando el Test “t” de Student. En el caso de no superar la normalidad o la igualdad de varianzas, se realizó el Test de Mann-Whitney.

Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (SEM). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a partir de valores de $p < 0,05$.

A graphic consisting of two concentric red circles. The inner circle is solid red and contains the Roman numeral 'IV'. The outer circle is a red ring. The text 'IV RESULTADOS' is positioned to the right of the bullseye, with the 'IV' overlapping the inner circle.

IV RESULTADOS



IV. RESULTADOS

1. Análisis de la expresión en superficie de las dianas celulares

En primer lugar, se analizó la expresión en la superficie celular de los marcadores que posteriormente se utilizaron como dianas de las NPs. Para demostrar dicha expresión en las diferentes líneas celulares tiroideas analizadas, se utilizó el marcaje fluorescente con anticuerpos específicos.

Como se observa en la Figura 7, la expresión en superficie de las distintas dianas estudiadas (TSHR, EGFR y VEGFR) fue desigual.

La línea celular de carcinoma anaplásico 8505C, no presentó una inmunotinción uniforme del TSHR, sino que sólo una subpoblación celular mostró dicho receptor en superficie. Sin embargo, la línea celular FTC-133 y la línea control mostraron una expresión más uniforme del TSHR.

En relación a la expresión del EGFR, las tres líneas celulares estudiadas mostraron una inmunotinción intensa y uniforme de este receptor en la membrana plasmática.

Por el contrario, la presencia del VEGFR estuvo restringida a células aisladas de las líneas celulares Thy y FTC-133, mientras que el marcaje fue totalmente negativo en la línea celular 8505C.

Debido a estos resultados, el TSHR y el EGFR fueron elegidos para su caracterización como dianas.

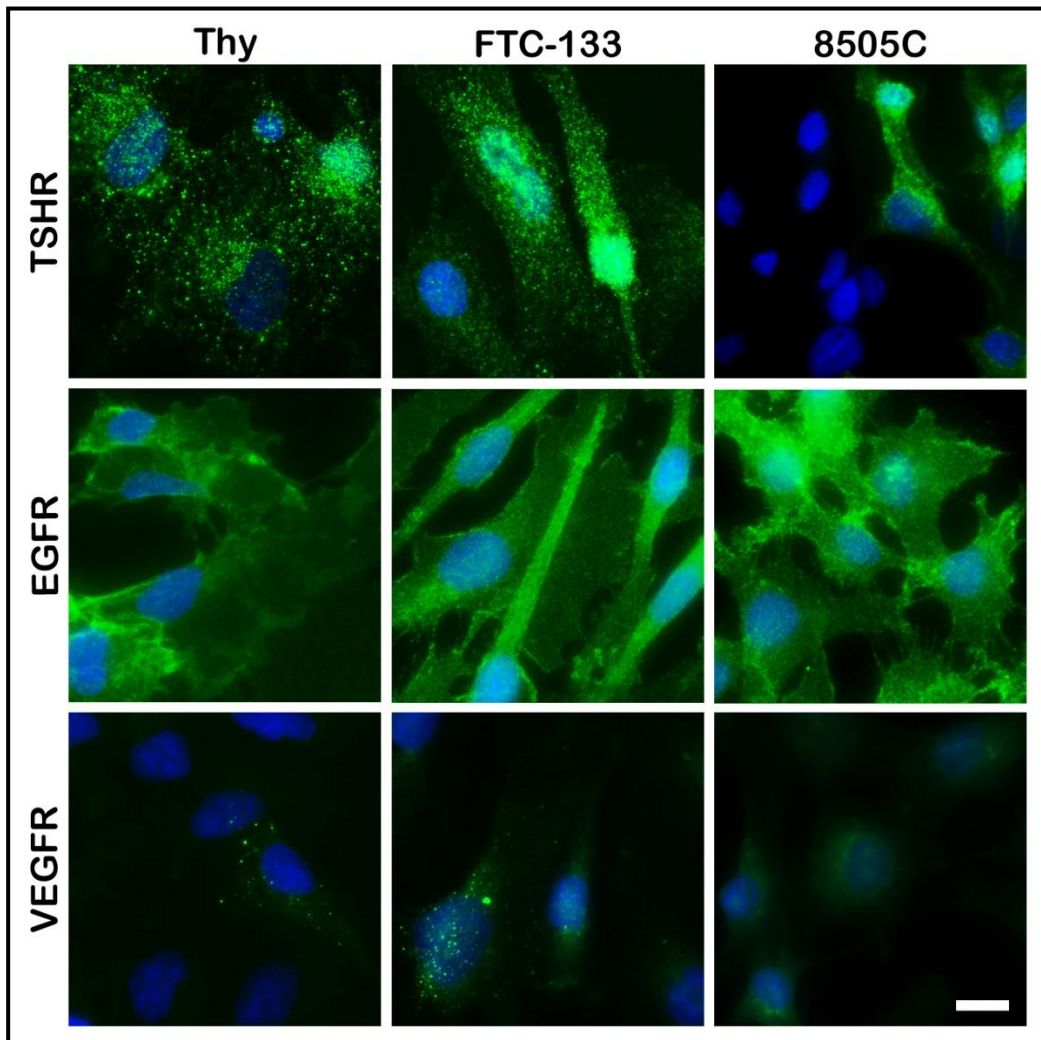


Figura 7. Marcaje fluorescente de los receptores de TSH, EGF y VEGF en las células tiroideas humanas Thy, FTC-133 y 8505C. Las células, fijadas como se describe en el Material y Métodos, se incubaron con los diferentes anticuerpos anti-TSHR, anti-EGFR o anti-VEGFR, seguido de un anticuerpo secundario marcado con FITC. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Barra de escala: 10 μ m.



2. Preparación de las NPs dirigidas

La preparación de las NPs dirigidas a los TSHR y EGFR se realizó siguiendo el protocolo detallado en Material y Métodos. Del mismo modo, también se prepararon NPs recubiertas con un anticuerpo inespecífico (IgG control), que se utilizaron como control de especificidad de la unión.

Con la finalidad de comprobar que los anticuerpos utilizados como vectores de direccionamiento se quedaban, efectivamente, adsorbidos a la superficie de la partícula de látex, las preparaciones de NPs se incubaron con un anticuerpo secundario marcado con Texas Red. Como se observa en la Figura 8, la presencia de doble marcaje (amarillo) en los paneles B, C, D y E indica que la partícula de látex está rodeada del anticuerpo, ya sea anti-TSHR (Serotec y Sigma), anti-EGFR o IgG control. La Figura 8A, muestra como las NPs sin vector de direccionamiento no presentan el doble marcaje (verde). Además, podemos observar que las NPs sin vector de direccionamiento no se agregan (A), mientras que las NPs con los vectores presentan cierto grado de agregación (B, C, D y E). Siguiendo el mismo procedimiento, se comprobó la presencia del vector de direccionamiento en las diferentes formulaciones de NPs con fármacos.

Por otra parte, hemos observado que cuando la preparación de las NPs ha sido correcta, forman un pellet tras la centrifugación. Como puede verse en la Figura 9, las formulaciones de NPs conteniendo el vector de direccionamiento, con o sin fármacos, tienen la propiedad de formar un pellet al someterlas a un campo gravitacional, mientras que las NPs *per se* (NPs) quedan en suspensión.

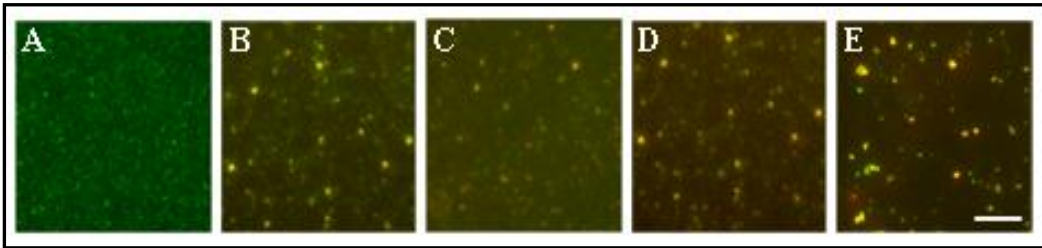


Figura 8. Formación de NPs dirigidas. NPs controles sin vector de direccionamiento (A), anti-TSHR de Serotec (B), anti-TSHR de Sigma (C), anti-EGFR (D) o IgG (E). Las NPs se prepararon mediante adsorción del anticuerpo a la superficie de la partícula de látex fluorescente (FITC) y contratinción con un secundario marcado con Texas Red. Todas las NPs con vector de direccionamiento presentaron doble marcaje. Barra de escala: 10 μ m.

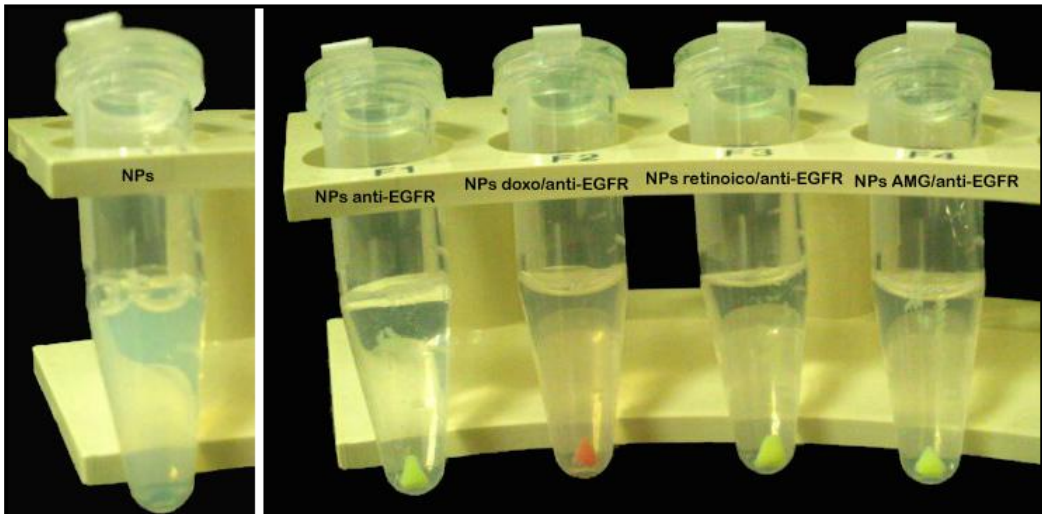


Figura 9. NPs dirigidas al EGFR transportando fármacos. Se prepararon NPs solo con el vector de direccionamiento o conteniendo, además, doxorubicina, ácido retinoico o AMG-706. En la imagen se muestran los precipitados de las diferentes formulaciones de NPs anti-EGFR, NPs doxo/anti-EGFR, NPs retinoico/anti-EGFR y NPs AMG/anti-EGFR, mientras que las NPs controles permanecen en suspensión.



3. Unión específica de las NPs

Después de comprobar la correcta formación de las diferentes NPs dirigidas, se realizaron experimentos de especificidad de unión a las células tiroideas. Para examinar la capacidad de unión específica de las NPs, las células se incubaron a 4°C con una preparación conteniendo las NPs con y sin vector de direccionamiento. La incubación a 4°C permite la unión específica de los vectores de direccionamiento a su ligando, pero la célula está metabólicamente inactiva, por lo que en ningún caso se produce la endocitosis de las NPs.

Las NPs dirigidas que contenían el vector de direccionamiento anti-TSHR (Serotec o Sigma) no se unieron a ninguna de las líneas celulares estudiadas, como se observa en la Figura 10.

Por el contrario, las NPs dirigidas al EGFR sí mostraron unión significativa a las células (Figura 10), aunque el grado de unión fue diferente entre las distintas líneas celulares. En las células controles Thy se detectó un patrón de unión heterogéneo, en el que pequeñas subpoblaciones de células presentaron NPs unidas a la superficie celular, mientras que el resto de las células no presentaron o presentaron una unión no significativa. Del mismo modo, la línea tumoral FTC-133 también presentó un patrón de unión heterogéneo, aunque en este caso fueron sólo pequeñas subpoblaciones celulares las que no presentaron unión o presentaron una unión no significativa. A diferencia de las dos anteriores, la línea 8505C presentó un patrón de unión más regular, donde la mayor parte del cultivo presentó una unión significativa de las NPs anti-EGFR. Además, como se observa en la Figura 10 fueron las células que presentaron un mayor grado de unión.

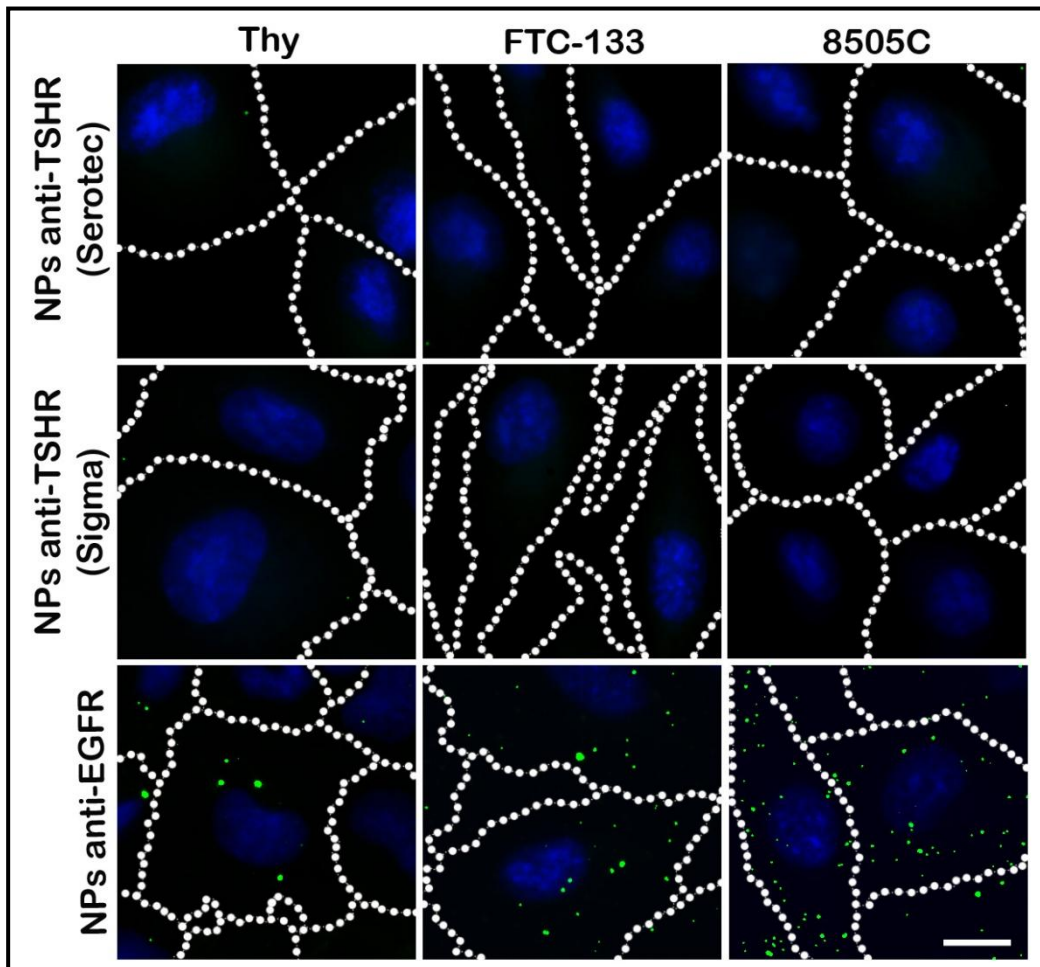


Figura 10. Especificidad de unión de las NPs anti-TSHR y anti-EGFR a las células tiroideas. Las células fueron incubadas en presencia de las diferentes formulaciones de NPs dirigidas durante 30 min a 4°C, para permitir la unión. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. No se detectó unión de ninguno de los dos tipos de NPs dirigidas al TSHR. Sin embargo, las NPs anti-EGFR presentaron unión específica a las células tiroideas. En el caso de las líneas FTC-133 y Thy, se seleccionaron campos con NPs asociadas a las células. Barra de escala: 10 μ m.

Con el fin de descartar la posible unión de las NPs de látex *per se* a las células, se realizó un experimento control de unión de las NPs sin contener ningún vector de direccionamiento. Como se muestra en la Figura 11, las NPs sin vector de direccionamiento no se unieron a ninguna de las líneas celulares.



Como control de especificidad, se llevó a cabo la unión de NPs conteniendo un vector de direccionamiento inespecifico IgG. Como se observa en la Figura 11, las NPs IgG tampoco se unieron a ninguna de las tres líneas celulares estudiadas.

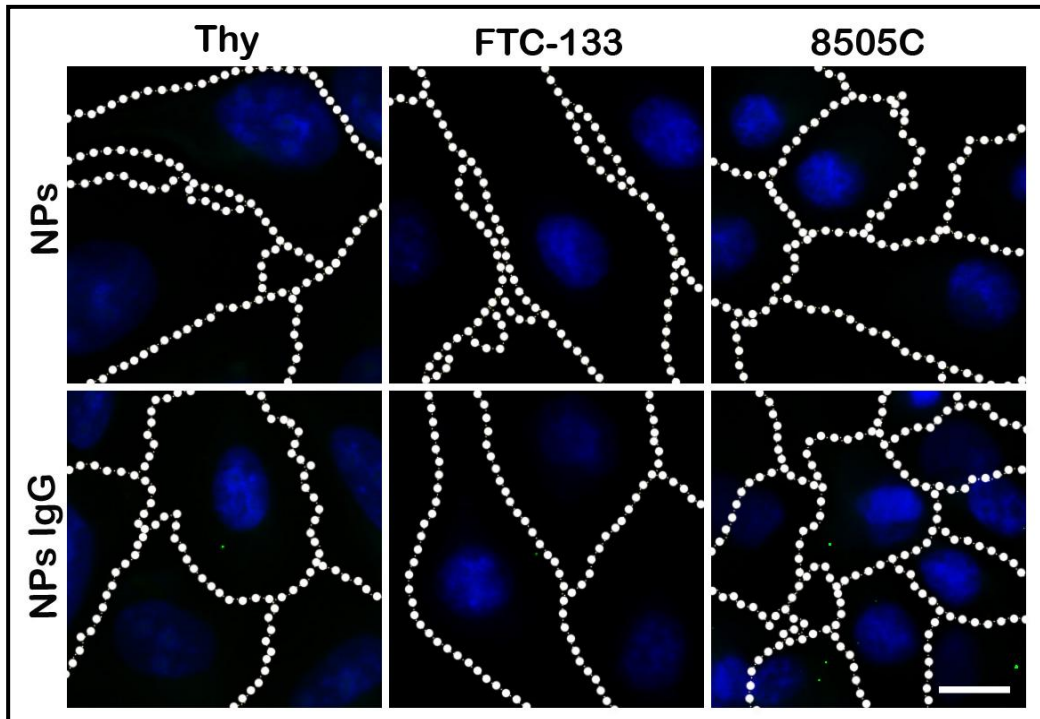


Figura 11. Especificidad de unión de las NPs a las líneas celulares tiroideas. Las células fueron incubadas con NPs sin vectores de direccionamiento (NPs no dirigidas) o con un vector de direccionamiento inespecifico (NPs IgG) durante 30 min a 4°C, para permitir la unión. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. No se detectó unión significativa de las NPs no dirigidas ni de las NPs inespecificas. Barra de escala: 10 μ m.

La cuantificación del número de NPs anti-EGFR unidas a cada tipo celular se llevó a cabo mediante el análisis de las imágenes, como se detalla en Materiales y Métodos (punto 7). En la Figura 12 se observa que el valor medio de NPs anti-EGFR unidas por célula fue mayor en la línea 8505C (3511 ± 299), seguida de la línea FTC-133 (2527 ± 249) y, por último, la línea control (505 ± 74). Dichas diferencias fueron estadísticamente significativas.

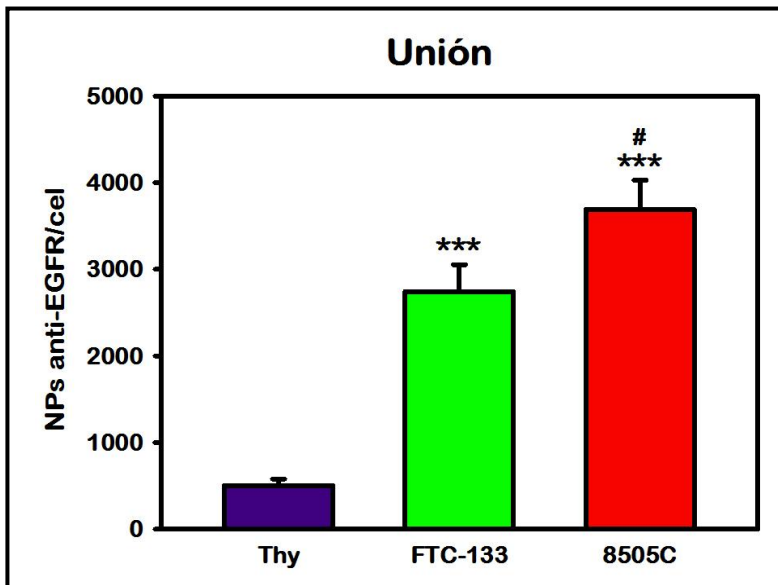


Figura 12. Cuantificación de las NPs anti-EGFR unidas a las células tiroideas. El número medio de NPs anti-EGFR unidas por célula fue de 505 ± 74 , 2527 ± 249 y 3511 ± 299 en las líneas Thy, FTC-133 y 8505C, respectivamente. Los datos se representan como la media \pm SEM. $n \geq 30$ imágenes procedentes de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ respecto a las controles Thy; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ respecto a la tumoral FTC-133.

4. Validación del método de doble marcaje fluorescente

Para diferenciar entre las NPs internalizadas por la célula de las NPs unidas a la superficie celular, se utilizó un método de doble marcaje previamente descrito [75]. Aunque este método ha sido ampliamente utilizado por otros grupos, se han llevado a cabo dos estrategias diferentes para validarlo en nuestro laboratorio. Por un lado, se comprobó que las NPs unidas a la superficie celular se detectaban de manera correcta con el anticuerpo secundario y, por otro lado, se comprobó que durante dicho proceso el anticuerpo secundario no podía acceder al interior celular, ya que las membranas celulares se mantienen sin permeabilizar.



La estrategia que hemos empleado para la correcta detección de las NPs en la superficie celular ha sido utilizar un anticuerpo secundario marcado con Texas Red contra el vector de direccionamiento para contra-teñir las NPs, tras permitir la unión durante 30 minutos a 4°C. A esta temperatura, como se ha explicado anteriormente, las células se encuentran en un estado metabólicamente inactivo, de manera que todas las NPs deben encontrarse en la superficie celular. Como se observa en la Figura 13, las imágenes superpuestas muestran todas las NPs en amarillo (doble marcaje), indicando que en todos los casos, el anticuerpo secundario conjugado con Texas Red marca las NPs verdes unidas a la membrana celular. El background del método se cuantificó calculando el porcentaje de internalización ($17 \pm 1 \%$) bajo estas condiciones.

Una vez confirmado que las NPs superficiales se marcaban de manera correcta, se comprobó que el anticuerpo secundario empleado con este fin no teñía las NPs que habían sido internalizadas por las células. Para ello, la estrategia empleada fue la detección de un orgánulo intracelular (endosoma temprano) bajo diferentes condiciones de fijación, ya que es durante este proceso cuando las membranas celulares se pueden permeabilizar. En la Figura 13B se aprecia la ausencia total de marcaje intracelular bajo nuestras condiciones de fijación, 10 minutos con PFA frío al 2%. Aunque el empleo de PFA al 4% produjo cierto grado de permeabilización de las membranas celulares, ya que algunos endosomas tempranos aparecían marcados, sólo las células tratadas con Tritón X-100 al 0,2% presentaron una permeabilización completa.

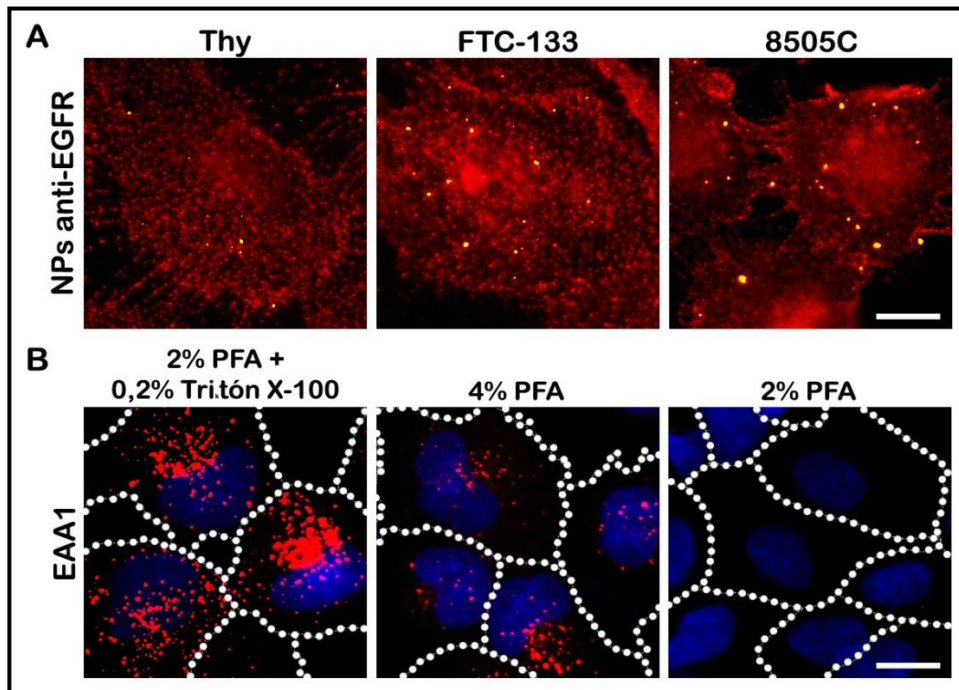


Figura 13. Validación del método de doble marcaje. A) Detección de NPs anti-EGFR en la superficie de las diferentes líneas celulares tiroideas. Las células fueron incubadas con NPs anti-EGFR durante 30 min a 4°C, para permitir la unión. Las NPs fueron teñidas con un anticuerpo secundario marcado con Texas Red. Las imágenes superpuestas muestran las NPs en amarillo. **B)** Permeabilización y marcaje fluorescente de los endosomas tempranos en la línea 8505C. Las células 8505C fueron fijadas con PFA al 2%, 4%, o PFA al 2% más 0,2% de Tritón X-100. Después de 1 h de incubación con el anticuerpo anti-EAA1 [1:200], las células se incubaron con un anticuerpo secundario marcado con Texas Red. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Barra de escala: 10 μ m.



5. Endocitosis de las NPs anti-EGFR por las células

Una vez obtenidos los datos de unión, se procedió con los estudios de internalización de las NPs anti-EGFR, utilizando el método de doble marcaje fluorescente anteriormente descrito y validado en nuestro laboratorio.

5.1. Internalización tras 1h de incubación a 37°C

En primer lugar se estudió la internalización de las NPs anti-EGFR por las diferentes líneas celulares durante una hora a 37°C. A esta temperatura, la célula está metabólicamente activa, por lo que se permite la endocitosis de las NPs.

En la Figura 14A se muestran imágenes representativas de la internalización de las NPs anti-EGFR en las tres líneas celulares tiroideas. En las imágenes se observan NPs anti-EGFR internalizadas en verde (flechas) y partículas asociadas a la membrana celular en amarillo (puntas de flecha). Además, se observa que las líneas tumorales FTC-133 y 8505C presentan un mayor número total de NPs anti-EGFR si se compara con la línea control Thy.

En la Figura 14B se representa el porcentaje de internalización de las NPs anti-EGFR, calculado como se describe en el Material y Métodos (punto 7). Como muestra la Figura, después de una hora de incubación, las tres líneas celulares presentaron endocitosis de las NPs anti-EGFR. Aunque el porcentaje de internalización fue más elevado en la línea tiroidea control Thy ($45\pm 3\%$) en comparación con las líneas tumorales FTC-133 y 8505C ($37\pm 2\%$ y $35\pm 2\%$, respectivamente), sólo en el caso de las células 8505C esa diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Estos resultados muestran que las NPs anti-EGFR fueron capaces de



inducir la endocitosis en las tres líneas celulares estudiadas, superándose el *background* del método (17 ± 1) tras una hora de incubación.

A pesar de que las células controles Thy presentaron un porcentaje de internalización algo mayor que las células tumorales FTC-133 y 8505C, sin embargo, como muestra la gráfica de la Figura 14C, el valor medio de NPs anti-EGFR totales asociadas por célula fue significativamente mayor en la línea 8505C (9120 ± 838 NPs anti-EGFR/cel), seguida de la línea FTC-133 (5610 ± 560 NPs anti-EGFR/cel) y, por último, la línea control Thy (1824 ± 232 NPs anti-EGFR/cel).

Aunque las NPs anti-EGFR fueron capaces de inducir la endocitosis en las diferentes líneas celulares, tras una hora de incubación el porcentaje de internalización no alcanzó el cincuenta por ciento, lo que podría indicar un proceso de endocitosis lento. Con el fin de estudiar la dinámica de internalización, sin que se viera afectada por la unión continua de NPs, se realizó el estudio de la cinética de internalización.

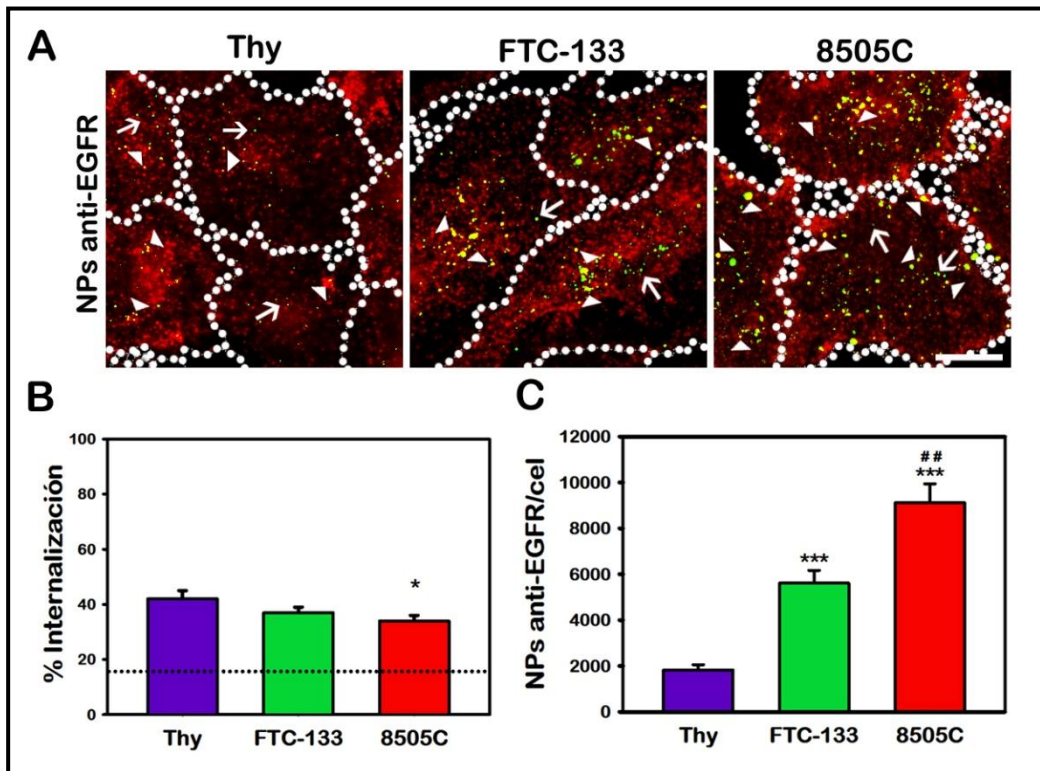


Figura 14. Las células tiroideas Thy, FTC-133 y 8505C internalizan las NPs anti-EGFR. **A)** Imágenes representativas de las tres líneas celulares tiroideas tras 1h de incubación con las NPs anti-EGFR a 37°C y posterior tinción con un anticuerpo secundario marcado con Texas Red. Las imágenes superpuestas muestran NPs anti-EGFR internalizadas en verde (flechas) y asociadas a la membrana celular en amarillo (puntas de flecha). Barra de escala: 10 μ m. **B)** Porcentaje de internalización. La línea de puntos señala el *background* del método (17 \pm 1). **C)** Cuantificación del número total de NPs anti-EGFR asociadas por célula. Los datos se representan como la media \pm SEM. $n \geq 30$ imágenes procedentes de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ respecto a las controles Thy; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ respecto a la tumoral FTC-133.



5.2. Cinética de internalización de las NPs anti-EGFR

Para determinar la rapidez con la que se producía la endocitosis de las NPs anti-EGFR, se incubaron las células con las NPs durante una hora a 37°C. Pasado este tiempo, se eliminaron las NPs no unidas a las células y se permitió la internalización incubando los cultivos a 37°C durante diferentes tiempos (0 y 30 min, 1, 3 y 5h).

En la Figura 15 se observa cómo a medida que pasa el tiempo, va disminuyendo el número de NPs localizadas en la superficie celular (amarillas), a la vez que aumentan en el interior de las células (verdes).

La Figura 16 representa gráficamente los porcentajes de internalización de las NPs anti-EGFR a los diferentes tiempos de incubación. Se observa que no existieron diferencias en la cinética de internalización entre las líneas Thy y FTC-133 durante la primera hora, aunque el máximo porcentaje de internalización, alcanzado por ambas líneas celulares a partir de las 3 horas, fue significativamente menor ($p < 0,01$) en las FTC-133 ($85 \pm 3\%$), comparado con las células controles Thy ($95 \pm 2\%$).

En relación a la cinética de internalización en la línea 8505C, observamos que durante la primera hora de incubación se produce una rápida internalización, mientras que a partir de ese tiempo y hasta las cinco horas de incubación la velocidad de internalización descendió considerablemente. A pesar de ello, el porcentaje máximo de internalización alcanzado por esta línea fue $96 \pm 1\%$, el mismo que el alcanzado por la línea control, aunque en el caso de las 8505C no se alcanzó hasta las 5 horas.

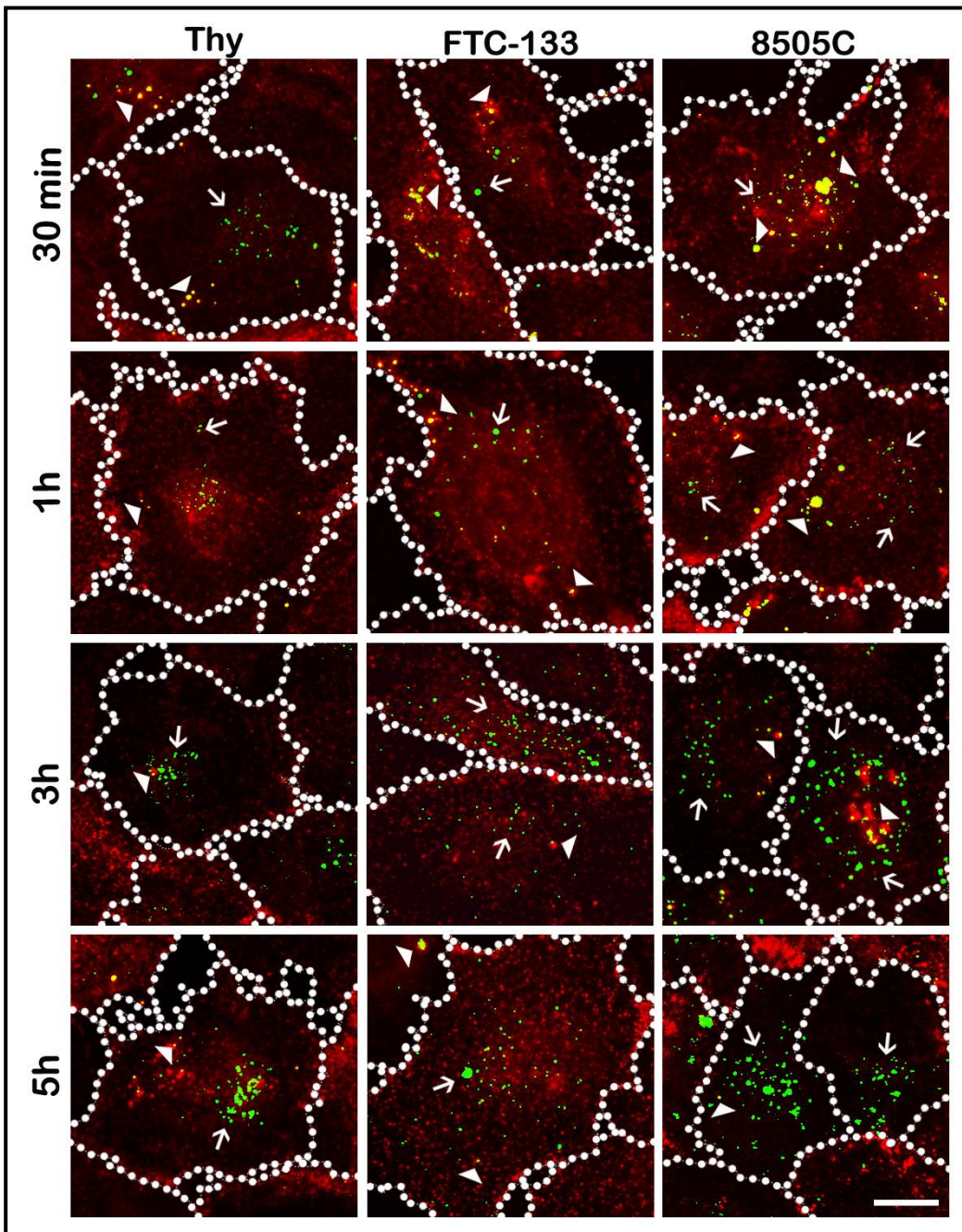


Figura 15. Cinética de internalización de las NPs anti-EGFR. Las células fueron incubadas en la presencia de NPs anti-EGFR durante 1 hora a 37°C. Tras eliminar las NPs no unidas a las células, se incubaron de nuevo durante 30 minutos, 1, 3 y 5 horas. Transcurridos los diferentes tiempos, se aplicó el método de doble marcaje. Las imágenes muestran NPs anti-EGFR internalizadas en verde (flechas) y asociadas a la membrana celular en amarillo (puntas de flecha). Barra de escala: 10 μm .

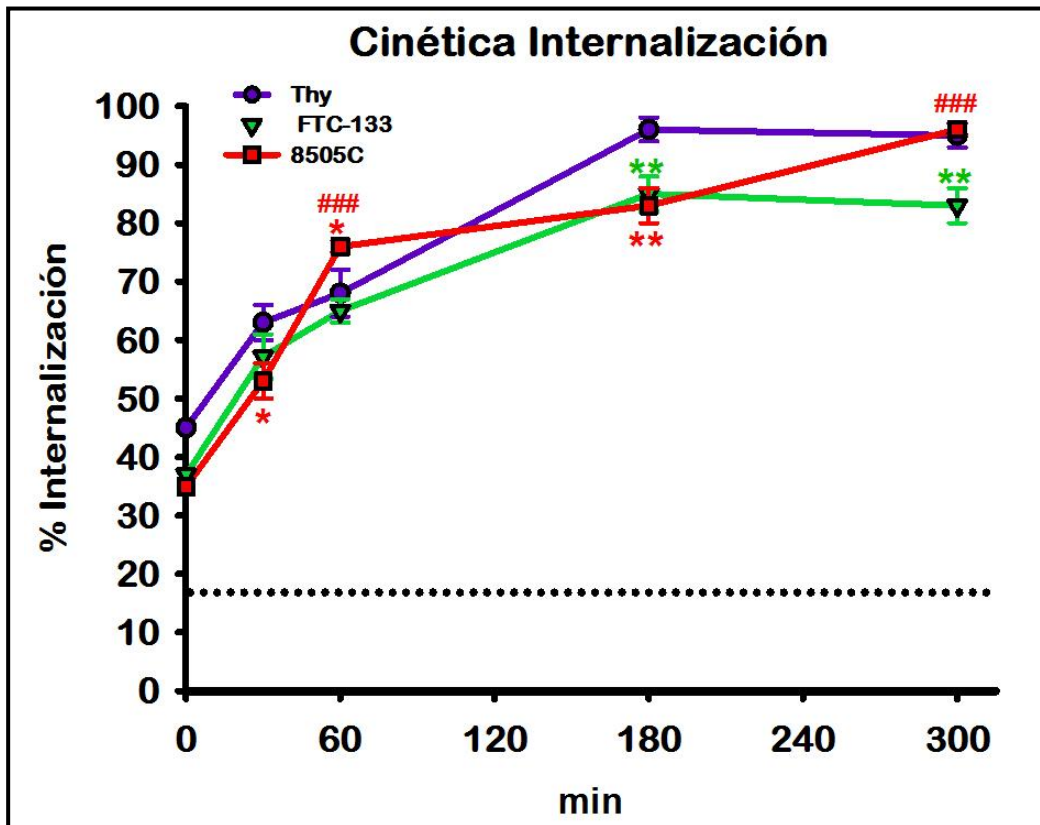


Figura 16. Cinética de internalización de las NPs anti-EGFR. Cuantificación de las NPs anti-EGFR internalizadas como se describe en la Figura 15. El porcentaje de internalización se representa como la media \pm SEM. La línea de puntos señala el *background* del método (17 ± 1). $n \geq 20$ imágenes procedentes de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ respecto a las controles Thy; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ respecto a la tumoral FTC-133.

A pesar de las diferencias encontradas entre las líneas celulares, el porcentaje máximo de endocitosis alcanzado por los tres tipos celulares fue similar.

5.3. Acumulación de NPs anti-EGFR en la superficie y en el interior celular

Con el fin de analizar la capacidad de las células de acumular NPs anti-EGFR tanto en su superficie como en el interior, hemos realizado incubaciones continuas a lo largo del tiempo a 37°C.



A tiempos cortos, las NPs anti-EGFR asociadas a cada línea celular fue incrementándose en el tiempo de manera continua, como se observa en la Figura 17. La línea celular 8505C presentó mayor cantidad de NPs asociadas en todos los tiempos ensayados, mientras que las Thy fue la línea que menos NPs asociadas presentó. También puede observarse en la Figura 17 NPs anti-EGFR en el interior de las células (verdes) a partir de los 30 min, principalmente en las 8505C.

A partir de los datos del número de NPs totales por célula y el porcentaje de internalización, se calculó el número de NPs anti-EGFR en superficie e internalizadas (Figura 18). Para periodos cortos de incubación, el número de NPs anti-EGFR en la superficie de las células Thy y FTC-133 aumenta de forma lineal, lo que indica que el número de NPs anti-EGFR unidas en superficie aumenta a un ritmo constante. En el caso de la línea 8505C, el número de NPs anti-EGFR en superficie aumenta de forma logarítmica, lo que implica un aumento rápido hasta alcanzar la meseta a partir de los 30 minutos con, aproximadamente, 5500 NPs anti-EGFR por célula.

En relación a la acumulación intracelular de NPs anti-EGFR, para periodos cortos de incubación se observó un aumento lineal en las tres líneas celulares (Figura 18). En todos los puntos ensayados, el número de NPs anti-EGFR fue mayor en las células tumorales comparado con las control Thy, presentando las mayores diferencias las 8505C. Tras una hora de incubación, el número de las NPs anti-EGFR internas acumuladas por célula en las líneas Thy, FTC-133 y 8505C correspondió a 847 ± 113 , 2335 ± 245 y 3551 ± 445 , respectivamente.

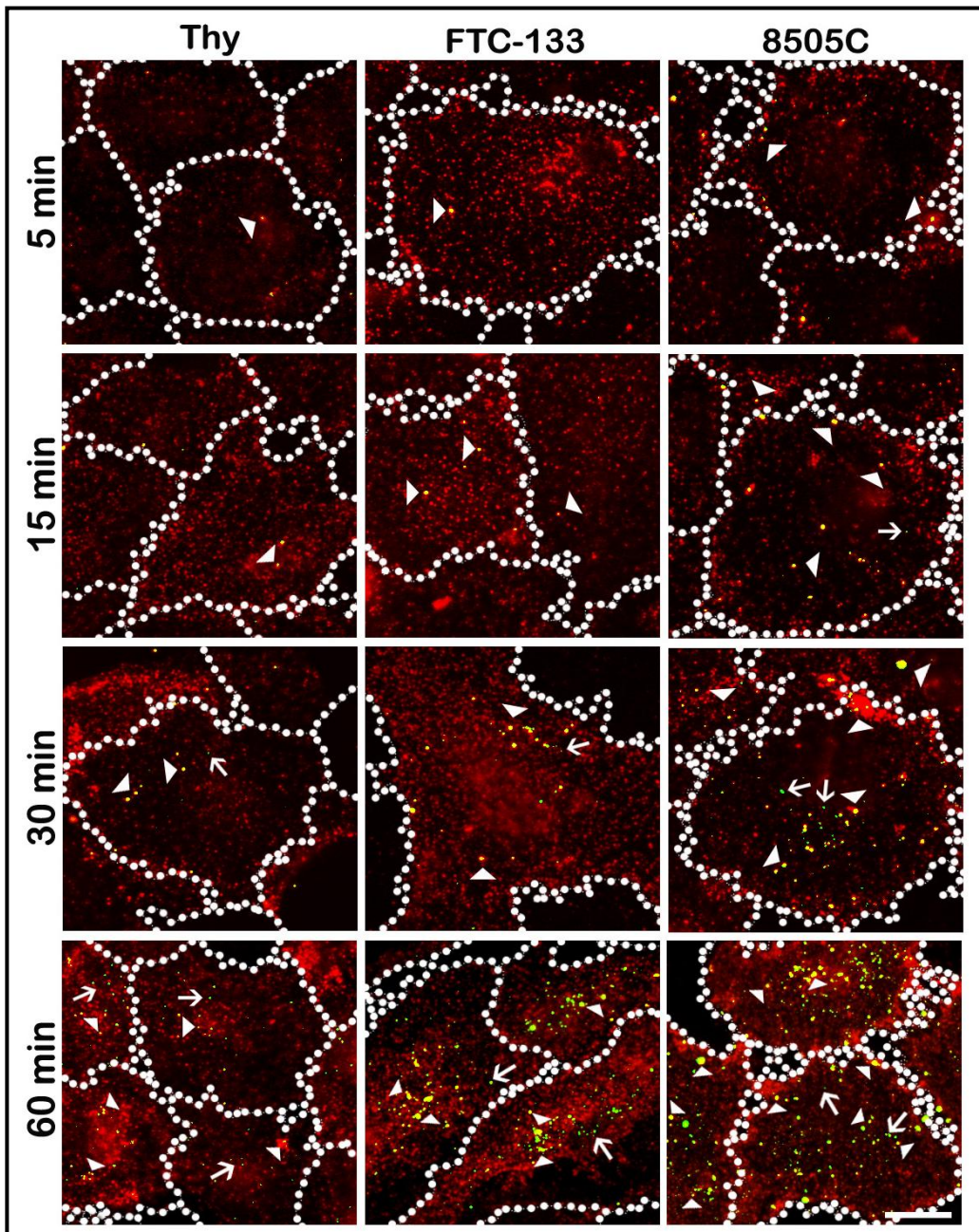


Figura 17. Acumulación de NPs anti-EGFR en la superficie y en el interior celular durante 1 hora. Las células fueron incubadas de forma continua en presencia de NPs anti-EGFR durante 5, 15, 30 y 60 minutos a 37°C. Transcurridos los diferentes tiempos se aplicó el método de doble marcaje. Las imágenes representativas muestran un mayor acúmulo de NPs en las células 8505C. Las puntas de flecha muestran NPs anti-EGFR asociadas a la membrana celular (amarillo), mientras que las flechas señalan las internalizadas (en verde). Escala de la barra: 10 μ m.

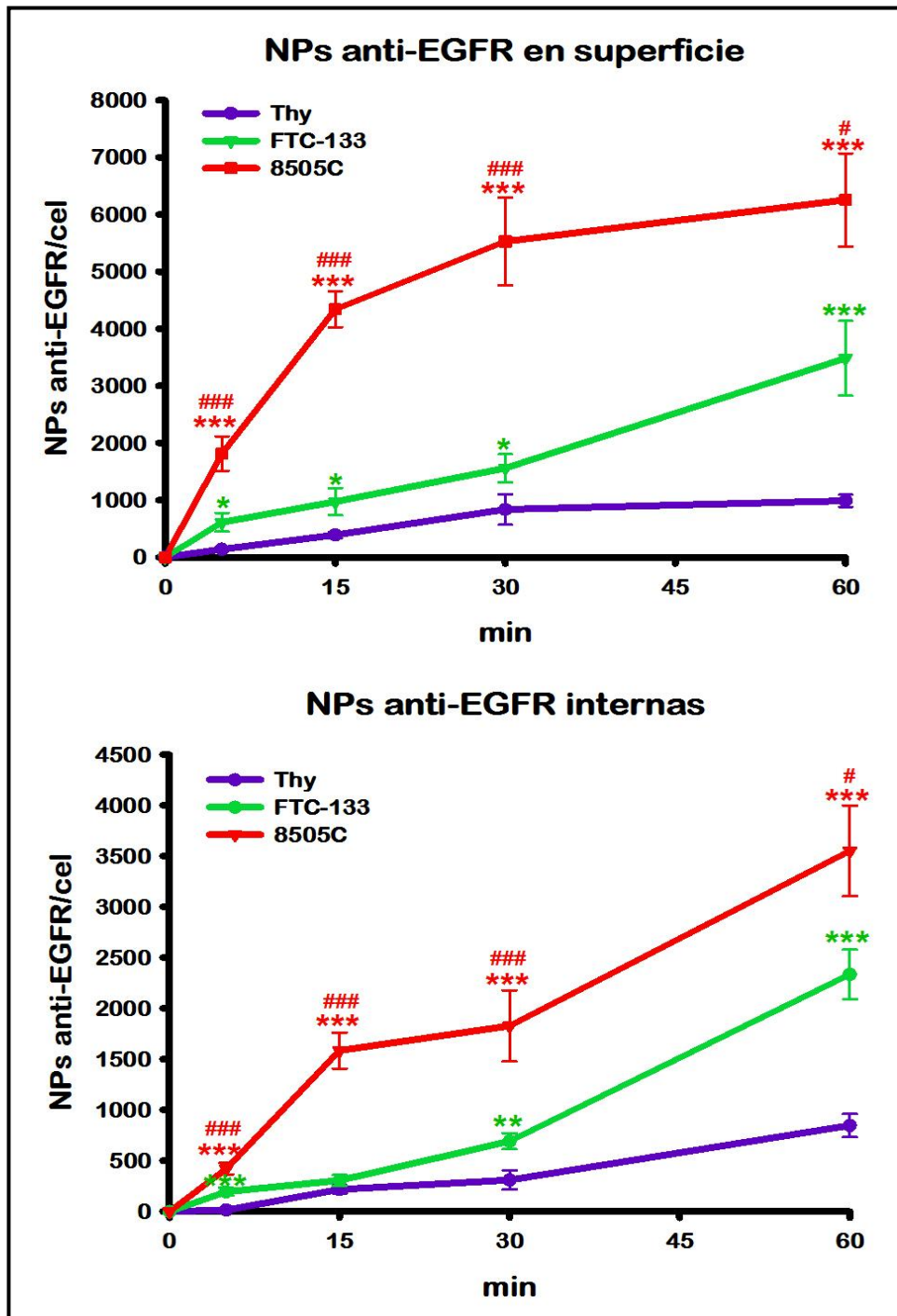


Figura 18. Acumulación de NPs anti-EGFR en la superficie y en el interior celular durante 1 hora. Cuantificación de las NPs anti-EGFR en superficie e internalizadas como se describe en la Figura 17. $n \geq 20$ imágenes procedentes de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ respecto a las controles Thy; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ respecto a la tumoral FTC-133.



Con el fin de analizar la acumulación de NPs anti-EGFR en superficie e internalizadas durante incubaciones continuas y prolongadas, se procedió a realizar el mismo ensayo a 3 y 5 horas. Como se observa en la Figura 19, tras 3 y 5 horas de incubación continua, el número de NPs anti-EGFR en superficie (amarillas) e internalizadas (verdes) sigue aumentando en las tres líneas celulares. Al igual que durante los periodos cortos de incubación, la línea 8505C presentó mayor cantidad de NPs asociadas, mientras que la Thy fue la línea que menos NPs totales asociadas mostró. Se observa que en las líneas tumorales después de 5 horas aparecen agregados de mayor tamaño, tanto asociados a la superficie como internalizados, mientras que la línea Thy presentó aparentemente agregados de menor tamaño. En las tres líneas celulares observamos una acumulación interna de NPs anti-EGFR.

La cuantificación del número de NPs anti-EGFR en la superficie celular para periodos prolongados de incubación (Figura 20) muestra un aumento constante de dicho número en las tres líneas celulares. Tras 3 horas de incubación correspondió aproximadamente a 2168, 5627 y 7460 NPs anti-EGFR/cel para las células Thy, FTC-133 y 8505C, respectivamente. Sin embargo, tras 5 horas de incubación el número de NPs anti-EGFR en la superficie se incrementó considerablemente en las dos líneas tumorales, mientras que se mantuvo constante en la línea control.

En relación a la acumulación intracelular tras periodos prolongados de incubación, las NPs anti-EGFR se siguieron acumulando en las tres líneas celulares (Figura 20). Al igual que sucedió para periodos de incubación cortos, el número de NPs anti-EGFR fue mayor en las células tumorales comparado con las control Thy. Sin embargo, tras 3 y 5 horas de incubación continua



desaparecen las diferencias estadísticamente representativas entre las líneas tumorales.

Estos resultados muestran que, al menos hasta las 3 h de incubación continua, las NPs anti-EGFR siguen uniéndose de forma constante a las tres líneas celulares estudiadas. En el caso de las células controles Thy, se mantiene constante incluso a 5 h, mientras que en el caso de las líneas tumorales, el número de NPs anti-EGFR unidas a las células se incrementa exponencialmente tras 5 horas. En cuanto a la acumulación de NPs internas, las células continúan acumulando NPs anti-EGFR en su interior de manera eficiente, tras periodos largos de incubación continua.

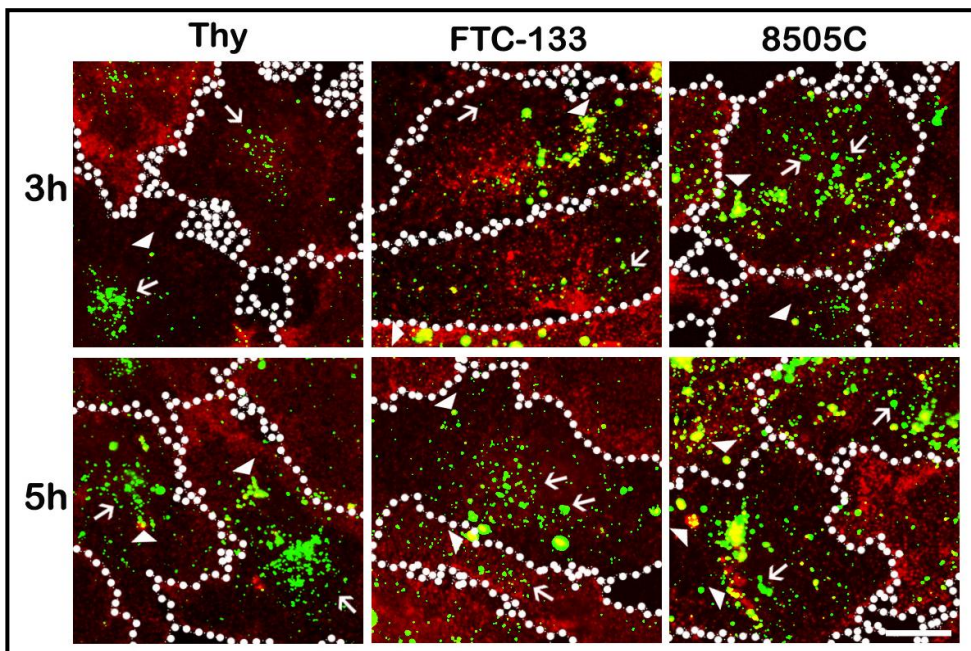


Figura 19. Acumulación de NPs anti-EGFR en la superficie y en el interior celular a 3-5 horas. Las células fueron incubadas de forma continua en presencia de NPs anti-EGFR durante 3 y 5 horas a 37°C. Transcurridos los diferentes tiempos se aplicó el método de doble marcaje. Las imágenes representativas muestran una mayor acumulación de NPs en las células tumorales FTC-133 y 8505C. Las puntas de flecha muestran NPs anti-EGFR asociadas a la membrana celular (amarillo), mientras que las flechas señalan las internalizadas (en verde). Escala de la barra: 10 μ m.

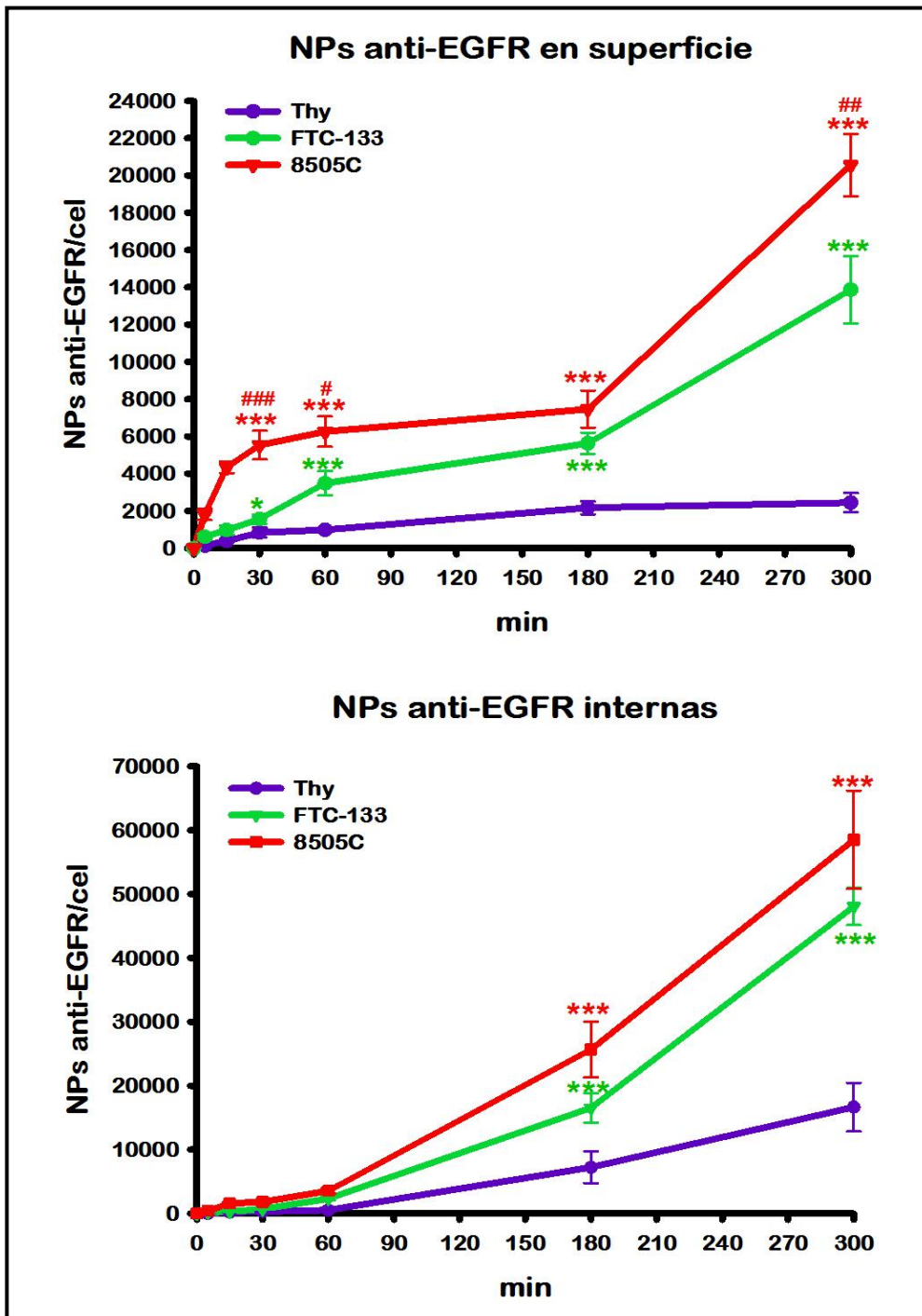


Figura 20. Acumulación de NPs anti-EGFR en la superficie y en el interior celular a 3-5 horas. Cuantificación de las NPs anti-EGFR en superficie e internalizadas como se describe en la Figura 19. $n \geq 20$ imágenes procedentes de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ respecto a los controles Thy; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ respecto a la tumoral FTC-133.



6. Tráfico hacia los lisosomas

Un criterio importante a tener en cuenta a la hora de diseñar un sistema dirigido con NPs es el tráfico intracelular, ya que en la mayoría de los casos, el destino final de las vesículas endocíticas son los lisosomas. Debido a que el lisosoma contiene enzimas degradativas, el fármaco transportado por la NP podría degradarse en este compartimento y, por tanto, es de gran importancia determinar el tiempo que tardan las NPs en alcanzar dicho orgánulo. Para ello, tras teñir los lisosomas con dextrano marcado con Texas Red, estudiamos la colocación de las NPs anti-EGFR con este compartimento a distintos tiempos.

En la Figura 21 se observa cómo a medida que aumenta el tiempo de incubación, la colocación de las NPs anti-EGFR con el compartimento lisosomal aumenta.

Los resultados de colocación en el lisosoma (Figura 22) indican que la línea 8505C presentó un tráfico de las NPs anti-EGFR hacia los lisosomas más lento, al menos durante la primera hora (de $25\% \pm 2$ a $28\% \pm 2$), comparado con las líneas FTC-133 (de $34\% \pm 3$ a $46\% \pm 5$) y Thy (de 41 ± 2 a $48\% \pm 6$). Tras 3 horas de incubación, el porcentaje de NPs en el lisosoma aumentó en las tres líneas celulares, alcanzando el $71\% \pm 3$, $64\% \pm 4$ y $51\% \pm 3$ para las Thy, FTC-133 y 8505C, respectivamente. Finalmente, tras 5 horas de incubación las tres líneas celulares alcanzaron un porcentaje de colocación cercano al 70%.

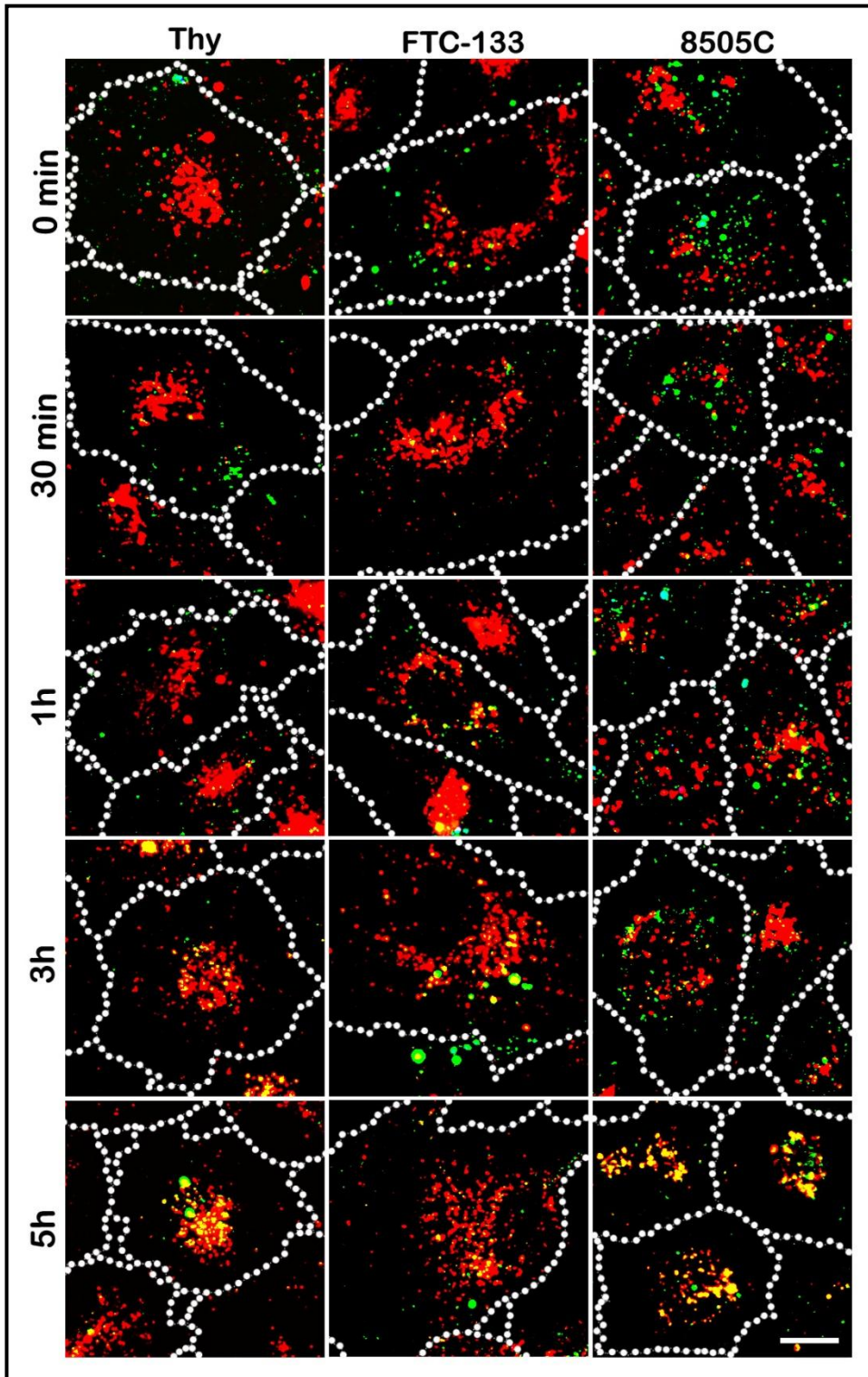


Figura 21. Tráfico de las NPs anti-EGFR al lisosoma. Imágenes representativas de la colocalización (amarillo) de las NPs (verdes) con los lisosomas marcados con Texas Red-dextrano (rojo) a diferentes tiempos de incubación. Barra de escala: 10 μ m.

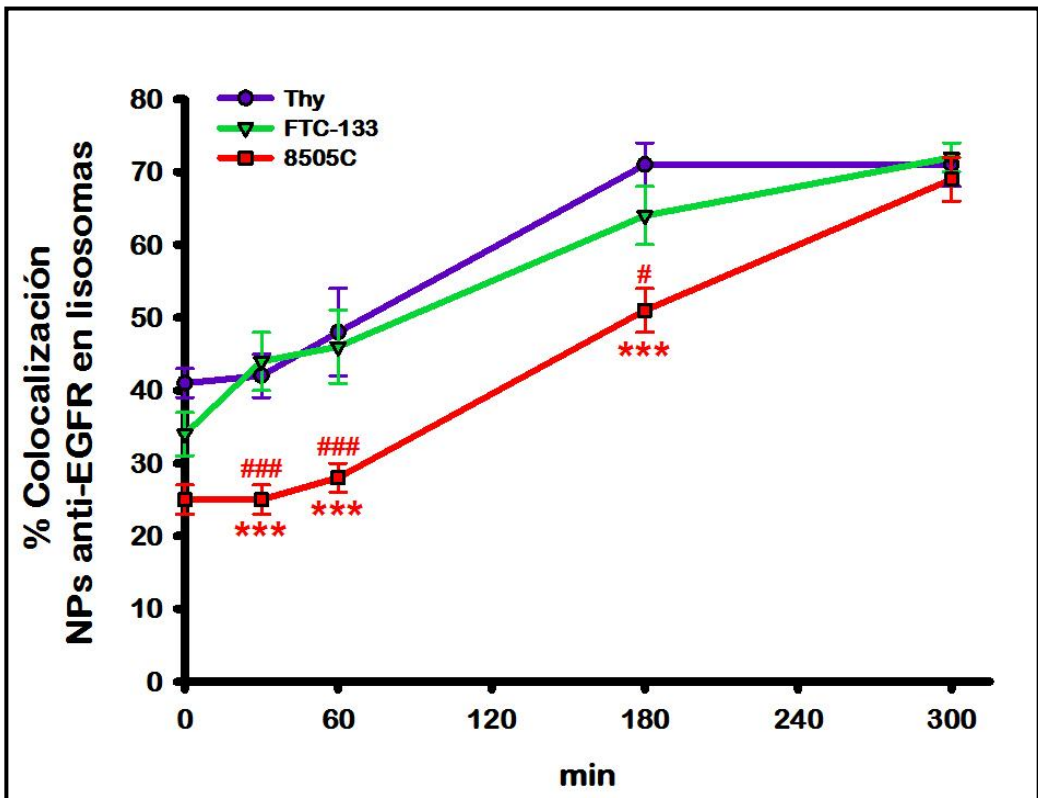


Figura 22. Tráfico intracelular NPs anti-EGFR hacia los lisosomas. Cuantificación de la colocalización de las NPs anti-EGFR (verdes) con los lisosomas positivos para Texas Red-dextrano (rojos). $n \geq 20$ imágenes procedentes de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ respecto a los controles Thy; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ respecto a la tumoral FTC-133.



7. Fármacos

7.1. Preparación y unión de las NPs anti-EGFR dirigidas conteniendo diferentes fármacos

Para la preparación de las NPs dirigidas al EGFR conteniendo los distintos fármacos se redujo la cantidad del vector de direccionamiento al 50%, y se sustituyó el otro 50% por el fármaco.

La capacidad de unión de las NPs anti-EGFR con y sin fármaco se evaluó mediante un ensayo de unión usando la línea celular 8505C (Figura 23). La cantidad de NPs unidas conteniendo un 50% de anticuerpo anti-EGFR se redujo considerablemente (1899 ± 397 NPs/cel) con respecto a la unión de las NPs recubiertas con el 100% del vector de direccionamiento (3511 ± 299 NPs/cel). En el caso de las NPs cargadas, además, con los fármacos doxorubicina, ácido retinoico o AMG-706, los números de NPs que se unieron a las células fueron los siguientes: 1703 ± 228 NPs doxo/anti-EGFR/cel, 1306 ± 193 NPs retinoico/anti-EGFR/cel y 1602 ± 231 NPs AMG/anti-EGFR/cel, respectivamente. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos para las NPs con o sin fármaco, pero sí entre los obtenidos para NPs con el 50% y 100% de vectores de direccionamiento ($p < 0,001$).

La presencia de los vectores de direccionamiento en las diferentes formulaciones se comprobó observando la aparición de doble marcaje (datos no mostrados). Para ello, se siguió el mismo procedimiento que el realizado para la validación del método de doble marcaje (Figura 13). En el caso de los fármacos, tan solo se comprobó la presencia de doxorubicina. Durante el proceso de preparación se observó un cambio de coloración en el precipitado de las NPs (Figura 9), variando de verde a rojo, lo que indica la



presencia de doxorubicina en la formulación de las NPs. En el caso de los fármacos ácido retinoico y AMG-706 no se pudo comprobar su presencia en las formulaciones de las NPs.

Estos resultados muestran que la reducción en el número de NPs anti-EGFR al 50%, aproximadamente, se debe fundamentalmente a la reducción en la cantidad de los vectores de direccionamiento.

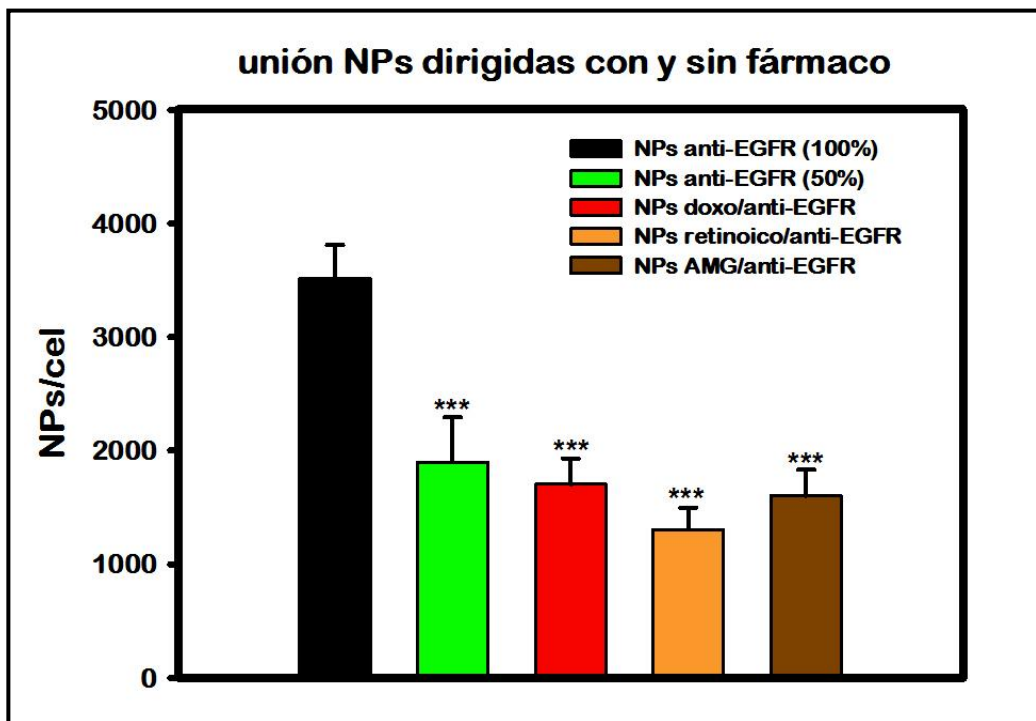


Figura 23. Unión de NPs dirigidas al EGFR con y sin fármacos en la línea celular 8505C. Las células fueron incubadas en presencia de NPs anti-EGFR con el 100% del vector de direccionamiento (control), el 50%, y 50% con doxorubicina, con ácido retinoico y con AMG-706, durante 30 min a 4°C, para permitir la unión. La disminución a la mitad del vector de direccionamiento produjo una disminución aproximadamente del 50 % en el número de NPs unidas a las células. Se muestra la media \pm SEM procedentes de $n \geq 15$ imágenes procedentes de 2 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ respecto a las NPs anti-EGFR controles [100% vectores].



7.2. Efecto citotóxico de las NPs anti-EGFR transportando diferentes fármacos

El efecto citotóxico de las NPs dirigidas transportando diferentes fármacos (doxorubicina, ácido retinoico o AMG-706) se comprobó *in vitro* en las líneas celulares tiroideas 8505C y Thy. Tras 5, 10 y 24 horas de tratamiento, se cuantificó el porcentaje de viabilidad y el número de células muertas, mediante el recuento de células vivas (no teñidas) y muertas (teñidas), utilizando el método de exclusión del azul tripano. Con el fin de descartar el posible efecto citotóxico que pudiera generar el disolvente del fármaco (DMSO), por un lado, y las NPs dirigidas *per se*, por otro, se utilizaron dos controles. El primer control consistió en la incubación de las células con la misma cantidad de DMSO que la utilizada para disolver los fármacos (control), y en el segundo control, las células se incubaron con la misma cantidad de NPs dirigidas ($2,72 \times 10^{10}$ NPs anti-EGFR /pocillo) pero sin fármaco.

Con el fin de comparar el efecto citotóxico *in vitro* del fármaco contenido en la NP dirigida con respecto al fármaco libre, se estimó la cantidad total de fármaco incluido en el total de las NPs anti-EGFR y, seguidamente, se ensayó esa misma cantidad de fármaco de manera libre (1 μg /pocillo).

Del mismo modo, con el fin de comparar el efecto citotóxico *in vitro* de las NPs dirigidas con respecto al direccionamiento pasivo, tan solo en el caso de la doxorubicina, se utilizaron NPs conteniendo la misma cantidad del fármaco pero sin dirigir (NPs doxo).

Tras dichos ensayos comprobamos que las NPs anti-EGFR sin fármaco no tuvieron ningún efecto citotóxico, ni sobre la línea



celular 8505C (Figuras 24-26) ni sobre las controles Thy (Figuras 27-29).

Con respecto a la línea 8505C, de los 3 fármacos ensayados, tan solo la doxorubicina tuvo efecto citotóxico tras 24 horas de tratamiento, como se observa en la Figura 24. Desafortunadamente, ni el ácido retinoico, ni el fármaco AMG-706, tuvieron efecto alguno sobre la línea 8505C, a ningún tiempo ni en ninguna de las condiciones ensayadas, como se observa en las Figuras 25 y 26.

La doxorubicina influyó en el porcentaje de viabilidad tras 24 h de tratamiento, ya que se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) entre las NPs dirigidas con doxorubicina (NPs doxo/anti-EGFR, $56\% \pm 6$) y el fármaco libre (doxorubicina, $60\% \pm 7$) con respecto al control con DMSO.

Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de viabilidad entre la doxorubicina libre y las NPs anti-EGFR con doxorubicina, sí detectamos diferencias ($p < 0,05$) entre las NPs dirigidas con fármaco (NPs doxo/anti-EGFR) y sin dirigir (NPs doxo). No obstante, estas diferencias no se dieron entre las NPs doxo y el fármaco libre (doxorubicina).

En relación al número de células muertas, al igual que en el caso del porcentaje de viabilidad, no se detectaron diferencias tras 5 y 10 horas de incubación entre las diferentes condiciones ensayadas. Las mayores diferencias en el número de células muertas se obtuvieron tras 24 horas de tratamiento en los pocillos con las NPs doxo/anti-EGFR ($31,63 \pm 12,73 \times 10^4$ células muertas, $p < 0,01$) y doxorubicina libre ($15,77 \pm 3,59 \times 10^4$ células muertas, $p < 0,05$), con respecto al control ($3,91 \pm 0,61 \times 10^4$). Sin embargo,



bajo las mismas condiciones, el número de células muertas para las NPs doxo correspondió a $3,06 \pm 1,11 \times 10^4$ células.

Estos datos muestran que tanto la doxorubicina libre [4,3 μM] como la transportada en NPs anti-EGFR tiene un efecto citotóxico tras 24 horas de tratamiento sobre la línea celular 8505C. Además, el efecto de las NPs dirigidas conteniendo doxorubicina es mayor que el efecto provocado por las NPs sin dirigir conteniendo la misma cantidad de doxorubicina.

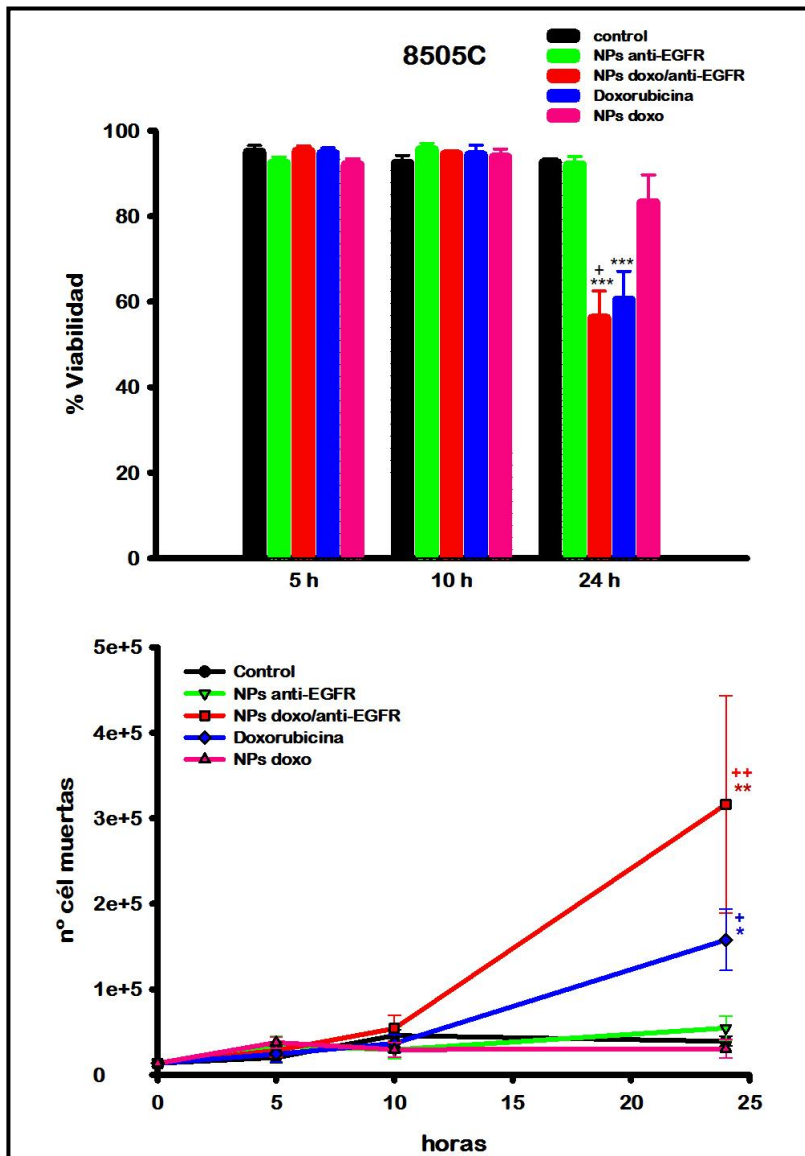


Figura 24. Efecto citotóxico de las NPs anti-EGFR conteniendo doxorubicina en la línea 8505C. Las células fueron incubadas en la presencia de DMSO (control), NPs anti-EGFR (NPs anti-EGFR), NPs anti-EGFR con doxorubicina (NPs doxo/anti-EGFR), doxorubicina libre [4,3 μM] y NPs con doxorubicina sin dirigir (NPs doxo) durante 5, 10 y 24 horas. Tras los diferentes tiempos de tratamiento se determinó el porcentaje de viabilidad y el número de células muertas mediante el método de exclusión del azul tripano. Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar. N = 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ respecto al control; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ respecto al fármaco libre; + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$ respecto a las NPs doxo.

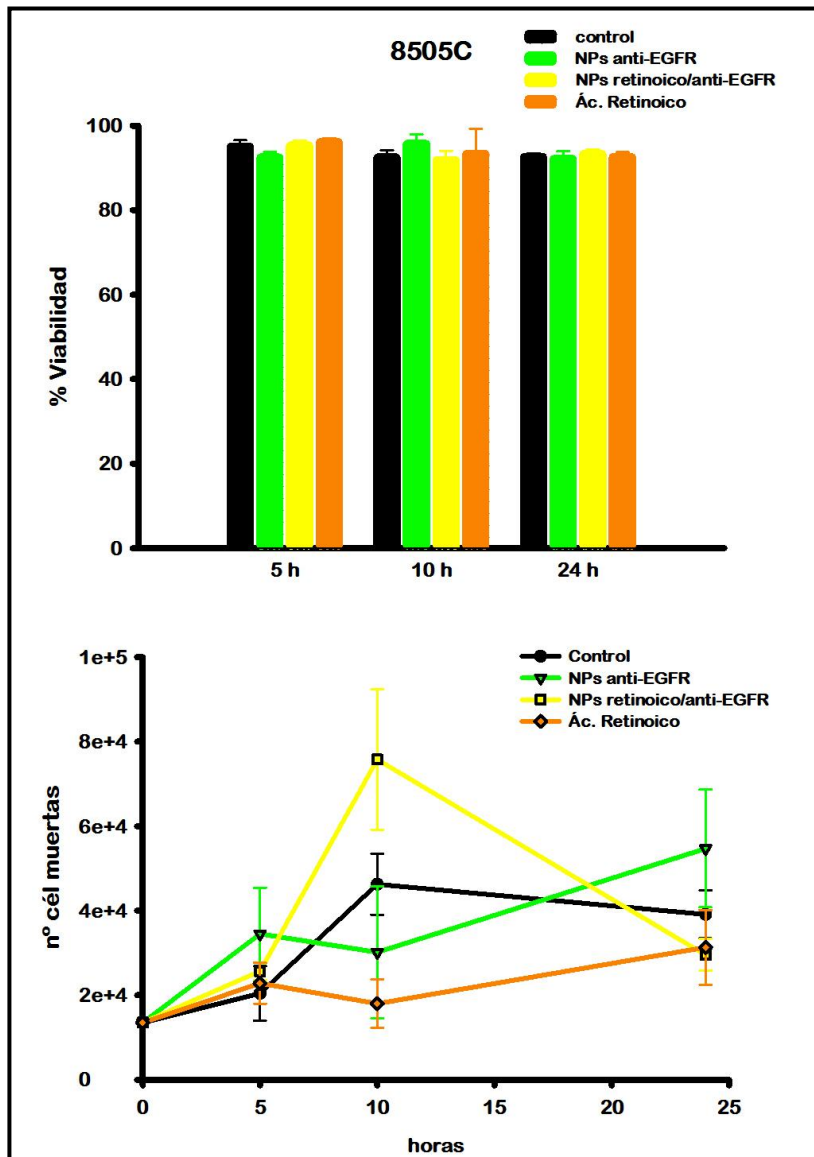


Figura 25. Efecto citotóxico de las NPs anti-EGFR conteniendo ácido retinoico en la línea 8505C. Las células fueron incubadas en la presencia de DMSO (control), NPs anti-EGFR (NPs anti-EGFR), NPs anti-EGFR con ácido retinoico (NPs retinoico/anti-EGFR) y ácido retinoico libre [8,4 μM] durante 5, 10 y 24 horas. Tras los diferentes tiempos de tratamiento se determinó el porcentaje de viabilidad y el número de células muertas mediante el método de exclusión del azul tripano. Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar. N = 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ respecto al control; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ respecto al fármaco libre.

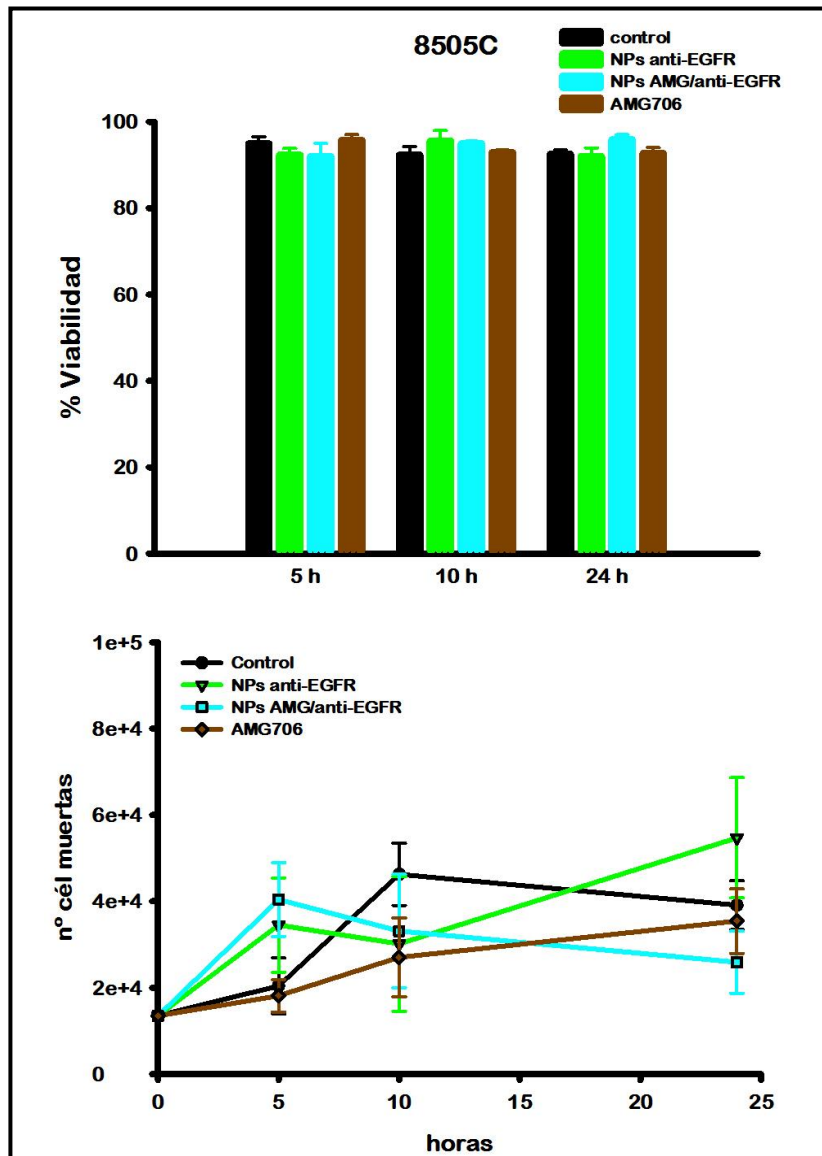


Figura 26. Efecto citotóxico de las NPs anti-EGFR conteniendo AMG-706 en la línea 8505C. Las células fueron incubadas en la presencia de DMSO (control), NPs anti-EGFR (NPs anti-EGFR), NPs anti-EGFR con AMG-706 (NPs AMG/anti-EGFR) y AMG-706 libre [4,4 μ M] durante 5, 10 y 24 horas. Tras los diferentes tiempos de tratamiento se determinó el porcentaje de viabilidad y el número de células muertas mediante el método de exclusión del azul tripano. Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar. N = 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ respecto al control; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ respecto al fármaco libre.



En la línea Thy, el efecto citotóxico de la doxorubicina libre y las NPs doxo fue mayor en comparación con la línea 8505C. Sin embargo, las NPs doxo/anti-EGFR no ejercieron efecto citotóxico sobre la línea control (Figura 27). El porcentaje de viabilidad tras 10 y 24 horas de incubación con doxorubicina libre fue del $67\pm 8\%$ y $52\pm 7\%$, respectivamente. En el caso de las NPs doxo (con fármaco y sin direccionamiento) no se detectó efecto alguno tras 10 horas de incubación, mientras que tras 24 horas se obtuvo el mayor efecto citotóxico ($48\pm 6\%$). En el caso de las NPs doxo/anti-EGFR (viabilidad $81\pm 4\%$), no se hallaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles ($91\pm 3\%$).

El efecto citotóxico de los fármacos ácido retinoico y AMG-706 sobre la línea Thy fue leve. Con respecto al control, se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$) tan solo tras 5 horas de incubación con ácido retinoico libre [$8,4 \mu\text{M}$], y tras 5 y 10 horas de incubación con AMG-706 [$4,4 \mu\text{M}$]. En el resto de condiciones ensayadas ninguno de los dos tipos de fármacos tuvieron efecto citotóxico, como se observa en las Figuras 28 y 29.

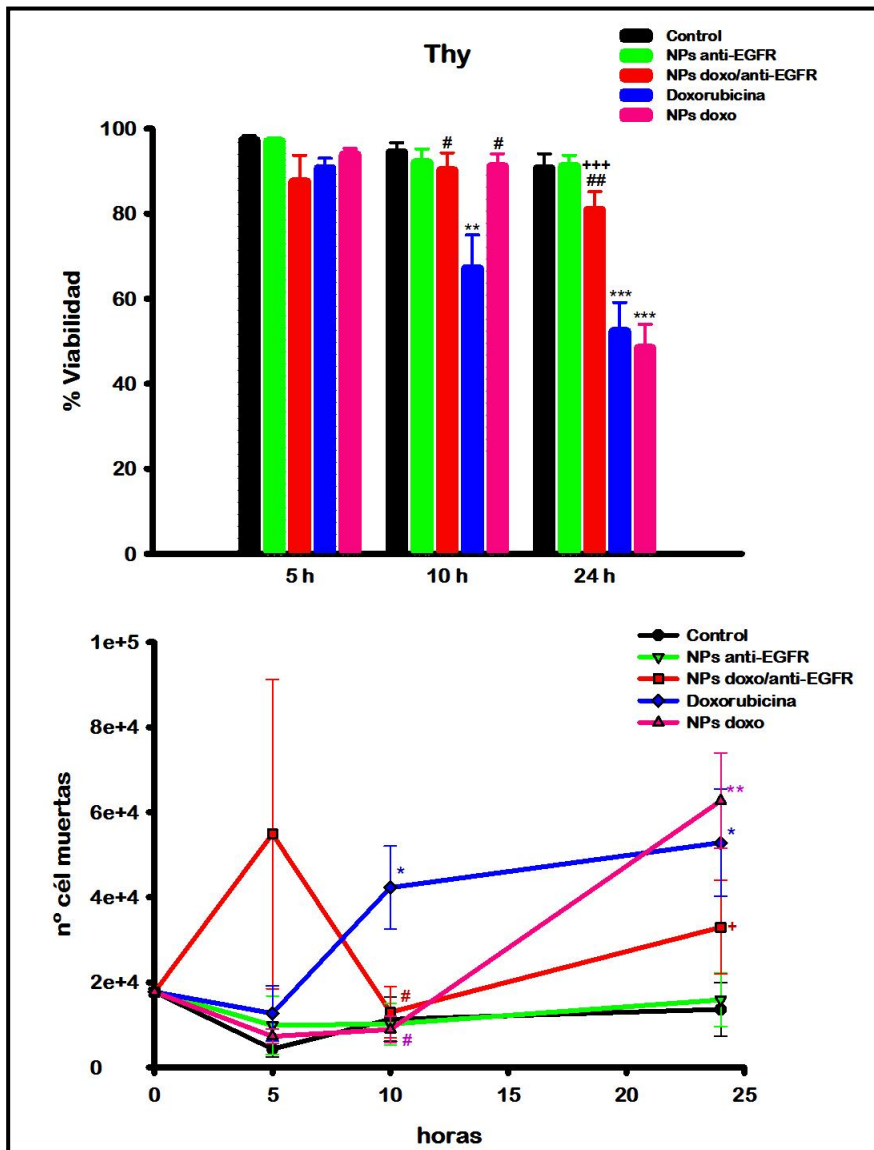


Figura 27. Efecto citotóxico de las NPs anti-EGFR conteniendo doxorubicina en la línea Thy. Las células fueron incubadas en la presencia de DMSO (control), NPs anti-EGFR (NPs anti-EGFR), NPs anti-EGFR con doxorubicina (NPs doxo/anti-EGFR), doxorubicina libre [4,3 μ M] y NPs con doxorubicina sin dirigir (NPs doxo) durante 5, 10 y 24 horas. Tras los diferentes tiempos de tratamiento se determinó el porcentaje de viabilidad y el número de células muertas mediante el método de exclusión del azul tripano. Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar. N = 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ respecto al control; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ respecto al fármaco libre; + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$ respecto a las NPs doxo.

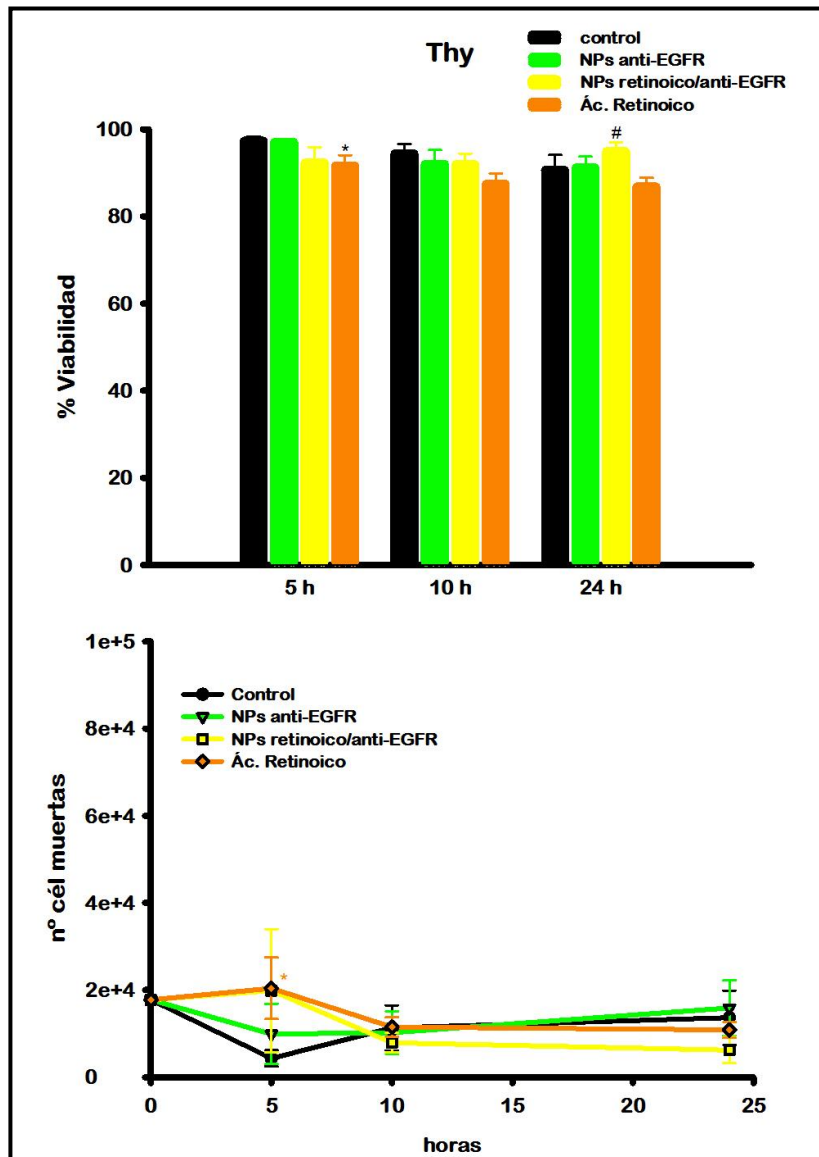


Figura 28. Efecto citotóxico de las NPs anti-EGFR conteniendo ácido retinoico en la línea Thy. Las células fueron incubadas en la presencia de DMSO (control), NPs anti-EGFR (NPs anti-EGFR), NPs anti-EGFR con ácido retinoico (NPs retinoico/anti-EGFR) y ácido retinoico libre [8,4 μM] durante 5, 10 y 24 horas. Tras los diferentes tiempos de tratamiento se determinó el porcentaje de viabilidad y el número de células muertas mediante el método de exclusión del azul tripano. Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar. N = 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ respecto al control; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ respecto al fármaco libre.

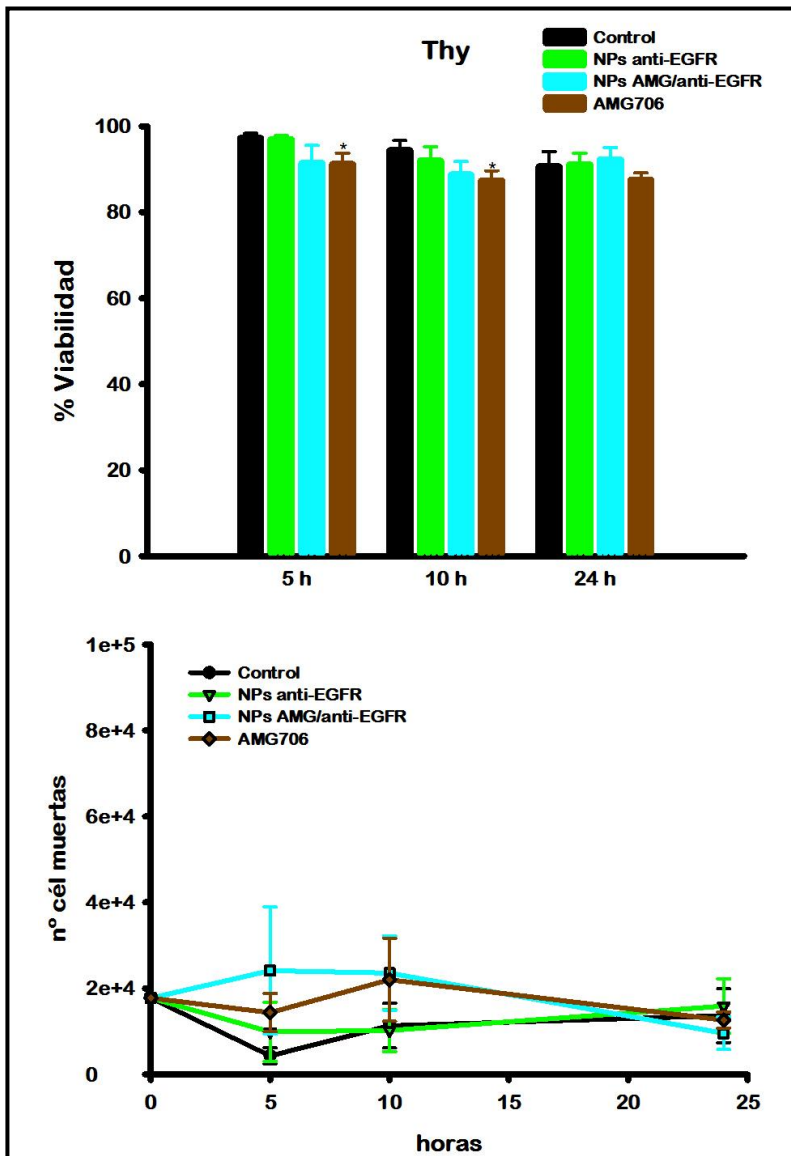
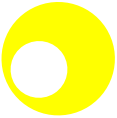


Figura 29. Efecto citotóxico de las NPs anti-EGFR conteniendo AMG-706 en la línea Thy. Las células fueron incubadas en la presencia de DMSO (control), NPs anti-EGFR (NPs anti-EGFR), NPs anti-EGFR con AMG-706 (NPs AMG/anti-EGFR) y AMG-706 libre [4,4 μ M] durante 5, 10 y 24 horas. Tras los diferentes tiempos de tratamiento se determinó el porcentaje de viabilidad y el número de células muertas mediante el método de exclusión del azul tripano. Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar. N = 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ respecto al control; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ respecto al fármaco libre.



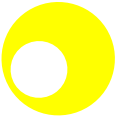
V DISCUSIÓN



V. DISCUSIÓN

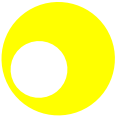
El desarrollo de nanosistemas para el tratamiento de muchos tipos de cáncer tiene como finalidad aumentar la eficacia terapéutica, a la vez que se minimizan los efectos secundarios. A pesar de que en la nanotecnología se trabaja intensamente en la búsqueda de nuevos tratamientos para una amplia variedad de tipos de cáncer, el cáncer de tiroides aún no se encuentra en esa amplia lista. La finalidad de la presente tesis doctoral ha sido desarrollar un sistema de NPs dirigidas *in vitro* como primer paso para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer de tiroides.

Como modelo de cáncer de tiroides se han empleado dos líneas celulares tumorales establecidas diferentes, FTC-133 y 8505C. El origen de estas líneas celulares se confirmó hace unos años en una revisión, donde los autores muestran que algunas líneas celulares comerciales comúnmente utilizadas como modelo de tumor de tiroides experimental no proceden específicamente de la glándula tiroides [139]. Además, la caracterización genotípica y molecular de algunas líneas celulares llevada a cabo por otros grupos de investigación, entre las que se encuentran la línea 8505C empleada por nosotros, muestran que esta línea celular representa un buen modelo del CAT al presentar las mismas mutaciones que se observan en los tumores humanos, como son P53, RAS y BRAF [118-120]. Otro estudio donde se comparan los perfiles de expresión génica (*microarray*) entre algunas líneas celulares (incluyen las FTC-133 y 8505C) y tumores humanos [140], concluye que el uso de líneas establecidas como modelo de cáncer indiferenciado es apropiado, mientras que el uso de líneas establecidas como modelo de carcinoma diferenciado necesita la correspondiente validación de la línea [140]. La línea celular FTC-



133 se aisló de un CFT [141], pero no del tumor primario, sino de una metástasis en un ganglio linfático. Esta línea mantiene la expresión de Tg y presenta la mutación en P53 (característica de los CAT y CPDT) [142]. Por otro lado, la línea celular 8505C se aisló de un CAT. En el análisis histopatológico se describió que, además, contenía una parte residual con un componente de carcinoma diferenciado [119]. En esta línea se ha demostrado la expresión génica de los factores de transcripción específicos tiroideos TTF-1 y PAX8, pero no se ha detectado la expresión de los genes que codifican para Tg y TSHR, entre otras proteínas específicas [118].

Como consecuencia de lo expuesto anteriormente, la línea celular FTC-133 puede utilizarse como modelo de CPDT, y la línea celular 8505C como modelo de CAT. Estos tipos de tumores, como se comentó en la Introducción, se corresponden con las modalidades de cáncer de tiroides más agresivo, para los cuales no se dispone de tratamientos efectivos. Otra evidencia que apoyaría el uso de estas líneas celulares es que son válidas para la investigación de terapias en animales como modelos de cáncer metastásicos de tiroides, ya que presentan la capacidad de reproducir las características típicas de metástasis, como son la colonización y crecimiento de estas células, principalmente en el pulmón y en el hueso [112]. Aunque el uso de líneas establecidas no reproduce la altísima variabilidad celular observada en los carcinomas humanos “*in situ*”, motivo principal de controversia de su uso, permite estudiar el comportamiento celular ante diferentes formulaciones de NPs dirigidas (unión, internalización y tráfico intracelular) en poblaciones celulares que presentan un conjunto de mutaciones más homogéneas y que han sido validadas por otros grupos de investigación.



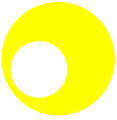
Con el fin de desarrollar *in vitro* una terapia dirigida con NPs, se realizó su abordaje en dos bloques diferentes. En un primer bloque, se seleccionó la diana y se caracterizó el direccionamiento de las NPs que presentaban las mejores características, y en un segundo bloque, se cargaron fármacos en la superficie de las NPs desarrolladas y se comprobó el efecto citotóxico.

1. Selección de la diana y las NPs dirigidas.

1.1. Expresión de la diana en la superficie celular

El primer criterio que se debe tener en cuenta a la hora de diseñar un sistema dirigido con NPs es la expresión de la diana en la superficie celular. Como se ha descrito en la Introducción, las dianas potenciales seleccionadas fueron los receptores TSHR, EGFR y VEGFR.

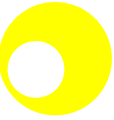
El TSHR es la diana que, por su función reguladora, se corresponde con la molécula de superficie más específica del tejido tiroideo, que se expresa, además, en la mayoría de los cánceres de tiroides [107, 143], y aunque también se expresa en otros tipos celulares [89], las NPs no tendrían acceso a ellas, ya que la vasculatura normal no presenta fugas que permitan su entrada [65]. En este trabajo, hemos detectado una expresión desigual del TSHR en la membrana plasmática de las distintas líneas celulares estudiadas. Concretamente, en las células FTC-133 y las células controles Thy, la expresión del TSHR fue más uniforme, por lo que este receptor podría ser una buena diana específica del carcinoma diferenciado y pobremente diferenciado de tiroides. Sin embargo, la línea celular 8505C, procedente de un carcinoma anaplásico, no presentó un patrón uniforme para dicho receptor, sino que tan sólo algunos grupos de células mostraron



inmunotinción en la superficie, confirmándose la presencia de restos del componente de carcinoma diferenciado. Debido a esto, el TSHR no sería una buena diana para este tipo de tumor. Aunque durante el proceso de desdiferenciación que conduce a la transformación tiroidea, el último marcador específico de tiroides que se pierde es el TSHR [89, 106, 107, 144], en los casos de desdiferenciación completa esta diana no es adecuada, puesto que no se encontraría en las células tumorales desdiferenciadas.

En relación a la segunda diana seleccionada, el EGFR, se ha demostrado que se sobreexpresa en muchos tumores sólidos y se está utilizado actualmente como diana para distintos fármacos [80, 128, 129]. En nuestro estudio hemos observado expresión de este receptor en la membrana plasmática de las tres líneas celulares estudiadas, por lo que, en un principio, podría ser una buena diana para un tratamiento dirigido con NPs frente al cáncer de tiroides. Además, en estudios recientes, se ha descrito la sobreexpresión de este receptor en el carcinoma anaplásico de tiroides [121, 124, 145].

La última diana escogida, el VEGFR, es un receptor implicado en la angiogénesis. Dada su función en la formación de nuevos vasos sanguíneos, necesarios para el crecimiento y la progresión tumoral, el direccionamiento de NTs hacia esta diana es una estrategia atractiva, que tendría como principal objetivo impedir la formación de nuevos vasos, así como destruir los existentes [124]. La finalidad es conseguir inhibir el crecimiento del tumor impidiendo el acceso de oxígeno y nutrientes, provocando la muerte celular [146]. Numerosos estudios muestran una reducción de la supervivencia en aquellos pacientes con tumores que sobreexpresan VEGF, ya que se asocia con el inicio del proceso de metástasis, aunque el mecanismo exacto en la

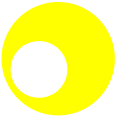


progresión tumoral se desconoce todavía [124, 130]. Por lo tanto, aunque en estudios *in vitro* no constituye una diana adecuada, ya que las líneas celulares tiroideas no muestran una expresión uniforme de este receptor, el VEGFR es un receptor tirosina quinasa que, como su propio nombre indica, ha sido ampliamente estudiado en células endoteliales y podría ser útil en un modelo *in vivo* (previa comprobación *in vitro* utilizando células endoteliales).

1.2. Preparación de las diferentes NPs y estudio de su unión a las dianas celulares

Una vez determinadas las posibles dianas (EGFR y TSHR), en el siguiente paso se seleccionaron el/los vectores de direccionamiento más adecuados para el reconocimiento específico de la diana escogida. En la presente tesis doctoral se emplearon diferentes anticuerpos específicos dirigidos contra dichas dianas, debido a que poseen una alta afinidad por las mismas [147]. Sin embargo, con la finalidad de reducir en la medida de lo posible la reacción inmunológica que produciría la presencia del anticuerpo, existen varias opciones que se explorarán más adelante, como la utilización de ligandos naturales, péptidos de afinidad o anticuerpos humanizados.

Como NT se ha utilizado un prototipo de NP esférica de látex fluorescente (FITC) de 100 nm de diámetro. Estas NPs son muy homogéneas en tamaño y forma, y fácilmente trazables mediante microscopía de fluorescencia. Por ello, a pesar de no ser biodegradables y, por tanto, no utilizables en humanos, constituyen un modelo muy apropiado para el desarrollo de sistemas dirigidos con NPs [86]. Las preparaciones de NPs que presentan buenos resultados *in vitro*, podrían caracterizarse en

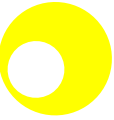


un modelo *in vivo* donde se cambiarían los NTs por formulaciones de NPs biodegradables.

Con respecto a la elaboración de las diferentes NPs dirigidas, se comprobó la correcta unión de los diferentes vectores de direccionamiento a las NPs. Este tipo de unión no es covalente, sino que tiene lugar por adsorción (diferencias de cargas) a la superficie de látex. A partir de los estudios llevados a cabo utilizando este prototipo de NP de látex decorada con diferentes tipos de IgG específicos, se sabe que el tamaño promedio de la NP dirigida corresponde a 150-300 nm de diámetro [67, 72, 75, 148]. También se sabe que los anticuerpos utilizados se distribuyen homogéneamente por toda la superficie de la NP ocupando aproximadamente un 90%, y que hay en torno a 180-250 moléculas de anticuerpo por partícula, orientadas en todas las direcciones del espacio [67].

Tras comprobar la correcta formación de las diferentes NPs dirigidas, se realizaron experimentos de unión de las mismas a las dos dianas seleccionadas: TSHR y EGFR.

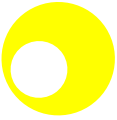
Los dos tipos de NPs dirigidas hacia el TSHR empleadas en este estudio (con dos anticuerpos comerciales anti-TSHR diferentes), no presentaron unión a ninguna de las líneas celulares estudiadas. En el caso de la línea 8505C, este resultado era esperable, ya que la expresión de este receptor se restringió a una subpoblación celular. Por el contrario, la falta de unión de las NPs anti-TSHR a las líneas celulares FTC-133 y Thy podría explicarse por algún tipo de impedimento estérico [67]. Sin embargo, como se ha demostrado previamente, este impedimento estérico podría eludirse utilizándose como vector de direccionamiento un



anticuerpo que reconozca un epítipo diferente o un ligando natural de dicha diana [67, 138].

Por otra parte, las NPs anti-EGFR presentaron unión a las tres líneas celulares en estudio, si bien con diferencias entre ellas. Así, el mayor número de NPs unidas por célula se obtuvo en la línea celular 8505C, seguida de la FTC-133 y, finalmente, de la Thy. Estos resultados se ajustan con los referidos en la literatura donde se describe una mayor expresión de este receptor en el carcinoma anaplásico de tiroides [121, 122, 124, 145, 149].

Además, a partir de los estudios realizados en varios tipos de carcinomas humanos (mama, hígado, pulmón, piel, vejiga, ovario y glioblastomas entre otros), se ha comprobado que estos tumores también sobreexpresan el EGFR [150, 151]. En las células tumorales, se ha estimado una densidad del receptor superior a 2×10^6 moléculas por célula, mientras que para las células normales (todas las células epiteliales, fibroblastos, varios tipos de células gliales y algunas células musculares lisas [152]) se ha estimado una densidad de 4×10^4 - 1×10^5 moléculas por célula [150, 151]. Estas diferencias entre el tejido normal y patológico se han confirmado mediante estudios inmunohistoquímicos, así como la existencia de una correlación entre la mayor expresión del EGFR y el grado de dediferenciación tumoral [122, 145], lo que sugiere que a pesar de que esta diana se expresa en diversos tejidos normales podría ser adecuada para el direccionamiento de fármacos en el tratamiento de tumores. Las diferencias en expresión también explicarían la presencia en la línea control Thy de subpoblaciones con una unión de las NPs anti-EGFR no significativa, mientras que otras subpoblaciones presentaron una unión eficiente. Estas últimas se corresponderían con células más indiferenciadas, ya que, como es conocido, las líneas celulares



mantenidas *in vitro* presentan una tendencia a la desdiferenciación [140, 153].

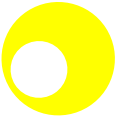
Por lo tanto, el carcinoma anaplásico de tiroides presentaría una mayor capacidad para unir NPs anti-EGFR, mientras que la unión a las células normales sería menor, reduciéndose así los posibles efectos secundarios. Además, aunque de manera variable, prácticamente todas las células de la línea 8505C presentaron una unión eficiente de NPs. Esta variabilidad intercelular podría explicarse por diferencias en el nivel de expresión del receptor.

Como consecuencia de lo expuesto anteriormente, las diferencias obtenidas en el número de NPs anti-EGFR entre las tres líneas celulares se deberían a las diferencias en el grado de expresión del EGFR.

Además, la ausencia de unión de las partículas de látex *per se*, así como con un vector de direccionamiento inespecífico (IgG) a ninguna de las líneas estudiadas, demuestra que la unión de las NPs anti-EGFR a las células fue específica, estando mediada por la unión entre el vector de direccionamiento acoplado a la superficie de la NP y el EGFR, como se ha descrito previamente en otros sistemas dirigidos [42, 67].

1.3. Internalización de las NPs anti-EGFR

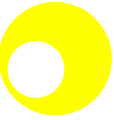
Para comprobar si la unión de las NPs anti-EGFR a la célula induce su endocitosis, se realizaron estudios de internalización. Para ello, previamente se comprobó la adecuada detección de las NPs localizadas en la superficie *versus* las internalizadas por las células (validación del método de doble marcaje). Además, los experimentos para la detección de las NPs superficiales (unión y



posterior tinción de las NPs) permitieron estimar el *background* del método.

El primer estudio de internalización consistió en la incubación de las diferentes líneas celulares con las NPs anti-EGFR durante una hora a 37°C. Con estas condiciones, se obtuvo una endocitosis de aproximadamente el 40% del total de NPs asociadas a cada tipo celular. El porcentaje de internalización es una variable independiente del número total de NPs pero dependiente de la cantidad que se localice en la superficie. Así, el menor porcentaje de internalización estimado en la línea 8505C podría deberse a la presencia de una mayor cantidad de NPs superficiales, ya que sobreexpresan este receptor. El bajo porcentaje de internalización observado tras una hora de incubación indicaría que las NPs anti-EGFR son capaces de inducir una endocitosis lenta. Además, el hecho de que las diferentes líneas celulares presenten el mismo porcentaje de internalización sugiere que la endocitosis sigue una ruta específica de internalización.

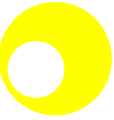
En vista de estos resultados decidimos llevar a cabo un estudio de cinética de internalización. Debido al bajo número de NPs anti-EGFR que se unían a las células en los experimentos a 4°C, se incubaron las células durante una hora a 37°C, para conseguir la unión de un número elevado de NPs que nos permitiera el estudio de la cinética de internalización. Posteriormente, se eliminaron las NPs que no se habían unido hasta ese momento, para permitir la internalización de las recién unidas. Bajo estas condiciones, el tiempo medio que tardaron en alcanzar la endocitosis máxima fue aproximadamente de una hora, en los tres tipos de células, aumentando la sospecha de la dependencia de una ruta específica de endocitosis. Además, tanto la línea control como la anaplásica



mostraron un alto porcentaje de internalización, indicativo de que en estas líneas celulares la internalización de las NPs anti-EGFR es totalmente eficiente dentro de las primeras tres horas de incubación, para las Thy, y las cinco horas, para las 8505C. En el caso de la línea FTC-133, el valor máximo obtenido fue significativamente inferior, indicando la presencia de NPs superficiales tras 5 horas de incubación.

El siguiente método de abordaje consistió en incubar de forma continuada las NPs anti-EGFR con las células desde una a cinco horas. A partir del número de NPs totales obtenido por célula y del porcentaje de internalización, se estimó el número de NPs en superficie e internalizadas para cada tiempo de incubación estudiado. La principal diferencia que obtuvimos en la cinética de unión de las NPs en superficie a tiempos cortos, fue el elevado número de NPs anti-EGFR en superficie que presentó la línea 8505C con respecto a las otras dos líneas celulares, incluso, tras solo quince minutos de incubación. Este fenómeno se podría explicar por una sobreexpresión del receptor en esta línea anaplásica.

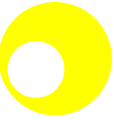
De acuerdo con los resultados publicados por Mickler y colaboradores, quienes describen dos mecanismos de endocitosis tras la activación del EGFR [154], la unión de las NPs anti-EGFR activarían al receptor débilmente. Estos autores comparan dos tipos de vectores de direccionamiento: el ligando natural (EGF), que induce la activación del receptor, y un péptido de afinidad denominado GE11, que induce una activación muy reducida del receptor [154]. Aunque utilizan *polyplexes* (NPs recubiertas con material genético) [155], podemos comparar sus resultados con los nuestros debido a la similitud en el tamaño de estos NTs con nuestras NPs. Los autores demuestran que la rápida



internalización de los *polyplexes* con EGF, un 70% tras 20 minutos de incubación, está acoplada a la activación del receptor, mientras que el mecanismo de internalización lento generado por los péptidos GE11, un 26% tras 20 minutos de incubación, sería independiente de la activación del receptor pero dependiente de las conexiones que presenta el EGFR con los filamentos de actina [154]. En nuestro caso, tras 15-30 minutos de incubación se estimó un porcentaje de internalización en torno al 26%, una internalización lenta, en comparación al 80% de internalización acoplada a la activación del receptor que inducen los *polyplexes* recubiertos de EGF.

Aunque las NPs anti-EGFR inducen una internalización lenta, se comprobó que a lo largo del tiempo, se acumulan en el interior de las células de manera eficiente, siendo la línea de células anaplásicas la que mayor acumulación presentó en todos los tiempos estudiados, con respecto a las otras dos líneas celulares. Además, la unión constante de las NPs anti-EGFR en la superficie de las tres líneas celulares después de periodos prolongados de incubación, podría indicar la continua reposición del receptor en la membrana plasmática, probablemente a través de su reciclaje desde los compartimentos endosomales. En el caso de las líneas tumorales, además, se detectó un incremento exponencial de NPs superficiales tras 5 horas de incubación. Posiblemente, durante periodos tan prolongados de incubación, sería posible que las células con mayor expresión del EGFR, unan un mayor número de agregados.

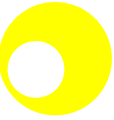
Los datos de unión, internalización y acumulación interna de nuestras NPs anti-EGFR nos indican que esta formulación de NPs podría ofrecernos una terapia dirigida que mejore la eficacia con respecto a la terapia pasiva, puesto que la acumulación de NPs en



la zona tumoral conduciría a la unión, internalización y acumulación de éstas justo en el interior de las células tumorales.

1.4. Tráfico intracelular de las NPs anti-EGFR hacia los lisosomas

Por último, en relación a los estudios de tráfico intracelular hacia los lisosomas, se obtuvieron diferencias entre las distintas líneas celulares en el tiempo que las NPs anti-EGFR tardan en alcanzar dicho orgánulo. La diferencia más importante se detectó entre el comportamiento de la línea anaplásica y las otras dos líneas celulares. Concretamente, las 8505C presentaron un tráfico hacia el lisosoma más lento, habiendo un retraso en la localización de las NPs anti-EGFR dentro de los lisosomas. Sin embargo, en las líneas FTC-133 y control, la alta colocación de las NPs anti-EGFR con los lisosomas desde el inicio del ensayo indicaría que el tráfico de las NPs hacia este orgánulo es más rápido. Si lo comparamos con la cinética de internalización (Figura 16), prácticamente conforme se internalizan las NPs anti-EGFR se dirigen hacia los lisosomas. En un sistema dirigido, el tráfico intracelular de la NP depende entre otras, del epítipo de la diana reconocido por el vector de direccionamiento [67]. Dado que el vector de direccionamiento (anticuerpo monoclonal) fue el mismo en las tres líneas tiroideas, la diferencia entre ellas podría encontrarse en la propia diana (EGFR), o en una desregulación general del tráfico intracelular, asociada a las diferentes mutaciones que porta cada una de las líneas celulares. Frecuentemente, asociado con la amplificación génica del EGFR se ha descrito una mutación del mismo que consiste principalmente en una delección de un fragmento del dominio extracelular (dominio I y parte del dominio II). Estos mutantes se

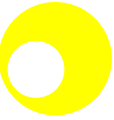


denominan EGFRvIII y se caracterizan por ser una de las variantes del EGFR que presentan una localización intracelular del receptor aberrante (mitocondrias, el aparato de Golgi, el retículo endoplasmático y núcleo) [147]. En cáncer, la localización de EGFR en el núcleo está asociado con tumores muy agresivos, con pobre pronóstico clínico, y además existen evidencias que sugieren que esta localización del receptor contribuye a la resistencia terapéutica, incluso tras el empleo de tratamientos específicos dirigidos a este receptor, como por ejemplo inhibidores tirosín quinasa o anticuerpos que impiden la activación del receptor [147]. Por lo tanto, es posible que la línea anaplásica 8505C presente una mutación en el EGFR que provoque el retraso del tráfico intracelular de las NPs anti-EGFR hacia el lisosoma. A pesar del retraso en esta línea celular, con el tiempo el destino final de las NPs es el compartimento lisosomal.

2. Estudio con fármacos

2.1. Unión de las diferentes NPs con los fármacos

Con respecto a la unión de las diferentes NPs dirigidas conteniendo fármacos, se comprobó que se unen en un número considerablemente menor. La reducción al 50% en el contenido de anticuerpos necesaria para la incorporación de las moléculas de fármaco en la superficie de las NPs, provoca una pérdida de efectividad en la unión al EGFR, debido a un menor número de vectores de direccionamiento en la superficie de la NP, y no a la presencia del fármaco. Como se ha comentado anteriormente, en el caso de las NPs conteniendo el 100% de anticuerpos, se sabe que se distribuyen homogéneamente por toda la superficie de la NP ocupando aproximadamente un 90% y se orientan en todas las direcciones del espacio [67]. La reducción en el número de

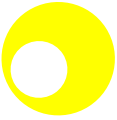


anticuerpos provoca una disminución de los vectores orientados de manera adecuada para el reconocimiento de su epítopo, y por lo tanto disminuye el número de vectores de direccionamiento funcionales. La presencia del fármaco podría interaccionar e interferir en el reconocimiento del anticuerpo por su epítopo. En el caso de la doxorubicina, se ha comprobado que en estudios donde se ensaya la capacidad de penetración de fármacos en esferoides (cultivos celulares en matrigel) interacciona con macromoléculas de la células [22, 156]. Aunque se debe comprobar de manera específica, en principio descartamos esta posibilidad porque el número de NPs unidas a las 8505C con y sin fármaco es el mismo, y además, como se discutirá más adelante, las diferencias en el efecto citotóxico ante la incubación con la formulación de la NP doxo/anti-EGFR entre la línea anaplásica y la línea control apoyarían esta afirmación.

A pesar de la evidente reducción en el grado de unión a las células de las NPs con fármacos, realizamos los ensayos para el estudio del posible efecto citotóxico, puesto que la estimación del número de NPs seguía siendo muy elevada. Incluso, consideramos que esta reducción en el número de NPs unidas a la línea anaplásica aumentará la diferencia en la unión de NPs con respecto a la línea control. Este hecho podría disminuir la unión de las NPs doxo/anti-EGFR a las células no tumorales, y por tanto reducir los posibles efectos secundarios.

2.2. Efecto citotóxico

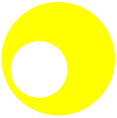
El efecto citotóxico de los fármacos *in vitro* se llevó a cabo mediante el recuento de células vivas y muertas con la técnica de exclusión del azul tripano. Mediante este abordaje, la doxorubicina



fue el único fármaco que presentó un efecto citotóxico sobre las células tiroideas (Thy y 8505C).

La doxorubicina (Adriamicina) es un agente antineoplásico potente para una gran variedad de tipos de tumores. El mecanismo de acción es complejo y aunque no está totalmente esclarecido, se sabe que se intercala en el ADN provocando torsiones que desestabilizan la estructura de la cromatina [158]. El transporte de estas moléculas a través de la membrana celular se realiza mediante un mecanismo inespecífico [159, 160], por difusión simple [161, 162]. Desafortunadamente, su uso clínico en tratamientos prolongados está asociado con la aparición de importantes efectos secundarios (como leucopenia y cardiotoxicidad), y por ello, la administración de doxorubicina libre se encuentra restringida [163]. El empleo de NTs de fármacos ha permitido reducir los efectos secundarios asociados al tratamiento convencional con doxorubicina, además de mejorar la biodistribución y el tiempo de circulación en sangre [46].

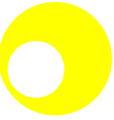
Los estudios clínicos demuestran que el tiempo de circulación en sangre de la doxorubicina cargada en liposomas recubiertos con PEG corresponde a 55-70 horas, mientras que en un estudio clínico en fase I con liposomas dirigidos hacia el EGFR (con el anticuerpo Cetuximab), el tiempo de circulación correspondió con 31 horas [47]. Sin embargo, los liposomas sin direccionamiento no aumentan la eficacia del tratamiento con respecto a la doxorubicina libre, mientras que los liposomas dirigidos son más eficaces que los liposomas sin dirigir, demostrándose que asegurar el destino intracelular del fármaco es una característica clave para el desarrollo de tratamientos más eficaces [47]. Además, la principal ventaja del empleo de NPs como tipo de NT del agente quimioterapéutico, en lugar de liposomas, es su alta



estabilidad en sangre, y se puede controlar la liberación del fármaco [46]. Debido a lo anteriormente expuesto, el desarrollo de NPs dirigidas aumentará la eficacia del tratamiento contra el cáncer.

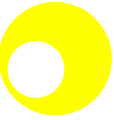
En nuestro caso, *in vitro*, el efecto citotóxico observado de la doxorubicina en la línea anaplásica fue el mismo tanto si se administraba de manera libre como cargado en las NPs anti-EGFR. Aunque no se encontraron diferencias en la viabilidad celular entre dichas condiciones, como se ha comentado anteriormente, en un modelo *in vivo* podrían observarse diferencias en la eficacia entre ambos tratamientos. Sin embargo, en la línea celular Thy se detectó efecto citotóxico de la doxorubicina libre tras 10 horas de incubación (más susceptible al tratamiento), mientras que las NPs dirigidas con fármacos no ejercieron un efecto significativo ni tras 24 horas de tratamiento. Este resultado era esperable, puesto que tan solo una subpoblación en la línea celular control mostró unión de las NPs anti-EGFR. Además, el descenso en la unión específica de las NPs conteniendo el 50% de vectores de direccionamiento en la línea 8505C, conlleva de la misma manera, a una disminución en la unión específica de las NPs doxo/anti-EGFR en la línea celular Thy, aunque para comprobarlo de manera específica se deberían realizar experimentos de unión en este tipo celular.

En cuanto a las diferencias entre el efecto de las NPs doxo/anti-EGFR y las NPs doxo, confirman que la capacidad de unión específica y la internalización de las NPs dirigidas ofrece una mayor efectividad del fármaco. Tras 24 horas de tratamiento, las NPs doxo no ejercieron efecto citotóxico sobre la línea 8505C, mientras que en la línea Thy se obtuvo el mayor efecto observado. La interacción inespecífica de estas NPs con las células explicaría las diferencias observadas entre la línea celular anaplásica y la



control. Aunque obtuvimos un efecto citotóxico empleando las NPs doxo/anti-EGFR, este efecto se podría optimizar realizando un estudio con diferentes formulaciones variando las proporciones de anticuerpo anti-EGFR y doxorubicina.

El ácido retinoico es un metabolito de la vitamina A, que induce la diferenciación celular e inhibición de la proliferación [89, 164]. El tratamiento con ácido retinoico pretende estimular la rediferenciación de las células tumorales que comienzan el proceso de desdiferenciación (CPDT), así como de las células completamente indiferenciadas (CAT) [89]. La respuesta a este fármaco es variable. En estudios clínicos, aunque de manera variable, el 40% aproximadamente de los pacientes que no respondían al tratamiento convencional con I-131, tras la aplicación de ácido retinoico incrementaron la captación de yodo [167, 168]. En estudios *in vitro* se ha comprobado que el efecto depende del estado de diferenciación en el que se encuentra el tumor, de tal manera, que tiene efecto sobre células que han comenzado el proceso de desdiferenciación, mientras que sobre las células completamente indiferenciadas no tiene efecto [165]. De la misma manera, la inducción de la apoptosis en diferentes tipos de tumores es variable. Se ha observado en tratamientos prolongados (desde tres a ocho días) y a altas concentraciones del fármaco [10 μ M], en células procedentes de hepatoma o melanoma indujo la apoptosis, mientras que en células leucémicas no [166]. En nuestro caso, no hemos hallado ningún efecto citotóxico sobre la línea 8505C, mientras que sobre la línea Thy se observa un ligero efecto del fármaco libre tras cinco horas, pero dicho efecto no se mantiene en el tiempo. Entre las posibles explicaciones para estos resultados se podrían incluir la baja



dosis del fármaco, el tiempo de tratamiento, así como la sensibilidad del tipo celular [164, 168].

El AMG-706, un fármaco inhibidor tirosín quinasas, principalmente de VEGFR1/2/3, PDGFR, c-Kit y Ret, es un potente agente anti-angiogénico. Se ha demostrado su capacidad para inducir la regresión de tumores de gran tamaño, ya que su efecto apoptótico sobre las células endoteliales provoca la disminución del área de vasos sanguíneos necesarios para la progresión del tumor [169]. En estudios *in vitro* con tratamientos a alta concentración [25 μ M] y prolongados (3 días) sobre células procedentes de un carcinoma epidermoide (A431), el AMG-706 no tuvo efecto sobre la viabilidad celular [169]. Aunque el AMG-706 podría no tener efecto citotóxico *in vitro* sobre las líneas celulares tiroideas ensayadas, ni a mayores concentraciones, ni a tiempos más prolongados de incubación, probablemente se observaría su efecto en un modelo *in vivo*.

En base a nuestros resultados, proponemos el siguiente modelo:

La unión específica de las NPs doxo/anti-EGFR a su receptor promueve una internalización lenta y eficiente. En el transporte de las NPs endocitadas hacia los lisosomas, la disminución del pH liberaría las moléculas de doxorubicina, permitiendo que éstas difundan hacia el núcleo, donde se intercalan en el ADN, ejerciendo su efecto citotóxico.

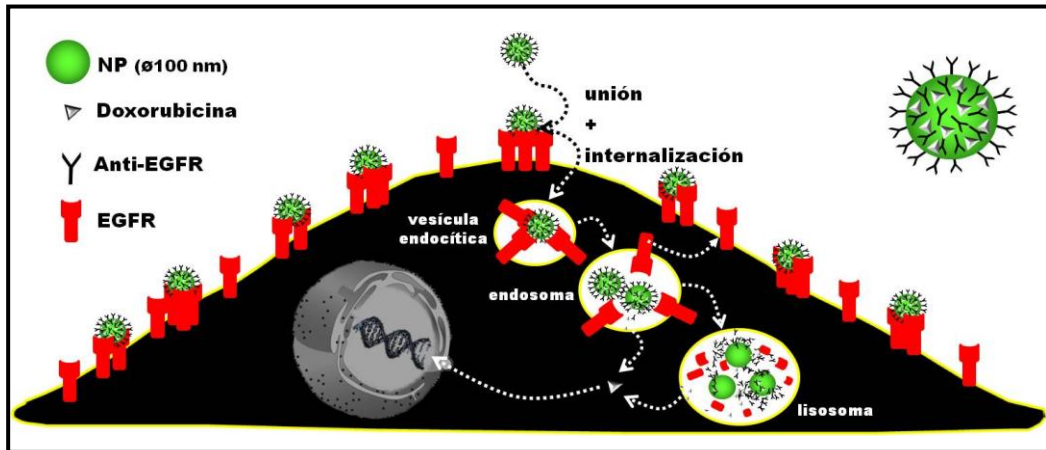
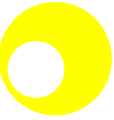
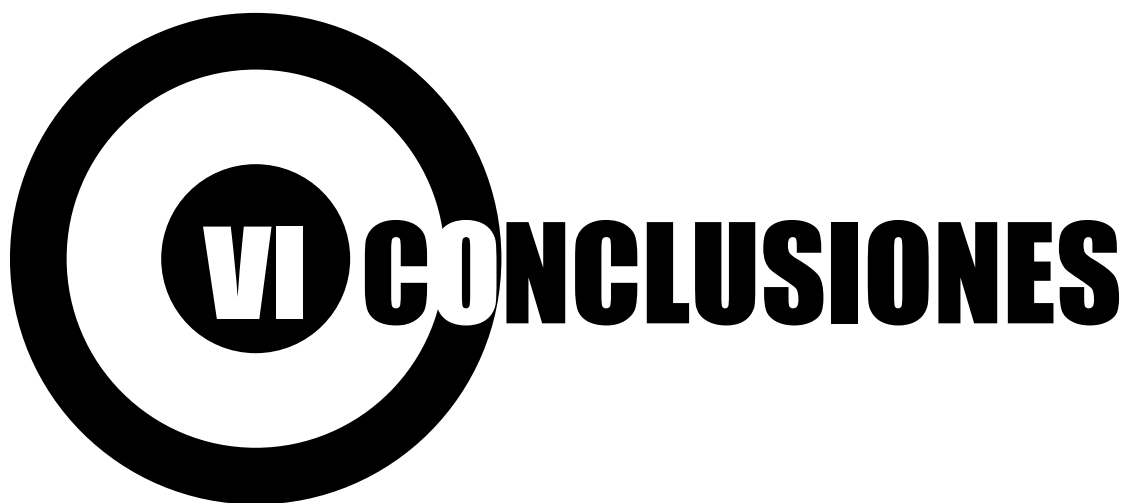


Figura 30. Modelo *in vitro* de terapia dirigida con NPs para el tratamiento del cáncer de tiroides.

Por lo tanto, a partir de los estudios *in vitro* realizados podemos concluir que las NPs dirigidas hacia el EGFR y cargadas de doxorubicina desarrolladas en el presente proyecto de tesis doctoral presentan las características necesarias para su posterior evaluación en un modelo *in vivo*.

The logo features a large black circle on the left. Inside this circle is a smaller black circle containing the white text 'VI'. To the right of the inner circle, the word 'CONCLUSIONES' is written in a bold, black, sans-serif font, overlapping the right edge of the large circle.

VI CONCLUSIONES




VI. CONCLUSIONES

Las conclusiones parciales obtenidas a partir de este estudio *in vitro* son:

1. De las tres dianas ensayadas (TSHR, EGFR y VEGFR), sólo el EGFR permite la unión específica de las NPs dirigidas.
2. La capacidad de unión de las NPs anti-EGFR depende del nivel de expresión del receptor en la superficie celular.
3. El número de NPs anti-EGFR que se unen por célula depende de la cantidad de vectores correctamente orientados en la superficie de la NP.
4. La unión específica de las NPs anti-EGFR induce una internalización lenta pero efectiva a lo largo del tiempo.
5. El proceso de unión e internalización de las NPs anti-EGFR se mantiene constante a lo largo del tiempo, promoviendo su acumulación en los lisosomas.
6. De los tres fármacos ensayados (doxorubicina, ácido retinoico y AMG-706), tan sólo las NPs doxo/anti-EGFR tienen efecto citotóxico en nuestro modelo *in vitro*.
7. El efecto citotóxico de las formulaciones de NPs dirigidas hacia el EGFR se debe al agente quimioterapéutico y no a la NP *per se*.
8. El direccionamiento de las NPs al EGFR incrementa la especificidad del tratamiento con doxorubicina en comparación con las NPs no dirigidas.

Como conclusión final, podemos afirmar que el EGFR presenta las características idóneas para actuar como diana en el direccionamiento de NPs para nuevas terapias dirigidas contra el cáncer de tiroides. Así mismo, la doxorubicina es el agente quimioterapéutico de elección para su evaluación posterior en un modelo *in vivo*.

A graphic element consisting of two concentric blue circles. The inner circle is solid blue, and the outer circle is a blue ring. The text 'VII BIBLIOGRAFÍA' is positioned to the right of the inner circle, with the 'VII' partially overlapping it.

VII BIBLIOGRAFÍA



VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Appenzeller, T., *The man who dared to think small*. Science, 1991. **254**(5036): p. 1300.
2. Drexler, K.E., *Engines of creation*. The Anchor library of science 1990, Garden City, N.Y.: Anchor Press/Doubleday. xii, 298 p.
3. Roduner, E., *Size matters: why nanomaterials are different*. Chem Soc Rev, 2006. **35**(7): p. 583-92.
4. Gogotsi, I.U.G. and CRC Press., *Nanomaterials handbook*, 2006, CRC/Taylor & Francis: Boca Raton. p. 1 online resource (780 p.).
5. Kim, B.Y., J.T. Rutka, and W.C. Chan, *Nanomedicine*. N Engl J Med, 2010. **363**(25): p. 2434-43.
6. Bawa, R., et al., *Protecting new ideas and inventions in nanomedicine with patents*. Nanomedicine, 2005. **1**(2): p. 150-8.
7. Bogunia-Kubik, K. and M. Sugisaka, *From molecular biology to nanotechnology and nanomedicine*. Biosystems, 2002. **65**(2-3): p. 123-38.
8. Wang, E.C. and A.Z. Wang, *Nanoparticles and their applications in cell and molecular biology*. Integr Biol (Camb), 2014. **6**(1): p. 9-26.
9. He, J., et al., *Application of smart nanostructures in medicine*. Nanomedicine (Lond), 2010. **5**(7): p. 1129-38.
10. Freitas, R.A., Jr., *What is nanomedicine?* Nanomedicine, 2005. **1**(1): p. 2-9.
11. Farokhzad, O.C. and R. Langer, *Nanomedicine: developing smarter therapeutic and diagnostic modalities*. Adv Drug Deliv Rev, 2006. **58**(14): p. 1456-9.
12. Zhang, L., et al., *Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments*. Clin Pharmacol Ther, 2008. **83**(5): p. 761-9.
13. Boulaiz, H., et al., *Nanomedicine: application areas and development prospects*. Int J Mol Sci, 2011. **12**(5): p. 3303-21.
14. Kim, K., et al., *Tumor-homing multifunctional nanoparticles for cancer theragnosis: Simultaneous diagnosis, drug delivery, and therapeutic monitoring*. J Control Release, 2010. **146**(2): p. 219-27.
15. Kono, K., et al., *Highly temperature-sensitive liposomes based on a thermosensitive block copolymer for tumor-specific chemotherapy*. Biomaterials, 2010. **31**(27): p. 7096-105.
16. Kubinova, S. and E. Sykova, *Nanotechnologies in regenerative medicine*. Minim Invasive Ther Allied Technol, 2010. **19**(3): p. 144-56.
17. Scott, T.G., et al., *Advances in bionanomaterials for bone tissue engineering*. J Nanosci Nanotechnol, 2013. **13**(1): p. 1-22.



18. Torchilin, V.P., *Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging*. AAPS J, 2007. **9**(2): p. E128-47.
19. Vizirianakis, I.S., *Nanomedicine and personalized medicine toward the application of pharmacotyping in clinical practice to improve drug-delivery outcomes*. Nanomedicine, 2011. **7**(1): p. 11-7.
20. Wang, A.Z., R. Langer, and O.C. Farokhzad, *Nanoparticle delivery of cancer drugs*. Annu Rev Med, 2012. **63**: p. 185-98.
21. Simone, E., B.S. Ding, and V. Muzykantov, *Targeted delivery of therapeutics to endothelium*. Cell Tissue Res, 2009. **335**(1): p. 283-300.
22. Jang, S.H., et al., *Drug delivery and transport to solid tumors*. Pharm Res, 2003. **20**(9): p. 1337-50.
23. Stern, S.T., et al., *Translational considerations for cancer nanomedicine*. J Control Release, 2010. **146**(2): p. 164-74.
24. Jain, K.K., *Recent advances in nanooncology*. Technol Cancer Res Treat, 2008. **7**(1): p. 1-13.
25. Blanco, E., et al., *Nanomedicine in cancer therapy: innovative trends and prospects*. Cancer Sci, 2011. **102**(7): p. 1247-52.
26. Shi, J., et al., *Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications*. Nano Lett, 2010. **10**(9): p. 3223-30.
27. Cho, K., et al., *Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(5): p. 1310-6.
28. Garnacho, C., et al., *Delivery of acid sphingomyelinase in normal and niemann-pick disease mice using intercellular adhesion molecule-1-targeted polymer nanocarriers*. J Pharmacol Exp Ther, 2008. **325**(2): p. 400-8.
29. Saad, M., et al., *Receptor targeted polymers, dendrimers, liposomes: which nanocarrier is the most efficient for tumor-specific treatment and imaging?* J Control Release, 2008. **130**(2): p. 107-14.
30. Pene, F., et al., *Toward theragnostics*. Crit Care Med, 2009. **37**(1 Suppl): p. S50-8.
31. Mura, S., J. Nicolas, and P. Couvreur, *Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery*. Nat Mater, 2013. **12**(11): p. 991-1003.
32. Chen, H., et al., *Characterization of pH- and temperature-sensitive hydrogel nanoparticles for controlled drug release*. PDA J Pharm Sci Technol, 2007. **61**(4): p. 303-13.
33. Biswas, S. and V.P. Torchilin, *Nanopreparations for organelle-specific delivery in cancer*. Adv Drug Deliv Rev, 2014. **66**: p. 26-41.



34. Kobayashi, H., R. Watanabe, and P.L. Choyke, *Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; what is the appropriate target?* *Theranostics*, 2013. **4**(1): p. 81-9.
35. Byrne, J.D., T. Betancourt, and L. Brannon-Peppas, *Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008. **60**(15): p. 1615-26.
36. Alexis, F., et al., *Nanoparticle technologies for cancer therapy*. *Handb Exp Pharmacol*, 2010(197): p. 55-86.
37. Tiwari, M., *Nano cancer therapy strategies*. *J Cancer Res Ther*, 2012. **8**(1): p. 19-22.
38. Langer, R., *Drug delivery and targeting*. *Nature*, 1998. **392**(6679 Suppl): p. 5-10.
39. Jain, K.K., *Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics*. *Clin Chim Acta*, 2005. **358**(1-2): p. 37-54.
40. Shekaran, A. and A.J. Garcia, *Nanoscale engineering of extracellular matrix-mimetic bioadhesive surfaces and implants for tissue engineering*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1810**(3): p. 350-60.
41. An, J., et al., *Advanced nanobiomaterial strategies for the development of organized tissue engineering constructs*. *Nanomedicine (Lond)*, 2013. **8**(4): p. 591-602.
42. Muro, S., *Challenges in design and characterization of ligand-targeted drug delivery systems*. *J Control Release*, 2012. **164**(2): p. 125-37.
43. Moros, M., et al., *Monosaccharides versus PEG-functionalized NPs: influence in the cellular uptake*. *ACS Nano*, 2012. **6**(2): p. 1565-77.
44. Torchilin, V.P., *Multifunctional nanocarriers*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006. **58**(14): p. 1532-55.
45. Wang, A.Z., R.S. Langer, and O.C. Farokhzad, *Nanoparticle Delivery of Cancer Drugs*. *Annu Rev Med*.
46. Park, J., et al., *PEGylated PLGA nanoparticles for the improved delivery of doxorubicin*. *Nanomedicine*, 2009. **5**(4): p. 410-418.
47. Mamot, C., et al., *Tolerability, safety, pharmacokinetics, and efficacy of doxorubicin-loaded anti-EGFR immunoliposomes in advanced solid tumours: a phase 1 dose-escalation study*. *Lancet Oncol*, 2012. **13**(12): p. 1234-41.
48. Bressan, E., et al., *Nanotechnology to drive stem cell commitment*. *Nanomedicine (Lond)*, 2013. **8**(3): p. 469-86.
49. Szoka, F.C., *Review of Liposomes: Edited by Vladimir P. Torchilin, Volkmar Weissig, Oxford University Press, Oxford, 2003, 424 pp.* *Journal of Controlled Release*, 2004. **96**(2): p. 353.



50. Discher, D.E. and A. Eisenberg, *Polymer vesicles*. Science, 2002. **297**(5583): p. 967-973.
51. Soppimath, K.S., et al., *Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices*. J Control Release, 2001. **70**(1-2): p. 1-20.
52. Bei, D., J. Meng, and B.B. Youan, *Engineering nanomedicines for improved melanoma therapy: progress and promises*. Nanomedicine, 2010. **5**(9): p. 1385-99.
53. Danhier, F., O. Feron, and V. Preat, *To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery*. J Control Release, 2010. **148**(2): p. 135-46.
54. Dziubla, T.D. and V.R. Muzykantov, *Synthetic carriers for vascular delivery of protein therapeutics*. Biotechnol Genet Eng Rev, 2006. **22**: p. 267-98.
55. Herd, H., et al., *Nanoparticle geometry and surface orientation influence mode of cellular uptake*. ACS Nano, 2013. **7**(3): p. 1961-73.
56. Maeda, H., *The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting*. Adv Enzyme Regul, 2001. **41**: p. 189-207.
57. Bertrand, N., et al., *Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology*. Adv Drug Deliv Rev, 2014. **66**: p. 2-25.
58. Greish, K., *Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors: a royal gate for targeted anticancer nanomedicines*. J Drug Target, 2007. **15**(7-8): p. 457-64.
59. Maeda, H., H. Nakamura, and J. Fang, *The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo*. Adv Drug Deliv Rev, 2013. **65**(1): p. 71-9.
60. Maeda, H., T. Sawa, and T. Konno, *Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS*. J Control Release, 2001. **74**(1-3): p. 47-61.
61. Fang, J., H. Nakamura, and H. Maeda, *The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect*. Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**(3): p. 136-51.
62. Narang, A.S. and S. Varia, *Role of tumor vascular architecture in drug delivery*. Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**(8): p. 640-58.
63. Papademetriou, I., et al., *Combination-targeting to multiple endothelial cell adhesion molecules modulates binding, endocytosis, and in vivo*



- biodistribution of drug nanocarriers and their therapeutic cargoes*. J Control Release, 2014. **188C**: p. 87-98.
64. Hobbs, S.K., et al., *Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(8): p. 4607-12.
65. Yuan, F., et al., *Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size*. Cancer Res, 1995. **55**(17): p. 3752-6.
66. Maeda, H., *Macromolecular therapeutics in cancer treatment: the EPR effect and beyond*. J Control Release, 2012. **164**(2): p. 138-44.
67. Garnacho, C., et al., *Differential intra-endothelial delivery of polymer nanocarriers targeted to distinct PECAM-1 epitopes*. J Control Release, 2008. **130**(3): p. 226-33.
68. Brannon-Peppas, L. and J.O. Blanchette, *Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy*. Adv Drug Deliv Rev, 2004. **56**(11): p. 1649-59.
69. Ding, B.S., et al., *Advanced drug delivery systems that target the vascular endothelium*. Mol Interv, 2006. **6**(2): p. 98-112.
70. Everts, M., et al., *Selective intracellular delivery of dexamethasone into activated endothelial cells using an E-selectin-directed immunoconjugate*. J Immunol, 2002. **168**(2): p. 883-9.
71. Pasqualini, R., D.M. McDonald, and W. Arap, *Vascular targeting and antigen presentation*. Nat Immunol, 2001. **2**(7): p. 567-8.
72. Muro, S., et al., *Slow intracellular trafficking of catalase nanoparticles targeted to ICAM-1 protects endothelial cells from oxidative stress*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **285**(5): p. C1339-47.
73. Muro, S., V.R. Muzykantov, and J.C. Murciano, *Characterization of endothelial internalization and targeting of antibody-enzyme conjugates in cell cultures and in laboratory animals*. Methods Mol Biol, 2004. **283**: p. 21-36.
74. Muro, S., M. Koval, and V. Muzykantov, *Endothelial endocytic pathways: gates for vascular drug delivery*. Curr Vasc Pharmacol, 2004. **2**(3): p. 281-99.
75. Muro, S., et al., *A novel endocytic pathway induced by clustering endothelial ICAM-1 or PECAM-1*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 8): p. 1599-609.
76. Papademetriou, J., et al., *Comparative binding, endocytosis, and biodistribution of antibodies and antibody-coated carriers for targeted delivery of lysosomal enzymes to ICAM-1 versus transferrin receptor*. J Inher Metab Dis, 2013. **36**(3): p. 467-77.



77. Sanna, V., N. Pala, and M. Sechi, *Targeted therapy using nanotechnology: focus on cancer*. Int J Nanomedicine, 2014. **9**: p. 467-83.
78. Kanapathipillai, M., A. Brock, and D.E. Ingber, *Nanoparticle targeting of anti-cancer drugs that alter intracellular signaling or influence the tumor microenvironment*. Adv Drug Deliv Rev, 2014.
79. Schlessinger, J., *Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor*. Cell, 2002. **110**(6): p. 669-72.
80. Gan, H.K., et al., *Targeting of a conformationally exposed, tumor-specific epitope of EGFR as a strategy for cancer therapy*. Cancer Res, 2012. **72**(12): p. 2924-30.
81. Garnacho, C., D. Serrano, and S. Muro, *A fibrinogen-derived peptide provides intercellular adhesion molecule-1-specific targeting and intraendothelial transport of polymer nanocarriers in human cell cultures and mice*. J Pharmacol Exp Ther, 2012. **340**(3): p. 638-47.
82. Yadav, S.C., A. Kumari, and R. Yadav, *Development of peptide and protein nanotherapeutics by nanoencapsulation and nanobioconjugation*. Peptides, 2011. **32**(1): p. 173-87.
83. Sahay, G., D.Y. Alakhova, and A.V. Kabanov, *Endocytosis of nanomedicines*. J Control Release, 2010. **145**(3): p. 182-95.
84. Kumari, S., S. Mg, and S. Mayor, *Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell*. Cell Res, 2010. **20**(3): p. 256-75.
85. Conner, S.D. and S.L. Schmid, *Regulated portals of entry into the cell*. Nature, 2003. **422**(6927): p. 37-44.
86. Muro, S., et al., *Control of endothelial targeting and intracellular delivery of therapeutic enzymes by modulating the size and shape of ICAM-1-targeted carriers*. Mol Ther, 2008. **16**(8): p. 1450-8.
87. Sahay, G., et al., *The exploitation of differential endocytic pathways in normal and tumor cells in the selective targeting of nanoparticulate chemotherapeutic agents*. Biomaterials, 2010. **31**(5): p. 923-33.
88. Sakhrani, N.M. and H. Padh, *Organelle targeting: third level of drug targeting*. Drug Des Devel Ther, 2013. **7**: p. 585-99.
89. Diéguez González, C., R. Yturriaga Matarranz, and e-libro Corp, *Tiroides [in Actualizaciones en Endocrinología 32007, McGraw-Hill Interamericana de España, Madrid. p. xiii, 322 p.*
90. Kierszenbaum, A.L. and L.L. Tres, *Histología y biología celular : introducción a la anatomía patológica : tercera edición*. 3a ed ed2012, Barcelona etc.: Elsevier. XV, 700 p.
91. Drake, R.L., et al., *Gray anatomía para estudiantes2005*, Madrid etc.: Elsevier. XXV, 1058 p.



92. Utrilla, J.C., et al., *Expression of hypothalamic regulatory peptides in thyroid C cells of different mammals*. Gen Comp Endocrinol, 2013. **187**: p. 6-14.
93. Morillo-Bernal, J., et al., *Ghrelin potentiates TSH-induced expression of the thyroid tissue-specific genes thyroglobulin, thyroperoxidase and sodium-iodine symporter, in rat PC-Cl3 Cells*. Peptides, 2011. **32**(11): p. 2333-9.
94. Garcia-Marin, R., et al., *Melatonin-synthesizing enzymes and melatonin receptor in rat thyroid cells*. Histol Histopathol, 2012. **27**(11): p. 1429-38.
95. De Miguel, M., et al., *Thyrotropin-releasing hormone receptor expression in thyroid follicular cells: a new paracrine role of C-cells?* Histol Histopathol, 2005. **20**(3): p. 713-8.
96. Fernández-Santos, J.M., et al., *Paracrine Regulation of Thyroid-Hormone Synthesis by C Cells*. Thyroid Hormone 2012.
97. Morillo-Bernal, J., et al., *Functional expression of the thyrotropin receptor in C cells: new insights into their involvement in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis*. J Anat, 2009. **215**(2): p. 150-8.
98. Martin-Lacave, I., et al., *C cells evolve at the same rhythm as follicular cells when thyroidal status changes in rats*. J Anat, 2009. **214**(3): p. 301-9.
99. Banerjee, M., et al., *Conditional Survival in Thyroid Cancer Patients*. Thyroid, 2014. **11**: p. 11.
100. Nikiforov, Y.E., *Molecular diagnostics of thyroid tumors*. Arch Pathol Lab Med, 2011. **135**(5): p. 569-77.
101. Goyal, N., et al., *Molecular and genetic markers of follicular-cell thyroid cancer: etiology and diagnostic and therapeutic opportunities*. Adv Exp Med Biol, 2013. **779**: p. 309-26.
102. DeLellis, R.A., *Pathology and genetics of thyroid carcinoma*. J Surg Oncol, 2006. **94**(8): p. 662-9.
103. Riesco-Eizaguirre, G. and P. Santisteban, *Molecular biology of thyroid cancer initiation*. Clin Transl Oncol, 2007. **9**(11): p. 686-93.
104. Omur, O. and Y. Baran, *An update on molecular biology of thyroid cancers*. Crit Rev Oncol Hematol, 2014. **90**(3): p. 233-52.
105. Agate, L., L. Lorusso, and R. Elisei, *New and old knowledge on differentiated thyroid cancer epidemiology and risk factors*. J Endocrinol Invest, 2012. **35**(6 Suppl): p. 3-9.
106. Riesco-Eizaguirre, G. and P. Santisteban, *New insights in thyroid follicular cell biology and its impact in thyroid cancer therapy*. Endocr Relat Cancer, 2007. **14**(4): p. 957-77.
107. Garcia-Jimenez, C. and P. Santisteban, *TSH signalling and cancer*. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2007. **51**(5): p. 654-71.



108. Riesco-Eizaguirre, G. and P. Santisteban, *A perspective view of sodium iodide symporter research and its clinical implications*. Eur J Endocrinol, 2006. **155**(4): p. 495-512.
109. Ragazzi, M., et al., *Update on anaplastic thyroid carcinoma: morphological, molecular, and genetic features of the most aggressive thyroid cancer*. Int J Endocrinol, 2014. **790834**(10): p. 21.
110. Smallridge, R.C., et al., *American Thyroid Association guidelines for management of patients with anaplastic thyroid cancer*. Thyroid, 2012. **22**(11): p. 1104-39.
111. Smallridge, R.C. and J.A. Copland, *Anaplastic thyroid carcinoma: pathogenesis and emerging therapies*. Clin Oncol, 2010. **22**(6): p. 486-97.
112. Zhang, L., et al., *An in vivo mouse model of metastatic human thyroid cancer*. Thyroid, 2014. **24**(4): p. 695-704.
113. Phay, J.E. and M.D. Ringel, *Metastatic mechanisms in follicular cell-derived thyroid cancer*. Endocr Relat Cancer, 2013. **20**(6): p. 13-0187.
114. Smallridge, R.C. and J.A. Copland, *Anaplastic thyroid carcinoma: pathogenesis and emerging therapies*. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2010. **22**(6): p. 486-97.
115. Nikiforov, Y.E. and M.N. Nikiforova, *Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer*. Nat Rev Endocrinol, 2011. **7**(10): p. 569-80.
116. Thomas, D., S. Friedman, and R.Y. Lin, *Thyroid stem cells: lessons from normal development and thyroid cancer*. Endocr Relat Cancer, 2008. **15**(1): p. 51-8.
117. Lin, R.Y., *Thyroid cancer stem cells*. Nat Rev Endocrinol, 2011. **7**(10): p. 609-16.
118. Meireles, A.M., et al., *Molecular and genotypic characterization of human thyroid follicular cell carcinoma-derived cell lines*. Thyroid, 2007. **17**(8): p. 707-15.
119. Ito, T., et al., *Establishment of 2 human thyroid-carcinoma cell-lines (8305c, 8505c) bearing p53 gene-mutations*. Int J Oncol, 1994. **4**(3): p. 583-6.
120. Ito, T., et al., *Unique association of p53 mutations with undifferentiated but not with differentiated carcinomas of the thyroid gland*. Cancer Res, 1992. **52**(5): p. 1369-71.
121. Ensinger, C., et al., *Epidermal growth factor receptor as a novel therapeutic target in anaplastic thyroid carcinomas*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1030**: p. 69-77.
122. Schiff, B.A., et al., *Epidermal growth factor receptor (EGFR) is overexpressed in anaplastic thyroid cancer, and the EGFR inhibitor gefitinib*



- inhibits the growth of anaplastic thyroid cancer.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(24): p. 8594-602.
123. Wiseman, S.M., et al., *Anaplastic thyroid carcinoma: expression profile of targets for therapy offers new insights for disease treatment.* Ann Surg Oncol, 2007. **14**(2): p. 719-29.
124. Gule, M.K., et al., *Targeted therapy of VEGFR2 and EGFR significantly inhibits growth of anaplastic thyroid cancer in an orthotopic murine model.* Clin Cancer Res, 2011. **17**(8): p. 2281-91.
125. Latif, R., et al., *The thyroid-stimulating hormone receptor: impact of thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor antibodies on multimerization, cleavage, and signaling.* Endocrinol Metab Clin North Am, 2009. **38**(2): p. 319-41, viii.
126. Singh, S.P., et al., *Upon thyrotropin binding the thyrotropin receptor is internalized and localized to endosome.* Endocrinology, 2004. **145**(2): p. 1003-10.
127. Ogiso, H., et al., *Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains.* Cell, 2002. **110**(6): p. 775-87.
128. Mitsudomi, T. and Y. Yatabe, *Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer.* FEBS J, 2010. **277**(2): p. 301-8.
129. Hynes, N.E. and G. MacDonald, *ErbB receptors and signaling pathways in cancer.* Curr Opin Cell Biol, 2009. **21**(2): p. 177-84.
130. Olsson, A.K., et al., *VEGF receptor signalling - in control of vascular function.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(5): p. 359-71.
131. Gaengel, K. and C. Betsholtz, *Endocytosis regulates VEGF signalling during angiogenesis.* Nat Cell Biol, 2013. **15**(3): p. 233-5.
132. Arias, J.L., *Drug targeting strategies in cancer treatment: an overview.* Mini Rev Med Chem, 2011. **11**(1): p. 1-17.
133. Hendriks, B.S., et al., *Impact of tumor HER2/ERBB2 expression level on HER2-targeted liposomal doxorubicin-mediated drug delivery: multiple low-affinity interactions lead to a threshold effect.* Mol Cancer Ther, 2013. **12**(9): p. 1816-28.
134. Maya, S., et al., *Cetuximab conjugated O-carboxymethyl chitosan nanoparticles for targeting EGFR overexpressing cancer cells.* Carbohydr Polym, 2013. **93**(2): p. 661-9.
135. Milane, L., Z.F. Duan, and M. Amiji, *Pharmacokinetics and biodistribution of lonidamine/paclitaxel loaded, EGFR-targeted nanoparticles in an orthotopic*





- animal model of multi-drug resistant breast cancer*. *Nanomedicine*, 2011. **7**(4): p. 435-44.
136. Mamot, C., et al., *Epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted immunoliposomes mediate specific and efficient drug delivery to EGFR- and EGFRvIII-overexpressing tumor cells*. *Cancer Res*, 2003. **63**(12): p. 3154-61.
137. Song, S., et al., *Peptide ligand-mediated liposome distribution and targeting to EGFR expressing tumor in vivo*. *Int J Pharm*, 2008. **363**(1-2): p. 155-61.
138. Paolino, D., et al., *Targeting the thyroid gland with thyroid-stimulating hormone (TSH)-nanoliposomes*. *Biomaterials*, 2014. **35**(25): p. 7101-9.
139. Pilli, T., et al., *Potential utility and limitations of thyroid cancer cell lines as models for studying thyroid cancer*. *Thyroid*, 2009. **19**(12): p. 1333-42.
140. van Staveren, W.C., et al., *Human thyroid tumor cell lines derived from different tumor types present a common dedifferentiated phenotype*. *Cancer Res*, 2007. **67**(17): p. 8113-20.
141. Holting, T., et al., *Transforming growth factor-beta 1 is a negative regulator for differentiated thyroid cancer: studies of growth, migration, invasion, and adhesion of cultured follicular and papillary thyroid cancer cell lines*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994. **79**(3): p. 806-13.
142. Simon, D., et al., *Significance of P53 in human thyroid tumors*. *World J Surg*, 1994. **18**(4): p. 535-40.
143. Ohta, K., T. Endo, and T. Onaya, *The mRNA levels of thyrotropin receptor, thyroglobulin and thyroid peroxidase in neoplastic human thyroid tissues*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991. **174**(3): p. 1148-53.
144. Ros, P., et al., *Thyroid-specific gene expression in the multi-step process of thyroid carcinogenesis*. *Biochimie*, 1999. **81**(4): p. 389-96.
145. Landriscina, M., et al., *Epidermal growth factor receptor 1 expression is upregulated in undifferentiated thyroid carcinomas in humans*. *Thyroid*, 2011. **21**(11): p. 1227-34.
146. Perche, F., et al., *Hypoxia-targeted siRNA delivery*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014. **53**(13): p. 3362-6.
147. Wang, Y.N. and M.C. Hung, *Nuclear functions and subcellular trafficking mechanisms of the epidermal growth factor receptor family*. *Cell Biosci*, 2012. **2**(1): p. 13.
148. Muro, S., E.H. Schuchman, and V.R. Muzykantov, *Lysosomal enzyme delivery by ICAM-1-targeted nanocarriers bypassing glycosylation- and clathrin-dependent endocytosis*. *Mol Ther*, 2006. **13**(1): p. 135-41.
149. Lee, D.H., et al., *Epidermal growth factor receptor status in anaplastic thyroid carcinoma*. *J Clin Pathol*, 2007. **60**(8): p. 881-4.



150. Gullick, W.J., et al., *Expression of epidermal growth factor receptors on human cervical, ovarian, and vulval carcinomas*. *Cancer Res*, 1986. **46**(1): p. 285-92.
151. Schafer, A., et al., *Disconnecting the yin and yang relation of epidermal growth factor receptor (EGFR)-mediated delivery: a fully synthetic, EGFR-targeted gene transfer system avoiding receptor activation*. *Hum Gene Ther*, 2011. **22**(12): p. 1463-73.
152. Wells, A., *EGF receptor*. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999. **31**(6): p. 637-43.
153. Feng, F., et al., *Dedifferentiation of differentiated thyroid carcinoma cell line FTC-133 is enhanced by 131I pretreatment*. *Nucl Med Biol*, 2011. **38**(7): p. 1053-8.
154. Mickler, F.M., et al., *Tuning nanoparticle uptake: live-cell imaging reveals two distinct endocytosis mechanisms mediated by natural and artificial EGFR targeting ligand*. *Nano Lett*, 2012. **12**(7): p. 3417-23.
155. Chiu, S.-J., N.T. Ueno, and R.J. Lee, *Tumor-targeted gene delivery via anti-HER2 antibody (trastuzumab, Herceptin®) conjugated polyethylenimine*. *Journal of Controlled Release*, 2004. **97**(2): p. 357-369.
156. Ma, H.L., et al., *Multicellular tumor spheroids as an in vivo-like tumor model for three-dimensional imaging of chemotherapeutic and nano material cellular penetration*. *Mol Imaging*, 2012. **11**(6): p. 487-98.
157. Lemoine, N.R., et al., *Characterisation of human thyroid epithelial cells immortalised in vitro by simian virus 40 DNA transfection*. *Br J Cancer*, 1989. **60**(6): p. 897-903.
158. Yang, F., et al., *Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 2014. **1845**(1): p. 84-89.
159. Schoener, C.A., et al., *An inulin and doxorubicin conjugate for improving cancer therapy*. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2013. **23**(2): p. 111-118.
160. Minotti, G., et al., *Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity*. *Pharmacol Rev*, 2004. **56**(2): p. 185-229.
161. Dalmark, M., *Characteristics of doxorubicin transport in human red blood cells*. *Scand J Clin Lab Invest*, 1981. **41**(7): p. 633-9.
162. Dalmark, M. and E.K. Hoffmann, *Doxorubicin (Adriamycin) transport in Ehrlich ascites tumour cells: comparison with transport in human red blood cells*. *Scand J Clin Lab Invest*, 1983. **43**(3): p. 241-8.
163. Prados, J., et al., *Doxorubicin-loaded nanoparticles: new advances in breast cancer therapy*. *Anticancer Agents Med Chem*, 2012. **12**(9): p. 1058-70.



164. Kang, H.J., et al., *Antiproliferation and redifferentiation in thyroid cancer cell lines by polyphenol phytochemicals*. J Korean Med Sci, 2011. **26**(7): p. 893-9.
165. Schmutzler, C., et al., *Human thyroid carcinoma cell lines show different retinoic acid receptor repertoires and retinoid responses*. Eur J Endocrinol, 2004. **150**(4): p. 547-56.
166. Zhang, H., et al., *All-trans retinoic acid (atRA) differentially induces apoptosis in matched primary and metastatic melanoma cells - a speculation on damage effect of atRA via mitochondrial dysfunction and cell cycle redistribution*. Carcinogenesis, 2003. **24**(2): p. 185-191.
167. Schmutzler, C. and J. Kohrle, *Retinoic acid redifferentiation therapy for thyroid cancer*. Thyroid, 2000. **10**(5): p. 393-406.
168. Fernandez, C.A., et al., *Effectiveness of retinoic acid treatment for redifferentiation of thyroid cancer in relation to recovery of radioiodine uptake*. J Endocrinol Invest, 2009. **32**(3): p. 228-33.
169. Polverino, A., et al., *AMG 706, an oral, multikinase inhibitor that selectively targets vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and kit receptors, potently inhibits angiogenesis and induces regression in tumor xenografts*. Cancer Res, 2006. **66**(17): p. 8715-21.



VIII ANEXOS



VIII. ANEXOS

1. Índice de Abreviaturas

AMG-706: Motesanib difosfato.

BSA: Albúmina sérica bovina.

CAT: Carcinoma anaplásico de tiroides.

CFT: Carcinoma folicular de tiroides.

CMT: Carcinoma medular de tiroides.

CMV: Cuerpos multivesiculares.

CPDT: Carcinoma pobremente diferenciado de tiroides.

CPT: Carcinoma papilar de tiroides.

CT: Calcitonina.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

EGF: Factor de crecimiento epidérmico.

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

EPR: Aumento de la permeabilidad y retención.

I-131: Yodo radiactivo.

Ig: Inmunoglobulina.

IgG: Inmunoglobulina tipo G.

NIS: Bomba simporter Na^+/I^- .

NP: Nanopartícula.

NP AMG/anti-EGFR: Nanopartícula dirigida al EGFR cargada de AMG-706.

NP anti-EGFR: Nanopartícula dirigida al EGFR.

NP doxo/anti-EGFR: Nanopartícula dirigida al EGFR cargada de doxorubicina.

NP retinoico/anti-EGFR: Nanopartícula dirigida al EGFR cargada de ácido retinoico.

NT: Nanotransportador.

PBS: Tampón fosfato salino.



PDGFR: Receptor del factor de crecimiento derivado de plaqueta.

PEG: Polietilenglicol.

Pi3K: Fosfatidil inositol 3´quinasa.

PLA: Ácido poli-láctico.

QD: Quantum dots o puntos cuánticos.

SFM: Sistema fagocítico mononuclear.

T3: Triyodotironina.

T4: Tetrayodotironina o tiroxina.

TfR: Receptor de transferrina.

Tg: Tiroglobulina.

TRH: Hormona liberadora de tirotropina.

TSH: Tirotropina.

TSHR: Receptor de tirotropina.

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial.

VEGFR: Receptor del factor de crecimiento vascular endotelial.



2. Tablas de datos

Tabla 1. Cinética internalización NPs anti-EGFR.

% Internalización	0 min	30 min	1 h	3 h	5 h
Thy	45 ±3	63 ±3	68 ±4	96 ±2	95 ±2
FTC-133	37 ±2	57 ±3	65 ±2	85 ±3	83 ±3
8505C	35 ±2	53 ±3	76 ±1	83 ±3	96 ±1

Los datos se muestran como la media \pm SEM, $n \geq 20$ imágenes procedentes de 3 experimentos independientes.



Tabla 2. Incubación continua NPs anti-EGFR a 37°C.

NPs anti-EGFR/cel en superficie	5 min	15 min	30 min	1 h	3 h	5 h
Thy	139 ±28	389 ±55	836 ±265	987 ±106	2168 ±346	2443 ±511
FTC-133	611 ±164	973 ±237	1559 ±245	3484 ±653	5627 ±577	13872 ±1807
8505C	1813 ±302	3545 ±316	5528 ±768	6255 ±816	7460 ±996	20562 ±1671
NPs anti-EGFR/cel internas	5 min	15 min	30 min	1 h	3 h	5 h
Thy	13 ±5	217 ±40	309 ±94	847 ±113	7237 ±2473	16662 ±3801
FTC-133	194 ±40	305 ±52	692 ±79	2335 ±245	16542 ±2306	48069 ±2908
8505C	420 ±57	1005 ±177	1827 ±350	3551 ±445	25666 ±4379	58495 ±7671
% Internalización	5 min	15 min	30 min	1 h	3 h	5 h
Thy	12 ±3	26 ±3	36 ±5	45 ±3	80 ±3	88 ±3
FTC-133	18 ±2	26 ±3	26 ±2	37 ±2	74 ±3	78 ±3
8505C	20 ±2	22 ±2	26 ±2	35 ±2	74 ±2	74 ±3

Los datos se muestran como la media \pm SEM, $n \geq 20$ imágenes procedentes de 3 experimentos independientes.

**Tabla 3. Tráfico intracelular NPs anti-EGFR hacia los lisosomas.**

% Colocalización con los lisosomas	0 min	30 min	1 h	3 h	5 h
Thy	41 ±2	42 ±3	48 ±6	71 ±3	71 ±3
FTC-133	34 ±3	44 ±4	46 ±5	64 ±4	72 ±2
8505C	25 ±2	25 ±2	28 ±2	51 ±3	69 ±3

Los datos se muestran como la media \pm SEM, $n \geq 20$ imágenes procedentes de 3 experimentos independientes.



Tabla 4. Tratamientos en la línea 8505C.

% Viabilidad	5 h	10 h	24 h
Control	95 ±2	93 ±1	93 ±1
NPs anti-EGFR	92 ±2	96 ±1	92 ±2
NPs doxo/anti-EGFR	95 ±1	95 ±1	56 ±8
NPs retinoico/anti-EGFR	96 ±1	92 ±1	93 ±1
NPs AMG/anti-EGFR	94 ±1	94 ±1	96 ±1
NPs doxo	92 ±1	94 ±2	83 ±6
Doxorubicina [4,3 µM]	95 ±1	93 ±2	60 ±7
Ácido retinoico [8,4 µM]	96 ±1	95 ±2	93 ±1
AMG-706 [4,4 µM]	96 ±1	93 ±1	93 ±1

Nº cel muertas	5 h	10 h	24 h
Control	2,04x10 ⁴ ±0,65x10 ⁴	4,59x10 ⁴ ±0,72x10 ⁴	3,91x10 ⁴ ±0,61x10 ⁴
NPs anti-EGFR	3,45x10 ⁴ ±1,09x10 ⁴	3,01x10 ⁴ ±1,56x10 ⁴	5,47x10 ⁴ ±1,39x10 ⁴
NPs doxo/anti-EGFR	2,86x10 ⁴ ±0,79x10 ⁴	5,41x10 ⁴ ±1,51x10 ⁴	36,63x10 ⁴ ±12,73x10 ⁴
NPs retinoico/anti-EGFR	2,22x10 ⁴ ±0,22x10 ⁴	5,86x10 ⁴ ±0,86x10 ⁴	2,95x10 ⁴ ±0,37x10 ⁴
NPs AMG/anti-EGFR	3,76x10 ⁴ ±0,89x10 ⁴	3,54x10 ⁴ ±0,61x10 ⁴	2,59x10 ⁴ ±0,72x10 ⁴
NPs doxo	3,77x10 ⁴ ±0,92x10 ⁴	2,94x10 ⁴ ±0,85x10 ⁴	3,06x10 ⁴ ±1,11x10 ⁴
Doxorubicina [4,3 µM]	2,44x10 ⁴ ±0,92x10 ⁴	3,68x10 ⁴ ±1,03x10 ⁴	15,77x10 ⁴ ±3,59x10 ⁴
Ácido retinoico [8,4 µM]	2,85x10 ⁴ ±0,88x10 ⁴	1,80x10 ⁴ ±0,57x10 ⁴	3,13x10 ⁴ ±0,92x10 ⁴
AMG-706 [4,4 µM]	2,32x10 ⁴ ±0,61x10 ⁴	3,01x10 ⁴ ±0,45x10 ⁴	3,54x10 ⁴ ±0,78x10 ⁴

Los datos se muestran como la media ± SEM, 3 experimentos independientes.



Tabla 5. Tratamientos en la línea Thy.

% Viabilidad	5 h	10 h	24 h
Control	97 ±1	94 ±2	91 ±3
NPs anti-EGFR	97 ±2	92 ±3	91 ±3
NPs doxo/anti-EGFR	88 ±6	90 ±4	81 ±4
NPs retinoico/anti-EGFR	92 ±4	92 ±3	95 ±2
NPs AMG/anti-EGFR	91 ±4	89 ±3	92 ±3
NPs doxo	94 ±2	91 ±3	48 ±6
Doxorubicina [4,3 µM]	91 ±2	67 ±8	52 ±7
Ácido retinoico [8,4 µM]	92 ±2	87 ±2	87 ±2
AMG-706 [4,4 µM]	91 ±3	87 ±2	88 ±2

Nº cel muertas	5 h	10 h	24 h
Control	0,43x10 ⁴ ±0,18x10 ⁴	1,13x10 ⁴ ±0,52x10 ⁴	1,36x10 ⁴ ±0,63x10 ⁴
NPs anti-EGFR	0,99x10 ⁴ ±0,69x10 ⁴	1,02x10 ⁴ ±0,49x10 ⁴	1,59x10 ⁴ ±0,64x10 ⁴
NPs doxo/anti-EGFR	5,49x10 ⁴ 3,64x10 ⁴	1,30x10 ⁴ ±0,60x10 ⁴	3,30x10 ⁴ ±1,1x10 ⁴
NPs retinoico/anti-EGFR	1,98x10 ⁴ ±1,42x10 ⁴	0,79x10 ⁴ ±0,22x10 ⁴	0,62x10 ⁴ ±0,30x10 ⁴
NPs AMG/anti-EGFR	2,41x10 ⁴ ±1,48x10 ⁴	2,35x10 ⁴ ±0,86x10 ⁴	0,96x10 ⁴ ±0,38x10 ⁴
NPs doxo	0,72 x10 ⁴ ±0,17x10 ⁴	0,89x10 ⁴ ±0,31x10 ⁴	6,27x10 ⁴ ±1,12x10 ⁴
Doxorubicina [4,3 µM]	1,27x10 ⁴ ±0,66x10 ⁴	4,23x10 ⁴ ±0,97x10 ⁴	5,29x10 ⁴ ±1,26x10 ⁴
Ácido retinoico [8,4 µM]	2,04x10 ⁴ ±0,71x10 ⁴	1,15x10 ⁴ ±0,22x10 ⁴	1,08x10 ⁴ ±0,18x10 ⁴
AMG-706 [4,4 µM]	1,43x10 ⁴ ±0,45x10 ⁴	2,20x10 ⁴ ±0,97x10 ⁴	1,26x10 ⁴ ±0,18x10 ⁴

Los datos se muestran como la media ± SEM, 3 experimentos independientes.