

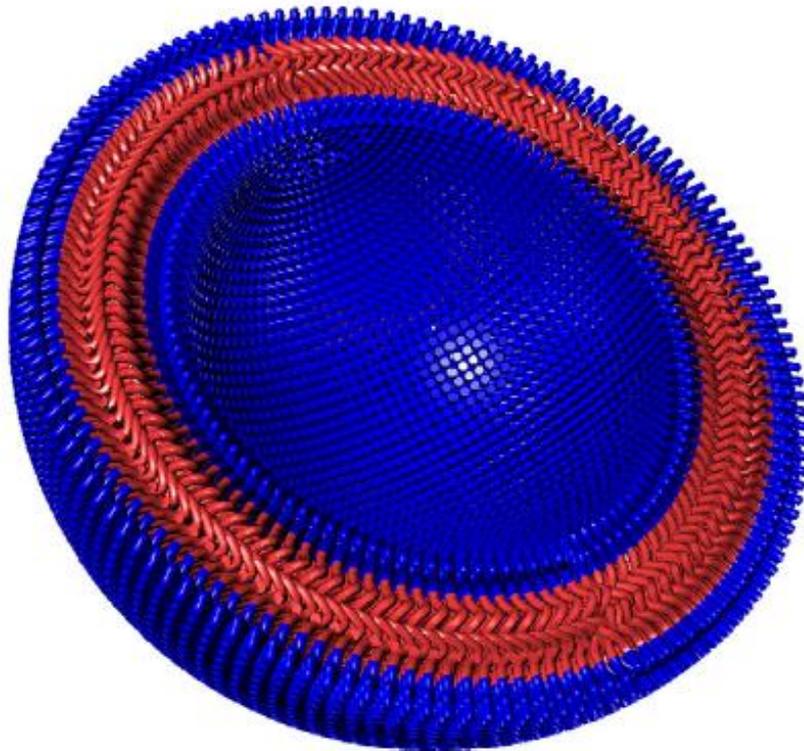


Universidad de Sevilla
Facultad de Farmacia

Trabajo Fin de Grado
Grado en Farmacia

POLIMERSOMAS COMO VEHÍCULOS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

Carmen Rodríguez Chacón





UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

Trabajo Fin de Grado

Grado en Farmacia

POLIMERSOMAS COMO VEHÍCULOS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

Alumna: Carmen Rodríguez Chacón

Lugar de presentación: Facultad de Farmacia, Sevilla

Fecha de presentación: Junio de 2019

Departamento: Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Tutora: Carmen Ferrero Rodríguez

Tipología del proyecto: Trabajo de fin de grado de carácter bibliográfico



CARMEN FERRERO RODRÍGUEZ, Profesora Titular del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Sevilla,

INFORMA: Que el presente trabajo titulado “*Polimersomas como vehículos para el tratamiento del cáncer*” ha sido realizado, bajo mi tutorización y asesoramiento, en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica durante el curso académico 2018/19, constituyendo el Trabajo Fin de Grado que presenta la estudiante Carmen Rodríguez Chacón.

En Sevilla, a 14 de junio de 2019

Fdo.: Carmen Ferrero Rodríguez

RESUMEN

Los polimersomas o vesículas poliméricas son nanopartículas constituidas por una bicapa de copolímeros de bloque anfifílicos, que le proporciona unas características deseables para la vehiculización de fármacos tanto hidrófilos como hidrófobos. Además, presentan una gran estabilidad, un tiempo de circulación adecuado, son biodegradables o al menos biocompatibles y, por último, van a permitir una liberación controlada del fármaco. Todas estas características los convierten en plataformas interesantes para la vehiculización de fármacos anticancerosos, ya que la terapéutica convencional implica la utilización de alta dosis de estos fármacos, con el consiguiente riesgo de toxicidad.

En primer lugar, en esta revisión bibliográfica, se recogen los polímeros biocompatibles que se utilizan con mayor frecuencia en la elaboración de polimersomas, ya que la utilización de unos u otros será determinante en las propiedades finales de la vesícula polimérica. En segundo lugar, se describen los métodos de preparación más comúnmente empleados, que también tendrán relevancia en cuanto al tamaño final del polimersoma. En tercer lugar, se detallan propiedades relevantes de los polimersomas (tamaño, forma y propiedades fisicoquímicas de la membrana), las técnicas de caracterización más empleadas, incluyendo ventajas y desventajas de las mismas, así como la metodología utilizada en la realización de los estudios *in vitro* e *in vivo* de las vesículas. Por último, se recogen diversas aplicaciones en relación con la terapia antitumoral con potencial en la clínica para el tipo de cáncer con mayor prevalencia en mujeres, el cáncer de mama.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. Nanopartículas	5
1.1.1. Historia	5
1.1.2. Nanopartículas como vehículos de fármacos: Polimersomas.	5
2. OBJETIVOS	9
3. METODOLOGÍA	10
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
4.1. Polímeros empleados en la formulación de polimersomas.....	11
4.2. Métodos de elaboración	14
4.2.1. Rehidratación pelicular	14
4.2.2. Hidratación directa	15
4.2.3. Nanoprecipitación.....	15
4.2.4. Doble emulsión por extracción-evaporación del solvente.....	16
4.2.5. Formación activada por estímulos.....	17
4.2.6. Dispositivo microfluídico	17
4.2.7. Utilización de fluidos supercríticos	18
4.3. Caracterización y controles	19
4.3.1. Propiedades	20
4.3.2. Técnicas de caracterización.....	23
4.3.3. Estudios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	27
4.4. Aplicaciones	30
5. CONCLUSIONES.....	34
6. BIBLIOGRAFÍA.....	35

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad causada por el crecimiento incontrolado y la diseminación de células anormales y, además, constituye la segunda causa de muerte en el mundo. Hoy en día el tratamiento incluye distintas opciones como la cirugía, radiación, terapia hormonal y quimioterapia, siendo esta última una de las más utilizadas. Sin embargo, una de sus limitaciones es su alta inespecificidad, el tratamiento no está dirigido a las células dianas, sino que se distribuye por la totalidad del organismo, produciendo efectos adversos indeseables por la interacción con células sanas. Además, la rápida eliminación y específica distribución a los órganos y tejidos diana requiere la administración de altas dosis de fármaco, lo que conlleva problemas económicos y de toxicidad (Prabhu et al., 2015).

La adecuada distribución de un fármaco es una de las etapas claves en el éxito de un tratamiento; es necesario que, para ejercer su efecto terapéutico, este fármaco alcance las células diana a la dosis requerida y en su forma activa (Colley et al., 2014). La vectorización de los distintos principios activos a sus células diana conlleva diversas ventajas, por un lado, aumenta la concentración de fármaco en las células, tejido u órgano diana, disminuyendo por tanto la concentración en el resto, lo que reduce considerablemente la aparición de efectos adversos; además, el coste del fármaco y de la terapia será menor al emplearse menor cantidad de fármaco (Torchilin, 2010).

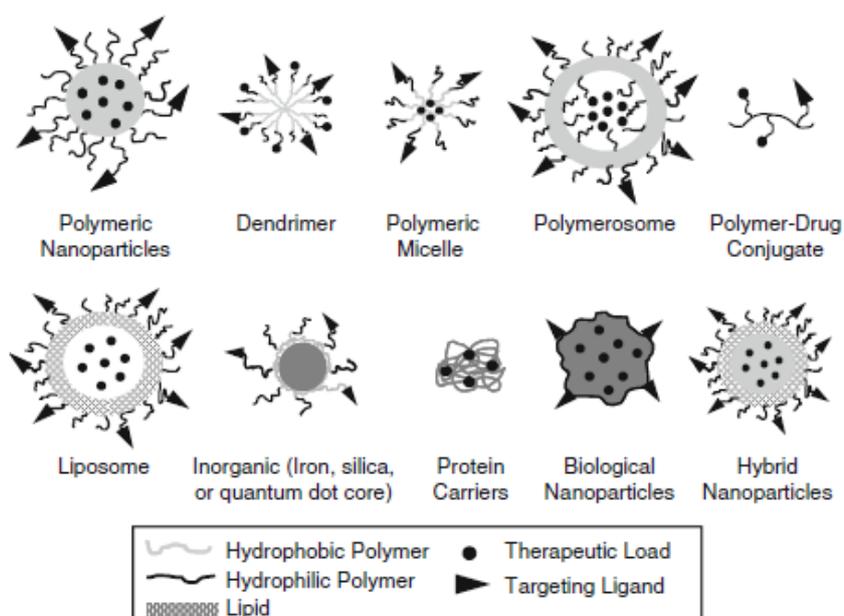


Figura 1. Nanopartículas utilizadas como sistemas de transporte de fármacos (Alexis et al., 2010).

En las últimas décadas se han desarrollado distintos sistemas de transporte de escala nanométrica como los liposomas, conjugados polímero-fármaco, nanopartículas poliméricas, micelas, dendrímeros, polimersomas, nanopartículas proteicas, biológicas, inorgánicas e híbridas (Figura 1) (Alexis et al., 2010).

1.1. Nanopartículas

1.1.1. Historia

Las primeras nanopartículas descritas como sistemas de administración de fármacos, en la década de 1960, fueron unas vesículas lipídicas denominadas liposomas (Alexis et al., 2010). Son estructuras vesiculares constituidas por bicapas lipídicas autoensambladas dispuestas de forma concéntrica, que presentan claramente dos tipos de compartimentos, hidrofílicos e hidrofóbicos. Esta característica es la que permite a los liposomas el transporte de moléculas con distinta solubilidad (Su et al., 2014).

Años más tarde, en 1976, aparecieron los primeros sistemas poliméricos de liberación controlada de macromoléculas, a lo que le sucedió la primera aplicación de sistemas liposomales vectorizados en 1980. Posteriormente, en la década de los 90, se procedió a modificar la superficie de liposomas y nanopartículas poliméricas con polietilenglicol, lo que condujo al aumento del tiempo de circulación de estas nanopartículas.

A partir de entonces, el campo de la nanotecnología siguió desarrollándose hasta culminar con la aprobación de Doxil, un sistema liposomal que encapsulaba doxorubicina, ampliamente utilizado en el tratamiento de distintos tipos de cáncer. Desde entonces, se ha llevado a cabo un gran progreso en el diseño y desarrollo de nanopartículas “inteligentes”, que presentan la capacidad de producir una respuesta al entorno, lo que permite obtener estrategias de liberación de fármacos más efectivas (Alexis et al., 2010).

En la actualidad, hay 29 ensayos clínicos activos, en distintas fases, en los que se emplean nanopartículas para el tratamiento de distintos tipos de cáncer y otros 60 ensayos programados que se encuentran reclutando participantes (U.S. National Library of Medicine, 2019).

1.1.2. Nanopartículas como vehículos de fármacos: Polimersomas.

Las nanopartículas proporcionan muchas ventajas como sistemas de administración de fármacos: aumentan el tiempo de circulación, permitiendo una acumulación en el lugar

de acción; liberan el fármaco preferentemente en la célula/tejido diana, disminuyendo los efectos adversos; mejoran la solubilidad de aquellos fármacos poco solubles en sangre y los protegen del ambiente. Las nanopartículas con tamaños comprendidos entre 30-200 nm se acumulan preferentemente en tejidos poco vascularizados, como los tumores, mejorando así la permeación y retención de las mismas. En definitiva, las nanopartículas permiten un mejor control temporal y espacial, lo que conlleva una mejora de la eficacia y una reducción de la toxicidad (Rwei et al., 2015).

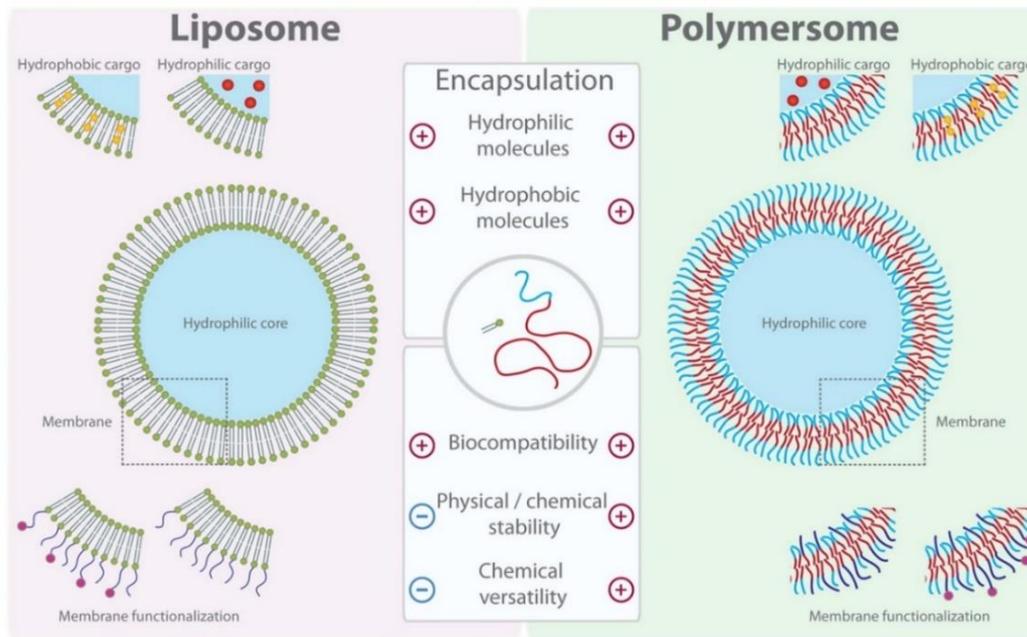


Figura 2. Representación esquemática de la estructura básica de liposomas (izquierda) y polimersomas (derecha) (Messenger et al., 2014).

Los polimersomas, también denominados vesículas poliméricas, son nanopartículas análogas estructurales de los liposomas (Su et al., 2014), como se puede observar en la Figura 2. Están constituidos por una estructura hueca cuyo interior es acuoso, lo que permite la encapsulación de moléculas hidrófilas; en lugar de la bicapa lipídica propia de los liposomas, se rodean de una bicapa de copolímero anfifílico de bloque biodegradable que permite encapsular moléculas hidrófobas (Hu et al., 2017). Presentan ciertas ventajas con respecto a los liposomas, entre las que se incluyen una mayor estabilidad, debido a que el copolímero presenta un mayor peso molecular, por lo que la bicapa resultante es más dura, menos permeable y fluida (Brinkhuis et al., 2011). Además, muestran un aumento del tiempo de circulación (hasta dos veces superior a los

liposomas unidos a moléculas de polietilenglicol) y características superiores de biodegradabilidad y liberación controlada del fármaco (Mohammadi et al., 2017).

Los polimersomas presentan un gran número de aplicaciones biomédicas como sistemas de transporte y vectorización de fármacos, de genes y como diagnóstico por imagen (Brinkuis et al., 2011; Hu et al., 2017; Xiong et al., 2012). La incorporación de un agente de contraste permite la monitorización de la ubicación concreta de los polimersomas durante la liberación de los fármacos de forma no invasiva, sin necesidad de sacrificar al animal, lo que supone una gran ventaja (Levine et al., 2008). Además, pueden servir como compartimentos para llevar a cabo reacciones a nanoescala *in situ*. Los últimos avances en investigación se han centrado en el diseño de polimersomas “inteligentes”, con la capacidad para responder a determinados estímulos tales como pH, potencial de óxido-reducción, temperatura o luz (Hu et al., 2017).

Esta revisión bibliográfica se centra en el uso de estas vesículas poliméricas en la terapia anticancerosa. Merece insistir en la necesidad de buscar nuevas estrategias que eviten la aparición de los efectos adversos propios de la quimioterapia, como en el caso de la doxorrubicina, uno de los agentes quimioterápicos más efectivos y con mayor uso en la actualidad. La doxorrubicina se intercala en el ADN interponiéndose a la acción de la topoisomerasa II, que tiene mayor actividad en células tumorales y cuya función es desenrollar el ADN en la transcripción, por lo que este fármaco produce la detención del proceso de replicación y, además, genera radicales libres de oxígeno. La principal desventaja del uso de este fármaco es que produce una severa cardiotoxicidad, lo que limita la dosis de fármaco que se puede administrar, siendo muchas veces insuficiente para conseguir el efecto terapéutico (Colley et al., 2014; Zhu et al., 2017).

Por lo tanto, es necesario el desarrollo de una estrategia que permita vehiculizar este fármaco y su liberación de manera selectiva en las células dianas, reduciendo así la aparición de efectos adversos (Zhu et al., 2017). En determinados casos, se lleva a cabo terapia combinada con otro fármaco cuyo mecanismo de acción sea distinto (por ejemplo, paclitaxel, que es un agente antimetabólico), ya que esto produce un aumento en la tasa de regresión tumoral, así como en la tasa de supervivencia de los pacientes en comparación con la monoterapia. Dado que el paclitaxel es menos soluble que la doxorrubicina, se requiere un vehículo que permita el transporte de los fármacos de manera conjunta (Ahmed et al., 2006).

El número de artículos referidos a polimersomas en la última década ha ido aumentando considerablemente, como se puede observar en la Figura 3.



Figura 3. Gráfico que muestra el número de publicaciones sobre polimersomas en los últimos 10 años (Elsevier, 2019).

2. OBJETIVOS

La creciente necesidad de establecer una terapia anticancerosa más efectiva y segura para los pacientes ha llevado al diseño y desarrollo de nuevos sistemas de vehiculización de fármacos. La nanotecnología permite el desarrollo de estos sistemas, que presentan un gran potencial en lo referente a la mejora del tratamiento del cáncer. Entre estos sistemas, se encuentran los polimersomas.

Por ello, el objetivo general de este trabajo es revisar la utilidad de los polimersomas como plataformas para la administración de agentes antineoplásicos del tipo de la doxorubicina. Este objetivo general se concreta en una serie de objetivos específicos:

- Conocer los tipos de polímeros utilizados en la formulación de polimersomas y los distintos métodos de elaboración.
- Analizar los ensayos de caracterización y controles que garantizan la calidad de los sistemas elaborados.
- Evaluar el comportamiento de liberación *in vitro* e *in vivo* de dichos sistemas y su potencial aplicación en el tipo de cáncer más prevalente en mujeres, el cáncer de mama.

3. METODOLOGÍA

Para la elaboración de esta revisión bibliográfica se han utilizado diferentes fuentes de información:

- Scopus: base de datos multidisciplinar a través de la cual se ha tenido acceso a diversos artículos científicos con respecto al tema en estudio. Ha permitido seleccionar los artículos de forma sencilla en función de las citas que han recibido, lo que nos permite conocer su impacto.
- PubMed: motor de búsqueda que permite el acceso a Medline, que es una base de datos de bibliografía médica.

El acceso a estas fuentes de bibliografía se ha realizado a través de FAMA, el catálogo de la biblioteca de la Universidad de Sevilla.

Además, se ha utilizado la aplicación web Mendeley para archivar los artículos consultados y como gestor de las referencias bibliográficas. También ha permitido encontrar nuevos documentos de interés gracias a las sugerencias basadas en los artículos archivados.

En primer lugar, se realizó una búsqueda general utilizando las siguientes palabras clave: polymersome y cancer therapy. Se seleccionaron artículos relevantes de los últimos 15 años tomando como criterio fundamental el número de citas. Posteriormente, se realizaron búsquedas más concretas incluyendo también las palabras clave: doxorubicin, polymer engineering, cancer targeting, drug delivery.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Polímeros empleados en la formulación de polimersomas

Los polimersomas son vesículas poliméricas autoensambladas cuya membrana está constituida por una bicapa de copolímeros de bloque anfifílicos que deben contener, al menos, un bloque hidrofílico y otro hidrofóbico (Xiong et al., 2012) (Figura 4). Cada uno de los bloques puede estar formado por un monómero específico o por la combinación de más de uno; esta variabilidad en la composición y el peso molecular final es lo que permite la elaboración de polimersomas con diferentes propiedades, espesor y permeabilidad de la membrana (Lee y Feijen, 2012). Además, esta membrana puede ser funcionalizada con el objetivo de mejorar la vectorización y de producir una respuesta a un estímulo concreto que permita la liberación del fármaco encapsulado (Gaitzsch et al., 2016).

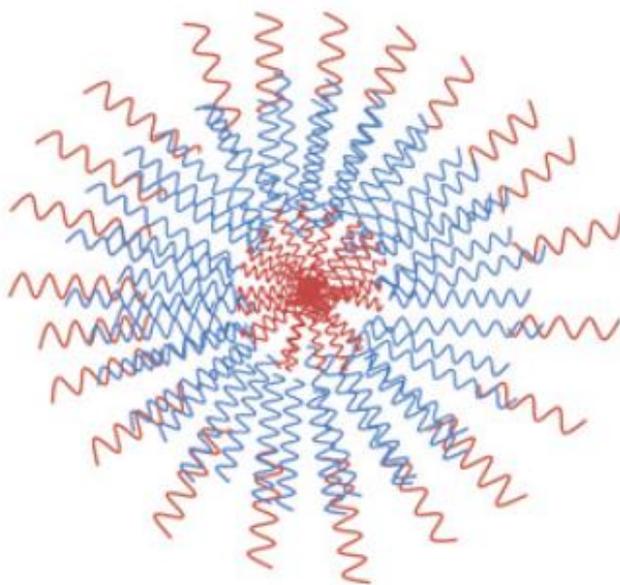


Figura 4. Ilustración de un polimersoma formado por copolímeros de bloque hidrófilos (color rojo) e hidrófobos (color azul) (Martin et al., 2016).

Existe una gran cantidad de copolímeros de bloque empleados en la formulación de polimersomas (Tabla 1); todos ellos se caracterizan por ser biodegradables o, al menos, biocompatibles.

Polímeros	hidrófilos	Polímeros	hidrófobos
Poli-etilenglicol	PEG	Ácido poliláctico	PLA
Poli-etilenimina	PEI	Policaprolactona	PCL
Poli-2-dimetilaminoetil metacrilato	PDMAEMA	Poli 2-etil 2-oxazolina	PEOz
Poli-etileno fosfato	PEEP	Poli-L-lisina	PLL
Tetraetilpentamina	TEPA	Policarbonato	PC
Poli-etilglicinatometacrilamida	PEGMA	Polipropilenglicol	PPG
Polialilglicidileter	PAGE	Poliestireno	PS
Ácido hialurónico	HYA	Polibencilglutamato	PBLG
Ácido poliacrílico	PAA	Poli-etileno	PEE
Poli (2-metacrililoiloxi-etil fosforilcolina)	PMPC	Polibutadieno	PBd
Dextrano	DEX	Ácido poli-láctico-co-glicólico	PGLA
		Poli-2-vinilpiridina	P2VP
		Poli-2-diisopropilamino metacrilato de etilo	PDPA

Tabla 1. Polímeros hidrófilos (izquierda) y polímeros hidrófobos (derecha) empleados con mayor frecuencia en la formulación de polimersomas (Martin et al., 2016, adaptada).

El primer copolímero de bloque biocompatible utilizado en la formación de polimersomas fue PEG-PEE (polietilenglicol y polietileno). PEG, también denominado PEO (óxido de polietileno), es hidrosoluble y es el que proporciona a estos polimersomas características útiles *in vivo*, a pesar de que PEE también es altamente biocompatible. Además, la utilización de PEG proporciona mayor tiempo de circulación debido a que reduce la adsorción a proteínas inespecíficas.

Se han sintetizado otros copolímeros de bloque basados en PEG. El bloque de PEG puede acoplarse a diversos bloques hidrófobos, tanto biodegradables (policaprolactona

(PCL) o ácido poliláctico (PLA)), como no biodegradables (poliestireno (PS) o polibutadieno (PBd)).

La utilización de un polímero u otro proporciona distintas características al polimersoma. PS, al tener una temperatura de transición vítrea muy alta, produce una membrana semicristalina rígida; en cambio, PBd, al tener una temperatura de transición vítrea por debajo de la temperatura ambiente, da como resultado una membrana flexible y fluida que permitiría la extrusión y, por tanto, el control del tamaño tras la formación de los polimersomas. La principal limitación de la utilización de PBd para terapias *in vivo* es que se trata de un polímero biocompatible pero no biodegradable, por lo que sus residuos pueden producir toxicidad. Por ello, se suelen emplear otros polímeros hidrófobos que sí son biodegradables, como PCL, PLA o ácido poli-láctico-co-glicólico) (PGLA) (Brinkhuis et al., 2011; Levine et al., 2008).

Por un lado, PLA y PGLA son altamente biocompatibles y además tienen buenas propiedades mecánicas para su uso en la administración de fármacos. Las vesículas poliméricas compuestas por estos polímeros biodegradables experimentan degradación hidrolítica intracelular catalizada por ácidos, generando como productos ácido láctico y ácido glicólico, que son solubles en agua y no tóxicos. Por otro lado, aunque el copolímero PCL también es biodegradable y no tóxico, se suele emplear junto a otros polímeros biodegradables, ya que su degradación es lenta. La combinación de este polímero con otros permite adaptar la cinética de degradación del polimersoma (Danafar, 2016).

La utilización de copolímeros de bloque cuya solubilidad en soluciones acuosas depende del pH permite que la liberación del contenido sea más rápida, como en el caso de polimersomas compuestos de copolímeros de poli-2-vinilpiridina (P2VP), polímero hidrófobo, y PEG; o poli-2-diisopropilamino metacrilato de etilo (PDPA), polímero hidrófobo, y poli (2-metacrilatoiloxi-etil fosforilcolina) (PMPC), polímero hidrófilo. Esto se debe a la protonación de los bloques hidrófobos en soluciones por debajo de un determinado pH, volviéndose hidrófilos, lo que produce la transición brusca de polimersomas a copolímeros de bloque disueltos libres y, por tanto, la liberación del fármaco (Brinkhuis et al., 2011; Levine et al., 2008).

4.2. Métodos de elaboración

A continuación, se indican algunos de los métodos más empleados en la elaboración de polimersomas.

4.2.1. Rehidratación pelicular

Mediante esta técnica, los polimersomas se forman a partir de una fina película polimérica que posteriormente se rehidrata con el solvente adecuado. Para ello, el copolímero de bloque y los compuestos hidrófobos se disuelven en un disolvente orgánico volátil adecuado, como el cloroformo, en un vial de vidrio y la solución se seca al reducir la presión para eliminar el solvente residual. Una vez se ha eliminado el solvente, el polímero crea una película fina en la pared del vial. A continuación, con el fin de hidratar la película creada, se añade la fase acuosa que contiene el agente hidrofílico y cuya función es difundir a través de la película haciendo que la parte hidrofílica se hinche. Durante todo el proceso de hidratación es muy importante mantener la agitación para que el polímero se mantenga como una fina película (Figura 5).

Este método produce vesículas de una amplia variedad de tamaño, desde 100 nm hasta 100 μm dependiendo del polímero utilizado y de las condiciones específicas empleadas en la elaboración. Por lo tanto, tras el procedimiento, pueden llevarse a cabo distintos tratamientos (extrusión a través de una membrana de policarbonato con poros definidos, sonicación o ciclos de congelación y descongelación) para obtener una adecuada distribución de tamaño (Gaitsch et al., 2016; Letchford y Burt, 2007; Mohammadi et al., 2017).

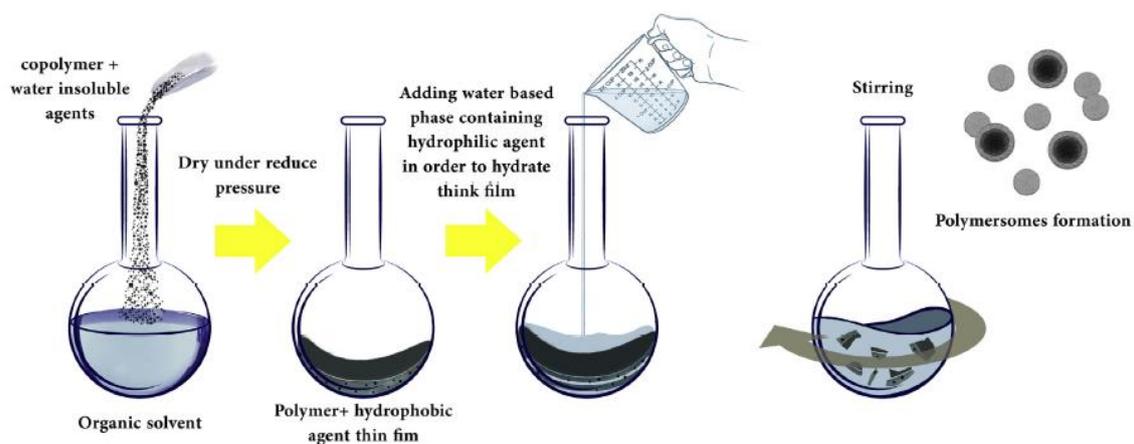


Figura 5. Representación esquemática del método de elaboración de polimersomas por rehidratación pelicular (Mohammadi et al., 2017).

Aunque se trata de una técnica simple, el principal inconveniente que presenta es la reducida eficiencia (5-15%) en la encapsulación de moléculas hidrófilas (Mohammadi et al., 2017).

4.2.2. Hidratación directa

Según el tamaño y tipo de copolímeros de bloque empleados en la formación de los polimersomas, algunos se pueden formar directamente en un ambiente acuoso sin necesidad de emplear ningún solvente orgánico. Los copolímeros se disuelven en una solución tampón que contiene las moléculas hidrófilas y rápidamente se forma la estructura vesicular (Mohammadi et al., 2017).

4.2.3. Nanoprecipitación

La nanoprecipitación, también denominada intercambio de solvente, es una técnica fácil, poco compleja, ampliamente aplicable y eficiente energéticamente. Además, con este método se pueden encapsular tanto moléculas hidrófilas (interior acuoso) como hidrófobas (bicapa). El polímero disuelto en un solvente orgánico se añade a una solución acuosa gota a gota manteniendo agitación constante. A continuación, los polimersomas se forman instantáneamente a medida que el polímero va difundiendo hacia la fase acuosa. La etapa final consiste en la eliminación del solvente orgánico utilizado previamente mediante un proceso de diálisis o a presión reducida si es volátil.

Los requisitos para llevar a cabo esta técnica son que los disolventes sean miscibles entre sí y den lugar a la formación espontánea de las nanopartículas en la separación de fases y la existencia de soluciones poliméricas diluidas. La velocidad de adición del polímero y la velocidad de agitación también influyen en el tamaño de los polimersomas y en su capacidad de encapsulación (Mohammadi et al., 2017; Zhang et al., 2013). La principal desventaja de la utilización de este método es la necesidad de eliminar el disolvente orgánico residual, que es peligroso tanto para el medio ambiente como para los sistemas fisiológicos (Danafar et al., 2016; Mohammadi et al., 2017; Zhang et al., 2013).

El tamaño de partícula que se obtiene con este método es de aproximadamente 200 nm, normalmente menor que los obtenidos con otros procesos (Zhang et al., 2013).

4.2.4. Doble emulsión por extracción- evaporación del solvente

Este método es uno de los más versátiles para la preparación de polimersomas que encapsulan agentes tanto hidrófilos como hidrófobos.

En primer lugar, el copolímero anfifílico se disuelve en una fase orgánica (oleosa) que ya incluye los agentes hidrófobos. A continuación, se emulsiona con una fase acuosa junto con los agentes hidrófilos, utilizando para ello un agente tensioactivo. La emulsificación se lleva a cabo mediante ultrasonificación, lo que permite la formación de gotas de polímero de tamaño nanométrico. La calidad de la emulsión formada determinará tanto el tamaño como la distribución de tamaño de las partículas, por ello se requiere el uso de tensioactivos y/o homogeneizadores. La emulsión resultante se transfiere a una fase acuosa más grande y se mantiene en agitación para que se produzca la evaporación del solvente. Por último, se recogen y lavan los polimersomas mediante centrifugación (Figura 6) (Mohammadi et al., 2017).

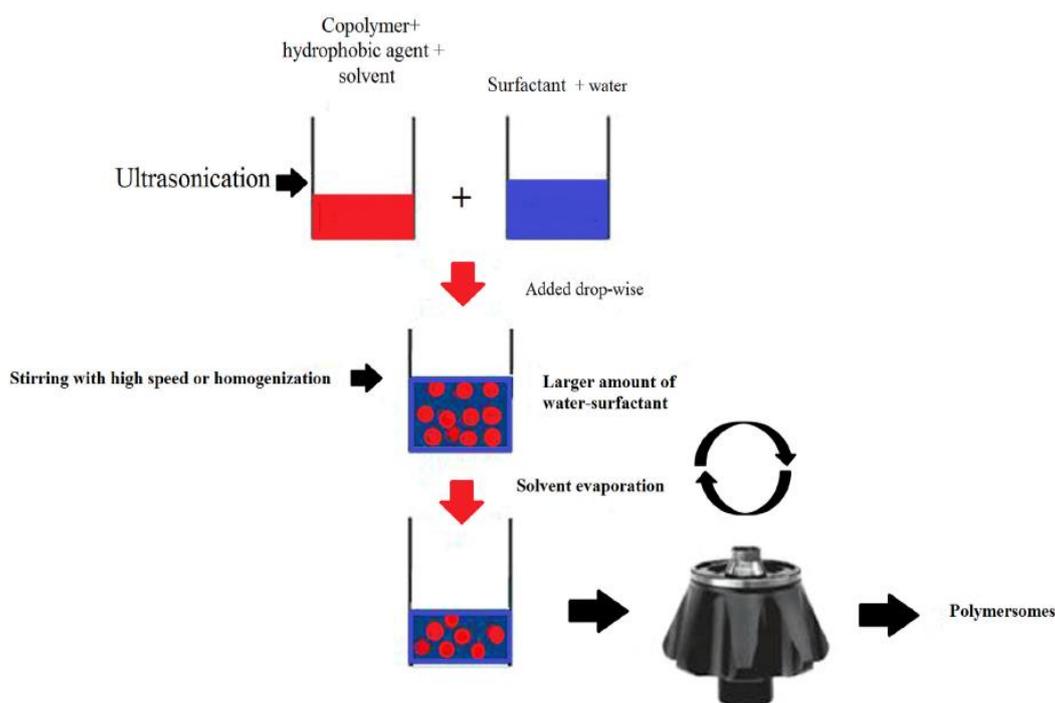


Figura 6. Representación esquemática de la elaboración de polimersomas mediante la técnica de doble emulsión por extracción- evaporación del solvente (Mohammadi et al., 2017).

Las principales desventajas de este método son la producción de polimersomas con un amplio rango de tamaños, la pérdida del fármaco hidrófilo que causa baja eficiencia de encapsulación (Mohammadi et al., 2017) y la necesidad de usar disolventes orgánicos peligrosos para el medio ambiente (Danafar et al., 2016).

4.2.5. Formación activada por estímulos

También se pueden formar polimersomas a partir de gotas de doble emulsión con múltiples núcleos (A/O/A) y utilizando como estímulos externos la temperatura o la luz UV. Tras la activación por estos estímulos, estas gotas de doble emulsión con múltiples núcleos se transforman en gotas de doble emulsión de un solo núcleo. A continuación, se produce la evaporación del solvente utilizado, obteniendo finalmente los polimersomas, tal y como se muestra en la Figura 7 (Mohammadi et al., 2017).

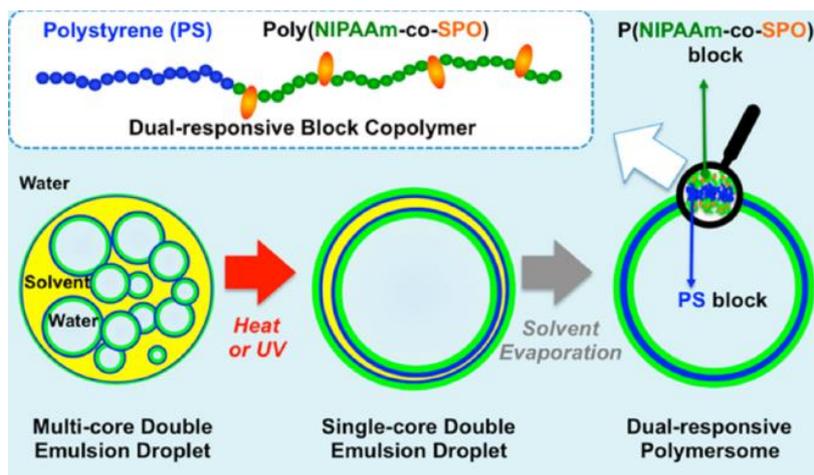


Figura 7. Representación esquemática de la formación de polimersomas mediante el empleo de estímulos (Mohammadi et al., 2017).

Además de la temperatura y la luz, el cambio de pH también puede utilizarse como estímulo para la formación de polimersomas (Gaitzsch et al., 2016).

4.2.6. Dispositivo microfluídico

Estos dispositivos normalmente están fabricados de vidrio o polidimetilsiloxano (PDMS) y compuestos por varias jeringas y bombas que permiten la inyección en el sistema de los fluidos. En esta técnica, los volúmenes de fluido utilizados son muy pequeños, lo que permite una mejor mezcla agua/disolvente y la formación de polimersomas con alto rendimiento (Thiele et al., 2010; Zhang et al., 2013).

Para la elaboración de los polimersomas se emplean dos jeringas que se acoplan al dispositivo. Una de ellas contiene la solución hidrófoba o del polímero en el solvente orgánico a un caudal preseleccionado y ajustado mediante una bomba interna. A su vez, la fase hidrófila se introduce en el dispositivo con ayuda de la segunda jeringa, también

a un flujo determinado. La tensión superficial provoca que el fluido se rompa formando gotas de doble emulsión sin que se produzca la salida del fluido interno hacia el externo (Lorenceanu et al., 2005). Para recoger los polimersomas elaborados se emplea un tubo que se coloca en el punto concreto del dispositivo donde se produce la mezcla (Figura 8).

Mediante esta técnica, se obtienen polimersomas con tamaño de partícula de 40 nm a 2 μm , dependiendo de la relación entre los flujos de las jeringas seleccionados. En comparación con las técnicas de emulsión convencionales, que generan polimersomas con gran variabilidad de tamaños, esta técnica permite elaborar polimersomas con un buen control tanto del diámetro de la partícula como de la eficiencia de encapsulación (Mohammadi et al., 2017; Zhang et al., 2013) y permite la elección de distintos materiales para su formulación (Lorenceanu et al., 2005). Sin embargo, la principal desventaja de este método es la velocidad lenta de producción, lo que dificulta a su vez la utilización a gran escala (Gaitzsch et al., 2016).

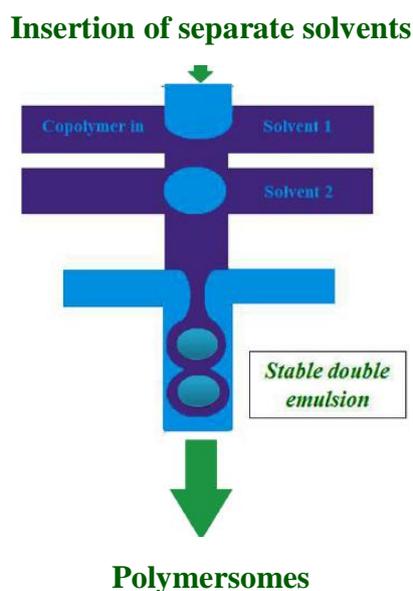


Figura 8. Representación esquemática de la utilización del dispositivo microfluídico para la elaboración de polimersomas (Mohammadi et al., 2017).

4.2.7. Utilización de fluidos supercríticos

En esta técnica, esquematizada en la Figura 9, se disuelven en un mismo codisolvente tanto el fármaco como el polímero. El empleo de un mismo codisolvente es importante para conseguir una eficiencia de encapsulación aceptable. A continuación, esta solución

se pulveriza en un fluido supercrítico, generalmente dióxido de carbono (CO₂). Se emplea este fluido debido a que presenta ciertas propiedades que resultan ideales, entre las que se encuentran que no es inflamable, ni tóxico y, además, es económico.

El polímero y el fármaco precipitan formando nanopartículas debido a la transición de un sistema de dos fases (el codisolvente y CO₂ como fluido supercrítico) a un sistema de fluido supercrítico homogéneo de una sola fase.

A diferencia de otros métodos convencionales, la utilización de fluidos supercríticos no deja ningún tipo de residuo tóxico debido al solvente orgánico en las nanopartículas. Además, al ser una técnica económica, simple, adecuada y que permite la producción de polimersomas en masa, se establece como una técnica perfecta para ser utilizada por la industria farmacéutica (Mohammadi et al., 2017).

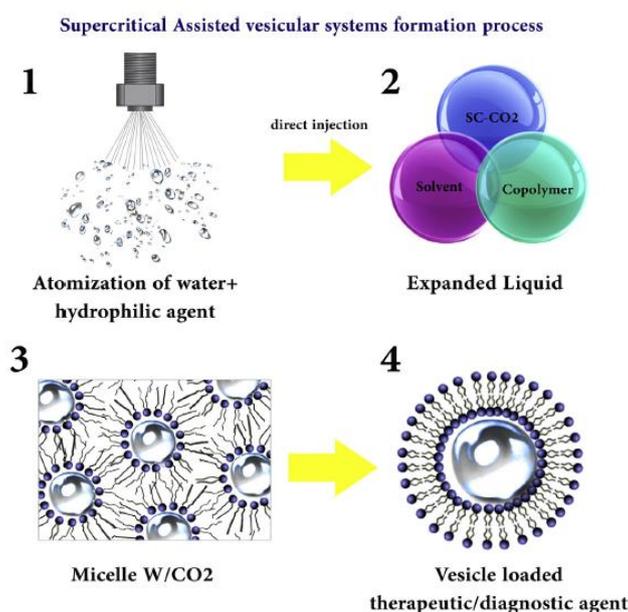


Figura 9. Representación esquemática del proceso de formación de polimersomas mediante la utilización de fluidos supercríticos (Mohammadi et al., 2017).

4.3. Caracterización y controles

Para acercar la utilización de los polimersomas a la práctica clínica, es necesario tener una completa comprensión de su ensamblaje y desensamblaje, las interacciones fisicoquímicas y la biofuncionalización de los polimersomas. Es necesario mantener un control en la regulación del tamaño, estructura y propiedades de la membrana y la forma (Leong et al., 2018).

Se requiere llevar a cabo una caracterización fiable y reproducible de las vesículas poliméricas para que éstas puedan emplearse, llegando a un compromiso entre la precisión de las mediciones y la instrumentación y preparación más adecuadas. Las técnicas de caracterización utilizadas son compatibles con las que se aplican con normalidad en la ciencia de los sistemas coloidales y las podemos clasificar en cinco grupos: técnicas de dispersión, métodos de visualización o microscopía, manipulación física y electromagnética, métodos de separación/purificación y herramientas de simulación (Habel et al., 2015; Kita-Tokarczyk et al., 2005).

4.3.1. Propiedades

4.3.1.1. Tamaño

Las partículas con un diámetro mayor a 12 nm no pueden alcanzar los órganos normales, en cambio, los vasos sanguíneos en el tumor son permeables, tortuosos y con un drenaje linfático deficiente. Esto permite el paso y la acumulación de los polimersomas de un tamaño inferior a 780 nm, que es la distancia máxima entre las células endoteliales de la vasculatura tumoral. Esto se conoce como efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR) (Leong et al., 2018).

El tamaño de la vesícula polimérica puede modificarse en distintas etapas de su elaboración. Los parámetros sobre los que se puede incidir para el control del tamaño son la composición del polímero, ya que existe una correlación entre el peso molecular de éste y el tamaño del polimersoma, la concentración inicial del copolímero, la naturaleza del solvente y el contenido de agua en la mezcla, la temperatura y, posiblemente, la adición de otros componentes o aditivos como iones, homopolímeros o surfactantes (Bleul et al., 2015). Además, la polidispersidad del copolímero de bloque y la proporción entre los bloques puede influir en la distribución del tamaño. También el método de elaboración utilizado puede determinar el tamaño de la vesícula polimérica. Así, mediante las técnicas de rehidratación pelicular, intercambio de solvente y métodos de inyección se obtienen vesículas de entre 50 a 800 nm (Brinkhuis et al., 2011).

Se puede controlar el tamaño final de los polimersomas con el empleo de algunas técnicas:

-Extrusión/sonicación: Los polimersomas se redimensionan haciendo uso de las fuerzas de cizalla que surgen en la extrusión. La muestra de polimersomas preformados se hace

pasar por un filtro con nanoporos. La única restricción es que la membrana polimérica debe permanecer fluida hasta el final del proceso, por lo que se requieren polímeros con una temperatura de transición vítrea baja. Alternativamente, la aplicación de la energía del sonido se emplea para romper las partículas en otras más pequeñas (Brinkhuis et al., 2011; Leong et al., 2018).

-Velocidad de mezcla: Modificando la velocidad de mezclado del agua y la solución polimérica se puede controlar el tamaño de los polimersomas en un amplio rango. Un aumento en la velocidad de la mezcla hace que los polímeros se autoensamblen en polimersomas de menor tamaño; al contrario, si se reduce la velocidad de mezcla, las moléculas de polímero se autoensamblan lentamente dando lugar a polimersomas de mayor tamaño (Leong et al., 2018).

-Filtración y centrifugación: Para llevar a cabo la purificación de los polimersomas, éstos se hacen pasar a través de una membrana semipermeable con un tamaño de poro específico, excluyéndose así los polimersomas de mayor tamaño mientras que las vesículas de menor tamaño (micelas) pasan a través de la membrana. El empleo de la filtración tangencial (Figura 10) previene la colmatación de la membrana, por lo que es la técnica empleada (Robertson et al., 2016). A continuación, se lleva a cabo una centrifugación diferencial, sedimentando los polimersomas más grandes y quedando los de menor tamaño en el sobrenadante. De esta forma, se pueden obtener distintas poblaciones de tamaño mediante incrementos graduales de la fuerza centrífuga (Leong et al., 2018).

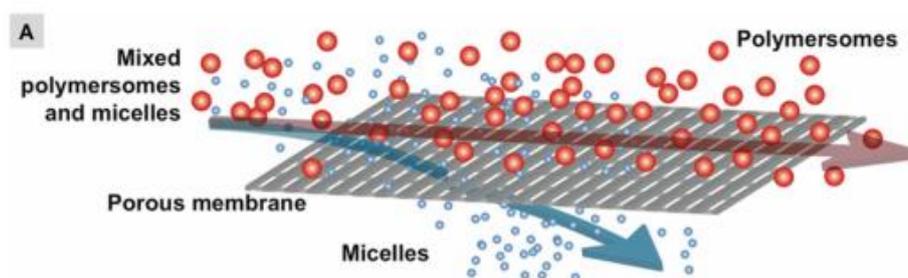


Figura 10. Representación del proceso de filtración tangencial para la purificación de polimersomas (Robertson et al., 2016).

-Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC): Separa las partículas en función de su volumen hidrodinámico. La mezcla de partículas se hace pasar por una columna de cromatografía formada por un material poroso, de forma que las partículas de mayor

tamaño no penetran en los poros de la columna, por lo que eluyen más rápidamente que las de menor tamaño, que quedan retenidas en los poros (Robertson et al., 2016).

-Química del polímero: Tanto la fracción de volumen del bloque hidrófilo como el peso molecular de los polímeros empleados modulan el diámetro del polimersoma. Al aumentar la fracción de bloque hidrófilo y el peso molecular de los polímeros se experimenta un incremento en el tamaño del polimersoma (Leong et al., 2018).

4.3.1.2. Propiedades fisicoquímicas de la membrana

Las propiedades fisicoquímicas de la membrana de la vesícula polimérica, tales como la carga superficial y la permeabilidad, deben estar diseñadas de tal manera que aumenten la eficacia diagnóstica y terapéutica, ya que influyen tanto en la velocidad de penetración celular como en la orientación espacial de la carga de fármaco (Leong et al., 2018).

-Carga superficial: Modula la interacción con las membranas celulares (negativamente cargadas, potencial zeta -20 mV). Los polimersomas simétricos sufren un proceso de endocitosis lento debido a las repulsiones electrostáticas. Por el contrario, los polimersomas asimétricos (formados a partir de copolímeros tribloque con dos bloques hidrofílicos diferentes flanqueando el bloque hidrófobo) permiten un mejor control de la carga superficial y muestran un proceso de endocitosis más rápido que los anteriores (Leong et al., 2018).

Lee et al. (2011) demostraron que polimersomas con una carga superficial ligeramente negativa (potencial zeta $-7,6$ mV) son estables en la circulación y, además, presentan un mayor tiempo de circulación y una mayor acumulación en tumores de ratones que los polimersomas con potencial zeta más negativo ($-38,7$ mV).

-Permeabilidad: Influye de forma importante en el movimiento de las moléculas a través de la membrana del polimersoma. El polímero que conforma el bloque hidrófobo es el que determina la fluidez y el espesor de la membrana. Una menor hidrofobicidad del polímero se traduce en una mayor velocidad en el movimiento de las moléculas a través de la membrana. Además, la temperatura de transición vítrea de los polímeros determina la fluidez de la membrana, por lo que se requieren polímeros con una temperatura de transición vítrea baja ya que, a temperaturas superiores a ésta, la velocidad del movimiento de las moléculas se ve aumentada. Por otro lado, el coeficiente de difusión

de las membranas del polimersoma se ve disminuido al aumentar el peso molecular del copolímero, dado que se incrementa el espesor de la membrana (Leong et al., 2018).

4.3.1.3. Forma

La organización espacial de las cadenas de los copolímeros anfifílicos contribuye a la forma final de los polimersomas, lo que determina su transporte. Por un lado, los polimersomas esféricos son los más estables termodinámicamente al tener la menor relación superficie/volumen y la energía superficial más baja, en cambio presentan una capacidad inferior para la adhesión celular o tisular que los polimersomas no esféricos (Leong et al., 2018). Los polimersomas elipsoidales muestran una mejor adhesión a las células diana en comparación con los polimersomas esféricos, lo que se atribuye a un área superficial mayor (Lai et al., 2012).

Por otro lado, los polimersomas esféricos presentan una endocitosis más rápida y requieren menos energía para llevar a cabo este proceso que los polimersomas elipsoidales (Chen et al., 2016). Se puede inducir tanto física como químicamente la transición de polimersomas esféricos a no esféricos (Leong et al., 2018).

4.3.2. Técnicas de caracterización

4.3.2.1. Métodos de dispersión

-Dispersión dinámica de la luz

Para la realización de mediciones de tamaño, distribución de tamaño (índice de polidispersidad) y morfología, la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS) es la más conveniente y rutinaria (Habel et al., 2015; Lee y Feijen, 2012). Esta técnica se basa en la dispersión de la luz láser a distintas intensidades que se produce debido al movimiento browniano de las partículas cuando se encuentran en solución. Permite la detección de partículas de hasta 2 nm. Se trata de una técnica rápida, simple, sensible y para la que se requiere un mínimo volumen de muestra. Sin embargo, presenta algunas desventajas, ya que las muestras polidispersas son difíciles de interpretar, la comparación entre distintos instrumentos es difícil y se pueden realizar interpretaciones erróneas en caso de agregados (Habel et al., 2015).

Por otro lado, el potencial zeta (ζ) también se puede determinar a través del uso de esta técnica (DLS), mediante la medición de la movilidad electroforética del polimersoma en un capilar de electroforesis (Aghajanzadeh et al., 2018; Lee y Feijen, 2012).

-Dispersión de rayos X o de neutrones

La principal ventaja de estas técnicas es que permiten detectar partículas de hasta 0,5 nm y proporcionan información detallada sobre la bicapa del polimersoma. Sin embargo, su uso se ve limitado debido a la necesidad de contar con instalaciones de radiación a gran escala (Habel et al., 2015).

-Dispersión de luz de flujo interrumpido o stopped-flow (SFLS)

Es una técnica simple únicamente válida para muestras monodispersas. Permite medir la permeabilidad de los polimersomas. La solución de polimersomas se mezcla rápidamente con una sustancia osmóticamente activa, lo que provoca un cambio de volumen en los polimersomas que, a su vez, produce cambios en la dispersión de la luz (Habel et al., 2015).

4.3.2.2. Métodos de visualización

La microscopía óptica y electrónica son las técnicas que más frecuentemente se emplean para la visualización directa de los polimersomas. Permiten la caracterización del tamaño, morfología y homogeneidad.

La microscopía óptica presenta la ventaja de ser una técnica sencilla y con una fácil preparación de las muestras. Sin embargo, sólo se puede utilizar para partículas mayores de 1 μm de diámetro, y la resolución, el aumento y el contraste de las muestras son bastante limitados (Lee y Feijen, 2012).

La microscopía electrónica de barrido (SEM) o la microscopía electrónica de transmisión (TEM) permiten la caracterización con una alta resolución de partículas con un tamaño mayor a 1 nm aunque, para mejorar el contraste, se recomienda secar y teñir las muestras con átomos de metales pesados ricos en electrones. La gran desventaja del uso de la microscopía electrónica es la necesidad de crear condiciones de vacío, lo que puede producir una deformación de la muestra. Para solventar este inconveniente, los polimersomas hidratados se pueden estudiar mediante el uso de TEM criogénico, tras la congelación rápida de la muestra. Opcionalmente, la muestra puede fracturarse para

evaluar la estructura interna del polimersoma. En la Figura 11 se muestran imágenes de estos tres tipos de microscopía electrónica (Habel et al., 2015; Lee y Feijen, 2012).

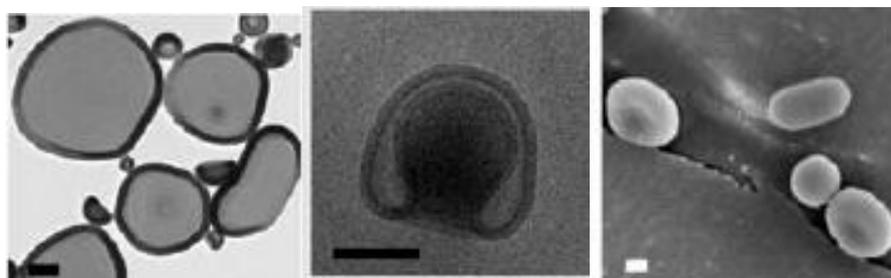


Figura 11. Imágenes de polimersomas (forma de estomatocito) tomadas con distintos tipos de microscopía: TEM (izquierda), TEM criogénico (centro) y SEM criogénico (derecha) (Meeuwissen et al., 2011).

Por otro lado, la microscopía de fluorescencia presenta ventajas con respecto a la microscopía electrónica. El marcaje específico de partes del polimersoma mediante fluorocromos permite obtener información acerca de su posición, además, la tinción múltiple permite detectar la presencia de moléculas individuales en los distintos compartimentos de la vesícula polimérica. Sin embargo, la necesidad de usar fluorocromos también presenta inconvenientes, ya que es necesario realizar los pasos adicionales de mezcla y purificación, lo que puede limitar la utilización de este tipo de microscopía en la caracterización rutinaria de las vesículas poliméricas. Una técnica de microscopía óptica por fluorescencia es la microscopía confocal láser de barrido (CLSM) (Figura 12), que permite obtener cortes ópticos de la partícula, que pueden combinarse para obtener una imagen de la vesícula en 3D (Habel et al., 2015; Lee y Feijen, 2012).

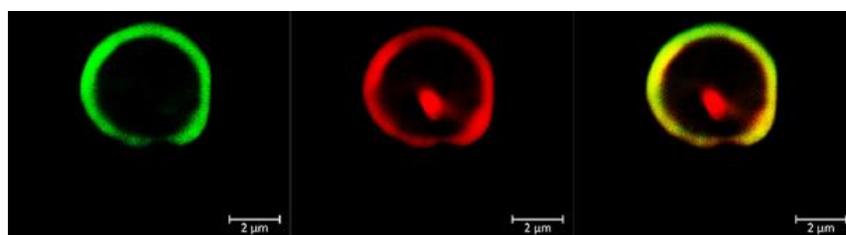


Figura 12. Imágenes de polimersomas observados mediante CLSM. Se observa en la imagen de la izquierda el polimersoma cargado con cumarina, en la imagen central el polimersoma cargado con el fármaco doxorrubicina y, por último, en la imagen derecha el polimersoma cargado con la mezcla de ambas sustancias tras 120 minutos de incubación (Zhu et al., 2017).

4.3.2.3. Manipulación electromagnética y mecánica

Se emplean diversas técnicas de manipulación para la caracterización de polimersomas. Por un lado, una de las técnicas más empleadas rutinariamente en cuanto a la manipulación electromagnética es la microscopía de fuerza atómica (AFM), que permite detectar partículas de hasta 1 nm. Proporciona información sobre el tamaño, las propiedades elásticas y la topografía del polimersoma.

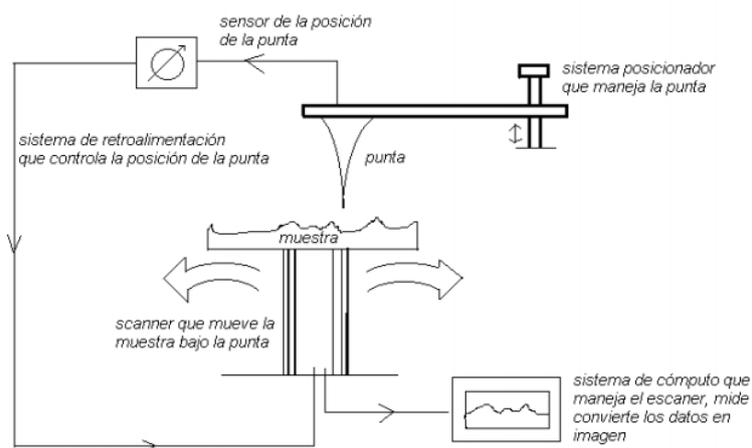


Figura 13. Representación esquemática del sistema de microscopía de fuerza atómica (Reséndiz y Castellón-Uribe, 2005).

La AFM (Figura 13) utiliza un brazo de elevación elástico con una punta microscópica que permite el escaneo de la muestra a una corta distancia utilizando un sensor piezoeléctrico. Al interactuar la punta microscópica con la muestra, el brazo elevadizo se curva y se produce un cambio en la reflexión del láser, lo que permite obtener información topográfica de la muestra. La alta sensibilidad en la punta microscópica permite obtener imágenes de resolución atómica, pero suelen aparecer ruidos de vibración e interacciones no deseadas (Figura 14) (Habel et al., 2015).

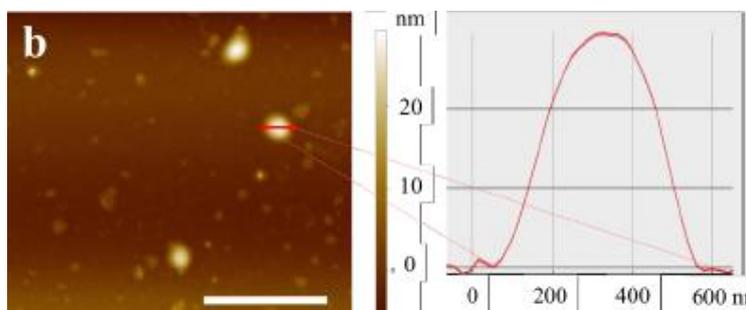


Figura 14. Imagen topográfica de AFM en la que se puede observar que la mayoría de los polimersomas son esféricos (Habel et al., 2015).

Otras técnicas de manipulación electromagnéticas son la resonancia paramagnética electrónica (EPR), resonancia magnética nuclear (RMN) y electroforesis con láser Doppler (LDE), que permiten determinar propiedades de la bicapa tales como laminaridad, polaridad y potencial zeta.

Por otro lado, las técnicas de manipulación mecánica, entre las que podemos destacar el límite elástico o de tracción, aspiración por micropipeta y viscosimetría de esfera descendente, se emplean de manera complementaria a la AFM, pero normalmente están limitadas a polimersomas de tamaño en torno a la micra (Habel et al., 2015).

4.3.2.4. Métodos de separación

En primer lugar, la citometría de flujo (FCM) se emplea para el análisis del tamaño, pero la principal restricción es que la detección de polimersomas con un diámetro inferior a 300 nm es difícil.

En segundo lugar, la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) es, de entre estas técnicas, la que se encuentra mejor establecida y su límite de detección es de 17 nm, aunque su principal inconveniente es que se produce la adsorción del material anfifílico en la columna de cromatografía.

En tercer lugar, el fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (A4F) permite la separación de partículas de un amplio rango de tamaño, pero requiere una preparación elaborada, la instalación es costosa, se requiere calibración y se produce la adsorción de la muestra (Habel et al., 2015).

Todas las técnicas anteriores suelen emplearse en combinación con las técnicas de dispersión de la luz (apartado 4.3.2.1.)

4.3.2.5. Métodos de simulación

Las técnicas de dinámica molecular proporcionan información estructural de la vesícula polimérica, aunque requieren la resolución de cálculos muy elaborados (Habel et al., 2015).

4.3.3. Estudios *in vitro* e *in vivo*

4.3.3.1. Liberación *in vitro*

Los estudios de liberación *in vitro* se suelen llevar a cabo mediante el método de diálisis. Para ello, soluciones del fármaco libre y dispersiones del polimersoma cargado

con el fármaco se introducen en una bolsa de diálisis que se sumerge en soluciones tampón a uno o varios valores de pH. A diferentes intervalos de tiempo se toman muestras del medio de disolución para medir la cantidad de fármaco liberado, habitualmente mediante HPLC o espectrofotometría UV-visible (Nosrati et al., 2019; Zhao et al., 2017).

Como se ha comentado en la introducción, las membranas de los polimersomas pueden responder a diversos estímulos en función de las características de los polímeros que lo conforman. En el caso de polímeros sensibles a pH, los fármacos permanecen encapsulados en los polimersomas durante su circulación en sangre a pH fisiológico (pH 7,4) y se liberan rápidamente al alcanzar el sitio diana, las células cancerosas, debido al carácter ácido (pH 6,5-7,2) del ambiente tumoral (Lee y Feijen, 2012). De ahí el interés de ensayar *in vitro* el comportamiento de liberación de los polimersomas en medios de distinto pH.

En la Figura 15 se puede observar una liberación prolongada del fármaco en la formulación de polimersomas, en comparación con el fármaco libre, y una mayor velocidad de liberación a pH 5, característico del tejido tumoral.

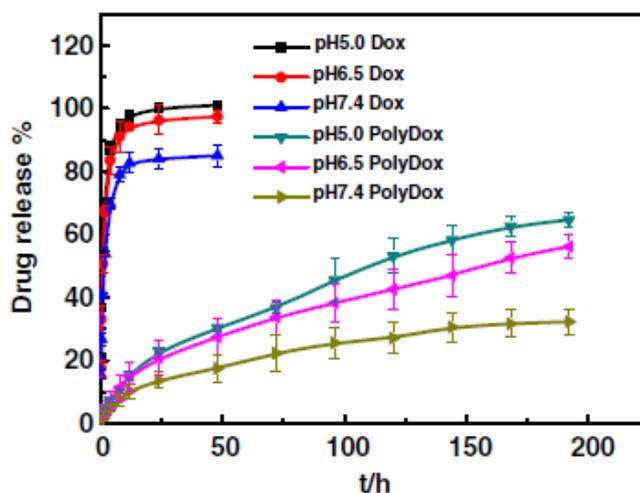


Figura 15. Perfil de liberación *in vitro* de doxorribicina (DOX) libre y encapsulada en polimersomas, a diferentes valores de pH (Zhao et al., 2017).

Otros estímulos que pueden influir en el proceso de liberación del fármaco son, por ejemplo, la temperatura o el potencial de óxido-reducción. Así, algunos polimersomas se mantienen estables a temperatura corporal, pero, al enfriarse, se desensamblan debido a que los polímeros termo-sensibles se vuelven solubles a bajas temperaturas (Lee y

Feijen, 2012). Para evaluar este comportamiento se incuban las soluciones a distintos valores de temperatura (25-37°C) bajo suave agitación (Oroojalian et al., 2018).

En lo que se refiere a las reacciones de óxido-reducción, tanto en los fluidos extracelulares como en los tejidos tumorales se dan condiciones oxidativas, mientras que en los compartimentos intracelulares se dan condiciones reductoras. Los polimersomas elaborados con polímeros sensibles a las condiciones reductoras pueden proteger los fármacos en el entorno extracelular, y liberar su contenido en el interior celular, al ser captados por las células (Lee y Feijen, 2012), este comportamiento de liberación se evalúa mediante el empleo de distintas concentraciones del tripéptido reductor glutatión (GSH) (Anajafi et al., 2016).

4.3.3.2. Citotoxicidad *in vitro*

Para la realización de este tipo de estudios *in vitro* se emplean distintas líneas celulares (HeLa, HUVEC, BxPC-3, MCF-7, A549), que se siembran e incuban a 37°C (5% de CO₂). Posteriormente, se añaden las dispersiones de los polimersomas a estudiar y se vuelven a incubar durante un periodo determinado de tiempo. Por último, se lleva a cabo la determinación del número de células viables utilizando un ensayo colorimétrico, como el ensayo de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Aibani et al., 2018; Lee et al., 2011; Zhao et al., 2017).

4.3.3.3. Farmacocinética y biodistribución *in vivo*

La dispersión de polimersomas se inyecta en animales de experimentación (normalmente, ratones) a los que previamente se induce una clase de tumor. Tras la administración, se toman muestras de sangre a intervalos definidos de tiempo y se analizan parámetros farmacocinéticos como la semivida biológica ($t_{1/2}$), el área bajo la curva (AUC), volumen de distribución y aclaramiento (Lee et al., 2011; Zhao et al., 2017).

Además, los animales se pueden observar mediante diversos sistemas de análisis de imagen que permiten registrar la biodistribución *in vivo* a tiempo real (Aibani et al., 2018; Quadir et al., 2017).

4.3.3.4. Actividad antitumoral *in vivo*

Tras inducir la formación de un tumor en animales de experimentación, normalmente ratones, éstos se dividen en varios grupos. Se procede a la inyección de distintas

soluciones según el grupo de ratones: se requiere un grupo control al que se le administra solución salina; varios grupos a los que se le administra el fármaco libre a distintas dosificaciones y otros grupos a los que se administra el fármaco encapsulado en la vesícula polimérica, también a distintas concentraciones. A continuación, se registra el peso corporal de cada ratón y el tamaño del tumor durante varios días. Por último, se sacrifican los ratones, se extraen los tumores y se estudia el volumen de los mismos y la inhibición del crecimiento tumoral (Quadir et al., 2017; Xu et al., 2014).

4.4. Aplicaciones

En la actualidad, existen numerosos estudios sobre el interés de los polimersomas como sistemas de administración de fármacos en la terapia contra el cáncer (Guan et al., 2015). Se han escogido ejemplos característicos de estos estudios aplicados al cáncer de mama ya que es el tipo de cáncer más prevalente entre las mujeres de todo el mundo, diagnosticándose alrededor de 1,7 millones de casos nuevos cada año. Además, presenta una alta tasa de mortalidad (Aghajanzadeh et al., 2018).

Ahmed et al. (2006) administraron una dosis única de polimersomas biodegradables (PEG-PLA mezclado con PEG-PBD) cargados con doxorubicina (DOX) y paclitaxel (TAX) a la dosis máxima tolerada, para el tratamiento de tumores de mama agresivos y con metástasis. Se obtuvieron vesículas poliméricas con un tamaño de hasta 100 nm (medido por TEM criogénico) tras la aplicación de ciclos de sonicación, congelación-descongelación y extrusión. Los polimersomas mostraron una potente actividad antitumoral de forma rápida y sostenida sin ningún efecto tóxico y un mayor efecto anticanceroso debido a la sinergia de ambos fármacos. Esta terapia de combinación desencadena en la masa tumoral una apoptosis masiva y una mayor supresión del tumor en comparación con el efecto de los fármacos libres, como se muestra en la Figura 16.

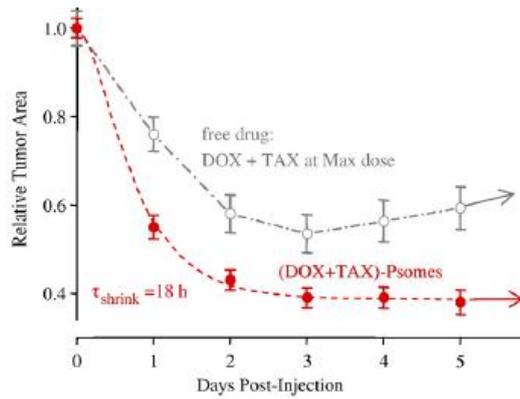


Figura 16. Gráfica que muestra la diferencia entre la utilización de los fármacos libres (color negro) y el empleo de polimersomas (color rojo) en relación con la reducción de la masa tumoral en ratones (Ahmed et al., 2006).

Por su parte, Upadhyay et al. (2010) realizaron un estudio para demostrar la eficacia *in vitro* e *in vivo* de una formulación de polimersomas formados por poli-(γ -bencil-L-glutamato) y ácido hialurónico (PBLG-HYA) y cargados con doxorubicina. El empleo del ácido hialurónico no es solo como polímero hidrófilo, sino que se emplea como ligando para el receptor CD44, que se encuentra sobreexpresado en células cancerosas. Los polimersomas se obtuvieron por nanoprecipitación con un tamaño aproximado de 220 nm (determinado por DLS) y una eficacia de encapsulación del 50%. Además, fueron estables en un amplio rango de pH (3-9).

El perfil de liberación *in vitro* se evaluó a pH 7.4 y pH 5.5, observándose un perfil bifásico, con una liberación inicial de fármaco del 50% en 24h, seguida de una liberación controlada mediante la difusión a través de la bicapa del polimersoma. La eficacia *in vivo* se evaluó en ratas, mostrando los polimersomas una eficacia antitumoral superior a la doxorubicina libre, debido fundamentalmente a su elevada acumulación en las células cancerosas y a la liberación controlada del fármaco (Figura 17).

Por último, se evaluó la cardiotoxicidad, uno de los principales efectos adversos de la DOX, mediante la medición de la producción de enzimas específicas (lactato deshidrogenasa y creatinfosfoquinasa), mostrando un nivel reducido de ambas enzimas con el empleo del fármaco encapsulado en los polimersomas en comparación con el fármaco libre.

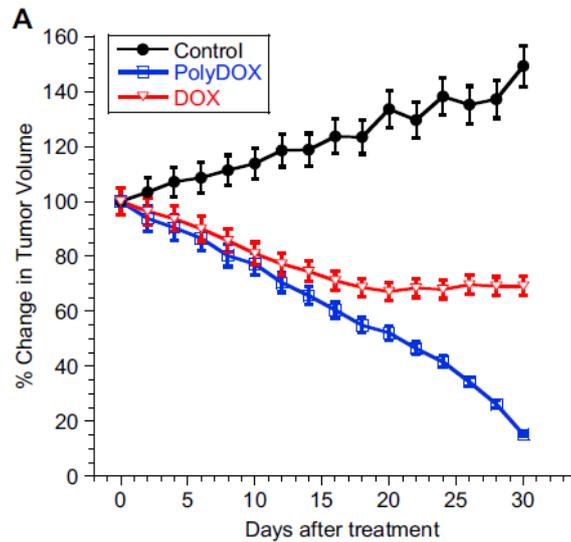


Figura 17. Gráfica que muestra la progresión del volumen del tumor tras la administración del fármaco libre y el polimersoma cargado (Upadhyay et al., 2010).

Alibolandi et al. (2016) también elaboraron, mediante nanoprecipitación, polimersomas formados por un copolímero de dextrano-ácido poliláctico-co-glicólico (DEX-PLGA) y cargados con docetaxel, un agente antineoplásico capaz de producir efectos adversos graves debido a su baja especificidad tisular, lo que dificulta su aplicación en la clínica. Por ello, los polimersomas se conjugaron con folato, lo que aumenta la especificidad hacia las células cancerosas, que sobreexpresan receptores de folato. Mediante DLS y TEM se llevó a cabo la caracterización del tamaño, la distribución de tamaño y la morfología de los polimersomas, observándose partículas esféricas individuales de un tamaño aproximado de 170 nm y con una distribución homogénea. Se obtuvo una alta eficacia de encapsulación del fármaco (79%). Además, la conjugación con folato no supuso una variación significativa en el tamaño, potencial zeta, morfología ni eficacia de encapsulación de los polimersomas.

Los estudios de liberación *in vitro* se llevaron a cabo a pH 7.4, observándose un perfil bifásico, con una liberación brusca, correspondiente al fármaco adsorbido o encapsulado cerca de la superficie del polimersoma, seguida de una liberación continua del fármaco durante 6 días controlada por los mecanismos de difusión y erosión. Los estudios *in vitro* en líneas celulares de cáncer de mama mostraron una mayor acumulación de los polimersomas conjugados con folato, debido a que la endocitosis está favorecida, siendo además estos polimersomas los que demostraron una mayor actividad citotóxica.

Los estudios *in vivo* en ratas demostraron que el empleo de polimersomas conjugados proporciona una mayor potencia terapéutica que aquellos no conjugados o el fármaco libre.

Nosrati et al. (2019) elaboraron, mediante la técnica de doble emulsión por extracción-evaporación del solvente, polimersomas cargados con el fármaco metotrexato (MTX), utilizando para ello un copolímero de polietilenglicol-policaprolactona (PEG-PCL). El tamaño de los polimersomas se midió mediante DLS y fue de, aproximadamente, 47 nm. La técnica AFM permitió observar la morfología esférica y homogénea de estas vesículas (Figura 18).

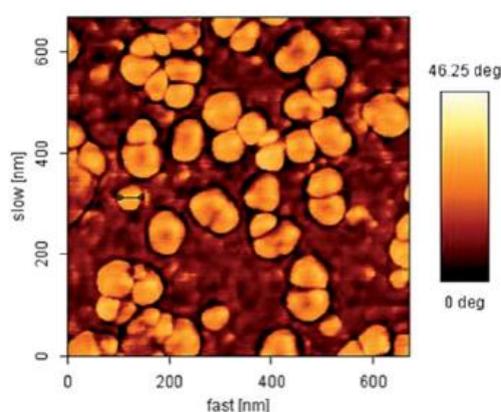


Figura 18. Imagen obtenida mediante AFM (microscopía de fuerza atómica) en la que se observa la morfología de los polimersomas (Nosrati et al., 2019).

Los polimersomas mostraron una liberación más rápida a pH ácido que neutro, debido a que el copolímero se degrada en condiciones ácidas por hidrólisis. Estos polimersomas cargados muestran un perfil trifásico de liberación: se observa una liberación inicial del fármaco contenido en la cubierta de la vesícula, una fase de meseta en la que se produce la migración del fármaco desde el interior de la vesícula a la superficie, y, por último, una tercera fase de liberación sostenida del fármaco. Los ensayos de actividad metabólica *in vitro* mostraron que los polimersomas presentan mayor efecto citotóxico sobre las células cancerosas que el MTX libre.

5. CONCLUSIONES

- Los polímeros empleados en la formulación de polimersomas deben ser biocompatibles y su composición determina las características de la membrana del polimersoma que, a su vez, juega un papel fundamental en el control de la liberación del fármaco.
- La selección del método de elaboración condiciona propiedades como el tamaño y eficacia de encapsulación de los polimersomas. La técnica de nanoprecipitación es una de las más empleadas por su simplicidad, pero la utilización de dispositivos microfluídicos se revela como una técnica prometedora, debido a sus ventajas en el control del tamaño.
- La caracterización del tamaño, forma y propiedades fisicoquímicas de la membrana de los polimersomas es fundamental por su influencia en los mecanismos de transporte al interior celular. Estos parámetros se suelen evaluar a través de una combinación de técnicas, de las cuales las más utilizadas son la dispersión de luz dinámica (DLS), la microscopía electrónica de transmisión (TEM) y la microscopía de fuerza atómica (AFM).
- El comportamiento *in vitro* e *in vivo* de los polimersomas demuestra su utilidad como vehículo de fármacos con potencial en la clínica anticancerosa. Esto se debe principalmente a una mayor regresión tumoral en comparación con la administración del fármaco libre y a una mayor selectividad por el tejido canceroso, lo que conlleva una reducción de los efectos adversos.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Aghajanzadeh M, Zamani M, Rashidzadeh H, Rostamizadeh K, Sharafi A, Danafar H. Amphiphilic Y shaped miktoarm star copolymer for anticancer hydrophobic and hydrophilic drugs codelivery: Synthesis, characterization, *in vitro*, and *in vivo* biocompatibility study. *J Biomed Mater Res. Part A*. 2018; 106(11): 2817-26.
2. Ahmed F, Pakunlu RI, Brannan A, Bates F, Minko T, Discher DE. Biodegradable polymersomes loaded with both paclitaxel and doxorubicin permeate and shrink tumors, inducing apoptosis in proportion to accumulated drug. *J. Control. Release*. 2006; 116(2): 150-8.
3. Aibani N, Nesbitt H, Marino N, Jurek J, O'Neill C, Martin C et al. Electroneutral polymersomes for combined cancer chemotherapy. *Acta Biomater*. 2018; 80: 327-40.
4. Alexis F, Pridgen EM, Langer R, Farokhzad OC. Nanoparticle Technologies for Cancer Therapy. En: Schäfer-Korting M (Ed.). *Drug Delivery. Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol 197. Berlin: Springer; 2010. p. 55-86.
5. Alibolandi M, Abnous K, Hadizadeh F, Taghdisi SM, Alabdollah F, Mohammadi M et al. Dextran-poly lactide-co-glycolide polymersomes decorated with folate-antennae for targeted delivery of docetaxel to breast adenocarcinoma *in vitro* and *in vivo*. *J. Control Release*. 2016; 241: 45-56.
6. Anajafi T, Scott MD, You S, Yang X, Choi Y, Qian SY et al. Acridine orange conjugated polymersomes for simultaneous nuclear delivery of gemcitabine and doxorubicin to pancreatic cancer cells. *Bioconjugate Chem*. 2016; 27: 762–71.
7. Bleul R, Thiermann R, Maskos M. Techniques to control polymersome size. *Macromolecules*. 2015; 48: 7396-409.
8. Brinkhuis RP, Rutjes FPJT, van Hest JCM. Polymeric vesicles in biomedical applications. *Polym. Chem*. 2011; 2: 1449-62.
9. Chen L, Xiao S, Zhu H, Wang L, Liang H. Shape-dependent internalization kinetics of nanoparticles by membranes. *Soft Matter*. 2016; 12(9): 2632-41.
10. Colley HE, Hearnden V, Avila-Olias M, Cecchin D, Canton I, Madsen J et al. Polymersome-mediated delivery of combination anticancer therapy to head and neck cancer cells: 2D and 3D *in vitro* evaluation. *Mol. Pharmaceut*. 2014; 11(4): 1176-88.

11. Danafar H. Applications of copolymeric nanoparticles in drug delivery systems. *Drug. Res.* 2016; 66(10):506-19.
12. Elsevier. Scopus [en línea]. [Consultado en Junio 2019]. Disponible en: <https://www.scopus.com/>
13. Gaitzsch J, Huang X, Voit B. Engineering functional polymer capsules toward smart nanoreactors. *Chem. Rev.* 2016; 116: 1053-93.
14. Guan L, Rizzello L, Battaglia G. Polymersomes and their applications in cancer delivery and therapy. *Nanomedicine.* 2015; 10(17): 2757-80.
15. Habel J, Ogbonna A, Larsen N, Cherré S, Kynde S, Midtgaard SR et al. Selecting analytical tools for characterization of polymersomes in aqueous solution. *RSC Advances.* 2015; 5(97):79924- 46.
16. Hu X, Zhang Y, Xie Z, Jing X, Bellotti A, Gu, Z. Stimuli-Responsive Polymersomes for Biomedical Applications. *Biomacromolecules.* 2017; 18: 649-73.
17. Kita-Tokarczyk K, Grumelard J, Haeefele T, Meier W. Block copolymer vesicles- using concepts from polymer chemistry to mimic biomembranes. *Polymer.* 2005; 46: 3540-63.
18. Lai M-H, Jeong JH, DeVolder RJ, Brockman C, Schroeder C, Kong H. Ellipsoidal polyaspartamide polymersomes with enhancer cell-targeting ability. *Adv. Funct. Mater.* 2012; 22 (15): 3239-46.
19. Lee JS, Ankone M, Pieters E, Schiffelers RM, Hennink WE, Feijen J. Circulation kinetics and biodistribution of dual-labeled polymersomes with modulated surface charge in tumor-bearing mice: Comparison with stealth liposomes. *J. Control. Release.* 2011; 155: 282–8.
20. Lee JS, Feijen J. Polymersomes for drug delivery: Design, formation and characterization. *J. Control. Release.* 2012; 161: 473-83.
21. Leong J, Teo JY, Aakaly VK, Yang YY, Kong H. Engineering polymersomes for diagnostics and therapy. *Adv. Healthcare Mater.* 2018; 7(8): 1701276.

22. Letchford K, Burt H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2007; 65: 259-69.
23. Levine DH, Ghoroghchian PP, Freudenberg J, Zhang G, Therien MJ, Greene MI et al. Polymersomes: A new multi-functional tool for cancer diagnosis and therapy. *Methods.* 2008; 46: 25-32.
24. Lorenceau E, Utada AS, Link DR, Cristobal G, Joanicot M, Weitz DA. Generation of polymersomes from double emulsions. *Langmuir.* 2005; 21: 9183-6.
25. Martin C, Aibani N, Callan JF, Callan B. Recent advances in amphiphilic polymers for simultaneous delivery of hydrophobic and hydrophilic drugs. *Ther. Deliv.* 2016; 7(1): 15-31.
26. Meeuwissen SA, Kim KT, Chen Y, Pochan DJ, van Hest JCM. Controlled shape transformation of polymersome stomatocytes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011; 50(31): 7070-3.
27. Messenger L, Gaitzsch J, Chierico L, Battaglia G. Novel aspects of encapsulation and delivery using polymersomes. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2014; 18: 104-11.
28. Mohammadi M, Ramezani M, Abnous K, Alibolandi M. Biocompatible polymersomes-based cancer theranostics: Towards multifunctional nanomedicine. *Int. J. Pharmaceut.* 2017; 519: 287-303.
29. Nosrati H, Adinehvand R, Manjili HK, Rostamizadeh K, Danafar H. Synthesis, characterization and kinetic release study of methotrexate loaded mPEG-PCL polymersomes for inhibition of MCF-7 breast cancer cell line. *Pharm. Dev. Technol.* 2019; 24(1): 89-98.
30. Oroojalian F, Babaei M, Taghdisi SM, Abnous K, Ramezani M, Alibolandi M. Encapsulation of thermo-responsive gel in pH-sensitive polymersomes as dual-responsive smart carriers for controlled release of doxorubicin. *J. Control. Release.* 2018; 288: 45-61.
31. Prabhu RH, Patravale VB, Joshi MD. Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights. *Int. J. Nanomed.* 2015; 10: 1001-18.

32. Quadir M, Morton SW, Mensah LB, Shopsowitz K, Dobbelaar J, Effenberger N et al. Ligand-decorated click polypeptide derived nanoparticles for targeted drug delivery applications. *Nanomed-Nanotechnol.* 2017; 13: 1797-808.
33. Reséndiz González MC, Castrellón-Uribe J. Microscopio de fuerza atómica. *Encuentro de Investigación en Ingeniería Eléctrica. Centro de Investigación en Ingeniería y Ciencias Aplicadas; México; 17-18 de marzo; 2005.*
34. Robertson JD, Rizzello L, Avila-Olias M, Gaitzsch J, Contini C, Magon MS et al. Purification of nanoparticles by size and shape. *Sci. Rep.* 2016; 6: 27494.
35. Rwei AY, Wang W, Kohane DS. Photoresponsive nanoparticles for drug delivery. *Nano Today.* 2015; 10: 451-67.
36. Su C-W, Chiang C-S, Li W-H, Hu S-H, Chen S-Y. Multifunctional nanocarriers for simultaneous encapsulation of hydrophobic and hydrophilic drugs in cancer treatment. *Nanomedicine.* 2014; 9(10): 1499-515.
37. Thiele J, Abate AR, Shum HC, Bachtler S, Förster S, Weitz DA. Fabrication of polymersomes using double-emulsion templates in glass-coated stamped microfluidic devices. *Small.* 2010; 6 (16): 1723-27.
38. Torchilin VP. Passive and Active Drug Targeting: Drug Delivery to Tumors as an Example. En: Schäfer-Korting M. (Ed.). *Drug Delivery. Handbook of Experimental Pharmacology, Vol 197.* Berlin: Springer; 2010. p. 3-53.
39. Upadhyay KK, Bhatt AN, Mishra AK, Dwarakanath BS, Jain S, Schatz C et al. The intracellular drug delivery and antitumor activity of doxorubicin loaded poly (γ -benzyl L-glutamate)-b-hyaluronan polymersomes. *Biomaterials.* 2010; 31: 2882-92.
40. U.S. National Library of Medicine. Clinical Trials [en línea]. [Consultado en Junio 2019]. Disponible en: <http://www.clinicaltrials.gov/>
41. Xiong X-B, Binkhathlan Z, Molavi O, Lavasanifar A. Amphiphilic block copolymers: Preparation and application in nanodrug and gene delivery. *Acta Biomater.* 2012; 8: 2017-33.
42. Xu J, Zhao Q, Jin Y, Qiu L. High loading of hydrophilic/hydrophobic doxorubicin into polyphosphazene polymersome for breast cancer therapy. *Nanomed-Nanotechnol.* 2014; 10: 349-58.

43. Zhang Y, Chan HF, Leong KW. Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2013; 65: 104-20.
44. Zhao L, Zhang X, Liu X, Li J, Luan Y. pH-responsive poly (ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone)-poly (glutamic acid) polymersome as an efficient doxorubicin carrier for cancer therapy. *Polym. Int.* 2017; 66(11): 1579-86.
45. Zhu D, Wu S, Hu C, Chen Z, Wang H, Fan F et al. Folate-targeted polymersomes loaded with both paclitaxel and doxorubicin for the combination chemotherapy of hepatocellular carcinoma. *Acta Biomater.* 2017; 58: 399-412.