



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Nanopartículas: Permeabilidad selectiva y efecto de retención

Nanoparticles: Enhanced permeability and retention effects

Autor

Simó Llaneras Garcés

Director

José Javier Aramayona Alonso

Facultad de Veterinaria

Curso 2017-2018

ÍNDICE

1.	RESUMEN	2
2.	INTRODUCCIÓN	3
3.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	5
4.	METODOLOGÍA.....	5
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
5.1.	NANOPARTÍCULAS.....	6
5.1.1.	NANOPARTÍCULAS ORGÁNICAS:	7
5.1.2.	NANOPARTÍCULAS INORGÁNICAS:	8
5.1.3.	PROPIEDADES DE SUPERFICIE Y RECUBRIMIENTO	10
5.2.	NANOPARTÍCULAS Y EL CÁNCER	11
5.3.	EFFECTO DE PERMEABILIDAD SELECTIVA Y RETENCIÓN AUMENTADA (EFFECTO EPR). 14	
5.3.1.	FACTORES CELULARES INVOLUCRADOS EN EL EFFECTO EPR	15
5.4.	DIFERENCIAS ANATÓMICAS Y FISIOPATOLÓGICAS DE LA VASCULATURA TUMORAL 16	
5.5.	RECUPERACIÓN DE LAS MACROMOLÉCULAS DESDE EL INTERSTICIO TISULAR: LINFOTROPISMO Y METÁSTASIS LINFÁTICAS.	18
5.6.	AUMENTO DEL EFFECTO EPR. ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS JUNTO A HIPERTENSIÓN INDUCIDA POR ANGIOTENSINA II.....	18
5.7.	REDUCCION DE LA IFP EN TERAPIA ANTITUMORAL	20
5.8.	DISEÑO DE FÁRMACOS MACROMOLECULARES ANTICANCEROSOS	22
6.	CONCLUSIONES	26
7.	VALORACIÓN PERSONAL	28
8.	BIBLIOGRAFÍA	29

1. RESUMEN

Las nanopartículas se definen como estructuras orgánicas o inorgánicas cuyo tamaño se encuentra entre 1-100 nm. Inicialmente, fueron diseñadas como vehículo para vacunas, pero algunas modificaciones han permitido que estas partículas entreguen fármacos a través de la barrera hematoencefálica, penetren profundamente en los tejidos o sean absorbidas por las células de manera eficiente. Las principales modificaciones se dan en las propiedades de superficie y el recubrimiento de las nanopartículas.

La liberación del fármaco y el aclaramiento orgánico son dos de los parámetros principales que deben controlarse, debido a su importancia crítica en una formulación exitosa. Además, la difusión y la descomposición química en la atmósfera del receptor también influyen en su uso terapéutico efectivo. Todas estas características nos han llevado al estudio del efecto de la permeabilidad selectividad y capacidad de retención, el efecto EPR.

Entre las características que se han investigado se encuentra la de producir una liberación selectiva en células tumorales, debido a su propia naturaleza química y a algunas características histológicas típicas del tumor (vascularización, rápido metabolismo, etc.).

ABSTRACT

Nanoparticles are defined as organic or inorganic structures with sizes ranging from 1 to 100 nm. Initially designed as vaccine vehicles, specific structural modifications have allowed it an efficient drug deliver through the blood-brain barrier, deep penetration into tissues or efficient cell absorption. The main modifications are in surface properties and coating of the nanoparticles.

Drug release and body clearance are two of the main parameters to be controlled, due its critical importance in successful formulations. In addition, diffusion and chemical breakdown in the receptor atmosphere may also be investigated to achieve an effective therapeutic use. All these characteristics have led us to study the enhanced permeability and retention capacity shown by nanoparticles, that is to say, the EPR effect.

Among the characteristics conditioning EPR are (a) selective release in tumor cells due to its own chemical nature and (b) histological characteristics of the tumor (vascularization, metabolism, etc).

2. INTRODUCCIÓN

Un gran número de publicaciones en el campo de la farmacoterapia se centran en encontrar tratamientos eficaces y que al mismo tiempo sean capaces de minimizar las reacciones tóxicas, indeseables o secundarias, motivadas por la poca especificidad de los fármacos de las formas de administración convencionales [1]. Este es el motivo por el que debe prevalecer el principio de cautela, la máxima *primum nil nocere*, atribuida a Hipócrates, y que puede traducirse por “lo principal es no hacer daño”. En consecuencia, cuando un clínico valora la aplicación de un tratamiento farmacológico sopesa los beneficios frente a los riesgos que va a suponer la terapia para el paciente, siendo este un tema periódicamente reevaluado.

Los dos enfoques que se siguen para conseguir maximizar los beneficios de un tratamiento son (a) lograr fármacos con una mayor especificidad hacia su diana terapéutica y (b) conseguir vehiculizarlos hacia, y acumularlos en, los tejidos diana a través de formas galénicas especiales. En este último caso, es evidente que, dependiendo del tejido al que se dirijan, los fármacos tendrán una afinidad físico-química determinada. Por ejemplo, un anestésico necesita cruzar la barrera hematoencefálica, por lo que necesariamente será un compuesto altamente liposoluble. Por desgracia, esta última característica también le hará alcanzar fácilmente el tejido graso, y esta afinidad química le dará la capacidad de cruzar otras barreras, como la placenta.

Para evitar esta falta de selectividad se está investigando en el campo de la liberación dirigida de fármacos, buscando sistemas que permitan que el medicamento alcance selectivamente las células diana en las que debe ejercer su acción farmacológica, y que en su búsqueda no interactúe con el resto de células del organismo [2]. Debido a sus propiedades físico-químicas y estructurales, las nanopartículas son un magnífico candidato para lograr estos fines: su tamaño y sus inusuales formas de interacción con las células las convierten en un vehículo óptimo.

Una característica clave a favor del uso de nanopartículas como sistemas de vehiculización dirigida es lo que se ha dado en denominar efecto de permeabilidad selectiva y retención aumentada o efecto EPR (por sus siglas en inglés *enhanced permeability and retention*) que muestran hacia algunos tejidos, como los tumorales [3].

El cáncer continúa siendo una de las principales causas de muerte en el mundo. Desde mediados del siglo XX, la búsqueda de fármacos selectivos para el tratamiento del cáncer se convirtió en uno de los principales objetivos en el campo de la oncología. Esto es debido a que

durante los últimos 50 años los tratamientos contra el cáncer avanzado se han basado en el uso de fármacos de bajo peso molecular, aunque estos no han ofrecido una mejor tasa de curación [4,5]. El principal inconveniente de estos tratamientos es sin lugar a duda la toxicidad que produce en las células sanas del organismo, es decir, su falta de selectividad. El beneficio que aporta la quimioterapia en muchos casos de cáncer, algunos tan comunes como el cáncer de mama o el cáncer de próstata, es escaso en etapas avanzadas de los mismos. La diferencia de esperanza de vida entre pacientes con cáncer de mama sometidos a cirugía y los pacientes tratados con cirugía más los tratamientos de quimioterapia solo difiere en un 2% al 3% [6]. A esto hay que sumar los cuidados añadidos a los pacientes sometidos a quimioterapia anticancerosa como transfusiones de sangre, transfusiones de plaquetas y leucocitos, inyecciones de factores hematogénicos (como EPO), antibióticos u hospitalización del paciente. Todos estos factores además de pérdida de apetito, caída de cabello, entre otros, hace que la calidad de vida del paciente se vea claramente disminuida.

Por otra parte, es cierto que, existen casos de tratamientos contra el cáncer basados en quimioterapia que aumentan sustancialmente la tasa de supervivencia de los pacientes. Por ejemplo, la leucemia linfocítica y la enfermedad de Hodgkin son casos en los que la quimioterapia ha sido realmente efectiva. El cáncer cervical tratado en una etapa temprana ha respondido bien a la cirugía combinada con radioterapia y quimioterapia [7].

De todos modos se ha demostrado que de todos los agentes quimioterapéuticos disponibles en la actualidad, su exposición excesiva y prolongada daña a las células sanas, por tanto, es imprescindible una administración más específica de los fármacos dirigida específicamente a los tumores.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En este trabajo se pretende realizar un estudio del concepto de las nanopartículas y su papel como vehículo de fármacos, centrándose fundamentalmente en el papel que desempeñan en el tratamiento de tumores sólidos gracias, sobretodo, al efecto EPR. Para ello se llevará a cabo una revisión bibliográfica de artículos y documentos a través de las plataformas “Pubmed”, “Medline” y “Science Direct”.

El objetivo principal de este trabajo es conocer mejor este nuevo tratamiento de tumores sólidos gracias al transporte de fármacos por nanopartículas, así como también, entender lo que es el efecto EPR y las ventajas que proporciona. Este método, aún en sus inicios, está probablemente llamado a ser el tratamiento del futuro.

4. METODOLOGÍA

Para realizar este trabajo se han llevado a cabo consultas sobre nanopartículas y sus propiedades en diversos formatos: artículos académicos, revistas y páginas web, entre otras. Debido a que principalmente su uso tiene importancia en medicina humana, gran parte de la información obtenida está basada en resultados obtenidos en humanos. Dentro de los resultados encontrados en animales, la mayoría de ellos son obtenidos de experimentos realizados sobre animales de laboratorio. No obstante, siempre que ha sido posible, se ha buscado información relevante en el campo de la medicina veterinaria.

Primero se ha recopilado información y se ha realizado un estudio de la misma, lo mas completa posible. Posteriormente se han analizado los puntos a tratar, que se han considerado más importantes y relevantes. Finalmente se ha realizado el desarrollo escrito del trabajo, teniendo en cuenta la bibliografía utilizada y marcándola en cada referencia.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. NANOPARTÍCULAS

Los primeros experimentos realizados con nanopartículas en el campo de la farmacología datan del siglo pasado[8] y estaban basados en la modificación de vesículas lipídicas para conseguir vacunas más efectivas. Sin embargo, estos experimentos iniciales no se mostraron muy convincentes, siendo incluso decepcionantes debido al elevado índice de embolias que provocaba su administración. Con el paso del tiempo se han conseguido grandes avances en este campo y, hoy en día, alrededor del 15% de la investigación farmacéutica se dirige a la nanotecnología. Esto supone que se esté abriendo una gran ventana a la investigación de nuevas técnicas y materiales [9].

Existen una serie de factores que optimizan la biodistribución y el aclaramiento para que los resultados sean positivos, en concreto tres: el tamaño, las moléculas de superficie y por último el recubrimiento de las nanopartículas [10].

El tamaño es vital para el éxito de la terapia. Se ha demostrado que moléculas con tamaños inferiores a 10 nm sufren extravasación y rápida filtración por parte de los riñones [11]. Por otra parte, las partículas con tamaños superiores a 100 nm son rápidamente detectadas por el sistema fagocítico mononuclear y eliminadas del torrente sanguíneo [11]. Por tanto, se ha llegado a la conclusión de que las partículas de un tamaño inferior a 100 nm son las ideales para conseguir que permanezca en el torrente sanguíneo el tiempo necesario y que disminuya el efecto primer paso en el hígado.

Las moléculas que recubren la superficie de las nanopartículas, así como sus cargas, es otro factor fundamental para comprender la cinética de las nanopartículas [11]. Se ha demostrado que las partículas con carga positiva provocan una rápida respuesta del sistema inmune mientras que las neutras son capaces de evitar la opsonización. Por último, este recubrimiento es el factor que proporciona las características físico-químicas que determinan su afinidad tisular.

La estructura completa (núcleo y corona) es, por tanto, capaz de proteger los principios activos que albergue consiguiendo reducir la acumulación del fármaco en los tejidos no deseados.

5.1.1. NANOPARTÍCULAS ORGÁNICAS:

Este tipo de nanopartículas cuentan con una gran versatilidad en cuanto a los materiales que pueden formar parte de corona y el núcleo, una elevada capacidad de biodegradación y una capacidad de almacenamiento suficientemente efectiva como para permitir la acumulación del principio activo en cantidades adecuadas [12]. Su gran ventaja reside en que están compuestas de lípidos y polímeros que podemos encontrar de manera natural en el organismo y, por tanto, son altamente biocompatibles [13].

- LIPOSOMAS: Los liposomas son vesículas esféricas de entre 80-300 nm formadas por una bicapa de fosfolípidos y/o triglicéridos rodeando el núcleo acuoso [14]. Pueden interactuar con la célula diana mediante distintos procesos: absorción, fusión, endocitosis o transferencia lipídica.

Estas partículas tienen principalmente tres inconvenientes. En primer lugar, cabe destacar que si el principio activo que transportan es soluble en agua se producen fugas desde el núcleo al torrente sanguíneo, la estabilidad de la bicapa según el entorno puede verse comprometida y, por último, destacar que estos sistemas tienen una baja capacidad de carga en encapsulación [15].

- LÍPIDOS SÓLIDOS: Estas partículas están formadas por una monocapa y un núcleo con una matriz sólida formada por triglicéridos, ceras o una mezcla de glicéridos estabilizados mediante un surfactante [11].

La principal ventaja de estas partículas podría resumirse en que tienen una mayor capacidad de carga y esto evita que se produzcan tantas fugas como en los liposomas [14]. Por otra parte, estas partículas tienden a la gelificación, tienen un alto índice de cristalización y poseen una dinámica a veces impredecible que puede modificar de forma negativa la cinética de liberación del fármaco.

- POLÍMEROS: Son estructuras que pueden ser tanto naturales como sintéticas y que tienen un tamaño de entre 10-100 nm y suelen ir cubiertas con surfactantes neutros para reducir sus interacciones y reducir la activación de la respuesta inmune [11].

Son sistemas biodegradables que, cuando son hidrolizados por el organismo, se descomponen en monómeros. Su manera de actuar con las células dianas es mediante los procesos de difusión, erosión y desorción. Dentro de los polímeros merecen especial referencia los DENDRIMEROS, que tienen una estructura arborescente a partir del núcleo [11]. Además, cuentan con moléculas de superficie y dendrones. Las moléculas

de superficie son las encargadas de determinar las propiedades físico-químicas y la biocompatibilidad de la partícula.

En todos los casos descritos, el fármaco que vehiculizan puede unir a las nanopartículas tanto en el núcleo como en las moléculas de superficie, dependiendo de las características de las mismas. Sin embargo, continúan desarrollándose muchos experimentos que pretenden delimitar sus características cinéticas y que aun limitan en gran medida su aplicación práctica.

5.1.2. NANOPARTÍCULAS INORGÁNICAS:

- CARBÓN: Estructura tridimensional que se pueden dividir en dos tipos: (a) Nanotubos: una o varias capas de grafito con una estructura cilíndrica que le permite poseer una gran superficie de contacto y una alta conductividad térmica y eléctrica. El fármaco se libera por impulsos eléctricos o químicos. (b) Nanocuernos: Estructuras formadas por una única capa de grafito y que tienden a adquirir forma esférica [11].

Los cultivos *in vitro* de células sometidas a altas concentraciones de estas nanopartículas mostraban la formación de radicales oxígeno, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, oxidación de lípidos y cambios en la morfología celular. Estudios más avanzados han comprobado también una ligera tendencia a la agregación plaquetaria.

- SÍLICE: Son compuestos de óxido de sílice con una estructura porosa suspendida en un líquido. Según su estructura las podemos dividir en dos grupos: (a) Xerogeles: es un material amorfo y deshidratado que mantiene la porosidad, pero aumenta la superficie de contacto. Modificando características del entorno podemos lograr cambiar sus características intrínsecas. (b) Mesoporos: este es un material homogéneo que aumenta la capacidad de absorción del principio activo permitiendo así una mayor carga [14]. Se une al fármaco por absorción y libera el mismo por difusión.

Se trata de unas partículas que tienen una alta biocompatibilidad. A pesar de ello se ha demostrado que dependiendo de la relación dosis-exposición se pueden llegar a producir graves efectos tóxicos.

El resto de las nanopartículas inorgánicas están formadas por un núcleo metálico, lo que les otorga a todas ellas propiedades específicas que permiten una liberación del fármaco más precisa gracias al uso de campos magnéticos externos el uso de calor, etc. Su principal

desventaja es que tienden a formar agregados lo cual ocasiona una pérdida de algunas de sus propiedades físico-químicas.

- ÓXIDOS DE HIERRO: La magnetita es una combinación de óxidos que además se produce de forma natural en el organismo. Por tanto este tipo de partículas constarán de una enorme biocompatibilidad. Otras ventajas destacables son su inocuidad, su estabilidad en condiciones fisiológicas y la facilidad de adición de un recubrimiento sobre las mismas para mejorar su eficacia [16].

El principio activo se incorpora por interacción electroestática, adsorción, formación de enlaces covalentes o encapsulación dependiendo del modo que sea más conveniente según el fármaco a transportar. Estas nanopartículas son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica sin producir un aumento de toxicidad. El transporte suele ser activo y depende de su atracción por las células diana que puede ser controlado a través de campos magnéticos externos.

- ORO: Son partículas con un elevado número atómico y métodos de síntesis sencillos. Todo esto permite tener un mayor control sobre el tamaño y la forma deseada. Sin embargo, el oro no es estable como nanopartícula y necesita de pequeñas modificaciones a la hora de su síntesis como podría ser añadir un tiol [17]. Si que es cierto que es la partícula que más espacio está ganando en el diagnóstico por imagen en concreto en el campo de los rayos X [17].
- QUANTUM-DOTS: Son partículas con un núcleo cristalino y metálico cubierto por una corona orgánica. A veces se puede añadir un recubrimiento de Zn que aumenta su capacidad de luminiscencia [18].

Su toxicidad depende de este recubrimiento según varios estudios. De hecho, se ha demostrado que quantum-dots “desnudos” son capaces de inducir la formación de radicales libres de oxígeno dañinos para el organismo [18]. Al ser nanocristales semiconductores con capacidad de fluorescencia, se usan mayoritariamente como marcadores específicos en biopsias y como contraste en técnicas de imagen *in vivo* [18].

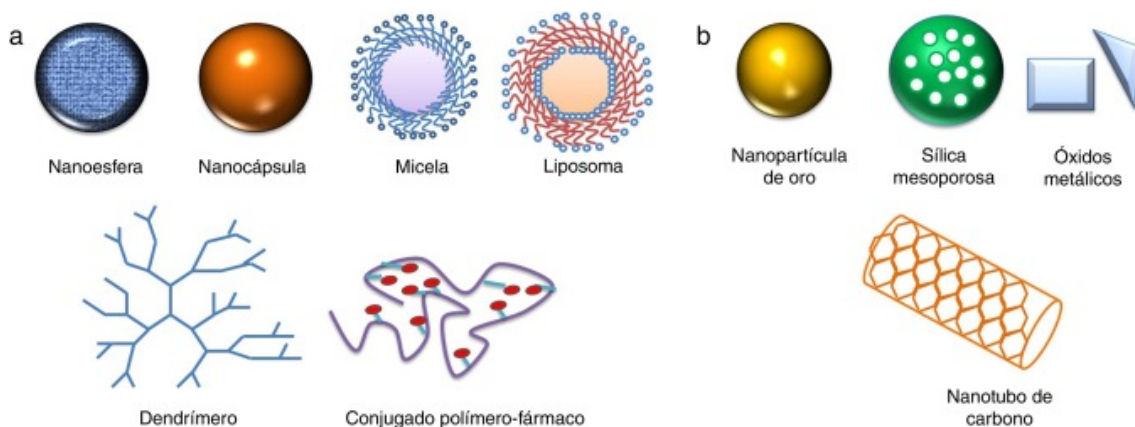


Ilustración 1. Tipos de nanopartículas. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0187893X16300295>

5.1.3. PROPIEDADES DE SUPERFICIE Y RECUBRIMIENTO

Las nanopartículas suelen revestirse con polímeros degradables o surfactantes hidrofílicos para evitar ser reconocidos por sistema retículo endotelial y así evitar activar la respuesta inmune, lo cual sucede con intensidad tras ser administrados vía intravenosa [19]. El polietilenglicol fue el primer polímero de cobertura aprobado por la FDA por su capacidad de hacer invisible a las nanopartículas a la detección de macrófagos y monocitos, aunque hoy en día existen estudios con otro tipo de recubriendo como el quitosano, dextrano y co-polímeros como la povidona que también ha dado buenos resultados. Cuando la corona está constituida por estos materiales el fármaco que alberga la nanopartícula se libera por difusión pasiva. Este es el motivo por el que la mayoría de las terapias basadas en nanofármacos tienen un sistema de liberación pasivo.

Sin embargo, la funcionalización mediante ligando, es decir, la unión a la superficie de la nanopartícula de moléculas capaces de mejorar su biodistribución, se encuentra entre los métodos más prometedores para mejorar la eficacia de los tratamientos con nanopartículas [20]. A la estructura que forma la corona se pueden ligar otras moléculas para otorgar a las nanopartículas de cierta selectividad. Por ejemplo, los anticuerpos y sus fragmentos, gracias a su afinidad y alta especificidad por sus dianas moleculares, se encuentran entre los más prometedores. Los aptámeros son otras estructuras capaces de reconocer compuestos como los azúcares. También se están realizando experimentos con péptidos y pequeñas moléculas de señalización, capaces de realizar esta función de revestimiento.

5.2. NANOPARTÍCULAS Y EL CÁNCER

La patogénesis del cáncer es un proceso multifactorial. Entre las características que la definen se encuentran que sus células son resistentes a la apoptosis, su mayor o menor capacidad para invadir tejidos cercanos y lejanos, ser capaces de evadir las señales celulares de supresión y su capacidad de angiogénesis. Sin embargo, la terapia farmacológica del cáncer se complica por el hecho de que cada tumor presenta características distintivas, por lo que se requieren terapias específicas para cada uno de ellos. A esto se une el hecho de que muchos tumores presentan cierta capacidad de resistencia a los fármacos [21]. Esta resistencia puede ser tanto intrínseca (sensibilidad farmacológica escasa o nula) como extrínseca (alta tasa de mutación celular). Cabe destacar que a estos modos de resistencia hay que unir la idiosincrasia del paciente y las alteraciones patológicas que hayan podido sufrido sus tejidos hasta el momento de iniciar el tratamiento. Los últimos estudios se han centrado en buscar el tratamiento sobre las primeras células en mutar, el origen del tumor [1].

En consecuencia, se hace indispensable que la terapia del cáncer sea multifactorial, es decir, la combinación de los mecanismos de acción de dos o más fármacos en un intento de atacar a las células patológicas desde varios frentes, al mismo tiempo que se minimizan los efectos colaterales de la terapia.

Un problema habitual de este enfoque multifactorial radica en que los fármacos poseen con frecuencia una distribución tisular y un aclaramiento muy diferentes que además pueden verse afectados al ser co-administrados [22]. La vehiculización conjunta de dos o más sustancias en una misma nanopartícula podría ser un enfoque para evitar los problemas que se presentan con la polifarmacia. Diversos experimentos han tratado de proponer combinaciones que sean exitosas, pero aunque los resultados son prometedores, aún son demasiado preliminares para permitir un uso clínico seguro [22]. Por otra parte, se ha demostrado que, para obtener un éxito razonable, las dosis de carga deben ser elevadas.

El efecto EPR (*enhanced permeability and retention*) que muestran los fármacos vehiculizados en nanopartículas representa una gran ventaja al conseguir una distribución dirigida del fármaco ya que permite que partículas con peso molecular pequeño (y que de otra forma se distribuirían sin trabas por todo el organismo) logren llegar al interior del tumor de forma más selectiva [3]. El mecanismo por el que se produce este efecto será descrito con detalle más adelante. Sin embargo, podemos señalar que es debido en gran medida a la peculiar angiogénesis que se produce en las zonas tumorales y que, al ser tan rápida, determina la formación de anomalías en los vasos neoformados [3]. Este hecho, junto a la falta de

drenaje linfático, provoca una circulación anormal de los fluidos creando la oportunidad para que las nanopartículas, junto al fármaco que vehiculizan, se concentran junto a las células diana. Gracias a todos estos factores, se ha demostrado experimentalmente que la concentración de nanopartículas se incrementa, aunque en muchas ocasiones de forma insuficiente para que el tratamiento sea completamente eficaz [23]. Diferentes estudios en modelos animales de cáncer han demostrado una mejora en la evolución de la enfermedad, aunque en la mayoría solo se consiguió una mejoría parcial y transitoria [24].

Para que las nanopartículas puedan tener la posibilidad de acumularse, deben circular por el torrente sanguíneo durante un tiempo significativo, el cual se reduce al ser reconocidos por los sistemas de defensa del organismo. Esta necesidad de permanencia en sangre (un aclaramiento no muy elevado) es el argumento por el cual las nanopartículas recubiertas con PEG y péptidos han adquirido tanta importancia. Se ha demostrado que el grosor de la cubierta y no solo su formulación es un factor importante para conseguir un mayor tiempo de circulación. A menor peso molecular mayor tasa de eliminación por parte del organismo [3].

A partir de estas investigaciones se ha conseguido autorización administrativa para comercializar diferentes formulaciones de nanopartículas recubiertas. A continuación, mencionaremos algunas de ellas:

1. DOXIL® (Liposomas PEG-ilados de doxorubicina): la doxorubicina es un fármaco que permite el tratamiento del sarcoma de Kaposi y tumores ováricos, entre otros. Esta formulación evita, en gran medida, los efectos cardiotóxicos del fármaco, al mismo tiempo que incrementa su tiempo de vida media en plasma.

2. THERMODOX (Liposomas PEG-ilados de doxorubicina sensibles a la temperatura): Similares a los anteriores, se caracterizan por controlar la liberación de fármaco a través de un aumento externo de la temperatura (calor, ultrasonidos, etc).

3. ABRAXANE® (Paclitaxel en micelas de albúmina): La cubierta permite evitar la pre-medicación habitual para evitar los efectos tóxicos.

4. Nanaopartículas de oro: Ya mencionadas anteriormente. Están adquiriendo importancia en el diagnóstico por imagen, aunque se están buscando otros campos de aplicación junto a protocolos de ablación térmica.

5. FERUMOXITOL® (Nanopartículas a base de óxidos de hierro): usados como tratamiento de la anemia, en insuficiencia renal crónica y en técnicas de diagnóstico por

imagen. Es un fármaco que aumenta las reservas de hierro y la respuesta de la hemoglobina.

6. CORNELL DOTS® (Nanopartículas híbridas de sílice): Permiten técnicas de diagnóstico por imagen a tiempo real.

Es significativo el hecho de que algunas de estas técnicas permiten un enfoque multifactorial. Además de incluir un fármaco, buscan su combinación con otras técnicas físicas, como la hipertermia dirigida, la cual se ha demostrado prometedora, dada la mayor sensibilidad al calor de las células tumorales respecto a las células sanas del organismo [25]. La terapia fotodinámica es otro de los tratamientos más innovadores y prometedores [26]. Se basa en conseguir una mayor liberación de fármaco irradiando la zona tumoral con láseres de infrarrojo cercano, capaces de excitar a las nanopartículas pero invisibles a los tejidos corporales. Para esta terapia los Quantum-Dots y las nanopartículas de oro, se han mostrado especialmente prometedores [17,18].

Sin embargo, no toda la comunidad científica está a favor del uso de estas partículas como tratamiento de algunas enfermedades, ya que existen sólidos argumentos en contra, como los siguientes [27]:

1. El efecto EPR de las nanopartículas proporciona facilidad de vehiculización para llegar a las células tumorales, pero también es cierto que no evitan por completo la posibilidad de paso a través de los capilares de tejido sano.
2. Los ligandos de superficie no han sido todo lo efectivos que se esperaba dejando a la nanopartícula circular por torrente sanguíneo sin el control necesario. Las nanopartículas son un buen vehículo, pero tiene que estar bien dirigido para ser efectivo.
3. Al fin y al cabo, son sustancias extrañas para el organismo y van a ser eliminadas por el sistema retículo endotelial, por lo que la mayor concentración final lograda ha sido el 5% de la dosis administrada por vía intravenosa.

A parte de estos argumentos, ciertos e irrefutables, el principal problema de esta técnica de tratamiento es que no se conoce con exactitud la toxicidad a muy largo plazo de las nanopartículas por lo que se aboga por diseñar test específicos para las curvas de biodistribución, sobre todo para fármacos que sean capaces de atravesar la barrera hematoencefálica [24]. Para ello, se ha propuesto seguir un esquema que incluye cuatro categorías, para definir la toxicidad de estas partículas sobre las células sanas: endocitosis, toxicidad producida por el fármaco vehiculizado, biodegradación y lisis de la partícula. Dado que, en el momento

actual, estos puntos aún se encuentran en el terreno de la investigación y dadas sus posibles consecuencias a largo plazo, la solución actual es aplicar el principio de cautela.

5.3. EFECTO DE PERMEABILIDAD SELECTIVA Y RETENCIÓN AUMENTADA (EFECTO EPR)

Para poder entender el concepto del efecto EPR es necesario tener una idea básica del entorno, la estructura y el funcionamiento de las células tumorales y saber qué diferencia a estas de las células sanas en lo que se refiere a la circulación de sustancias a través de su estructura vascular.

Las células tumorales, en sus primeros estados de desarrollo, captan los nutrientes necesarios para crecer por difusión pasiva hasta que alcanzar un tamaño de 2 mm^3 [28]. Posteriormente, desarrollan nuevos vasos sanguíneos para seguir con su expansión. Este proceso se conoce como angiogénesis. La angiogénesis tumoral no es un proceso ordenado por lo que en los tumores sólidos se forman áreas poco vascularizadas, con necrosis resultante. Por el contrario, otras regiones del mismo tumor están dotadas de una excelente vascularización. Es importante destacar que estos vasos tumorales son anormales y tortuosos. Además, cuentan con una deficiente membrana basal por la cual se producen fugas [29]. Todos estos factores proporcionan una permeabilidad aumentada para el paso de moléculas de pequeño tamaño a través de estas fugas. El tamaño de estas brechas entre las células endoteliales varía entre 100 y 780 nm [30-32].

El intersticio tumoral está constituido por una red de colágeno y un fluido gelificado, con altas presiones intersticiales que ofrecen resistencia al flujo interno de moléculas. El transporte de fármacos al intersticio depende de dicha presión intersticial y de las características del propio fármaco, es decir, del tamaño del fármaco, de su configuración espacial, de su naturaleza hidrófoba y de su carga eléctrica.

Como ya se ha comentado, la presión intersticial del estroma tumoral es más elevada que la externa [23]. Si a esto se suma el hecho del deficiente drenaje linfático con el que cuentan la conclusión es que los fármacos tienen problemas para acceder al intersticio, aunque, a su vez, las moléculas que consiguen acceder pueden tener tiempos de retención más extendidos dentro del tumor. El tamaño de las nanopartículas es suficientemente elevado como para conservar su capacidad de paso hasta el estroma tumoral y por otra parte, al ser mucho mayor que los fármacos desnudos, muestran una capacidad de retención aumentada con respecto a ellos. Esta

característica es la que se conoce como efecto de permeabilidad selectiva y retención aumentada (EPR) que favorece la acumulación intersticial de nanopartículas [3,33].

Para que una nanopartícula o cualquier transportador de fármacos puede llegar al interior de las células tumorales debe encontrar las fenestraciones de los vasos sanguíneos del tumor de forma aleatoria. Por otra parte, su acumulación puede verse dificultada por la presión hidrostática del interior del tumor que ejerce una fuerza hacia el exterior del mismo. Para evitar estos problemas es por lo que se le otorga tanta importancia al tiempo de permanencia de las nanopartículas en plasma, su tiempo de circulación, ya que aumenta la probabilidad de que las partículas encuentren esas vías de entrada. Durante el tiempo de circulación el fármaco debe permanecer mayoritariamente ligado a su transportador, la nanopartícula, ya que una liberación temprana del mismo no permitiría que el fármaco llegara al destino que se busca. Otro problema a resolver es que, dado su tamaño macromolecular, las nanopartículas se aglomeren en la entrada de las fenestraciones, lo que ocasionaría el colapso en la zona de entrada [24].

Maeda et al. [34,35] fue el descubridor de la diferencia que existe entre la captación de fármacos por parte del tumor en función del peso molecular de estos fármacos. Concretamente consiguió demostrar esa diferencia con el fármaco macromolecular SMANCS en tumores sólidos. Este descubrimiento tuvo lugar mientras estudiaba el comportamiento in vivo de la proteína antitumoral antibiótica neocarzinostatina y su polímero conjugado SMANCS. Posteriormente, se han realizado muchos estudios e investigaciones sobre el efecto EPR. En estos estudios se ha llegado a demostrar que, para mostrar el efecto EPR, una sustancia debe tener un peso molecular capaz de esquivar el umbral de la excreción renal, es decir, mayor a 40kDa.

5.3.1. FACTORES CELULARES INVOLUCRADOS EN EL EFECTO EPR

También se demostró la generación de bradiquina por parte de proteinasas bacterianas a través de la activación del factor XII seguida de la activación de prekallikreina a kallikreina, que libera bradykinina de kininogeno. La bradiquina es un péptido que induce la permeabilidad vascular y es vital en el efecto EPR. Así pues, en los sitios donde hay una infección/inflamación, que es el lugar donde se forma un exceso de bradiquinas, también existe el efecto EPR [36]. La diferencia entre el efecto EPR inducido por una inflamación y el que se produce en las células tumorales radica en la duración del tiempo de retención. Esta diferencia de duración de tiempo de retención es debido a que los tejidos normales tienen un sistema linfático activo que se ocupa del drenaje, mientras que en los tejidos cancerosos está ausente. Este hecho permite que los fármacos macromoleculares queden retenidos en el tejido canceroso mucho más tiempo que

en un tejido únicamente inflamado [34,37]. Todo ello, ha permitido remarcar la importancia del sistema vascular no solo en el crecimiento tumoral sino también en la administración selectiva de fármacos.

El efecto EPR, por tanto, es un fenómeno de extravasaciones mejoradas de macromoléculas y posterior retención en vasos y tejidos tumorales que no se da en los lechos vasculares normales.

Otros mediadores vasculares están implicados en el efecto EPR, además de la bradiquina. Por ejemplo, el óxido nítrico (NO). Dvorak et al. [38] identificaron como factor de permeabilidad vascular a las prostaglandinas y al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). A continuación, se presenta un resumen de los factores que facilitan el efecto EPR:

- (1) Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF / VPF).
- (2) Bradiquinina / 3-hidroxipropil bradiquinina (BK).
- (3) Óxido nítrico (NO).
- (4) Peroxinitrito (un producto de reacción de los superóxidos, radicales aniónicos y NO).
- (5) Prostaglandinas (PG).
- (6) Metaloproteinasas de matriz (MMP).
- (7) Otras proteinasas (por ejemplo, sistema de cinina / calicreína) que involucran varias proteasas en cascada.
- (8) Otras citoquinas (por ejemplo, factor de necrosis tumoral, IL-2 y TNF- α).

5.4. DIFERENCIAS ANATÓMICAS Y FISIOPATOLÓGICAS DE LA VASCULATURA TUMORAL

Mediante microscopía electrónica de barrido se ha llegado a observar las grandes diferencias anatómicas que existen entre la estructura de los vasos sanguíneos tumorales y los vasos sanguíneos normales usando un modelo murino portador de tumores. En este sentido, Hashizume et al. [39] observaron este fenómeno en carcinomas mamarios de ratón usando dichas técnicas. Además, también se detectaron anomalías de la estructura del endotelio vascular de los vasos sanguíneos tumorales. Este endotelio presenta aperturas intercelulares con un diámetro mucho mayor que el de los vasos sanos. El tamaño promedio de estas fenestraciones intercelulares en los capilares endoteliales normales es de 1.7 micrometros, mientras que los descritos por Hashizume tenían un diámetro de 4.7 micrometros. En otro estudio se determinó el tamaño de los poros en los vasos del adenocarcinoma de colon humano

implantado en ratones SCID, que llegaron a medir 4 micrometros de diámetro. Estos estudios evidencian que la arquitectura vascular anormal de los tumores desempeña un papel fundamental en la permeabilidad excesiva que se observa en estas zonas.

En resumen, el efecto EPR que se da en los tumores y que se relaciona con la permeabilidad aumentada de fármacos macromoleculares a nivel tisular puede resumirse como:

1. Angiogénesis extensa y alta densidad vascular (hipervascularización).
2. Falta de capa de músculo liso, sin vasoconstricción.
3. Arquitectura vascular defectuosa.
4. Flujo sanguíneo caprichoso (no hay un flujo y ni una dirección de sangre constantes).
5. Aclaramiento linfático exiguo que conduce a una mayor retención de fármacos macromoleculares y partículas lipídicas en el intersticio de los tumores.
6. Retorno venoso lento que conduce a la acumulación de fármacos macromoleculares y partículas lipídicas en el intersticio del tumor.

La mayoría de los polímeros solubles en agua pueden lograr el efecto EPR tras ser infundidos por vía intravenosa, vista la relación entre su concentración en el tumor y en sangre (relación T/S) que varía entre 5 y 30 [37-40]. El efecto EPR puede evidenciarse a los 10 minutos tras el inicio de la infusión [41]. La mayoría de fármacos macromoleculares muestran un prolongado tiempo de circulación en plasma y un aclaramiento renal muy bajo.

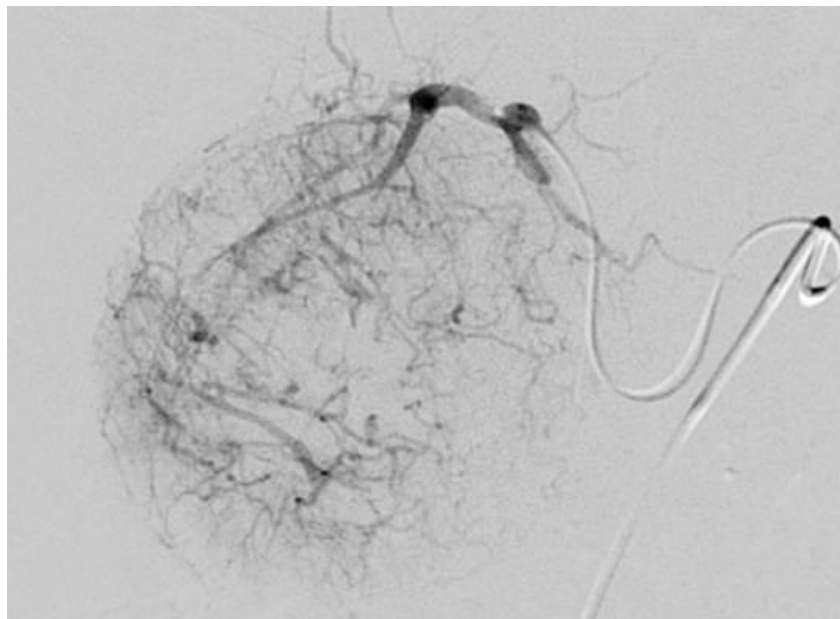


Ilustración 2. Angiograma (hígado) de la vasculatura tumoral que ilustra un tumor muy vascularizado. https://www.rocheplus.es/content/dam/hcp-portals/spain/documents/landing/Jornadas-Residentes/1.%20Angiogenesis_Sept2017.pdf

5.5. RECUPERACIÓN DE LAS MACROMOLÉCULAS DESDE EL INTERSTICIO TISULAR: LINFOTROPISMO Y METÁSTASIS LINFÁTICAS.

El sistema linfático es el encargado de recuperar las macromoléculas o lípidos cuando estas alcanzan en el espacio intersticial; se puede decir que es el modo de depuración del que están dotados los tejidos sanos. Por desgracia, esta es la ruta por la que también se producen las metástasis linfáticas. La propiedad linfotrópica de los lípidos se puede apreciar claramente, como demostró Maeda et al. [42-44], al introducir por vía subcutánea SMANCS (16kDa, mediante la unión de albúmina a 80 kDa). Este fármaco macromolecular se acumuló primero en los ganglios linfáticos regionales para, posteriormente, ir pasando lentamente a la circulación general. La metástasis linfática de los tumores es la causa más frecuente de fallo terapéutico, motivo por el que se investiga en el diseño de nuevos fármacos para la supresión linfática.

El principal efecto de las terapias antitumorales, como la quimioterapia o la cirugía, es sobre el tumor en sí. No obstante, y por lo explicado anteriormente, es de vital importancia que la metástasis no pueda avanzar. Para ello, la administración de fármacos linfotrópicos podría lograr la supresión de la vía linfática por la que progresa la metástasis y así evitar el avance del cáncer en el paciente. Con esto no se consigue una regresión del cáncer, pero sí que se detenga el avance que, en un cáncer maligno, puede llegar a ser fatal [45].

5.6. AUMENTO DEL EFECTO EPR. ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS JUNTO A HIPERTENSIÓN INDUCIDA POR ANGIOTENSINA II

Como se ha comentado en apartados anteriores, la densidad vascular presente en muchos tumores, si no en todos, es mayor que la de los tejidos normales. Además, los vasos sanguíneos tumorales frecuentemente carecen de la capa de músculo liso, que desempeña un papel vital en la regulación de la presión arterial y el volumen sanguíneo [23]. En los vasos sanguíneos normales, la capa de músculo liso responde a mediadores vasculares, como las bradicininas, la acetilcolina y el NO, a través de su unión a receptores presentes en las células musculares de la pared vascular, que modulan los niveles de calcio intracelular, lo que ayuda a mantener un volumen constante de flujo sanguíneo. En tejidos normales, cuando la hipertensión se induce mediante la infusión de angiotensina II, por vía intravenosa, la vasoconstricción de la capa de músculo liso produce una presión arterial más alta y también una velocidad de flujo más alta. Sin embargo, curiosamente, el flujo sanguíneo permanece constante [46]. En contraste, en tejidos tumorales bajo estado de hipertensión inducido por angiotensina II, el flujo no

permanece constante. En el tumor, el flujo sanguíneo en realidad aumenta en respuesta a la presión arterial elevada. En ratas portadoras de tumores, el aumento de la presión sistólica de 90 a 160 mmHg produjo un aumento de casi 2 a 6 veces el volumen del flujo sanguíneo del tumor, dependiendo de la presión arterial alcanzada, mientras que el volumen sanguíneo en tejidos normales como el riñón o la médula ósea se mantuvo constante [46]. Por tanto, la inducción de un estado de hipertensión debería aumentar el efecto EPR y, en consecuencia, la acumulación de fármacos macromoleculares.

La presión intersticial de los tumores es mayor que la de las estructuras sanas del organismo, siendo un factor limitante del efecto EPR, ya que dificulta el paso de moléculas al interior del tumor. Young et al., 1950 [47], informó que la presión hidrostática tumoral está a menudo aumentada. Jain, 1987 [48,49], planteó la hipótesis de que la presión osmótica en los tumores debía ser alta y que la alta presión del líquido intersticial del tumor se convertiría, en consecuencia, en una barrera para el suministro eficaz de fármacos. Hoy en día ya no es tema de debate el hecho de que en la mayoría de tumores sólidos la presión intersticial está aumentada. Esta presión del líquido intersticial (IFP) es uniforme en el centro del tumor y más baja en la periferia del mismo [50,51]. El por qué se desconoce con exactitud, aunque se postula que, probablemente, esté condicionado por las anomalías tanto en los vasos sanguíneos como en los vasos linfáticos y por una contracción del espacio intersticial mediada por la presencia de fibroblastos en los estromas [45].

Las moléculas grandes, como las proteínas, fluyen por el intersticio gracias a un modo de transporte llamado convección [52], en cambio las moléculas de bajo peso molecular lo hacen por difusión (por gradiente). El aumento de la IFP provoca una disminución del transporte transcápilar. Por tanto, se puede afirmar que es un obstáculo para el tratamiento del efectivo del cáncer, ya que reduce la eficacia terapéutica de los medicamentos dada la dificultad que tienen para llegar a su destino.

En resumen, las razones por las que aumenta la presión intersticial en tumores son las siguientes:

1. Vasos sanguíneos y linfáticos defectuosos.
2. Estromas reactivos: Tienen una contractilidad similar a la de los fibroblastos, tienen una composición modificada de la matriz extracelular, una mayor densidad de micro-vasos, fibroblastos con un fenotipo activado y también hay una infiltración de células inflamatorias.

3. Se liberan varias citoquinas como el PDGF, el TGF β y el VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular).

Además, los vasos de las células tumorales se contraen, lo cual reduce el flujo [53,54]. La producción de VEGF se ha demostrado que consigue aumentar la permeabilidad vascular [38]. Esta permeabilidad aumentada provoca que se extravasen proteínas y otras moléculas produciendo un aumento concomitante de la presión osmótica coloidal del intersticio.

Normalmente, en los tejidos sanos, estas variaciones de la IFP se compensan con cambios de volumen del tejido, por ejemplo, formando edemas. Sin embargo, en los tumores estos cambios están más restringidos debido, probablemente, a la red más densa de su tejido conectivo. Es muy probable que esto contribuya a la persistencia del aumento de la IFP de algunos tumores.

5.7. REDUCCION DE LA IFP EN TERAPIA ANTITUMORAL

La IFP tumoral se contrapone a una captación eficaz de agentes terapéuticos, por lo que se hace necesario encontrar la manera de aumentar el transporte transvascular. Se ha demostrado que, en ciertos modelos animales, la infusión de angiotensina II aumenta la presión sanguínea sistémica que, a su vez, se traduce en un aumento de la presión hidrostática en los capilares y, por consiguiente, un aumento en el gradiente de presiones frente al intersticio [55]. En este sentido, se ha demostrado que varios tipos de tratamiento disminuye la IFP tumoral en modelos animales y pacientes humanos. Estos fenómeno se observa tras la administración de inhibidores VEGF, inhibidores PDGF, inhibidores TGF β , dexametasona o la nicotinamida, entre otros [23].

En un estudio en el que se inyectó albúmina marcada con ^{51}Cr en ratas con carcinoma Walkar-256 y se elevó la presión arterial de 90 a 150 mmHg durante solo 15 minutos se observó que hubo un aumento de 1,3 a 3,0 veces la acumulación de los fármacos macromoleculares en el tejido tumoral [56]. Además, también se observó una reducción de la concentración en tejidos sanos de los fármacos administrados, es decir, se redujo significativamente la toxicidad debido a la vasoconstricción y al estrechamiento de las uniones intercelulares del endotelio, lo que suprimió la extravasación de los polímeros.

En quimioterapia antitumoral no se aconseja la administración de dosis mayores de las recomendadas debido a la toxicidad que producen los agentes anticancerosos por su extravasación hacia los tejidos sanos debido a su bajo peso molecular. Sin embargo, con el

estado de hipertensión se ha conseguido poder aumentar la concentración de fármacos macromoleculares en los tumores de modelos animales de 1,3 a 5,0 veces con la misma dosis. Teniendo en cuenta todas estas ventajas, el uso de la angiotensina II para aumentar la presión arterial y así la concentración de fármaco en las células tumorales puede ser una vía para mejorar los índices de seguridad en la quimioterapia anticancerosa [23]. Este sistema de administración ya se ha aprobado en Japón para medicamentos convencionales, pero aún no para nanofármacos.

La hiperproducción de mediadores vasculares como el factor de crecimiento endotelial, bradiquina o prostaglandinas, entre otros, se sabe que ayuda mucho a conseguir esta hiperpermeabilidad en las células tumorales [57-60]

El efecto EPR se basa principalmente en dos características. La primera es la biodistribución alterada por la que el fármaco transportado en partículas de tamaño nanométrico muestra una acumulación diferencial en los tejidos tumorales. Este efecto depende en gran medida del tiempo de circulación y del tamaño de la nanopartícula (de 40 a 800 kD). La segunda característica es el aumento de vida media en el plasma de los nano fármacos, ya que gracias a su tamaño son capaces de evitar en gran medida las vías de excreción renal ya que exceden el umbral de filtrado, lo que limita su eliminación. El resultado de estos fenómenos es conseguir un efecto prolongado del fármaco, además de una distribución orientada del mismo [24].

En resumen, el efecto EPR es un fenómeno pasivo. No obstante, puede ser aumentado activamente con el uso concomitante de otras técnicas que modifican favorablemente características específicas de la vasculatura tumoral. En este sentido, Greish K. et al. [61], recopilaron en un artículo algunas de estas técnicas:

1. Hipertensión: En los vasos sanguíneos no tumorales la capa de músculo liso responde a los mediadores vasculares (acetilcolina y bradiquina entre otros), lo cual ayuda a mantener un flujo sanguíneo constante. La infusión de angiotensina II durante 15 minutos aumentó la presión arterial sistólica de 100 a 150 mmHg en ratas con tumores, causando un aumento selectivo de 2 a 6 veces en el flujo sanguíneo tumoral. En cambio, en los tejidos normales, la presión sanguínea se mantuvo constante [62].

2. Bradicinina: Se ha demostrado que algunos tumores sólidos expresan altos niveles de receptores Bk involucrados en la acumulación de fluido ascítico y pleural [57-59]. La bradicinina se degrada, sobre todo, por la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Así pues, los inhibidores de la ECA provocan un aumento de los niveles de BK en

el tumor. A partir de este hecho, se han usado algunos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (iECAs), enalapril y temocapril, para inhibir la degradación de BK. Con esto se logró aumentar los niveles de BK en el tumor y una mejora del efecto EPR [63].

3. Óxido nítrico (NO): El NO es esencial para la angiogénesis, la proliferación celular y el efecto EPR. En consecuencia, la inhibición de los fármacos estimulantes de la formación de NO suprimen el crecimiento tumoral [57,58,60]. Greish K. utilizó el efecto vasodilatador del NO para aumentar la difusión tumoral de fármacos vehiculizados en nanopartículas.

4. Terapia fotodinámica: Cuando se administra un fotosensibilizador por vía sistémica o localmente y luego se activa por iluminación con luz visible, esto lleva a la generación de especies reactivas de oxígeno. Este efecto tiene un papel activo en la mejora de la permeabilidad vascular del tumor [61]. Se demostró que la fotosensibilización provoca que se retraigan las células endoteliales y se produzcan brechas intercelulares, lo que provoca una mayor permeabilidad vascular.

5.8. DISEÑO DE FÁRMACOS MACROMOLECULARES ANTICANCEROSOS

El diseño de los fármacos macromoleculares que utilizan el efecto EPR para el tratamiento contra el cáncer es objeto de investigación desde hace años. Este diseño consta de un núcleo y un conjugado o revestimiento químico con polímeros que recubren el fármaco. Los polímeros deben ser solubles en agua para ser biocompatibles y biodegradables [16,64]. El punto crucial de todos ellos es que deben ser capaces de liberar el fármaco en el momento idóneo y con la concentración adecuada. Así pues, si son demasiado estables y liberan el fármaco en un tiempo incorrecto o no liberan la cantidad adecuada en el tiempo requerido no cumplen su función. Por otro lado, deben ser lo suficientemente estables como para soportar el período de almacenamiento del fármaco previo a uso clínico. Todo esto significa que la combinación del fármaco y el polímero de recubrimiento es un factor importante para tener las características adecuadas.

En consecuencia, el uso en nanomedicina de polímeros conjugados con fármacos presenta una serie de ventajas:

1. Aumento del tiempo de vida media, y antigenicidad reducida, o, dicho de otra manera, un aumento de la invisibilidad frente al sistema retículo endotelial. La conjugación con polímeros aporta tres ventajas principales a los fármacos “desnudos”:

a. Aporta estabilidad y prolonga la vida media en el plasma de los fármacos de bajo peso molecular. Por ejemplo, el SMANCS (un conjugado de SMA y neocarzinostatina) muestra este carácter, así como también lo muestra la bilirrubina oxidasa conjugada con polietilenglicol, entre otros [35].

b. Aporta solubilidad a compuestos insolubles en agua de bajo peso molecular.

c. En condiciones específicas, los conjugados poliméricos aportan al fármaco una propiedad de “sigilo” que les permite evitar ser captados por el sistema reticuloendotelial o por los macrófagos. Esto permite que se alargue su vida media en circulación sanguínea [65].

Además de todas estas ventajas que hacen que mejore la eficacia terapéutica consiguen reducir la frecuencia de las inyecciones y reducen el costo del tratamiento.

2. Modificación de la respuesta biológica o inmuno-potenciación. Algunos conjugados poliméricos, como SMANCS, por ejemplo, mostraron propiedades inmunomoduladoras, incluida la activación de macrófagos, la inducción de la producción de interferón- γ [66-68] y el aumento de células NK esplénicas y peritoneales [68]. Por tanto, estas macromoléculas son capaces de estimular citotoxicidad no específica en ratones portadores de tumores.

3. Resistencia a radicales libres, degradación proteolítica, capacidad de quelación de metales y lubricación de la superficie. Muchas proteínas, enzimas, ácidos nucleicos y fármacos activos pueden inactivarse o modificarse fácilmente si se ven expuestos a radicales libres, como el radical aniónico superóxido O_2^- o el hipoclorito (HClO), entre otros [69-72]. Las lesiones inflamatorias y patológicas, incluido el cáncer, se encuentran constantemente expuestas a estos radicales. Para ello la conjugación con polímeros micelares confiere a los fármacos una estabilidad frente a estos radicales libres. Un ejemplo es la superóxido dismutasa (SOD), que cataliza la dismutación del radical aniónico superóxido O_2^- a H_2O_2 . Si la catalasa no está disponible en el medio, el H_2O_2 se acumula en la lesión. También confiere resistencia a la degradación proteolítica sin afectar demasiado a la actividad biológica como se demostró con la bilirrubina conjugada con PEG, que se vuelve más resistente a la degradación proteolítica que la bilirrubina no conjugada [42,73].

4. Mejora de la solubilidad, distribución celular, absorción intestinal y estabilidad física. Muchos fármacos potencialmente útiles para el tratamiento de distintas enfermedades no acaban convirtiéndose en agentes terapéuticos debido a su escasa solubilidad en agua. Además del aumento del tiempo medio de vida media y el efecto EPR, la encapsulación de fármacos con polímeros mejora su solubilidad. Ejemplos de ello son fármacos como el taxol o el caplitaxel. Otro efecto que se observa con la encapsulación es que muchas proteínas y fármacos escasamente absorbidos por vía intestinal se convierten en fármacos oralmente activos al combinarlos con una formulación oleosa [74]. Una de estas formulaciones es SMANCS en solución de triglicéridos de cadena media (MCT). Un estudio demostró que la concentración plasmática de SMANCS oleoso administrado vía oral fue aproximadamente once veces mayor que la de SMANCS acuoso. La estabilidad de SMANCS oleoso también se vio mejorada notablemente y, por tanto, su tiempo de vida medio en plasma [75].

Otra forma de aumentar las posibilidades de que el fármaco sea capaz de cruzar la barrera hacia el interior del intersticio tumoral desde la circulación sanguínea es mediante la internalización mediada por el receptor con un ligando marcado, basado en el efecto EPR. Un ejemplo de esto es el copolímero doxorubicina-HPMA (2-hidroxipropil metacrilamida) que contiene galactosa con afinidad elevada hacia el tejido hepático [75-77]. Los complejos antígeno-anticuerpo son capaces, debido a su mayor peso molecular, de provocar el efecto EPR y alcanzar el objetivo de acceder con mayor facilidad a las células tumorales tras sufrir endocitosis. Las células tumorales en división tienen una mayor capacidad de captación endocítica que las células normales [78], lo cual es una ventaja para los fármacos macromoleculares.

5. Resistencia múltiple a fármacos múltiple dependiente de glucoproteína P: Una ventaja de los fármacos poliméricos es que disminuye su unión a la glicoproteína, lo cual impide que pueda ser eliminado del interior de la célula tumoral [79,80].

6. Calidad de vida del paciente. Una gran ventaja para los pacientes sometidos a terapia con fármacos poliméricos es que requieren una administración menos frecuente debido a su mayor tiempo de vida tisular y sanguíneo, normalmente unas diez o más veces que los fármacos convencionales [6,42]. Un ejemplo de ello es el tratamiento de la leucemia linfocítica usando el conjugado de PEG-L-asparaginasa, el cual tiene un tiempo de vida medio de unos catorce días y requiere de una sola inyección cada dos semanas. En cambio, la enzima L-asparaginasa “desnuda” tiene un tiempo de vida de unas 8-30 horas y requiere de una administración diaria durante 4 semanas [81].

Por desgracia, el diseño y uso de fármacos poliméricos también presenta algunos problemas que deben ser resueltos en el futuro. Por ejemplo, el tamaño de las nanopartículas debe ser optimizado para que sean capaces de evitar la excreción renal. Además, deben ser biodegradables o, al menos, poseer un importante aclaramiento fecal. En este último caso el peso molecular puede tener menos importancia. Los polímeros hidrófobos pueden llegar a acumularse en la piel o en tejidos ricos en lípidos, aunque puedan ser eliminados a través de la bilis [24]. En consecuencia, la acumulación de polímeros hidrófobos puede llegar a ser importante si aumenta la dosis. Ciertos polímeros pueden llegar a provocar reacciones alérgicas o despertar la respuesta inmunológica, si bien esta puede llegar a ser controlada con corticoides y antihistamínicos.

Finalmente, la liberación del fármaco in vivo desde las partículas poliméricas es, en muchos casos, un problema ya que es una cuestión puramente física que responde a una cinética de orden 0. La diferencia que existe entre las especies animales en su función renal, hepática o su tasa metabólica debe tenerse en cuenta en términos de la evolución en el tiempo de la liberación del fármaco. Por ejemplo, los ratones toleran mejor que el humano la toxicidad de los fármacos debido a su alta tasa metabólica y al alto aclaramiento urinario del que disponen [24].

6. CONCLUSIONES

Hoy en día, el efecto EPR está aceptado como sistema de administración de fármacos dirigidos a tumores. El efecto EPR se observa en la mayoría de fármacos macromoleculares, incluyendo los conjugados poliméricos y los fármacos micelares. Cuando estos fármacos llegan al tumor son capaces de permanecer el tiempo necesario para desarrollar la función para la que han sido diseñados, gracias al aumento en la retención que les proporcionan las nanopartículas que los vehiculizan. Además, el efecto EPR puede aumentar mediante la infusión conjunta de angiotensina II y/o mediante la administración de agonistas PGI₂, entre otras. Gracias al aumento de presión se puede lograr administrar fármacos en nanopartículas a tumores que tengan una baja densidad vascular. Por lo tanto, gracias a esta selectividad, cabe esperar una disminución en la toxicidad secundaria en células sanas. Sin embargo, se requiere una velocidad de liberación adecuada para ejercer el efecto deseado, por lo que se hace necesario la estabilización de la nanopartícula y la modulación de su cinética de liberación. También se hace imprescindible una mejora en el tiempo de circulación y un mayor tiempo de permanencia en el tumor y formas para aumentar el suministro de fármacos, como podría ser el aumento de la presión arterial.

Todas estas ventajas, demostradas individualmente, garantizan un futuro ilusionante y prometedor al tratamiento por transporte de fármacos a través de nanopartículas, no solo para el cáncer, sino para muchas otras enfermedades.

CONCLUSIONS

Nowadays, the EPR effect is accepted as a system of administration of drugs directed to tumors. The EPR effect is observed in most macromolecular drugs, including polymeric conjugates and micellar drugs. When these drugs reach the tumor they are able to stay the necessary time to develop the function for which they are designed, thanks to the increase in retention provided by the nanoparticles that transport them. In addition, the EPR effect can be increased by the co-infusion of angiotensin II and/or by the administration of PGI₂ agonist, among others. Thanks to this increase in pressure, it is possible to administer drugs in nanoparticles to tumors that have a low vascular density. Therefore, thanks to this selectivity, a decrease in secondary toxicity in healthy cells can be expected. However, an adequate release rate is required to exert the desired effect, which is why it is necessary to stabilize the

nanoparticle and modulate its release kinetics. An improvement in circulation time and a longer stay in the tumor and ways to increase the supply of drugs, such as the increase in blood pressure are also essential.

All these advantages, demonstrated individually, guarantee an exciting and promising future to treatments by transporting drugs through nanoparticles, not only for cancer, but for many other diseases.

7. VALORACIÓN PERSONAL

Gracias a este trabajo he podido conocer un tema que será de vital importancia en terapéutica en un futuro no muy lejano y que toca de cerca un campo como la oncología, en boca de todos en las últimas décadas en los países desarrollados. Además, al ser un tema que se encuentra en los inicios me ha permitido adquirir unos conocimientos desde la base hasta la actualidad.

Por otro lado me ha hecho crecer en cuanto a mi experiencia en recabar información científica y veraz para, seguidamente, expresar en un texto todo lo que he aprendido.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Insel PA, Amara SG, Blaschke TF, Meyer UA. Introduction of the Theme "Cancer Pharmacology". *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2016; 56(1): 19-22.
- [2] Tsimberidou AM. Targeted therapy in cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2015; 76(6): 1113-32.
- [3] Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR Effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release*. 2000; 65(1-2): 271-84.
- [4] Leaf C. Why we are losing the war on cancer and how to win. *Fortune*. 2004; 149(6): 76-97.
- [5] Miklos G. The human cancer genome Project-one more misstep in the war on cancer. *Nat Biotechnol*. 2005; 23(5): 535-7.
- [6] Thomas R, Pieri A, Cain H. A systematic review of generic and breast cancer specific life expectancy models in the elderly. *Eur J Surg Oncol*. 2017; 43(10): 1816-27.
- [7] Nwizu T, Adelstein D. Pharmacotherapy of head and neck cancer. *Expert Opin Pharmacother*. 2025; 16(16): 2409-22.
- [8] Marty JJ, Oppenheim RC, Speiser P. Nanoparticles- a new colloidal drug delivery system. *Pharm Acta Helv*. 1978; 53(1): 17-23.
- [9] Griffin S, Masood MI, Nasim MJ, Sarfraz M, Ebokaiwe AP, Schäfer KH, Keck CM, et al. Natural Nanoparticles: a particular matter inspired by nature. *Antioxidants*. 2017. 7(1): 3
- [10] Torchilin V P. Nanocarriers. *Pharm Res*. 2007; 24(12): 2333-4.
- [11] Kumari P, Ghosh B, Biswas S. Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery. *J Drug Target*. 2016; 24(3): 179-91.
- [12] Srinivasan M, Rajabi M, Mousa S. Multifunctional nanomaterials and their applications in drug delivery and cancer therapy. *Nanomaterials*. 2015; 5(4): 1690-1703.
- [13] Sun T, Zhang YS, Pang B, Hyun DC, Yang M, Xia Y. Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2014; 53(46): 12320-64.
- [14] Wilczewska AZ, Niemirowicz K, Markiewicz KH, Car H. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol Rep*. 2012; 64(5): 1020-37.
- [15] Oropesa Nuñez R, Jáuregui Haza UJ. Las nanopartículas como portadores de fármacos: características y perspectivas. *Cenic*. 2012; 3(43): (revista digital).

- [16] Zhu L, Zhou Z, Mao H, Yang L. Magnetic nanoparticles for precision oncology: theranostic magnetic iron oxide nanoparticles for image-guided and targeted cancer therapy. *Nanomedicine*. 2017; 12(1): 73-87.
- [17] Cabuzu D, Cirja A, Pulu R, Grumezescu AM. Biomedical applications of gold nanoparticles. *Curr Top Med Chem*. 2015; 15(16): 1605-13.
- [18] Pisanic II TR, Zhang Y, Wang TH. Quantum dots in diagnostics and detection: principles and paradigms. *Analyst*. 2014; 139(12): 2968-81.
- [19] Chen Y, Mohanraj VJ, Wang F, Benson HAE. Designing chitosan-dextran sulfate nanoparticles using charge ratios. *AAPS Pharm Sci Tech*. 2007; 8(4): 131-9.
- [20] Zhong Y, Meng F, Deng C, Zhong Z. Ligand-directed active tumor-targeting polymeric nanoparticles for cancer chemotherapy. *Biomacromoleculares*. 2014; 15(6): 1955-69.
- [21] Wilson M L, Fleming KA. Global cancer care. *Am J Clin Pathol*. 2016; 145(1): 6-7.
- [22] Teo PY, Cheng W, Hendrick JL, Yang YY. Co-delivery of drug and plasmid DNA for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016; 1(98): 41-63.
- [23] Heldin CH, Rubin K, Pietras K, Ostman A. High interstitial fluid pressure: an obstacle in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4(10): 806-13.
- [24] Maeda H, Bharate GY, Daruwalla J. Polymeric drugs for efficient-targeted drug delivery based on EPR-Effect. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009; 71(3): 409-19.
- [25] Jurek PM, Zablocki K, Wasko U, Mazurek MP, Otlewski J, Jelen F. Anti-FGFR1 aptamer-tagged superparamagnetic conjugates for anticancer hyperthermia therapy. *Int J Nnanomedicine*. 2017; 11(12): 2941-50.
- [26] Chilakamarthi U, Giribabu L. Photodynamic therapy: past, present and future. *Chem Rec*. 2017; 17(8): 775-802.
- [27] Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J*. 2005; 19(3): 310-30.
- [28] Jones A, Harris AL. New developments in angiogenesis: A major mechanism for tumor growth and target for therapy. *Cancer J Sci Am*. 1998; 4(4): 209-17.
- [29] Baban DF, Seymour LW. Control of tumor vascular permeability. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998; 34(1): 109-19.
- [30] Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, Torchilin VP, et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95(8): 4607-12.

- [31] Rubin P, Casarett G. Microcirculation of tumors. I. Anatomy, function, and necrosis. *Clin Radiol.* 1996; 17(3): 220-9.
- [32] Shubik P. Vascularization of tumors: A review. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1982; 103(3): 211-26.
- [33] 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: 189-207.
- [34] Maeda H. SMANCS and polymer-conjugated macromolecular drugs: advantages in cancer chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews.* (1991): 6, 181–202.
- [35] Maeda H, Takeshita J, Kanamaru R. A lipophilic derivative of neocarzinostatin. A polymer conjugation of an antitumor protein antibiotic. 1979; 14(2): 81-7.
- [36] Maeda H. Polymer therapeutics and the EPR effect. *J Drug Target.* 2017; 25(9-10): 781-85.
- [37] Maeda H, Sawa T, Konno T. 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): 47-61.
- [38] Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995; 146(5): 1029-39.
- [39] Hashizume H, Baluk P, Moriwaka S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, et al. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol.* 2000; 156(4): 1363-80.
- [40] Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumor-tropic accumulation of proteins and antitumor agent SMANCS. *Cancer Res.* 1986; 46 (12 Pt 1): 6387-92.
- [41] Noguchi Y, Wu J, Duncan R, Strohalm J, Ulbrich K, Akaike T, et al. Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues. *Jpn J Cancer Res.* 1998; 89(3): 307-14.
- [42] Maeda H, Takeshita J, Yamashita A. Lymphotropic accumulation of an antitumor antibiotic protein, neocarzinostatin. *Eur J Cancer.* 1980; 16(5):723-31.
- [43] Takeshita J, Maeda H, Kanamaru R. In vitro mode of action, pharmacokinetics and organ specificity of poly (maleic acid-styrene)-conjugated neocarzinostatin, SMANCS. *Gan.* 1982; 73(2): 278-84.

- [44] Maeda H, Takeshita J, Kanamaru R, Sato H, Khatoh J, Sato H. Antimetastatic and antitumor activity of a derivative of neocarzinostatin: an organic solvent and 32fect-soluble polymer conjugated protein. *Gan*. 1979; 70(5): 601-6.
- [45] Bae YH. Drug targeting and tumor heterogeneity. *J Control Release*. 2009; 133(1): 2-3.
- [46] Sverdlov ED. Multidimensional complexity of cancer. Simple solutions are needed. *Biochemistry*. 2016; 81(7): 731-8.
- [47] Young JS. The significance of the tissue pressure of normal testicular and of neoplastic (Brown–Pearce carcinoma) tissue in the rabbit. *J Pathol Bacteriol*. 1950; 62(3): 313-33.
- [48] Jain RK. Transport of molecules across tumor vasculature. *Cancer Metastasis Rev*. 1987; 6(4): 559-93.
- [49] Jain RK. Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Res*. 1987; 47(12): 3039-51.
- [50] Boucher Y, Baxter LT, Jain RK. Interstitial pressure gradients in tissue-isolated and subcutaneous tumors: implications for therapy. *Cancer Res*. 1990; 50(15): 4478-84.
- [51] DiResta GR, Lee J, Larson SM, Arbit E. Characterization of neuroblastoma xenograft in rat flank. I. Growth, interstitial fluid pressure, and interstitial fluid velocity distribution profiles. *Microvasc Res*. 1993; 46(2): 158-77.
- [52] Rippe B, Haraldsson B. Transport of macromolecules across microvascular walls: the two-pore theory. *Physiol Rev*. 1994; 74(1): 163–219.
- [53] Griffon-Etienne G, Boucher Y, Brekken C, Suit HD, Jain RK. Taxane-induced apoptosis decompresses blood vessels and lowers interstitial fluid pressure in solid tumors: clinical implications. *Cancer Res*. 1999; 59(15): 3776–82.
- [54] Padera TP, Stoll BR, Tooredman JB, Capen D, di Tomaso E, Jain RK. Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. *Nature*. 2004; 427(6976): 695.
- [55] Netti PA, Hamberg LM, Babich JW, Kierstead D, Graham W, Hunter GJ, et al. Enhancement of fluid filtration across tumor vessels: implication for delivery of macromolecules. *Proc Natl Acad Sci USA*. 199; 96(6): 3137-42
- [56] Li J, Miyamoto Y, Kojima Y, Maeda H. Augmentation of tumor delivery of macromolecular drugs with reduced bone marrow delivery by elevating blood pressure. *Br J Cancer*. 1993; 67(5): 975-80.
- [57] Wu J, Akaike T, Maeda H. Modulation of enhanced vascular permeability in tumors by a bradykinin antagonist, a cyclooxygenase inhibitor, and a nitric oxide scavenger. *Cancer Res*. 1998; 58(1): 159-65.

- [58] Maeda H, Akaike T, Wu J, Noguchi Y, Sakata Y. Bradykinin and nitric oxide in infectious disease and cancer. *Immunopharmacology*. 1996; 33(1-3): 222-30.
- [59] Maeda H, Matsumura Y, Kato H. Purification and identification of [hydroxypropyl³]bradykinin in ascitic fluid from a patient with gastric cancer. *J Biol Chem*. 1988; 263(31): 16051-4.
- [60] Doi k, Akaike T, Horie H, Noguchi Y, Fujii S, Beppu T, Ogawa M, Maeda H. Excessive production of nitric oxide in rat solid tumor and its implication in rapid tumor growth. *Cancer*. 1996; 77(8 suppl): 1598-604.
- [61] Greish K. Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting. *Methods Mol Biol*. 2010; 624: 25-37.
- [62] Suzuki M, Hori K, Abe I, Saito S, Sato H. A new approach to cancer chemotherapy: selective enhancement of tumor blood flow with angiotensin II. *J Natl Cancer Inst*. 1981; 67(3): 663-9.
- [63] Tanaka S, Akaike T, Wu J, Fang J, Sawa T, Ogawa M, Beppu T, Maeda H. Modulation of tumor-selective vascular blood flow and extravasation by the stable prostaglandin 12 analogue beraprost sodium. *J Drug Target*. 2003; 11(1): 45-52.
- [64] Langer R. Drug delivery and targeting. *Nature*. 1998; 392(6679 Suppl): 5-10.
- [65] Heathcote EJ, Mitchell ML, Graganm W, Cooksley E, Dusheiko GM, Lee SS, et al. Peginterferon alfa-2 in patient with chronic hepatitis C and cirrhosis. *N Engl J Med*. 2000; 343(23): 1673-80.
- [66] Suzuki F, Munakata T, Maeda H. Interferon induction by SMANCS: a polymer-conjugated derivative of neocarzinostatin. *Anticancer Res*. 1988; 8(1): 97-103.
- [67] Oda T, Morinaga T, Maeda H. Stimulation of macrophage by polyanions and its conjugated proteins and effect on cell membrane. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1986; 181(1): 9-17.
- [68] Masuda E, Maeda H. Antitumor resistance induced by zinostatin stimalamer (ZSS), a polymer-conjugated neocarzinostatin (NCS) derivative. I. Meth A tumor eradication and tumor-neutralizing activity in mice pretreated with ZSS or NCS. *Cancer Immunol Immunother*. 1995; 40(5): 329-38.
- [69] Oda T, Akike T, Hamamoto T, Suzuki F, Hirano T, Maeda H. Oxygen radicals in influenza-induced pathogenesis and treatment with pyran polymerconjugated SOD. *Science*. 1989; 244(4907): 974-6.
- [70] Akaike T, Okamoto S, Sawa T, Yoshitake J, Tamura F, Ichimori K, et al. 8-Nitroguanosine formation in viral pneumonia and its implication for pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(2): 685-90.

- [71] Maeda H, Akaike T. Oxygen free radicals as pathogenic molecules in viral diseases. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1991; 198(2): 721-7.
- [72] Akaike T, Maeda H. Nitric oxide and viral infection. *Immunology.* 2000; 101(3):300-8.
- [73] Kimura M, Matsumura Y, Konno T, Miyauchi Y, Maeda H. Enzymatic removal of bilirubin toxicity by bilirubin oxidase in vitro and excretion of degradation products in vivo. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1990; 195(1): 64-9.
- [74] Oka K, Miyamoto Y, Matsumura Y, Tanaka S, Oda T, Suzuki F, et al. Enhanced intestinal absorption of a hydrophobic polymer-conjugated protein drug SMANCS in an oily formulation. *Pharm Res.* 1990; 7(8): 852-5.
- [75] Hirayama S, Sato F, Oda T, Maeda H. Stability of high molecular weight anticancer agent SMANCS and its transfer from oil-phase to water-phase, comparative study with neocarzinostatin. *Jpn J Antibiot.* 1986; 39(3): 815-22.
- [76] Duncan R, Sat-Klopsch YN, Burger AM, Bibby MC, Fiebig HH, Sausville EA. Validation of tumour models for use in anticancer nanomedicine evaluation: the EPR effect and cathepsin B-mediated drug release rate. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013; 72(2): 417-27.
- [77] Duncan R. Polymer conjugates for tumor targeting and intracytoplasmic delivery. The EPR effect as a common gateway. *Pharm Sci Technolo Today.* 1999; 2(11): 441-9.
- [78] Pellegrin P, Fernandez A, Lamb NJ, Benes R. Macromolecular uptake is a spontaneous event during mitosis in cultured fibroblast: implications for vector-dependent plasmid transfection. *Mol Biol of the Cell.* 2002; 13(2): 570-8.
- [79] Miyamoto Y, Oda T, Maeda H. Comparison of the cytotoxic effects of the high and low molecular weight anticancer agents on multi drug resistance Chinese hamster ovary cells in vitro. *Cancer Res.* 1990; 50(5): 1571-5.
- [80] Miyamoto Y, Maeda H. Enhancement by verapamil of neocarzinostatin action on multidrug-resistant. Chinese hamster ovary cells: possible release of non-protein chromophore in cells. *Jpn J Cancer Res.* 1991; 82(3): 351-6.
- [81] Harris JM, Chess RB. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov.* 2003; 2(3): 214-21.