



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y
BIOQUÍMICAS

LIBERACIÓN DE DOXORRUBICINA EN CÉLULAS
MCF-7 UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE
SÍLICE MODIFICADAS CON POLI (B-AMINO
ÉSTER).

TESIS

PRESENTADA POR

CHRISTOFER ENMANUEL OLAN
NOVEROLA

EN OPCIÓN AL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO
2020



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y
BIOQUÍMICAS

LIBERACIÓN DE DOXORRUBICINA EN CÉLULAS
MCF-7 UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE
SÍLICE MODIFICADAS CON POLI (B-AMINO
ÉSTER).

TESIS

PRESENTADA POR

CHRISTOFER ENMANUEL OLAN
NOVEROLA

EN OPCIÓN AL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO
2020



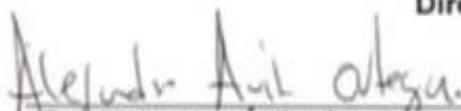
Mérida, Yuc., 24 de noviembre de 2019

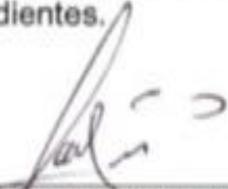
Oficio Num.: PICQB/251/2019

Asunto: Autorización de digitalización

La tesis "Liberación de doxorrubicina en células MCF-7 utilizando nanopartículas de sílice modificadas con poli (B-amino éster)" presentada por Christofer Enmanuel Olan Noverola, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar por el grado de Maestro en Ciencias Químicas y Bioquímicas, ha sido aprobada en cuanto a su contenido científico y en cuanto a lo establecido en el Manual de Procedimientos del Posgrado Institucional en Ciencias Químicas y Bioquímicas, por lo que se le autoriza la digitalización de los ejemplares correspondientes.

Directores de la tesis


Dr. Alejandro Ávila Ortega


Dra. Leydi Maribel Carrillo Cocom

Firmas

Sinodales

Dr. William Alejandro Talavera Pech

Dra. Beatriz Adriana Rodas Junco

Dra. Fabiola Elizabeth Villa de la Torre

ATENTAMENTE
"LUZ, CIENCIA Y VERDAD"


DRA. MAIRA RUBI SEGURA CAMPOS
COORDINADORA DEL POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS



POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS QUÍMICAS
Y BIOQUÍMICAS

c.c. Archivo
MRSC

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Universidad Autónoma de Yucatán que dentro de sus Facultades de Química e Ingeniería Química adquirí los conocimientos necesarios para poder formarme como Maestro en Ciencias Químicas y Bioquímicas.

A mis asesores: El Dr. Alejandro Ávila Ortega y la Dra. Leydi Maribel Carrillo Cocom, quienes fueron un pilar muy importante para mi aprendizaje y mi crecimiento personal.

A mis sinodales: Dra. Beatriz Adriana Rodas Junco, Dra. Fabiola Elizabeth Villa de la Torre y al Dr. William Alejandro Talavera Pech, quienes me ayudaron a ampliar mi perspectiva como futuro investigador con sus comentarios y correcciones.

A mis amigos y colegas Maestros en Ciencias: Gina, Lili y Vicente, quienes estuvieron presentes en los momentos de estrés y diversión.

A mi familia: More y Miguel, mis hermanos que me brindaron esas palabras de ánimo para perseguir mis sueños, Marcos y Cleotilde, mis padres que con su cariño incondicional y sus consejos nada de esto hubiera sido posible.

Este trabajo fue realizado en los laboratorios de Biotecnología, Cultivo celular y Química de Materiales de la Universidad Autónoma de Yucatán. Asimismo, algunas pruebas fueron realizadas en los laboratorios de Microscopía Electrónica del Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEMex-UNAM, bajo la supervisión del Dr. Alfredo Rafael Vilchis Nestor y los análisis de SEM fueron realizados en LANNBIO Cinvestav Mérida, con el apoyo de los proyectos FOMIX-Yucatán 2008-108160, CONACYT LAB-2009-01-123913, 292692, 294643, 188345, 204822, 292692, 294643. Agradezco el apoyo técnico a M.C. Dora Huerta con la supervisión de la Dra. Patricia Quintana Owen, respectivamente. La investigación fue realizada bajo la dirección del Dr. Alejandro Ávila Ortega y la Dra. Leydi Maribel Carrillo Cocom, formando parte del Proyecto “Liberación controlada de doxorubicina en líneas celulares cancerosas humanas utilizando nanopartículas de sílice modificadas con poli- β -amino éster”, con el apoyo de una beca con CVU: 861071 concedida por Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

RESUMEN

El cáncer es una de las principales enfermedades causantes de un alto índice de muertes a nivel mundial, debido a esto, se han desarrollado diversas terapias para eliminar a las células cancerosas. Una de las estrategias es la quimioterapia, que implica el uso de fármacos antineoplásicos para eliminar las células cancerosas o inhibir su crecimiento. Sin embargo, estos fármacos suelen tener efectos secundarios adversos al actuar indiscriminadamente sobre las células en división de todo el organismo. De esta forma, se han desarrollado sistemas de liberación focalizada, cuyo objetivo es liberar el fármaco en el sitio de interés sin dañar a las células sanas. De esta manera se han sintetizado nanopartículas recubiertas con polímeros hidrolizables ante estímulos, como el pH ácido debido al pH del microambiente que presentan los tumores (6.5-5.5). Sin embargo, aún existe un limitado número de investigaciones sobre la evaluación de la liberación *in vitro* y la acción específica de estos sistemas sobre las células cancerosas. Por tal motivo, en esta investigación se propuso evaluar la toxicidad de un nuevo sistema de liberación compuesto de nanopartículas mesoporosas de sílice recubiertas con Poli (β -amino éster) y cargado con el fármaco doxorubicina, sobre las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y sana de fibroblastos humanos hFB. Para lograrlo, el trabajo se dividió en tres etapas. En la primera etapa se sintetizaron las nanopartículas mesoporosas de sílice (NMS) y a su vez el polímero que las recubrió, el cuál fue Poli (β -amino éster) (PbAE), posteriormente, dichos materiales fueron caracterizados mediante las técnicas SEM, TEM, SARXD, FTIR, RMN y TGA. En la segunda etapa, la doxorubicina (DOX) se encapsuló en el complejo NMS-PbAE, previamente sintetizado y, por último, el complejo NMS-PbAE-DOX fue probado en las líneas celulares MCF-7 y hFB. Después de la confirmación de la síntesis del complejo de liberación, se demostró citotoxicidad con el complejo NMS-PbAE-DOX sobre ambas líneas celulares. Sin embargo, en células MCF-7, el complejo demostró una mayor toxicidad que la DOX libre. Lo que puede sugerir que en este tipo de células hubo una mayor internalización mediada por las nanopartículas. Sin embargo, con los ensayos realizados no fue posible establecer una acción diferencial del complejo entre ambas líneas celulares. Esto porque se demostró que el pH desciende durante el cultivo *in vitro* de manera similar, a un pH ácido en el rango de liberación del complejo. Por tal motivo, estudios con otros modelos como cultivos en 3D o *in vivo* deben ser realizados para demostrar la acción específica de este sistema de liberación sobre células de cáncer.

ABSTRACT

Cancer is one of the main diseases that cause a high rate of deaths worldwide, due to this, various therapies have been developed to eliminate cancer cells. One of the strategies is chemotherapy, which involves the use of antineoplastic drugs to kill cancer cells or inhibit their growth. However, these drugs usually have adverse side effects by acting indiscriminately on dividing cells throughout the body. In this way, focused release systems have been developed, whose objective is to release the drug at the site of interest without harming healthy cells. In this way, nanoparticles coated with hydrolysable polymers have been synthesized before stimuli, such as the acidic pH, this due to the pH of the microenvironment that the tumors present (6.5-5.5). However, there is still a limited number of research on the evaluation of *in vitro* release and the specific action of these systems on cancer cells. For this reason, in this investigation it was proposed to evaluate the toxicity of a new release system composed of silica-coated mesoporous silica nanoparticles with Poly (β -amino ester) and loaded with the drug doxorubicin, on the MCF-7 breast cancer cellular line and healthy human and hFB fibroblasts. To achieve this, the work was divided into three stages. In the first stage the silica mesoporous nanoparticles (NMS) were synthesized and in turn the polymer that covered them, which was Poly (β -amino ester) (PbAE), subsequently, materials were characterized by the techniques SEM, TEM, SARXD, FTIR, NMR and TGA. In the second stage, doxorubicin (DOX) was encapsulated in the previously synthesized NMS-PbAE complex and, finally, the NMS-PbAE-DOX complex was tested in the MCF-7 and hFB cell lines. After confirmation of the synthesis of the release complex, greater cytotoxicity was demonstrated with the NMS-PbAE-DOX complex on both cell lines. However, in MCF-7 cells, the complex demonstrated greater toxicity than free DOX. What can suggest that in this type of cells there was a greater internalization mediated by the nanoparticles. However, with the tests performed it was not possible to establish a differential action of the complex between both cell lines. This is because it was shown that the pH decrease during *in vitro* culture on same the way, to ácid pH in the state of release complex. For this reason, studies with other models such as 3D or *in vivo* cultures should be performed to demonstrate the specific action of this release system on cancer cells.

ÍNDICE

| | |
|---|-------|
| RESUMEN | xi |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | xviii |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| Cáncer..... | 3 |
| Terapias contra el cáncer de tumores sólidos..... | 4 |
| Fármacos utilizados como tratamiento de cáncer de mama. | 5 |
| Sistemas de liberación controlada..... | 7 |
| Nanopartículas mesoporosas de silicio. | 11 |
| Modificaciones a nanopartículas para la liberación de fármacos | 12 |
| Poli(β -amino esteres)..... | 15 |
| Doxorrubicina y sus sistemas de liberación | 16 |
| Pruebas <i>in vitro</i> de la liberación de DOX encapsulada en nanopartículas..... | 19 |
| JUSTIFICACIÓN..... | 23 |
| HIPÓTESIS | 24 |
| OBJETIVOS..... | 26 |
| Objetivo general | 26 |
| Objetivos específicos | 26 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 27 |
| Etapa 1: Síntesis y caracterización de los materiales..... | 27 |
| Caracterización de NMS, NMS-APTES, NMS-PbAE y PbAE..... | 29 |
| Etapa 2: Encapsulación de DOX. | 30 |
| Encapsulación de DOX | 30 |
| Determinación de la eficiencia del fármaco encapsulado en las NMS-PbAE..... | 30 |
| Etapa 3. Citotoxicidad del sistema de liberación NMS-PbAE-DOX y sus componentes y liberación de DOX. | 31 |
| Líneas celulares y cultivo | 31 |
| Conteo celular y determinación de viabilidad. | 32 |
| Preparación de muestras para pruebas de toxicidad | 32 |
| Inoculación de placas para pruebas de toxicidad..... | 32 |
| Evaluación de la citotoxicidad de los materiales (NMS, PbAE y NMS-PbAE)..... | 32 |
| Pruebas de toxicidad de DOX libre sobre células MCF-7 y hFB | 34 |

| | |
|--|----|
| Pruebas de toxicidad del complejo NMS-PbAE-DOX sobre células MCF-7 y hFB | 34 |
| <i>Liberación de DOX dependiente del pH</i> | 34 |
| Análisis de datos | 34 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 36 |
| Etapa 1: Síntesis y caracterización de las NMS, NMS-APTES, PbAE Y NMS-PbAE. | 36 |
| Análisis de FTIR. | 36 |
| Análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) protónica del PbAE. | 37 |
| Análisis termogravimétrico del complejo NMS-PbAE..... | 39 |
| Análisis de Difracción de rayos X de ángulo bajo: SAXRD. | 40 |
| Morfología superficial determinada por SEM..... | 41 |
| Determinación del recubrimiento de PbAE y ordenamiento de los poros mediante TEM | 41 |
| Etapa 2: Eficiencia de encapsulación de DOX..... | 42 |
| Etapa 3. Citotoxicidad del sistema de liberación NMS-PbAE-DOX y liberación de DOX..... | 43 |
| Evaluación de la citotoxicidad de NMS, NMS-PbAE y PbAE..... | 43 |
| Estudio de la citotoxicidad del complejo NMS-PbAE-DOX sobre las líneas celulares hFB y MCF-7..... | 48 |
| Pruebas de toxicidad del complejo NMS-PbAE-DOX sobre células MCF-7 y hFB. | 50 |
| Liberación de DOX en medio de cultivo y evaluación del pH del medio..... | 52 |
| REFERENCIAS | 57 |
| ANEXOS | 67 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-------------------------------|
| Figura 1. Perfiles ideales de concentración en plasma de los sistemas de liberación ... | 7 |
| Figura 2. Representación de la acumulación de las nanopartículas en el tumor a través del efecto de retención y permeación mejorada. | 9 |
| Figura 3. Síntesis de las nanopartículas mediante el proceso sol-gel | 11 |
| Figura 4. Estructura tetracíclica de la doxorubicina que contiene una molécula de glucosa (daunosamida) unida al anillo A. | 17 |
| Figura 5. Representación esquemática de la translocación nuclear de la DOX. | 17 |
| Figura 6. Mecanismo de acción de DOX mediado por EROS. | 18 |
| Figura 7. Síntesis de las nanopartículas de sílice funcionalizadas con APTES. | 28 |
| Figura 8. Síntesis de PbAE y NMS-APTES-PbAE. | 28 |
| Figura 9. Espectros de FTIR de NMS-APTES, NMS-APTES-PbAE y PbA | 37 |
| Figura 10. Estructura de PbAE y sus principales señales en el espectro de RMN. | 38 |
| Figura 11. Termograma de NMS-APTES-PbAE. | 39 |
| Figura 12. Espectros de difracción de rayos X de ángulo bajo de a) NMS, y b) NMS-APTES. | 40 |
| Figura 13. Microfotografías de las NMS realizadas por SEM. | 41 |
| Figura 14. Microfotografías de las NMS y NMS-PbAE obtenidas por TEM. | 42 |
| Figura 15. Representación de los porcentajes de inhibición celular de fibroblastos humanos expuestos al complejo NMS-PbAE, determinado por CV. | 44 |
| Figura 16. Representación de los porcentajes de inhibición celular de fibroblastos humanos expuestos al complejo NMS-PbAE, determinado por MTT. | 46 |
| Figura 17. Representación de los porcentajes de inhibición celular de MCF-7 expuestos al complejo NMS-PbAE, determinado por CV. | 47 |
| Figura 18. Representación del porcentaje de inhibición celular de hFB expuestas a DOX libre, determinado por CV. | 48 |
| Figura 19. Representación del porcentaje de inhibición celular de MCF-7 expuestas a DOX libre, determinado por CV. | 50 |
| Figura 20. Comparación de la citotoxicidad entre el complejo NMS-APTES-PbAE-DOX y DOX libre en ambas líneas celulares | 51 |
| Figura 21. Curvas de concentración de DOX en el medio de cultivo de células hFB y MCF-7 expuestas al complejo NMS-PbAE-DOX | ¡Error! Marcador no definido. |
| Figura 22. Curvas de pH de DOX en el medio de cultivo de células hFB y MCF-7 expuestas al complejo NMS-PbAE-DOX | 54 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Principales fármacos utilizados para el cáncer de mamá y tumores que se encuentran en las categorías 2 y 3. | 6 |
| Tabla 2. Principales características y limitaciones de los distintos tipos de nanotransportadores..... | 10 |
| Tabla 3. Principales estímulos endógenos y exógenos con sus respectivos mediadores. | 13 |
| Tabla 4. Técnicas utilizadas para la caracterización de cada material sintetizado. | 29 |

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales enfermedades causante de un alto número de muertes a nivel mundial.¹ Tal patología es motivada por causas multifactoriales, como la exposición prolongada a carcinógenos, a factores ambientales o debido al consumo de ciertos alimentos, entre otros.² Por tal motivo, este padecimiento es de relevancia social y tema principal de innumerables investigaciones; como el estudio de los aspectos moleculares y celulares del cáncer y la generación de nuevos fármacos y tratamientos.

A nivel mundial se estima que más de 10 millones de personas son diagnosticadas con cáncer, de las cuales cerca de 7 millones fallecen a causa de dicho padecimiento.³ En América, la causa número uno de muertes en hispanos se debe a problemas causados por esta enfermedad. Entre los principales cánceres que padecen los habitantes de países latinoamericanos se encuentran los de próstata, seno, colon, pulmón y de la sangre.⁴

En México el cáncer representa un grave problema de salud pública, debido a la gran cantidad de personas a las que se les diagnostica este padecimiento, y a las muertes ocasionadas por éste. El cáncer en el 2015 representó la tercera causa de muertes en México. De acuerdo a datos del INEGI, en ese mismo año se estimó que los principales tipos de cáncer padecido por varones están asociados con tumores digestivos y de próstata, mientras que en mujeres se relacionó con tumores formados en los senos.⁵⁻⁷ Por la alta incidencia de este padecimiento, es indispensable ofrecer pláticas informativas, realizar campañas de prevención, optimizar el diagnóstico y tratamiento, además de suministrar los cuidados paliativos para mejorar la calidad de vida de las personas que lo padecen.⁸ Por tal motivo, se han desarrollado diversos métodos o terapias que permiten mejorar la calidad de vida del paciente.

Entre los principales tratamientos o terapias para combatir el cáncer se encuentran la cirugía, radioterapia y quimioterapia. Esta última es la más común y consiste en la aplicación de un fármaco que disminuye la proliferación de las células afectadas. Sin embargo, una desventaja de la quimioterapia es que también afecta a las células sanas adyacentes. Por tal motivo, se han realizado numerosos proyectos de investigación cuyo objetivo es establecer estrategias para dirigir y liberar los fármacos antineoplásicos en los tejidos cancerosos y evitar la exposición de los medicamentos a las células sanas cercanas.⁹ Este tipo de técnica es denominada terapia dirigida o focalizada.

La liberación focalizada es realizada empleando técnicas que permiten encapsular el fármaco en materiales biocompatibles. Al realizar estas técnicas, se debe comprobar la conservación de las propiedades antineoplásicas del fármaco después de ser encapsulado. Asimismo, se debe asegurar que todo el complejo, formado por los

transportadores y el fármaco, sea resistente a la degradación y sea capaz de llegar al sitio específico, atravesando las membranas celulares y los epitelios sanguíneos.¹⁰ En la actualidad se han realizado distintos estudios que proponen sistemas de liberación, como es el caso del empleo de nanopartículas de sílice que son utilizadas como transportadores.¹¹⁻¹³ Sin embargo, las nanopartículas deben ser modificadas para evitar la liberación del fármaco, lo que se ha realizado con el recubrimiento de las mismas con algún polímero, como es el caso de Poli (β -amino éster). Dicho polímero ha permitido la liberación de fármacos antineoplásicos, como la DOX, debido a su degradación a pH ácido.¹⁴ En particular, este fármaco se ha utilizado como modelo en diversos trabajos de investigación, debido a su amplio tratamiento terapéutico contra distintos tipos de cáncer.¹⁵⁻¹⁷

Si bien existen estudios para el diseño de sistemas de liberación de fármacos, aún es necesario continuar con las investigaciones para establecer nuevos métodos de liberación. Asimismo, se deben realizar pruebas que permitan determinar la especificidad de acción de estos sistemas sobre las células cancerosas.

ANTECEDENTES

Cáncer

La mayoría de las células diferenciadas son capaces de duplicarse y transmitir a su descendencia la información genética necesaria para cumplir todas las funciones celulares que les corresponden. En ocasiones estas células pueden haber sufrido alteraciones en sus genes, mismas que transmiten a su siguiente generación. Estas alteraciones son conocidas como mutaciones, las cuales son capaces de convertir a las células normales en células cancerosas.^{18,19}

Las mutaciones en las células troncales pueden provocar la activación de ciertos genes, o por lo contrario la inactivación de éstos. Los genes que son activados por medio de la mutación reciben el nombre de oncogenes, y aquellos inactivados por la mutación son llamados genes supresores de tumores.²⁰ Estos eventos inducen a la formación de células cancerosas que presentan características distinguibles y propias de ellas, como son la independencia a las señales estimulantes del crecimiento, resistencia a la muerte celular programada, una capacidad proliferativa infinita, potencial de angiogénesis y la habilidad de hacer metástasis e invadir tejido sano.^{21,22} En adición, existen dos atributos muy particulares en cuanto a comunicación celular. Primero, las células malignas no presentan la inhibición por contacto, es decir, al haber una pérdida de la comunicación celular, las células crecen superpuestas una de otras y, segundo, las células cancerosas no necesitan estar unidas a otras células, debido a esto, pueden crecer libremente sobre superficies pleurales.²³

Además de las características antes mencionadas, las células cancerosas también presentan ciertas características morfológicas y celulares que las distinguen del resto, como es el incremento en el tamaño del núcleo, teniendo como consecuencia un incremento en la proporción núcleo-citoplasma y un nucléolo hiper cromático.² También, las células cancerosas presentan una sobreexpresión de proteínas y determinados grupos funcionales (folatos) los cuales funcionan como mecanismos de reconocimiento celular.²⁴ Aparte de dichas características, los tejidos cancerosos presentan un rasgo distintivo conocido como efecto de permeabilidad y retención mejorada, que consiste en la retención de moléculas en el tumor a causa del espacio que se forman entre las células del epitelio vascular, debido a la malformación de los vasos sanguíneos durante la angiogénesis, además, el flujo venoso favorece la acumulación de las moléculas depositadas en el tumor.²⁵

Existen un gran número de formas para clasificar el cáncer, sin embargo, la manera más simple de hacerlo es en tumores sólidos y tumores derivados de células sanguíneas.¹⁰ Asimismo, la forma más común de nombrarlos es de acuerdo al tejido embrionario del que derivan. Así, se denominan sarcomas a las neoplasias que aparecen en tejidos mesenquimatosos y derivados y, que provienen de la capa germinal conocida

como mesodermo. Sin embargo, es común nombrar de forma específica a los sarcomas linfoides, como es el caso de las leucemias y linfomas. De manera similar, se les da el nombre de carcinomas a las células malignas que se forman en tejido epitelial, en este grupo se encuentran todos los tumores sólidos.^{18,26}

Los tumores sólidos son similares a órganos malformados y sus tejidos están compuestos por diferentes tipos de células incluyendo células neoplásicas, células vasculares y fibroblastos.²² Es sabido que la mayoría de los tumores se originan de una simple célula, pero no todas las células dentro del tumor son idénticas, a esta propiedad se le conoce como heterogeneidad del tumor. De acuerdo a estudios previos, solo una porción de las células presentes en el tumor tienen la capacidad de dar origen a éste (< 1%), mientras que otras dan soporte al crecimiento del tumor como también su mantenimiento.²⁷ En México, los tumores sólidos ocasionan diversos porcentajes de mortalidad de acuerdo a los diferentes grupos etarios. En el 2018, se estimó que durante el periodo comprendido entre los 0-17 años, la mortalidad por cáncer ocasionado por los tumores sólidos fue de 48.3%, 71.7% en la población de 18-29 años y el 70.6% en la población de 30 años en adelante.⁵ Debido a esto, esta clase de cáncer representa un problema de relevancia nacional.

Terapias contra el cáncer de tumores sólidos

Una detección temprana del cáncer es sin duda una de las estrategias más eficientes para disminuir la mortalidad que ocasiona. Sin embargo, esto no siempre es posible debido a la velocidad de crecimiento que presentan las células malignas y a la formación de los tumores ocasionados por múltiples factores. En la gran mayoría de los casos, la detección del cáncer se debe a la aparición de los primeros síntomas, mismos que generalmente indican que se encuentra en una etapa avanzada.²⁸

Existen una serie de métodos o tratamientos para combatir los tumores sólidos cuando éstos han sido detectados. El objetivo principal de los tratamientos consiste en reducir el tamaño del tumor o eliminar de manera completa el tejido afectado. Entre los principales tratamientos se encuentra la cirugía, radioterapia, quimioterapia y la terapia focalizada la cual también se apoya en el empleo de fármacos.

La cirugía oncológica permite eliminar el tejido u órgano dañado de manera preventiva, y a través del estudio del tejido se puede obtener información sobre el nivel de estadiaje del cáncer, es decir, de la progresión de la enfermedad, y si es necesaria alguna otra terapia complementaria. Sin embargo, aunque es muy útil para eliminar tumores focalizados, puede no ser eficiente y causar daños estéticos y funcionales al paciente.^{29,30}

La radioterapia tiene como objetivo principal la eliminación completa del tumor, por medio de la aplicación de radiación de tipo ionizante. Ha habido grandes avances en cuanto al empleo de esta terapia, tales como radiar de forma precisa el tumor,

disminuyendo así los daños ocasionados a células sanas. Una de las principales ventajas que presenta la radioterapia, es la capacidad de eliminar tejidos o células remanentes que no se eliminan por medio de la cirugía. Sin embargo, la eliminación del tumor por radioterapia no siempre es factible, como ha sido demostrado en un estudio realizado a pacientes con cáncer de mama.³⁶ En él se determinó que la eficiencia en la reducción del tumor fue mejor cuando éste no superaba los 4 cm. Además, se ha demostrado que la continua exposición a la radiación trae consigo efectos negativos, tales como lesiones del endotelio vascular y de las células parenquimatosas del tejido irradiado, teniendo como consecuencia cuadros de fibrosis pulmonar intersticial, pericarditis, nefritis y obstrucción intestinal, entre otros.^{30,31}

La quimioterapia, por su parte, es una estrategia que se emplea principalmente como tratamiento de los cánceres metastásicos, después que las terapias locales han fallado.³² Consiste en la administración de fármacos (principalmente por vía intravenosa) para impedir el crecimiento y proliferación de las células malignas. De acuerdo al momento de administración de la quimioterapia en el conjunto del tratamiento, ésta se denomina quimioterapia adyuvante, neoadyuvante o de rescate.

La quimioterapia adyuvante consiste en administrar quimioterapia sistémica tras el control local del tumor primario. Se aplica después de cirugía y/o radioterapia, en pacientes con alto riesgo de recaída, como los que presentan tumores de gran volumen. La quimioterapia neoadyuvante es un tratamiento inicial aplicado en tumores localmente avanzados. Permite el control local de la enfermedad, ya que reduce el tamaño del tumor y facilita el tratamiento quirúrgico/radioterápico posterior. Por último, la quimioterapia de rescate es una segunda línea de tratamiento, que implica la administración de fármacos con diferentes mecanismos de acción a los empleados con anterioridad, cuyo objetivo es obtener una nueva remisión completa de la enfermedad.³⁰

Fármacos utilizados como tratamiento de cáncer de mama.

Sikora et al, 1999³³ organizaron a los diferentes tipos de tumores diagnosticados en cinco categorías, de acuerdo a la respuesta de los tumores ante la quimioterapia:

Categoría 1: Tumores los cuales con el uso de un fármaco o con la combinación de otros fármacos y apoyados con otros tratamientos (cirugía, radioterapia), son eliminados.

Categoría 2: Tumores donde la vida del paciente se prolonga cuando la quimioterapia es usada como un adyuvante para la cirugía local o radioterapia en las etapas iniciales del tumor.

Categoría 3: Tumores de los cuales hay evidencia que el uso de un medicamento o la combinación de estos causan la reducción del tumor hasta un 20 % de los pacientes seleccionados con metástasis con casi una mejora de vida.

Categoría 4: Tumores donde el control local puede ser mejorado por el uso de la quimioterapia, antes o después de la cirugía o radiación.

Categoría 5: Tumores para los cuales no hay fármacos efectivos.

De acuerdo a las características que presenta el cáncer de mama ante la quimioterapia fue catalogado en las categorías 2 y 3. Tales categorías corresponden a distintos tipos de fármacos que son útiles para tratar el cáncer de mama, los cuales se presentan en la Tabla 1.³³

Tabla 1. Principales fármacos utilizados para el cáncer de mamá y tumores que se encuentran en las categorías 2 y 3.

| Fármacos utilizados para cáncer de mama | |
|--|--------------|
| Bleomicina | Metotrexato |
| Cisplatino | Gemcitabina |
| Ciclofosfamida | Tamoxifeno |
| Doxorrubicina | Paclitaxel |
| 5-fluorouracilo | Docetaxel |
| Vincristina | Epirubicina |
| Vinblastina | Capecitabina |

La quimioterapia convencional se dirige a macromoléculas y enzimas involucradas en la proliferación de las células, pero de forma típica no discrimina entre las células en división normal celular acelerada y células tumorales, lo que conduce a manifestaciones tóxicas.³⁴ Por tal motivo, es deseable el empleo de fármacos dirigidos a blancos moleculares propios de células malignas o de estrategias para liberar los compuestos de manera exclusiva en el sitio deseado, con el propósito de afectar solamente a la célula maligna a través de la intervención de mecanismos o vías imprescindibles para su reproducción, migración y metástasis.^{25,35}

A la espera de fármacos más específicos en contra de células cancerosas, la liberación dirigida representa una opción asequible, permitiendo el transporte del fármaco al sitio deseado hasta su liberación.³⁶

Sistemas de liberación controlada

Los sistemas de liberación controlada son aquellos que permiten controlar los efectos farmacológicos del medicamento y, a su vez, permiten influir en los perfiles farmacocinéticos, en la tasa de liberación, en el sitio de acción o en el tiempo de vida media del fármaco en el organismo.³⁷ En estos casos, los sistemas de liberación pueden contribuir a modificar positivamente algunos parámetros de los fármacos, tales como su capacidad de atravesar barreras biológicas (membranas celulares), dirigir su biodistribución y favorecer su eliminación hepática. Otra ventaja de los sistemas de liberación es que protege a los fármacos de una posible degradación enzimática debido a un mejoramiento en su estabilidad metabólica.^{38,39} Para realizar esto, los sistemas de liberación controlada deben ser inertes, biocompatibles, resistentes mecánicamente, capaces de cargar una alta cantidad del fármaco, de administración y eliminación simple y, de fácil fabricación.⁴⁰ Esta clase de sistemas incluyen los de liberación inmediata y modificada (retrasada, sostenida y controlada), los cuales presentan diversos perfiles cinéticos de liberación (Figura 1).

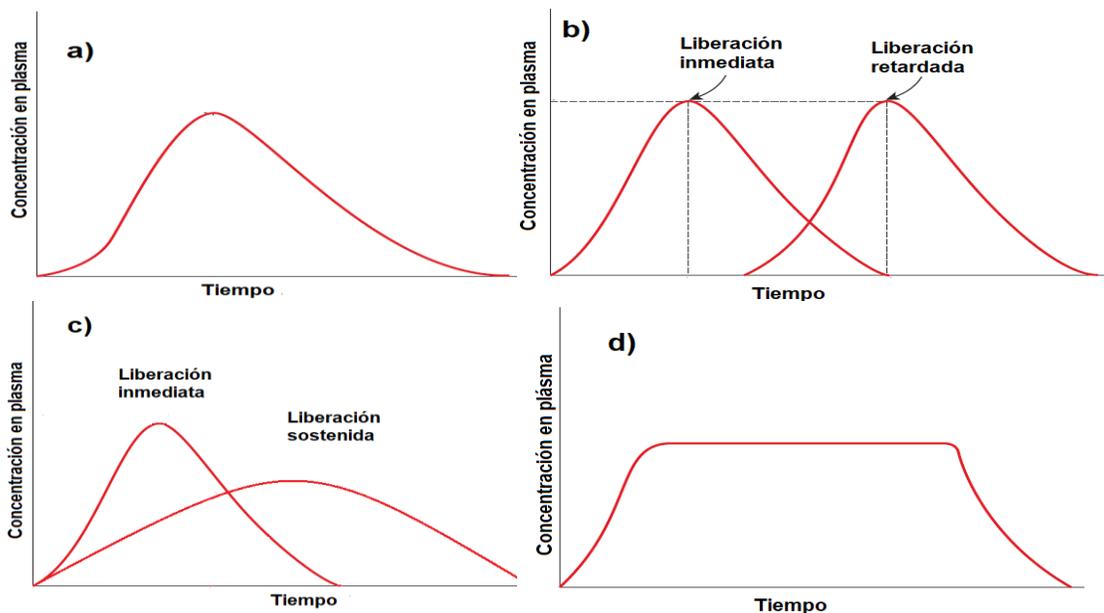


Figura 1. Perfiles ideales de concentración en plasma de los sistemas de liberación a) Inmediata, b) Retardada, c) Sostenida y d) Controlada.⁴³

El mecanismo de liberación inmediata se caracteriza por liberar el fármaco inmediatamente después de la administración. El comienzo de acción es inmediato en infusiones e inyecciones intravenosas. Los sistemas de liberación inmediata liberan el fármaco siguiendo un perfil cinético de primer orden (Figura 1a).⁴³

Los sistemas de liberación modificada están diseñados para liberar el fármaco una vez alcanzado un sitio específico o en un tiempo dado después de la administración. Este sistema de liberación se divide en tres mecanismos de liberación: retrasada, extendida y focalizada. La liberación retrasada (Figura 1b) consiste en liberar el fármaco o ingrediente activo un tiempo después de la administración. Los sistemas de liberación retrasada son útiles para proteger el fármaco de la degradación a causa del pH ácido del estómago. El otro sistema de liberación, la liberación extendida, consiste en liberar el fármaco durante periodos prolongados. Este tipo de sistemas, a su vez se subdivide en dos: sostenido y controlado. El primero mantiene una tasa de liberación en un periodo sostenido (Figura 1c), y el segundo al igual que el primero ofrece un sistema de liberación sostenido, pero con la ventaja de poder mantener concentraciones constantes del fármaco en el plasma, independientemente del ambiente biológico del sitio de aplicación. Sin embargo, los sistemas de liberación controlada no son necesariamente específicos, es decir, que no liberan el fármaco exclusivamente en el órgano de interés (Figura 1d).⁴³

En cuanto al sistema de liberación focalizada, su principal objetivo es liberar el fármaco en un sitio específico, manteniendo los niveles del fármaco dentro de un rango deseado.⁴⁴ Una de las principales razones por lo que se opta por utilizar sistemas de liberación focalizada es debido a que los fármacos liberados por los sistemas de liberación convencionales tienen ciertas deficiencias como problemas de solubilidad, poca capacidad de protección al fármaco ocasionada por los cambios del pH en el sistema biológico, y deficiencias en el perfil de liberación. Estas deficiencias pueden ser reducidas en gran medida con la ayuda de nanotransportadores debido a la capacidad de éstos de liberar el fármaco en el órgano o tejido de interés, incrementando la eficacia del tratamiento y reduciendo la toxicidad del fármaco al controlar el perfil de liberación.⁴¹

Nanotransportadores

Los nanotransportadores tienen propiedades únicas tales como tamaños nanométricos, una alta proporción superficie-volumen y favorables características fisicoquímicas que les permiten tener un potencial para controlar perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos.⁴²

El tamaño de los nanotransportadores no solo juega un papel importante sobre los perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos del compuesto a transportar, sino que también favorece la acumulación pasiva de los mismos en la periferia del tumor mediante el efecto de permeación y retención mejorada (EPR), como se muestra en la Figura 2. A causa de las altas demandas de nutrientes y oxígeno para el crecimiento del tumor, las células cancerosas liberan factores de crecimiento para la formación de nuevos vasos sanguíneos que le proporcionan sustento al tumor (angiogénesis).⁴³ Estos vasos sanguíneos recién formados en el tumor difieren mucho de los vasos sanguíneos normales que irrigan los tejidos sanos, ya que son de forma irregular, dilatados y

presentan fugas, debido a que las células endoteliales se encuentran desalineadas presentando grandes espacios u orificios entre ellas.⁴⁴ Esta deficiencia morfológica, da lugar a la salida de componentes del plasma sanguíneo, como macromoléculas y partículas lipídicas en el tejido tumoral, lo que también permite el paso de los nanomateriales acarreadores del fármaco, a la periferia del tumor. Además, el lento retorno venoso en el tejido tumoral provoca una retención de las macromoléculas en el tumor y a su vez la acumulación de los nanotransportadores.

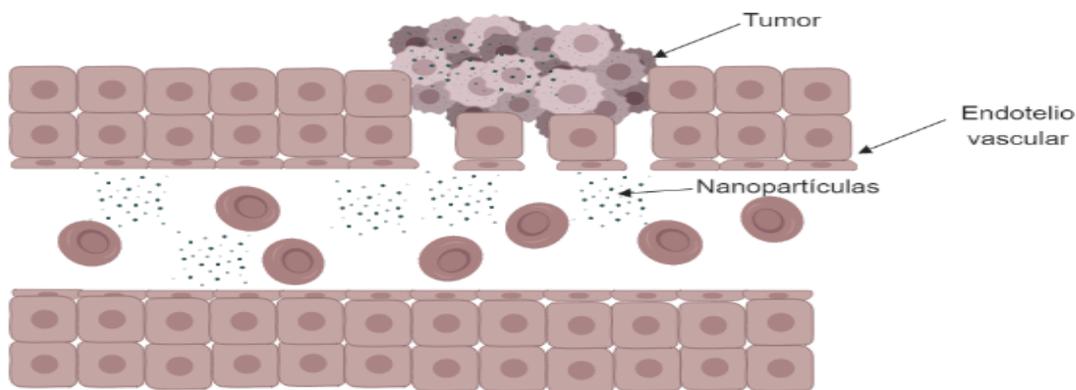


Figura 2. Representación de la acumulación de las nanopartículas en el tumor a través del efecto de retención y permeación mejorada.

De esta manera, el efecto EPR presenta un potencial importante para el tratamiento del cáncer, por lo que diversos nanotransportadores se han sintetizado. Entre los principales nanotransportadores se encuentran los liposomas, dendrímeros, micelas, nanopartículas virales y nanopartículas mesoporosas de sílice. Cada uno de estos sistemas presenta características y limitaciones, mismos que se pueden observar en el Tabla 2.

Tabla 2. Principales características y limitaciones de los distintos tipos de nanotransportadores.

| Tipo de sistema | Estructura | Características | Limitaciones | Referencias |
|------------------------|--|--|---|--------------------|
| Liposomas | Estructura coloidal compuesto por una bicapa lipídica. | Muestran una gran compatibilidad con distintos fármacos, es fácil su preparación, incrementa la solubilidad de fármacos. | Una pobre estabilidad de las vesículas bajo condiciones fisiológicas. Baja eficiencia de encapsulación. | 48 |
| Micelas | Copolímeros estructurados con un núcleo hidrofóbico y una superficie hidrofílica. | Capacidad de encapsular fármacos hidrofóbicos, alta solubilidad y estabilidad en el medio fisiológico. | Por su tamaño polimérico no puede ser excretado vía renal. | 48 |
| Nanopartículas virales | Jaulas proteínicas, las cuales son multivalentes, estructuras auto-ensambladas | Capacidad de infectar y replicarse en células tumorales y eliminarlas, además de expresar factor estimulante de colonias de granulocitos, incrementando la respuesta inmune. | Puede insertar errores a nivel ADN y activar proto-oncogenes. | 53 |
| Dendrímeros | Crecimiento radial. Polímero con patrones regulares de unidades repetitivas | Proveen una alta capacidad de almacenamiento del fármaco con una liberación controlada, la cual puede ser desencadenada por cambios en el pH | Puede liberar el fármaco en sitios y a tiempos erróneos, lo cual puede ocasionar efectos tóxicos. | 48 |
| Nanopartículas | Son transportadores sólidos hechos de polímeros naturales o sintéticos y pueden ser biodegradables o no. | Muestran una alta tasa de encapsulación y proveen protección al fármaco contra la degradación. | Dependiendo del material, pueden presentar efectos tóxicos. | 53,55 |

Nanopartículas mesoporosas de silicio.

Entre los diversos tipos de nanopartículas, las sintetizadas a partir de sílice (NMS) han demostrado ser materiales ideales para aplicaciones biomédicas y biotecnológicas por su alta estabilidad química y térmica, gran área superficial, alta estabilidad en suspensiones acuosas, su inercia al ambiente, la capacidad de modificar el tamaño tanto de la nanopartícula como de los poros, su fácil funcionalización y biocompatibilidad.¹⁷

Las NMS pueden ser sintetizadas por medio del proceso sol-gel, el cual consiste en reacciones de hidrólisis y condensación de precursores de sílice (silicato sódico, tetraetilortosilicato o silicato de tetrametilamonio). La técnica de sol-gel es empleada para preparar vidrios inorgánicos, con surfactantes catiónicos que permiten la obtención de estructuras ordenadas y monodispersas mediante la formación típica de micelas que actúan a modo de molde y dan origen a los poros. Se trata de una adaptación del método descrito por Stöber en 1968 para la obtención de NMS⁴⁵. La diferencia consiste en la incorporación de un tensoactivo catiónico, dando así una modificación del proceso clásico de sol-gel (Figura 3).^{46,47}

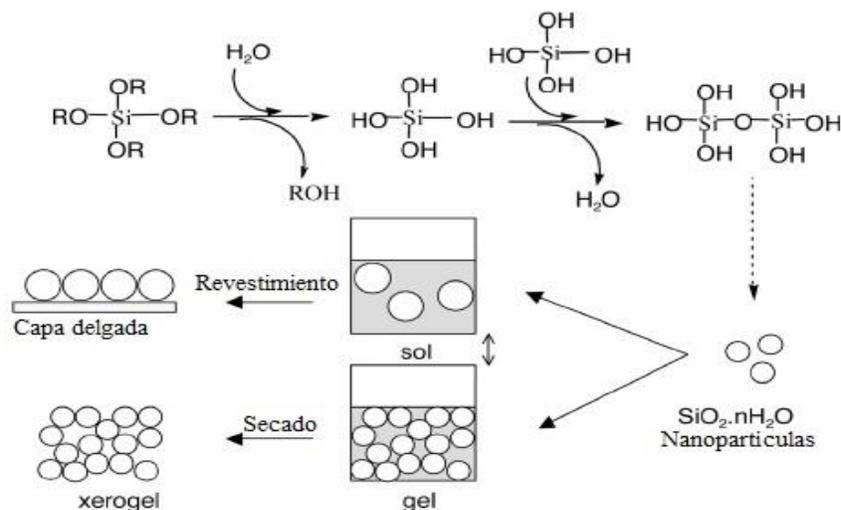


Figura 3. Síntesis de las nanopartículas mediante el proceso sol-gel.⁴⁸

Kresge *et al*, 1992.⁴⁹ Describieron la importancia de la combinación entre la química del sol-gel con plantillas de líquidos cristalinos para crear nuevas clases de poros ordenados incorporados dentro de una matriz de sílica amorfa. Sin embargo, las aplicaciones de este proceso eran amplias. Debido a esto, algunos investigadores observaron el potencial de dichas nanopartículas en el área biomédica, usándolas como nanotransportadores.

Meng *et al*, 2011.⁵⁰ Evaluaron la especificidad de las nanopartículas de acumularse en tejidos de interés (tumores) mediante el efecto de retención y permeabilidad mejorada (por sus siglas en inglés: EPR). Aunque dichas nanopartículas presentaron una focalización pasiva, no era eficaz al momento de encapsular fármacos dentro de ellas, por tal motivo, se realizaron estudios de modificación superficial de las nanopartículas, como es el caso de Xia *et al*, 2009.⁵¹ En este estudio se demostró que el recubrimiento con polímeros catiónicos no solo favorecía la internalización de las nanopartículas en las células, sino también una mejora en el efecto EPR.

Modificaciones a nanopartículas para la liberación de fármacos

Los sistemas de liberación controlada requieren tener la capacidad de retener el fármaco y de liberarlo a condiciones específicas. La encapsulación permite la retención del fármaco mediante el recubrimiento de las partículas con diversos materiales. En todos los casos, los poros de la NMS juegan un papel muy importante porque a través de ellos se encapsula el fármaco y se evita la liberación del mismo por medio del sellado con materiales llamados porteros (*gatekeepers* en inglés).⁹ Asimismo, la liberación en condiciones específicas se lleva a cabo por medio de los porteros, los cuales evitan la liberación hasta la activación mediante un estímulo, esto ofrece la oportunidad para diseñar sistemas de liberación de fármacos de acuerdo a su estímulo-respuesta. De la misma manera, se pueden realizar modificaciones a nivel superficial de los sistemas de liberación, con la adición de anticuerpos o ligandos apropiados, que permiten una liberación controlada del fármaco.⁵²

Por ejemplo, Rosenholm y colaboradores ²⁴ funcionalizaron las NMS con ácido fólico teniendo como objetivo células cancerosas, ya que se ha encontrado que dichas células presentan receptores de folato en la membrana celular. Como resultado, observaron una mejor internalización de las nanopartículas funcionalizadas que las nanopartículas sin grupos folatos. Otro ejemplo es la investigación realizada por Liong *et al*, 2008. ⁵³ donde probaron la liberación del fármaco antineoplásico paclitaxel sobre células cancerosas, las NMS fueron recubiertas por nanocristales de óxido de hierro superparamagnético y ligandos de fosfonatos que les permitieron una liberación en las células cancerosas.

Los estímulos pueden ser divididos en estímulos endógenos y exógenos.⁵⁴ Los estímulos endógenos son aquellos estímulos que ocurren en el interior del organismo, como se da el caso en el microambiente entre el tejido normal y el tumor. En este caso, en ocurre una reducción del pH, existe alto potencial redox y se presenta un incremento en el nivel de algunas enzimas.^{55,56} Por otra parte, los estímulos exógenos son aquellos que no son propios del organismo pero permiten la activación de los porteros como son los campos magnéticos, el ultrasonido, la luz y los campos eléctricos (Tabla 3).

Tabla 3. Principales estímulos endógenos y exógenos con sus respectivos mediadores.⁵⁴⁻⁵⁶

| Porteros sensibles a: | Estímulo | Mediante |
|------------------------------|-----------------|--|
| pH | Endógeno | Enlaces lábiles (hidracinas, ésteres, tioles, aminas terciarias) |
| Temperatura | Endógeno | Polímeros termosensibles |
| Reacciones redox | Endógeno | Puentes de disulfuro |
| Luz | Exógeno | Isómeros cis-trans |
| Campos magnéticos | Exógeno | Aplicación de un campo magnético sobre nanopartículas metálicas |
| Enzimas | Endógeno | Glucosa, enlace biotina-avidina, enlace glicosídico, interacción con aptámeros |

Entre los sistemas de liberación estímulo-respuesta, la liberación mediante la reducción del pH ha sido punto de interés de innumerables investigaciones para la liberación controlada en tumores.^{14,24,57,58} Debido a que las células tumorales presentan una alta tasa de glicólisis y generan un alto nivel de CO₂, lo que produce un microambiente con valores de pH entre 5.5 y 6.5, por debajo del pH fisiológico de 7.4.⁹

De esta manera, materiales sensibles a pH como polielectrolitos, nanoválvulas supramoleculares, polímeros con enlaces sensibles a pH y materiales inorgánicos de descomposición ácida han sido empleados como porteros, recubriendo los poros de NMS.⁵⁹

Los polielectrolitos son polímeros con unidades repetidas que soportan grupos electrolitos, también son absorbidos o unidos covalentemente a la superficie de las NMS que funciona como un sistema de liberación mecanizado de estímulo-respuesta por la transformación bajo diferentes valores de pH.⁶⁰ Entre los estudios realizados con polielectrolitos se encuentra el trabajo de Feng *et al*, 2013⁶¹, cuya investigación consistió en sintetizar NMS cubiertas por capas de de polialilamina (PAH) y poliestireno (PSS). En este trabajo los autores probaron las NMS sobre células de cáncer cervicouterino HeLa y observaron que estas nanopartículas cargadas con el antibiótico DOX se

distribuyen en casi todo el citoplasma dentro de 6 h, y la DOX liberada entra rápidamente en las células con cáncer y se acumula en el núcleo en 50 min.

Las nanoválvulas supramoleculares consisten en el uso de una molécula inmovilizada unida covalentemente a la matriz de sílice junto con una molécula cíclica, entre las que se encuentran β -ciclodextrin, cucurbit-6-uril y ciclobis(paraquat-p-fenileno), que actúan a modo de tapón. En el estado cerrado la molécula cíclica se une al eje mediante enlaces covalentes y este conjunto sirve como barrera de las aperturas de los poros. Cuando las nanoválvulas reciben un estímulo (eléctrico, químico, térmico) ocurre una disociación, provocando que la válvula quede en posición abierta y se libere la carga del poro.⁶² Un ejemplo de aplicación, es el trabajo realizado por Meng *et al*, 2010⁶³, quienes probaron un nuevo sistema de liberación, basado en NMS funcionalizadas con β -ciclodextrina, sobre células de carcinoma escamoso (KB-31) a las cuales se les administró NMS cargadas con DOX. Los autores observaron que las NMS penetran eficientemente la región perinuclear en 3 h, y el fármaco se libera en el núcleo.

Con materiales inorgánicos de descomposición ácida, la estrategia comúnmente usada es la funcionalización superficial de las NMS, incluyendo el injerto de especies inorgánicas. No obstante, tales estrategias han sido limitadas por lo tedioso e intrincado de los pasos para la síntesis orgánica.⁹ Por tal motivo se han utilizado materiales inorgánicos capaces de descomponerse en medio ácido y son utilizados como porteros para controlar la liberación de fármacos. Uno de los primeros estudios que involucra la funcionalización de las NMS utilizando un material inorgánico fue realizado por Rim *et al*, 2011⁶⁴, quienes introdujeron fosfato de calcio inorgánico como un nuevo sellador de poro mediante la mineralización enzimática sobre la superficie de las NMS. En el estudio, el material fue capaz de disolverse dentro de los endosomas, como iones no tóxicos, y así iniciar la liberación del fármaco.

La estrategia con polímeros sensibles a pH consiste en realizar modificaciones orgánicas a las nanopartículas para la creación de materiales híbridos, mediante polímeros que recubren por completo a las nanopartículas y que se degradan ante la disminución de pH que ocurre en el microambiente de los tumores.⁶⁵

El uso de polímeros como recubrimiento para las NMS juega un papel muy importante en el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos anticancerígenos, ya que los polímeros poseen características que vuelven más eficiente al sistema. Entre estas características se encuentran su biocompatibilidad, peso molecular, estructura y función, también ayuda a prolongar el tiempo de circulación del fármaco y mejora la capacidad de liberar el fármaco de manera focalizada.^{66,67} Pese a las características beneficiosas, existen ciertos inconvenientes para la utilización de los polímeros, tales inconvenientes son la síntesis (muchas etapas) y la eficiencia de encapsulación.⁶⁸

Entre los estudios que se han realizado con este tipo de polímeros se encuentra los que emplearon polímeros lineales como Poli ácido-acrílico (PAA) para la liberación controlada de DOX. Sin embargo, en ese trabajo se observaron deficiencias en la liberación a pH ácido, debido a que los polímeros se compactaron y bloquearon la liberación.⁶⁵

Otros polímeros utilizados como porteros son los poliseudorotaxanos y la familia de los poli (β -amino éster), el primero fue utilizado por Gao *et al*, 2012¹⁵ para sellar los poros a través de enlaces amino-benzoico sensibles a pH. En ese trabajo se mostró que bajo condiciones ácidas, como las presentes en el ambiente extracelular del tumor, los enlaces amino-benzoico se hidrolizan parcialmente para acelerar la liberación de DOX mientras generan grupos amino para facilitar la internalización de las partículas. Las recientes investigaciones sobre esta clase de polímeros se deben principalmente a los pocos estudios que se tienen sobre ellos, así como también al hecho de que pueden ser sintetizados con materiales baratos y que existen protocolos para su síntesis y purificación.⁶⁹

Poli(β -amino ésteres)

Los Poli(β -amino ésteres) (PbAE) son polímeros biodegradables que fueron sintetizados por primera vez por Langer *et al*, 2004, quienes utilizaron este polímero para aplicaciones de transporte de ADN por su alta eficiencia de transfección y su biocompatibilidad.^{70,71} La gran variedad de PbAE lineales son sintetizados mediante la síntesis de tipo adición de Michael, que consiste en la reacción entre aminas (primarias o secundarias) y monómeros con grupos diacrilato. Por ejemplo, Langer *et al*, 2002, sintetizaron el PbAE mediante la adición de dimetiletilenodiamina y 4,4-trimetilenedipiperidina a 1,4-butenodiol diacrilato.⁷² Ellos reportaron que la adición de aminas primarias y secundarias a los grupos diacrilato daba como resultado aminas terciarias, las cuales no participan en reacciones de adición subsecuentes, lo que evita el crecimiento de la cadena.

Una característica importante que hace del PbAE un eficiente portero es su capacidad de permanecer en estado sólido cuando se encuentra en un medio fisiológico (pH 7.4), pero cuando el pH se reduce a 6.5, este polímero se vuelve soluble en medio acuoso.^{73,74} De igual forma, Lynn y Langer, 2000, mencionan que bajo condiciones de acidez (pH < 3) o basicidad (pH >12) extremas, el polímero se degrada rápidamente. Además, estos investigadores señalan un 50% de degradación del polímero a un pH de 5, en al menos 10h y, que el tiempo de degradación disminuye conforme desciende el pH.

Un ejemplo de investigación donde se utilizó PbAE para recubrir NMS fue el realizado por Talavera, 2017.⁷⁵ En dicha investigación se logró el recubrimiento de NMS tipo MCM-41 con un PbAE, creando el complejo NMS-PbAE, en el cual se llevó a cabo la encapsulación de DOX. Además, fue evaluada la liberación de DOX a pH fisiológico (7.4) y ácido (5.5) en solución salina. Como conclusión, se obtuvo que el recubrimiento por PbAE favorece la liberación de DOX en medio ácido. Asimismo, la liberación de DOX fue mayor a pH ácido en un lapso de 2 h.

Otra investigación que ha empleado el PbAE en copolímero, es decir, la unión de dos o más polímeros, fue la investigación de Chen *et al*, 2011⁷⁶. En tal trabajo, se sintetizaron micelas poliméricas basadas en PbAE y poli(etileno-glicol) las cuales tuvieron la capacidad de auto-ensamblarse a micelas estables en un ambiente fisiológico. Además, sus resultados mostraron que a un pH 7.4 el fármaco exhibe una liberación sostenida de DOX, donde hay una pequeña difusión del fármaco proveniente del núcleo de la micela. Por el contrario, a un pH de 6.5, las micelas pierden su integridad rápidamente y como consecuencia se da una liberación acelerada. Existen otras investigaciones que utilizan PbAE como revestimiento utilizando otros polímeros como núcleos, por ejemplo Poli(óxido de etileno) (PEO)¹⁴ y, Poli(etilen glicol) (PEG)⁷⁷.

Por otra parte, otra característica que señala al PbAE como un buen portero, es la baja toxicidad que ha demostrado inducir sobre células de mamífero, en comparación a otros polímeros catiónicos como poli(etileimina) (PEI) y poli(L-lisina).^{78,79} Los mismos resultados se han observado de sus productos de hidrólisis, (bis(β -amino ácidos) y productos dioles) han demostrado que son relativamente biocompatibles para la aplicaciones del sistema de liberación.⁵⁷ Al respecto, se ha evaluado la toxicidad de PbAE sobre la línea celular RAW 256.7, observándose una reducción del porcentaje de viabilidad solo cuando se alcanzaron concentraciones de 11.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.⁵⁷

Doxorrubicina y sus sistemas de liberación

Como se ha mencionado, un antineoplásico continuamente utilizado como fármaco modelo para su encapsulación en sistemas de liberación controlada es el antibiótico DOX para tratar el cáncer. Éste se ha empleado para el tratamiento de los tumores sólidos y linfáticos, como es el caso de cáncer de mama, próstata, útero, ovario, esófago, estómago, hígado, pulmón y leucemia linfoblástica.⁸⁰⁻⁸² Pertenece al grupo de los agentes anti-cáncer antraciclinas, cuya característica es la estructura planar tetracíclica y una molécula de glucosa llamado daunosamida, la cual está unida a uno de los anillos por un enlace glicosídico (Figura 4).

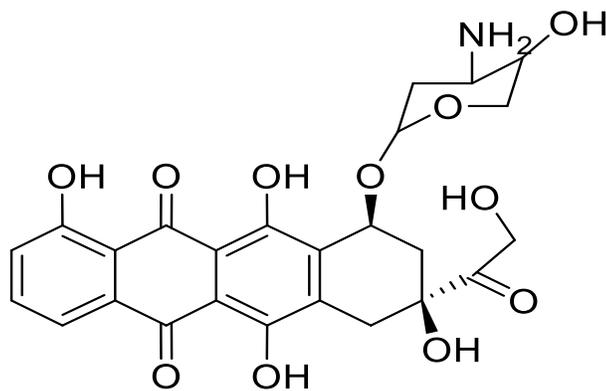


Figura 4. Estructura tetracíclica de la doxorubicina que contiene una molécula de glucosa (daunosamida) unida al anillo A.

Estudios demuestran que la DOX atraviesa fácilmente la membrana plásmatica por difusión simple, utilizando transportadores de la subfamilia ABCC que permiten su entrada al espacio intracelular. Posteriormente se une al proteosoma 20s, formando un complejo que se introduce al núcleo celular. Si bien el mecanismo específico del transporte nuclear no es muy bien conocido, se sabe que una vez dentro del núcleo la DOX se disocia y se ancla a la cadena de ADN (Figura 5).⁸³

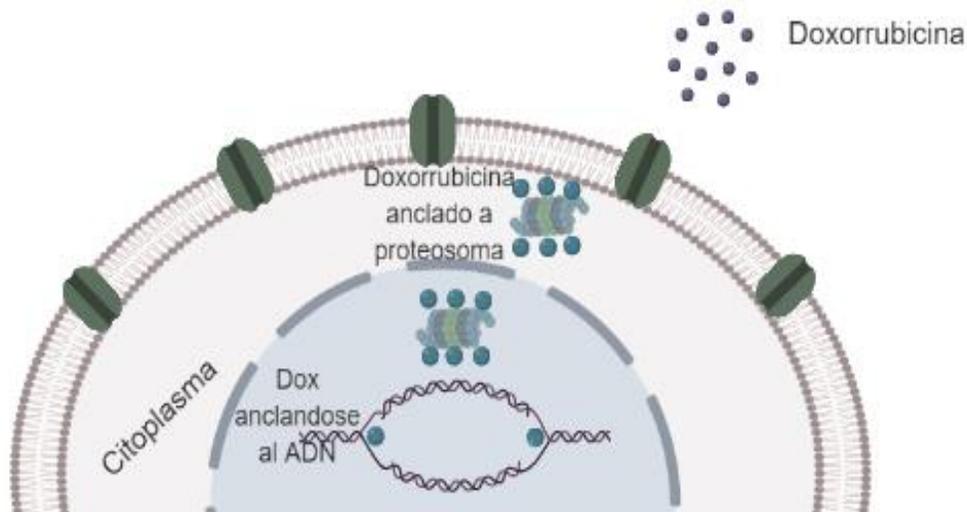


Figura 5. Representación esquemática de la translocación nuclear de la DOX. Al internalizarse, la DOX se une al proteosoma y posteriormente a la topoisomerasa para formar un complejo tripartido e inhibir la síntesis de ADN.⁸³

En el núcleo, la DOX se une al complejo covalente DNA-topoisomerasa II para formar un complejo tripartito que previene el resellado de la rotura de las hebras de ADN. Lo anterior provoca que la proteína p53 detenga la progresión del ciclo celular e inicie la reparación celular. Sin embargo, si las roturas son demasiadas, la célula entra en apoptosis. De este modo, la DOX actúa generando citotoxicidad celular.

Sin embargo, otro modo de acción de la DOX es a través de la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO). En presencia de metales como el Fe^{++} , la quinona en el anillo C de la molécula, experimenta rápidos ciclos de oxidación.^{80,84} En el último caso, la DOX se oxida a semiquinona, un metabolito inestable, el cual es convertido nuevamente a DOX en un proceso que libera ERO como peróxido de hidrogeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) o el anión peroxinitrito (ONOO^-), destruyendo membranas celulares, ADN y proteínas.

El daño al ADN, generado por las ERO, induce la activación de la Poli ADP-ribosa (PARP), el cual a su vez activa NADPH (fosforilándolo), lo que incrementa el potencial mitocondrial de membrana ($\Delta\Psi\text{M}$), desencadenando la activación de 3-caspasa e induciendo la apoptosis (Figura 6).⁸⁵

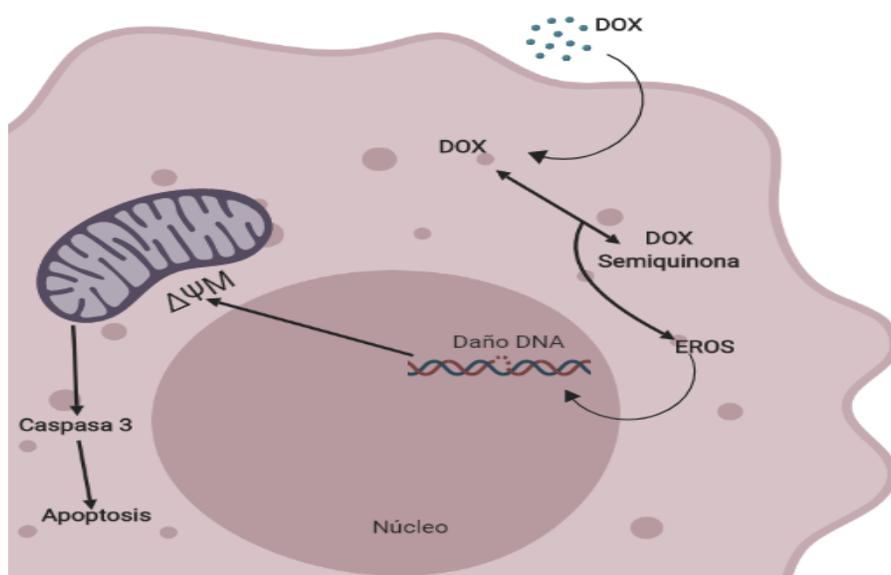


Figura 6. Mecanismo de acción de DOX mediado por EROS. Se induce la apoptosis de manera extrínseca. DOX: doxorubicina, EROS: especies reactivas de oxígeno.⁸⁴

La principal ruta de administración de DOX es vía intravenosa, a causa de su baja liposolubilidad, aplicando dosis de $60\text{mg}/\text{m}^2$ (peso del fármaco por metro cuadrado de superficie) cada tres semanas hasta una dosis máxima de $550\text{mg}/\text{m}^2$. Las curvas de desaparición plasmática de la DOX son multifásicas y el tiempo de vida media es de 30 h.⁸⁶ La DOX es metabolizada por el hígado, donde se hidrolizan sus anillos, la mayoría del fármaco y sus metabolitos son excretados por la bilis y cerca de una sexta parte a través de la orina.⁸⁷

Debido al mecanismo de acción de este fármaco, los pacientes sufren de efectos secundarios como alopecia, vómito, náuseas, problemas gastrointestinales, cardiotoxicidad y aplasia de médula ósea. Los mecanismos que inducen los efectos secundarios no son del todo claro, pero la mayoría de las evidencias indican que los

radicales libres están involucrados en la cardiotoxicidad.⁸⁸ De igual manera se ha comprobado que la extravasación de la DOX produce necrosis en tejidos locales.⁸⁹

De esta manera, a pesar de que la DOX se emplea para tratar diversos tipos de tumores, su aplicación directa como fármaco para quimioterapia genera efectos secundarios no deseados. Por tal motivo, este compuesto ha sido sujeto de investigación para su liberación controlada.^{77,90-92}

Pruebas *in vitro* de la liberación de DOX encapsulada en nanopartículas

Para evaluar el efecto que tienen los nuevos fármacos o complejos sobre los sistemas biológicos, una de las herramientas esenciales son las pruebas sobre células cultivadas *in vitro*. Esta metodología es importante también para evaluar el efecto de los nuevos sistemas de liberación de los fármacos.

Algunas de las principales ventajas de este método es la rapidez con que se realizan los estudios y la obtención de los datos, así como también su relación costo-efectividad. Los cultivos de células son modelos toxicológicos de gran sensibilidad, debido a esto son utilizados para probar la toxicidad de los fármacos y sus transportadores (nanopartículas). Sin embargo, las respuestas *in vitro* no siempre son indicadoras de reacciones *in vivo* ya que las condiciones que pueden reproducirse *in vitro* son una pequeña parte de lo que puede representarse *in vivo*. No obstante, la importancia de los ensayos *in vitro* radica en la posibilidad de observar el comportamiento de tipos específicos de células vivas en un ambiente controlado.⁹³⁻⁹⁵

Hay una gran variedad de estudios realizados sobre líneas cancerosas para probar la efectividad de distintos tipos de fármacos, uno de ellos es el estudio realizado por Al-Ghamdi *et al*, 2008,⁸⁷ cuyo trabajo consistió en evaluar el efecto de la DOX en células cancerosas prostáticas (DU-145). Utilizaron como concentración inicial 10 μ M del fármaco para determinar la concentración necesaria para inhibir la proliferación celular en un 50 %.

De igual manera, existen diversas investigaciones donde utilizan distintos tipos de transportadores para la DOX.⁹⁶⁻⁹⁸ Sin embargo, las NMS son de los transportadores más utilizados que han sido evaluados sobre líneas celulares. Entre los estudios realizados con NMS, se pueden encontrar el trabajo realizado por He y Shi (2011), en el que evaluaron la eficiencia de endocitosis, la cual depende del tamaño y la superficie esférica de las nanopartículas.¹⁷ Los autores tomaron como referencias nanopartículas de 190 nm a 1220 nm y concluyeron que las partículas de menor tamaño son más fáciles de penetrar a las células mediante endocitosis. Las nanopartículas de menor tamaño fueron encontradas dentro de la célula, específicamente en los lisosomas.

Por otra parte, Soud *et al*, 2008,⁹⁹ evaluaron a las NMS (MCM-41) junto con las nanopartículas mesoporosas tipo SBA-15 para comprobar si presentaban algún efecto nocivo en las células Jurkat (inhibición de la respiración celular) y concluyeron que las MCM-41 no presentan tal efecto en ninguna de las concentraciones (50, 100 y 200 µg/mL), debido al limitado acceso a la mitocondria.

Existe otro estudio donde utilizaron como transportadores nanopartículas magnéticas, basadas en óxido de hierro superparamagnético no tóxico (SPIO, por sus siglas en Inglés).⁹¹ En tal investigación, el principal objetivo fue la evaluación *in vitro* de los efectos citotóxicos de las nanopartículas magnética cargada de DOX sobre células cancerosas de mama (MCF-7) y Fibroblastos de ratón (NIH-3T3). En este ensayo, la prueba de citotoxicidad se realizó mediante la técnica de bromuro de 3-(4,5-dimetildiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT), el cual permite medir de manera indirecta la densidad celular respecto a un control no tratado. En la prueba se evaluaron tres concentraciones de DOX, 50 µM, 5 µM y 0.5 µM. Los resultados mostraron un descenso de la viabilidad a todas las concentraciones, en ambos grupos (DOX administrada directamente y las nanopartículas cargadas con DOX) y en las dos líneas celulares. Se mostró que la viabilidad celular fue disminuyendo conforme se incrementaba la concentración de DOX aunque sólo en las concentraciones de 50µM y 5 µM la viabilidad celular fue menor del 80%.

En el caso de Meng *et al*, 2010,¹⁰⁰ realizaron estudios donde la nanopartícula libera el fármaco en conjunto con siRNA. Ellos administraron las nanopartículas cargadas de DOX y un gen que codifica la glicoproteína P (Pgp), debido a que este gen se encuentra sobreexpresado en células cancerosas (KB-31). Este estudio demostró que el complejo logra una terapia sinérgica, ya que la concentración intranuclear de DOX aumenta significativamente cuando es liberada por la NMS en presencia de la Pgp, en comparación con la DOX administrada sin el transportador y con DOX administrada con NMS pero sin Pgp.

En el 2011, Gao *et al*, 2011,¹⁰¹ probaron la internalización celular de NMS de distintos tamaños de poros y cargadas con DOX sobre células cancerosas de mama (MCF-7) y y células cancerosas de mama resistentes a adriamycin (MCF-7/ADR). Los resultados demostraron que la internalización es mayor en las NMS con un poro mayor (12.6 nm) y con una concentración de 5 µg/mL de DOX. Asimismo, se evaluó la citotoxicidad mediante la técnica de MTT y se encontró que la citotoxicidad está relacionada con el diámetro del poro; es decir, las NMS con un mayor tamaño de poro mostraron mayor citotoxicidad que las de menor tamaño.

Como se puede observar, existen algunos estudios para probar la efectividad de la liberación controlada de DOX sobre células cultivadas *in vitro*. Sin embargo, son pocas las investigaciones donde se utilicen nanotransportadores recubiertos por algún tipo de polímero. Por tal motivo, hacer una investigación donde se pruebe el complejo NMS-

PbAE-DOX sobre células cancerosas, proporcionará información para evaluar la factibilidad de emplear este tipo de estrategias como tratamiento para el cáncer.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente se han realizado muchas investigaciones relacionadas con el tratamiento del cáncer, debido a que representa un serio problema de salud pública. Los innumerables estudios efectuados sobre este tema van desde los aspectos genéticos y moleculares, hasta la implementación de los fármacos y nuevos métodos de encapsulación y liberación de éstos.

La mayoría de los fármacos empleados como agentes terapéuticos contra tumores poseen considerables efectos negativos en células sanas, razón por la cual se están investigando distintas estrategias que permitan reducir o eliminar los daños ocasionados en dichas células. Lo anterior ha generado un gran interés en el desarrollo de nuevos mecanismos de liberación. Entre los principales métodos para reducir el daño ocasionado a células sanas está la liberación de fármacos mediante nanopartículas recubiertas por distintos tipos de polímeros. Estos polímeros proporcionan protección al fármaco contra la degradación mientras se encuentra en circulación hasta llegar al tumor, reduciendo considerablemente los efectos adversos a células sanas adyacentes.

Se han realizado varios estudios sobre la liberación controlada utilizando distintos tipos de transportadores, materiales de recubrimiento y fármacos sobre varias líneas celulares cancerosas, sin embargo, no hay estudios en donde utilicen el complejo NMS-PbAE-DOX sensible a pH como posible agente terapéutico para combatir células malignas.

Debido a lo anterior, previamente se ha realizado la síntesis de un nuevo complejo denominado NMS-PbAE-DOX, el cual ha demostrado potencial como agente de liberación controlada de DOX bajo estímulos de pH ácido, como el presente en el microambiente de tejidos tumorales. Sin embargo, aún era necesario realizar estudios sobre la evaluación de la liberación focalizada del fármaco sobre las células cancerosas.

HIPÓTESIS

El complejo NMS-PbAE-DOX aumenta *in vitro* la citotoxicidad de la DOX encapsulada, preferentemente sobre células de cáncer MCF-7, debido al incremento en la internalización celular y la liberación focalizada producida por el descenso del pH.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la toxicidad de doxorubicina encapsulada en nanopartículas mesoporosas de sílice recubiertas con Poli (β -amino éster) sobre células MCF-7 y hFB.

Objetivos específicos

1. Sintetizar nanopartículas de sílice (NMS), nanopartículas aminofuncionalizadas (NMS-APTES), Poli (β -amino éster) (PbAE) y NMS-APTES recubiertas con Poli- β -amino éster (NMS-PbAE).
2. Caracterizar las NMS y el complejo NMS-PbAE mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Análisis Termogravimétrico (TGA) y Difracción de Rayos X de Ángulo Bajo (SARXD), y el PbAE, por medio de Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN).
3. Evaluar la eficiencia de encapsulación de Doxorubicina (DOX).
4. Evaluar la citotoxicidad de las NMS, NMS- PbAE, PbAE y NMS-PbAE-DOX en las líneas celulares MCF-7 y fibroblastos humanos (hFB).
5. Evaluar el pH en los medios de cultivo y la liberación de DOX del complejo NMS-PbAE-DOX.

MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo de este trabajo de investigación fue realizado en tres etapas: 1) Síntesis de NMS y aminofuncionalización de éstas con 3-aminopropiltriétoxisilano (APTES). Esta etapa incluye también el recubrimiento con el polímero, para crear el complejo de encapsulación del fármaco DOX, y la caracterización de los materiales obtenidos en cada segmento durante la síntesis utilizando las siguientes técnicas: TEM, SEM, TGA, SARXD, FTIR, RMN, 2) Encapsulación de DOX en el complejo NMS-PbAE, 3) Evaluación de la citotoxicidad de los materiales (NMS, NMS-PbAE, PbAE y NMS-PbAE-DOX) en las líneas celulares hFB y MCF-7, y medición de la concentración de DOX y pH en el medio.

Etapas 1: Síntesis y caracterización de los materiales.

Síntesis de NMS, NMS-PbAE.

La síntesis de las nanopartículas NMS-PbAE se realizó en dos etapas, de acuerdo a lo reportado previamente (Figura 7).^{102,103} En la primera etapa se obtuvieron las nanopartículas de sílice amino-funcionalizadas y en la segunda etapa se incorporó el polímero a las nanopartículas. Brevemente, para la síntesis de las nanopartículas se disolvieron 0.2 g de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) en 96 mL de agua destilada y 0.7 mL de NaOH 2 M, esta solución se agitó mecánicamente y se calentó a 80 °C, posteriormente se añadieron lentamente 1.4 mL de TEOS disuelto en 3 mL de etanol y se mantuvo en agitación a 80 °C durante 2 h, finalmente se filtró y se dejó secar a temperatura ambiente por una noche. El producto de la reacción anterior fueron las NMS, las cuales fueron resuspendidas en una solución de tolueno y a una cantidad específica de APTES (15% mol respecto al TEOS utilizado para obtener las nanopartículas), y se llevó a reflujo durante 6 h para la amino-funcionalización. Para extraer el surfactante, el producto fue resuspendido en etanol y 1 mL de ácido clorhídrico. Se dejó en reflujo durante 24 h y finalmente la solución fue filtrada. Las nanopartículas obtenidas fueron lavadas con etanol y se dejaron secar en una estufa a 100 °C y vacío durante una noche. Estas muestras fueron llamadas NMS-APTES.

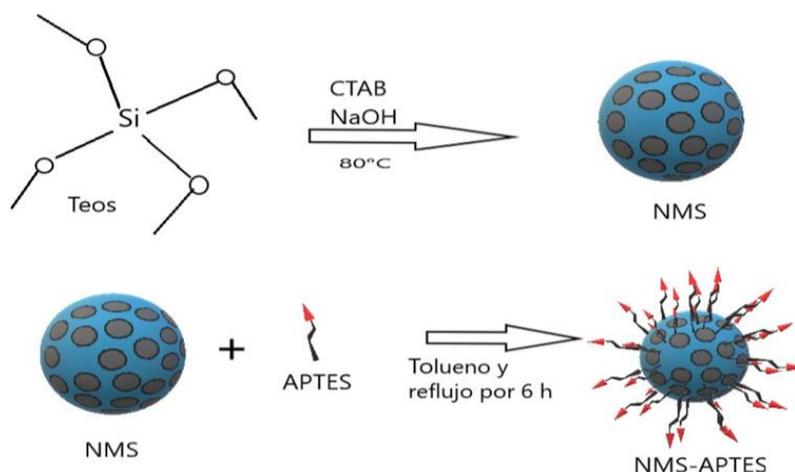


Figura 7. Síntesis de las nanopartículas de sílice funcionalizadas con APTES.¹⁰⁴⁻¹⁰⁵

El primer paso para la modificación de las NMS-APTES fue la obtención de un PbAE con finales acrilados. Para esto se llevó a cabo una síntesis previamente reportada, que involucra reacciones de Michael, entre grupos amino y grupos diacrilato⁷². Se mezclaron los monómeros 1-4 butanodiol diacrilato y 4-4 trimetilendipiperidina, en una relación molar 1.2:1 de acrilato: amina, con el fin de obtener el PbAE con terminaciones acrilato, éstos reaccionaron con los finales aminados del APTES (Figura 8). Posteriormente, se preparó una solución de 800 mg de polímero que fue disuelto en THF y posteriormente se agregaron 400 mg de las NMS amino-funcionalizadas con APTES. Esta adición se realizó para que los grupos amino presente superficie de las NMS reaccionen con los finales acrilados del PbAE. Estas muestras fueron denominadas NMS-PbAE.

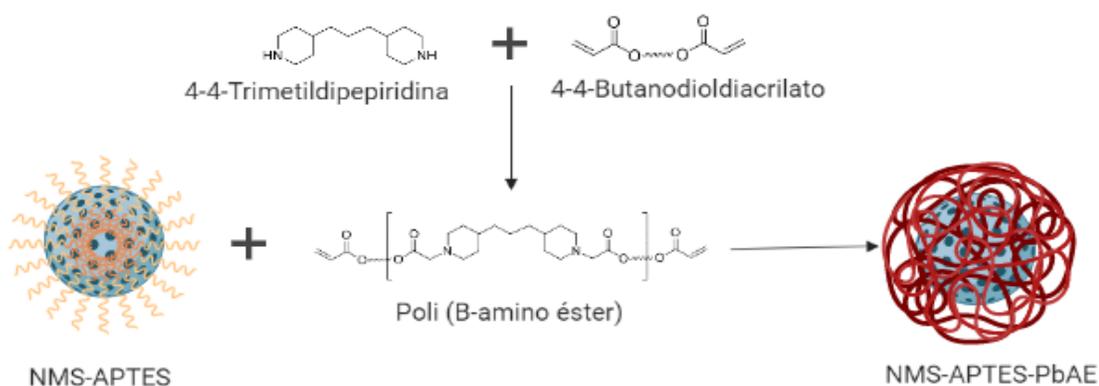


Figura 8. Síntesis de PbAE y NMS-PbAE.

Caracterización de NMS, NMS-APTES, NMS-PbAE y PbAE.

Distintas técnicas fueron empleadas para caracterizar los materiales sintetizados. La estrategia de caracterización fue realizada de acuerdo a la Tabla 4.

Tabla 4. Técnicas utilizadas para la caracterización de cada material sintetizado.

| Material | Técnica de caracterización | | | | | |
|-----------|----------------------------|-----|-------|------|-----|-----|
| | SEM | TEM | SARXD | FTIR | RMN | TGA |
| NMS | • | • | • | | | |
| NMS-APTES | | | • | • | | |
| PbAE | | | | • | • | |
| NMS-PbAE | | • | | • | | • |

SEM: Microscopía electrónica de barrido, TEM: Microscopía electrónica de transmisión, SARXD: Difracción de rayos X de ángulo bajo, FTIR: Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier, RMN: Resonancia magnética nuclear, TGA: Análisis termogravimétrico, NMS: Nanopartículas de sílice, NMS-APTES: Nanopartículas de sílice aminofuncionalizadas con 3-aminopropiltrióxido de silano, PbAE: Poli (β -amino éster).

Microscopía electrónica de barrido

Para corroborar la forma y el diámetro de las nanopartículas, se utilizó Microscopía electrónica de barrido (SEM). Este análisis se utilizó porque permite obtener imágenes con magnificación de 12 X-1000. Para esto, las nanopartículas fueron recubiertas de oro y se empleó un microscopio JEO, modelo JSM-7600F.

Microscopía electrónica de transmisión

El ordenamiento de los poros en las nanopartículas de las NMS se corroboró mediante Microscopía electrónica de transmisión (TEM). Asimismo, se empleó para corroborar la presencia de PbAE en el complejo NMS-PbAE. Para tal efecto, se empleó un microscopio JEOL-2100 de 200 kV con filamento de LaB6.¹⁰⁴

Difracción de rayos X de ángulo bajo

Para conocer el ordenamiento de los mesoporos de las NMS y de las NMS-APTES se empleó difracción de rayos X de ángulo bajo (SAXRD). Para tal efecto, se utilizó un difractómetro Bruker D-8 Advance con tubo Cu Kalfa 1 con un tiempo de paso de 0.5 segundos y con un tamaño de paso 0.009 grados y rango de 0.8° a 10° 2 θ

Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier

Las NMS-APTES, NMS-PbAE y PbAE fueron caracterizadas por FTIR, el cual se utilizó para conocer las vibraciones de los enlaces formados y determinar la presencia de grupos funcionales en los compuestos. Para obtener los espectros de FTIR, se utilizó el método de reflectancia total atenuada (ATR). Las muestras se corrieron en el intervalo espectral de 4000-400 cm⁻¹ con una resolución de 16 barridos.⁷⁷ Para tal análisis se utilizó el Espectrófotometro FT_IR Thermo Scientific Nicolet 380.

Resonancia magnética nuclear

El PbAE fue analizado mediante RMN. El espectro utilizado en esta técnica fue el monodimensional de H^1 , el cual proporciona información respecto a los grupos funcionales y la cantidad de hidrógenos unidos a carbonos. Asimismo, permite información más detallada sobre la estructura, mediante la comprensión de los diferentes entornos químicos.¹⁰⁵ Para el análisis, se colocaron 5 mg de PbAE y posteriormente se añadieron 5 mL de cloroformo deuterado en viales para RMN. Los datos se obtuvieron utilizando un equipo Bruker Avance Ultrashield (400 Mhz) con una sonda BBO de 5 mm. Los desplazamientos químicos fueron reportados en ppm referidos a la señal residual del disolvente deuterado empleado.

Análisis Termogravimétrico

Para conocer el porcentaje de fase orgánica y la temperatura de descomposición de PbAE que recubre a las NMS-PbAE se empleó la técnica de TGA. La muestra se calentó de 30 °C hasta 800 °C con una tasa de calentamiento de 10 °C por minutos en atmósfera de nitrógeno.

Etapas 2: Encapsulación de DOX.

Encapsulación de DOX

Para la encapsulación de este compuesto anticancerígeno, se utilizaron procedimientos previamente reportados, con algunas variaciones.⁹⁸ En este método se utilizaron 10 mL de una solución de DOX en agua destilada con una concentración de 1 mg/mL, cuyo pH fue ajustado a 8.5 con NaOH 0.1 M, posteriormente se añadieron 40 mg de NMS-PbAE y se resuspendieron mediante sonicación durante 2 h, después la solución se dejó en agitación mecánica durante 24 h. Al final de este periodo, la solución fue centrifugada para recuperar las nanopartículas y el sobrenadante fue utilizado para la determinación de la cantidad de compuesto encapsulado.

Determinación de la eficiencia del fármaco encapsulado en las NMS-PbAE.

Debido a que la DOX es un compuesto que da señal en el espectrofotómetro UV-Vis,⁹⁷ el sobrenadante obtenido al final del proceso de encapsulación fue analizado mediante espectrofotometría UV-Vis para determinar de manera indirecta la cantidad de fármaco cargado en las nanopartículas. Dicho análisis fue realizado a las longitudes de onda de 480 nm. Además, se hizo una curva de calibración de DOX para calcular la cantidad de fármaco encapsulado. La eficiencia de encapsulamiento del fármaco fue calculada según la siguiente Ecuación 1:

$$E = \frac{F_c - F_s}{F_c} \quad (1)$$

Donde E es la eficiencia de encapsulamiento en porcentaje, F_c es el fármaco en la solución de carga y F_s es el fármaco en el sobrenadante.

Etapa 3. Citotoxicidad del sistema de liberación NMS-PbAE-DOX y sus componentes y liberación de DOX.

Líneas celulares y cultivo

En el presente estudio se utilizó la línea celular MCF-7 por ser una línea de cáncer de mama, uno de los principales tipos de cáncer que afectan a la población mundial y para el cual se emplea DOX como tratamiento quimioterapéutico. Asimismo, se empleó una línea de fibroblastos humanos (hFB) como grupo control para evaluar el efecto de la DOX en células saludables. Las células se cultivaron de manera rutinaria en Medio Modificado Eagle de Dulbecco (DMEM-F12) sin rojo fenol (Sigma-Aldrich, cat. D2906) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Biowest, cat. Bio-S1650) y 1% de antibiótico-antimicótico (gibco, 15240-062) a 37 °C, 5 % de CO₂ y atmósfera humidificada. Al medio preparado de esta manera se le denominó medio completo.

Durante el cultivo continuo, pases fueron realizados de manera rutinaria cuando las células alcanzaron 75% de confluencia. Para tal efecto, el medio de las células fue eliminado y las células fueron lavadas con 10 mL de PBS 1 X. Al término, 5 mL de tripsina 0.025% fueron adicionados y se dejó actuar por 5 min. Luego, se adicionaron 5 mL de medio y la suspensión celular fue recuperada y centrifugada a 1000 rpm durante 5 min. Con las células de cada caja de 75 cm² se inoculó una caja nueva con 1/4 del pellet y las células restantes fueron congeladas.

Para la congelación las células fueron resuspendidas en medio con 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO). Se congelaron células aproximadamente a 5x10⁵ cel/mL en 1 ml de medio. El procedimiento para congelación consistió en colocar los viales a 4°C por 0.5 h, una vez pasada la media hora los viales se colocaron por 2 h a -20 °C. Al término, los viales fueron resguardados a -80 °C o en nitrógeno líquido.

Cuando fue necesario, las células en el vial fueron descongeladas. Brevemente, el vial fue atemperado y cuando se observó descongelamiento de la solución, el contenido del vial fue colocado inmediatamente en 5 ml de medio en un tubo cónico de 15 mL. Las células fueron centrifugadas a 1000 rpm por 5 min y el pellet fue resuspendido en 10 mL y colocado en cajas T de 75 cm².

Conteo celular y determinación de viabilidad.

Para el conteo celular se tomaron aproximadamente 200 μL de células en suspensión, obtenidas al despegar con tripsina. A esta muestra se adicionó 10% de azul de tripano y 20 μL fueron colocados en una cámara de Neubauer. Las células fueron contabilizadas de acuerdo al procedimiento tradicional.¹⁰⁶ Las células azules fueron consideradas como muertas.

Preparación de muestras para pruebas de toxicidad

En una primera etapa se evaluaron las partículas NMS, PbAE y NMS-PbAE. Para tal efecto, se pesaron 300 μg de cada material y se le añadieron 15 mL de Solución Buffer Fosfato (PBS, cat. 56064C para tener una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Posteriormente se sonicaron los tres materiales hasta dispersar completamente el material por 5 min. Al término se dejaron en la campana de bioseguridad bajo luz UV durante 15 min y se procedió hacer las diluciones.

Para las diluciones se tomaron 2 mL de cada solución stock (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se agregaron en tres tubos cónicos (uno por cada material) de 15 mL. En esos mismos tubos se añadieron 2 mL de medio DMEM sin rojo fenol preparado a una concentración al 2X para tener una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en medio final a 1X. Posteriormente se hicieron diluciones seriadas para obtener soluciones a 10, 5 y 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por cada muestra.

Inoculación de placas para pruebas de toxicidad

Para las pruebas de toxicidad se emplearon células crecidas y recuperadas como se describió previamente. De acuerdo con el conteo celular, se calculó para preparar un inóculo para sembrar 100 μL a una concentración de 2×10^4 células por pocillo de una placa de cultivo de 96 pozos. Se empleó medio de cultivo completo. A las 24 h después de la siembra se colocaron los materiales a evaluar.

Evaluación de la citotoxicidad de los materiales (NMS, PbAE y NMS-PbAE).

Para verificar que no exista toxicidad generada por los materiales del complejo, sin DOX, se realizaron dos pruebas colorimétricas indirectas para calcular la viabilidad respecto a un control. La viabilidad fue determinada por las técnicas de bromuro de 3-(4,5-dimetildiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) y Cristal Violeta (CV). En el caso de la técnica de MTT ésta se fundamenta por la reducción metabólica del MTT por deshidrogenasas mitocondriales de células viables, formando un compuesto formazan de color púrpura. Lo anterior permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células que han sido tratadas y, de manera indirecta, permite determinar el porcentaje

de células viables después de un tratamiento comparado con controles no tratados.¹⁰⁷ Debido a que se ha reportado que la DOX, influye en la actividad mitocondrial de las células,¹⁰⁸ se propuso también evaluar la toxicidad por la técnica de CV. Esta última es un método simple para teñir las proteínas y ADN de las células que se encuentran adheridas a una superficie de cultivo. Como es sabido que las células dañadas pierden su capacidad de adherencia a las superficies de cultivo, esto permite suponer que después de lavados, las células remanentes en la superficie son viables. Por lo que pueden ser teñidas y comparadas contra un control de células sin tratar.¹⁰⁹

Para ambas técnicas, las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos como se describió previamente y fueron tratadas con los materiales por 48 h. Para evaluar la citotoxicidad de los materiales, se colocaron 3 concentraciones de NMS, PbAE y el complejo NMS-PbAE (2.5, 5, 10 µg/mL) preparados en medio de cultivo. Brevemente, a las 24 h de inoculación de las placas, se eliminó el medio y se colocaron las muestras por triplicado. Como control negativo se usó solo medio de cultivo. Luego, las placas se incubaron por 48 h a las condiciones normales de cultivo. Al término, la viabilidad fue determinada por las técnicas de CV y MTT como se describe a continuación.

Para la técnica de CV, al término del tratamiento, el medio de los pozos fue retirado y las placas fueron lavadas dos veces con agua corriente y secados sobre un papel absorbente. Después, 50 µL de CV fueron adicionados a cada pozo y se dejaron incubando durante 30 min. Al término, el colorante fue retirado cuidadosamente y los pocillos fueron lavados nuevamente con agua corriente para eliminar el exceso de colorante. Seguido de esto, se añadieron 100 µL de DMSO empleado para resuspender el colorante. Los resultados fueron interpretados y representados de acuerdo al porcentaje de inhibición (%) de la viabilidad celular, calculado con respecto a las células sin tratar, de acuerdo a la Ecuación 2.

$$\% \text{ inhibición} = \%I = \left(1 - \frac{\text{Absorbancia de células tratadas}}{\text{Absorbancia de células sin tratar}} \right) * 100 \quad (2)$$

Para la evaluación por la técnica de MTT, al término de las 48 h se agregaron 20 µL de MTT a cada pozo, sobre el medio de cultivo, y se dejó incubar durante 4 h. Al término, el medio con el reactivo fue retirado cuidadosamente y se adicionó 100 µL de DMSO para resuspender los cristales formados. El porcentaje de inhibición fue calculado con la Ecuación 2.

Pruebas de toxicidad de DOX libre sobre células MCF-7 y hFB

Para determinar la concentración de DOX en la que ejerce un efecto citotóxico sobre las líneas celulares MCF-7 y hFB, se realizaron pruebas de toxicidad como se describió previamente, evaluando la viabilidad celular por la técnica de CV, debido a que no se encontró diferencia entre los resultados de las pruebas previas con MTT y CV. En estos ensayos se probaron cinco concentraciones de DOX (50, 100, 150, 200 y 250 μM) disueltas en medio completo. La concentración que redujo la viabilidad celular aproximadamente en un 50% fue empleada para cargar en el complejo NMS- PbAE-DOX.

Pruebas de toxicidad del complejo NMS-PbAE-DOX sobre células MCF-7 y hFB

Para la etapa de la evaluación de la citotoxicidad por la liberación de doxorubicina del complejo NMS-PbAE-DOX, las células se sembraron siguiendo la metodología descrita previamente en la etapa 3, utilizando las mismas técnicas, MTT y CV. El porcentaje de la viabilidad se calculó con la Ecuación 2, descrita previamente.

Liberación de DOX dependiente del pH

La liberación de DOX del complejo NMS-PbAE-DOX fue determinada en el medio de cultivo de células expuestas al complejo. Para tal efecto, placas de 24 pozos fueron inoculadas con células de MCF-7 y hFB a 2×10^4 cel/pozo en 1 mL de medio completo. A las 24 h, el medio fue eliminado y el complejo fue añadido a una concentración final de 100 μM respecto a la DOX, y la muestra del medio fue tomada cada hora durante 6 h. Pozos sin células y con DOX libre fueron usados como control. El pH del medio y la absorbancia fueron medidos a las muestras, con un potenciómetro Thermo Electron Corporation (Orion 320) y un espectrofotómetro Thermo Fisher Scientific (4001). La concentración de DOX fue determinada de acuerdo a una curva de absorbancia respecto concentración.

Análisis de datos

Los valores obtenidos de las pruebas *in vitro* fueron expresados como el promedio \pm desviación estándar (DE) del experimento por triplicado. Los datos se analizarán usando la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de las pruebas *post hoc* de Dunnett y Tukey. Los valores con un nivel de $p < 0.05$ se considerarán como estadísticamente significativos en comparación con el grupo control. Asimismo, los valores obtenidos de las pruebas estadísticas se encuentran en los anexos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de esta investigación son presentados de acuerdo a las etapas de desarrollo.

Etapa 1: Síntesis y caracterización de las NMS, NMS-APTES, PbAE Y NMS-PbAE.

En esta etapa se obtuvieron las NMS. Un gramo fue resguardado para los análisis SARXD, TEM y SEM. Asimismo, las NMS fueron aminofuncionalizadas y analizadas por SARXD y FTIR, de las cuales se tomó 1 g para sus análisis (TEM y SEM). Finalmente se sintetizó el polímero y se tomaron 200 mg para la caracterización por RMN y FTIR. Por último, las NMS-APTES fueron recubiertas por PbAE y el complejo fue caracterizado por TGA, TEM y FTIR.

Los resultados de caracterización obtenidos durante cada fase de la síntesis se presentan a continuación.

Análisis de FTIR.

Mediante la técnica FTIR se pudo identificar los enlaces químicos de los siguientes materiales: NMS-APTES, NMS-PbAE y PbAE. Las NMS-APTES presentaron los siguientes picos característicos de Silicio: estiramiento simétrico del enlace Si-O-Si a 1081 cm^{-1} y el pico que se encuentra aproximadamente a 950 cm^{-1} representa la flexión de Si-OH (Figura 9c).¹¹⁰ Adicionalmente los picos representativos de los grupos aminados están representados por las señales a 1634 cm^{-1} y 800 cm^{-1} los cuales corresponden a los grupos aminos protonados y la vibración de tipo torsión de los grupos amino respectivamente.^{102,111} El espectro del polímero (Figura 9a), muestra picos a 2930 cm^{-1} y 2850 cm^{-1} que corresponden a las vibraciones de tensión simétrica y asimétrica, respectivamente, de grupos metil y metileno. De igual manera aparece un pico aproximadamente a 1700 cm^{-1} que representa la presencia de grupos acrilato, los cuales pueden corroborar la estequiometría usada durante la síntesis, este resultado concuerda con los estudios en donde encontraron un pico similar al sintetizar PbAE cuando se utiliza una relación molar de 1.2:1 de acrilato y amina respectivamente.^{75,112} Por otra parte, el espectro del complejo NMS-PbAE (Figura 9b) muestra los picos típicos de los grupos acrilato 1700 cm^{-1} y aproximadamente a 1500 cm^{-1} la típica banda de flexión en el plano que pertenece al enlace =C-H.^{110,112} Estas bandas sugieren la presencia de grupos acrilatos residuales, de acuerdo a Talavera, 2017.⁷⁵

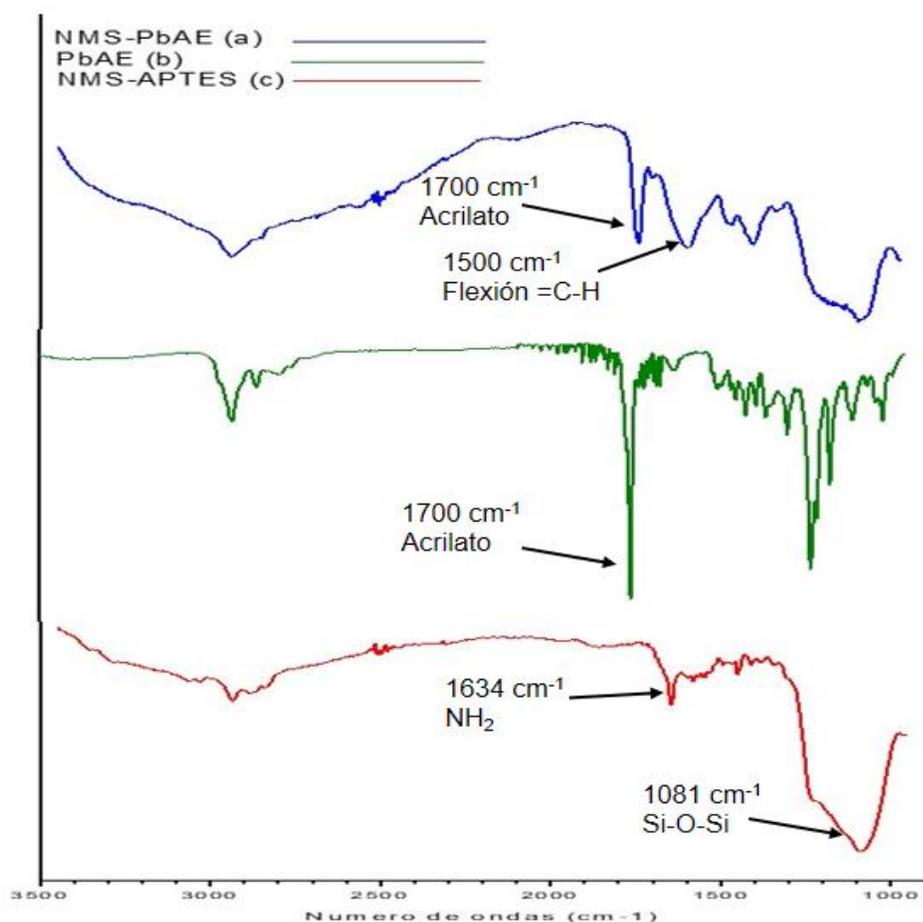


Figura 9. Espectros de FTIR de NMS-APTES, NMS-PbAE y PbAE.

Análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) protónica del PbAE.

El uso del RMN permitió la asignación de los protones del polímero como se muestra en la Figura 10. En esta figura también se puede observar la asignación y desplazamientos de los protones de la cadena principal del polímero de la unidad repetitiva propuesta. Las señales de los grupos acrilato se encuentran localizados a campos bajos en el rango 5.8-6.35 ppm (a, b, c). Cabe resaltar que las señales del grupo acrilato son pequeñas debido a que son pocos comparados con los otros protones de la cadena principal.¹¹³ Las señales entre 4.1 y 4.2 ppm (f, d) son asignadas a los protones de los metilenos que se encuentran a lado de los enlaces éster,¹¹⁴ mientras la señal que se encuentra a 3.7 ppm (g) pertenece a los protones del grupo metileno que fue desplazado a campos bajos debido al grupo amino que se encuentra cercano a él.¹¹⁵ Las señales entre 1.7-2.9 ppm (i, i', m, n, l, k) son asignados a los protones de los metilenos que se encuentran dentro del anillo piperazina y a los grupos etileno cercanos a los

enlaces éster, lo que los desplaza a campos altos. Finalmente las señales que se encuentran en el rango de 1.1-1.3 (q,q',q'',o) son asignados a los protones de la cadena de propileno de la unidad piperidina.¹¹⁶ Esta información es útil porque nos permite corroborar el método de síntesis, ya que los datos muestran que el polímero fue formado a través de la adición conjugada de aminas secundarias con las fracciones acrilato de 1,4-butanodiol diacrilato, esto quiere decir que las aminas terciarias que se forman en la cadena no participarán en la subsecuente adición con los monómeros diacrilato, dando como resultado un polímero lineal y con terminaciones acrilato.¹¹⁷ Como se mencionó anteriormente, este polímero fue sintetizado a través de la reacción del tipo Michael de una amina secundaria a un éster acrilato, esto hace posible que el polímero pueda sufrir una reacción retro-Michael que tendría como producto grupos acrilato libres, particularmente en condiciones ácidas.¹¹⁵ De acuerdo a lo anterior, esto favorecería a la liberación de doxorubicina cuando se encuentre en el microambiente ácido del tumor.

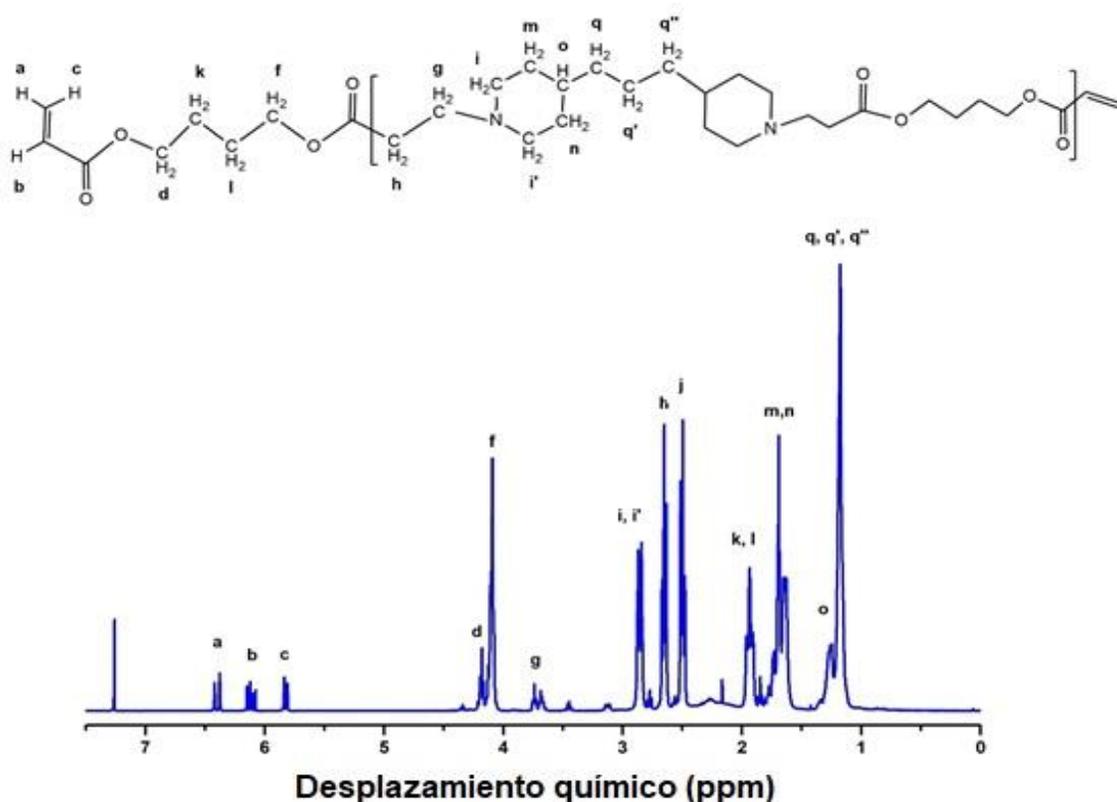


Figura 10. Estructura de PbAE y sus principales señales en el espectro de RMN. Las letras en el espectro indican el protón que es indicado en la estructura molecular superior.

Análisis termogravimétrico del complejo NMS-PbAE.

Esta técnica ayudó a estimar la proporción de componente orgánico de las muestras NMS-PbAE asociados al PbAE. De acuerdo a la Figura 11, se puede apreciar la degradación del material (pérdida de masa) en tres fases, la primera fase de degradación aparece aproximadamente a los 280 °C, este pico representa la pérdida de masa atribuida a la fase orgánica perteneciente al APTES con el que se funcionalizaron las NMS.^{118,119}. Las otras dos fases de degradación se registraron a 335 °C y a 465 °C. Estas dos fases donde ocurre una disminución de la masa es característica de PbAE, en estas etapas ocurre la descomposición de la fase orgánica, atribuida a las cadenas poliméricas que recubren a las nanopartículas, teniendo una masa residual de un 45% (Figura 11).^{120,121}

El porcentaje de la masa residual puede ser atribuido a las NMS, ya que las nanopartículas presentan una gran estabilidad estructural, esto ocasiona que no haya una pérdida de masa significativa a temperaturas elevadas (800 °C).

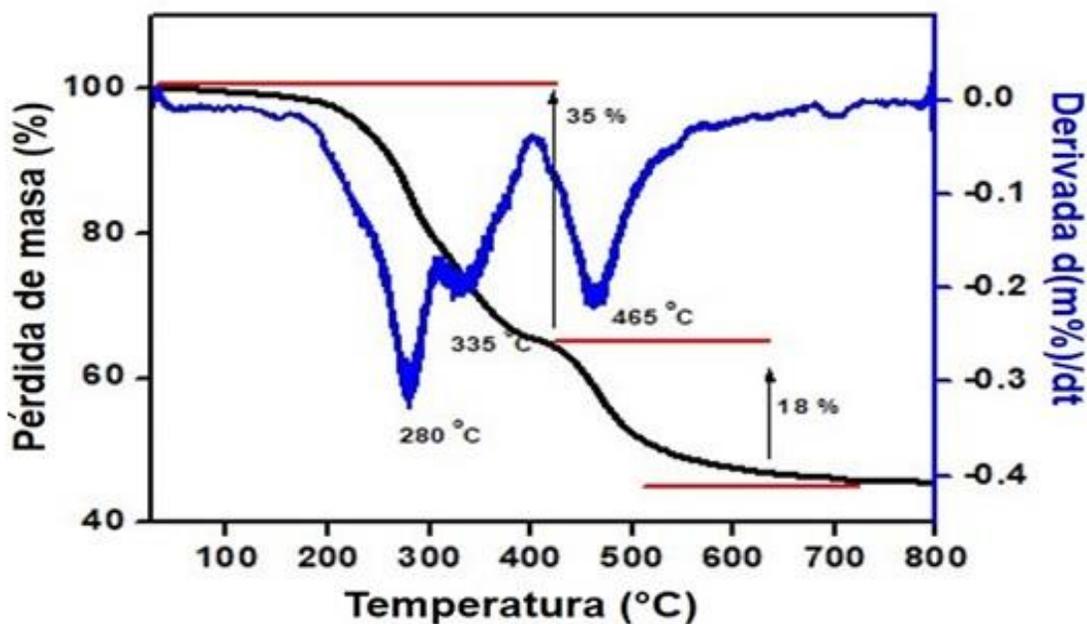


Figura 11. Termograma de NMS-PbAE. La curva de la derivada muestra los principales picos de temperaturas donde hubo un mayor descenso en la masa del material (300°C-600°C).

Análisis de Difracción de rayos X de ángulo bajo: SAXRD.

Si bien esta técnica permite conocer el ordenamiento de los mesoporos de las nanopartículas en una estructura hexagonal, para ello se necesita que los espectros de SAXRD presenten los picos correspondientes a los planos cristalográficos (100), (110) y (200),^{122,123} sin embargo la muestra analizada NMS-APTES solo muestra un pico el cual corresponde al plano (100) (Figura 12b). Esto indica una pérdida de la conformación hexagonal debido a la aminofuncionalización. Sin embargo, esto podría deberse a que el material aminofuncionalizado está recubierto por grupos aminos, los cuales impiden el paso de los rayos X hacia los otros planos. Esto corresponde a lo reportado por Talavera, 2017, quien menciona que la funcionalización no solo se presenta en la superficie de las nanopartículas sino también en los poros, provocando un desordenamiento de la estructura.⁷⁵ Por otra parte, la Figura 12a presenta los tres picos correspondientes a los planos cristalográficos (100), (110) y (200) de la NMS sin aminofuncionalizar, la presencia de los tres picos podría indicar una fácil internalización de los rayos X en los poros, es decir, hay un ordenamiento de los poros.

La literatura indica que las nanopartículas de sílice del tipo MCM-41 poseen una flexibilidad estructural que le permite ser recubiertas por el material con que se funcionalizará, esto hace que se expanda y pierda el ordenamiento. Además, dependiendo de la concentración de APTES durante la aminofuncionalización los picos pueden ser desplazados a ángulos más bajos como se muestra en la Figura 12b.¹²⁴

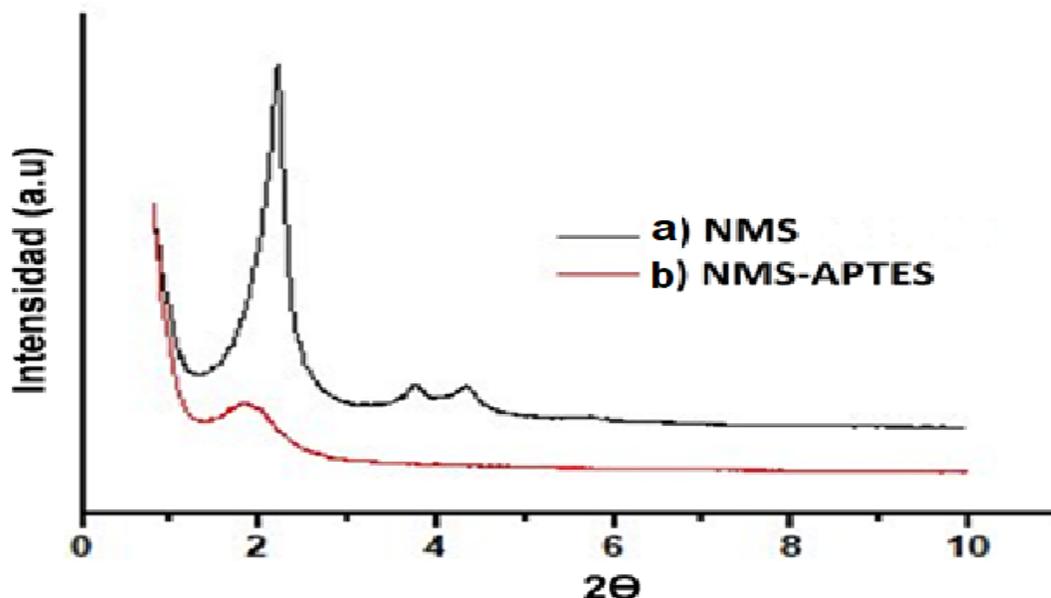


Figura 12. Espectros de difracción de rayos X de ángulo bajo de NMS, y NMS-APTES.

Morfología superficial determinada por SEM

Las NMS fueron caracterizadas mediante SEM para conocer su topología superficial. Como se muestra en la Figura 13, las nanopartículas mostraron una forma esférica, la cual ya ha sido reportada en diferentes trabajos como en el caso de Harun *et al*, 2008 y Sadasivan *et al*, 2006.^{125,126} Sin embargo, en la Figura 13 también se puede apreciar una aglomeración de las nanopartículas, esto se debe a que las NMS interactúan con las nanopartículas vecinas mediante fuerzas de Van der Waals, lo que les otorga una alta energía funcional entre ellas. Asimismo, se puede incrementar la dispersión de las nanopartículas mediante la modificación con distintos grupos funcionales y polímeros, de esta manera se puede mejorar la estabilidad de la dispersión de la sílica.¹²⁷

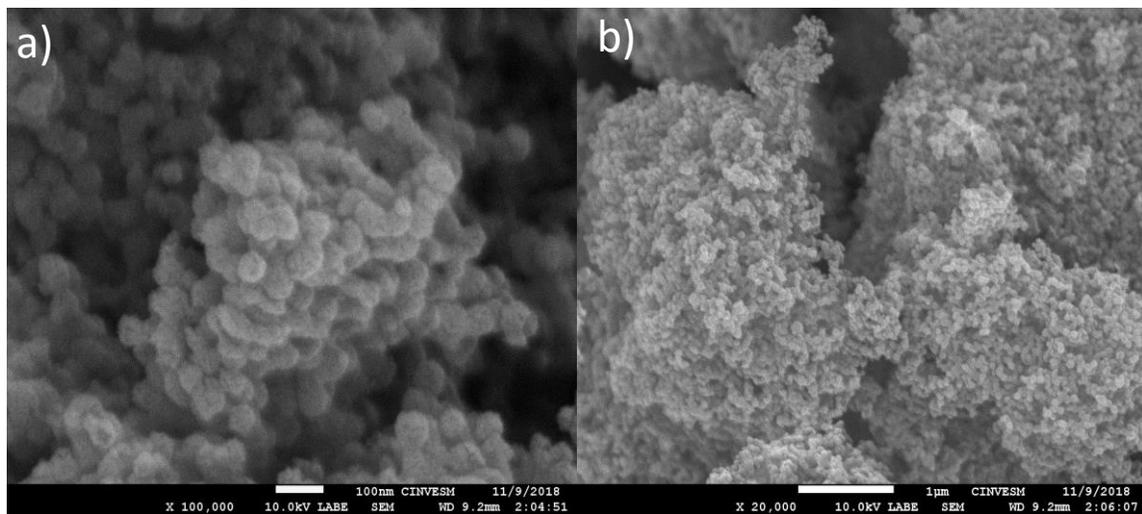


Figura 13. Microfotografías de las NMS realizadas por SEM. La imagen muestra: a) las NMS a 100 nm con una topografía esférica y b) las mismas NMS a 1 μm, además, se muestra la aglomeración de las NMS debido a la alta energía funcional.

Determinación del recubrimiento de PbAE y ordenamiento de los poros mediante TEM

Las microfotografías obtenidas por TEM ofrecieron información que apoya las técnicas anteriores referentes a las características morfológicas, como son el ordenamiento geométrico de los poros presentes en las nanopartículas recubiertas con el polímero como en las nanopartículas sin funcionalizar. Como se aprecia en la Figura 14a de las NMS, éstas presentan un arreglo de los poros conocido como estructura de panal de abejas, el cual corresponde al ordenamiento de los poros en forma hexagonal.⁹⁰ En estos casos, la Figura 14a muestra un mayor ordenamiento debido a la falta de funcionalización, este análisis permitió corroborar el resultado obtenido por SAXRD, el

cual demostró que al funcionalizarse hay una aparente pérdida del ordenamiento debido a que los poros son saturados de los grupos aminos o del polímero.

Por otra parte, la Figura 14b muestra un recubrimiento tipo anillo amorfo, atribuido al recubrimiento polimérico (flecha negra) que recubre la superficie de las NMS.^{128,129}

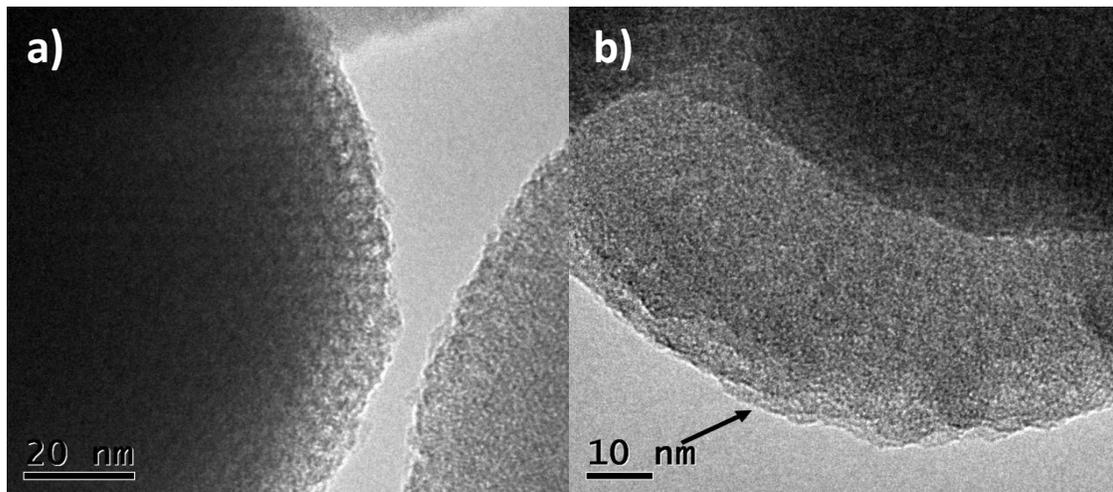


Figura 14. Microfotografías de las NMS y NMS-PbAE obtenidas por TEM. a) NMS sin aminofuncionalizar, b) NMS-PbAE, la flecha indica el recubrimiento tipo anillo amorfo.

Etapas 2: Eficiencia de encapsulación de DOX.

La DOX se encapsuló en una solución con un pH cercano a 8.5, ya que se ha reportado que valores cercanos al punto isoeléctrico (pI) de la DOX (pI= 8.25) se mejora la eficiencia de encapsulación.⁹⁸ Esto se debe al mantenimiento de la carga neta cercana a cero, lo que disminuye la interacción electrostática con el recubrimiento polimérico.⁷⁵ Sin embargo, la DOX tuvo una eficiencia de encapsulación del $23\% \pm 0.024$. Este porcentaje de encapsulación es muy bajo en comparación con otros tipos de nanopartículas ya que se ha reportado una eficiencia superior, como por ejemplo en nanopartículas mesoporosas tubulares de sílica (nanorods).⁹⁰ La mayor eficiencia en los nanorods se debe a su mayor área superficial y amplio volumen de los poros en comparación con las NMS tipo MCM-41, aunque ambos tipos de nanopartículas posean una organización hexagonal de los poros. Pese a una menor eficiencia de encapsulación por parte de las NMS, éstas presentaron una liberación rápida del fármaco provocando el descenso de la viabilidad celular a las 48 h, en comparación con los nanorods que demostraron un descenso de la viabilidad celular hasta las 72 h.

Etapa 3. Citotoxicidad del sistema de liberación NMS-PbAE-DOX y liberación de DOX.

Evaluación de la citotoxicidad de NMS, NMS-PbAE y PbAE.

Evaluación de la citotoxicidad en hFB.

Para determinar la toxicidad del complejo de liberación sin el fármaco, se evaluó la citotoxicidad de las NMS, PbAE y del complejo NMS-PbAE en fibroblastos por el ensayo CV. En la evaluación de NMS, las células fueron incubadas con los materiales a tres distintas concentraciones cada uno (10, 5 y 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 48 h. Las NMS mostraron una inhibición de la concentración celular en un rango de 5 a 10% (Figura 15a), pero sin diferencia estadística respecto al control ($p > 0.05$). Sin embargo, la norma ISO 10993-5:2009 para la evaluación de materiales, establece una reducción mayor al 30 % en la viabilidad celular para considerar un material como citotóxico. Por lo que se puede establecer que las NMS no son citotóxicas a las concentraciones evaluadas. La poca citotoxicidad de las nanopartículas ha sido reportada en distintas líneas celulares. Rabolli *et al*, 2010,¹³⁰ evaluaron concentraciones de las NMS (40-1080 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en células endoteliales de cordón umbilical humano EAHY926 y 10-93 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en fibroblastos de embrión de ratón suizo 3T3 sin observar una toxicidad significativa en las células. Debido a esto podemos suponer que las nanopartículas de sílice a las concentraciones evaluadas no fueron citotóxicas.

Por otra parte, en la Figura 15b se presentan los resultados obtenidos a partir de la evaluación de la citotoxicidad del complejo NMS-PbAE, mostrando un descenso similar a la concentración anterior, en un rango de 5 a 10 % de inhibición celular en las concentraciones de 10 a 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sin embargo, tal descenso no mostró diferencia estadística respecto al grupo control ($p > 0.05$). Como se ha mencionado, debido a que estas partículas no produjeron un descenso mayor al 30% de viabilidad celular, se consideran no citotóxicas a las concentraciones probadas.

Por último, la Figura 15c muestra que las concentraciones 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PbAE presentan una diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$). Sin embargo, de acuerdo a la norma ISO 10993-5:2009, solo la concentración más alta puede ser considerada citotóxica debido a que produjo un 50% de la inhibición celular. Este resultado fue similar al presentado por Sankaranarayanan *et al*, 2010.¹³¹ Ellos obtuvieron un descenso marcado del porcentaje de viabilidad celular al llegar a una concentración de 11.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esto puede deberse a que se ha reportado que el PbAE, bajo condiciones de acidez, se hidroliza en la cadena los grupos ésteres obteniendo como productos moléculas pequeñas de bis(ácido β -amino) y productos diol, los cuales presentan una relativa toxicidad.

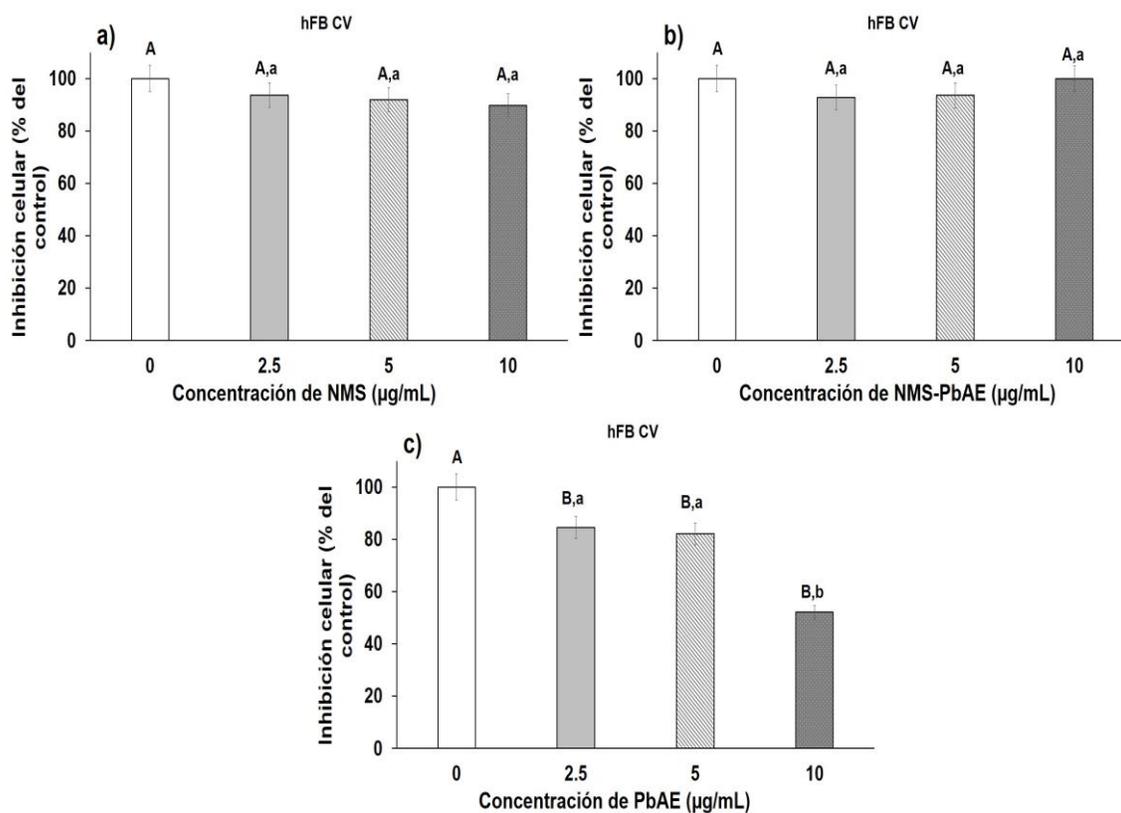


Figura 15. Representación de los porcentajes de inhibición celular de fibroblastos humanos expuestos: a) NMS, b) NMS-PbAE y c) PbAE, determinado por CV. Los resultados representan la media \pm DE de tres experimentos independientes por triplicado. Los datos fueron interpretados mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba post hoc de Dunnett para comparación con el control, y de una prueba de Tukey para la comparación entre tratamientos. Se consideró diferencia estadística a un valor $p < 0.05$. Letras mayúsculas diferentes a “A” representan diferencia significativa con respecto al control y letras minúsculas diferentes representan diferencia estadística entre tratamientos de un mismo ensayo.

De igual manera que el ensayo anterior, se evaluaron los mismos materiales con las mismas concentraciones con la técnica colorimétrica MTT. Como se muestra en la Figura 16a, las NMS no presentaron una diferencia significativa ($p > 0.05$) entre las tres concentraciones utilizadas. Si bien, esto supondría que las nanopartículas a esas concentraciones no son citotóxicas, hay estudios que demuestran que las NMS pueden presentar cierta citotoxicidad la cual depende de la concentración y el tamaño de las nanopartículas (> 250 nm).¹³²

Por otra parte, la Figura 16b muestra el complejo NMS-PbAE no mostró diferencias significativas respecto al grupo control en las concentraciones 2.5, 5 y 10 µg/mL ($p > 0.05$). Este resultado concuerda con el reportado por Isurika *et al*, 2015,⁶⁹ los

cuales evaluaron el complejo NMS-PbAE, y obtuvieron un 40 % de inhibición celular. Esto pudo deberse a la hidrólisis del PbAE que recubre a las NMS ocasionado por el descenso del pH.

Finalmente, en el ensayo de toxicidad de PbAE, las concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ produjeron una reducción de la viabilidad significativa ($p < 0.05$) de un 20% y 40% para 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figura 16c). Sin embargo, solo la concentración más alta puede ser considerada citotóxica, de acuerdo a la norma ISO 10993-5:2009, esto se debe a que produjo un 40 % de inhibición celular. Dicha citotoxicidad producida por el polímero a esas concentraciones pudo deberse al propio peso molecular, debido a que se ha reportado que existe una capacidad limitada de las células para expulsar compuestos de alto peso molecular de su interior. Esto resulta en una mayor acumulación del polímero en el interior celular, el cual es internalizado mediante la endocitosis mediada por clatrina.¹³³ Tal acumulación de PbAE, tiene como consecuencia un incremento de los productos formados a partir de la hidrólisis de los grupos ésteres como se mencionó anteriormente. Sin embargo, en el ensayo anterior, donde se evaluó el complejo NMS-PbAE, no se presentó la misma toxicidad. Esto permite inferir que la cantidad de PbAE que recubre a la NMS no produce tal efecto.

En estos ensayos, además se pudo confirmar que los resultados obtenidos por ambas técnicas resultaron semejantes, lo que puede dar más certeza de la confiabilidad de los resultados.

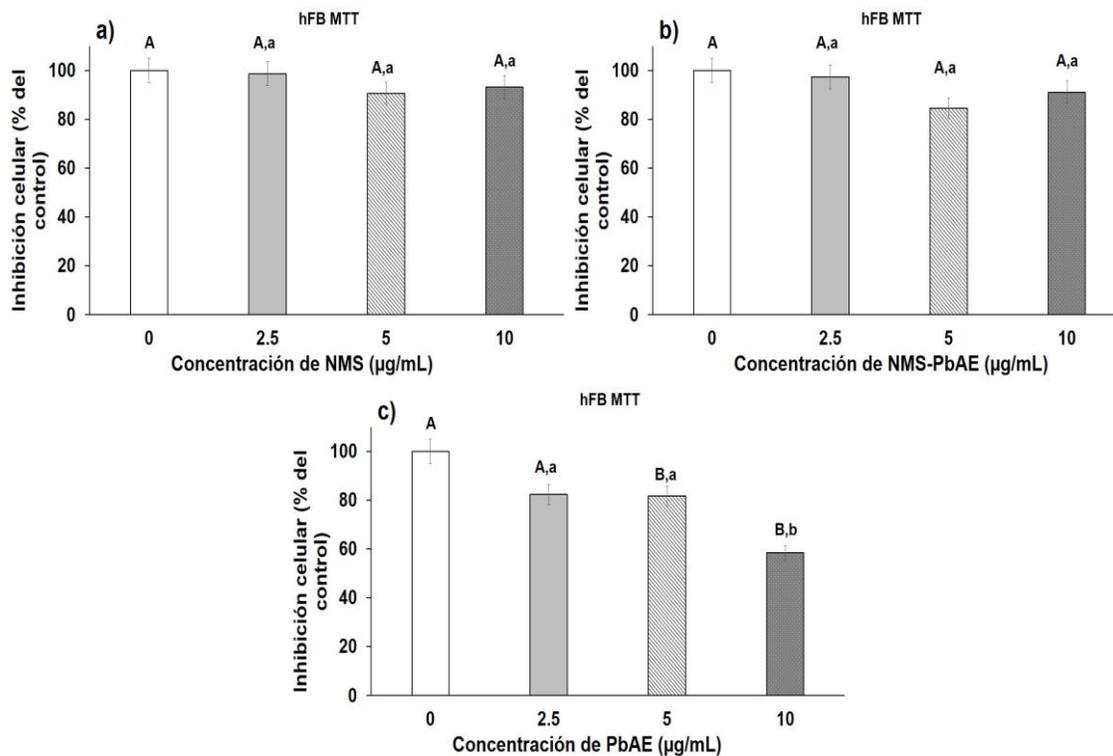


Figura 16. Representación de los porcentajes de inhibición celular de fibroblastos humanos expuestos: a) NMS, b) NMS-PbAE y c) PbAE, determinado por MTT. Los resultados representan la media \pm DE de tres experimentos independientes por triplicado. Los datos fueron interpretados mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba post hoc de Dunnett para comparación con el control, y de una prueba de Tukey para la comparación entre tratamientos. Se consideró diferencia estadística a un valor $p < 0.05$. Letras mayúsculas diferentes a “A” representan diferencia significativa con respecto al control y letras minúsculas diferentes representan diferencia estadística entre tratamientos de un mismo ensayo.

Evaluación de la citotoxicidad en MCF-7.

Sobre las células MCF-7 también se evaluaron las tres concentraciones (2.5, 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$) de las NMS, PbAE y NMS-PbAE. Con esta línea, solo se determinó el efecto citotóxico por la técnica de MTT, dado que no se encontró una diferencia en la viabilidad celular usando CV en las pruebas anteriores. En la Figura 17a se muestra que a las tres concentraciones evaluadas con NMS no se obtuvieron diferencias significativas con respecto al grupo control ($p > 0.05$). De igual forma, en los trabajos de Vivero-Escoto *et al*, 2010 y Raehm *et al*, 2008^{132,134} evaluaron distintas concentraciones de NMS y no hallaron diferencia estadística respecto al control. Sin embargo, se ha comprobado que

las NMS pueden llegar a ser tóxicas si durante la síntesis de éstas no se extrae el surfactante (CTAB).¹³² Por otra parte, el PbAE que recubre a las NMS y libre no mostró diferencia significativa cuando se evaluó con MCF-7 ($p > 0.05$) como muestra la Figura 17b y 17c. En el trabajo de Tang *et al*, 2015, probaron diferentes complejos usando PbAE donde obtuvieron una alta viabilidad celular en MCF-7.⁵⁸ Los autores mencionan que la alta viabilidad pudo ser causada por la resistencia de las células cancerosas al estímulo proapoptótico que es incrementado por los genes *SNAI1* y *TWIST1* (Snail y Twist).¹³⁵

Por otra parte, de acuerdo a los resultados obtenidos en todos los ensayos para evaluar la toxicidad de los componentes del complejo, se puede decir que solo el material PbAE produjo una respuesta de inhibición celular respecto al control, a todas las concentraciones para las células sanas. Lo anterior, confirmado por las dos técnicas MTT y CV. Sin embargo, de acuerdo a la norma ISO 10993-5:2009, se puede decir que solo la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ produce un efecto citotóxico sobre las células hFB.

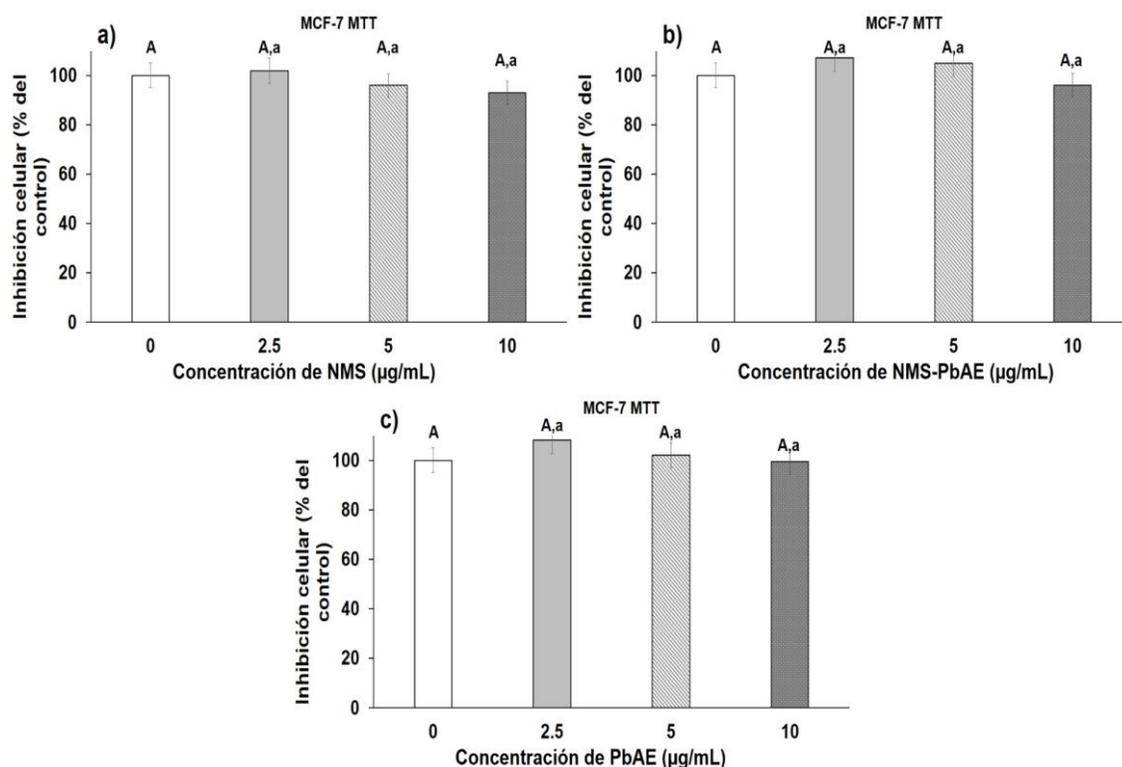


Figura 17. Representación de los porcentajes de inhibición celular de células MCF-7 expuestas: a) NMS, b) NMS-PbAE y c) PbAE, determinado por MTT. Los resultados representan la media \pm DE de tres experimentos independientes por triplicado. Los datos fueron interpretados mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba post hoc de Dunnett para comparación con el control, y de una prueba de Tukey para la comparación entre tratamientos. Se consideró diferencia estadística a un valor $p < 0.05$. Letras mayúsculas diferentes a “A” representan diferencia significativa con respecto al control y letras minúsculas diferentes representan diferencia estadística entre tratamientos de un mismo ensayo.

Estudio de la citotoxicidad del complejo NMS-PbAE-DOX sobre las líneas celulares hFB y MCF-7.

En esta etapa se presentan los resultados de evaluar cinco concentraciones de DOX libre sobre la toxicidad en las líneas celulares MCF-7 y hFB. Este resultado fue empleado para determinar la concentración de DOX a encapsular en el complejo NMS-PbAE-DOX, el cual fue también evaluado sobre ambas líneas celulares. Por último, se determinó la liberación de DOX *in vitro*, con el seguimiento del pH y la concentración de DOX en el medio de cultivo.

Toxicidad de DOX en hFB

El efecto de la DOX sobre la viabilidad celular fue determinado usando la técnica colorimétrica CV. Como se muestra en la Figura 18, la concentración donde se aprecia un descenso en el porcentaje de viabilidad celular fue a partir de la concentración 50 μM . Tal concentración y mayores, provocaron un descenso hasta del 64 % de inhibición celular, pero siendo todos estadísticamente similares entre tratamientos ($p > 0.05$) con excepción de la concentración de 100 μM , presumiblemente se debió a la variación del sembrado de las células en las placas, además, todas las concentraciones fueron estadísticamente diferentes con respecto al control ($p < 0.05$). Este resultado concuerda con el trabajo de Tomankova et al, 2015, en donde evaluaron la citotoxicidad de DOX libre y nanopartículas de Hierro.⁹⁶ En dicho trabajo, la DOX libre produjo un descenso en la viabilidad en fibroblastos muy parecido al presentado en el trabajo.

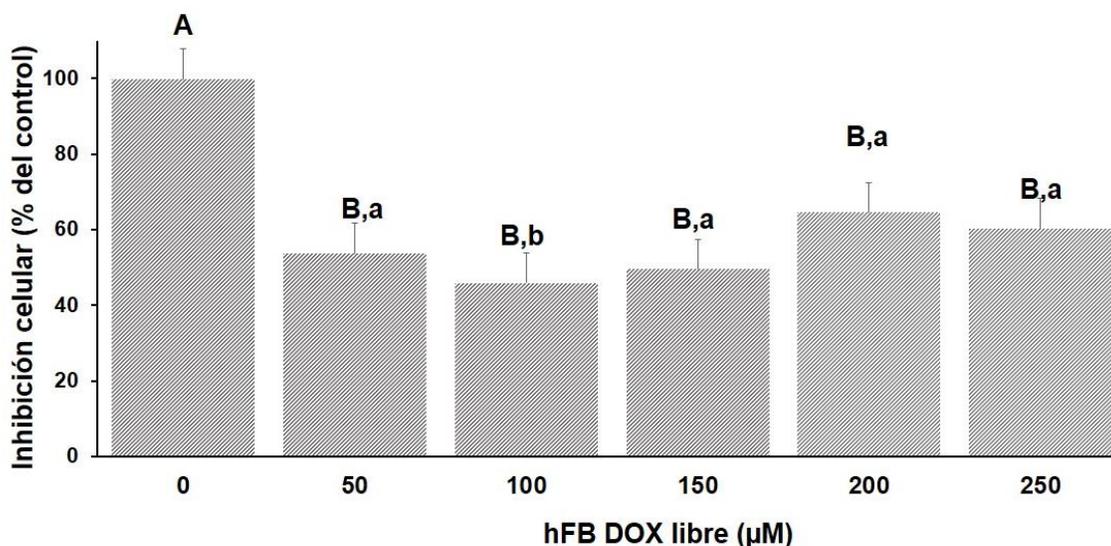


Figura 18. Representación del porcentaje de inhibición celular de hFB expuestas a DOX libre, determinado por CV. Los resultados representan la media \pm DE de tres

experimentos independientes por triplicado. Los datos fueron interpretados mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba post hoc de Dunnett para comparación con el control y de una prueba de Tukey para la comparación entre tratamientos. Se consideró diferencia estadística a un valor $p < 0.05$. Letras mayúsculas diferentes a "A" representan diferencia significativa con respecto al control y letras minúsculas diferentes representan diferencia estadística entre tratamientos de un mismo ensayo.

Toxicidad de DOX en MCF-7

En las células MCF-7, la DOX, al igual que en el estudio anterior, produjo una inhibición mayor al 50% a partir de la concentración de 50 μM . Este descenso, para todas las concentraciones presentó diferencia significativa respecto al control ($p < 0.05$). Sin embargo, como se muestra en la Figura 19, fue a partir de 100 μM donde provocó un 70 % de la inhibición celular. De igual modo, esta concentración junto con las concentraciones de 150 y 200 μM presentaron una diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al tratamiento de 50 μM de DOX. Este resultado similar con el trabajo de Tomankova *et al*, 2015⁹⁶ donde se evaluaron tres concentraciones, siendo la de 50 μM la concentración que provocó un descenso del 70 % en la viabilidad celular de MCF-7.

De acuerdo a Leukemi *et al*, 1986¹³⁶ y Bellamy *et al*, 1988¹³⁷ donde evaluaron el efecto de DOX sobre líneas celulares de leucemia P388 y mielomas 8226 respectivamente, obtuvieron que el descenso en la viabilidad celular era mayor en células cancerosas que el control. Los investigadores postularon que este efecto se debía a los radicales libres producidos por el fármaco y la sobre-expresión, en las células de cáncer, de la glucoproteína de permeabilidad (P-glucoproteína) que pudiera mejorar la internalización del fármaco.¹³⁷

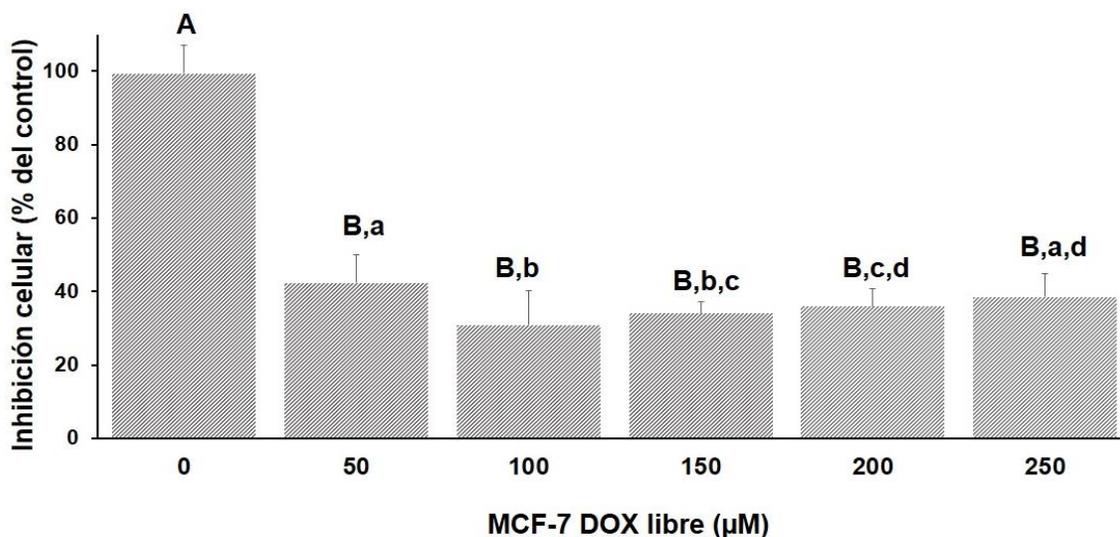


Figura 19. Representación del porcentaje de inhibición celular de MCF-7 expuestas a DOX libre, determinado por CV. Los resultados representan la media \pm DE de tres experimentos independientes por triplicado. Los datos fueron interpretados mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba post hoc de Dunnett para comparación con el control y de una prueba de Tukey para la comparación entre tratamientos. Se consideró diferencia estadística a un valor $p < 0.05$. Letras mayúsculas diferentes a “A” representan diferencia significativa con respecto al control y letras minúsculas diferentes representan diferencia estadística entre tratamientos de un mismo ensayo.

Pruebas de toxicidad del complejo NMS-PbAE-DOX sobre células MCF-7 y hFB.

Finalmente se evaluó la citotoxicidad del complejo NMS-PbAE-DOX en las células MCF-7 y hFB, en donde se obtuvo un descenso significativo ($p < 0.05$) en el porcentaje de la viabilidad celular en ambas líneas celulares con respecto a su respectivo grupo control. Como muestra la Figura 20a; el complejo inhibió un 70 % de las células, mientras la DOX libre produjo un 50 % de inhibición celular, este resultado es similar al obtenido por Isurika *et al*, 2015.⁵⁷ En dicho trabajo probaron un complejo similar al usado en esta investigación en el cual encapsularon a su vez yoduro de propidio junto con DOX y obtuvieron un descenso en la viabilidad celular de células de cáncer de mama MDA-MB-231 debido a la liberación casi completa del fármaco. El descenso abrupto de la viabilidad en MCF-7 se debió, como se ha mencionado anteriormente en los antecedentes, el ambiente extracelular del tejido canceroso es ligeramente ácido. Además, se ha comprobado que las células cancerosas contienen una mayor concentración de esterases lo que provoca una hidrólisis del polímero y de esta forma termina liberando mayor cantidad del fármaco.

Por otra parte, el efecto del complejo NMS-PbAE-DOX en células hFB fue similar al observado MCF-7, ya que el complejo produjo un 60 % de inhibición celular respecto al control, tal descenso se considera significativo ($p < 0.05$), no obstante, no se esperaba que el complejo causara una citotoxicidad similar al producido en MCF-7. Esto porque

los fibroblastos no presentan una alta tasa metabólica en comparación con las células cancerosas que pudieran ocasionar una acidificación del medio teniendo como consecuencia una mayor liberación del fármaco. Sin embargo, la evaluación del cambio del pH demostró que éste fue similar para ambas líneas como se explicará más adelante.

De igual modo, se puede observar una mayor reducción en la viabilidad celular en ambas líneas celulares con el complejo NMS-PbAE-DOX en comparación con la DOX libre, esta reducción solo fue significativa en MCF-7 ($p < 0.05$), mientras que en hFB no hubo una diferencia entre el complejo y la DOX libre ($p > 0.05$) (Figura 20b). Esto concuerda con los trabajos de He *et al*, 2011¹⁴¹ y Shen *et al*, 2011,¹⁴² quienes reportaron una mayor eficacia en la reducción de la viabilidad celular en MCF-7 usando DOX encapsulada en los complejos NMS-CTAB-DOX y en NMS-DOX respectivamente, en comparación con DOX libre. Ellos deducen que eso se puede deber a la mayor eficiencia de internalización celular de las NMS que la DOX. Asimismo, Pan *et al*, 2013,¹⁴³ confirmó mediante Microscopía Confocal Laser de Barrido la internalización de las NMS al núcleo de las MCF-7, mientras que la DOX libre solo se encontraba en el citoplasma durante las primeras 4 h, de esta forma el complejo NMS-DOX mejora el efecto del fármaco.

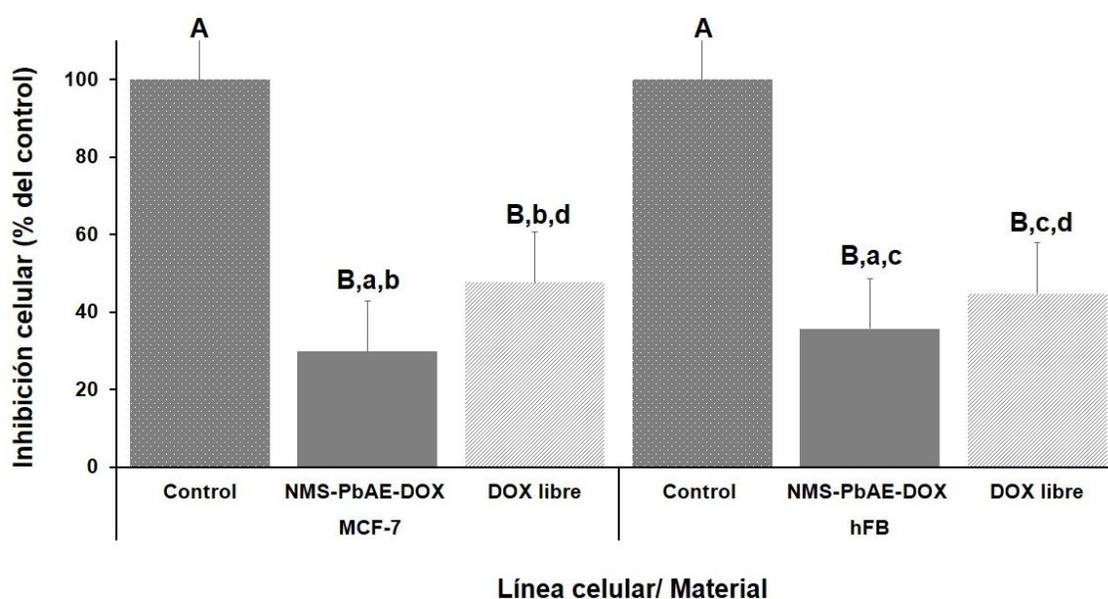


Figura 20. Comparación de la citotoxicidad entre el complejo NMS-PbAE-DOX y DOX libre en ambas líneas celulares: a) MCF-7 y b) hFB. Los resultados representan la media \pm DE de tres experimentos independientes por triplicado. Los datos fueron interpretados mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba post hoc de Dunnett para comparación con el control, y de una prueba de Tukey para la comparación entre tratamientos. Se consideró diferencia estadística a un valor $p < 0.05$. Letras mayúsculas diferentes a “A” representan diferencia significativa con respecto al control y letras minúsculas diferentes representan diferencia estadística entre tratamientos de un mismo ensayo.

Liberación de DOX en medio de cultivo y evaluación del pH del medio.

La evaluación del complejo NMS-PbAE-DOX en medio de cultivo permitió comparar la liberación de DOX encapsulada entre ambas líneas celulares. Como se muestra en la Figura 21 ocurre la liberación en las líneas celulares como en el medio de cultivo sin células en el tiempo 0, es decir, al momento de colocar el complejo cargado con DOX. Esto se debe a que el fármaco no solo fue encapsulado en los poros de las nanopartículas sino que una porción del fármaco quedó retenida en la superficie del sistema de liberación, ya que ocurre una interacción electrostática entre la molécula de DOX con los grupos silanoles de las NMS ¹⁴⁴.

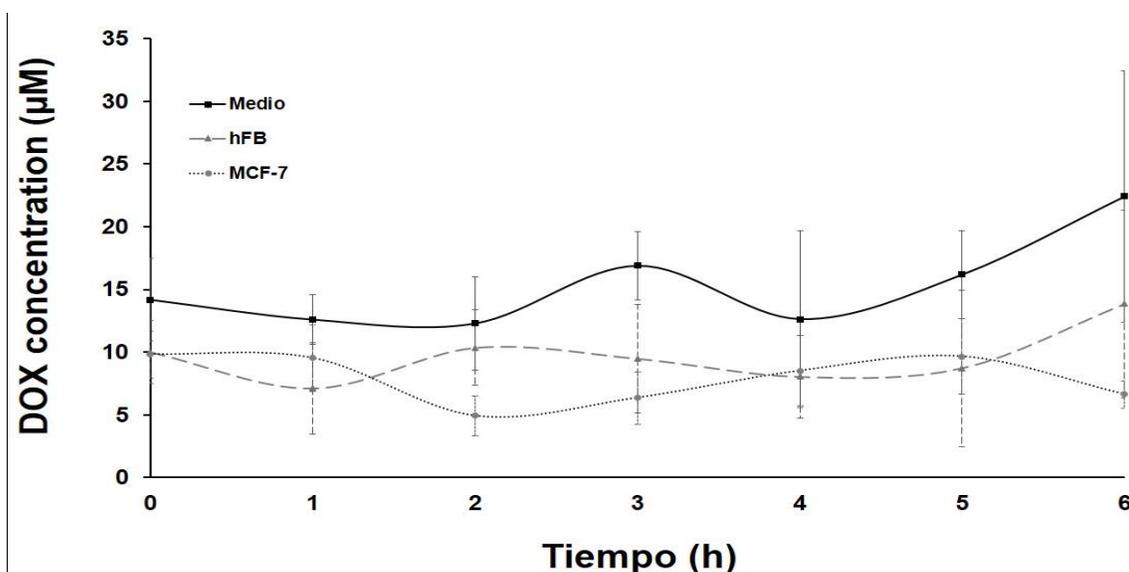


Figura 21. Curvas de concentración de DOX en el medio de cultivo de células hFB y MCF-7 expuestas al complejo NMS-PbAE-DOX: medio (—■—), hFB (-▲-) y MCF-7 (-●-). Los resultados representan la media \pm DE de tres experimentos independientes por triplicado. Se realizó una comparación entre tratamientos al mismo tiempo mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba post hoc de Tukey para la comparación entre tratamientos. Se consideró diferencia estadística a un valor $p < 0.05$.

En la Figura 21 se observa una diferencia en la liberación del fármaco en las líneas celulares con respecto al medio de cultivo. Se esperaba observar que ocurriera una mayor liberación de DOX en el medio con células que en el medio de cultivo control debido al descenso del pH. Sin embargo, se puede apreciar que el medio de cultivo presentó una mayor liberación de DOX, esto puede deberse a que las células pudieron internalizar el complejo, resultando en una menor cantidad del mismo en el medio. Este

comportamiento fue observado en los trabajos de Venkatesan *et al*, 2012 y Mhawi *et al*, 2006.^{145,146} En dichos estudios, se observó que en un lapso de 15 min después de la exposición a un complejo cargado con DOX, la concentración de DOX descendía en el ensayo celular, posteriormente comprobaron que éste se encontraba acumulado en las vesículas citoplasmáticas y en la región perinuclear.

Como puede observarse en la Figura 21, en ambas líneas celulares se presentaron fluctuaciones en la concentración de DOX a lo largo del estudio. A pesar de ellos, a las primeras 5 h no se obtuvo diferencia significativa entre ellas ($p > 0.05$). Sin embargo, a las 6 h hubo un descenso en la concentración de DOX en el medio con MCF-7 respecto a hFB, esto pudo deberse a la mayor eficiencia de endocitosis que presentan MCF-7, lo cual concuerda con lo encontrado en la investigación de Huang *et al*, 2013.¹⁴⁷ En dicho trabajo probaron la endocitosis de nanopartículas de selenio en MCF-7 y células endoteliales de cordón umbilical humano HUVEC, mostrando en la línea celular cancerosa una mayor internalización a los 50 min.

De igual manera, se determinó el cambio del pH durante 6 h en las líneas celulares y en el medio de cultivo. Como se muestra en la Figura 22, el medio de cultivo sin células y el medio con fibroblastos, no presentaron una diferencia significativa durante las primeras 5 h a diferencia con MCF-7 ($p < 0.05$). Esta última presentó un descenso importante en la primera hora y las 6 h con un pH de 6.3 y 5.9, respectivamente. El descenso del pH en MCF-7 se debe a que las células cancerosas a menudo dependen de la glucólisis, lo que refleja su alta demanda de nutrientes, obteniendo al final de la glucólisis el ácido láctico, que se secreta en el microambiente tumoral. Sin embargo, la acidificación del medio en hFB puede explicarse debido al hecho que en cultivo no hay flujo constante de gases (CO_2) como normalmente se tiene *in vivo* ocasionando la acidificación del medio. Esto ocasionó que el complejo liberara el fármaco no sólo en células cancerosas sino también en las células control.^{18,139,140}

Además de esto, la liberación de DOX parece estar correlacionada con el descenso del pH en ambas líneas celulares, ya que durante las primeras 2 h y a las 6 h hubo una mayor acidificación en el medio con MCF-7 que correspondería al descenso de concentración de DOX en el ensayo anterior, esto quiere decir, que se liberó una porción del fármaco dentro de las células.

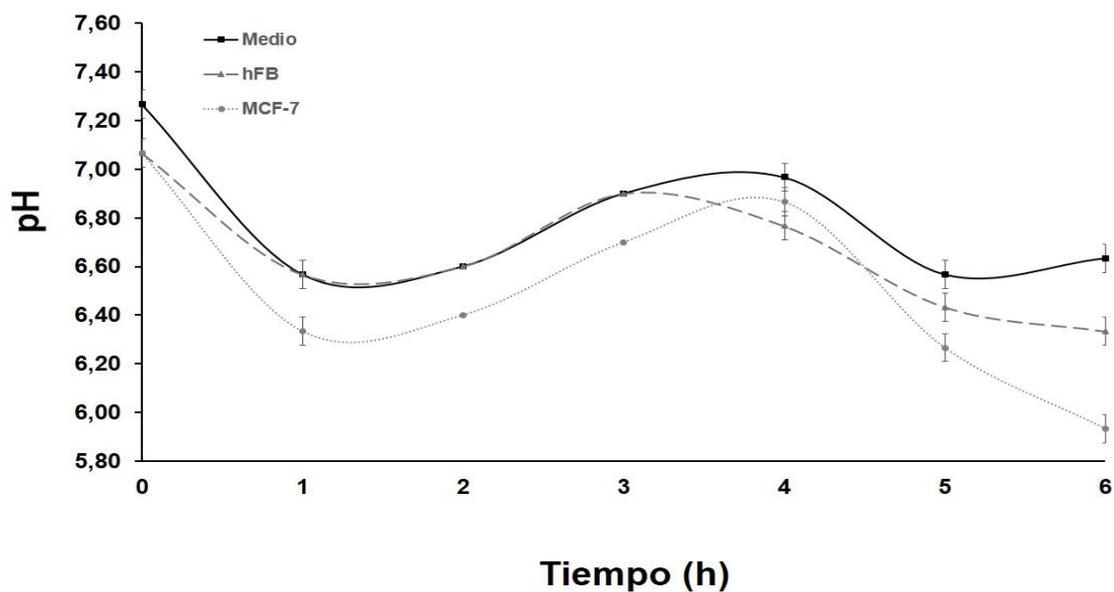


Figura 22. Curvas de pH del medio de cultivo de células hFB y MCF-7 expuestas al complejo NMS-PbAE-DOX durante 6 h: medio (—■—), hFB (-▲-) y MCF-7 (-●-). Los resultados representan la media \pm DE de tres experimentos independientes por triplicado. Se realizó una comparación entre tratamientos al mismo tiempo mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba post hoc de Tukey para la comparación entre tratamientos. Se consideró diferencia estadística a un valor $p < 0.05$.

CONCLUSIONES

El complejo NMS-PbAE se sintetizó y a su vez fue caracterizado mediante distintos análisis que permitieron corroborar la capacidad de encapsular DOX y la integridad del complejo. Asimismo, con la metodología seguida se obtuvo una encapsulación del 23 % de DOX en el complejo NMS-PbAE.

Por otra parte, la evaluación *in vitro* de los componentes del complejo NMS, NMS-PbAE y PbAE, demostraron una compatibilidad con las células MCF-7 y hFB en el mayor de los casos, a excepción de PbAE a 10 µg/ mL. Pese a esto, el complejo sin DOX, demostró una escasa toxicidad sobre las células empleadas. El principal resultado obtenido de esta investigación es la comprobación del incremento en el efecto citotóxico del complejo sobre la línea celular de cáncer MCF-7, comparado al empleo de la doxorubicina libre. Sin embargo, en la línea de células sanas también hubo un efecto tóxico con el complejo, lo que indica baja especificidad de la liberación en modelos *in vitro*. Esto puede ser explicado por la reducción similar en el pH del medio, en ambas líneas celulares tratadas con el sistema NMS-PbAE-DOX.

En conclusión, en este trabajo se puede confirmar el incremento en la toxicidad del fármaco doxorubicina encapsulada en el complejo NMS-PbAE-DOX, pero sin una liberación específica sobre células cancerosas.

REFERENCIAS

- (1) Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Ervik, M.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D. M.; Forman, D.; Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. No. 11 [Internet].
- (2) Kumar, V.; Abbas, A.; Aster, J. *Robbins. Patología Humana*, Novena.; 2013.
- (3) Tirado Gómez, L. L.; Moha Betancourt, A. Epidemiología de Las Neoplasias Hemato-Oncológicas. *Inst. Nac. Cancerol.* **2007**, 2, 109–120.
- (4) America Cancer Society. Datos y Estadísticas Sobre El Cáncer Entre Los Hispanos/Latinos. *Soc. Am. Contra El Cáncer* **2014**, 40.
- (5) INEGI. DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER (4 DE FEBRERO)". **2018**, 1–13.
- (6) INEGI. Estadísticas a Propósito Del Día Mundial Contra El Cáncer. Datos Nacionales. *Inegi* **2017**, 1–14.
- (7) Soto-Estrada, G.; Moreno-Altamirano, L.; Pahua Díaz, D. Panorama Epidemiológico de México, Principales Causas de Morbilidad y Mortalidad. *Rev Fac Med* **2016**, 59 (6), 8–22.
- (8) Mc, A. M.; C, D.; Bargalló, E.; Ramírez, M. T.; Lara, F.; Beltrán-ortega, A. Recursos Disponibles Para El Tratamiento Del Cáncer de Mama En México. **2009**, 51 (1), 263–269.
- (9) Yang, K.-N.; Zhang, C.-Q.; Wang, W.; Wang, P. C.; Zhou, J.-P.; Liang, X.-J. PH-Responsive Mesoporous Silica Nanoparticles Employed in Controlled Drug Delivery Systems for Cancer Treatment. *Cancer Biol. Med.* **2014**, 11 (1), 34–43.
- (10) Cho, K.; Wang, X.; Nie, S.; Chen, Z. G.; Shin, D. M. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. **2008**, 14 (5), 1310–1317.
- (11) Victoria Roblero-Bartolón Eva Ramón-Gallegos, G.; Ramón-Gallegos Wilfrido Massieu, E.; cda Manuel Stampa Zacatenco Del Gustavo Madero, esq A. Uso de Nanopartículas (NP) En La Terapia Fotodinámica (Photodynamic Therapy [PDT]) Contra El Cáncer. *Gac. Med. Mex.* **2014**, 151, 85–98.
- (12) Beltrán, D. Á.; Marisela, A.; Franco, M.; Lomas, L.; Hugo, V.; Corona, L.; Cárdenas, J.; Negrón, G. Preparación de Materiales Mesoporosos Tipo Ti-MCM-41 y Su Uso En La Apertura Nucleófila de Epiclorhidrina Con L-Prolinol. **2003**, 47 (2), 155–159.
- (13) Llinas, M. C.; Sánchez, D. Nanopartículas de Sílice: Preparación y Aplicaciones En Biomedicina. *Affinidad* **2014**, LXXI (565), 20–31.
- (14) Shenoy, D.; Little, S.; Langer, R.; Amiji, M. Poly(Ethylene Oxide)-Modified Poly(β -Amino Ester) Nanoparticles as a PH-Sensitive System for Tumor-Targeted Delivery of Hydrophobic Drugs: Part I. In Vitro Evaluations. *Mol Pharm.* **2005**, 193 (1), 118–125.
- (15) Gao, Y.; Yang, C.; Liu, X.; Ma, R.; Kong, D.; Shi, L. A Multifunctional Nanocarrier Based on Nanogated Mesoporous Silica for Enhanced Tumor-Specific Uptake and Intracellular Delivery. *Macromol. Biosci.* **2012**, 12 (2), 251–259.
- (16) Vivero-escoto, J. L. Surface Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles for

Intracellular Drug Delivery By. **2009**.

- (17) He, Q.; Shi, J. Mesoporous Silica Nanoparticle Based Nano Drug Delivery Systems: Synthesis, Controlled Drug Release and Delivery, Pharmacokinetics and Biocompatibility. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21* (16), 5845.
- (18) Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, S. M. Biología Celular y Molecular- Lodish. In *Biología celular y Molecular*, 2005; pp 924–930.
- (19) Karp, G. Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments. *Mendeley Deskt.* **2008**, 662–682.
- (20) Bertram, J. S. The Molecular Biology of Cancer. *Mol. Aspects Med.* **2000**, *21*, 167–223.
- (21) Hornberg, J. J.; Bruggeman, F. J.; Westerhoff, H. V.; Lankelma, J. Cancer: A Systems Biology Disease. *BioSystems* **2006**, *83* (2–3 SPEC. ISS.), 81–90.
- (22) Han, L.; Shi, S.; Gong, T.; Zhang, Z.; Sun, X. Cancer Stem Cells: Therapeutic Implications and Perspectives in Cancer Therapy. *Acta Pharm. Sin. B* **2013**, *3* (2), 65–75.
- (23) Cell, T. C.; Origin, C.; Translocations, N.; Amplification, G.; Techniques, M. A.; Genes, S.; Oncogene, C. 1 Cellular and Molecular Biology of Cancer. **1994**, 3–17.
- (24) Rosenholm, J. M.; Meinander, A.; Peuhu, E.; Niemi, R.; Eriksson, J. E.; Sahlgren, C.; Lind?n, M. Targeting of Porous Hybrid Silica Nanoparticles to Cancer Cells. *ACS Nano* **2009**, *3* (1), 197–206.
- (25) Nakamura, Y.; Mochida, A.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. Nanodrug Delivery: Is the Enhanced Permeability and Retention Effect Sufficient for Curing Cancer? *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27* (10), 2225–2238.
- (26) Soimout Ouchen F. Neoplasias. Definiciones. Nomenclatura. Características. *Inmunol. y cáncer* **2009**, 140–146.
- (27) Lobo, N. A.; Shimono, Y.; Qian, D.; Clarke, M. F. The Biology of Cancer Stem Cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2007**, *23* (1), 675–699.
- (28) Bisen, P. S. Cancer Therapy: An Overview. *J. Cancer Sci. Ther.* **2014**, *6* (1), 6–7.
- (29) Harris, J.; Morrow, M.; Norton, L. Malignant Tumors of the Breast. *Cancer Princ. Pract. Oncol.* **1997**, No. July, 1557–1616.
- (30) Fernández-Plaza, S.; Sevilla, J.; Madero, L. Tratamiento Del Cáncer En Pediatría : Estado Actual y Expectativas Futuras. *Pediat Integr.* **2004**, *8* (6), 501–510.
- (31) Noordijk, E. M.; Clement, E. v. d. P.; Hermans, J.; Wever, A. M. J.; Leer, J. W. H. Radiotherapy as an Alternative to Surgery in Elderly Patients with Resectable Lung Cancer. *Radiother. Oncol.* **1988**, *13* (2), 83–89.
- (32) García, M. G.; Rodríguez, O. A.; León, D. C. de. *Oncología y Cirugía. Bases y Principios*; 2012; Vol. 16.
- (33) Sikora, K.; Advani, S.; Koroltchouk, V.; Magrath, I.; Levy, L.; Pinedo, H.; Schwartzmann, G.; Tattersall, M.; Yan, S. Special Article Essential Drugs for Cancer Therapy : A World Health Organization Consultation. **2018**, No. January, 385–390.
- (34) Ferreiro, J.; Rubio, I. Quimioterapia : Efectos Secundarios Adverse Effects of

- Treatment Chemotherapy. **2003**, 69–74.
- (35) Contreras, C.; Cecilia, A. Redalyc.Terapia Biológica En Cáncer de Mama. Conceptos Básicos. **2008**.
 - (36) Cho, K.; Wang, X.; Nie, S.; Cho, K.; Wang, X.; Nie, S.; Chen, Z. G.; Shin, D. M. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. **2008**, 1310–1316.
 - (37) Perrie, Y.; Rades, T. *Pharmaceutics-Drug Delivery and Targeting*, Second.; FASTtrack, Ed.; 1999.
 - (38) Vilar, G.; Tulla-Puche, J.; Albericio, F. Polymers and Drug Delivery Systems. *Curr. Drug Deliv.* **2012**, 9 (4), 367–394.
 - (39) Shade, D. M.; Johnson, A. T. Source: STANDARD HANDBOOK OF BIOMEDICAL ENGINEERING AND DESIGN CHAPTER 21 DESIGN OF RESPIRATORY DEVICES. *Most* **2004**, 1–30.
 - (40) Bhowmik, D.; Gopinath, H.; Kumar, B. P.; Duraivel, S.; Kumar, K. P. S. Controlled Release Drug Delivery Systems. *Pharma Innov.* **2012**, 1 (10), 24–32.
 - (41) Martinho, N.; Damgé, C.; Reis, C. P. Recent Advances in Drug Delivery Systems. *J. Biomater. Nanobiotechnol.* **2011**, 02 (05), 510–526.
 - (42) Wicki, A.; Witzigmann, D.; Balasubramanian, V.; Huwyler, J. Nanomedicine in Cancer Therapy: Challenges , Opportunities , and Clinical Applications. *J. Control. Release* **2015**, 200, 138–157.
 - (43) Iyer, A. K.; Khaled, G.; Fang, J.; Maeda, H. Exploiting the Enhanced Permeability and Retention Effect for Tumor Targeting. **2006**, 11 (September).
 - (44) Abe, O.; Abe, R.; Enomoto, K.; Kikuchi, K.; Koyama, H.; Masuda, H.; Nomura, Y.; Sakai, K.; Litton, A.; Chlebowski, R. T.; Caffier, H. Effects of Radiotherapy and Differences in the Extent of Surgery for Early Breast Cancer on Local Recurrence and 15-Year Survival: An Overview of the Randomised Trials. *Lancet* **2005**, 366 (9503), 2087–2106.
 - (45) Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E. Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, 26 (1), 62–69.
 - (46) Teresa, M.; Palma, R.; Acuña, R. H.; Espinosa, G. Estado Del Arte Del Proceso Sol-Gel En México. *Espac. del Divulg.* **2010**, 1, 183–188.
 - (47) Rodolfo Zanella. Metodologías Para La Síntesis de Nanopartículas: Controlando Forma y Tamaño | Zanella | Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencia y Nanotecnología. *Mundo Nano. Rev. Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología* **2012**, 5 (1).
 - (48) Coradin, T.; Boissière, M.; Livage, J. Sol-Gel Chemistry in Medicinal Science. *Curr. Med. Chem.* **2006**, 13 (1), 99–108.
 - (49) Kresge, C. T.; Leonowicz, M. E.; Roth, W. J.; Vartuli, J. C.; Beck, J. S. Ordered Mesoporous Molecular Sieves Synthesized by a Liquid-Crystal Template Mechanism. *Nature* **1992**, 359.
 - (50) Meng, H.; Xue, M.; Xia, T.; Ji, Z.; Tarn, D. Y.; Zink, J. I.; Nel, A. E. Use of Size and a Copolymer Design Feature To Improve the Biodistribution and the Enhanced Permeability and Retention Effect of Doxorubicin- Loaded Mesoporous Silica Nanoparticles in a Murine Xenograft Tumor Model. **2011**, No. 5, 4131–4144.

- (51) Xia, T.; Kovichich, M.; Liong, M.; Meng, H.; Kabehie, S.; George, S.; Zink, J. I.; Nel, A. E. Polyethyleneimine Coating Enhances the Cellular Uptake of Mesoporous Silica Nanoparticles and Allows Safe Delivery of siRNA and DNA Constructs. **2009**, 3 (10), 3273–3286.
- (52) Brannon-Peppas, L.; Blanchette, J. O. Corrigendum to “Nanoparticle and Targeted Systems for Cancer Therapy” [Advanced Drug Delivery Reviews 56(2004)1649-1659] (DOI:10.1016/j.Addr.2004.02.014). *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009, p 364.
- (53) Liong, M.; Lu, J.; Kovichich, M.; Xia, T.; Ruehm, S. G.; Nel, A. E.; Tamanoi, F.; Zink, J. I. Multifunctional Inorganic Nanoparticles for Imaging, Targeting, and Drug Delivery. TL - 2. *ACS Nano* **2008**, 2 VN-re (5), 889–896.
- (54) Mura, S.; Nicolas, J.; Couvreur, P. Stimuli-Responsive Nanocarriers for Drug Delivery. *Nat Mater* **2013**, 12 (11), 991–1003.
- (55) Torchilin, V. Multifunctional and Stimuli-Sensitive Pharmaceutical Nanocarriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2009, pp 431–444.
- (56) Zhu, L.; Torchilin, V. P. Stimulus-Responsive Nanopreparations for Tumor Targeting. *Integr. Biol.* **2013**, 5 (1), 96–107.
- (57) Fernando, I. R.; Ferris, D. P.; Frascioni, M.; Malin, D.; Strelakova, E.; Yilmaz, M. D.; Ambrogio, M. W.; Algaradah, M. M.; Hong, M. P.; Chen, X.; Nassar, M. S.; Botros, Y. Y.; Cryns, L.; Stoddart, J. F. Esterase- and PH-Responsive Poly(β -Amino Ester)-Capped Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery. *Nanoscale* **2015**, No. ii.
- (58) Tang, S.; Yin, Q.; Su, J.; Sun, H.; Meng, Q.; Chen, Y.; Chen, L.; Huang, Y.; Gu, W.; Xu, M.; Yu, H.; Zhang, Z.; Li, Y. Biomaterials Inhibition of Metastasis and Growth of Breast Cancer by PH-Sensitive Poly (β -Amino Ester) Nanoparticles Co-Delivering Two siRNA and Paclitaxel. *Biomaterials* **2015**, 48, 1–15.
- (59) Xing, L.; Zheng, H.; Cao, Y.; Che, S. Coordination Polymer Coated Mesoporous Silica Nanoparticles for Ph-Responsive Drug Release. *Adv. Mater.* **2012**, 24 (48), 6433–6437.
- (60) Fu, Q.; Rao, G. V. R.; Ista, L. K.; Wu, Y.; Andrzejewski, B. P.; Sklar, L. A.; Ward, T. L.; Lopez, G. P. Control of Molecular Transport through Stimuli-Responsive Ordered Mesoporous Materials. *Adv. Mater.* **2003**, 15 (15), 1262–1266.
- (61) Feng, W.; Zhou, X.; He, C.; Qiu, K.; Nie, W.; Chen, L.; Wang, H.; Mo, X.; Zhang, Y. Polyelectrolyte Multilayer Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles for PH-Responsive Drug Delivery: Layer Thickness-Dependent Release Profiles and Biocompatibility. *J. Mater. Chem. B* **2013**, 1 (43), 5886.
- (62) Li, Z.; Barnes, J. C.; Bosoy, A.; Stoddart, J. F.; Zink, J. I. Mesoporous Silica Nanoparticles in Biomedical Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41 (7), 2590.
- (63) Meng, H.; Xue, M.; Xia, T.; Zhao, Y.-L.; Tamanoi, F.; Stoddart, J. F.; Zink, J. I.; Nel, A. E. Autonomous in Vitro Anticancer Drug Release from Mesoporous Silica Nanoparticles by PH-Sensitive Nanovalves. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132 (36), 12690–12697.
- (64) Rim, H. P.; Min, K. H.; Lee, H. J.; Jeong, S. Y.; Lee, S. C. PH-Tunable Calcium Phosphate Covered Mesoporous Silica Nanocontainers for Intracellular Controlled Release of Guest Drugs. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, 50 (38), 8853–8857.

- (65) Gao, Q.; Xu, Y.; Wu, D.; Sun, Y.; Li, X. PH-Responsive Drug Release from Polymer-Coated Mesoporous Silica Spheres. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113* (29), 12753–12758.
- (66) Liu, S.; Maheshwari, R.; Kiick, K. L. Polymer-Based Therapeutics. *Macromolecules* **2009**, *42* (1), 3–13.
- (67) Wang, Y.; Bansal, V.; Zelikin, A. N.; Caruso, F. Templated Synthesis of Single-Component Polymer Capsules and Their Application in Drug Delivery. *Nano Lett.* **2008**, *8* (6), 1741–1745.
- (68) Fleming, M. S.; Mandal, T. K.; Walt, D. R. Nanosphere–Microsphere Assembly: Methods for Core–Shell Materials Preparation. *Chem. Mater.* **2001**, *13* (6), 2210–2216.
- (69) Fernando, I. R.; Ferris, D. P.; Frasconi, M.; Malin, D.; Strelakova, E.; Yilmaz, M. D.; Ambrogio, M. W.; Algaradah, M. M.; Hong, M. P.; Chen, X.; Nassar, M. S.; Botros, Y. Y.; Cryns, V. L.; Stoddart, J. F. Esterase- and PH-Responsive Poly(β -Amino Ester)-Capped Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery. *Nanoscale* **2015**, *7* (16), 7178–7183.
- (70) Anderson, D. G.; Peng, W.; Akinc, A.; Hossain, N.; Kohn, A.; Padera, R.; Langer, R.; Sawicki, J. a. A Polymer Library Approach to Suicide Gene Therapy for Cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101* (45), 16028–16033.
- (71) Green, J. J.; Zhou, B. Y.; Mitalipova, M. M.; Beard, C.; Langer, R.; Jaenisch, R.; Anderson, D. G. Nanoparticles for Gene Transfer to Human Embryonic Stem Cell Colonies. *Nano Lett.* **2008**, *8* (10), 3126–3130.
- (72) Kim, Y.; Zhang, C.; Cho, C. World ' s Largest Science , Technology & Medicine Open Access Book Publisher Poly (Amino Ester) s-Based Polymeric Gene Carriers in Cancer Gene Therapy. **2013**.
- (73) Akinc, A.; Langer, R. Measuring the PH Environment of DNA Delivered Using Nonviral Vectors: Implications for Lysosomal Trafficking. *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *78* (5), 503–508.
- (74) Lynn, D. M.; Amiji, M. M.; Langer, R. PH-Responsive Polymer Microspheres: Rapid Release of Encapsulated Material within the Range of Intracellular PH. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2001**, *40* (9), 1707–1710.
- (75) Talavera Pech, W. A. Encapsulación de Un Compuesto Anticáncer En Partículas Mesoporosas de Silicio Recubiertas Con Un Poli (β -Amino Éster) Sensible a PH, Universidad Autónoma de Yucatan, 2017.
- (76) Chen, J.; Qiu, X.; Ouyang, J.; Kong, J.; Zhong, W.; Xing, M. M. Q. PH and Reduction Dual-Sensitive Copolymeric Micelles for Intracellular Doxorubicin Delivery. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (10), 3601–3611.
- (77) Huynh, C. T.; Nguyen, M. K.; Kim, J. H.; Kang, S. W.; Kim, B. S.; Lee, D. S. Sustained Delivery of Doxorubicin Using Biodegradable PH/Temperature-Sensitive Poly(Ethylene Glycol)-Poly(β -Amino Ester Urethane) Multiblock Copolymer Hydrogels. *Soft Matter* **2011**, *7* (10), 4974.
- (78) Akinc, A.; Anderson, D. G.; Lynn, D. M.; Langer, R. Synthesis of Poly(β -Amino Ester)s Optimized for Highly Effective Gene Delivery. *Bioconjug. Chem.* **2003**, *14* (5), 979–988.
- (79) Lynn, D. M.; Anderson, D. G.; Putnam, D.; Langer, R. Accelerated Discovery of Synthetic Transfection Vectors: Parallel Synthesis and Screening of a Degradable

- Polymer Library [20]. *Journal of the American Chemical Society*. 2001, pp 8155–8156.
- (80) Chabner, B.; Lynch, T.; Longo, D. *Harrison Manual de Oncología*; 2009.
- (81) Gruber, B. M.; Anuszevska, E. L.; Priebe, W. The Effect of New Anthracycline Derivatives on the Induction of Apoptotic Processes in Human Neoplastic Cells. *Folia Histochem. Cytobiol.* **2004**, *42* (2), 127–130.
- (82) Danesi, R.; Fogli, S.; Gennari, A.; Conte, P.; Del Tacca, M. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationships of the Anthracycline Anticancer Drugs. *Clin. Pharmacokinet.* **2002**, *41* (6), 431–444.
- (83) Kiyomiya, K. I.; Matsuo, S.; Kurebe, M. Mechanism of Specific Nuclear Transport of Adriamycin: The Mode of Nuclear Translocation of Adriamycin-Proteasome Complex. *Cancer Res.* **2001**, *61* (6), 2467–2471.
- (84) Thorn, C. F.; Oshiro, C.; Marsh, S.; Hernandez-boussard, T.; Mcleod, H.; Klein, T. E.; Altman, R. B. Doxorubicin Pathways: Pharmacodynamics and Adverse Effects. **2011**, No. ii, 440–446.
- (85) Mizutani, H.; Tada-oikawa, S.; Hiraku, Y. Mechanism of Apoptosis Induced by Doxorubicin through the Generation of Hydrogen Peroxide. **2005**, *76*, 1439–1453.
- (86) Brunton, L.; Chabner, B.; Knollman, B. *Las Bases Farmacológicas de La Terapéutica*, 12a Ed.; Mc Graw-Hill: México, D.F., 2012.
- (87) Al-Ghamdi, S. S. Time and Dose Dependent Study of Doxorubicin Induced DU-145 Cytotoxicity. *Drug Metab. Lett.* **2008**, *2* (1), 47–50.
- (88) Singal, P. K.; Iliskovic, N. Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* **1998**.
- (89) Carvalho, C.; Santos, R. X.; Cardoso, S.; Correia, S.; Oliveira, P. J.; Santos, M. S.; Moreira, P. I. Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. *Curr Med Chem* **2009**, *16* (25), 3267–3285.
- (90) Rahmani, S.; Durand, J.; Charnay, C.; Lichon, L. Synthesis of Mesoporous Silica Nanoparticles and Nanorods: Application to Doxorubicin Delivery. **2017**, *68*, 25–31.
- (91) Polakova, K.; Polakova, K.; Pizova, K.; Binder, S.; Havrdova, M.; Kolarova, M.; Kriegova, E.; Zapletalova, J.; Malina, L.; Horakova, J.; Malohlava, J.; Kolokithas-Ntoukas, A.; Bakandritsos, A.; Kolarova, H.; Zboril, R. In Vitro Cytotoxicity Analysis of Doxorubicin-Loaded/Superparamagnetic Iron Oxide Colloidal Nanoassemblies on MCF7 and NIH3T3 Cell Lines. *Int. J. Nanomedicine* **2015**, *10*, 949–961.
- (92) Etrych, T.; Jelínková, M.; Íhová, B.; Ulbrich, K. New HPMA Copolymers Containing Doxorubicin Bound via PH-Sensitive Linkage: Synthesis and Preliminary in Vitro and in Vivo Biological Properties. *J. Control. Release* **2001**, *73* (1), 89–102.
- (93) Ekwall, B. Screening of Toxic Compounds in Mammalian Cell Cultures. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1983**, *407*, 64–77.
- (94) Anne Rathbun, M.; Craig, R. G.; Hanks, C. T.; Filisko, F. E. Cytotoxicity of a BIS-GMA Dental Composite before and after Leaching in Organic Solvents. *J. Biomed. Mater. Res.* **1991**, *25* (4), 443–457.
- (95) Rlos H; Janet Cepero Cañas, L.; Natalia Davidenko, D.; Rosa Krael, L.; Annia

- González Pérez, T.; Kenya Pérez, T.; Bello Gárciga, J. L. Evaluación Toxicológica in Vitro De Materiales Poliméricos De Restauración Dental Compuestos Por Bis-Gma. *Anu. Toxicol.* **2001**, 1 (1), 65–72.
- (96) Tomankova, K.; Polakova, K.; Pizova, K.; Kolarova, M.; Horakova, J. In Vitro Cytotoxicity Analysis of Doxorubicin- Loaded / Superparamagnetic Iron Oxide Colloidal Nanoassemblies on MCF7 and NIH3T3 Cell Lines. **2015**, 949–961.
- (97) Janes, K. A.; Fresneau, M. P.; Marazuela, A.; Fabra, A. Chitosan Nanoparticles as Delivery Systems for Doxorubicin. **2001**, 73, 255–267.
- (98) Chang, B.; Sha, X.; Guo, J.; Jiao, Y.; Wang, C.; Yang, W. Thermo and PH Dual Responsive, Polymer Shell Coated, Magnetic Mesoporous Silica Nanoparticles for Controlled Drug Release. *J. Mater. Chem.* **2011**, 21 (25), 9239.
- (99) Tao, Z. M.; Morrow, M. P.; Asefa, T.; Sharma, K. K.; Duncan, C.; Anan, A.; Penefsky, H. S.; Goodisman, J.; Souid, A. K. Mesoporous Silica Nanoparticles Inhibit Cellular Respiration. *Nano Lett.* **2008**, 8 (5), 1517–1526.
- (100) Meng, H.; Liang, M.; Xia, T.; Li, Z.; Ji, Z.; Zink, J. I.; Nel, A. E. Engineered Design of Mesoporous Silica Nanoparticles to Deliver Doxorubicin and Pgp siRNA to Overcome Drug Resistance in a Cancer Cell Line. *ACS Nano* **2010**, 4 (8), 4539.
- (101) Gao, Y.; Chen, Y.; Ji, X.; He, X.; Yin, Q.; Zhang, Z.; Shi, J.; Li, Y. Controlled Intracellular Release of Doxorubicin in Multidrug-Resistant Cancer Cells by Tuning the Shell-Pore Sizes of Mesoporous Silica. **2011**, No. 12, 9788–9798.
- (102) Kamarudin, N. H. N.; Jalil, A. A.; Triwahyono, S.; Salleh, N. F. M.; Karim, A. H.; Mukti, R. R.; Hameed, B. H.; Ahmad, A. Role of 3-Aminopropyltriethoxysilane in the Preparation of Mesoporous Silica Nanoparticles for Ibuprofen Delivery: Effect on Physicochemical Properties. *Microporous Mesoporous Mater.* **2013**, 180, 235–241.
- (103) Chen, H.; Zhen, Z.; Tang, W.; Todd, T.; Chuang, Y. J.; Wang, L.; Pan, Z.; Xie, J. Label-Free Luminescent Mesoporous Silica Nanoparticles for Imaging and Drug Delivery. *Theranostics* **2013**, 3 (9), 650–657.
- (104) Yang, P.; Gai, S.; Lin, J. Functionalized Mesoporous Silica Materials for Controlled Drug Delivery. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41 (9), 3679.
- (105) S, H. G.; Valcárcel, D. H. M. Espectroscopia. Fundamento de La Resonancia Magnética Nuclear. *Entornos* **2008**, No. 21, 89–94.
- (106) Strober, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **2015**, No. November, 3–5.
- (107) Wada, Y.; Harayama, Y.; Kamimura, D.; Yoshida, M.; Shibata, T.; Fujiwara, K.; Morimoto, K.; Fujioka, H.; Kita, Y. The Synthetic and Biological Studies of Discorhabdins and Related Compounds. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9 (13), 4959–4976.
- (108) Childs, A. C.; Phaneuf, S. L.; Dirks, A. J.; Phillips, T.; Leeuwenburgh, C. Doxorubicin Treatment in Vivo Causes Cytochrome c Release and Cardiomyocyte Apoptosis, As Well As Increased Mitochondrial Efficiency, Superoxide Dismutase Activity, and Bcl-2 : Bax Ratio 1. *Cancer Res.* **2002**, 4, 4592–4598.
- (109) Feoktistova, M.; Geserick, P.; Leverkus, M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. **2016**, 343–347.
- (110) Barbara H. Stuart. Infrared Spectroscopy : Fundamentals and Applications. **2004**,

- (111) Robert M. Silverstein, Francis X. Webster, D. J. K. Spectrometric Identification of Organic Compounds. *Journal of Molecular Structure*. 2005, p 512.
- (112) Brey, D. M.; Erickson, I.; Burdick, J. A. Influence of Macromer Molecular Weight and Chemistry on Poly(??-Amino Ester) Network Properties and Initial Cell Interactions. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2008**, 85 (3), 731–741.
- (113) Li, C.; Tzeng, S. Y.; Tellier, L. E.; Green, J. J. (3-Aminopropyl)-4-Methylpiperazine End-Capped Poly(1,4-Butanediol Diacrylate-Co-4-Amino-1-Butanol)-Based Multilayer Films for Gene Delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, 5 (13), 5947–5953.
- (114) Huynh, D. P.; Nguyen, M. K.; Lee, D. S. Controlling the Degradation of PH/Temperature-Sensitive Injectable Hydrogels Based on Poly(??-Amino Ester). *Macromol. Res.* **2010**, 18 (2), 192–199.
- (115) Lynn, D. M.; Langer, R. Degradable Poly (Beta-Amino Esters): Synthesis , Characterization , and Self-Assembly with Plasmid DNA. *J Am Chem Soc* **2000**, 122 (10), 10761–10768.
- (116) Hammarling, K.; Sandberg, M. Synthesis , Curing Behavior and Swell Tests of PH-Responsive Coatings from Acryl-Terminated Oligo (β -Amino Esters). **2018**.
- (117) Lynn, D. M.; Langer, R. Degradable Poly (-Amino Esters): Synthesis , Characterization , and Self-Assembly with Plasmid DNA. **2000**, No. 10, 10761–10768.
- (118) Kleitz, F.; Schmidt, W.; Sch, F. Calcination Behavior of Different Surfactant-Templated Mesoporous Silica Materials. **2003**, 65, 1–29.
- (119) Du, L.; Liao, S.; Khatib, H. A.; Stoddart, J. F.; Zink, J. I. Controlled-Access Hollow Mechanized Silica Nanocontainers. **2009**, No. 5, 15136–15142.
- (120) Kecht, J.; Bein, T. Microporous and Mesoporous Materials Oxidative Removal of Template Molecules and Organic Functionalities in Mesoporous Silica Nanoparticles by H₂O₂ Treatment. *Microporous Mesoporous Mater.* **2008**, 116 (1–3), 123–130.
- (121) Kecht, J.; Schlossbauer, A.; Bein, T. Mesoporous Silica Nanoparticles. **2008**, No. 11, 7207–7214.
- (122) Shanfu Lu, Deli Wang, Jinlin Lu, Jie Zeng, S. P. J. HPW/MCM-41 Mesoporous Silica Composites as Novel Proton Exchange Membranes for Elevated Temperature Fuel Cells. *ECS Trans.* **2009**, 25 (1), 1927–1933.
- (123) Landau, M. V; Varkey, S. P.; Herskowitz, M.; Regev, O.; Pevzner, S.; Sen, T.; Luz, Z. Wetting Stability of Si-MCM-41 Mesoporous Material in Neutral , Acidic and Basic Aqueous Solutions. **1999**, 33, 149–163.
- (124) Puentes, V. F.; Kiricsi, I.; Zhu, J.; Ager, J. W.; Ko, M. K.; Frei, H.; Alivisatos, P.; Somorjai, G. A. Synthetic Insertion of Gold Nanoparticles into Mesoporous Silica. **2003**, No. 2, 1242–1248.
- (125) Sadasivan, S.; Sukhorukov, G. B. Fabrication of Hollow Multifunctional Spheres Containing MCM-41 Nanoparticles and Magnetite Nanoparticles Using Layer-by-Layer Method. **2006**, 304, 437–441.
- (126) Tu, H. Direct Imaging of Surface Topology and Pore System of Ordered Mesoporous Silica (MCM-41 , SBA-15 , and KIT-6) and Nanocast Metal Oxides

- by High Resolution Scanning Electron. **2008**, No. 14, 11510–11517.
- (127) Kim, S.; Kim, E.; Kim, S.; Kim, W. Surface Modification of Silica Nanoparticles by UV- Induced Graft Polymerization of Methyl Methacrylate. No. 1049, 1–11.
- (128) Chung, B. P.; Kumar, R.; Pruski, M.; Lin, V. S. Temperature Responsive Solution Partition of Organic – Inorganic Hybrid Poly (N -Isopropylacrylamide) -Coated Mesoporous Silica Nanospheres **. **2008**, 1390–1398.
- (129) Yang, Y.; Yan, X.; Cui, Y.; He, Q.; Li, D.; Wang, A. Preparation of Polymer-Coated Mesoporous Silica Nanoparticles Used for Cellular Imaging by a “ Graft-from ” Method †. **2008**, 5731–5737.
- (130) Rabolli, V.; Thomassen, L. C. J.; Princen, C.; Napierska, D.; Gonzalez, L.; Kirschvolders, M.; Hoet, P. H.; Huaux, F.; Kirschhock, C. E. A.; Martens, J. A.; Lison, D. In FI Uence of Size , Surface Area and Microporosity on the in Vitro Cytotoxic Activity of Amorphous Silica Nanoparticles in Different Cell Types. **2010**, 4 (September), 307–318.
- (131) Sankaranarayanan, J.; Mahmoud, E. A.; Kim, G.; Morachis, J. M.; Almutairi, A. Multiresponse Strategies to Modulate Burst Degradation and Release from Nanoparticles. *ACS Nano* **2010**, 4 (10), 5930–5936.
- (132) Vivero-Escoto, J. L.; Slowing, I. I.; Trewyn, B. G.; Lin, V. S.-Y. Mesoporous Silica Nanoparticles for Intracellular Controlled Drug Delivery. *Small* **2010**, 6 (18), 1952–1967.
- (133) Deng, X.; Zheng, N.; Song, Z.; Yin, L.; Cheng, J. Trigger-Responsive, Fast-Degradable Poly(B-Amino Ester)s for Enhanced DNA Unpackaging and Reduced Toxicity. *Biomaterials* **2014**, 35 (18), 5006–5015.
- (134) Raehm, Æ. L.; Monique, Æ. J. D. Æ.; Werts, M. H. V; Delphine, Æ. M. B. Æ. Surface Functionalization of Two-Photon Dye-Doped Mesoporous Silica Nanoparticles with Folic Acid : Cytotoxicity Studies with HeLa and MCF-7 Cancer Cells. **2008**, 32–39.
- (135) Barrallo-gimeno, A.; Nieto, M. A. The Snail Genes as Inducers of Cell Movement and Survival : Implications in Development and Cancer. **2005**, 3151–3161.
- (136) Leukemi, P.; Goldenberg, G. J.; Wang, H.; Blair, G. W. Resistance to Adriamycin : Relationship of Cytotoxicity to Drug Uptake and DNA Single @ and Double-Strand Breakage in Cloned Cell Lines of Adriamycin MI. **1986**, 2978–2983.
- (137) Bellamy, W. T.; Dalton, W. S.; Kailey, J. M.; Gleason, M. C.; Mccloskey, T. M.; Dorr, R. T.; Alberts, D. S. Verapumil Reversal of Doxorubicin Resistance in Multidrug-Resistant Human Myeloma Cells and Association with Drug Accumulation and DNA Damage1. **1988**, 6303–6308.
- (138) Gewirtz, A.; Virginia, F. A. F. By Doxorubicin with DNA Unwinding in MCF-7 Breast Tumor Cells.
- (139) Forster, R. E.; Crandall, E. D. Time Course of Exchanges between Red Cells and Extracellular Fluid during C=2 Uptake. *J. Appl. Physiol.* **1975**, 38 (4).
- (140) Hill, P.; Gilbert, D. Rate of PH Changes in Blood Plasma in Vitro and in Vivo. *J. Physiol.* **1976**.
- (141) He, Q.; Gao, Y.; Zhang, L.; Zhang, Z.; Gao, F.; Ji, X.; Li, Y.; Shi, J. Biomaterials A PH-Responsive Mesoporous Silica Nanoparticles-Based Multi-Drug Delivery System for Overcoming Multi-Drug Resistance. *Biomaterials* **2011**, 32 (30), 7711–

7720.

- (142) Shen, J.; He, Q.; Gao, Y.; Li, Y. Nanoscale Mesoporous Silica Nanoparticles Loading Doxorubicin Reverse Multidrug Resistance: Performance and Mechanism. **2011**, 4314–4322.
- (143) Pan, L.; Liu, J.; He, Q.; Wang, L.; Shi, J. Biomaterials Overcoming Multidrug Resistance of Cancer Cells by Direct Intranuclear Drug Delivery Using TAT-Conjugated Mesoporous Silica Nanoparticles. *Biomaterials* **2013**, 34 (11), 2719–2730.
- (144) Roik, N. V; Belyakova, L. A. Mesoporous Silica Nanoparticles Equipped with Surface Nanovalves for PH-Controlled Liberation of Doxorubicin. **2016**.
- (145) Venkatesan, R.; Pichaimani, A.; Hari, K.; Balasubramanian, P. K.; Kulandaivel, J.; Premkumar, K. Drug Delivery Carrier for Improved Anticancer Therapy †. **2012**.
- (146) Mhawi, A. A.; Fernandes, A. B.; Ottensmeyer, F. P. Low-Energy-Loss Electron Microscopy of Doxorubicin in Human Breast Cancer MCF-7 Cells : Localization by Color. **2007**, 158, 80–92.
- (147) Huang, Y.; He, L.; Liu, W.; Fan, C.; Zheng, W.; Wong, Y.; Chen, T. Biomaterials Selective Cellular Uptake and Induction of Apoptosis of Cancer-Targeted Selenium Nanoparticles. *Biomaterials* **2013**, 34 (29), 7106–7116.

ANEXOS

Anexo I. Valores P obtenidos de la prueba post hoc Dunnett. Los rótulos (a) indican que no hay diferencia significativa respecto al control, (b) indica que hay diferencia estadística respecto al control. Se considera como diferencia significativa si $p < 0.05$

| Valor de P | | | |
|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| concentración | | | |
| hFB CV | 2.5 | 5 | 10 |
| NMS | 0.982 ^a | 0.185 ^a | 0.485 ^a |
| NMS-PbAE | 0.229 ^a | 0.66 ^a | 0.110 ^a |
| PbAE | 0.0002 ^b | 0.0001 ^b | 0.0001 ^b |
| hFB MTT | 2.5 | 5 | 10 |
| NMS | 0.275 ^a | 0.989 ^a | 0.999 ^a |
| NMS-PbAE | 0.116 ^a | 0.321 ^a | 0.067 ^a |
| PbAE | 0.098 ^a | 0.032 ^b | 0.009 ^b |
| MCF-7 MTT | 2.5 | 5 | 10 |
| NMS | 0.355 ^a | 0.273 ^a | 0.688 ^a |
| NMS-PbAE | 0.666 ^a | 0.307 ^a | 0.781 ^a |
| PbAE | 0.162 ^a | 0.101 ^a | 0.976 ^a |

Anexo II. Valores P obtenidos de la prueba post hoc Dunnett de la evaluación de los materiales en MCF-7 con cristal violeta. Los rótulos (a) indican que no hay diferencia significativa respecto al control, (b) indica que hay diferencia estadística respecto al control. Se considera como diferencia significativa si $p < 0.05$

| MCF-7 CV | Valor de P | | |
|-----------------|----------------------|--------------------|--------------------|
| | concentración | | |
| | 2.5 | 5 | 10 |
| NMS | 0.368 ^a | 0.954 ^a | 0.222 ^a |
| NMS-PbAE | 0.452 ^a | 0.983 ^a | 0.703 ^a |
| PbAE | 0.002 ^b | 0.247 ^a | 0.372 ^a |

Anexo III. Valores P obtenidos de la prueba post hoc Dunnett de la curva de DOX con cristal violeta. Los rótulos (b) indican que hay diferencia estadística respecto al control. Se considera como diferencia significativa si $p < 0.05$.

| Curva hFB | Valor de P | | | | |
|------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | concentración | | | | |
| | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 |
| DOX | 0.0001 ^b | 0.0001 ^b | 0.0001 ^b | 0.0001 ^b | 0.0001 ^b |

Anexo IV. Valores P obtenidos de la prueba post hoc Dunnett de la curva de DOX con cristal violeta. Los rótulos (b) indican que hay diferencia estadística respecto al control. Se considera como diferencia significativa si $p < 0.05$.

| | Valor de P | | | | |
|-----------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | concentración | | | | |
| MCF-7 CV | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 |
| DOX | 0.0001 ^b | 0.0001 ^b | 0.0001 ^b | 0.0001 ^b | 0.0001 ^b |

Anexo V. Valores P obtenidos de la prueba post hoc Dunnett de la evaluación del complejo NMS-PbAE-DOX en MCF-7 y hFB. Los rótulos (b) indican que hay diferencia estadística respecto al control. Se considera como diferencia significativa si $p < 0.05$.

| | Valor de P | |
|--------------|----------------------|---------------------|
| | concentración | |
| | DOX libre | NMS-PbAE-DOX |
| MCF-7 | 0.0001 ^b | 0.0001 ^b |
| hFB | 0.0001 ^b | 0.0001 ^b |

