

Nanomedicinas: lo esencial es invisible...al microscopio óptico

Eder Lilia Romero y María José Morilla.

Programa de Nanomedicinas, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes. eder19lilia@gmail.com

Recibido 1 de octubre de 2013- Aceptado 29 de Octubre de 2013

Resumen

El poder de resolución del microscopio óptico es de unos 200 nm y si tenemos suerte, los nano-objetos más voluminosos apenas se distinguirán como puntos fluorescentes. ¿Podremos, mediante el control de la arquitectura de esos “puntos brillantes”, dirigir su acceso a ciertos sectores del cuerpo, donde ejecutarían exitosamente funciones terapéuticas? Por ahora estamos más lejos de lo que creemos en materializar ese ejercicio mental. Sin embargo, de todas las aplicaciones de la Nanotecnología al área de la salud, el campo terapéutico es el más importante. En este artículo nos adentraremos en los fenómenos que explican cómo funcionan los nano-objetos que transportan principios activos hasta los sitios blancos. A partir de allí será posible construir expectativas razonables sobre la irrupción de esta nueva tecnología en el corto futuro. Sus potencialidades y limitaciones son dependientes de nuestra capacidad de diseño racional, de desarrollo industrial y conocimiento de los fenómenos de nanotoxicidad, respectivamente.

Palabras clave: nano-objeto, efecto de incremento de permeación y retención (EPR), nanomedicinas antitumorales

Nanomedicines, the essential is invisible... to the light microscope

Abstract

The resolution power of the optical microscope is nearly 200 nm and if we are lucky, the biggest nano-objects are saw as highly fluorescent dots. How the architecture of these shiny dots be controlled, to target them to specific body sites and successfully exert therapeutic actions? For the moment, we have been unable of meeting such issue. Nonetheless, drug delivery is by far the most important field of all the applications of Nanotechnology in health. In this review, we will address the phenomena underlying the action of nano-objects as drug delivery systems. On that knowledge, it will be possible to build reasonable expectancies to the irruption of these new medicines, in the near future. Potentialities and pitfalls of nanomedicines will depend on our skills for rational design, industrial development and insights gained on the new phenomena of nanotoxicity.

Key words: Nano-objects, Enhanced Permeation and retention (EPR) effect, antitumoral nanomedicines

1. INTRODUCCION

La Nanotecnología irrumpió en la comunidad científica hace más de 50 años [1], como una promesa capaz de resolver retos ingenieriles inabordables para la materia macro o microestructurada. El propósito de esta tecnología es diseñar nano-objetos, estudiar sus propiedades estructurales y luego aplicarlos con múltiples fines. Los nano-objetos se definen como objetos con una (nanoplate), dos (nanotubo) o tres (nanopartícula) dimensiones en la nano-escala de tamaño. La nano-escala posee un límite inferior de 1 nm (excluye a los átomos) y un límite superior difuso que supera los 100 nm cuando los nuevos fenómenos asociados al tamaño del nano-objeto no son de naturaleza cuántica, sino por ejemplo, relativos a sus modalidades de captura y tráfico intracelular. Nanopartículas de idénticas dimensiones, pueden presentar distintas propiedades de acuerdo al material con que se las prepare. Por otro lado, moléculas producidas por síntesis química o biológica y cuya actividad dependa de su estructura primaria (secuencia de átomos o de moléculas), no son considerados nano-objetos. Para bien o mal, desde hace unos 10 años usamos diariamente productos que contienen nano-objetos o superficies nanoestructuradas, a veces sin enterarnos. Otras, la intervención de la Nanotecnología en campos como el de la salud suscita tanto en legos como en la mayoría de los académicos, una expectativa cercana a la idealización. Es que la idea de emplear nano-objetos para resolver exitosamente complejos problemas de salud resulta fascinante. La disciplina en cuestión se conoce como Nanomedicina y emplea nano-objetos diseñados ad-hoc para operar en la interfase entre el tamaño atómico y el celular con fines terapéuticos, profilácticos y de tecnología médica (que incluye ingeniería de tejidos y diagnóstico).

No es posible identificar un único tipo de nano-objeto igualmente útil para todos los propósitos. Por lo general, aquellos que se emplean in vitro o ex vivo (como en la mayoría de las técnicas diagnósticas) no siempre pueden administrarse a un ser vivo. Asimismo, en terapéutica y profilaxis los nano-objetos son biodegradables y son aplicados por distintas rutas. La mayoría de las estrategias terapéuticas están basadas en la incorporación de un principio activo (PA) a un determinado nano-objeto. A partir de allí, la farmacocinética, biodistribución y tráfico intracelular del PA se independiza de su estructura química y pasa a depender de la naturaleza estructural del nano-objeto. Por volumen de ventas y patentes, la aplicación más importante de la Nanotecnología en salud es la pertinente al campo terapéutico conocida como nanotecnología farmacéutica [2]. Dicho esto, en este artículo comentaremos los fenómenos que ocurren cuando los nano-objetos (nanopartículas) se administran con fines terapéuticos por ruta endovenosa. A diferencia de la inhalatoria, los fenómenos asociados a la ruta endovenosa están bastante bien conocidos, además de poner en juego la máxima capacidad operativa de los nano-objetos. Por su complejidad, excluirémos referirnos al cruce de la barrera hematoencefalica. Asimismo, no abordaremos la exposición no intencional de nano-objetos no biodegradables, que tiene lugar fundamentalmente por ruta inhalatoria.

2. ¿CÓMO FUNCIONAN LAS NANOMEDICINAS?

2.1 El turbulento viaje de los nano-objetos

Una vez inyectados endovenosamente, los nano-objetos ingresan directamente al corazón, desde cuyo ventrículo derecho -en humanos- son bombeadas a los pulmones a un flujo de 5,6 litros por minuto [3]. Su viaje por sangre venosa continúa hacia los capilares alveolares pulmonares donde se vuelcan a la sangre arterial. Desde allí retornan al corazón, para ser bombeadas en la sangre arterial a cada uno de los órganos corporales. La magnitud de su acceso a los órganos dependerá del volumen de flujo que accede a cada uno. Asimismo durante casi toda su trayectoria, los nano-objetos permanecen confinados al compartimiento vascular. Nano-objetos en el orden de los 100 nm de diámetro (unas 10 veces mayor que el diámetro hidrodinámico de una proteína plasmática como la albúmina, aunque unas 100 veces menor que un glóbulo rojo) no pueden difundir a través del endotelio vascular/capa de músculo liso /membrana basal, ni penetrar los poros de la vasculatura (<6 nm en vénulas post capilares). Más aun, los nano-objetos que pierdan su estabilidad coloidal en circulación y se agreguen, pueden ocluir redes vasculares particularmente angostas, como los capilares pulmonares (entre 2 y 23 mm de diámetro). Al igual que las proteínas plasmáticas, nano-objetos lo suficientemente pequeños pueden atravesar libremente las fenestraciones de entre 100 - 150 nm (alrededor de 107 nm en humano) de los sinusoides hepáticos (vasos de 5 -10 μm diámetro sin membrana basal para acceder al espacio perisinusoidal o espacio de Disse), donde se ubican los cordones de hepatocitos [4, 5]. Pero a diferencia de las proteínas, los nano-objetos son reconocidos como extraños y fagocitados por macrófagos fijos ubicados estratégicamente en la luz de los sinusoides (células de Kupffer). Por su gran volumen, el hígado es el órgano corporal con mayor capacidad de captura global de nano-objetos, aunque el bazo lo supere en tasa de captura por unidad de masa de tejido. Los órganos con vasculatura fenestrada como el hígado, bazo (con anchos sinusoides (5-8 μm) en la vasculatura de pulpa roja, para dejar pasar glóbulos rojos senescentes) y en menor medida, médula ósea, son los únicos donde los nano-objetos pueden extravasar hacia los intersticios tisulares. Claramente es la arquitectura vascular la responsable directa de la biodistribución de nano-objetos inyectados endovenosamente.

Luego de inyectados, además de diluirse y ser arrastrados en el turbulento flujo vascular, los nano-objetos son inmediatamente cubiertos por proteínas plasmáticas. Primeramente ocurre una cobertura inespecífica y transitoria con albúmina, la proteína de mayor concentración (35-40 g/l), que es rápidamente reemplazada por proteínas de menor concentración pero mayor afinidad. Estas últimas (fibronectina, fibrinógeno, proteína C reactiva, inmunoglobulinas, proteínas del complemento C3b y C4b y lipoproteínas entre otras) se conocen como opsoninas, o proteínas plasmáticas para las que los macrófagos expresan receptores en su superficie. Las opsoninas permiten establecer múltiples puntos de contacto entre la superficie de microorganismos o nano-objetos y receptores fagocíticos como los de la fracción Fc de anticuerpos plasmáticos (R-Fc), de fosfatidilserina (R-PS) y de ciertas fracciones

del complemento (R-C) en la membrana de macrófagos [6, 7]. Una vez opsonizados tal como si fueran microorganismos, la membrana plasmática del macrófago se extiende alrededor de los nano-objetos, encerrándolos. La vesícula así formada se conoce como fagosoma. El material dentro del fagosoma es procesado en una ruta destructiva, que recibe los contenidos de endosomas y lisosomas y culmina con la eliminación de sus fragmentos hidrolizados. Recientemente ha comenzado a establecerse la lógica entre el patrón y extensión de la opsonización -y por ende de la fagocitosis- con el tamaño, geometría y naturaleza superficial del nano-objeto.

El bajo radio de curvatura de grandes nano-objetos (> 200 nm) facilita la deposición de opsoninas y su posterior agregación (pérdida de estabilidad coloidal) [8]. En general, es la pérdida de estabilidad coloidal la responsable de la captura fagocítica de los nano-objetos [9, 10]. Los nano-objetos de superficie hidrofóbica atraen mayor proporción de lipoproteínas y apolipoproteínas. Las lipoproteínas pueden intercambiar lípidos con liposomas y nanopartículas lipídicas y desestabilizar su estructura [11]. Una interacción de este tipo puede ser responsable del targeting de nano-objetos a células que tengan receptores para apolipoproteínas, como hepatocitos (con receptores para apo E) [12] y sistema nervioso central (con receptores para apo A1, Apo B100, apo E) [13]. En general las superficies negativa o positivamente cargadas, muy hidrofóbicas o irregulares también promoverán la adhesión de proteínas del complemento

Si bien es prácticamente imposible evitar la opsonización, la agregación puede minimizarse modificando la superficie de los nano-objetos. Esto se logra cubriéndolos con un polímero hidrofílico de conformación adecuada, de unas decenas de angstroms de espesor. Para tal fin usualmente se emplea polietilenglicol de peso molecular 2000 (PEG2000), y la estrategia que se conoce como “estabilización estérica” [14]. La estabilización estérica mediante PEG, tiene un rol controvertido ya que además puede ser responsable de toxicidad, como veremos más adelante.

Los nano-objetos estabilizados estéricamente pueden permanecer en circulación por largo tiempo sin ser fagocitados. La evasión temporal de la fagocitosis es el primer paso para que los nano-objetos puedan acceder a tejidos diferentes al hígado, bazo o medula ósea.

2.2 Incremento local de permeación y retención: el efecto EPR

La estabilización estérica de los nano-objetos aumenta sus posibilidades de extravasar en sitios con elevada permeabilidad vascular. Tales sitios están presentes en ciertas patologías, como los tumores sólidos (que constituyen cerca del 85% de los cánceres humanos). En la tabla 1, se muestran ejemplos de diferentes nanomedicinas antitumorales en uso clínico y en ensayos clínicos avanzados. El delivery de nano-objetos desde el sitio de inyección hasta las células tumorales involucra su transporte por circulación sistémica, extravasación y transporte a través del intersticio tumoral.

A partir de un tamaño mínimo, los tumores sólidos comienzan a estimular su propia vascularización [15]. La resultante vasculatura anómala asociada al drenaje linfático defectuoso, son responsables de la acumulación y retención sitio específica de nano-objetos [16]. Este fenómeno observado en ciertos tumores sólidos, sobre todo aquellos con elevado grado de malignidad, es conocido como efecto de incremento de permeabilidad y retención (enhanced permeability and retention (EPR) effect) o efecto EPR [17, 18].

2.2. i Factores locales responsables del incremento de la permeabilidad vascular

Los tumores sobre-expresan múltiples isoformas del factor de crecimiento endotelial vascular VEGF-idéntico al factor de permeabilidad vascular (VPF) [19, 20]. Los VEGF pertenecen a una familia de mitógenos endoteliales y mediadores de permeabilidad vascular, con diferentes capacidades para interactuar con proteínas de la matriz extracelular [21]. Como resultado, la vasculatura tumoral es heterogénea y no sigue una morfología estándar (arteriolas, capilares y vénulas en una red organizada, de ramificación dicótoma con orden jerárquico) [22]. La vasculatura tumoral es dilatada, sacular y mal alineada, con células endoteliales defectivas y amplias fenestraciones entre 300 y 4700 nm, ausencia de músculo liso o innervación, amplio lumen y sin receptores funcionales para angiotensina II [23-25] (Figura 1). En ella la dirección del flujo sanguíneo puede cambiar abruptamente, cesar o ser errático [26].

Desde hace unos 30 años se sabe que la permeabilidad vascular propia de inflamaciones e inducida por infecciones es gatillada por bradiquinina (BK, quinina), vía activación de una cascada proteolítica [27]. Luego se descubrió que la BK también acompaña procesos carcinomatosos, siendo responsable de la acumulación de fluido pleural y ascítico y de dolor [28]. Además, los tumores sólidos expresan simultáneamente múltiples mediadores inflamatorios como el óxido nítrico (NO) (un mediador de vasodilatación, hipotensión, angiogénesis, proliferación celular y extravasación); prostaglandinas (PGs), sintetizadas por ciclo-oxigenasas (COX)-1 y-2 y peroxinitrito (ONOO-), formado por una rápida reacción entre los radicales superóxido (O_2^-) y NO y activador de pro-matriz metalproteinasa (MMPs), estas últimas enzimas que degradan la matriz extracelular [29, 30].

Tabla 1. Ejemplos de diferentes nanomedicinas antitumorales en uso clínico y en ensayos clínicos avanzados

Compuesto	Nombre	Indicación	Estatus (año)
Doxorubicina liposomal peguilada	Myocet, Caelyx (Doxil)	Cáncer de ovario y mama, refractarios, Sarcoma de Kaposi asociado a HIV, mieloma múltiple	Aprobado FDA (1995)
Daunorubicina liposomal	Daunoxome	Sarcoma de Kaposi asociado a HIV	Aprobado (1996)
Doxorubicina liposomal no peguilado	Myocet	Cáncer de mama metastásico	Aprobado en Europa y Canada (año)
Vincristina liposomal	Marqibo	Leucemia linfoblástica aguda con cromosoma philadelphia negativo (Ph-)	Aprobado (2012)
Doxorubicina liposomas termosensibles	ThermoDox	Carcinoma hepatocelular	Fase III
Cisplatino liposomal	Lipoplatin	Carcinoma de células no pequeñas de pulmón y pancreático	Fase II y III
Lurtotecan liposomal	OSI-221	Varios	Fase II
Paclitaxel en nanopartículas de albúmina	Abraxane	Cáncer de mama	Aprobado (2005)
L-asparginasa-Peg	Oncaspar	Leucemia aguda linfocítica	Aprobado (1994)
Paclitaxel-Acido poliglutamico	Opaxio	Carcinoma de células no pequeñas de pulmón, de ovario y otros	Fase III
Doxetacel en nanopartículas de albúmina	ABI-008	Cáncer de próstata refractario a hormonas	Fase II
Paclitaxel-micelas poliméricas	NK105	Cáncer de estómago	Fase III
Doxorubicina-micelas poliméricas	NK911	Varios	Fase II completa
Cisplatino-micelas poliméricas	Nanoplatin	Varios	Fase I

Adaptado de Duncan R, Gaspar R (2011) Nanomedicine(s) under the microscope. *Molecular Pharmaceutics* 8: 2101-2141

2.2. ii Disminución del drenaje linfático

La red de linfáticos remueve macromoléculas y fluido intersticial y es esencial para las funciones inmunes del tejido normal y mantenimiento del balance de fluidos en el intersticio. En los tumores sólidos sin embargo, el drenaje linfático es usualmente defectivo [15, 31]. Los vasos linfáticos son comprimidos por las propias células tumorales [32] y por ende su funcionalidad depende de su localización. Los linfáticos periféricos o en la interfase tumoral son

funcionales, no así los del interior tumoral [33]. La funcionalidad reducida de los linfáticos está asociada a flujo retrógrado, con invasión de células tumorales a vasos linfáticos periféricos y promoción de metástasis dentro del sistema linfático [26, 34, 35].

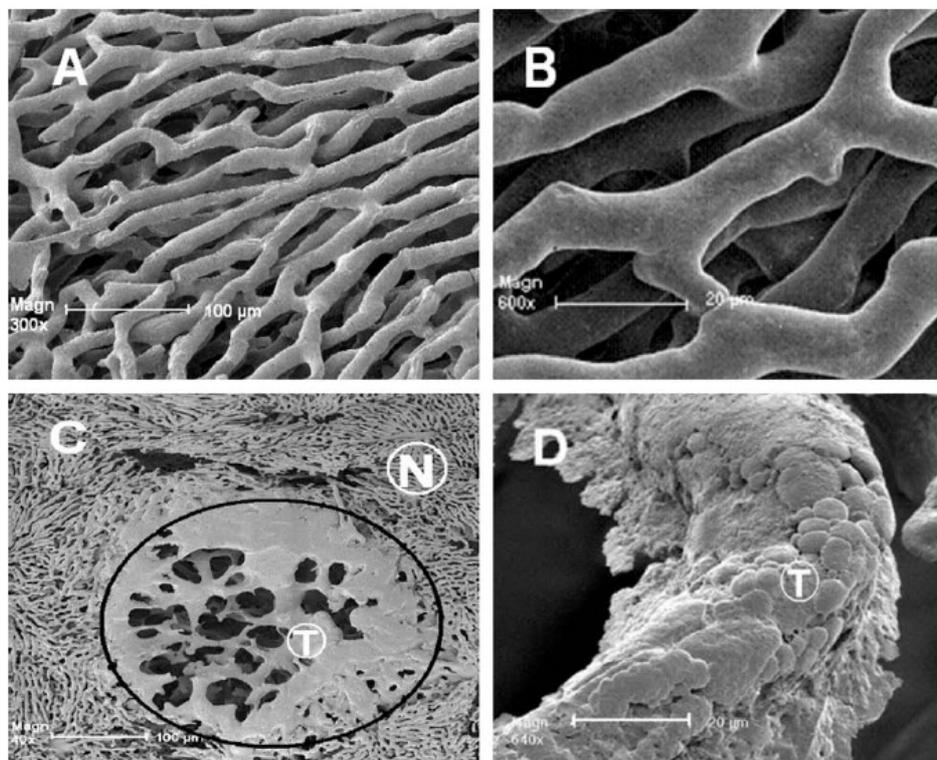


Figura 1. Micrografías de scanning electrónico de capilares sanguíneos normales (A y B) y tumorales hepáticos (C y D). B y D son imágenes ampliadas de la red de capilares de A y C. Mientras no hay pérdida de polímero acrílico en el hígado normal, se observa su extravasación (por efecto EPR) en la vasculatura tumoral (T). N es vasculatura normal. Adaptado de [135]

2.2. iii Los nano-objetos extravasan por convección

Notablemente, en tanto las moléculas de bajo peso molecular difunden uniformemente a través de la vasculatura hacia los tejidos, los nano-objetos únicamente pueden extravasar a través de las fenestraciones por convección [36]. El flujo convectivo depende del gradiente de presión hidrostática entre el espacio intravascular (microvascular pressure, MVP) y el espacio intersticial (interstitial fluid pressure, IFP) y el gradiente de presión osmótica (debido a diferencias en niveles proteicos) [37]. La funcionalidad disminuida de los linfáticos es responsable principal de la elevada IFP, que se opone al gradiente convectivo y a la extravasación de material hacia las células tumorales [38, 39]. Asimismo, la elevada IFP induce un flujo intersticial radial hacia el exterior, de entre 0,1–0,2 $\mu\text{m/s}$ para un tumor aislado de 1 cm [40] y un orden de magnitud menor para uno subcutáneo [41] (Figura 2). Sin embargo, hay autores que consideran controvertido adjudicar la disminución del flujo convectivo a la elevada

IFP [42]. La elevada IFP forzaría la salida de solutos y fluidos hacia la zona de menor presión (el extremo venoso de los capilares) y no hacia el extremo arterial, donde la presión hidrostática derivada del input cardíaco y la resistencia vascular son mucho mayores que en el extremo venoso.

El flujo sanguíneo tumoral depende de la diferencia entre la presión arterial y venosa, la resistencia debido a la arquitectura vascular y la viscosidad sanguínea. En comparación a los tejidos normales, los tumores tienen similar presión arterial pero menor presión venosa [43]. En la microcirculación tumoral, debido a la elevada permeabilidad vascular, el flujo sanguíneo intravascular e intersticial están acoplados. La presencia de macromoléculas en el intersticio es en parte responsable de la elevada viscosidad sanguínea tumoral. El flujo sanguíneo en tumores es en promedio, menor que en tejidos normales [44].

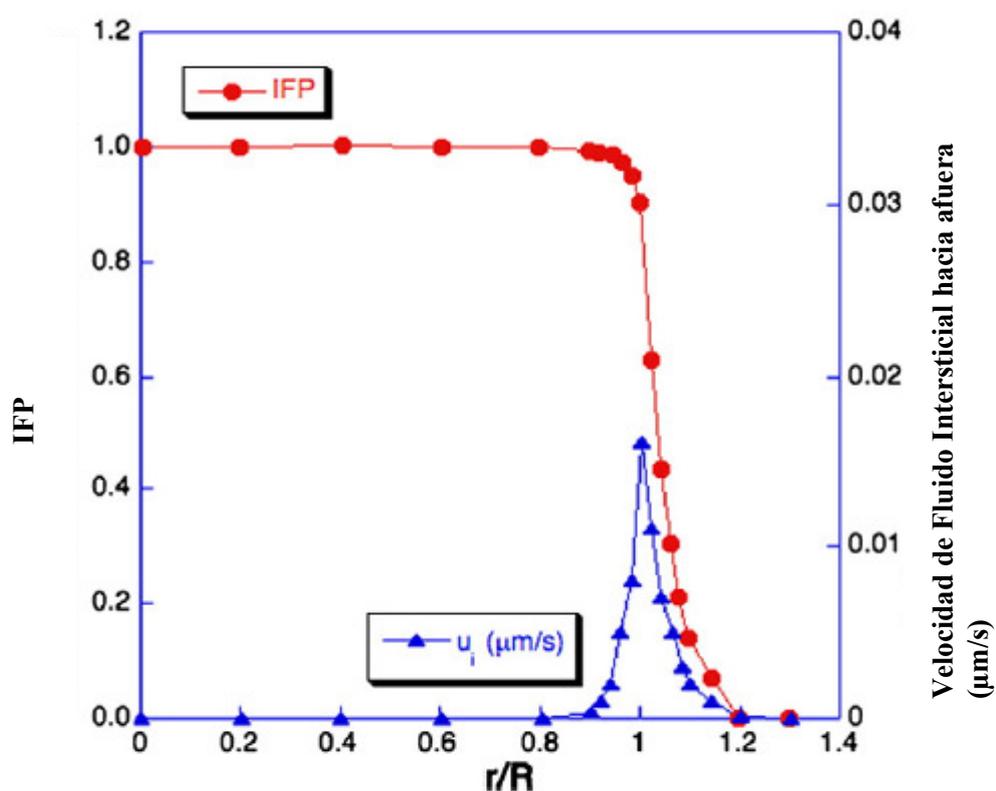


Figura 2. Presión de fluido intersticial (Interstitial fluid pressure, IFP) y velocidad de distribución de un tumor crecido subcutáneamente. El centro y los alrededores del tumor se indican por $r/R=0$ y $r/R=1$, respectivamente. IFP (●) es elevada en el interior del tumor y rápidamente decrece en la periferia. Debido al gradiente de presión, se induce un movimiento de fluido intersticial hacia el exterior a aproximadamente $0,02 \mu\text{m/s}$ (▲). Esta convección hacia afuera, junto con la menor extravasación debido a la elevada IFP, conduce a un acceso insuficiente de agentes terapéuticos [41, 61].

2.2. iv Los nano-objetos difunden con dificultad a través del intersticio

Los tumores sólidos poseen una densa matriz extracelular (MEC), consistente en proteínas fibrosas como colágeno y elastina y polisacáridos como hialuronano y proteoglicanos [45], que dificultan el ingreso de material hacia el interior tumoral. La elevada IFP tumoral sumada al elevado contenido de glicosaminoglicanos (GAG) y colágeno respecto de tejidos normales [46, 47], reduce el flujo convectivo intersticial. Como resultado la difusión es el principal mecanismo de transporte a través del intersticio. La difusión disminuye a medida que aumenta el peso molecular y el diámetro del material [48-50]. Los nano-objetos más pequeños son transportados a mayor distancia y con mayor dispersión en la MEC que los de mayor tamaño, que tienden a localizarse en el espacio peri-vascular [51].

2.3. v Heterogeneidad del efecto EPR

El efecto EPR es heterogéneo y varía sustancialmente no sólo entre pacientes sino también entre los distintos tipos y estadios tumorales [52, 53]. Dentro de un mismo tumor hay grandes diferencias en permeabilidad vascular. En general, los nano-objetos (tamaño promedio de 100 nm) únicamente podrán acercarse sólo a las células de una limitada fracción del volumen tumoral. La mayor parte del tumor apenas permite extravasar estructuras de diámetro entre 4 y 7 nm. La distribución de la vascularización varía con la zona y tamaño tumoral. La densidad vascular decrece desde la periferia hacia el centro, donde se incrementan las distancias intercapilares, que son enormes en términos de difusión de nano-objetos. Por ejemplo, la distancia intercapilar es de unos ~50 μm en regiones vascularizadas de adenocarcinomas mamarios de rata, pero puede llegar a unos ~300 μm en humanos [54]. Los tumores sólidos de gran tamaño (> 1 cm diámetro) poseen tres regiones: (a) necrótica sin vasculatura, (b) semi-necrótica conteniendo capilares, pre-y post-capilares y (c) establemente perfundida, con muchos vasos venosos y pocas arteriolas (2 a 5). En general, la relación región (avascular/bien perfundida) aumenta con el tamaño del tumor, lo que significa que el efecto EPR es mayor en tumores más pequeños. En el interior tumoral, la distribución de nano-objetos sería más heterogénea que la de drogas de bajo PM, debido a que su acceso depende estrictamente de la estructura vascular y de las serias restricciones a la difusión presentadas por el impedimento físico de la MEC sumado a su escaso gradiente difusivo [42].

Por otro lado, la densidad vascular depende del tipo de tumor: los carcinomas renales son muy vascularizados en tanto la densidad de microvasculatura de carcinoma escamoso de cabeza y cuello y en carcinoma de ovario es baja. Asimismo, la densidad vascular en algunos casos está correlacionada con el estadio del tumor, como ocurre con el cáncer de pulmón de células no pequeñas. Otro tipo de tumores, como el carcinoma de células renales, no presentan correlación entre densidad vascular y estadio tumoral. Los tumores metastásicos tienden a presentar mayor densidad de vasculatura respecto de los no metastásicos. Diferentes tipos tumorales secretan cantidades variables de mediadores vasculares e inflamatorios. Por esta razón, la tasa de respuesta del sarcoma de Kaposi (muy vascularizado y productor de

grandes cantidades de VEGF) a la monoterapia con doxorubicina liposomal peguilada (Doxil), supera entre un 25% y un 46% a la combinación estándar del régimen ABV (adriamicina (doxorubicina), bleomicina y vincristina) [55]. La densa MEC propia de la mayoría de los tumores malignos pancreáticos dificulta su irrigación; las células tumorales se alimentan por difusión de nutrientes y oxígeno desde los tejidos adyacentes y no responden bien a los tratamientos basados en el efecto EPR [56].

2.2.v Optimización de la estructura de nano-objetos

Para maximizar la extravasación en los sitios donde existe efecto EPR, los nano-objetos deben circular por el máximo tiempo posible, evadiendo la eliminación renal y la captura fagocítica. A partir de un PM de 40.000, y un diámetro hidrodinámico mínimo de 7 nm [57] (orden de peso y tamaño de proteínas plasmáticas globulares, cuya filtración renal está limitada por la apertura del diafragma de los pies de podocitos [58]) es factible evitar la eliminación renal. La estabilización estérica evitará la eliminación de los nano-objetos por fagocitosis. Empíricamente, se ha identificado un rango de tamaño óptimo para la circulación prolongada, extravasación y difusión de nano-objetos en tumores sólidos que manifiestan el efecto EPR, que oscila entre los 80 y 200 nm de diámetro [59].

El tamaño, PM y estabilización estérica sin embargo, no son los únicos factores relevantes a la hora de lograr una óptima evasión del reconocimiento por el sistema mononuclear fagocítico. Por ejemplo, proteínas plasmáticas como albúmina e IgG (de PM 68.000 y 150.000, respectivamente), se acumulan en tumores que presentan efecto EPR en igual o mayor extensión que el primer agente antitumoral a partir del cual se reveló el efecto EPR, el SMANCS (un conjugado de dos cadenas copolímero estireno y ácido maleico (SMA PM 2.000) y neocarcinostatina (NCS PM 12.000), PM total 16.000). El diseño estructural del SMANCS dista de ser óptimo para acumularse extensivamente en tumores sólidos; en el tratamiento del carcinoma hepatocelular se lo inyecta directamente en la arteria hepática y no endovenosamente. Por otro lado, la captura hepática de ambas proteínas es sustancialmente menor que la de SMANCS. De hecho, la mayoría de las proteínas plasmáticas desnaturalizadas o con profundas modificaciones estructurales, independientemente de su PM, son eliminadas muy rápidamente por fagocitosis. Esto señala otra deficiencia en el diseño estructural de SMANCS ya que a pesar de su bajo PM, es reconocido como ajeno en virtud de su insuficiente biocompatibilidad.

Es importante señalar que en la inflamación asociada a infecciones, también hay extravasación por convección de material particulado. Sin embargo, el funcionamiento linfático normal impide su retención prolongada. Además, el efecto EPR es "invisible" para moléculas livianas que difunden al tumor para regresar libremente a la circulación sanguínea. Señalemos por ejemplo que pequeñas moléculas hidrosolubles usadas como agentes de contraste en angiografías arteriales, experimentan un targeting pasivo en tumores, donde son retenidas unos pocos minutos. Por el contrario, los nano-objetos que extravasan en tumores no regresan

a circulación, se acumulan gradualmente y quedan retenidos por largo tiempo. Esta cuestión se reportó por primera vez hace casi 30 años en roedores, donde 6 h luego de inyectar endovenosamente Evans blue que forma un complejo con albúmina de 6 nm, comenzó su acumulación selectiva en tumores. También se observó que la acumulación de nano-objetos es inversamente proporcional al tamaño tumoral. Por ejemplo, la acumulación del conjugado copolímero hidroxipropilmetilacrilamida (HPMA)-doxorubicina, decayó de ~20% a 1–5% dosis/g tejido tumoral, al aumentar el tamaño tanto de modelos tumorales de ratón como xenografts humanos. En tanto la concentración plasmática se mantuviera elevada un mínimo de 6 h, hubo un incremento progresivo de la acumulación a lo largo de horas o días. En la clínica, luego de administrar SMANCS en Lipiodol (SMANCS/Lipiodol) localmente vía una infusión en la arteria hepática, se registró una veloz acumulación en el carcinoma hepatocelular en contraste con un muy lento clearance durante semanas. De hecho aun 2–3 meses más tarde el SMANCS permaneció a razón de 20–30 µg/g tejido tumoral, una actividad remanente más de 100 veces mayor que la concentración inhibitoria mínima del carcinoma hepatocelular in vitro [59].

2.3. Incremento de la extravasación de nano-objetos

En promedio, tanto los conjugados polímeros-droga como drogas liposomas como Doxil, permiten descargar un 5 % de la dosis administrada sobre tumores que manifiestan el efecto EPR; entretanto, más del 50 % de la dosis culmina en el hígado [60, 61]. Aunque un 5 % es un porcentaje significativamente mayor que el acumulado como PA libre, se describen a continuación una serie de técnicas orientadas a incrementarlo.

2.3.i Modulación del efecto EPR

El incremento de extravasación puede lograrse mediante el aumento de la MVP, la reducción de la IFP y la normalización de la vasculatura tumoral.

Incremento de la MVP mediante Angiotensina II: El músculo liso de la vasculatura normal, responde a mediadores vasculares como BK, acetilcolina, NO y calcio, ayudando a mantener constante el volumen de flujo sanguíneo. La infusión endovenosa de angiotensina-II (AT-II), induce hipertensión sistémica por constricción de la capa de músculo liso. Sin embargo, ante el aumento de presión y flujo, el volumen de flujo sanguíneo permanece constante [62-64]. En contraste, la vasculatura tumoral no puede regular el volumen de flujo sanguíneo, que se incrementa localmente en respuesta a la hipertensión inducida por AT-II [59, 65]. En tumores de roedores, tras elevar la presión sistólica mediante AT-II se observó un incremento de ~2–6 veces en el volumen de flujo sanguíneo tumoral, dependiendo del incremento de presión [62]. Aunque su uso no se ha extendido por lo riesgoso, la hipertensión sistémica inducida por AT II se ha aplicado en la clínica hace ya 30 años, para incrementar la acumulación de drogas de bajo PM (figura 3). Estudios pre-clínicos en ratas mostraron que incrementando la presión sistólica de 100 a 150 mm Hg por 15 minutos, se aumentaba 1,3-3 veces la acumulación de

SMANCS en el tejido tumoral. Además de incrementar el efecto EPR, la vasoconstricción acompañante disminuyó el acceso de SMANCS a riñones y medula ósea. Desde hace 10 años se reportan los beneficios de la administración de SMANCS-Lipiodol a pacientes con tumores sólidos (que incluyeron carcinoma hepatocelular, cáncer metastásico de hígado, cáncer renal, colangiocarcinoma, cáncer pancreático, entre otros) bajo un estado hipertenso inducido por AT-II. Mediante esta estrategia es posible incrementar más de 5 veces la concentración local de droga antitumoral, induciendo un estado hipertenso solo por ~20 min [66, 67]. Considerando que las terapias antitumorales se llevan a cabo en o cerca de la máxima dosis tolerable, un aumento de 2-3 veces su concentración intratumoral tendría beneficios terapéuticos; de hecho los tiempos de regresión al 50% de la masa tumoral se acortaron [67]. En contraste, luego de la infusión intraarterial de PA de bajo PM no se observaron mejoras debido a su veloz escape del tumor. No se han publicado datos acerca del empleo de esta técnica para mejorar el delivery de Doxil u otros antitumorales liposomales de mayor diámetro que polímeros terapéuticos.

Incremento de MVP mediante Nitroglicerina. La nitroglicerina (NG) es un agente generador de NO, empleado por más de una centuria en el tratamiento de angina de pecho. En el medio hipóxico (baja pO₂) y de pH ligeramente ácido del tejido cardiaco infartado, el NO₂-liberado desde NG es convertido a NO, que causa vasodilatación e incremento de flujo sanguíneo. Dado que el medio hipóxico y ácido de los tejidos infartados se asemejaría al de los tumores, se inspeccionó la capacidad de NG para inducir vasodilatación e incremento local de flujo sanguíneo. Esta estrategia incrementó 2 a 3 veces la acumulación de macromoléculas inyectadas endovenosamente (complejo Evans blue/albúmina) en tumores, así como la eficacia tanto de pequeñas moléculas (aclerubicina, PM 812) como de conjugados Zn protoporfirina IX-PEG (PM 110.000). Sin embargo estos resultados se obtuvieron luego de la administración tópica de NG en modelos de tumores subcutáneos [68]. Esta estrategia aún no ha llegado a la clínica. Asimismo, resta inspeccionar el efecto de la administración de donores de NO, por rutas diferentes a la tópica. Finalmente, aún no ha sido testeado su efecto sobre la extravasación de nano-objetos de mayor tamaño, como el Doxil.

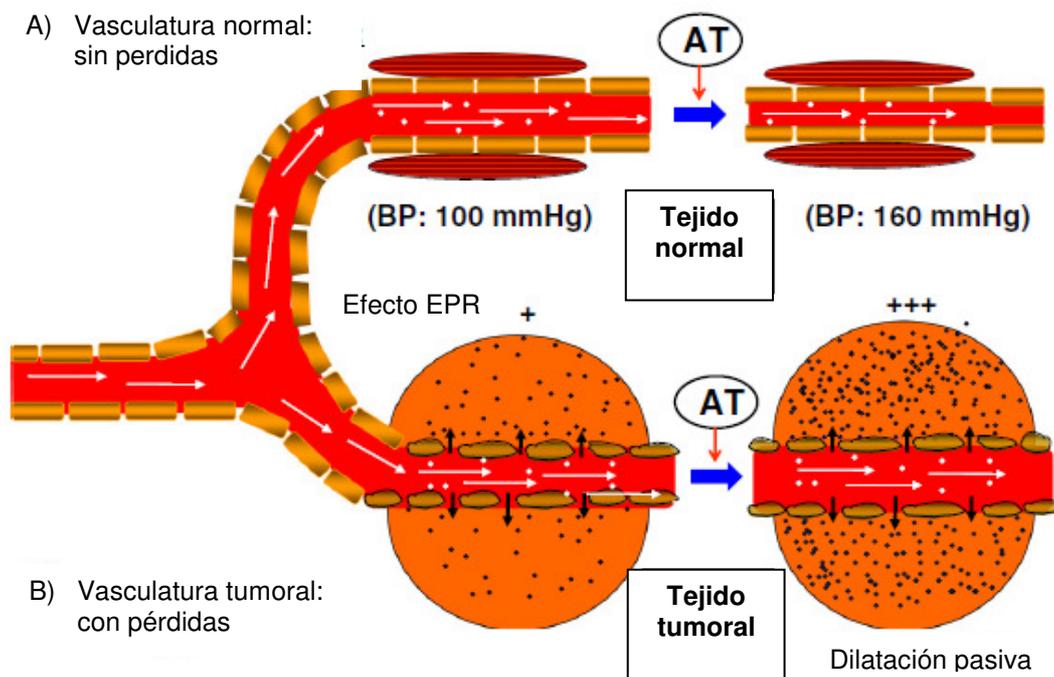


Figura 3. Representación del efecto EPR y su incremento inducido por la hipertensión generada por angiotensina II (AT-II) y el delivery en tejidos normales y tumorales. (A) La vasculatura normal posee una capa de células de músculo liso que se contraen, se cierran las uniones estrechas y se reduce el diámetro del vaso lo que resulta en menor pérdida de contenido. (B) La vasculatura tumoral posee aberturas entre las células endoteliales que se abren aún más al elevarse la presión sanguínea. La hipertensión inducida por AT-II incrementa la acumulación de drogas macromoleculares en el tejido tumoral. Adaptado de [37, 136, 137]

Incremento de MVP mediante Inhibidores de enzima convertidora de angiotensina I (Angiotensin-converting enzyme, ACE). Los inhibidores de ACE se emplean como agentes anti-hipertensivos y son carboxipeptidasas que inhiben la conversión de AT I en ATII. La ATI tiene una secuencia aminoacídica similar a la hallada en el extremo C terminal de la BK. Por lo tanto los inhibidores de ACE potencian la acción local de la BK, el mediador de permeabilidad vascular sobreexpresada en tumores. El inhibidor de ACE enalapril, combinado con hipertensión sistémica inducida por AT-II, incremento al doble el delivery de anticuerpos monoclonales dirigidos contra cáncer gástrico sobre modelos tumorales de ratón [65, 69]. Igual que en el caso anterior, esta estrategia no ha llegado a la clínica y resta testear su eficacia sobre nano-objetos de gran tamaño.

Recientemente se han testeado en roedores otras estrategias orientadas a aumentar el efecto EPR, mediante hemo-oxigenasa 1/ monóxido de carbono, inhibidor de TGF- β , TNF- α .

2.3.ii Incremento del delivery de nano-objetos a través del intersticio tumoral

La difusión de nano-objetos a través del intersticio puede incrementarse mediante a) degradación de la MEC y b) reducción de la IFP. Aunque testada ampliamente en pre-clínica, la utilidad clínica del empleo de MMP (colagenasas, stromelisin, gelatinasas y elastasas), hialuronidasa y catepsina C (digesting decorin) para degradar la MEC e incrementar la difusión de nano-objetos voluminosos (de alrededor de 100 nm) es discutible, ya que la digestión de la matriz no expande sustancialmente el espacio intercelular entre células tumorales (unos 20 nm) [70, 71]. Entre otras razones, la degradación de la MEC ha sido gradualmente abandonada porque incrementaría las chances de diseminación tumoral [72]. También en pre-clínica, la degradación enzimática de la MEC se ha empleado para disminuir la IFP. En este ámbito, la IFP se ha disminuido mediante métodos físicos (hipertermia), químicos (agente osmótico manitol) y tratamientos farmacológicos (TNF- α , paclitaxel, radiación). Por ejemplo, la reducción de IFP luego de aplicar hipertermia local sobre tumores subcutáneos, incrementa la extravasación y acumulación de liposomas y vectores génicos administrados endovenosamente (hasta 400 nm) [73, 74]. Esta estrategia sin embargo, no ha llegado a la clínica.

Otra forma de reducir la IFP es induciendo la normalización de la vasculatura tumoral, es decir, inhibiendo el efecto EPR. Pero aunque el empleo de agentes anti-angiogénicos ha permitido incrementar la extravasación de albúmina, la acumulación de estructuras de mayor tamaño como el Doxil no aumentó y su transporte a través del intersticio de tumores xenograft humanos se redujo [75]. En general, la inhibición del efecto EPR mediante inhibidores de VEGF como los anticuerpos monoclonales bevacizumab y ranibizumab puede emplearse como estrategia antitumoral, porque bloquea el acceso de nutrientes y oxígeno; sin embargo la misma dificulta la extravasación de nano-objetos. Hace unos 20 años comenzaron a desarrollarse inhibidores de MMP, capaces de inhibir el efecto EPR [76]. Sin embargo, ninguno tuvo éxito clínico dada su incapacidad para eliminar la totalidad de las células tumorales y su toxicidad a dosis elevadas.

2.3. iii Incremento de la transcitosis: péptidos penetrantes de tumores

Recientemente se ha demostrado en pre-clínica que la co-administración del péptido penetrante en tumores iRGD incrementó la acumulación y el índice terapéutico de diversas estructuras, composiciones y tamaños, tanto de pequeñas moléculas (doxorubicina), como de anticuerpos monoclonales (trastuzumab) y nanopartículas (Abraxane y Doxil), en múltiples modelos tumorales humanos xenograft en ratones [77].

2.4 Utilidad de modelos pre-clínicos

Los macrófagos de ratones inmunocomprometidos producen menos VEGF, lo que conduce a menor densidad vascular [78] y a un menor acceso de nano-objetos al intersticio

tumoral respecto de los inmunocompetentes, que pueden acumular alrededor del doble de nano-objetos que los inmunocomprometidos [79]. Los ratones inmunocompetentes por otro lado, portan tumores murinos y no humanos, lo que complica la interpretación de resultados y su extrapolación. Asimismo, la expresión de VEGF y sus receptores en células tumorales in vitro, es mucho menos variable que en tumores clínicos. Una diferencia sustancial entre los modelos tumorales en animales y tumores humanos es la tasa de progresión. Los animales usualmente desarrollan tumores clínicamente relevantes (>5 mm) una semana después de la inoculación subcutánea de células tumorales, en tanto un volumen tumoral equivalente puede tomar años en crecer humanos. Un tumor de 1 g en un ratón de 30 g es aproximadamente 3% de su peso total. En humanos, un tumor comparable pesaría 2–5 kg, una masa lejos de ser ideal para tratarse con nanomedicinas antitumorales. Además, los tumores implantados subcutáneamente hacen uso de la extensa red vascular cutánea, una condición raramente hallada en tumores humanos. Los tumores animales de rápido desarrollo producen gran cantidad de VEGF y mediadores vasculares. Esta rápida progresión resulta en la sobreestimación del efecto EPR. Aparentemente, el sitio de implantación del tumor experimental influiría en el efecto EPR. En este complejo contexto, la utilidad como modelo predictivo de monocapas celulares y esferoides, que carecen de vasculatura y por ende de las barreras histológicas a la extravasación de nano-objetos, es mínima.

3. LA COMPLEJIDAD ESTRUCTURAL EN LA NANO-ESCALA

Hasta aquí hemos descripto generalidades relativas a la acción selectiva de los nano-objetos, cuyo funcionamiento luce engañosamente sencillo. Cabe preguntarse entonces, por que es tan lenta la aparición de nuevos productos [80]. Las respuestas son múltiples, pero la principal razón obedece a que la actividad de las nanomedicinas depende estrictamente de la interacción de su arquitectura estructural en la nano-escala con el contexto anátomo-patológico del paciente. Y sucede que la capacidad de controlar la arquitectura de los nano-objetos a escala industrial es limitada, además de ser muy heterogéneos los contextos biológicos. La tecnología actual es capaz de producir en condiciones GMP (Good Manufacturing Practice) únicamente vesículas y nanopartículas con geometrías cuasi esféricas de lípidos (liposomas) o polímeros naturales o sintéticos. Asimismo, las superficies pueden recubrirse con relativa facilidad para su estabilización estérica. Aunque no es posible obtener estructuras de mayor complejidad estructural, este grado de simplicidad aún es muy complejo.

Analicemos la doxorubicina liposomal peguilada (Doxil/Caelyx), uno de los primeros nanofármacos llegados al mercado. La formulación contiene más del 90% de los 2 mg/mL de clorhidrato de doxorubicina a pH 6.5, encapsulada en una población monomodal de liposomas de 80 nm diámetro hidrodinámico y aproximadamente -13 mV de potencial Z. La bicapa liposomal consiste en 3,19 mg/mL de sal sódica de N-(carbonil-metoxi polietilenglicol 2000)-1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (MPEG-DSPE); 9,58 mg/mL fosfatidil colina de soja hidrogenada (HSPC) y 3,19 mg/mL colesterol. Para mantener la isotonicidad, cada mL de Doxil

contiene 2 mg sulfato de amonio, buffer histidina y sacarosa. La doxorubicina se incorpora al interior liposomal mediante el método de carga activa, para lo que se genera un gradiente de protones al atrapar sulfato de amonio en el interior liposomal. Este gradiente es necesario para que la base débil doxorubicina difunda hacia el interior y quede allí retenida una vez protonada. En este proceso, el ácido débil amonio pierde su protón y el amoniaco resultante se elimina a través de la bicapa. La carga activa es tan eficiente para atrapar doxorubicina, que la droga ingresada supera su solubilidad y forma un precipitado de sulfato de doxorubicina. Los cristales de doxorubicina responsables de la típica forma ovoide del Doxil pueden observarse por cryo-transmission electronic microscopy (cryo-TEM) (Figura 4). Junto con Ambisome (anfotericina liposomal), Doxil es uno de los dos nanofarmacos más antiguos, comercializado en Estados Unidos desde 1996. Pero aunque sus patentes estadounidenses hayan caducado en 2010, el desarrollo de una formulación genérica de Doxil se lleva a cabo con extremada lentitud (Lipodox, aprobado por la Food and Drug Administration, FDA, en 2012/13 pero no por la European Medicines Agency, EMA). La complejidad estructural de la doxorubicina liposomal peguilada es responsable directa de su estabilidad coloidal en circulación, farmacocinética y biodistribución. Su conocimiento permitiría estimar la performance del producto in vivo. Sin embargo tal complejidad es difícil no solo de estimar sino también de reproducir. A diferencia de un fármaco convencional, conocer el origen, naturaleza, pureza, estado cristalino y cantidad de principio activo y excipientes no es suficiente para tener una certeza razonable acerca de la performance in vivo de una nanomedicina [81]. Solo a título ilustrativo, mencionaremos sus aspectos estructurales más relevantes: 1) los residuos metoxi-PEG 2000 del PEG-DSPE que deben tener una conformación en cepillo y no de hongo, para proveer máxima protección estérica; 2) constancia de carga eléctrica superficial y potencial Z; 3) adecuado perfil de liberación de la doxorubicina in vitro testado bajo múltiples condiciones, asegurando el atrapamiento la doxorubicina en el interior liposomal frente a la dilución durante la infusión (10 ml/7000 ml sangre); 4) gradiente de sulfato de amonio estable, ya que es responsable de la permanencia de la doxorubicina en el interior liposomal. Este gradiente es lábil y su disipación implica la liberación de la doxorubicina.

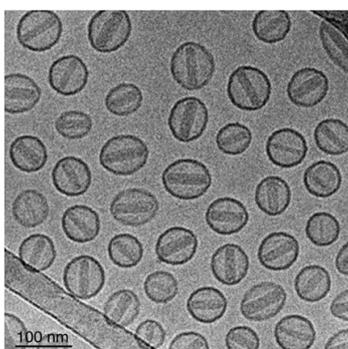


Figura 4. Cryo-TEM de Doxil.

A los efectos de aprobar una formulación genérica de doxorubicina liposomal peguilada, la FDA [82] exige constatar la igualdad de: condiciones internas (volumen, pH y concentración interna de sulfato de amonio, críticas para mantener precipitada a la doxorubicina); morfología liposomal y cantidad de bicapas (críticas para definir carga de droga, tasa de liberación y potencial activación de complemento); temperatura de transición de fase de bicapas (involucrada en la permeabilidad a la doxorubicina atrapada); tamaño de población liposomal (crítica para asegurar el targeting pasivo). Algunos de estos parámetros son sencillos de determinar; pero otros no. Un cálculo hecho sobre la base de la concentración de los componentes de Doxil y tamaño de población liposomal revela que 1 ml de una dispersión comercial contiene $2,3 \times 10^{14}$ liposomas, cada uno de los cuales acarrea unas ~ 10.000 moléculas de doxorubicina, de las cuales más del 95% está precipitadas como cristales en el interior liposomal. La geometría del liposoma influye -entre otras cosas- sobre la activación in vivo del complemento. La técnica de cryo-TEM es en este caso la apropiada para evidenciar las formas ovoides resultantes del precipitado interno de cristales de doxorubicina. Las condiciones internas, como la estabilidad del gradiente disipable o el volumen interno son aún menos sencillos de determinar. La dificultad en predecir la performance in vivo derivadas de la complejidad estructural en la nanoescala ententece la aprobación por organismos regulatorios y por ende la aplicación.

4. EL TARGETING ACTIVO: LA “BALA MÁGICA” NO ES REAL.

Hace unos 15 años, aparecieron estudios que sugerían que el targeting pasivo podía mejorarse mediante la exhibición superficial de ligandos de receptores selectivamente expresados por las células blanco. Sin embargo el intento de aplicar esta estrategia conocida como targeting activo, para incrementar el delivery de drogas mediante nano-objetos, no ha dado los frutos esperados. Únicamente se ha implementado con relativo éxito en fármacos consistentes en droga unida covalentemente a anticuerpos (ejemplos: Zevalin anti-CD20 90Y-ibritumomab tiuxetan contra linfoma No-Hodgkin), Mylotarg (anti-CD33- ozogamicin-gemtuzumab contra Leucemia, retirado en 2010 del mercado), Ontak (anti-CD25- proteína de fusión toxina difterica-IL2 contra linfoma de células T) y Bexxar (anti-CD20 131I-tositumomab contra linfoma No-Hodgkin).

Existen una serie de cuestionamientos sobre las estrategias de targeting cuya selectividad depende de la interacción ligando-receptor, surgidas tanto de la experimentación in vivo como de la clínica. Uno de ellos se refiere a la oportunidad, cantidad y calidad de la expresión de receptores, que pueda ser transitoria, insuficiente y/o inespecífica [83]. En modelos tumorales de roedores, es indistinguible la acumulación tumoral de albúmina de la de albúmina-folato. La farmacocinética y biodistribución de nanopartículas de ácido poli- láctico-co glicólico (PLGA) no difiere de la de nanopartículas PLGA-folato. La captura hepática (el principal órgano de almacenamiento del exceso de folato) de estos conjugados, explicaría estos resultados. Hasta la fecha, tratamientos pre-clínicos y clínicos con nano-objetos

derivatizados con pequeñas moléculas como galactosamina, transferrina y folato no produjeron resultados satisfactorios [84].

Otro de los cuestionamientos refiere a que la sobre-expresión de receptores en tumores no sucede sincrónicamente y no conduce necesariamente a una mayor acumulación de nano-objetos derivatizados. Las células normales, mucho más numerosas, pueden competir exitosamente frente a las tumorales por la captura (como ocurre con la derivatización con folato). Asimismo, la endocitosis mediada por receptores que sigue a la interacción ligando-receptor, aunque veloz, es un proceso saturable [85]; la tasa de reciclaje de receptores en tumores es muy heterogénea, oscilando entre 6-20 h de acuerdo al tipo tumoral [86]. En tanto los receptores de células tumorales tienen gran heterogeneidad en densidad y estructura [87]; la conducta de las células tumorales de un mismo paciente puede variar de acuerdo al estadio de su progresión [88].

Estudios pre-clínicos que emplearon nano-objetos derivatizados con fragmentos de anticuerpos, mostraron que el anticuerpo monoclonal anti-HER2 no media un incremento significativo de acumulación de inmunoliposomas en tumores. Los perfiles farmacocinéticos de liposomas e inmunoliposomas son similares y la acumulación tumoral es la misma para ambos (7-8% de la dosis inyectada/g tejido tumoral), independientemente de la sobre-expresión tumoral de HER2 (figura 5). La presencia de ligandos en liposomas solo incrementa sus oportunidades de binding/internalización de aquellos que se hallan en las vecindades de las células tumorales. Únicamente en ese caso, la internalización de inmunoliposomas por células tumorales que sobre-expresan HER2 fue un orden de magnitud mayor que para liposomas control. Pero como veremos en breve, estos resultados únicamente solo pudieron conseguirse in vitro [89]. Lo mismo sucedió con nanopartículas de poli (DL-láctico) cubiertas con HER2 [90]. Estudios recientes muestran que inmunoliposomas derivatizados con ligandos empleados para targeting al cerebro, no intermedian el acceso al parénquima cerebral in vivo [91].

Por otro lado, se ha reportado que la decoración con ligandos podría incrementar la transcitosis de nanopartículas unos 40–50 μm (3–5 capas celulares) más allá de la vasculatura tumoral, acercándolas al core tumoral [92, 93]. Sin embargo, la dificultad para difundir a través de la MEC tumoral aumenta con el diámetro hidrodinámico de los nano-objetos, como es el caso de aquellos estéricamente estabilizados y derivatizados. Finalmente, los nano-objetos derivatizados serían eliminados de circulación mucho más rápidamente que las proteínas nativas o polímeros biocompatibles no modificados, lo que reduce su vida media de circulación y posibilidades de extravasación.

Un tercer cuestionamiento se refiere al hecho de que la incorporación de anticuerpos a la superficie de nano-objetos es un reto estructural que aún no ha podido ser superado a escala industrial. Es extremadamente difícil obtener una población homogénea de nano-objetos recubiertos con anticuerpos carentes de fracción Fc (para evitar su reconocimiento por los R-Fc en células de Kupffer) unidos al extremo del estabilizante estérico.

El cuarto y más importante cuestionamiento, es que la derivatización con ligandos sirve para incrementar la captura de nano-objetos, por células que expresen los correspondientes receptores, pero no incrementa el acceso de nano-objetos a dichas células. In vivo, la cantidad de nano-objetos capturados por un tejido blanco depende primariamente de su posibilidad de extravasar hacia ese tejido desde circulación sistémica. Tal posibilidad es gobernada por los parámetros del targeting pasivo discutidos anteriormente y no por la presencia de ligandos superficiales.

En suma entonces, la identificación de blancos moleculares en células tumorales no garantiza el targeting del nano-objetos derivatizados.

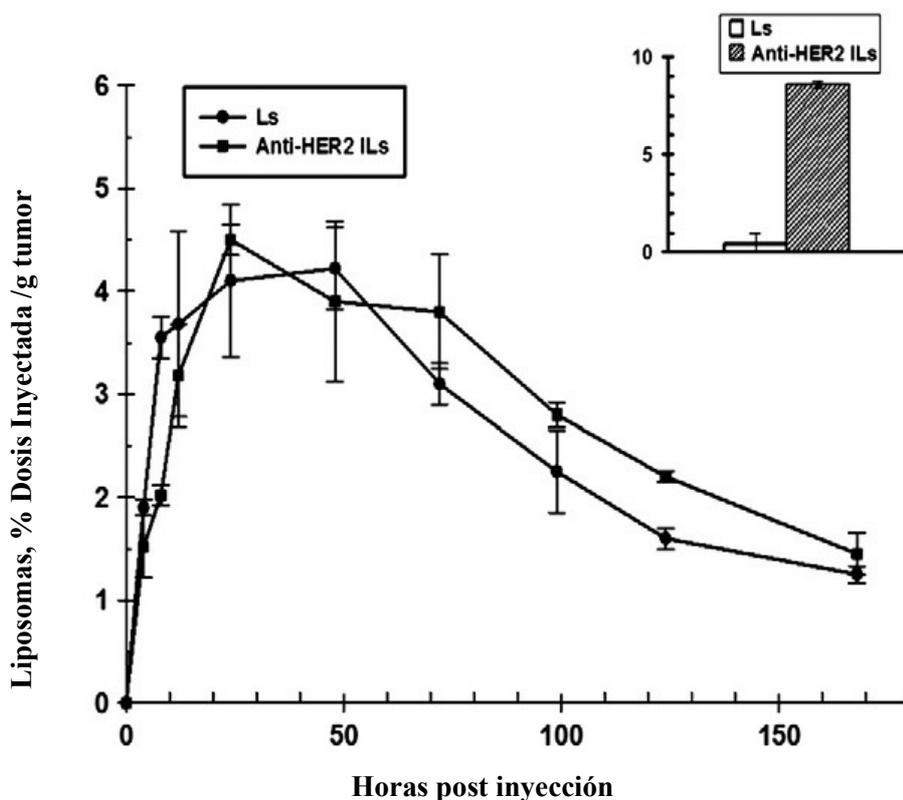


Figura 5. Farmacocinética tumoral de inmunoliposomas anti-HER2 (Anti-HERs ILs) versus liposomas Peguilados control (Ls) en xenografts de tumor de mama BT-474 implantado s.c. en ratones nude. Inset: captura de inmunoliposomas anti-HER2 versus liposomas control (Ls) en células de tumor de mama que sobre-expresan HER2 (SK-Br-3) in vitro. Adaptado de [89].

5. COMENTARIOS ACERCA DE LA EFICACIA

Luego de incorporado en nano-objetos, la farmacocinética de un PA se modifica profundamente. A excepción de las paredes vasculares, hígado, bazo y medula ósea, los nano-objetos fluyen sin tener contacto físico con el resto de los órganos. Asumiendo que el PA permanece retenido en la estructura del nano-objeto, la farmacocinética del PA es indistinguible

de la de su portador. Finalmente, aun existiendo efecto EPR, el hígado colecta la mayoría de los nano-objetos inyectados endovenosamente, por lo general por fagocitosis a cargo de células de Kupffer. Así, la doxorubicina liposomal peguilada por ejemplo, puede fluir por la vasculatura cardiaca sin que la doxorubicina tenga contacto físico con los cardiomiocitos [95-98]. Estudios representativos que emplearon datos normalizados a un área corporal superficial media de 1,7 m² y un peso promedio de 70 kg, mostraron que Doxil tiene mínima interacción con tejidos sanos, reducido clearance plasmático y menor riesgo de cardiotoxicidad [99]. Inyectada endovenosamente a dosis entre 25 y 50 mg/m² la doxorubicina liposomal peguilada, permanece en circulación por largo tiempo. Son típicos su mínimo volumen de distribución (en humanos 4L, unas 65 veces menor que la droga libre), gran área bajo la curva plasmática (unas 300 veces mayor que la droga libre), eliminación plasmática bi-exponencial (vidas medias 2 y 45 horas, la mayor parte de la dosis siendo eliminada en la segunda fase) y lento clearance renal (0,1 L/hora vs 45 L /hora para la droga libre). En presencia de efecto EPR, puede acumularse entre 4 a 16 veces más que la forma libre en tumores sólidos. En cambio la doxorubicina en formulación convencional accede uniformemente a todos los tejidos corporales. Además de mielosupresión severa, náuseas, vómitos y efectos mucocutáneos, puede causar fallo cardiaco congestivo irreversible, dada su cardiotoxicidad acumulativa y dosis-dependiente (hasta un máximo de 550 mg/m²) [94]. En su forma nanotecnológica la doxorubicina es más segura y permite administrar mayores dosis acumuladas con menor cardiotoxicidad [100]. Su eficacia sin embargo, no es mayor que la de doxorubicina libre. El acceso de doxorubicina a células tumorales, dependerá de su lenta difusión desde los cristales precipitados en el interior liposomal a través de bicapas poco permeables del Doxil, ya que la corona de PEG impide su endocitosis. Doxil está diseñado para maximizar la retención de doxorubicina en su interior, cuya liberación en circulación conduciría a su distribución uniforme y consiguiente cardiotoxicidad. El control del delicado balance (retención de PA en circulación/liberación sitio específica de PA) sin embargo, es una deuda pendiente. Actualmente se trabaja en la modificación de nano-objetos cuya estructura responda frente a estímulos externos sitio-específicos. Ejemplo de ello son los liposomas termo-sensibles que liberan doxorubicina luego de incrementar su permeabilidad en respuesta a estímulos locales [101]. Pero a pesar de su sencillez conceptual, no se han conseguido estructuras capaces de cumplir satisfactoriamente tal misión; por lo general hay una intensa liberación prematura de PA. Empleando métodos analíticos que permiten no sólo cuantificar el PA en sangre sino también la matriz liposomal y discernir entre PA libre y PA asociado a liposomas, se ha hallado que típicamente luego de 3 h, el 50% de los liposomas permanece circulante pero únicamente el 10% de la doxorubicina es retenida [102]. Recientes estudios muestran que la liberación prematura de PA desde micelas poliméricas podría retardarse mediante el entrecruzamiento de la estructura del core [103, 104].

Los diferentes tipos, estadios y grados tumorales tienen TD muy heterogéneos. De acuerdo al origen tisular por ejemplo, pueden variar entre 506–5378 días (adenomas pituitarios) [105] hasta 12 días (cáncer de estómago) [106]. Pero en tanto la toxicidad dosis-dependiente

es invariante, los tumores de crecimiento veloz, (o de bajo TD) requerirán un aumento proporcional de la dosis de nanomedicinas biodisponibles en el sitio blanco. Teóricamente la amplia ventana terapéutica de las nanomedicinas basadas en el efecto EPR [107] podría ser explotada en la dosificación personalizada para cada paciente. Pero como describimos anteriormente, es difícil controlar la dosificación de nanomedicinas. Por ejemplo, el Doxil se acumula en las vecindades de las células tumorales liberando doxorubicina, que difunde al interior celular en función de su gradiente de concentración, proporcional a su tasa de liberación desde el interior liposomal. Sin embargo, una alta acumulación tumoral de Doxil no significa elevada biodisponibilidad de doxorubicina, ya que su dificultosa liberación y bajo gradiente difusivo pueden resultar en concentración sub-terapéutica. Al margen de este problema, en general las vesículas entre 80-200 nm son lo suficientemente voluminosas como para asociar cantidades importantes de PA. Pero las nanopartículas poliméricas pueden presentar el problema de asociar insuficiente cantidad de PA. Esto ocurrió para las nanopartículas de conjugado polimérico copolímero HPMA-paclitaxel, que asociaron muy baja cantidad de paclitaxel ($\leq 10\%$) debido a su pequeño tamaño (12-15 nm); esto sumado a la inestabilidad de la unión éster [108, 109] resultó en concentraciones sub-terapéuticas de droga en tejido tumoral, que se evidenció en ensayos clínicos de fase I [110]. La rápida liberación de PA en circulación vía hidrólisis de unión éster, asociada a un tamaño demasiado pequeño fueron los responsables de la veloz filtración renal del conjugado copolímero de bajo PM HPMA-camptotecina además de la toxicidad uretral registrados en ensayos clínicos de fase I, sin que hubiera acumulación vía efecto EPR.

6. COMENTARIOS ACERCA DE LA NANOTOXICIDAD

La descripción detallada de la potencial toxicidad resultante de la interacción entre seres vivos y nano-objetos (nanotoxicidad), excede los términos de este artículo. En general podemos señalar que la interacción con nano-objetos biodegradables y no biopersistentes representan menores riesgos para la salud. La biopersistencia está relacionada con la incapacidad de células fagocíticas para procesar y eliminar el material, lo que conlleva al estrés oxidativo, inflamación crónica, y necrosis o generación de tumores. Asimismo, las rutas de administración tópica y mucosas son menos riesgosas que la parenteral. Los riesgos asociados a la ruta endovenosa surgen aun para nano-objetos biodegradables, y son varios. Por ejemplo, la doxorubicina liposomal peguilada, puede extravasarse y acumularse a través de los capilares de la piel de la planta de los pies y de las palmas de las manos. Estas zonas muy vascularizadas, con pequeños capilares sujetos a presión, fricción, microtraumatismos y elevado flujo sanguíneo, favorecen la extravasación y acumulación de nano-objetos de larga vida media de circulación. Este fenómeno está acompañado de toxicidad conocida como eritrodestesia palma-planta y puede ser limitante de su dosis terapéutica [111]. Como comentáramos anteriormente, la mayor parte de los nano-objetos administrados endovenosamente extravasa a través de fenestraciones de sinusoides hepáticos y esplénicos.

Pero mientras las funciones esplénicas pueden ser compensadas por otros órganos del sistema linfático, los daños hepáticos que puedan surgir tras la administración de nanomedicinas antitumorales representan un gran reto por superar. Por ejemplo los nanoconstructos de cis-platino (una droga con dosis limitada por toxicidad renal) tienen menor toxicidad renal a cambio de presentar dosis limitada por toxicidad hepática [112].

La peguiliación además, puede ser responsable de la eliminación sanguínea acelerada (accelerated blood clearance, ABC) de nano-objetos estéricamente estabilizados. En el fenómeno ABC, el tiempo de vida media en circulación se acorta para la segunda dosis administrada días más tarde, a causa de la inducción de IgM anti-PEG. Este fenómeno no solo causa captura hepática por opsonización sino eventual activación del complemento (C) [113, 114]. De hecho, la reacción tóxica aguda más importante luego de la administración endovenosa de nano-objetos es el efecto CARPA (Complement Activation Related Pseudo Allergy) [115]. Esta es una reacción de hipersensibilidad mediada por la liberación de factores inflamatorios desde mastocitos, iniciada por la activación del C frente a material nanoparticulado, que no requiere de la presencia de IgE. El distrés cardiopulmonar desencadenado por el efecto CARPA puede ser letal en individuos susceptibles. La activación del C ocurre por adhesión directa de C1q a superficie o a complejos antígeno en superficie-IgG/IgM, o por adhesión de lectina de unión a manosa (MBP)/ficolinas, o por adhesión de C3, sobre superficies. A continuación se desencadenan diferentes cascadas hidrolíticas convergentes en C3 convertasa [116]. La activación del C por vía clásica, de lectinas o alternativa, tiene como consecuencia una mayor eliminación de nano-objetos, ya por mayor fagocitosis luego de la opsonización o por formación del complejo de ataque y lisis sobre estructuras sensibles como las liposomales. El efecto CARPA se ha observado no solo luego de la administración de Taxol (paclitaxel solubilizado en Cremophor EL) y de Taxotere, (Docetaxel, paclitaxel solubilizado en Tween 80), y se cree que las micelas de surfactantes no iónicos polioxietilados Cremophor EL y Tween 80, activadoras de C in vitro, estarían relacionadas con la manifestación del efecto CARPA in vivo. Este efecto también se ha manifestado ante la administración de Doxil y de liposomas que no contienen PEG, como Ambisome. Aún se desconocen las características estructurales de los nano-objetos capaces de gatillar la activación de C, pero han podido establecerse ciertas generalidades que permiten predecir la manifestación del efecto CARPA. Por ejemplo, el C se activa sobre superficies de carga positiva y aunque las cargas negativas o el potencial Z negativo no son gatilladoras per se de activación, la misma es sensible a la topografía superficial de cargas negativas, como ocurre con Doxil, liposomas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) metoxiPEGuilados [117]. También se activa frente a la agregación de nano-objetos. De hecho pequeños cambios en la geometría individual de liposomas, redundan en grandes cambios de superficie total. Por ejemplo, cada dosis terapéutica de Doxil comprende 10¹³–14 liposomas, lo que representa la infusión de una cantidad de superficie en el orden de los cm². La detección de morfologías heterogéneas en los viales comerciales de Doxil (elongados, irregulares, agregados), es relevante en términos de activación de C ya que la misma es sensible a la superficie expuesta.

Recientemente se ha demostrado que mínimas variaciones en el radio de curvatura liposomal pueden activar C por la vía clásica (vía unión de IgM) [118]. En este contexto se ha sugerido que la doxorubicina podría contribuir indirectamente a la activación de C al modificar la forma y superficie de los liposomas [119].

La intensidad del efecto CARPA puede ser disminuida reduciendo la velocidad de infusión, diluyendo la concentración liposomal y premedicando con dexametasona. En ciertas ocasiones el fenómeno de taquifilaxis permite la desensibilización previa mediante placebos, como Doxibo (idéntico liposoma pero carente de doxorubicina) en el caso de Doxil.

Los ensayos in vitro, debido a su falta de estandarización y variabilidad, son poco efectivos para predecir activación de C in vivo por nano-objetos. Por otro lado, la reactogenicidad frente a la activación de C es especie dependiente, de acuerdo a: cerdos>perros>humanos>conejos>ratas>ratones. Por lo tanto el modelo animal porcino es el más adecuado para el estudio pre-clínico del efecto CARPA. Claramente, los tumores xenograft humanos implantados subcutáneamente en ratones nude inmunodeficientes, no solo son anatómicamente y fisiológicamente muy distintos de aquellos que crecen en su entorno nativo (ortotópicos), sino que este tipo de modelo excluye la percepción del efecto CARPA del nanomaterial. A pesar de lo universal de su empleo, los roedores están lejos de proporcionar información predictiva tanto de eficacia terapéutica como de la potencial toxicidad de las nanomedicinas.

7. CONCLUSIONES

Luego de describir los fundamentos de la actividad de las nanomedicinas antitumorales, pueden señalarse los principales aspectos que las diferencian de las formulaciones convencionales que emplean pequeñas drogas hidrofóbicas y de los basados en anticuerpos:

1. La actividad de las nanomedicinas depende de su posibilidad de acceso al sitio blanco, directamente ligada a la anatomía estructural local. Los nano-objetos no se autopropulsionan: su biodistribución depende de fenómenos puramente hidrodinámicos [120].
2. Mientras son pequeños (<2 mm) los tumores se sirven de la vasculatura de tejidos sanos adyacentes. Desarrollar la vasculatura anómala que permita el targeting vía efecto EPR puede tomar entre meses y años [121, 122]. Esto subraya la desventaja de esperar a una evolución del crecimiento tumoral para conseguir cierta selectividad y minimizar toxicidad. La dependencia del efecto EPR significa que los tratamientos más efectivos serían aquellos aplicados en una ventana temporal donde existiera una apropiada arquitectura vascular, con una mínima relación masa (avascular/vascularizada).
3. La dependencia del efecto EPR y su heterogeneidad hace que los estudios pre-clínicos sean poco predictivos de la eficacia de las nanomedicinas. La dificultad para conseguir modelos in vitro e in vivo, que remedien satisfactoriamente la arquitectura vascular tumoral, es uno de los

aspectos críticos para el desarrollo de prototipos de nanomedicinas tumorales cuya actividad depende del efecto EPR. La relevancia clínica del targeting de nano-objetos vía efecto EPR, dada su inusitada variabilidad, queda por demostrar. La exploración del contexto anatómico-patológico de cada paciente, mediante el mismo tipo de nano-objeto que permita tanto diagnóstico por imágenes como tratamiento, podría discernir si la futura medicación será beneficiosa o no [123].

4. La farmacodinamia de las nanomedicinas es única y muy diferente a la de los PA en formulaciones convencionales. La presencia de PA en sangre no es necesariamente PA biodisponible. Para acceder a las células de los tejidos irrigados por la vasculatura, las nanomedicinas deben extravasar y atravesar la matriz extracelular; luego serán capturadas endocíticamente o liberarán el PA acarreado en la periferia de las células blanco. Pero las nanomedicinas pueden quedar atrapadas en fenestraciones vasculares o en la matriz extracelular. En el primer caso se detectara PA en sangre, que no está biodisponible. En el segundo caso, solo mediante combinación de marca radiactiva con aislamiento de células, microscopia confocal de fluorescencia con múltiples marcas y/o citometría de flujo es posible distinguir in situ entre PA liberado/ PA asociado a nano-objetos/captura celular de PA libre o asociado a nano-objetos. Por otro lado, la cuantificación del nano-objeto o de PA por separado no significa presencia de nanomedicina, porque el PA puede haberse dissociado del nano-objeto.

5. Tanto el precio de las nanomedicinas como su complejidad estructural son muy elevados y la evaluación del costo-beneficio de los tratamientos con nanomedicinas oncológicas está fuera del objetivo de este artículo. Sin embargo, en el año 2006 se comparó la efectividad y costo-beneficio de tratamientos de segunda línea o subsecuentes con topotecan, doxorubicina peguilada liposomal y paclitaxel (tanto monoterapia como en combinación con compuestos de platino), sobre pacientes con cáncer de ovarios avanzado [124]. Se observó claramente que a pesar de no ser más efectivos, los tratamientos con doxorubicina liposomal peguilada fueron menos tóxicos. En tal caso, el menor costo del manejo de efectos adversos (aproximadamente £1,289 menos que topotecan y £4 menos que paclitaxel) contrapesa el elevado costo de la nanomedicina. La próxima generación de nanomedicinas deberá reducir la relación costo/beneficio no sólo disminuyendo la toxicidad sino también incrementando la eficacia. La tecnología actual sin embargo, aún debe resolver la selectividad del delivery de citostáticos, ajustando las dosis al tiempo de duplicación tumoral. Para ello el targeting vía efecto EPR mediante nanomedicinas de larga vida media en circulación, ofrece una solución poco satisfactoria. La peguilación superficial de nano-objetos, impide su captura y subsiguiente procesamiento intracelular, y por lo tanto reduce su oportunidad para ingresar mediante mecanismos que incrementarían la eficacia del delivery. La resolución de esta controversia requiere re-ingenierizar nano-objetos para a) minimizar la complejidad estructural, evitando la decoración superficial con ligandos complejos y b) buscar alternativas a la estabilización estérica con PEG. La vida media de nano-objetos en circulación puede aumentarse saturando la capacidad de captura de las células de Kupffer. Sin embargo dicha saturación no se ha

observado para nano-objetos estéricamente estabilizados hasta dosis de 300 mg/kg. Recientes estudios sugieren que mediante el control de la forma, podría reducirse la fagocitosis de nano-objetos; así su vida media en circulación aumentaría sin necesidad de complejas derivatizaciones. Por ejemplo la fagocitosis se dificulta para aquellos nano-objetos asimétricos cuya relación de ejes mayor/menor sea >10 y de tamaño $> 1 \mu\text{m}$ [125]. Hasta el momento sin embargo, no se han reportado estrategias antitumorales basadas en nano-objetos no fagocitables carentes de la clásica estabilización estérica.

Por otro lado, la modificación (ingenierización) de los nano-objetos permite controlar su modalidad de captura pinocítica y tráfico intracelular (endocitosis mediada por clatrina, caveolina, por no clatrina/ caveolina o macropinocitosis). Estas rutas permitirían el ingreso de una elevada cantidad de PA/tiempo, así como seleccionar el compartimiento de delivery intracelular de PA, requerida para incrementar expresión o silenciamiento génico, modular respuestas inmunes o evadir mecanismos de resistencia. En pre-clínica, la eficacia de estas estrategias es muy elevada, porque la captura pinocítica requiere de energía, pero es independiente de la difusión (y por lo tanto del gradiente de concentración). Esto significa que la captura pinocítica de pocos nano-objetos transportando elevadas cantidades de PA volcaría sustanciales cantidades de PA a compartimientos selectos del interior celular con extrema eficacia. Una de sus aplicaciones más promisorias de la captura pinocítica es la evasión de las bombas de resistencia a multidroga [126,127]. Al presente, Abraxane (paclitaxel en nanopartículas de albúmina) es el único tipo de nanomedicina antitumoral que opera luego de ser capturada endocíticamente por células blanco. A diferencia de Doxil, combina una reducción de toxicidad con incremento de eficacia [128]. Actualmente el desarrollo de nanomedicinas que incrementen el índice terapéutico en base a cambios de tráfico intracelular de la droga se perfila como extremadamente promisorio, pero se aún se halla en fase pre-clínica fundamentalmente contra agentes infecciosos intracelulares [129-131]. En este marco, recientemente se ha hallado que el control de la geometría y estructura superficial de los nano-objetos permitiría seleccionar la ruta pinocítica de captura y procesamiento [132]. También se ha sugerido que la geometría de los nano-objetos podría gobernar su biodistribución al experimentar diferentes fuerzas hidrodinámicas durante la circulación [133, 134].

La sencillez extrema está llamada a operar como próxima generación de nanomedicinas, pero para acceder a ella todavía hace falta desentrañar la intrincada relación entre forma, tamaño, características superficiales del nano-objeto, hidrodinámica y modalidad de captura/tráfico intracelular. La completa biocompatibilidad de los nano-objetos serán los principales retos estructurales para el campo de los nanobiomateriales y sobre todo para la manufactura industrial.

En este artículo hemos dado un brevísimo pantallazo desde la investigación pre-clínica, sobre la engañosa trivialidad detrás del diseño estratégico de nanomedicinas antitumorales basadas en el efecto EPR, la única estrategia conocida hasta el momento, capaz de incrementar la selectividad del delivery de citostáticos. En el mundo desarrollado los consorcios

público-privados, sustentados por una masa crítica de al menos 20 años de investigación previa, apuntan a acelerar la transferencia, es decir a transformar rápidamente conocimiento académico en productos comerciales. Estas acciones, que incluyen activamente los respectivos Ministerios Nacionales de Salud y autoridades regulatorias, se orientan a acelerar el acceso a pruebas clínicas, con fin de asegurar su liderazgo comercial en el campo farmacéutico. Pero en países en desarrollo como la Argentina, nuestra familiaridad para con la nanomedicina es engañosa. Para elaborar un plan estratégico que oriente a varios niveles el desarrollo de nanomedicinas, es condición necesaria pero insuficiente la formación de recursos humanos. Además debe existir la adecuada articulación entre academia e industria, con los organismos de control sanitario y el Ministerio Nacional de Salud. Únicamente así podrá saberse en qué puntos críticos un país en desarrollo como el nuestro, sacaría provecho de desarrollar este tipo de tecnología. ¿Será la nanomedicina un instrumento sofisticado reservado a resolver problemas de salud del Primer Mundo? Está en nosotros responder a esta pregunta que permanece abierta. Dirección a consultar: Asociación Argentina de Nanomedicina (www.nanomed-ar.org.ar)

REFERENCIAS

- [1] Feynman RP (1960) There's plenty of room at the bottom. *EngSci (CalTech)* 23: 22–36
- [2] Etheridge ML, Campbell SA, Erdman AG, Haynes CL, Wolf SM, McCullough J (2013) The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine* 9(1):1-14
- [3] Bertrand N, Leroux JC(2011) The journey of a drug-carrier in the body: An anatomophysiological perspective. *Journal of Controlled Release* 161: 152-163.
- [4] Wisse E, Jacobs F, Topal B, Frederik P, De Geest B (2008) The size of endothelial fenestrae in human liver sinusoids: implications for hepatocyte-directed gene transfer. *Gene Ther.* 15 1193–1199
- [5] Jacobs F, Wisse E, De Geest B (2010) The role of the sinusoidal cells in hepatocyte-directed gene transfer. *Am. J. Pathol.* 176:14–21
- [6] Aggarwal P, Hall JB, McLeland CB, Dobrovolskaia MA, McNeil SE (2009) Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv. Drug Delivery Rev.* 61: 428–437
- [7] Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA (2008) Nanoparticle size and surface properties determined the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:14265–14270
- [8] Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, Simard P, Leroux JC, Benoit J-P (2006) Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake. *J. Biomed. Mater. Res.* 78A: 620–628
- [9] Walport MJ (2001) Advances in immunology: complement: first of two parts. *N. Engl. J. Med.* 344: 1058–1066
- [10] Monopoli MP, Åberg C, Salvati A, Dawson KA (2012) Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat. Nanotech.* 7: 779–786
- [11] Allen TM (1981) A study of phospholipid interactions between high-density lipoproteins and small unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 640: 385–397
- [12] Rensen PC, Van Dijk MC, Havenaa EC, Bijsterbosch MK, KarKrujit J, Van Berkel TJC (1995) Selective liver targeting of antivirals by recombinant chylomicrons: a new therapeutic approach to hepatitis B. *Nat Med* 1: 221–225
- [13] Kreuter J, Hekmatara T, Dreis S, Vogel T, Gelperina S, Langer K (2007) Covalent attachment of apolipoprotein A-I and apolipoprotein B-100 to albumin nanoparticles enables drug transport into the brain. *Journal of Controlled Release* 118: 54–58.
- [14] Senior J, Delgado C, Fisher D, Tilcock C, Gregoriadis G (1991) Influence of surface hydrophilicity of liposomes on their interaction with plasma protein and clearance from the

circulation: studies with poly(ethylene glycol)-coated vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1062: 77–82

[15] Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285: 1182–1186

[16] Berger DP, et al (1995) Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression in human tumor models of different histologies. *Ann. Oncol.* 6: 817–825

[17] Iyer AK, Khaled G, Fang J, Maeda H (2006) Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discovery Today* 11: 812–818.

[18] Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K (2000) Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release* 65: 271–284

[19] Senger DR, et al (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219: 983–985

[20] Senger DR, Perruzzi CA, Feder J, Dvorak HF (1986) A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res.* 46: 5629–5632

[21] Nagy JA, Chang SH, Dvorak AM, Dvorak HF (2009) Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? *Br. J. Cancer* 100: 865–869

[22] Herbert SP, Stainier DY (2011) Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 551–564

[23] Roberts WG, Palade GE (1997) Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated. *Cancer Research* 57: 765–772

[24] Graves EE, Maity A, Le QT (2010) The tumor microenvironment in non-small-cell lung cancer. *Semin. Radiat. Oncol.* 20: 156–163

[25] Fang J, Nakamura H, Maeda H (2011) The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63: 136–151

[26] Matsumura Y, Maeda H (1986) A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent SMANCS. *Cancer Res.* 46: 6387–6392

[27] Maeda H, Yamamoto T (1996) Pathogenic mechanisms induced by microbial proteases in microbial infections. *Biol. Chem.* 377: 217–226

[28] Matsumura Y, Kimura M, Yamamoto T, Maeda H (1988) Involvement of the kiningenerating cascade and enhanced vascular permeability in tumor tissue. *Jpn. J. Cancer Res.* 79: 1327–1334

- [29] Wu J et al (2001) Enhanced vascular permeability in solid tumor involving peroxynitrite and matrix metalloproteinases. *Jpn. J. Cancer Res.* 92: 439–451
- [30] Okamoto T et al (2001) Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. *J. Biol. Chem.* 276: 29596–29602
- [31] Noguchi Y, Wu J, Duncan R, Strohal J, Ulbrich K, Akaike T, Maeda H (1998) Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues. *Jpn. J. Cancer Res.* 89: 307–314
- [32] Padera TP, Stoll BR, Tooredman JB, Capen D, di Tomaso E, Jain RK (2004) Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. *Nature* 427: 695
- [33] Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, Carreira CM, Brown EB, Boucher Y, Choi NC Mathisen D, Wain J, Mark EJ, Munn LL, Jain RK (2002) Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* 296: 1883–1886
- [34] Isaka N, Padera TP, Hagendoorn J, Fukumura D, Jain RK (2004) Peritumor lymphatics induced by vascular endothelial growth factor-C exhibit abnormal function. *Cancer Res.* 64: 4400–4404
- [35] Fukumura D, Jain RK (2007) Tumor microenvironment abnormalities: causes, consequences, and strategies to normalize. *J. Cell. Biochem.* 101: 937–949
- [36] Rippe B, Haraldsson B (1987) Fluid and protein fluxes across small and large pores in the microvasculature. Application of two-pore equations. *Acta Physiol. Scand.* 131: 411–428
- [37] Maeda H, Nakamura H, Fang J (2013) The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65: 71–79
- [38] Boucher Y, Jain RK (1992) Microvascular pressure is the principal driving force for interstitial hypertension in solid tumors: implications for vascular collapse. *Cancer Research* 52: 5110–5114
- [39] Baxter LT, Jain RK (1990) Transport of fluid and macromolecules in tumors II. Role of heterogeneous perfusion and lymphatics. *Microvasc. Res.* 40 246–263
- [40] Jain RK (1987) Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Res.* 47: 3039–3051
- [41] Baxter LT, Jain RK (1989) Transport of fluid and macromolecules in tumors I. Role of interstitial pressure and convection. *Microvasc. Res.* 37: 77–104
- [42] Greish K (2012) Enhanced permeability and retention effect for selective targeting of anticancer nanomedicine: are we there yet? *Drug Discovery Today: Technologies* 9: 2

- [43] Peters W, Teixeira M, Intaglietta M, Gross JF (1980) Microcirculatory studies in rat mammary carcinoma. I. Transparent chamber method, development of microvasculature, and pressures in tumor vessels. *Journal of the National Cancer Institute* 65: 631–642
- [44] Jain RK (1990) Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors. *Cancer Research* 50: 814s–819s
- [45] Liotta LA, Rao CN (1985) Role of the extracellular matrix in cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 460: 333–344
- [46] Aukland K, Nicolaysen G (1981) Interstitial fluid volume: local regulatory mechanisms. *Physiological Reviews* 61: 556–643
- [47] Netti PA, Berk DA, Swartz MA, Grodzinsky AJ, Jain RK (2000) Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors. *Cancer Research* 60: 2497–2503
- [48] Pluen A, Boucher Y, Ramanujan S, Mckee TD, Gohongi T, Tomaso ED, Brown EB, Izumi Y, Campbell RB, Berk DA, Jain RK (2001) Role of tumor-host interactions in interstitial diffusion of macromolecules: cranial vs. subcutaneous tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:4628–4633
- [49] Ramanujan S, Pluen A, Mckee TD, Brown EB, Boucher Y, Jain RK (2002) Diffusion and convection in collagen gels: implications for transport in the tumor interstitium. *Biophys. J.* 83: 1650–1660
- [50] Alexandrakis G, Brown E, Tong RT, Mckee TD, Campbell RB, Boucher Y, Jain RK (2004) Two-photon fluorescence correlation microscopy reveals the two-phase nature of transport in tumors. *Nat. Med.* 10: 203–207
- [51] Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, Torchilin VP, Jain RK (1998) Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 4607–4612
- [52] Jain RK, Stylianopoulos T (2010) Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nature Reviews Clinical Oncology* 7: 653–664.
- [53] Bae YH, Park K (2011) Targeted drug delivery to tumors: Myths, reality and possibility. *Journal of Controlled Release* 153: 198–205
- [54] Less JR, Skalak TC, Sevick EM, Jain RK (1991) Microvascular architecture in a mammary carcinoma: branching patterns and vessel dimensions. *Cancer Research* 51: 265–273
- [55] Northfelt DW, Dezube BJ, Thommes JA, Miller BJ, Fischl MA, Friedman-Kien A, Kaplan LD, Du Mond C, Mamelok RD, Henry DH (2005) Pegylated-liposomal doxorubicin versus doxorubicin, bleomycin, and vincristine in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma: results of a randomized phase III clinical trial. *Journal of Clinical Oncology* 16: 2445–2451.

- [56] Bachem MG et al. (2005) Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology* 128: 907–921
- [57] Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Ito I, Bawendi MG, Frangioni JV (2007) Renal clearance of quantum dots. *Nat. Biotechnol.* 25: 1165–1170
- [58] Sarin H (2010) Physiologic upper limits of pore size of different blood capillary types and another perspective on the dual pore theory of microvascular permeability. *J. Angiogenes. Res.* 2: 14
- [59] Fang J, Nakamura H, Maeda H (2010) The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63: 136-151
- [60] Bae YH, Park K (2011) Targeted drug delivery to tumors: myths, reality, and possibility. *Journal of Control Release* 153: 198–205.
- [61] Kwon K, Lee SC, Han B, Park K (2012) Analysis on the current status of targeted drug delivery to tumors. *Journal of Controlled Release* 164: 108-114.
- [62] Suzuki M, Hori K, Abe I, Saito S, Sato H (1981) A new approach to cancer chemotherapy: selective enhancement of tumor blood flow with angiotensin II. *J. Natl. Cancer Inst.* 67: 663–669
- [63] Guyton C, Hall JE (2000) The body fluids and kidneys. In *Textbook of Medical Physiology* (Guyton C, Hall JE, eds), pp. 358–382, W.B. Saunders
- [64] Greish KG et al (2003) Macromolecular therapeutics: advantages and prospects with special emphasis on solid tumour targeting. *Clin. Pharmacokinet.* 42: 1089–1105
- [65] Maeda H (2012) Vascular permeability in cancer and infection as related to macromolecular drug delivery, with emphasis on the EPR effect for tumor-selective drug targeting. *Proc. Jpn Acad. B Phys. Biol. Sci.* 88 53–71
- [66] Arun KI, Greish K, Fang J, Maeda H (2006) Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discovery Today* 11: 812-818
- [67] Nagamitsu A, Greish K, Maeda H (2009) Elevating blood pressure as a strategy to increase tumor targeted delivery of macromolecular drug SMANCS: cases of advanced solid tumors. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 39: 756–76
- [68] Seki T, Fang J, Maeda H (2009) Enhanced delivery of macromolecular antitumor drugs to tumors by nitroglycerin application. *Cancer Sci.* 100: 2426–2430
- [69] Noguchi A, Takahashi T, Yamaguchi T, Kitamura K, Noguchi A, Tsurumi H, Takashina K, Maeda H (1992) Enhanced tumor localization of monoclonal antibody by treatment with kininase II inhibitor and angiotensin II. *Jpn. J. Cancer Res.* 83: 240–243

- [70] Nagano S, Perentes JY, Jain RK, Boucher Y (2008) Cancer cell death enhances the penetration and efficacy of oncolytic herpes simplex virus in tumors. *Cancer Res.* 68: 3795–3802
- [71] Kawai M, Higuchi H, Takeda M, Kobayashi Y, Ohuchi N (2009) Dynamics of different-sized solid-state nanocrystals as tracers for a drug-delivery system in the interstitium of a human tumor xenograft. *Breast Cancer Res.* 11(4): R43
- [72] Wang J, Lu Z, Gao Y, Wientjes G Au JL (2011) Improving delivery and efficacy of nanomedicines in solid tumors: Role of tumor priming. *Nanomedicine (Lond).* 6: 1605–1620
- [73] Chang E, Chalikonda S, Friedl J, et al (2005) Targeting vaccinia to solid tumors with local hyperthermia. *Hum Gene Ther.* 16(4): 435–444
- [74] Kong G, Braun RD, Dewhirst MW (2000) Hyperthermia enables tumor-specific nanoparticle delivery: effect of particle size. *Cancer Res.* 60: 4440–4445
- [75] Tailor TD, Hanna G, Yarmolenko PS, et al (2010) Effect of pazopanib on tumor microenvironment and liposome delivery. *Mol Cancer Ther.* 9(6):1798–1808
- [76] Wu J et al. (2001) Enhanced vascular permeability in solid tumor involving peroxynitrite and matrix metalloproteinases. *Jpn. J. Cancer Res.* 92, 439–451
- [77] Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, Kotamraju VR, Agemy L, Greenwald DR, Ruoslahti E, (2010) Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs. *Science* 328: 1031–1035
- [78] Robinson-Smith TM, Isaacsohn I, Mercer CA, Zhou M, Van Rooijen N, Husseinzadeh N, McFarland-Mancini MM, Drew AF (2007) Macrophages mediate inflammation-enhanced metastasis of ovarian tumors in mice. *Cancer Res.* 67: 5708–5716
- [79] Taurin S, Nehoff H, Greish K (2012) Anticancer nanomedicine and tumor vascular permeability; Where is the missing link? *Journal of Controlled Release* 164(3): 265-275
- [80] Venditto VJ, Szoka FC Jr (2013) Cancer nanomedicines: So many papers and so few drugs! *Advanced Drug Delivery Reviews* 65: 80–88
- [81] Barenholz Y (2012) Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned Yechezkel (Chezy). *Journal of Controlled Release* 160: 117-134
- [82] [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatory Information /Guidances / UCM199635.pdf](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM199635.pdf), accesado 01/07/2013
- [83] Lehtinen J, Magarkar A, Stepniewski M, Hakola S, Bergman M, Tomasz R, Yliperttula M, Urtti A, Bunker A (2012) Analysis of cause of failure of new targeting peptide in PEGylated liposome: Molecular modeling as rational design tool for nanomedicine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 46: 121–130.

- [84] Lammers T, Kiessling F, Hennink WE, Storm G (2012) Drug targeting to tumors: principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *J. Control. Release* 161: 175–187
- [85] Kranenborg MH, Boerman OC, Oosterwijk-Wakka JC, Weijert MCD, Corstens FH, Oosterwijk E (1998) Two-step radio- immunotargeting of renal-cell carcinoma xenografts in nude mice with anti-renal cell-carcinoma X anti-DTPA bispecific monoclonal antibodies. *Int. J. Cancer* 7: 74–80
- [86] Paulos CM, Reddy JA, Leamon CP, Turk MJ, Low PS (2004) Ligand binding and kinetics of folate receptor recycling in vivo: impact on receptor-mediated drug delivery. *Mol. Pharmacol.* 66: 1406–1414
- [87] Capone PM, Papsidero LD, Chu TM (1984) Relationship between antigen density and immunotherapeutic response elicited by monoclonal antibodies against solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 72: 673–677
- [88] Damia G, D'Incalci M (2009) Contemporary pre-clinical development of anticancer agents- what are the optimal preclinical models? *Eur. J. Cancer* 45: 2768–2781
- [89] Kirpotin DB, Drummond DC, Shao Y, Shalaby MR, Hong K, Nielsen UB, Marks JD, Benz CC, Park JW (2006) Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. *Cancer Res.* 66: 6732–6740
- [90] Cirstoiu-Hapca A, Buchegger F, Lange N, Bossy L, Gurny R, Delie F (2010), Benefit of anti-HER2-coated paclitaxel-loaded immuno-nanoparticles in the treatment of disseminated ovarian cancer: therapeutic efficacy and biodistribution in mice. *J. Control. Release* 144: 324–331
- [91] van Rooy I, Mastrobattista E, Storm G, Hennink WE, Schiffelers RM (2011) Comparison of five different targeting ligands to enhance accumulation of liposomes into the brain. *J. Control. Release* 150: 30–36
- [92] Ruoslahti E, Bhatia SN, Sailor MJ (2010) Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. *J. Cell Biol.* 188: 759–768
- [93] Lu W, Xiong C, Zhang R, Shi L, Huang M, Zhang G, Song S, Huang Q, Liu G, Li C (2012) Receptor-mediated transcytosis: a mechanism for active extravascular transport of nanoparticles in solid tumors. *J. Control. Release* 161: 1005-1014
- [94] Kenyon J Chemotherapy and cardiac toxicity- the lesser of two evils. Doctors Lounge Website. Available at: <http://www.doctorslounge.com/index.php/blogs/page/14030>. Accessed July 13 2013.
- [95] Hamilton A, Biganzoli L, Coleman R (2002) A phase I clinical and pharmacokinetic study of polyethylene glycol liposomal doxorubicin (Caelyx, Doxil) at a 6-week interval in patients with metastatic breast cancer. *EORTC Ann. Oncol.* 13: 910–918

- [96] Gabizon A, Shmeeda H, Barenholz Y (2003) Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies. *Clin. Pharmacokinet.* 42: 419–436
- [97] Mross K, Niemann B, Massing U (2004) Pharmacokinetics of liposomal doxorubicin 662 (TLC-D99; Myocet) in patients with solid tumors: an open-label, single-dose study. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 54: 514–524
- [98] Gabizon AA, Shmeeda H, Zalipsky S (2006) Pros and cons of the liposome platform in cancer drug targeting. *J. Liposome Res.* 16: 175–183
- [99] Ewer MS, Martin FJ, Henderson C (2004) Cardiac safety of liposomal anthracyclines. *Semin. Oncol.* 31: 161–181
- [100] Solomon R, Gabizon A (2008) Clinical pharmacology of liposomal anthracyclines: focus on pegylated liposomal Doxorubicin. *Clin. Lymphoma Myeloma* 8: 21–32
- [101] Ta T, Porter TM (2013) Thermosensitive liposomes for localized delivery and triggered release of chemotherapy. *Journal of Controlled Release* 169:112–125.
- [102] de Smet M, Heijman E, Langereis S, Hijnen NM, Grüll H (2011) Magnetic resonance imaging of high intensity focused ultrasound mediated drug delivery from temperature-sensitive liposomes: an in vivo proof-of-concept study. *J. Control. Release* 150: 102–110
- [103] Lee HJ, Kim SE, Kwon IK, Park C, Kim C, Yang J, Lee SC (2010) Spatially mineralized self-assembled polymeric nanocarriers with enhanced robustness and controlled drug-releasing property. *Chem. Commun.* 46: 377–379.
- [104] Koo AN, Min KH, Lee HJ, Lee S-U, Kim K, Chan Kwon I, Cho SH, Jeong SY, Lee SC (2012) Tumor accumulation and antitumor efficacy of docetaxel-loaded core-shell-corona micelles with shell-specific redox-responsive cross-links. *Biomaterials* 33: 1489–1499
- [105] Tanaka Y, Hongo K, Tada T, Sakai K, Kakizawa Y, Kobayashi S (2003) Growth pattern and rate in residual nonfunctioning pituitary adenomas: correlations among tumor volume doubling time, patient age, and MIB-1 index. *J. Neurosurg.* 98: 359–365
- [106] Takahashi Y, Mai M, Kusama S (1995) Factors influencing growth rate of recurrent stomach cancers as determined by analysis of serum carcinoembryonic antigen. *Cancer* 75: 1497–1502
- [107] Garnett MC, Kallinteri P (2006) Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles. *Occup. Med. (Lond.)* 56: 307–311
- [108] Van S, Das SK, Wang X, Feng Z, Jin Y, Hou Z, Chen F, Pham A, Jiang N, Howell SB, Yu L, (2010) Synthesis, characterization, and biological evaluation of poly(L-gamma-glutamyl-glutamine)- paclitaxel nanoconjugate. *Int. J. Nanomedicine* 5: 825–837
- [109] Duncan R, Vicent MJ, Greco F, Nicholson RI (2005) Polymer–drug conjugates: towards a novel approach for the treatment of endocrine-related cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 12: S189–S199

- [110] Meerum Terwogt JM, ten Bokkel Huinink WW, Schellens JH, Schot M, Mandjes IA, Zurlo MG, Rocchetti M, Rosing H, Koopman FJ, Beijnen JH (2001) Phase I clinical and pharmacokinetic study of PNU166945, a novel water-soluble polymer-conjugated prodrug of paclitaxel. *Anticancer Drugs* 12: 315–323
- [111] Saini A, Berruti A, Sperone P, Bitossi R, Tampellini M, Dogliotti L, Gorzegno G (2006) Recall inflammatory skin reaction after use of pegylated liposomal doxorubicin in site of previous drug extravasation. *Lancet Oncol* 7: 186–87.
- [112] Uchino H et al (2005) Cisplatin-incorporating polymeric micelles (NC- 6004) can reduce nephrotoxicity and neurotoxicity of cisplatin in rats. *Br. J. Cancer* 93: 678–687
- [113] Ishida T, Ichihara M, Wang X, Kiwada H (2006) Spleen plays an important role in the induction of accelerated blood clearance of PEGylated liposomes. *J. Control. Release* 115: 243–250
- [114] Park K (2010) To PEGylate or not to PEGylate, that is not the question. *J. Control. Release* 142: 147–148
- [115] Szebeni J, Muggia F, Gabizon A, Barenholz Y (2011) Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: Prediction and prevention. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63: 1020–1030.
- [116] Devine DV, Wong K, Serrano K, Chonn A, Cullis PR (1994) Liposome–complement interactions in rat serum: implications for liposome survival studies. *Biochim. Biophys. Acta* 1191: 43–51
- [117] Moghimi SM, Hamad I, Andresen TL, Jørgensen K, Szebeni J (2006) Methylation of the phosphate oxygen moiety of phospholipid-methoxy(polyethylene glycol) conjugate prevents PEGylated liposome-mediated complement activation and anaphylatoxin production. *FASEB J.* 20: 2591–2593
- [118] Pedersen MB, Zhou X, Larsen EKV, Sorensen US, Kjems J, Nygaard JV, Nyengaard JR, Meyer RL, Boesen T, Vorup-Jensen T (2010) Curvature of synthetic and natural surfaces is an important target feature in classical pathway complement activation. *J. Immunol.* 184: 1931–1945
- [119] Szebeni J, Bedocs P, Rozsnyay Z, Weiszhar Z, Rosivall L, Cohen R, Garbuzenko O, Báthori G, Tóth M, Bünger R, Barenholz Y (2012) Liposome-induced complement activation and related cardiopulmonary distress in pigs: factors promoting reactogenicity of Doxil and Ambisome. *Nanomedicine: Nanotechnol, Biol, Med.* 8: 176–184
- [120] Ruenraroengsak P, Cook JM, Florence AT (2010) Nanosystem drug targeting: facing up to complex realities. *J. Control. Release* 141: 265–276
- [121] Gimbrone Jr MA, Leapman SB, Cotran RS, Folkman J (1972) Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *The Journal of Experimental Medicine* 136: 261–276

- [122] Jang SH, Wientjes MG, Lu D, Au JLS (2003) Drug delivery and transport to solid tumors. *Pharmaceutical Research* 20: 1337–1350
- [123] Mastrobattista E (2013) Advanced drug delivery in motion. *International Journal of Pharmaceutics* 454: 517–520
- [124] Main C, Bojke L, Griffin S, Norman G, Barbieri M, Mather L, Stark D, Palmer S, Riemsma R (2006) Topotecan, pegylated liposomal doxorubicin hydrochloride and paclitaxel for second-line or subsequent treatment of advanced ovarian cancer. *Health Technology Assessment* 10: 1-80
- [125] Champion A, Mitragotri S (2006) Role of target geometry in phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 4930–4934
- [126] Kunjachan S, Błaż Andrzej, Makel D, Theek B, Kiessling F, Etrych T, Ulbrich K, van Bloois L, Storm G, Bartosz G, Rychlik B, Lammers T (2012) Overcoming cellular multidrug resistance using classical nanomedicine formulations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 45: 421–428.
- [127] Yin Q, Shen J, Zhang Z, Yu H, Li Y (2013) Reversal of multidrug resistance by stimuli-responsive drug delivery systems for therapy of tumor. *Advanced Drug Delivery Reviews*, In Press.
- [128] Hawkins MJ, Soon-Shiong P, Desai N (2008) Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60: 876–885.
- [129] Etzerodt A, Maniecki MB, Graversen JH, Møller HJ, Torchilin VP, Moestrup SK (2012) Efficient intracellular drug-targeting of macrophages using stealth liposomes directed to the hemoglobin scavenger receptor CD163. *Journal of Controlled Release* 160: 72-80.
- [130] Wei H, Zhuo R-X, Zhang X-Z (2013) Design and development of polymeric micelles with cleavable links for intracellular drug delivery. *Progress in Polymer Science* 38: 503-535.
- [131] Xu S, Olenyuk BZ, Okamoto CT, Hamm-Alvarez SF (2013) Targeting receptor-mediated endocytotic pathways with nanoparticles: Rationale and advances. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65(1):121-38.
- [132] Gratton SE, Ropp PA, Pohlhaus PD, Luft JC, Madden VJ, Napier ME, DeSimone JM (2008) The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 11613–11618
- [133] Decuzzi P, Godin B, Tanaka T, Lee S, Chiappini C, Liu X, Ferrari M (2010) Size and shape effect in the biodistribution of intravascularly injected particles. *J. Control. Release* 141: 320–327
- [134] Doshi N, Prabhakar Pandian B, Rea-Ramsey A, Pant K, Sundaram S, Mitragotri S (2010) Flow and adhesion of drug carriers in blood vessels depend on their shape: a study using model synthetic microvascular networks. *J. Control. Release* 146: 196–200

[135] Maeda H, Bharate GY, Daruwalla J (2009) Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 71: 409–419

[136] Maeda H (2010) Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: background and future prospects. Bioconjug. Chem. 21: 797-802

[137] Kono T, Maeda H, Iwai K, Tashiro S, Maki S, Morinaga T, Mochinaga M, Hiraoka MT, Yokoyama I (1983) Effect of arterial administration of high-molecular-weight anticancer agent SMANCS with lipid lymphographic agent on hepatoma: a preliminary report. Eu. J. Cancer Clin. Oncol. 19: 1053-1065



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista QuímicaViva

Número 3, año 12, Diciembre 2013

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar