



FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO:

**Sistemas de liberación controlada de
medicamentos. Aplicaciones biomédicas.**

Autor: Virginia Peña Blanco

D.N.I.: 47297438-P

Tutor: Florentina Niuris Acosta Contreras

Convocatoria: Febrero 2016

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
PALABRAS CLAVE	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Hidrogeles	
1.2. Aptámeros.	
2. OBJETIVOS	7
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	7
4. RESULTADOS.....	8
4.1 Hidrogeles funcionalizados con aptámeros en el tratamiento del cáncer.	
4.2. Hidrogeles funcionalizados con aptámeros para la captación y liberación de fármacos.	
4.3. Hidrogeles funcionalizados con aptámeros para la liberación de proteínas.	
4.4. Hidrogeles funcionalizados con aptámeros para la liberación de antibióticos.	
5. CONCLUSIONES	16
6. BIBLIOGRAFÍA	17

RESUMEN

Las Formas Farmacéuticas de Liberación Modificada (FFLM) son aquellas en las que la velocidad y el lugar de liberación de la sustancia o sustancias activas, es diferente al de la forma farmacéutica de liberación convencional administrada por la misma vía. Los avances biomédicos de los últimos años, han hecho posible investigar nuevos sistemas de liberación modificada basados en polímeros inteligentes y sistemas poliméricos de targeting, como es el caso de los hidrogeles funcionalizados con aptámeros. En el presente trabajo se realiza una revisión bibliográfica para conocer el uso de estos sistemas en el tratamiento de distintas patologías y las ventajas que presentan. Los resultados muestran la capacidad de los hidrogeles funcionalizados con aptámeros para liberar los fármacos de manera controlada y dirigida al lugar de acción, gracias a su especificidad y afinidad con la molécula diana.

Palabras clave: aptámeros; hidrogeles funcionalizados; sistemas liberación modificada; biomateriales.

ABSTRACT

Pharmaceutical Dosage Forms for controlled release of therapeutic agents are those which speed and drug delivery site are different from the native dosage form. Advances in biomedicine over the last few years have led to investigate new controlled drug delivery systems based on smart polymers and targeted delivery, such as aptamers functionalized hydrogels. In the present report, a bibliographical research on the use of these systems in a variety of diseases has been done, as well as on its advantages. In the light of the results the aptamers functionalized hydrogels ability is demonstrated. Therefore these systems can control the release of drugs at a target site with a desired rate because of its specificity and affinity with the target.

Keywords: aptamers; functionalized hydrogels; controlled delivery systems; biomaterials.

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Real Farmacopea Española (1), las Formas Farmacéuticas de Liberación Modificada (FFLM) son aquellas en las que la velocidad y el lugar de liberación de la sustancia o sustancias activas, es diferente al de la forma farmacéutica de liberación convencional administrada por la misma vía.

Estas formas de liberación modificada pueden clasificarse atendiendo a su objetivo, es decir, si pretenden controlar la velocidad de liberación o el lugar. Así distinguiremos entre sistemas temporales o espaciales.

En el primer caso, aquellas que controlan la velocidad de liberación, pueden a su vez clasificar en formas farmacéuticas de liberación retardada, prolongada, sostenida y pulsátil (1).

- Formas de liberación retardada: son aquellas en las que la liberación del principio activo se retrasa, ya que se libera en un momento distinto al de la administración pero sin prolongar el efecto terapéutico (2).
- Formas de liberación prolongada: son aquellas en las que el principio activo se libera inicialmente en proporción suficiente para producir efecto terapéutico y posteriormente lo hace de forma más lenta, manteniendo la concentración eficaz, con lo que se consigue alargar el efecto terapéutico (2).
- Formas de liberación sostenida en las que el principio activo se libera a una velocidad constante, para evitar las fluctuaciones de los niveles plasmáticos de principio activo (2).
- Formas de liberación pulsátil en las que la liberación se produce en distintas fases.

En los últimos años el desarrollo de este tipo de formas farmacéuticas se ha visto incrementado, ya que aportan ventajas clínicas para el paciente (3). Entre éstas podemos destacar:

- Reducción del número de dosis del medicamento. El aumento del intervalo posológico mejora en muchos casos la adherencia de los pacientes al tratamiento prescrito.

- Reducción de las fluctuaciones de las concentraciones plasmáticas, con ello se pretende minimizar los efectos adversos asociados a concentraciones tóxicas, así como evitar la pérdida de eficacia por niveles subterapéuticos de fármaco.
- Mayor control del lugar de liberación del fármaco.
- Evitar la degradación del fármaco en el organismo.

En segundo lugar encontraremos los sistemas espaciales, los cuales buscan la vectorización del fármaco al lugar de acción. Estos sistemas estarán formados por la sustancia activa y el transportador, como es el caso de los hidrogeles. En comparación con los sistemas convencionales, los beneficios terapéuticos que aportan son:

- Reducción de los efectos no deseados.
- Aumento de la eficacia de los principios activos.
- Prevención de la biodegradación del fármaco durante su distribución.
- Acceso a biofase o lugar donde el fármaco ejerce su acción.

Estas características junto con los avances biomédicos, ha hecho posible que en los últimos años se hayan desarrollado investigaciones dirigidas al estudio de nuevos sistemas de liberación modificada basados en polímeros inteligentes y sistemas poliméricos de targeting (4).

1.1. Hidrogeles

Los hidrogeles son sistemas tridimensionales poliméricos formados con materiales de origen natural o sintético capaces de retener una gran cantidad de agua (5-7). En condiciones fisiológicas, son capaces de retener una gran cantidad de agua u otros fluidos biológicos y se caracterizan por una viscoelasticidad similar a los tejidos humanos(7), lo que hace que sean una sustancia ideal para múltiples aplicaciones (8).

Durante la fase de hinchamiento, los hidrogeles no se desintegran gracias a la estructura reticulada. Los entrecruzamientos pueden producirse *in vitro*, durante la preparación del hidrogel, o *in situ*, es decir, una vez que se encuentra en el organismo humano (5). Para que se lleve a cabo esta reacción química es necesario introducir un agente de entrecruzamiento de bajo peso molecular con un polímero. En el caso de ausencia de puntos de entrecruzamiento, las cadenas hidrofílicas del polímero se

disuelven en el agua debido a la compatibilidad termodinámica entre ambos. Sin embargo, cuando estos puntos existen, la solubilidad se compensa con la reducción de la elasticidad de los puntos de entrecruzamiento. En el momento en el que las fuerzas se igualan, el hinchamiento llega al equilibrio (5).

Los hidrogeles pueden clasificarse en función de la naturaleza de las uniones de la red tridimensional, pudiendo ser de carácter físico o químico (6). En el caso de que el entrecruzamiento sea químico, las cadenas del polímero se unen por enlaces covalentes a un agente de entrecruzamiento. Mientras que en el físico, existen fuerzas hidrofóbicas, enlaces iónicos y puentes de hidrógeno que hacen que la síntesis de estos hidrogeles sea más sencilla, e incluso, que se puedan modificar características como el volumen y la forma. Además presentan mejores propiedades toxicológicas y son biodegradables.

Otra de las características destacable de estos sistemas es que permiten incorporar sustancias, en este caso fármacos, para su posterior liberación. Todo ello hace que sea posible crear hidrogeles inteligentes, es decir, hidrogeles capaces de reaccionar frente algún tipo de estímulo como por ejemplo el pH, la luz, la temperatura, radiación o el reconocimiento molecular entre otros (7-9). De esta forma la variación de las propiedades fisicoquímicas del medio en el que se encuentre el hidrogel, puede suponer cambios en el tamaño de poro, el volumen o la integridad estructural del polímero (9) que dan lugar a la liberación del fármaco. Para evitar la baja afinidad y especificidad de estos sistemas, se han desarrollado sistemas de funcionalización mediante aptámeros.

1.2. Aptámeros

Los aptámeros son ácidos nucleicos de cadena sencilla de ADN o ARN, cuya estructura tridimensional les permite unirse con elevada especificidad y afinidad a la molécula diana (10).

A la hora de diseñar los aptámeros, el primer proceso desarrollado fue el llamado evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial o SELEX (por las siglas en inglés Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment). Este

método fue publicado en 1990 por Tuerk y Gold, y Ellington y Szostak (10) de manera independiente. El resultado era la obtención de oligonucleótidos de una sola cadena que se unen específicamente y con gran afinidad a las moléculas diana. Basándose en la química recombinatoria (10) Larry Gold, crea una biblioteca de polinucleótidos que tienen secuencias conocidas en los extremos 5' y 3', denominadas cebadores, mientras que las regiones centrales están compuestas por secuencias al azar de 40-60 nucleótidos. Para seleccionar las secuencias de la biblioteca se lleva a cabo la repetición sucesiva de las siguientes etapas: incubación, separación, elución, amplificación y acondicionamiento (11).

En primer lugar se incuba la biblioteca de oligonucleótidos con la molécula diana de estudio, hasta conseguir que las secuencias con afinidad por ésta se unan a ella. A continuación, las secuencias no enlazadas se separan y descartan mediante diversas técnicas, entre ellas se encuentra la cromatografía de afinidad. Después, los oligonucleótidos se separan de la molécula diana y se amplifican mediante PCR (Polymerase Chain Reaction o en español reacción en cadena de la polimerasa). Finalmente las hebras dobles son separadas para obtener hebras de cadena sencilla. Este proceso se repite durante varios ciclos, por lo general se realizan de 10 a 15 ciclos (12) ya que de ello dependerá la afinidad de los aptámeros. Así con cada ciclo las condiciones de interacción con la diana y de separación del resto de las secuencias de la colección son más restrictivas y se obtienen aptámeros cada vez más selectivos (10). Una vez finalizado el proceso, se clonan y secuencian.

En comparación con los anticuerpos, los aptámeros presentan una serie de ventajas, ya que pueden sintetizarse de manera sencilla, económica y reproducible, presentan buena estabilidad, no son inmunogénicos y pueden modificarse fácilmente para mejorar sus propiedades. Así pueden emplearse de dos formas distintas, como moléculas efectoras que reconocen una molécula diana y ejercen directamente la acción, o bien, como vehículos para la entrega de una molécula secundaria como fármacos.

Aplicando estos conocimientos a los hidrogeles, la unión del aptámero a la diana puede producir cambios estructurales, que repercuten en las interacciones

establecidas con el hidrogel, pudiéndose dar la ruptura o disociación y con ello la liberación de fármacos.

Este hecho ha creado nuevas líneas de investigación, en las que numerosos grupos están desarrollando hidrogeles funcionalizados con aptámeros para la liberación controlada de fármacos para el tratamiento de distintas patologías entre las que destacan las orientadas a enfermedades hematológicas (13) al cáncer (10) y la infección por VIH (14).

2. OBJETIVOS

El objetivo de este Trabajo de Fin de Grado es realizar una revisión bibliográfica de los últimos cinco años sobre la temática de los hidrogeles funcionalizados con aptámeros como nuevos sistemas de liberación de fármacos con utilidad terapéutica. De forma específica, se pretende conocer las ventajas de estos sistemas frente a las terapias tradicionales.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se ha llevado a cabo una búsqueda de artículos relacionados con hidrogeles inteligentes, aptámeros e hidrogeles funcionalizados con aptámeros que tengan posibles utilidades terapéuticas.

Cabe destacar, que los artículos aceptados en la revisión han sido aquellos en los que se han desarrollado geles funcionalizados con aptámeros como un nuevo sistema de liberación controlada de fármacos. A la hora de seleccionar los artículos para este trabajo, se ha considerado necesario que los artículos escogidos hubieran sido publicados en los últimos cinco años.

Se valoraron también revisiones bibliográficas sobre aptámeros, en las que se revisaba la evolución en las técnicas de obtención, usos y funcionalización de hidrogeles en los últimos años. Además de una revisión de hidrogeles sobre su clasificación, diseño y

aplicaciones, así como otra revisión del año 2014 sobre biomateriales funcionalizados con aptámeros.

Para la búsqueda bibliográfica se realizó una exploración retrospectiva del tema de este trabajo en las principales fuentes de información biomédicas durante el período comprendido entre octubre de 2015 y enero de 2016. Las principales fuentes de información biomédica empleadas fueron las páginas web de PubMed y ScienceDirect. La búsqueda se realizó en inglés utilizando las siguientes palabras clave: *aptamers (aptámero)*, *hydrogel (hidrogel)*, *controlled delivery system (sistema de liberación modificada)*.

De dicha búsqueda se obtuvieron un total de treinta artículos que eran potencialmente útiles para el trabajo a partir del título y del resumen. De todos ellos, se descartaron los artículos en los que a pesar de tratarse de hidrogeles inteligentes, éstos no estaban funcionalizados con aptámeros. También se descartaron aquellos relacionados con aptámeros pero que empleaban otros sistemas distintos a los hidrogeles, como eran nanopartículas de oro. Y por último, aquellos hidrogeles funcionalizados con aptámeros, cuya finalidad difería de la liberación controlada de fármacos.

De esta forma se seleccionaron un total de trece artículos que cumplían con los criterios expuestos anteriormente.

4. RESULTADOS

Uno de los primeros estudios para demostrar la viabilidad de los hidrogeles funcionalizados con aptámeros (15), fue desarrollado por Soontornworajit et al. (2010). Para ello seleccionaron un hidrogel de poliacrilamida al cual incorporaron aptámeros de 36 nucleótidos modificados en el extremo 5', donde se añadió una cadena de 10 nucleótidos. Se emplearon aptámeros de alta y baja afinidad, los cuales tenían valores de K_D de 25 nM y 220 nM respectivamente. Para comprobar la incorporación de los aptámeros durante la síntesis del hidrogel, se realizó una electroforesis en geles de agarosa empleando bromuro de etidio como agente intercalante. Los resultados obtenidos, mostraban que los geles que habían

incorporado los aptámeros, tanto de alta como de baja afinidad, presentaban la misma intensidad de señal. Mientras que aquellos hidrogeles que no habían incorporado los aptámeros presentaban una intensidad significativamente menor. A pesar del éxito en la incorporación, hubo un 7.3 % de aptámeros de ADN que se encontraban libres después de la polimerización del hidrogel.

Para estudiar la cinética de liberación, incorporaron **PDGF-BB**, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, al hidrogel funcionalizado con aptámeros. Así en las primeras 24 h del estudio los porcentajes de liberación de PDGF-BB desde el hidrogel nativo, el que contenía aptámeros de baja afinidad y el hidrogel con aptámero de alta afinidad fueron 70%, 40% y 10% respectivamente. Durante las 120 h siguientes del estudio, la liberación se vio reducida.

Este estudio demostró el sistema de liberación sostenida de un hidrogel de poliacrilamida funcionalizado con el aptámero anti-PDGF-BB, sentando las bases para el desarrollo de futuros sistemas de hidrogeles biocompatibles.

4.1. Hidrogeles funcionalizados con aptámeros en el tratamiento del cáncer

Los avances en investigación permiten que los fármacos empleados en el tratamiento del cáncer sean cada vez más eficaces, permitiendo obtener mejores resultados y disminuyendo los efectos secundarios del tratamiento. En la búsqueda de terapias con mayor selectividad por las células cancerígenas se han desarrollado estudios que emplean geles funcionalizados con aptámeros con gran afinidad y especificidad por este tipo de células.

Recientemente Wang et al. (2015) seleccionaron aptámeros contra la nucleolina, una proteína sobreexpresada en las células tumorales, y los incorporaron a los hidrogeles para controlar la liberación del fármaco antitumoral doxorubicina (dox). En su estudio, los oligonucleótidos modificados en el grupo acrílico (S-A y S-B) se copolimerizan con acrilamida para dar lugar a conjugados de ADN poliacrilamida (PS-A y PS-B). Posteriormente la adición del **aptámero anti nucleolina AS1411** (10) iniciaba la hibridación de las cadenas de oligonucleótidos con la secuencia complementaria correspondiente del aptámero, dando lugar a uniones entre éste y los polímeros

lineales de poliacrilamida (8). La incorporación del aptámero era verificada mediante los cambios de viscosidad e imágenes de microscopio electrónico de transmisión (TEM). Posteriormente se añadió dox a la mezcla, a un pH distinto para conseguir su incorporación. Una vez que se añade la molécula diana del aptámero, el AS1411 presenta mayor afinidad por la nucleolina, produciéndose la disolución del gel como consecuencia de la disminución del número de enlaces del sistema polimérico. Esto provoca que el fármaco encapsulado en el interior pueda liberarse en el lugar de acción.

Para estudiar la liberación del fármaco, el grupo de Wang recreó las condiciones fisiológicas. Se emplearon dos variables de estudio. En primer lugar se estudió la liberación a distintos pH, observándose que la liberación era mayor y más rápida en un pH de 6.3, el cual coincidía con el pH de la superficie de las células tumorales. Así el 50% de la liberación se alcanzaba a las 5h y el 80% a las 20h, llegando al estado de meseta. Mientras que a pH fisiológico la liberación era mucho menor, consiguiéndose una liberación del 60% a las 20h.

Por otro lado, el estudio demostró que la liberación era mayor cuanto mayor era la concentración de nucleolina en el medio, llegándose a una liberación constante a concentraciones superiores de 10 ng.

4.2. Hidrogeles funcionalizados con aptámeros para la captación y liberación de fármacos

Actualmente los sistemas empleados para la liberación de productos biológicos como factores de crecimiento, citoquinas, péptidos y vacunas implican múltiples administraciones y elevadas dosis como resultado de la baja vida media de estos compuestos y de su rápido aclaramiento en el organismo antes de llegar al lugar de acción (17). Por este motivo se han desarrollado sistemas poliméricos para conseguir una liberación localizada de dichos productos (18,19). Además de emplearse como sistemas de liberación, los hidrogeles pueden usarse para capturar y liberar factores de crecimiento (20). Sin embargo el uso de hidrogeles que utilizan ligandos como heparina o iones metálicos presenta problemas como baja afinidad y especificidad, y

elevados niveles de toxicidad (21,22) Por este motivo el uso de aptámeros supone una alternativa a estos problemas.

Mark R. Battig et al. (2014) desarrollaron un hidrogel de superporos funcionalizado con aptámeros que pretendía secuestrar **PDGF-BB** y posteriormente liberarlo (23). Durante la síntesis se encontraron dos factores críticos a tener en cuenta. En primer lugar la concentración inicial de PEGDA (diacrilato de polietilenglicol) en la fase de polimerización debe encontrarse entre el 15 y 20% para dar lugar a poros estables, ya que a concentraciones inferiores, éstos se colapsaban o no se llegan a formar. Por otro lado se determinó que el aptámero ejercía un papel fundamental tanto en la síntesis del polímero, como en la captación y liberación de los factores de crecimiento. También se observó que el aptámero ideal era el modificado en el grupo acilo (24). Así el Apt-H, un aptámero anti-PDGF-BB, podía adsorber elevados niveles de PDGF-BB con gran eficiencia. Al variar la secuencia nucleotídica se obtuvieron distintos aptámeros que no eran capaces de captar y retener PDGF-BB con la misma capacidad.

También se observó que la capacidad de retención del hidrogel estaba relacionada con el tiempo de liberación de los factores de crecimiento, así a mayor afinidad del aptámero por PDGF-BB mayor retención y mayor tiempo de liberación de éstos. Se concluyó que para aumentar la retención se podía aumentar la concentración molar del aptámero.

Para estudiar la liberación del PDGF-BB se usaron dos secuencias complementarias (CSs) distintas. El uso de secuencias complementarias con las que hibrida el aptámero puede suponer el cambio de su estado activo al inactivo. Así, como resultado de la hibridación, el aptámero puede liberar PDGF-BB. En el estudio realizado, se observó que el aptámero tenía mayor afinidad por la secuencia complementaria con la que establecía mayor número de pares de bases.

En comparación con otros sistemas de síntesis de polímeros, la formación de este hidrogel se realizaba a través de radicales libres y ácido acético que generaba burbujas de gas (23). Este proceso eliminaba y/o inactivaba los posibles organismos biológicos que pudiese haber en la solución pre-polímero. Sin embargo los subproductos y monómeros que no reaccionaban eran eliminados mediante sucesivos lavados

pudiendo dar lugar a la pérdida de factores de crecimiento. Otro de los inconvenientes que presenta este proceso era la presencia de ligandos, que no se habían incorporado durante la polimerización, ya que podían neutralizar o bloquear la liberación de los factores de crecimiento, pudiendo causar una importante pérdida inicial de dichas moléculas.

El estudio finalmente demostró que el hidrogel podía retener durante un largo periodo de tiempo el PDGF-BB, y que la liberación de éste a su vez podía ser regulada mediante cambios en la afinidad del aptámero o con el uso de secuencias complementarias.

4.3. Hidrogeles funcionalizados con aptámeros para la liberación controlada de antibióticos

En la actualidad el tratamiento de las infecciones bacterianas supone un gran reto, debido al desarrollo de nuevos mecanismos de resistencia durante el tratamiento. Es por ello que las líneas de investigación se centran en la creación de nuevos antibióticos y de nuevos sistemas de liberación de estos fármacos que permitan un uso más efectivo (25).

Siguiendo esta última estrategia Zhang et al. (2012) crearon un hidrogel mediante una polimerización de radicales libres empleando polietilenglicol (PEG), persulfato de amonio (APS) y diamina de tetrametiletileno (TEMED). Posteriormente se incorporaron al hidrogel dos aptámeros (oligo 1 y 2) con la misma composición pero distinta secuenciación, modificados en el extremo 5' con un grupo ácido y una cadena de 6 carbonos. Al igual que en otros estudios, para comprobar la incorporación de los aptámeros se realizó una electroforesis en gel, obteniéndose un porcentaje de incorporación de alrededor del 80%.

Para estudiar la liberación del fármaco, se dejó incubar el hidrogel en tetraciclina durante 12 h la noche anterior al estudio. Los resultados obtenidos mostraban que la incorporación de tetraciclina en los hidrogeles con el oligo 1 y 2 eran similares y tres veces superior a la del hidrogel nativo. En cuanto a la liberación, durante la primera hora de estudio el porcentaje liberado desde el gel nativo era del 60%, mientras que en los otros hidrogeles era inferior al 30%.

Durante el estudio se observó que el incremento en la concentración de oligonucleótido suponía un incremento en la incorporación de tetraciclina en el hidrogel y por tanto en el aumento de la cantidad liberada. Sin embargo en el gel nativo, no se observaban cambios significativos al aumentar la concentración de fármaco ni del coeficiente de partición. En el caso de los hidrogeles funcionalizados, el coeficiente de reparto aumentaba conforme se incrementaba la concentración de fármaco hasta llegar a la concentración de 100 µg/ml donde se producía un descenso de éste. El incremento del coeficiente de reparto se explica por la formación de un mayor número de complejos aptámero-fármaco, lo que provoca el aumento de la cantidad de tetraciclina que difunde a través del hidrogel. Por otro lado, el descenso del coeficiente puede deberse a que a partir de concentraciones superiores a 1mM, la incorporación del aptámero al hidrogel es menos eficiente, por lo que será necesario estudiar en un futuro formas de optimizar las condiciones de incorporación de los aptámeros.

Para estudiar el efecto de los hidrogeles sobre *E.coli* DH5α se sembraron placas de agar con agujeros donde se incorporó el hidrogel. Se observó que el ratio de inhibición de crecimiento era mayor en los hidrogeles con oligonucleótidos. En todos los casos, conforme pasaba el tiempo este ratio disminuía, aunque los geles funcionalizados eran capaces de inhibir el crecimiento de las bacterias a las 48h y formar áreas de inhibición en la placa de agar.

4.4. Hidrogeles funcionalizados con aptámeros para la liberación controlada de proteínas

Para llevar a cabo la liberación de proteínas se han desarrollado numerosos hidrogeles inyectables *in situ*, sin embargo en muchos casos, como consecuencia de su elevada permeabilidad se ha producido una liberación rápida de las proteínas que el hidrogel contenía (26). Por ello Soontornworajit et al. (2010) desarrollaron una estrategia para sintetizar *in situ* hidrogeles inyectables que liberasen proteínas de manera controlada, empleando para ello aptámeros.

El aptámero empleado en este caso era frente al factor de crecimiento derivado de las plaquetas (**PDGF-BB**). Se llevó a cabo una modificación aleatoria de la cadena de diez

nucleótidos incorporada en el extremo 5' de la región esencial del aptámero o bien, la mutación de nucleótidos esenciales para crear una serie de aptámeros con los que estudiar la liberación de las proteínas (26). De esta forma se obtuvieron diez aptámeros que diferían en la secuencia de la región no esencial, se denominaron con la letra S y un número del uno al diez. En el caso de las mutaciones se obtuvieron tres aptámeros que únicamente diferían en el nucleótido del extremo 3', de esta forma en función del número de mutaciones respecto al aptámero S1 existían M1, M2 y M3 con una, dos y tres mutaciones respectivamente.

En estudios anteriores se determinó que el aptámero anti PDGF-BB presentaba 36 aptámeros esenciales, sin embargo el resto de nucleótidos influían en la adopción de la estructura secundaria óptima para la unión con la molécula diana. Basándose en la obtención de distintas estructuras secundarias, se esperaba que sólo los aptámeros que fueran similares al aptámero original tuvieran capacidad de unión al PDGF-BB. Sin embargo los datos que obtuvieron en la resonancia plasmática de superficie (SPR) demostraron que los aptámeros S2, S3, S4, S6, S9 y S10 presentaban la misma capacidad de unión que el S1. Esto puede deberse a que en la SPR se emplea un tampón con proteínas, que pueden competir con las cadenas de nucleótidos en la unión a los nucleótidos esenciales. En el caso de que la interacción intermolecular entre las proteínas y los nucleótidos esenciales sea mayor, en presencia de la molécula diana, la cadena adicional no interfiere en la formación de la estructura secundaria. Además otros estudios han demostrado que los aptámeros pueden sufrir cambios conformacionales una vez que se unen a la diana, manteniendo la unión a ésta. De esta forma, los aptámeros con cadenas adicionales pueden presentar estos cambios una vez unidos a la molécula diana. Así se concluyó, que los nucleótidos esenciales determinaban la estructura funcional y las variaciones en los nucleótidos no esenciales no varían significativamente la afinidad del aptámero.

En el caso de los aptámeros mutados, todos ellos presentaban estructuras similares aunque su capacidad de unión a PDGF-BB difería significativamente respecto a S1. Además se observó que cuanto mayor era el número de mutaciones, menor era esta capacidad. Esto se debía a que los nucleótidos más próximos a los extremos de la secuencia, se encargan de estabilizar la estructura funcional. De esta forma, al mutar

estas regiones se reduce la estabilidad y la presencia de la molécula diana no puede revertir la situación.

Para la formación del hidrogel, emplearon el copolímero Poloxámero 407® (27) ya que es considerado un modelo exitoso para los estudios de perfiles de liberación de fármacos (26). Se trata de un copolímero sintético anfifílico constituido por una cadena hidrofóbica de polioxipropileno (POP), flanqueada por dos cadenas hidrófilas de polioxietileno (POE). En este caso el desarrollo del hidrogel se realizó de manera distinta a estudios anteriores, así no era necesaria una conjugación química entre el aptámero y el hidrogel. El sistema sólo requiere de la mezcla física de los componentes: los aptámeros, las proteínas y la solución del polímero. A diferencia de otros estudios, los aptámeros libres pueden eliminarse antes de mezclarse con el resto de componentes. Sin embargo este hecho puede provocar que los hidrogeles no se funcionalicen.

En cuanto a la liberación del fármaco y la disolución del gel, ambas han sido estudiadas en estudios previos, demostrando que siguen una cinética de orden cero (26). Si se compara un hidrogel sin aptámero, la liberación de PDGF-BB es más rápida y sigue una cinética de orden cero, lográndose liberar en torno al 80% de la proteína en el primer día. Sin embargo, en el caso de los hidrogeles funcionalizados con aptámeros esta liberación se reduce, siendo ésta más prolongada en el tiempo. De esta forma se consigue liberar un 14% en las dos primeras semanas. La gran diferencia entre ambos radica en que en los hidrogeles funcionalizados, los aptámeros funcionan como sitios de afinidad para las proteínas, creando fuertes interacciones que impiden la difusión de las proteínas y retrasan su liberación del hidrogel.

5. CONCLUSIONES

Los recientes progresos en el desarrollo de biomateriales han permitido expandir el concepto de éstos. Gracias a las óptimas características de los hidrogeles, así como a la afinidad y especificidad de los aptámeros ha sido posible la creación de sistemas de liberación modificada de fármacos para distintas patologías.

Esta modificación en la liberación puede llevarse a cabo de distintas formas, tal y como se muestra en los estudios. Así podremos:

- Aumentar la concentración de aptámero, que conlleva un aumento en la cantidad de fármaco retenido y por tanto la liberación de éste será más prolongada en el tiempo.
- Incrementar la afinidad del aptámero, mediante modificaciones en la secuencia de oligonucleótidos.
- Incorporar secuencias complementarias para modular la liberación del fármaco.

De esta forma los estudios descritos en esta revisión han demostrado las grandes ventajas de estos biomateriales, ofreciendo nuevas estrategias terapéuticas para numerosas patologías.

Sin embargo, debido a su reciente aparición, todavía es necesario realizar estudios *in vivo* que avalen los buenos resultados que se han obtenido en los estudios *in vitro*. Aún así, las perspectivas de futuro para los hidrogeles funcionalizados con aptámeros como biomateriales para la liberación controlada de fármacos es prometedora.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Ministerio de Sanidad y Consumo. Real Farmacopea Española. 5^a ed. Madrid; 2015.
2. Servicio Navarro de Salud. Formas farmacéuticas de liberación modificada y estereoisómeros. ¿Nos aportan algo en la práctica clínica? Boletín de Información Farmacoterapéutica de Navarra 2005;13:1–10.
3. Suñé J. Nuevas Aportaciones Galénicas a las Formas de Administración. En: Formación continuada para farmacéuticos de hospital. Libro 3. 1^a ed. Barcelona: Fundación Promoción Médica; 28–65.
4. Fernández M. Sistemas de liberación controlada. Conceptos fundamentales. Universidad de Sevilla 2007. Disponible en: http://personal.us.es/mfarevalo/recursos/master/med_lib_ctr/introduccion.pdf [Consulta:11 de noviembre de 2015]
5. Ullah F, Bisyrul M, Javed F, Akil H. Classification, processing and application of hydrogels: A review. Materials Science and Engineering 2015;57:414–33.
6. Liu J, Liu H, Kang H, Donovan M, Zhu Z, Tan W. Aptamer-incorporated hydrogels for visual detection, controlled drug release, and targeted cancer therapy. Anal Bioanal Chem 2012;402:187–94.
7. Soontornworajit B, Zhou J, Snipes MP, Battig MR, Wang Y. Affinity hydrogels for controlled protein release using nucleic acid aptamers and complementary oligonucleotides. Biomaterials [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;32(28):6839–49.
8. Wang Z, Xia J, Cai F, Zhang F, Yang M, Bi S, et al. Aptamer-functionalized hydrogel as effective anti-cancer drugs delivery agents. Colloids Surfaces B Biointerfaces 2015;134:40–46.
9. Battig MR, Soontornworajit B, Wang Y. Programmable release of multiple protein drugs from aptamer-functionalized hydrogels via nucleic acid hybridization. Journal of the American Chemical Society 2012;134:12410–13.

10. Hernández FJ, Andrea J, Hincapié B. Aptámeros: agentes diagnósticos y terapéuticos. *Iatreia* 2012;25(2):159–68.
11. Tan W, Wang H, Chen Y, Zhang X, Zhu H, Yang C, et al. Molecular aptamers for drug delivery. *Trends in Biotechnology* 2011;29(12):634–40.
12. Donal Voet JGV. *Bioquímica*. 3^a ed. Buenos Aires: PANAMERICANA; 2006.
13. Shigdar S, Ward AC, De A, Yang CJ, Wei M, Duan W. Clinical applications of aptamers and nucleic acid therapeutics in haematological malignancies. *British Journal of Haematology* 2011;155(1):3–13.
14. Neff CP, Zhou J, Remling L, Kuruvilla J, Zhang J, Li H, et al. An aptamer-siRNA chimera suppresses HIV-1 viral loads and protects from helper CD4(+) T cell decline in humanized mice. *Science Translational Medicine*. 2011;3(66):66ra6.
15. Soontornworajit B, Zhou J, Shaw MT, Fan T-H, Wang Y. Hydrogel functionalization with DNA aptamers for sustained PDGF-BB release. *Chem Commun* 2010;46(11):1857–59.
16. Integrated DNA Technologies. *Strategies for Attaching Oligonucleotides to Solid Supports*. 2014;1–22.
17. Ezan E. Pharmacokinetic studies of protein drugs: past, present and future. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013;65(8):1065–1073.
18. Giri J, Li W-J, Tuan RS, Cicerone MT. Stabilization of proteins by nanoencapsulation in sugar-glass for tissue engineering and drug delivery applications. *Advanced Materials* 2011;23(42):4861–7.
19. Wu EC, Zhang S, Hauser CAE. Self-Assembling Peptides as Cell-Interactive Scaffolds. *Advanced Functional Materials*; 2012;22(3):456–68.
20. Mastronardi E, Foster A, Zhang X, DeRosa MC. Smart Materials Based on DNA Aptamers: Taking Aptasensing to the Next Level. *Sensors* 2014;14:3156-71.
21. Lin C-C, Metters AT. Metal-chelating affinity hydrogels for sustained protein release. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*; 2007;83(4):954–64.

22. Taylor SJ, McDonald JW, Sakiyama-Elbert SE. Controlled release of neurotrophin-3 from fibrin gels for spinal cord injury. *Journal of Controlled Release* 2004;98(2):281–94.
23. Battig MR, Huang Y, Chen N, Wang Y. Aptamer-functionalized superporous hydrogels for sequestration and release of growth factors regulated via molecular recognition. *Biomaterials* 2014;35(27):8040–8.
24. Zadeh JN, Steenberg CD, Bois JS, Wolfe BR, Pierce MB, Khan AR, et al. NUPACK: Analysis and design of nucleic acid systems. *Journal of Computational Chemistry* 2011;32(1):170–3.
25. Zhang X, Soontornworajit B, Zhang Z, Chen N, Wang Y. Enhanced loading and controlled release of antibiotics using nucleic acids as an antibiotic-binding effector in hydrogels. *Biomacromolecules* 2012;13(7):2202–10.
26. Soontornworajit B, Zhou J, Zhang Z, Wang Y. Aptamer-Functionalized In Situ Injectable Hydrogel for Controlled Protein Release. *Biomacromolecules* 2010;11(10):2724–30.
27. Pereira GG, Dimer FA, Guterres SS, Kechinski CP, Granada JE, Cardozo NSM. Formulation and characterization of poloxamer 407®: thermoreversible gel containing polymeric microparticles and hyaluronic acid. *Quimica Nova* 2013 ;36(8):1121–5.