

Factores para considerar en el diseño y síntesis de nanopartículas poliméricas para la entrega dirigida de moléculas anticancerígenas[◇]

Factors to consider in the design and synthesis of polymeric nanoparticles for targeted delivery of anticancer molecules

Karla Oyuky Juárez Moreno,* Jorge Herrera Ordóñez,*[†]

ABSTRACT: For an anticancer molecule to effectively enter a tumor cell and perform its function, it must overcome the physical and physiological barriers that the human body imposes. These barriers must be carefully considered and translated into specific physicochemical characteristics that the molecule must possess to ensure successful delivery. One strategy to enhance drug delivery involves using nanomaterials as carriers to facilitate the targeted delivery of drugs and bioactive molecules. This work reviews key biological aspects relevant to the topic. It examines how to tune and modulate the physicochemical properties of nanomaterials to overcome these barriers. Specifically, it discusses how parameters such as particle size, chemical composition, and functionalization can be optimized to improve drug targeting to neoplastic cells. This work focuses on emulsion polymerization as a method for nanocarrier synthesis, emphasizing the control of the average and size distribution of the particle. Furthermore, it highlights a physical functionalization method developed by our research group, which has led to a patent innovation.

KEYWORDS: cancer, polymer nanoparticles, targeted delivery, emulsion polymerization, functionalization.

RESUMEN: Para que una molécula anticancerígena pueda ingresar a una célula tumoral y cumplir su función de manera efectiva, es esencial que supere las barreras físicas y fisiológicas impuestas por el cuerpo humano. Estas barreras deben ser consideradas, y traducidas en características fisicoquímicas específicas que la molécula debe poseer para garantizar una entrega exitosa. Una de las estrategias para mejorar la entrega de fármacos es mediante el uso de nanomateriales, los cuales sirven como transportadores para la entrega dirigida de fármacos y moléculas bioactivas. En este trabajo se revisan aspectos biológicos de relevancia para el tema que nos ocupa y cómo sintonizar/modular las propiedades fisicoquímicas del material para superar dichas barreras, permitiendo determinar el tamaño de partícula, su naturaleza química y funcionalización para direccionar la entrega del fármaco de manera más específica a las células neoplásicas. Este trabajo se enfoca en la utilización de la polimerización en emulsión como método de síntesis de nano-acarreadores, haciendo énfasis en el control del promedio y distri-

Recibido: 1 de noviembre, 2024. Aceptado: 22 de enero, 2025. Publicado: 17 de febrero, 2025.

[◇] Los autores agradecen el apoyo financiero de la UNAM a través de los proyectos PAPIIT IA103717 e IN218823.

* Universidad Nacional Autónoma de México, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Campus Juriquilla.

[†] Autor de correspondencia: jorge_ho67@fata.unam.mx



bución de tamaño de la partícula. En cuanto a la funcionalización química, se resalta el método de funcionalización física desarrollado en nuestro grupo, dando origen a una patente.

PALABRAS CLAVE: cáncer, nanopartículas de polímero, entrega dirigida, polimerización en emulsión, funcionalización.

Introducción

Si bien a lo largo de años de investigación ha habido avances importantes en el diagnóstico y tratamiento del cáncer, aún sigue siendo una enfermedad cobrando vidas humanas. Además, también ocasiona un desgaste económico significativo a los sistemas de salud públicos y, para el caso de pacientes sin acceso a dicho sistema o sin contar con seguro médico, puede llevar esta enfermedad a la ruina económica a sus familias por lo costoso de los tratamientos actuales.

Ante este escenario, resulta muy importante desarrollar tratamientos para el cáncer cada vez más efectivos y, en lo posible, menos costosos. Una manera de mejorar su efectividad es mediante la entrega dirigida del fármaco. Para que esto ocurra, se deben tomar en cuenta las barreras anatómicas y fisiológicas a las cuales se enfrentará el material, y diseñarlo con tales características para que pueda superarlas. Existen diversas metodologías para sintetizar materiales que integren todas estas características, como se expone en el libro editado por Vauthier y Ponchel (2016), y en revisiones recientes, por ejemplo, los de Beach *et al.* (2024) y Pulingam *et al.* (2022).

Puesto que un mismo material debe integrar diversas funcionalidades específicas para cierta aplicación, no existe una metodología de síntesis general, sino algunas que representen mayores ventajas sobre otras. Para el caso específico de la síntesis de nanopartículas poliméricas (NPs) para la entrega de moléculas anticancerígenas, siendo esta la aplicación que nos interesa en este trabajo, nos enfocamos en metodologías basadas en la polimerización en emulsión (PE) y el comportamiento físicoquímico de tensoactivos. En particular, se abordan cuestiones como la modulación del promedio y distribución de tamaño de partícula, selección del polímero y funcionalización para direccionamiento. Existen otras cuestiones a considerar en el diseño de las NPs que serán abordadas en una publicación futura.

La PE es un proceso altamente aplicable industrialmente, al poderse escalar de forma relativamente fácil debido a que, si bien hay aspectos fundamentales de su cinética y mecanismos abiertos a discusión, se considera ser un proceso tecnológicamente maduro para el cual ya existe infraestructura subyacente (Herrera Ordóñez 2023; Beach *et al.* 2024). Además, las características de las NPs obtenidas por PE presentan una alta reproducibilidad lote a lote comparada con otras técnicas, así como también, el tamaño de partícula y la dispersidad son altamente controlables (Beach *et al.* 2024).

Modulación del tamaño de partícula por polimerización en emulsión

Implicaciones biológicas del tamaño de partícula

Antes de entrar en materia, revisaremos brevemente las barreras anatómicas y fisiológicas que acotan el intervalo de tamaños de partícula más conveniente, considerando que la vía de administración es intravenosa. La intención es que el material, mientras no llegue a su destino (el tumor), permanezca circulando en el torrente sanguíneo el mayor tiempo posible.

Se sabe que, a pesar de ser la membrana plasmática impermeable a muchas partículas grandes, es posible que NPs de tamaños menores a los 10 nm puedan atravesarla por difusión pasiva. Sin embargo, también se sabe que los riñones pueden excretar rápidamente partículas $< \sim 10$ nm (Choi *et al.*, 2011; Mok, 2024), por lo cual un tamaño mayor a, digamos 20 nm, aseguraría que no se eliminen por la vía renal.

Para el límite superior se han considerado las restricciones impuestas por la pared de los vasos sanguíneos y por el hígado. Normalmente, la vasculatura es impermeable a partículas mayores a 2-4 nm (Davis, 2012; Dreher *et al.*, 2006). No obstante, en tejidos cancerosos ocurre el efecto de permeabilidad y retención acentuada (EPR, por sus siglas en inglés: *enhanced permeability and retention*) en donde entidades más pequeñas a los 400-700 nm pueden filtrarse a través de la pared del vaso sanguíneo defectuoso, lo cual, afortunadamente, hace ser a los tumores más accesibles a partículas (Davis, 2012; Dreher *et al.*, 2006). Sindwani *et al.* (2020) cuestionaron el paradigma del efecto EPR, al encontrar que el 97% de las nanopartículas entran en tumores mediante un proceso activo a través de células endoteliales por lo cual a este mecanismo lo han llamado el “principio de transporte activo y retención” (Nguyen *et al.*, 2023), pero aún se requiere más investigación. Asimismo, es necesario tomar en cuenta que en el hígado se pueden retener partículas $> \sim 150$ nm (Mok, 2024).

De acuerdo con lo expuesto hasta aquí, las restricciones anatómicas nos llevan a establecer un intervalo de tamaños de partícula entre 20 y 150 nm, aproximadamente.

Por otra parte, la internalización de las NPs en células animales, así como su bioacumulación, está influenciada por sus propiedades fisicoquímicas, en especial por el tamaño, la forma y la química superficial (Kettler *et al.*, 2014). Como se detallará más adelante, la endocitosis mediada por receptor es uno de los mecanismos más importantes de internalización de NPs (Ledermann, Canevari y Thigpen, 2015). En este, las moléculas del ligando (con el cual está funcionalizada la superficie de las partículas) se acoplan con sus respectivos receptores presentes en la membrana celular deformándose y formando una cavidad (invaginación) a través de la cual la partícula entra en la célula. Se han establecido modelos teóricos para determinar cuál parámetro fisicoquímico es el más importante para el proceso de endocitosis, en los cuales se modela la membrana plasmática como una superficie plana con receptores móviles

envolviendo a las NPs, las cuales tienen ligandos de superficie que son inmóviles y están distribuidos uniformemente (Gao, Shi y Freund, 2005). En este modelo la NP que entre en contacto con la membrana plasmática “plana” es envuelta por la misma, y los receptores pueden unirse así a más ligandos en la superficie de la NP, por lo que termodinámicamente es más “costoso” y lento envolver NPs pequeñas; en tanto que “envolver” NPs más grandes es energéticamente más favorable y por lo tanto más rápido. Este modelo considera la internalización de NPs individuales; pero de forma experimental se ha observado que dentro de las vesículas o endosomas existen cúmulos de NPs, por lo cual se han desarrollado modelos explicando este fenómeno de internalización por cúmulos (Zhou *et al.*, 2006). Sin embargo, adicionalmente a las propiedades fisicoquímicas de las NPs, es importante considerar la dinámica molecular del o los receptores involucrados en el proceso, pues algunos de los receptores que se internalizan dependen de su dimerización, o del reconocimiento estructural del ligando, por lo cual el tamaño de la NP no es la única condición importante para el proceso de internalización, también lo es la distribución de los ligandos sobre su superficie (Kettler *et al.*, 2014).

Algunas células con capacidad fagocítica como los macrófagos pueden ser capaces de internalizar NPs de entre 500 a 2000 nm de diámetro; pero, el resto de células no fagocíticas se limitan a internalizar NPs de tamaños inferiores a los 500 nm. Se ha planteado el requerir la endocitosis mediada por receptor de un intervalo de tamaño de partícula óptimo, pues tamaños menores dificultan la existencia de los suficientes acoplamientos ligando-receptor mientras que tamaños mayores dificultan que la membrana forme una cavidad lo suficientemente grande para envolver la partícula (Nel *et al.*, 2009). Entre más grande sean las NPs, la cantidad de estas que pueden ser internalizadas por una célula disminuye (He *et al.*, 2010). Davis (2012) recomienda que el tamaño de partícula óptimo debe ser de 50 ± 20 nm, el cual se encuentra dentro del intervalo requerido para librar las barreras anatómicas.

Habiendo establecido el promedio y amplitud de la distribución de tamaños, el reto es cómo sintetizarlo. Como ya se mencionó en este trabajo, nos enfocamos a la polimerización en emulsión como método de síntesis pues no solo es, por mucho, el proceso más empleado a escala industrial para la producción de partículas sub-micrométricas sino también por sus bondades, entre ellas la facilidad para controlar no solo el promedio sino la amplitud de la distribución de tamaños de partícula (DTP). A continuación, se explican brevemente los fundamentos científicos de la técnica y, posteriormente, se describe cómo se emplean para obtener el tamaño deseado de partícula.

Modulación del promedio y amplitud de la DTP por polimerización en emulsión

En este trabajo solo se exponen, de manera breve, aquellos aspectos de la polimerización en emulsión y fisicoquímica de coloides, relevantes al control de

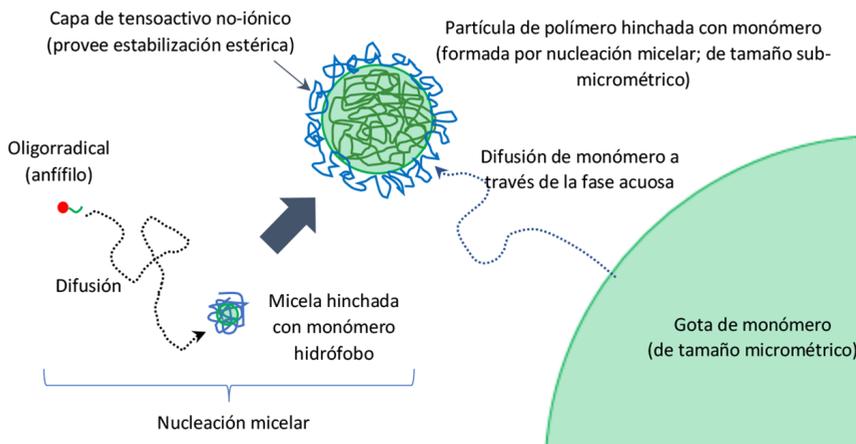
la DTP. Para más detalles, el lector puede referirse a libros de texto y trabajos de revisión reportados en la literatura, donde se revisan los fundamentos de estos temas, como lo son, por ejemplo, los de Lovell y Schork (2020), Herrera Ordóñez, Saldívar-Guerra, Vivaldo-Lima (2013), Herrera Ordóñez (2023), y Ottewill (1997).

La PE que ocurre vía radicales libres, y empleando monómeros vinílicos de relativamente baja solubilidad en agua, es el proceso industrial empleado para producir resinas acuosas (coloides poliméricos), las cuales se emplean en la formulación de pinturas arquitectónicas, impermeabilizantes, adhesivos, por mencionar algunos usos. Los mismos principios científicos que rigen la producción de toneladas de estos coloides también se aplican para producir a menor escala coloides de alto valor agregado, como los que se requieren en las aplicaciones biomédicas. Un componente fundamental de la formulación es el tensoactivo, el cual juega un doble papel en la polimerización: por una parte, permite la formación de micelas esféricas (agregados de moléculas de tensoactivo) que actúan como moldes y sitios de nucleación de las nanopartículas y, por otra, aporta estabilidad coloidal al sistema, es decir, evita la coagulación/agregación significativa de las partículas durante la vida de anaquel del producto y cuando se inyecta al torrente sanguíneo del paciente.

La formación de polímero en el interior de las micelas ocurre porque los radicales oligoméricos anfífilos formándose en la fase acuosa (el iniciador o generador de radicales libres es una sal hidrosoluble, típicamente persulfato de potasio o amonio), se difunden y penetran al interior hidrófobo de las micelas donde se polimerizan rápidamente, porque ahí la concentración de monómero es mucho mayor que en la fase acuosa. A este mecanismo, en el cual las micelas hinchadas con monómero se convierten en partículas de polímero, se le conoce como nucleación micelar, mismo que fue establecido en el trabajo pionero de Harkins (1947). Las partículas de polímero continúan creciendo a expensas de gotas micrométricas de monómero, el cual se difunde desde estas hasta las primeras a través de la fase acuosa. Por lo tanto, las partículas crecerán tanto como exista monómero en forma de microgotas, por lo que una forma de controlar el tamaño promedio de las partículas es mediante la cantidad total de monómero añadida al sistema de reacción. La figura 1 es una representación esquemática de este mecanismo.

Las partículas de polímero no se forman todas a la vez, sino que se tiene una cinética. Se forman durante lo que se conoce como etapa de nucleación o Intervalo I; toma algunos minutos y finaliza cuando desaparecen las micelas. Cuanto más larga sea esta etapa, más amplia será la distribución porque se generan partículas nuevas (pequeñas) en presencia de partículas relativamente grandes (las cuales se formaron al inicio); esto es lo deseable para el caso de pinturas y recubrimientos arquitectónicos. Por el contrario, cuanto más corta sea la etapa de nucleación, la diferencia de tamaños entre las partículas formadas al inicio y final de ella será menor y, por lo tanto, la distribución de tamaños de partícula (DTP) será más angosta, lo cual es lo que usualmente se

FIGURA 1. Mecanismo de la nucleación micelar y del crecimiento de partículas, al inicio de una polimerización en emulsión en la cual se emplea un tensoactivo no-iónico como estabilizante coloidal.



Fuente: Figura realizada por Jorge Herrera Ordóñez.

requiere en las aplicaciones biomédicas. Las condiciones favorecedoras de las etapas de nucleación corta son: concentración inicial de tensoactivo ($[S]_0$) muy cercana (pero mayor) a su concentración micelar crítica (CMC) (digamos 1.1 veces este parámetro) y temperatura de reacción lo más elevada posible, cuando mucho $10\text{ }^\circ\text{C}$ por debajo del punto de ebullición del componente más volátil. Una concentración inicial de iniciador ($[I]_0$) elevada también la favorece, pero puede originar inestabilidad coloidal además de iniciador residual al final de la polimerización, siendo recomendable emplear valores moderados de $[I]_0$ ($\sim 10^{-1}$ mM). Debido a la baja disponibilidad de tensoactivo, estas condiciones de polimerización requieren que el contenido inicial de monómero (correspondiente al contenido final de polímero) sea $< \sim 10\%$ masa, de otra manera se pueden formar coágulos macroscópicos de polímero o incluso puede ocurrir coagulación catastrófica.

Es conveniente realizar primero un seguimiento de la cinética de crecimiento en una polimerización con suficiente monómero para construir una curva tamaño *vs* conversión de monómero. Posteriormente, se emplea esta curva maestra para determinar la conversión a la cual se alcanza el tamaño de partícula deseado, para que en una próxima corrida se ajuste el contenido inicial de monómero de tal manera que al final se obtenga el tamaño objetivo.

Otra forma de modular la amplitud de la DTP es promoviendo coagulación limitada durante la polimerización. La heterocoagulación (coagulación entre partículas de diferente tamaño) da lugar a que se incremente el tamaño promedio, pero se reduce la amplitud de la distribución porque al fusionarse (coagular) partículas pequeñas con grandes se ocasiona la homogenización de tamaños, es decir, la heterocoagulación implica *per se* distribuciones más an-

gostas. La homocoagulación (coagulación entre partículas de tamaño similar), por el contrario, ocasiona el ampliarse la distribución. Entonces, la clave para obtener distribuciones más angostas aprovechando esta fenomenología es alterando hasta cierto límite la estabilidad coloidal del sistema de tal manera que se favorezca la heterocoagulación sobre la homocoagulación. Afortunadamente, así ocurre de manera natural mientras no se esté cerca de ese límite; cálculos basados en teoría DLVO¹ también lo predicen Gilbert (1995), Coen *et al.* (1998), y, Ottewill (1997). Si la estabilización coloidal es mediante repulsión electrostática (como cuando se emplean tensoactivos iónicos), con la adición de algún electrolito (ej. NaCl) se logra el efecto deseado. Si bien la teoría DLVO puede aplicarse para estimar el efecto de la concentración de sal en la estabilidad coloidal del sistema, cuantificada con el factor de estabilidad de Fuch, es necesario algo de trabajo experimental de prueba y error. El límite de concentración de electrolito corresponde a la llamada concentración de coagulación crítica (CCC). Así, optimizando la concentración de electrolito se puede modular la concentración, promedio y amplitud de distribución de tamaños de partícula para determinadas condiciones de una polimerización en emulsión (Dobrowolska y Koper, 2014).

La utilización de tensoactivos iónicos en la síntesis de NPs puede ocasionar citotoxicidad; esto puede evitarse purificando el producto (lo cual es una desventaja), empleando un tensoactivo polimerizable (que son más caros que los primeros, lo cual también constituye una desventaja) o bien empleando tensoactivos no-iónicos (Garay-Jimenez *et al.*, 2009).

Cuando se emplean tensoactivos no-iónicos para impartir estabilidad coloidal, como suele ocurrir en aplicaciones biomédicas, la adición de sales prácticamente no afecta la estabilidad. Puesto que la estabilidad se da por la repulsión estérica entre los *brushes* que recubren las partículas, todo aquello afectando la adsorción del tensoactivo y la conformación de su parte hidrófila es susceptible de ser utilizado para modular la estabilidad del sistema coloidal. Una opción es probar con tensoactivos de diferente balance hidrófilo-lipófilo (HLB) y/o diferente masa molar. Por ejemplo, cuando se utiliza poli(alcohol vinílico) (PVA) para estabilizar partículas de poli(acetato de vinilo) (PVAc), los mejores resultados para obtener partículas de 50 ± 20 nm fue PVA de 87% de grado de hidrólisis y masa molar de 13,000 a 23,000 Da (Olvera-Guillen *et al.*, 2021). El PVA es un polímero biocompatible ampliamente utilizado en el campo biomédico.

Selección del polímero

Debido a ocurrir el mecanismo de polimerización vía radicales libres, el monómero debe poseer el grupo vinilo; de aquí que a este tipo de polímeros se

¹ La teoría DLVO (Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek) describe la interacción de fuerzas entre superficies cargadas en un medio líquido. Esta teoría se aplica a materiales coloidales y nanopartículas.

les denomine “polímeros de base vinílica” o simplemente “polímeros vinílicos”. Entre la gran cantidad de polímeros vinílicos existentes, los que más han despertado interés son los acrilatos, metacrilatos, acrilamidas y metacrilamidas, con los cuales pueden obtenerse polímeros sensibles a estímulos del medio como pH, temperatura, enzimas, entre otros (Lv *et al.*, 2021).

A pesar de la no-biodegradabilidad del “esqueleto” de los polímeros vinílicos formados por unidades repetitivas C-C, se pueden emplear para la entrega terapéutica debido a su biocompatibilidad, no-toxicidad, baja inmunogenicidad y alta estabilidad (Beach *et al.*, 2024). Sin embargo, para poderse sintetizar mediante polimerización en emulsión, los monómeros vinílicos deben ser lo suficientemente hidrófobos para que se formen dos fases (una emulsión) pero con una ligera solubilidad en agua ($10^{-1} - 10^1$ g/L) para que exista el suficiente transporte de monómero por difusión, de las microgotas a los sitios de polimerización (las partículas) a través de la fase acuosa. Lesko y Sperry (1997) proporcionan una tabla de los monómeros vinílicos más comúnmente empleados en polimerización en emulsión junto con su hidrofili- cidad/hidrofobicidad relativa, entre otras propiedades. Estos monómeros son de fácil disponibilidad y muy baratos, lo cual es una gran ventaja; de hecho, se ocupan extensamente para producir de resinas base agua para la formulación de pinturas y recubrimientos. Pichot, Delair y Elaïssari (1995) hicieron una revisión de los coloides poliméricos para aplicaciones biomédicas y farmacéuticas.

Otro aspecto importante para tomar en cuenta en la selección del polí- mero vinílico es que el cargo debe ser líquido a temperatura ambiental o a al- gunas decenas de grados centígrados por arriba de esta, de solubilidad en agua similar al monómero y que sea un buen solvente para el polímero del cual están formadas las partículas. Se requieren estas propiedades para que, en una etapa post-polimerización, el cargo pueda emulsionarse e introducirse en las partículas por difusión a través de la fase acuosa, de manera análoga a la difusión de monómero. Puesto que tanto el polímero como el cargo son hi- drófobos, es muy probable que en la mayoría de los casos el primero sea so- luble en el segundo. Si no fuera así, es factible modular la hidrofobicidad del polímero para que se acerque más a la polaridad del cargo, mediante la copo- limerización de monómeros de diferente polaridad, en la proporción conve- niente. Se ha criticado a la PE en cuanto a que las condiciones de reacción li- mitan, en gran medida, la incorporación de carga terapéutica sensible (Beach *et al.*, 2024). Sin embargo, como ya se mencionó, la incorporación del cargo puede hacerse y es una etapa postreacción bajo condiciones suaves.

Siguiendo estas ideas, los autores sintetizaron NPs de Poli(acetato de vi- nilo) (PVAc) mediante polimerización en emulsión y lograron cargarlas con eugenol (Olvera-Guillen *et al.*, 2021; Herrera Ordóñez *et al.*, 2019), el cual es líquido a temperatura ambiente.

El PVAc tiene el éster acetato como grupo colgante en cada unidad repe- titiva. Su hidrólisis parcial ocasiona que se tengan como grupos colgantes

tanto al éster como al grupo OH. Al polímero obtenido así se le conoce comúnmente como poli(alcohol vinílico) (PVA), pero en realidad, por lo que acabamos de explicar es un copolímero (poli(alcohol vinílico-co-acetato de vinilo)). Puesto que las unidades repetitivas con grupos OH son más polares que los grupos colgantes éster, las cadenas son de naturaleza anfifila y tienden a comportarse como tensoactivos. En solución acuosa, la conformación de las cadenas de PVA es tal que pueden autoensamblarse para formar estructuras tipo micelas en las cuales las regiones de la cadena de PVA predominantemente hidrófobas tienden a asociarse “huyendo” del medio polar, mientras que las regiones predominantemente hidrófilas se extienden hacia la fase acuosa. En presencia de partículas coloidales, las regiones hidrófobas se adsorben sobre estas y las regiones hidrófilas forman una capa estérica (*brushes*, véase la figura 1) que dificulta su aglomeración por lo cual el PVA también puede actuar como estabilizante coloidal. Dada la importancia del PVAc y del PVA, a continuación se dedica una sección a ellos.

Biocompatibilidad y biodegradación del PVA y PVAc

El PVA es uno de los polímeros más utilizados en la biomedicina, sobre todo por sus propiedades mecánicas, su solubilidad en agua, buena biocompatibilidad y biodegradabilidad tanto en fluidos como en tejidos humanos (Alexandre *et al.*, 2014).

Su uso en dispositivos médicos no implantados y en sistemas de administración de fármacos ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos de América (FDA, por sus siglas en inglés). Debido a ello, se ha utilizado como excipiente en diversos sistemas de liberación de fármacos incluidos hidrogeles, micro y nanopartículas (Rivera-Hernández *et al.* 2021). Partículas de PVAc se han empleado inclusive como material para embolizaciones (Sadato *et al.*, 1994). La internalización de NPs de PVA ha sido estudiada desde hace varias décadas, para el caso de células de cáncer de piel, se ha determinado que las NPs de PVA de tamaños menores a los 200 nm se pueden internalizar mediante endocitosis mediada por caveolas, en tanto que las de tamaños superiores a los 200 nm se internalizan mediante endocitosis mediada por clatrina (Rejman *et al.*, 2004).

Los resultados sobre la biocompatibilidad *in vivo* por administración oral del PVA, revelan que no hay indicios de toxicidad reproductiva, neurológica y tampoco cambios en la actividad motora, ni en los parámetros bioquímicos en los análisis sanguíneos de roedores (Kelly *et al.*, 2003). Por otro lado, se sabe que el PVA desaparece de la circulación sanguínea aproximadamente después de 7 horas de haber sido administrado por vía intravenosa, siendo el hígado el principal órgano encargado de su depuración, y el potencial sitio de bioacumulación; aunque se ha demostrado que el PVA es muy estable en el cuerpo, pues no se han reportado indicios de monómeros o productos de su descomposición en la orina o las heces (Kaneo *et al.*, 2005). Por otro lado, las

evidencias indican que el PVA no genera efectos genotóxicos ni carcinogénicos en modelos murinos (Kelly *et al.*, 2003). El PVA es uno de los pocos polímeros vinílicos mayormente biodegradables bajo ciertas condiciones estructurales. Su degradación comienza fuera de las células mediante la acción de enzimas sobre el polímero. Los productos generados incluyen una combinación de ácidos grasos hidroxilados y acetoxihidroxilados. Después de la desacetilación enzimática dentro de la célula, se forman ácidos grasos hidroxilados, los cuales pueden ser procesados a través de la β -oxidación y el ciclo del ácido tricarbóxico. El ataque enzimático sobre la unidad de 1,3-diol en la cadena del polímero se realiza por enzimas oxidativas, creando estructuras en la cadena principal del PVA y sirviendo como puntos de ruptura para otras enzimas. Las estructuras de 1,3-dicetona o β -hidroxicetona, formadas enzimáticamente, son degradadas por enzimas hidrolasas o aldolasas específicas. Los fragmentos resultantes de polímero muestran que este proceso de escisión enzimática es aleatorio, y no tener la masa molar del PVA un impacto significativo en esta reacción (Solaro, Corti y Chiellini, 2000). Como resultado de la fragmentación extracelular, pequeños oligómeros de PVA con acetilación residual (PVA-PVAc) entran en la célula. La masa molar de estos fragmentos influye notablemente en su destino. Esterasas específicas catalizan la hidrólisis de los grupos acetilo residuales en el PVA que no ha sido completamente hidrolizado. Las estructuras de PVA-PVAc con menor masa molar son preferentemente aceptadas como sustratos para esta actividad, las cuales tienen lugar en el citoplasma celular (Sakai *et al.*, 1998).

Como ya se mencionó, el tensoactivo (en forma de micelas) actúa como sitio de nucleación y también como estabilizante coloidal. Adicionalmente, al estar el tensoactivo adsorbido sobre la superficie de las NPs (véase la figura 1), su interacción con el sistema biológico en el cual eventualmente se encontrará inmerso debe ser tal que no afecte negativamente su desempeño. Por ejemplo, el empleo de tensoactivos no-iónicos como el PVA hace que las partículas sean “transparentes” al sistema inmune (Davis, 2012) el cual es una de las barreras fisiológicas más importantes por superar las NPs para llegar al destino.

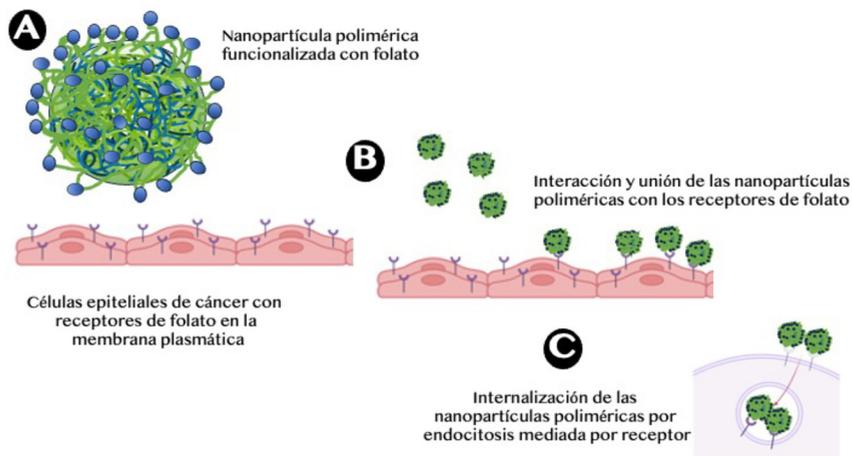
Funcionalización para direccionamiento

Aspectos biológicos del direccionamiento celular de las nanopartículas

Las barreras biológicas enfrentadas por una NP en un organismo vivo, dependerán de la vía de administración y, por supuesto, del tipo de patología que se desea diagnosticar o tratar. En ese sentido, una administración localizada parece ser la mejor opción para reducir los potenciales efectos tóxicos, sobre todo al administrar fármacos antineoplásicos (Patel *et al.*, 2019). Es por ello que una de las mejores estrategias para la entrega de fármacos y moléculas bioactivas es la funcionalización con grupos químicos y ligandos biológicos

que encuentren su receptor específico en la membrana plasmática (figura 2). De esta manera, el ácido fólico o folato, ha sido por excelencia uno de los ligandos más utilizados para la funcionalización química de NPs. El ácido fólico es una vitamina, esencial para diferentes mecanismos de biosíntesis de nucleótidos y de proliferación celular, por lo cual su receptor se encuentra sobreexpresado en la membrana plasmática de distintos tipos celulares, incluyendo una gran cantidad de células cancerígenas, particularmente de cáncer de mama, ovario, riñón, pulmón, entre otros. Existen varias isoformas del receptor de ácido fólico (RF), siendo la α la de mayor afinidad. Se ha reportado el haber una relación directa entre la expresión del RF- α en células cancerígenas y su resistencia a la quimioterapia (Narmani *et al.*, 2019).

FIGURA 2. Esquema de la interacción entre las nanopartículas poliméricas funcionalizadas (NPs-FA) y los receptores de membrana celular.



Se muestra: en (A) el esquema de la nanopartícula polimérica funcionalizada con folato y los receptores de folato presentes en la membrana plasmática; (B) interacción y unión de las NPs-FA con los receptores celulares de folato, y, (C) proceso de internalización de las NPs-FA en las células de cáncer por endocitosis mediada por receptor.

La imagen es un esquema y sus escalas no representan las escalas reales de las células y moléculas que ahí se muestran.

Fuente: Figura realizada por Juárez Moreno Karla, utilizando Biorender (www.biorender.com).

Funcionalización química

La polimerización en emulsión en dos etapas permite generar partículas tipo núcleo-coraza con una variedad de grupos reactivos en su superficie. En la primera etapa se genera el núcleo de polímero vinílico, como se expuso en la sección anterior. En la segunda etapa, se dosifica el mismo monómero de la primera, pero mezclado con un monómero el cual, además del doble enlace, posea otro grupo funcional como $-Cl$, $-COOH$, $-CHO$, $-OH$, NH_2 , SH , epoxi,

amidas, aminas cuaternarias, polioxietileno, etc. (Pichot, Delair y Elaïssari, 1995), lo cual genera una coraza de copolímero con el grupo funcional deseado. Mediante las diversas posibilidades ofrecidas por la química orgánica, el grupo reactivo de la superficie se emplea para unir covalentemente alguna molécula que actúe como ligando. Este, por su acoplamiento selectivo con receptores específicos sobrepresados en la membrana de la célula cancerosa (Angelopoulou *et al.*, 2019), permite dar el direccionamiento deseado para la entrega del cargo que se encuentra embebido en las NPs.

Funcionalización física

Otra opción para la funcionalización es la metodología desarrollada en nuestro grupo, la cual dio origen a una patente (Herrera Ordóñez *et al.*, 2019; Olvera-Guillén *et al.*, 2021). En este caso la funcionalización no se da por la formación de enlaces covalentes, sino que es física, debido a la formación de un complejo entre el ligando (folato) y el tensoactivo polimérico no-iónico (PVA), el cual se empleó en la polimerización en emulsión como estabilizante coloidal. La restricción es que el ligando debe ser una molécula anfífila en la cual la parte polar posea una carga neta. Para corroborar experimentalmente la formación del complejo, se construye una gráfica tensión interfacial (γ) versus concentración de solutos (PVA + ligando), para la interfase agua-acetato de etilo a condiciones fisiológicas (37 °C y pH = 7.3). Si γ exhibe un máximo implica que sí se forma el complejo. Esta metodología tiene la gran ventaja de que para la funcionalización solo se requiere mezclar el coloide polimérico con el ligando en la proporción adecuada, evitando así lo laborioso de la funcionalización química y posterior purificación para eliminar reactivos residuales. Pruebas *in vitro* (Olvera-Guillén *et al.*, 2021) sugieren fuertemente que el complejo PVA-folato permite la internalización mediada por receptor y los mínimos efectos secundarios observados en pruebas preliminares *in vivo* indican que el direccionamiento de NPs hacia células cancerosas fue exitoso.

Ejemplo de síntesis y uso terapéutico en modelos animales

Siguiendo las recomendaciones expuestas hasta aquí, los autores y su equipo de trabajo desarrollaron nanopartículas de poli(acetato de vinilo) mediante polimerización en emulsión empleando persulfato de amonio como iniciador y PVA como estabilizante. Este trabajo fue publicado en Olvera-Guillén *et al.* (2021). A continuación, se describen algunos aspectos relevantes de este trabajo.

Para lograr el tamaño objetivo de 50 ± 20 nm recomendado por Davis (2012), una de las primeras tareas fue identificar la masa molar y el grado de hidrólisis del PVA más adecuado entre las opciones comerciales disponibles.

Se determinó que el PVA con una menor masa molar (13,000-23,000 Dalton) y un grado de hidrólisis del 87-89% era el óptimo. Por el contrario, mayores masas molares, en lugar de estabilizar el sistema, tienden a desestabilizarlo coloidalmente debido a que el tamaño de las cadenas de PVA extendidas en el agua supera al de las NPs, funcionando como puentes aglutinantes. El ajuste “fino” del promedio y distribución de tamaño se logró variando la concentración inicial de monómero. Al alcanzar una conversión específica de monómero, se produce una coagulación limitada provocando un aumento repentino del tamaño promedio y un inherente angostamiento de la distribución.

En una etapa post-reacción las NPs fueron cargadas con eugenol, el ingrediente activo. Puesto que este es un líquido que actúa como un buen solvente para el polímero y, aunque es hidrófobo, presenta una ligera solubilidad en agua, existe el potencial químico que permite su incorporación en las NPs mediante un simple mezclado de la dispersión coloidal de NPs con el eugenol. Posteriormente, se realizó la funcionalización física mediante el mezclado de folato y NPs cargadas con eugenol.

Las NPs funcionalizadas y cargadas con eugenol, así como las no-funcionalizadas fueron utilizadas para realizar evaluaciones de citotoxicidad *in vitro* en líneas celulares de cáncer de mama. Los resultados indicaron que la muerte celular ocurrió mayoritariamente por apoptosis y que, en las NPs funcionalizadas, la muerte celular fue aproximadamente de 6-7 veces mayor que con las NPs no funcionalizadas. Estos resultados confirman la actividad antitumoral del eugenol, la efectividad de la funcionalización física y el papel importante del folato para el direccionamiento de los nanosistemas y la inducción de la muerte celular.

Se llevaron a cabo pruebas *in vivo* (Rivera *et al.*, 2022) para evaluar las NPs en un modelo de xenotransplante de adenocarcinoma mamario MCF-7 en ratones desnudos. A diferencia del cisplatino, las NPs únicamente generaron como efecto secundario un grado moderado de hígado graso. Estos resultados demuestran la capacidad de las NPs para realizar una entrega dirigida del eugenol como ingrediente activo, y confirma la efectividad del proceso de funcionalización física con folato.

Comentarios finales

Es muy deseable que en el diseño conceptual de NPs para la entrega dirigida de moléculas anticancerígenas que se deseen producir a escala industrial, se tomen en cuenta tanto factores biológicos como de ingeniería y costos. Los primeros determinarán las características del material, la ingeniería, la factibilidad de la síntesis y su escalamiento a nivel industrial; los costos influyen en la accesibilidad del tratamiento, por lo cual también tienen un impacto social. La polimerización en emulsión como método de síntesis de NPs, junto con el comportamiento fisicoquímico de mezclas de tensoactivos, permite materializar estas ideas dada la relativa facilidad para modular las caracterís-

ticas requeridas por el material para librar las diferentes barreras anatómicas y fisiológicas a las cuales se tiene que someter, a bajo costo, con materias primas fácilmente disponibles y mediante un proceso del cual ya se tiene experiencia industrial.

Contribución de autorías

Concepción y diseño del artículo: Jorge Herrera Ordóñez, Karla Oyuqui Juárez Moreno.

Redacción y preparación del borrador original: Jorge Herrera Ordóñez, Karla Oyuqui Juárez Moreno.

Redacción y revisión final: Jorge Herrera Ordóñez, Karla Oyuqui Juárez Moreno.

Referencias

- Alexandre, Nuno, Jorge Ribeiro, Andrea Gärtner, Tiago Pereira, Irina Amorim, João Fragoso, Ascensão Lopes *et al.* 2014. Biocompatibility and hemocompatibility of polyvinyl alcohol hydrogel used for vascular grafting - *In vitro* and *in vivo* studies. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 102(12): 4262-75. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35098>.
- Angelopoulou, Athina, Argiris Kolokithas-Ntoukas, Christos Fytas y Konstantinos Avgoustakis. 2019. Folic acid-functionalized, condensed magnetic nanoparticles for targeted delivery of doxorubicin to tumor cancer cells overexpressing the folate receptor. *ACS Omega*, 4(26): 22214-27. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03594>.
- Beach, Maximilian A., Umeka Nayanathara, Yanting Gao, Changhe Zhang, Yijun Xiong, Yufu Wang y Georgina K. Such. 2024. Polymeric nanoparticles for drug delivery. *Chemical Reviews*, 124(9): 5505-5616. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.3c00705>.
- Choi, Chung Hang J., Jonathan E. Zuckerman, Paul Webster y Mark E. Davis. 2011. Targeting kidney mesangium by nanoparticles of defined size. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(16): 6656-61. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103573108>.
- Coen, Emma M., Robert G. Gilbert, Bradley R. Morrison, Hartmann Leube y Sarah Peach. 1998. Modelling particle size distributions and secondary particle formation in emulsion polymerisation. *Polymer*, 39(26): 7099-7112. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(98\)00255-9](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(98)00255-9).
- Davis, Mark E. 2012. Fighting cancer with nanoparticle medicines. The nanoscale matters. *MRS Bulletin*, 37(9): 828-35. <https://doi.org/10.1557/mrs.2012.202>.
- Dobrowolska, Marta E. y Ger J. M. Koper. 2014. Optimal ionic strength for nonionically initiated polymerization. *Soft Matter*, 10(8): 1151. <https://doi.org/10.1039/c3sm51998h>.
- Dreher, Matthew R., Wenge Liu, Charles R. Michelich, Mark W. Dewhirst, Fan Yuan y

- Ashutosh Chilkoti. 2006. Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers. *Journal of the National Cancer Institute*, 98(5): 335-44. <https://doi.org/10.1093/jnci/djj070>.
- Gao, Huajian, Wendong Shi y Lambert B. Freund. 2005. Mechanics of receptor-mediated endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(27): 9469-74. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503879102>.
- Garay-Jiménez, Julio C., Danielle Gergeres, Ashley Young, Daniel V. Lim y Edward Turos. 2009. Physical properties and biological activity of poly(butyl acrylate-styrene) nanoparticle emulsions prepared with conventional and polymerizable surfactants. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 5(4): 443-51. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.01.015>.
- Gilbert, Robert G. 1995. *Emulsion polymerization: a mechanistic approach*. Londres: Academic Press.
- Harkins, William D. 1947. A general theory of the mechanism of emulsion polymerization. *Journal of the American Chemical Society*, 69(6): 1428-44. <https://doi.org/10.1021/ja01198a053>.
- He, Chunbai, Yiping Hu, Lichen Yin, Cui Tang y Chunhua Yin. 2010. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*, 31(13): 3657-66. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.065>.
- Herrera Ordóñez, Jorge. 2023. Controversies on the mechanism and kinetics of emulsion polymerization: an updated critical review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 320(octubre): 103005. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2023.103005>.
- Herrera Ordóñez, Jorge, Enrique Saldívar-Guerra y Eduardo Vivaldo-Lima. 2013. Dispersed-phase polymerization processes. En Enrique Saldívar-Guerra y Eduardo Vivaldo-Lima (eds.), *Handbook of polymer synthesis, characterization, and processing*. Hoboken, N. J., USA: John Wiley & Sons, Inc., 295-315. <https://doi.org/10.1002/9781118480793.ch14>.
- Herrera Ordóñez, Jorge, Roberto Olvera-Guillén, Gabriela Rocha-Botello, Karla Juárez-Moreno y Martha Cruz-Soto. 2023. Proceso de obtención de nanopartículas de polímero para la liberación de fármacos mediada por receptor. Patente de México No. 402024. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.
- Kaneo, Yoshiharu, Shiori Hashihama, Atsufumi Kakinoki, Tetsuro Tanaka, Takayuki Nakano y Yuka Ikeda. 2005. Pharmacokinetics and biodisposition of poly(vinyl alcohol) in rats and mice. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 20(6): 435-42. <https://doi.org/10.2133/DMPK.20.435>.
- Kelly, C. M., C. C. DeMerlis, D. R. Schoneker y J. F. Borzelleca. 2003. Subchronic toxicity study in rats and genotoxicity tests with polyvinyl alcohol. *Food and Chemical Toxicology*, 41(5): 719-27. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(03\)00003-6](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(03)00003-6).
- Kettler, Katja, Karin Veltman, Dik van de Meent, Annemarie van Wezel y A. Jan Hendriks. 2014. Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions y cell type. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(3): 481-92. <https://doi.org/10.1002/etc.2470>.

- Ledermann, J. A., S. Canevari y T. Thigpen. 2015. Targeting the folate receptor: diagnostic and therapeutic approaches to personalize cancer treatments. *Annals of Oncology*, 26(10): 2034-43. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv250>.
- Lesko, P. M. y P. R. Sperry. 1997. Acrylic and styrene-acrylic polymers. En Peter A. Lovell and Mohamed S. El-Aasser (eds.), *Emulsion polymerization and emulsion polymers*. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd., 619-55.
- Lovell, Peter A. y F. Joseph Schork. 2020. Fundamentals of emulsion polymerization. *Biomacromolecules* 619-55. 21(11): 4396-4441. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00769>.
- Lv, Shixian, Meilyn Sylvestre, Alexander N. Prossnitz, Lucy F. Yang y Suzie H. Pun. 2021. Design of polymeric carriers for intracellular peptide delivery in oncology applications. *Chemical Reviews*, 121(18): 11653-98. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00963>.
- Mok, Zi Hong. 2024. The effect of particle size on drug bioavailability in various parts of the body. *Pharmaceutical Science Advances*, 2(noviembre): 100031. <https://doi.org/10.1016/j.pscia.2023.100031>.
- Narmani, Asghar, Melina Rezvani, Bagher Farhood, Parvaneh Darkhor, Javad Mohammadnejad, Bahram Amini, Soheila Refahi y Nouraddin Abdi Goushbolagh. 2019. Folic acid functionalized nanoparticles as pharmaceutical carriers in drug delivery systems. *Drug Development Research*, 80(4): 404-24. <https://doi.org/10.1002/ddr.21545>.
- Nel, Andre E., Lutz Mädler, Darrell Velegol, Tian Xia, Eric M. V. Hoek, Ponisseril Somasundaran, Fred Klaessig, Vince Castranova y Mike Thompson. 2009. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature Materials*, 8(7): 543-57. <https://doi.org/10.1038/nmat2442>.
- Nguyen, Luan N. M., Zachary P. Lin, Shrey Sindhwani, Presley MacMillan, Stefan M. Mladjenovic, Benjamin Stordy, Wayne Ngo y Warren C. W. Chan. 2023. The exit of nanoparticles from solid tumours. *Nature Materials*, 22(10): 1261-72. <https://doi.org/10.1038/s41563-023-01630-0>.
- Olvera-Guillén, Roberto, Karla Juárez-Moreno, Martha Cruz-Soto, Gabriela Rocha-Botello y Jorge Herrera Ordóñez. 2021. Supramolecular poly(vinyl alcohol)-folate structure as functional layer and colloidal stabilizer of poly(vinyl acetate) nanoparticles with potential use as nanocarrier for hydrophobic antitumor agents. *Journal of Nanoparticle Research*, 23(6): 132. <https://doi.org/10.1007/s11051-021-05241-1>.
- Ottewill, Ronald H. 1997. Stabilization of polymer colloids dispersions. En Peter A. Lovell y Mohamed S. El-Aasser (eds.), *Emulsion polymers and emulsion polymerization*. Londres: John Wiley & Sons Ltd., 59-121. <https://www.wiley.com/enmx/Emulsion+Polymerization+and+Emulsion+Polymers-p-9780471967460>.
- Patel, Siddharth, Renee C. Ryals, Kyle K. Weller, Mark E. Pennesi y Gaurav Sahay. 2019. Lipid nanoparticles for delivery of messenger RNA to the back of the eye. *Journal of Controlled Release*, 303(junio): 91-100. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.04.015>.
- Pichot, C., T. Delair y A. Elaïssari. 1995. Polymer colloids for biomedical and pharmaceuti-

- cal applications. En *Polymeric dispersions: principles and applications*. Dordrecht: Springer Netherlands, 515-539. https://doi.org/10.1007/978-94-011-5512-0_33.
- Pulingam, Thiruchelvi, Parisa Foroozandeh, Jo-Ann Chuah y Kumar Sudesh. 2022. Exploring various techniques for the chemical and biological synthesis of polymeric nanoparticles. *Nanomaterials*, 12(3): 576. <https://doi.org/10.3390/nano12030576>.
- Rejman, Joanna, Volker Oberle, Inge S. Zuhorn y Dick Hoekstra. 2004. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochemical Journal*, 377(1): 159-69. <https://doi.org/10.1042/bj20031253>.
- Rivera-Hernández, Gabriela, Marilena Antunes-Ricardo, Patricia Martínez-Morales y Mirna L. Sánchez. 2021. Polyvinyl alcohol based-drug delivery systems for cancer treatment. *International Journal of Pharmaceutics*, 600(mayo): 120478. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120478>.
- Rivera M., Sánchez Bartz F., Gracia Mora I. 2022. *Evaluación de nanopartículas en un xenotransplante de adenocarcinoma mamario MCF-7 a ratón desnudo (nu/nu)*. Informe de resultados, UNIPREC, Facultad de Química, UNAM.
- Sadato, A., W. Taki, Y. Ikada, I. Nakahara, K. Yamashita, K. Matsumoto, M. Tanaka *et al.* 1994. Experimental study and clinical use of poly(vinyl acetate) emulsion as liquid embolisation material. *Neuroradiology*, 36(8): 634-41. <https://doi.org/10.1007/BF00600429>.
- Sakai, Kiyofumi, Masayuki Fukuba, Yutaka Hasui, Kunihiko Moriyoshi, Takashi Ohmoto, Tokio Fujita y Tatsuhiko Ohe. 1998. Purification and characterization of an esterase involved in poly(vinyl alcohol) degradation by *Pseudomonas vesicularis* PD. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62(10): 2000-2007. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.2000>.
- Sindhvani, Shrey, Abdullah Muhammad Syed, Jessica Ngai, Benjamin R. Kingston, Laura Maiorino, Jeremy Rothschild, Presley MacMillan *et al.* 2020. The entry of nanoparticles into solid tumours. *Nature Materials*, (enero). <https://doi.org/10.1038/s41563-019-0566-2>.
- Solaro, Roberto, Andrea Corti y Emo Chiellini. 2000. Biodegradation of poly(vinyl alcohol) with different molecular weights and degree of hydrolysis. *Polymers for Advanced Technologies*, 11(8-12): 873-78. [https://doi.org/10.1002/1099-1581\(200008/12\)11:8/12<873::AID-PAT35>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1099-1581(200008/12)11:8/12<873::AID-PAT35>3.0.CO;2-V).
- Vauthier, Christine y Gilles Ponchel (eds.). 2016. *Polymer nanoparticles for nanomedicines*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-41421-8>.
- Zhou, Jikou, Carola Leuschner, Challa Kumar, Josef F. Hormes y Winston O. Soboyejo. 2006. Sub-cellular accumulation of magnetic nanoparticles in breast tumors and metastases. *Biomaterials*, 27(9): 2001-8. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.10.013>.