



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

---

Trabajo de Tesis Doctoral

**DESARROLLO DE NANOSISTEMAS LIPÍDICOS  
PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE META-  
LOFÁRMACOS DE PLATINO(II) PARA EL TRATA-  
MIENTO DE TUMORES COLORRECTALES**

---

Tesista: Mg. Tugce Boztepe

Director: Dr. Ignacio E. León

Director: Dr. Guillermo R. Castro

Año: 2023

El presente trabajo de Tesis, para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado de manera conjunta en el Laboratorio de Nanobiomateriales perteneciente al Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales, CINDEFI (CONICET-UNLP), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, y en el Centro de Química Inorgánica "Dr. Pedro J. Aymonino", CEQUINOR (CONICET-UNLP) gracias al financiamiento de la Universidad Nacional de La Plata, la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

## Agradecimientos

A mis directores, Ignacio y Guiye, por aceptarme para este proyecto. Por el continuo apoyo, colaboración, orientación y motivación que recibí de ellos durante todas las etapas de mi investigación. Siempre estuvieron dispuestos a ayudarme.

Al CONICET, que financió el proyecto durante todo el doctorado y posibilitó el desarrollo de la tesis Doctoral.

A la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), por el otorgamiento de subsidios y fondos necesarios para llevar a cabo las tareas de investigación.

Al CINDEFI y a toda su gente, por su consideración, por abrirme sus puertas y por acompañarme pródigamente a lo largo de este camino.

Al CEQUINOR, por permitirme hacer mis experimentos celulares y a su gente, por ser amable conmigo siempre.

A mis amigos del Laboratorio de Nanobiomateriales: A Nacho, porque su ayuda y sus recomendaciones estuvieron disponibles siempre que las necesité, a German, por su colaboración y enseñanzas; a Maxi, por enseñarme síntesis en mi primer año; a Manu, a Sergio y a Flor por los buenos momentos compartidos.

A mi amigo Seba, por sus consejos y acompañarme en HPLC.

A mis compañeras del Lab 27 del CEQUINOR, Lucia B., Lucia SM., y Patricia, por sus orientaciones, por ayudarme de forma atenta y ofrecerme en todo momento una mano amiga.

A la Dra. Esperanza Ruiz, del LIDeB, por su ayuda y colaboración en la parte de la liberación de fármacos.

A la Dra. Vera Álvarez, del INTEMA, por su colaboración para la caracterización fisicoquímica de los materiales.

A mi gran amiga Giuli, por su invaluable amistad y estar ahí acompañarme en

mis momentos más vulnerables, pero también por compartir mis alegrías y triunfos, por escucharme, aconsejarme, y porque es muy divertida.

A mis buenos amigos, Dani, Juli y Leo, por ofrecerme su amistad, aceptarme desde que llegué y hacerme sentir como una más del club.

Tengo que agradecer a toda mi familia; a mis papas, Tulay y Sami, y a mis hermanas, Sude y Ece. Este trabajo no hubiera sido posible sin su apoyo, motivación, paciencia, y aliento. Todos estos años se sacrificaron estando a 13 mil km lejos de mí, pero siempre estuvieron conmigo, acompañándome a cada momento.

Al Sr. Duman, por aguantarme y estar a mi lado.

A David, mi pareja y mi compañero de la vida, he superado mis días más duros gracias a su ánimo y su confianza en mí. Me siento muy afortunada por tenerlo. Seni seviyorum.

**El presente trabajo de Tesis fue presentado y/o publicado parcialmente en los siguientes eventos y/o publicaciones internacionales con referato, a saber:**

**A. Reuniones científicas**

- Evento: V Jornadas de Química Inorgánica Prof. Aymonino

Autores: **T. Boztepe**, G.A. Islan, R.C. Gambaro, G.R. Castro, I.E. León.

Título: *Antitumoral Activity of Novel 8-Oxyquinolate-Platinum(II)-Loaded Nanostructured Lipid Carriers Targeted with Riboflavin.*

17 y 18 de Octubre de 2022, La Plata, Argentina (Presentación de poster).

- Evento: XXI Encuentro de Superficies y Materiales Nanoestructurados (Nano 2022)

Autores: **T. Boztepe**, G.A. Islan, R.C. Gambaro, G.R. Castro, I.E. León.

Título: *Synthesis and evaluation of the antitumoral activity of novel 8-Hydroxyquinoline platinum(II)-loaded Nanostructured Lipid Carriers targeted with Riboflavin.*

9-11 de Agosto de 2022, Cordoba, Argentina (Presentación de poster).

- Evento: Fronteras en Nanobiotecnología III (Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires)

Autores: **T. Boztepe**, G.A. Islan, R.C. Gambaro, G.R. Castro, I.E. León.

Título: *8- Hydroxyquinoline platinum(II)-loaded Nanostructured Lipid Carriers targeted with Riboflavin: Synthesis and evaluation of the antitumoral activity.*

20-22 de Julio de 2022, Buenos Aires, Argentina (Presentación de poster).

- Evento: Jornadas de Becarias y Becarios del CEQUINOR (UNLP-CONICET)

Autores: **T. Boztepe**, G.R. Castro, I.E. León.

Título: *8-Hydroxyquinoline Platinum (II) Loaded Nanostructured Lipid Carriers: Synthesis, Physicochemical Characterization, and Evaluation of Antitumor Activity.*

29 y 30 de Noviembre de 2021, La Plata, Argentina (Presentación oral).

- Evento: Reunión De Sociedades De Biociencias SAIC - SAI - AAFE - NANOMED-ar

Autores: **T. Boztepe**, G.A. Islan, G.R. Castro, I.E. León.

Título: *Synthesis and Evaluation of The Antitumoral Activity of Riboflavin-Targeted 8-Hydroxyquinoline platinum(II)-Loaded Nanostructured Lipid Carriers.*

17-20 de Noviembre de 2021, Buenos Aires, Argentina (Presentación de poster).

## **B.- Publicaciones científicas**

- **Boztepe, T.**; Cabrera, S.; Alemán, J.; Islan, G.A.; Castro, G.R.; León, I.E. *Anticancer Activity of 8-Oxyquinolate-Platinum(II)-Loaded Nanostructured Lipid Carriers Targeted with Riboflavin Against Human Colon Carcinoma HCT116 Cells in 2D and 3D Culture Models.* (en preparación)
- **Boztepe, T.**; Scioli-Montoto, S.; Gambaro, R.C.; Ruiz, M.E.; Cabrera, S.; Alemán, J.; Islan, G.A.; Castro, G.R.; León, I.E. *Design, Synthesis, Characterization, and Evaluation of the Anti-HT-29 Colorectal Cell Line Activity of Novel 8-Oxyquinolate-Platinum(II)- Loaded Nanostructured Lipid Carriers Targeted with Riboflavin.* *Pharmaceutics* 2023, 15, 1021. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15031021>.
- I.R. Berti, T. Singh, **T. Boztepe**, I.E. Leon, A.K. Nadda, G.R. Castro. Chapter 17. *Design of Nanostructured Lipid Carriers and Hybrid Lipid Nanoparticles. From the book: Concepts and Design of Materials Nanoarchitectonics. Nanoscience & Nanotechnology Series; Royal Society of Chemistry: Cambridge 2022, Vol. 2008, pp 381–416.* <https://doi.org/10.1039/9781788019613-00381>.

- **T. Boztepe**, G.R. Castro, I.E. León. *Lipid, Polymeric, Inorganic-Based Drug Delivery Applications for Platinum-Based Anticancer Drugs. International Journal of Pharmaceutics* 2021, 605 (June), 120788. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120788>.
- **T. Boztepe**, S. Scioli-Montoto, M.E. Ruiz, V.A. Alvarez, G.R. Castro, I.E. León. *8-Hydroxyquinoline Platinum(II) Loaded Nanostructured Lipid Carriers: Synthesis, Physicochemical Characterization and Evaluation of Antitumor Activity. New Journal of Chemistry* 2021, 45 (2), 821–830. <https://doi.org/10.1039/D0NJ03940C>

## Lista de abreviaturas

<b>8-QO-Pt</b>	8-oxiquinolinato de platino(II)
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>APC</b>	Poliposis coli adenomatosa
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>CCR</b>	Cáncer colorrectal
<b>DACH</b>	Diamino-ciclohexano
<b>DiOC18</b>	Perclorato de 3,3'-dioctadeciloxacarbocianina
<b>DLS</b>	Dispersión dinámica de la luz ( <i>Dynamic light scattering</i> )
<b>DMEM</b>	Medio Eagle modificado de Dulbecco ( <i>Dulbecco's modified eagle's medium</i> )
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DPPG</b>	Dipalmitoil fosfatidil glicerol
<b>DSC</b>	Calorimetría diferencial de barrido ( <i>Differential scanning calorimetry</i> )
<b>EE</b>	Eficiencia de atrapamiento ( <i>Entrapment efficiency</i> )
<b>EGFR</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>EPR</b>	Efecto mejorado de permeación y retención
<b>FA</b>	Ácido fólico
<b>FAD</b>	Dinucleótido de adenina de flavina
<b>FDA</b>	Administración de alimentos y medicamentos
<b>FMN</b>	Mononucleótido de flavina
<b>FTIR</b>	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier ( <i>Fourier transformed infrared spectroscopy</i> )
<b>GF</b>	Factores de crecimiento



<b>GSK3<math>\beta</math></b>	Glucógeno sintasa quinasa 3 $\beta$
<b>GTCC-LQ</b>	Triglicéridos de ácido caprílico/cáprico
<b>HA</b>	Ácido hialurónico
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta eficiencia ( <i>High performance liquid chromatography</i> )
<b>HRPC</b>	Cáncer de próstata refractario a hormonas
<b>IP</b>	Ioduro de propidio
<b>JM216</b>	Satraplatino
<b>MM</b>	Miristil miristato ( <i>Myristyl myristate</i> )
<b>MMP</b>	Metaloproteinasas de matriz
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
<b>MCT</b>	Esferoides tumorales multicelulares
<b>NLC</b>	Vehículos lipídicos nanoestructurados ( <i>Nanostructured lipid carriers</i> )
<b>NPs</b>	Nanopartículas
<b>NSCLC</b>	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>P188</b>	Poloxamero P188, también Kolliphor <sup>®</sup> P188, o Pluronic <sup>®</sup> F68
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino ( <i>Phosphate-Buffered Saline</i> pH 7.4)
<b>PdI</b>	Índice de polidispersión ( <i>Polydispersity index</i> )
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>P-gp</b>	Glicoproteína P
<b>pRb</b>	Proteína supresora de tumores de retinoblastoma
<b>Pt</b>	Platino
<b>RCP</b>	Proteína transportadora de riboflavina
<b>RFV</b>	Riboflavina

<b>RFVT</b>	Transportador de riboflavina
<b>SLN</b>	Nanopartículas sólidas lipídicas ( <i>Solid lipid nanoparticles</i> )
<b>SPARC</b>	Satraplatino y prednisone contra cancer refractarios ( <i>Satraplatin and Prednisone Against Refractory Cancer</i> )
<b>SS</b>	Estearil estearato ( <i>Stearyl stearate</i> )
<b>TEM</b>	Microscopía de transmisión electrónica ( <i>Transmission electron microscopy</i> )
<b>TGA</b>	Análisis termogravimétrico ( <i>Thermogravimetric analysis</i> )
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$
<b>TNM</b>	Tumores/Nodos/Metástasis
<b>XRD</b>	Difracción de rayos X ( <i>X-ray diffraction</i> )
<b>Zav</b>	Tamaño promedio
<b>Z-pot o <math>\zeta</math></b>	Potencial Z

# ÍNDICE

<b>Capítulo 1.....</b>	<b>1</b>
1.1. Definición de Cáncer.....	1
1.2. La epidemiología del cáncer .....	2
1.3. La clasificación del cáncer .....	4
1.4. Las características del cáncer .....	7
1.5. Cáncer colorrectal.....	14
1.6. Agentes antineoplásicos .....	19
1.7. Metalofármacos .....	21
1.7.1. Cisplatino.....	23
1.7.2. Carboplatino .....	25
1.7.3. Oxaliplatino.....	26
1.7.4. Medicamentos basados en platino de nueva generación .....	26
1.7.4.1. Satraplatino .....	26
1.7.4.2. Picoplatino.....	27
1.7.4.3. Iproplatino.....	28
1.7.4.4. Prolindac <sup>TM</sup> .....	28
1.7.4.5. 8-oxiquinolinato-platino (II) .....	29
1.8. Nanosistemas farmacéuticos .....	30
1.8.1. Nanopartículas lipídicas.....	32
1.8.2. Síntesis y características fisicoquímicas de las NPs lipídicas.....	35
1.8.3. Administración dirigida pasiva y activa.....	36

1.8.3.1. Riboflavina (RFV) .....	38
1.8.3.2. Transporte de RFV .....	39
1.8.4. Aplicaciones terapéuticas de los nanosistemas de lípidos cargadas con Pt en el campo del cáncer en fase preclínica.....	41
1.8.4.1. SPI-077.....	44
1.8.4.2. Lipoplatino .....	44
1.8.4.3. Aroplatin™ .....	47
1.9. Hipótesis y objetivos.....	48
1.9.1. Hipótesis.....	48
1.9.2. Objetivo general.....	48
1.9.3. Objetivos específicos .....	48
<b>Capítulo 2.....</b>	<b>50</b>
2.1. Materiales y métodos.....	50
2.1.1. Materiales .....	50
2.1.2. Síntesis de 8-QO-Pt .....	50
2.1.3. Preparación de nanosistemas lipídicos de 8-QO-Pt.....	51
2.1.4. Cuantificación de 8-QO-Pt en las formulaciones.....	52
2.1.5. Eficiencia de encapsulación .....	52
2.1.6. Caracterización fisicoquímica.....	53
2.1.6.1. Distribución de tamaño de partículas e índice de polidispersión .....	54
2.1.6.2. Microscopía de transmisión electrónica (TEM) .....	54
2.1.6.3. Análisis por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) .....	55
2.1.6.4. Análisis termogravimétrico (TGA).....	55
2.1.6.5. Análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	55
2.1.6.6. Análisis de difracción de rayos X (XRD).....	55
2.1.7. Ensayos de liberación <i>in vitro</i> .....	56

2.1.8. Ensayos <i>in vitro</i> .....	56
2.1.8.1. Cultivo de células .....	56
2.1.8.2. Estudios de citotoxicidad .....	57
2.1.8.3. Captación celular .....	58
2.1.8.4. Apoptosis.....	59
2.1.9. Análisis estadístico .....	61
2.2. Resultados y discusión .....	62
2.2.1. Desarrollo de formulaciones y morfología de nanopartículas ....	62
2.2.2. Caracterización fisicoquímica.....	64
2.2.2.1. Análisis por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) .....	64
2.2.2.2. Análisis por difracción de rayos X (XRD).....	66
2.2.2.3. Análisis termogravimétrico (TGA).....	67
2.2.2.4. Análisis calorimetría diferencial de barrido (DSC) .....	69
2.2.3. Ensayo de liberación <i>in vitro</i> .....	70
2.2.4. Ensayos de citotoxicidad .....	73
2.2.5. Captación celular de las NLC .....	75
2.2.6. Apoptosis.....	77
<b>Capítulo 3.....</b>	<b>80</b>
3.1. Materiales y métodos.....	80
3.1.1. Materiales .....	80
3.1.2. Preparación de las formulaciones .....	80
3.1.3. La eficiencia de encapsulación .....	81
3.1.4. Tamaño de partículas, índice de polidispersidad (PDI), potencial zeta y microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	82
3.1.5. Ensayo de liberación <i>in vitro</i> .....	82
3.1.6. Método para la cuantificación de 8-QO-Pt en HPLC.....	83
3.1.7. Ensayo de citotoxicidad celular.....	83

3.1.8. El ensayo de captación celular.....	84
3.1.9. Ensayo de apoptosis.....	85
3.1.10. Sistema de cultivo 3D, Esferoides .....	85
3.1.10.1. Formación de los esferoides de HCT 116.....	87
3.1.10.2. Evaluación de la citotoxicidad en modelos 3D .....	88
3.1.10.3. Migración de células 3D .....	89
3.1.11. Ensayo de hemotoxicidad .....	91
3.1.12. Análisis estadístico .....	91
3.2. Resultados y discusión .....	92
3.2.1. Desarrollo de formulaciones y morfología de nanopartículas ....	92
3.2.2. Ensayo de liberación <i>in vitro</i> .....	96
3.2.3. Estudios de citotoxicidad .....	99
3.2.4. Captación celular.....	102
3.2.5. Apoptosis.....	104
3.2.6. Evaluación de la citotoxicidad en modelos 3D .....	105
3.2.7. Migración de células 3D .....	108
3.2.8. Hemotoxicidad .....	111
<b>Conclusiones Finales y Perspectivas .....</b>	<b>113</b>
Referencias.....	115
Listado de Figuras.....	130
Listado de Tablas.....	136

# Capítulo 1

## *Introducción*

### **1.1. Definición de Cáncer**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el cáncer como un gran grupo de enfermedades que comienzan en casi cualquier órgano o tejido del cuerpo cuando las células anormales crecen sin control, y van más allá de sus límites habituales para invadir partes del cuerpo contiguas y/o diseminarse a otros órganos debido a la pérdida de inhibición de crecimiento por contacto célula-célula (World Health. Organ., n.d.).

Aunque el cáncer es causado por defectos en el material genético de una célula y se transmite a las células subsiguientes por la división de esa célula, en gran medida dependen de los mecanismos moleculares presentes en ella. Sin embargo, comprender la razón por la cual los diferentes tipos de cáncer ocurren con mayor frecuencia en personas que viven en diferentes países, la incidencia de los cánceres cambia con el tiempo y la incidencia de los tipos de cáncer en mujeres y hombres de manera diferente también puede afectar nuestro enfoque de los cánceres.

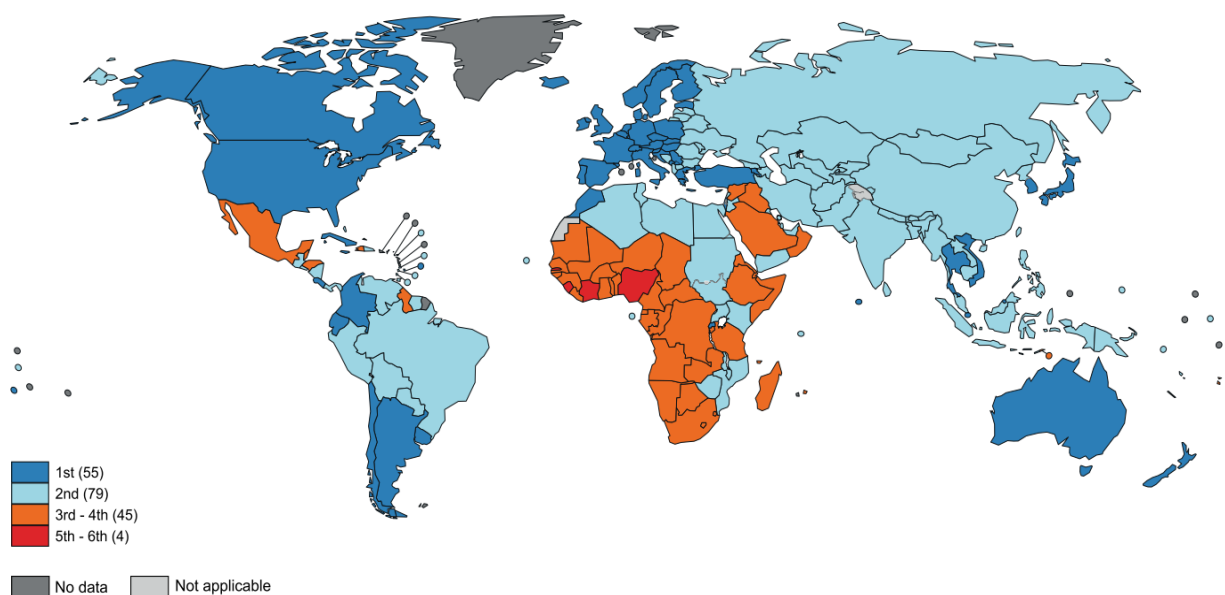
Todos los tipos de cáncer comienzan en la célula. Para entender el cáncer, es importante entender el mecanismo que ocurre cuando las células normales se transforman en células cancerosas. El cuerpo está formado por muchos tipos diferentes de células. Estas células crecen, se dividen y diferencian de manera controlada para asegurar la continuación de la vida. Cuando las células envejecen o se dañan, mueren y son reemplazadas por células nuevas. Sin embargo, a veces este proceso ordenado puede

fallar y el material genético (ADN) de la célula puede dañarse sufrir mutaciones, afectando el crecimiento y la división de las células normales.

## 1.2. La epidemiología del cáncer

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la primera o segunda causa de muerte antes de los 70 años en 112 de 183 países después de las enfermedades cardiovasculares en 2019 (**Figura 1.1**) (Wild and Weiderpass, 2020). Un estimado de 10 millones de muertes y 19.3 millones de nuevos casos de cáncer ocurrió en todo el mundo en 2020 (Sung *et al.*, 2021).

El cáncer de mama femenino ha superado al cáncer de pulmón como el cáncer más comúnmente diagnosticado, con un estimado de 2,3 millones de casos nuevos (11,7%), seguido de cánceres de pulmón (11,4%), colorrectal (10,0%), próstata (7,3%) y estómago (5,6%). El cáncer de pulmón siguió siendo la principal causa de muerte por cáncer, con un estimado anual de 1.8 millones de muertes (18,0%), seguido del cáncer colorrectal (9,4%), de hígado (8,3%), de estómago (7,7%) y de mama femenina (6,9%). De 2020 a 2040, se prevé que la carga global de cáncer aumente en un 47% a 28.4 millones de casos (Sung *et al.*, 2021).



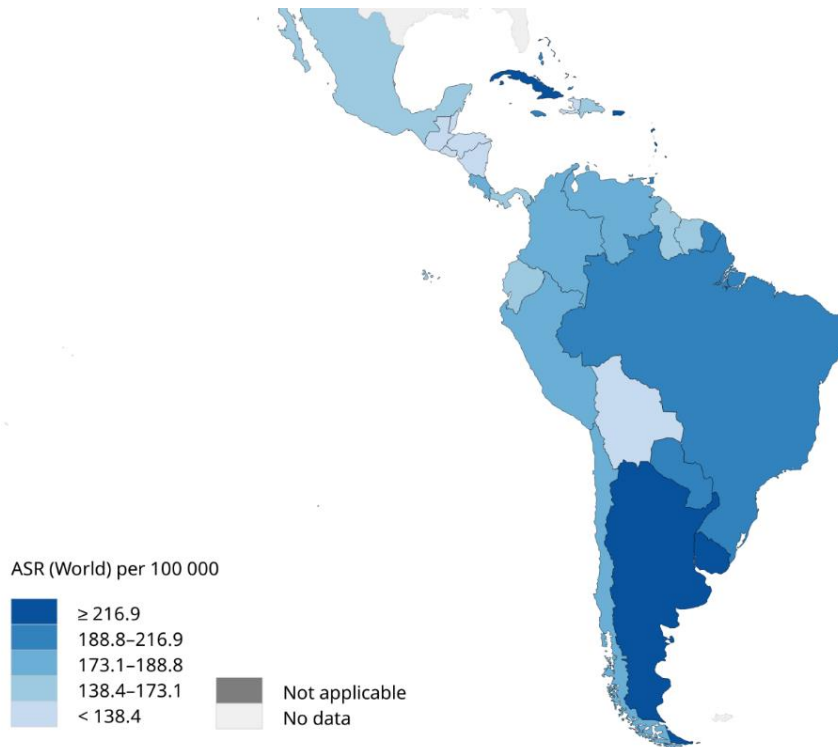
**Figura 1.1.** Mapa mundial del cáncer como causa principal de muerte prematura



(entre los 30 y los 69 años) (OMS, 2020)

A nivel mundial, mientras que en las mujeres el cáncer de mama es el más frecuente (2.09 millones de casos), seguido del cáncer de pulmón (0.72 millones de casos), cérvix (0.57 millones de casos) y colon (0.58), en los hombres, el de pulmón (1.37 millones de casos) y el de próstata (1.28 millones de casos) son los cánceres siguen en primera y segunda posición, mientras que el estómago (0.68 millones de casos) ocupa el tercer lugar, seguido del cáncer de hígado (y vías biliares intrahepáticas, 0.60 millones de casos) (Mattiuzzi & Lippi, 2019).

Los factores relacionados con el entorno, como pueden ser aquellos socioambientales (contaminación del aire, agua, suelo), ocupacionales, genéticos, metabólicos (presión arterial alta, nivel alto de colesterol, sobrepeso y obesidad) y conductuales (nutrición poco saludable, tabaquismo, consumo nocivo de alcohol y falta de actividad física) aumentan el riesgo de desarrollar cáncer. Además, se han demostrado disparidades en la incidencia del cáncer entre países. Se pueden considerar como razones una combinación de factores individuales y contextuales como la cultura, la ubicación geográfica, la política, la estructura social y económica y la desigualdad en la educación y los ingresos. (Wild and Weiderpass, 2020). Argentina se encuentra entre los países donde el cáncer es la primera causa de muerte prematura y en América del Sur entre los países con alta incidencia ( $\geq 216,9$  cada 100.000 habitantes) (**Figura 1.2**). En las mujeres el cáncer de mama es el más frecuente (22.024 casos) representa el 32,1% de todos los casos nuevos en 2020, seguido del cáncer de colon (7.402 casos, 10,8%), cérvix (4.583 casos, 6,7%) y pulmón (4.372 casos, 6,4%), en los hombres, el de próstata (11.686 casos, 18,7%), colon (8.493 casos, 13,6%) y pulmón (7.738 casos, 12,4%) (OMS, 2020).



**Figura 1.2.** Tasas de incidencia estimadas estandarizadas por edad en 2020 en América del Sur, todos los cánceres, ambos sexos, todas las edades. (OMS, Observatorio Global del Cáncer, 2020)

### 1.3. La clasificación del cáncer

Neoplasia significa literalmente "nuevo crecimiento". Las células neoplásicas se convierten en una masa de tejido anormal que no muestra limitación ni terminación de crecimiento, actúa fuera de los mecanismos de control celular y del organismo huésped, y es el resultado de la proliferación celular descontrolada. Pero la autonomía de las neoplasias tiene sus límites porque todas las neoplasias dependen del huésped para la incorporación de nutrientes, intercambio gaseoso y el suministro de sangre. Algunas neoplasias, además, requieren un soporte endocrino específico.

En el lenguaje médico común de neoplasia, que a menudo se denomina tumor y se identifican los tumores en "benignos" y "malignos". Esta distinción se hace sobre la base del comportamiento clínico potencial, la apariencia microscópica y su estructura. Teniendo en cuenta que las características microscópicas y macroscópicas de un tumor

se dice que esta lesión es benigna si el tumor se encuentra encapsulado o sea que posee procesos de diferenciación celular marcada por células en su superficie que no son metastásicas, lo que significa que permanecerá localizado donde se encuentra alojado, y no se extenderá a otras partes del cuerpo, por lo que la extirpación quirúrgica local podría ser suficiente.

Por otro lado, los tumores malignos pueden invadir y destruir los tejidos circundantes y diseminarse a sitios distantes a través de las vías sanguínea y linfática produciendo metástasis, lo cual es causal de muerte. Además, poseen una velocidad de crecimiento mayor que las células normales, y son heterogéneos en cuanto a el estado de diferenciación celular. Todos los tumores malignos se denominan “cáncer” (Kumar *et al.*, 2017).

Los cánceres se pueden clasificar basados en:

- el tipo de tejido del que se origina el cáncer (tipo histológico),
- el sitio primario o donde el cáncer se desarrolla por primera vez en el cuerpo.

El tipo histológico se examina en seis grupos principales; carcinoma, sarcoma, mieloma, leucemia, linfoma y tipos mixtos.

- a. **Carcinoma:** Las neoplasias malignas de las células epiteliales se denominan carcinomas y representan del 80% al 90% de todos los casos de cáncer. Las neoplasias malignas que surgen de cualquiera de las tres capas germinales, como el epitelio tubular renal (del mesodermo), la piel (del ectodermo) y el epitelio de revestimiento del intestino (del endodermo) se consideran carcinomas. Los carcinomas se subdividen en adenocarcinomas y carcinomas de células escamosas. Los adenocarcinomas crecen en un patrón glandular y generalmente ocurren en las membranas mucosas y se ven primero como una mucosa blanca engrosada similar a una placa. A menudo se propagan fácilmente a través del tejido blando donde se producen. Es más común en el colon, el estómago, las mamas, el útero, el páncreas, la vesícula biliar, la tiroides y las glándulas

salivales. Los carcinomas de células escamosas se originan a partir del epitelio escamoso y se clasifican según el lugar donde aparecen, encontrándose con frecuencia en piel, cabeza y cuello, esófago, pulmón y cuello uterino (*Cancer Classification-SEER Training*, n.d.; Kumar *et al.*, 2017; Sánchez-Danés & Blanpain, 2018).

- b. Sarcoma: Los sarcomas son un grupo diverso de neoplasias malignas mesodérmicas que se originan en el tejido de soporte y conectivo, como músculos, cartílagos, grasa, tendones y huesos, y se dividen principalmente en 2 grupos generales: sarcomas de tejidos blandos (histiocitoma fibroso maligno, liposarcoma, leiomiomasarcoma, sarcoma sinovial, dermatofibrosarcoma protuberans, angiosarcoma, sarcoma de Kaposi, tumor del estroma gastrointestinal, fibromatosis agresiva o tumor desmoide, rhabdomiosarcoma y sarcoma alveolar primario de partes blandas) y sarcomas óseos primarios (osteosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor de células gigantes y condrosarcoma) (Ceyssens & Stroobants, 2011; Skubitz & D'Adamo, 2007).
- c. Mieloma: El mieloma es un tipo de cáncer de la sangre que se desarrolla a partir del crecimiento descontrolado de células plasmáticas monoclonales en la médula ósea. El mieloma no forma un bulto o un tumor. Provoca la sobreproducción de inmunoglobulinas intactas no funcionales o cadenas de inmunoglobulinas. El mieloma afecta áreas donde tiene médula ósea activa. Esto incluye los brazos, las piernas y los hombros, así como la columna vertebral, el cráneo, la pelvis y la caja torácica. El mieloma afecta varios lugares del cuerpo, por lo que a veces se le llama mieloma múltiple (Brigle & Rogers, 2017; *Cancer Research Product Guide Edition 3*, n.d.).
- d. Leucemia: Las leucemias ("cánceres líquidos" o "cánceres de la sangre") son cánceres originados en la médula ósea. La enfermedad a menudo se asocia con la sobreproducción de glóbulos blancos inmaduros. La leucemia también afecta a los glóbulos rojos y puede provocar una mala coagulación de la sangre y fatiga debido a la anemia. Los principales tipos de leucemia son: la leucemia mieloide aguda (es un tipo de cáncer de la sangre que comienza a partir de glóbulos blancos jóvenes llamados granulocitos o monocitos en la médula ósea), la leucemia linfoblástica aguda (comienza a partir de glóbulos blancos llamados linfocitos en la médula ósea), leucemia mieloide crónica

(afecta la sangre y la médula ósea), la leucemia linfocítica crónica (afecta los linfocitos), and la leucemia de células pilosas (es un tipo raro de leucemia crónica que toma el nombre de los pequeños crecimientos similares a pelos en la superficie de las células sanguíneas leucémicas (*Cancer Classification-SEER Training*, n.d.; *Cancer Research Product Guide Edition 3*, n.d.)).

- e. Linfoma: Los linfomas son tumores sólidos del sistema inmunitario que se desarrollan en las glándulas o ganglios del sistema linfático, una red de vasos, ganglios y órganos (específicamente el bazo, las amígdalas y el timo) que purifican los fluidos corporales y producen glóbulos blancos que combaten las infecciones. Los linfomas también pueden ocurrir en órganos específicos, como el estómago, las mamas o el cerebro. Estos linfomas se denominan linfomas extraganglionares. Tradicionalmente se dividen en linfoma de Hodgkin (que representa aproximadamente el 10% de todos los linfomas) y linfoma no Hodgkin (90%) (*Cancer Classification-SEER Training*, n.d.; Shankland *et al.*, 2012).
- f. Tipos mixtos: Consisten en la combinación de múltiples tipos de células neoplásicas. Algunos ejemplos son: carcinosarcoma, carcinoma adenoescamoso, tumor mesodérmico mixto, teratocarcinoma, fibroadenoma, adenoma ceruminoso (*Cancer Classification-SEER Training*, n.d.).

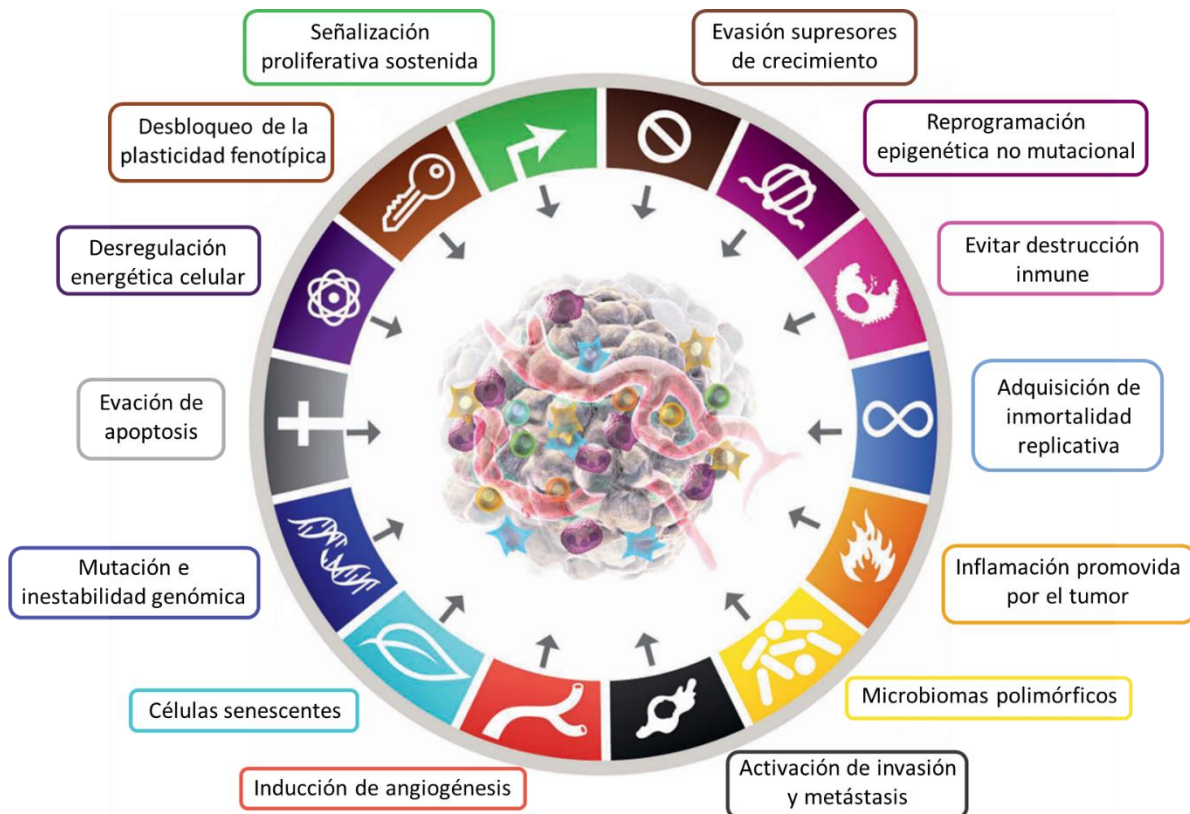
#### **1.4. Las características del cáncer**

Hanahan y Weinberg definieron el cáncer con 6 características principales, a saber:

- a.- Autosuficiencia en señales de crecimiento,
- b.- Insensibilidad a las señales anti-crecimiento,
- c.- Evasión de la apoptosis,
- d.- Potencial de replicación ilimitada,
- e.- Desarrollo de angiogénesis,
- f.- Invasión de tejidos y metástasis.

Una década después, los mismos autores agregaron cuatro características más:

- g.- Reprogramación de la energía celular,
- h.- Evasión de la respuesta inmune,
- i.- Inestabilidad genómica
- j.- Promoción de los procesos inflamatorios.



**Figura 1.3.** Características principales del cáncer (Adaptado de Hanahan, 2022).

Las mismas están representadas en la **Figura 1.3**. Fouad y Aenei, realizaron una categorización complementaria “Las células adquieren características evolutivas ventajosas que complementariamente promueven la transformación de células fenotípicamente normales en células malignas, y promueve la progresión de células malignas mientras se sacrifica el tejido huésped” (Fouad & Aenei, 2017).

Las características biológicas que distinguen a las células cancerosas de las células normales y que adquieren durante su desarrollo son la capacidad del cáncer para generar señales mitogénicas, causando una alteración no programada dentro del

genoma, resistir las señales inhibitoras del crecimiento, la alteración no programada dentro del genoma, evadiendo la apoptosis, el angiogénesis, la invasión de tejidos y el metástasis (Ok *et al.*, 2018).

Los ciclos celulares de las células normales se han regulado por las siguientes fases: fase de reposo ( $G_0$ ), fase de crecimiento ( $G_1$ , S,  $G_2$ ) y fase mitótica (M) con puntos de control y un proceso regulado de muerte celular programada (apoptosis). El punto de control  $G_1/S$  funciona como punto de restricción y es un punto de progresión irreversible hacia la división celular. Las células normalmente procederán a la proliferación en  $G_1$  temprano-medio, excepto que se inhiba por señales inhibitorias o privación del factor de crecimiento. Las células cancerosas tienen la capacidad de iniciar vías de transducción de señales que conducen a la mitosis (Ok *et al.*, 2018).

Los factores de crecimiento formados por polipéptidos son cruciales para la homeostasis tisular y son los principales reguladores de los pasos de progresión tumoral, como la expansión clonal, la angiogénesis, la invasión a través de las barreras tisulares, la colonización de nichos distantes, así como mutaciones oncogénicas. La mayoría de los factores de crecimiento mitógenos (GF) solubles son sintetizados por un tipo de célula para promover la proliferación de otro. Una vez que las células cancerosas adquieren la capacidad de sintetizar los GF a los que responden, crean un ciclo de señalización de retroalimentación positiva, a menudo denominado estimulación autocrina. La síntesis de un GF por una célula cancerosa permite que otras células en el tejido eliminen su dependencia de los GF. Además, las mutaciones asociadas con el cáncer en las vías de señalización de GF a menudo alivian parcialmente la dependencia de los tumores de los GF (Hanahan & Weinberg, 2000; Witsch *et al.*, 2010).

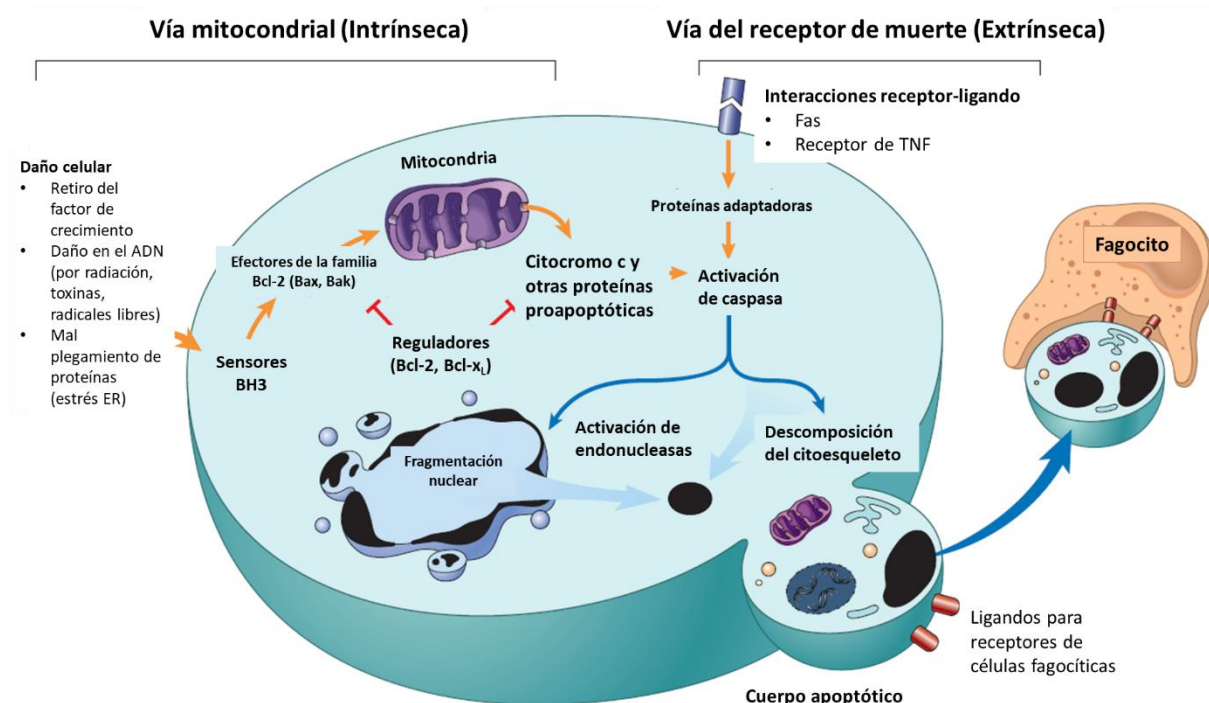
Las vías de señalización implicadas en la transducción de estímulos mitógenos se activan frecuentemente de forma constitutiva en las células tumorales, debido a sobreexpresión o mutación de moléculas transductores de señales. El estado mutado de los genes que codifican los factores de crecimiento y a sus receptores se define como

oncogén y gen supresor de tumores (Compagni & Christofori, 2000). La mutación y la transformación de proto-oncogenes que codifican proteínas en las vías de conducción celular en oncogenes interrumpen el mecanismo de control del crecimiento celular y provocan la proliferación y el crecimiento descontrolados de las células cancerosas. Los oncogenes tienen la capacidad de iniciar y mantener la transformación celular, además de interrumpir el funcionamiento normal del ciclo celular y desencadenar la apoptosis de aquellas células que no proliferan adecuadamente. La familia de genes del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un ejemplo de proto-oncogenes (Woda *et al.*, 2017). A nivel del receptor, la sobreexpresión de moléculas puede permitir que las células cancerosas se vuelvan hipersensibles a los GF (Witsch *et al.*, 2010). La familia de receptores transmembrana, incluido el EGFR, normalmente regula actividades celulares como la supervivencia, la adhesión, la proliferación celular, la diferenciación y la migración. Las mutaciones que pueden ocurrir aquí pueden conducir a una activación sostenida y promover la carcinogénesis (Woda *et al.*, 2017).

Las señales de anti-crecimiento pueden bloquear la proliferación por dos mecanismos diferentes: primero; las células pueden ser forzadas a salir del ciclo de proliferación activa al estado  $G_0$  y, en segundo lugar; se puede alentar a las células a que renuncien permanentemente a su potencial proliferativo. Las células cancerosas en desarrollo deben evitar estas señales anti-crecimiento en su formación. Muchas de las vías que permiten que las células normales respondan a las señales contra el crecimiento están asociadas con el reloj biológico del ciclo celular, específicamente los componentes que gobiernan la transición de la célula desde la fase  $G_1$  del ciclo de crecimiento. Las funciones biológicas de la proteína supresora de tumores de retinoblastoma (pRb) incluyen la supresión de tumores, la regulación del ciclo celular y la apoptosis. A nivel molecular, todas las señales anti-proliferativas están mediadas por pRb y sus dos parientes, p107 y p130. pRb es un regulador clave para el inicio irreversible de la división celular. La inactivación de pRb por fosforilación cruza la barrera de



transición de la fase G<sub>1</sub> a la fase S y la cual posiciona a la célula en la fase de síntesis de ADN (Akdeniz, 2014; Hanahan & Weinberg, 2000; Ok *et al.*, 2018).



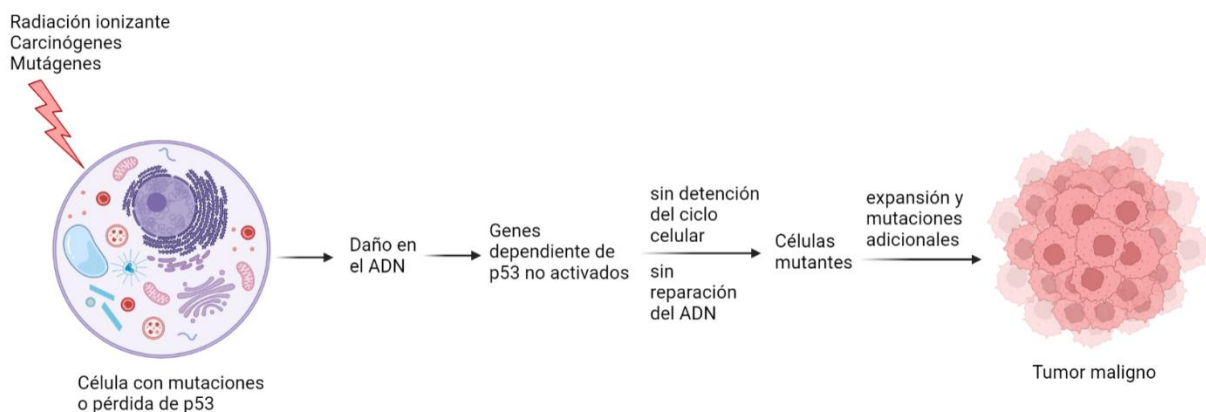
**Figura 1.4.** Mecanismos de apoptosis (Adaptado de Kumar *et al.*, 2017).

La apoptosis es responsable de mantener el equilibrio de producción y destrucción a lo largo del ciclo de vida de la célula. Hay dos vías principales en la apoptosis: la vía mitocondrial (intrínseca) desencadenada por estrés metabólico e hipóxico, y la vía del receptor de muerte (extrínseca) desencadenada por estímulos externos como Fas-L y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) conocido como ligandos de muerte celular. Mientras que en la vía intrínseca participan las situaciones patológicas y fisiológicas como el estrés del retículo endoplásmico, el daño del ADN y la abstinencia del factor de crecimiento, en la vía extrínseca las interacciones receptor-ligando en la membrana celular desencadenan la activación de la caspasa que conduce a la apoptosis (**Figura 1.4**) (Grilo & Mantalaris, 2019).

Los genes que suprimen y estabilizan los genes que activan el crecimiento y la división de la célula se denominan genes supresores de tumores y se ha demostrado

que la muerte celular programada estaba controlada por algunos oncogenes y genes supresores de tumores como por ejemplo p-53, bcl-2 y bcl-XL.

El gen supresor de tumores que codifica p53, TP53, es el gen mutado con mayor frecuencia en el cáncer humano. Más del 70% de los tumores malignos poseen una mutación p53, incluidos muchos de los tumores más comunes (por ej.; cáncer de mama, colon y pulmón). Al igual que pRb, p53 también muestra efectos antiproliferativos y su regulación de la apoptosis es igualmente crucial. Este gen impide la transición de la fase G<sub>1</sub> a la S en el ciclo celular. La proteína p53 dañada permite que el ciclo celular entre en la fase S sin que se repare el ADN. El daño del ADN no induce la detención del ciclo celular ni la reparación del ADN, y las células genéticamente dañadas proliferan y eventualmente causan la formación de tumores malignos (**Figura 1.5**) (Kumar *et al.*, 2017).



**Figura 1.5.** El papel del gen p53 en la formación de tumores malignos (Adaptado de Robbins Basic Pathology, 10<sup>a</sup> edición, 2017).

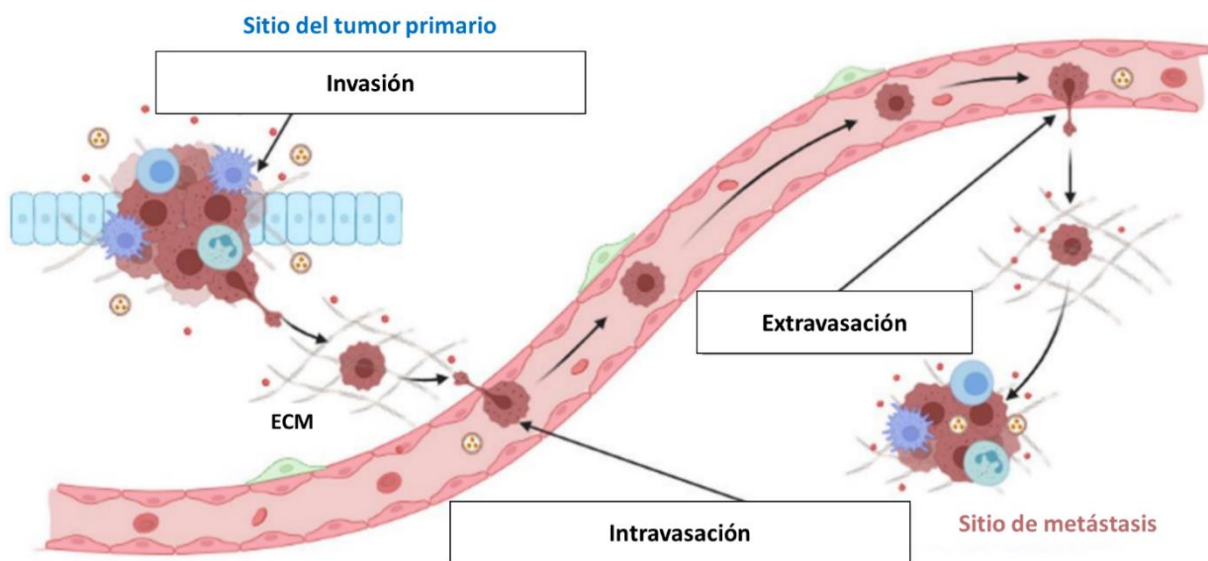
Las proteínas de la familia Bcl-2 son el factor más importante en la activación de las mitocondrias. Desempeña un papel central en la regulación de la muerte celular y tiene la capacidad de regular varios mecanismos de muerte celular, incluida la apoptosis, la necrosis y la autofagia. Se dividen en 3 subfamilias; proteínas anti-apoptóticas (ej; Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1), BH3 únicamente (pro-apoptóticas) (ej; BIK, BIM, PUMA, NOXA) y formadoras de poros o verdugos (pro-apoptóticas) (BAX, BAK, BOK). La

proporción de miembros de la subfamilia pro-apoptótica y anti-apoptótica presente en una célula puede alterarse mediante una serie de vías de señalización y transmitir de manera efectiva información sobre el estrés celular, como los nutrientes disponibles, el daño del ADN y el procesamiento de proteínas (Grilo & Mantalaris, 2019; Warren *et al.*, 2019; Yip & Reed, 2008).

La metástasis es el desarrollo de implantes secundarios que no son continuos con el tumor primario y están ubicados en tejidos distantes del cuerpo donde, al menos inicialmente, los nutrientes y el espacio no son limitantes. La metástasis es el indicador más definitivo de que una neoplasia es maligna, pero no todos los tumores malignos son capaces de desarrollar metástasis. Las metástasis son la causa del 90% de las muertes por cáncer en humanos (Hanahan & Weinberg, 2000).

La metástasis incluye tres etapas principales que pueden ser descritas por los siguientes mecanismos: invasión/intravasación, extravasación y angiogénesis. Antes de la metástasis, las células tumorales deben formar una matriz extracelular (ECM) y ganar movilidad celular a través del proceso de transición epitelial-mesenquimatosa (EMT). Las células que han adquirido propiedades mesenquimales facilitan la migración con pérdida de adherinas (E-cadherinas) y polaridad celular y permiten que las células tumorales participen en la circulación sanguínea y linfática como células tumorales (CTC) circulando por el endotelio vascular. Este proceso se llama intravasación. Entonces, cuando las CTC se adhieren al tejido nuevo y abandonan la circulación cruzando la pared del vaso, se denomina extravasación. Eventualmente, cuando ingresa a un área u órgano y comienza a proliferar nuevamente, se convierte en un nuevo tumor llamado "colonización metastásica" (**Figura 1.6**) (*Cancer Research Product Guide Edition 3*, n.d.; Zhang *et al.*, 2022).

Las metaloproteinasas de matriz (MMP) son una familia de endoproteinasas dependientes de zinc cuya actividad enzimática está dirigida contra los componentes de ECM. Las MMP son responsables de la degradación de la membrana basal. Por lo tanto, la *up*-regulación de las MMP conduce a una mayor invasión de células cancerosas. (*Cancer Research Product Guide Edition 3*, n.d.; Kleiner & Stetler-Stevenson, 1999).

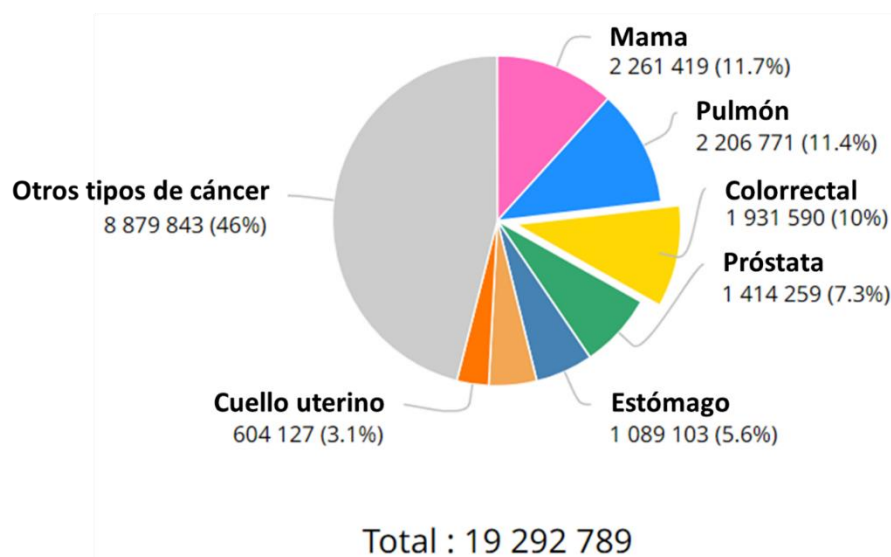


**Figura 1.6.** Las etapas principales en la metástasis (Adaptado de Zhang *et al.*, 2022).

## 1.5. Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR), definido como el crecimiento tumoral en el colon, el recto y el apéndice, también se conoce como cáncer de colon o cáncer de intestino grueso (Sameer, 2013). El CCR es el tercer tipo de cáncer más común en todo el mundo después de los cánceres de mama y pulmón. Según el Observatorio Global del Cáncer, en 2020, 1.931.590 personas fueron diagnosticadas con cáncer de colon (**Figura 1.7**) (*Global Cancer Observatory*, 2022). El cáncer colorrectal es el cuarto cáncer más común en los hombres y el tercero más común en las mujeres, pero los hombres se ven afectados un poco más a menudo que las mujeres (Center *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2017). En Argentina (año 2020), la incidencia del cáncer colorrectal es importante observándose 15.895 nuevos casos para ambos sexos que representan el 12,1% del total de nuevos

casos, ubicándose en segundo lugar de incidencia luego del cáncer de mama (16,8%) (*Estadísticas - Incidencia*, n.d.). Los factores dietéticos más asociados con el cáncer colorrectal son una baja ingesta de fibra vegetal no absorbible y una alta ingesta de carbohidratos refinados y grasas (Kumar *et al.*, 2017). El CCR esporádico constituye alrededor del 75% de los pacientes, sin evidencia aparente de haber heredado el trastorno; mientras que los pacientes con antecedentes familiares de CCR constituyen el 25% restante, lo que sugiere una contribución genética, exposiciones comunes entre los miembros de la familia o una combinación de ambos (Sameer, 2013).

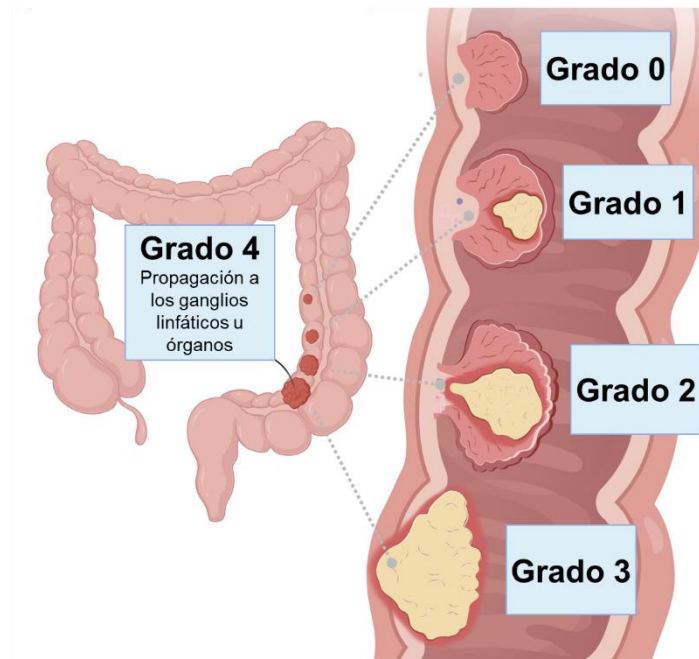


**Figura 1.7.** Número estimado de casos nuevos en 2020 en todo el mundo, ambos sexos, todas las edades (Observatorio Global del Cáncer, 2020).

El cáncer colorrectal se hereda en solo el 5% de los casos. La vulnerabilidad genética al cáncer de colon se ha atribuido a síndromes de poliposis o de no poliposis. El principal síndrome de poliposis es la poliposis adenomatosa familiar (FAP), que está asociada con la mutación o pérdida del gen FAP (también llamado poliposis coli adenomatosa (APC)). El síndrome de cáncer colorrectal hereditario sin poliposis (a menudo denominado HNPCC), también conocido como síndrome de Lynch, se asocia con mutaciones de la línea germinal en al menos cinco genes reparadores del ADN como MLH1, MSH2, MSH6, y APC (Labianca *et al.*, 2010).

Los tumores colorrectales se presentan con un amplio espectro de neoplasias, que van desde crecimientos benignos hasta cáncer invasivo, y son predominantemente tumores derivados del epitelio (es decir, adenomas o adenocarcinomas). Los patólogos han clasificado las lesiones en tres grupos: pólipos no neoplásicos, pólipos neoplásicos (pólipos adenomatosos, adenomas) y cánceres (Sameer, 2013).

Se están utilizando dos sistemas de clasificación para la estadificación del Dukes más antiguo o la clasificación Astler-Coller Modificada (MAC) y el sistema TNM (Tumores/Nodos/Metástasis). Las decisiones de tratamiento generalmente se toman en referencia al esquema de clasificación de Dukes y las etapas deben definirse preferiblemente por la clasificación TNM. La clasificación de Dukes, propuesta por primera vez por Dukes en 1932 (Dukes, 1932), identifica las etapas como: (A) Tumor confinado a la pared intestinal; (B) Tumor que invade a través de la pared intestinal; (C) Con afectación de ganglio(s) linfático(s); y (D) con metástasis a distancia. La clasificación TNM presenta una descripción más precisa e independiente de los tumores primarios y su diseminación (Labianca *et al.*, 2010; Sameer, 2013). En la clasificación TNM, el cáncer de colon invasivo se clasifica del estadio I al IV (**Figura 1.8**). El estadio I de la clasificación TNM corresponde a las lesiones A o B1 de Dukes, el estadio II corresponde a la lesión B2 de Dukes, el estadio III corresponde a la lesión C de Dukes y el estadio IV corresponde a la lesión D de Dukes. El estadio patológico, clasificado por cualquiera de los esquemas, se correlaciona altamente con el pronóstico del cáncer (Cappell, 2008).



**Figura 1.8.** Grados del cáncer de colon

(Adaptado de <https://www.chemoexperts.com/colon-cancer.html>)

La mayoría de los CCR se desarrollan a partir de lesiones preneoplásicas benignas: los pólipos adenomatosos o adenomas. Vogelstein describe la progresión de un adenoma benigno a un carcinoma maligno a través de una serie de etapas histológicas bien definidas (Vogelstein *et al.*, 1988). Esto se conoce como el modelo de secuencia de adenoma-carcinoma. Este modelo describe una acumulación de eventos genéticos, cada uno de los cuales confiere una ventaja de crecimiento selectivo a una célula colorectal afectada. Estos cambios genéticos finalmente dan como resultado un crecimiento celular desinhibido, proliferación y desarrollo de tumores clonales. Se ha demostrado que el efecto aditivo y acumulativo de estas mutaciones somáticas es la causa del cáncer colorrectal esporádico. Las características más destacadas del modelo de carcinogénesis del CCR de Vogelstein para cánceres esporádicos se pueden extraer de manera concluyente como:

- 1) La activación mutacional de oncogenes y/o la inactivación de genes supresores de tumores da como resultado carcinogénesis colorrectal;

- 2) Al menos cuatro o cinco genes de una célula deben sufrir mutaciones somáticas para transformarse malignamente;
- 3) Las características del tumor dependen de la acumulación de múltiples mutaciones genéticas más que de la secuencia de mutaciones de los genes implicados;
- 4) Las características del proceso tumorigénico del cáncer colorrectal también se aplican a otros tumores sólidos, como el cáncer de mama, estómago y páncreas (Sameer, 2013).

La combinación de eventos moleculares que conducen al adenocarcinoma de colon incluye anomalías genéticas y epigenéticas (Kumar *et al.*, 2017). Numerosos genes identificados en la patogenia del CCR como MLH1, MLH3, MSH2, MSH6, AXIN, APC, TP53,  $\beta$ -catenina, E-cadherina, (TGF)- $\beta$ , KRAS (Koelzer *et al.*, 2013). La secuencia clásica de carcinoma de adenoma, que representa hasta el 80% de los tumores de colon esporádicos, normalmente implica la mutación del supresor tumoral APC en las primeras etapas del proceso neoplásico. APC es un regulador negativo clave de la  $\beta$ -catenina (Kumar *et al.*, 2017). La  $\beta$ -catenina se identificó originalmente como un componente intracelular esencial de los complejos de adhesión de cadherina. Sin embargo, se sabe que también representa un componente muy importante de la vía de transducción de señales Wntless/Wnt. En ausencia de la señal Wnt extracelular, la  $\beta$ -catenina libre se une y se fosforila en el llamado complejo de destrucción, que consta de la proteína de andamiaje axina y conductina, la glucógeno sintasa quinasa 3  $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) y APC. La fosforilación de  $\beta$ -catenina por este complejo la destina a la ubiquitinación y posterior degradación proteolítica. (Fodde, 2002). Además, el tratamiento de varias líneas celulares de cáncer con el inhibidor del proteasoma ALLN conduce a la acumulación de  $\beta$ -catenina ubiquitinada (Morin, 1999).

La señalización de Wnt se clasifica en dos vías diferentes: las vías canónica y no canónica. APC puede inhibir la iniciación y el desarrollo de tumores colorrectales, independientemente de la señalización canónica de Wnt (Aghabozorgi *et al.*, 2019). Con



la falla de la función APC, la  $\beta$ -catenina se acumula y se traslada al núcleo, donde desencadena la transcripción de genes, como los que codifican MYC y ciclina D1, que estimulan la proliferación. A esto le siguen mutaciones adicionales, incluidas mutaciones activadoras en KRAS, que también promueven el crecimiento y previenen la apoptosis. La mutación de KRAS es un evento tardío y está respaldada por los estudios que indican que las mutaciones están presentes en menos del 10% de los adenomas de menos de 1 cm de diámetro, el 50% de los adenomas de más de 1 cm de diámetro y el 50% de los adenocarcinomas invasivos (Kumar *et al.*, 2017).

Las mutaciones en otros genes supresores de tumores como SMAD2, SMAD4 y TP53 contribuyen a la progresión neoplásica. SMAD2 y SMAD4 son los efectores codificantes de la señalización de TGF- $\beta$  que regulan el crecimiento y la diferenciación celular. En el caso de una alteración de la señalización de TGF- $\beta$ , se produce un crecimiento celular desenfrenado (Kumar *et al.*, 2017; Sameer, 2013). TP53 está mutado en el 70% al 80% de los cánceres de colon, pero se ve afectado con poca frecuencia en los adenomas, lo que sugiere que las mutaciones de TP53 también ocurren en etapas tardías de la progresión del tumor. La pérdida de la función de los genes supresores de tumores a menudo es causada por deleciones cromosómicas, por lo que esto destaca la inestabilidad cromosómica como un sello distintivo de la vía APC/ $\beta$ -catenina (Kumar *et al.*, 2017).

## **1.6. Agentes antineoplásicos**

Los agentes antineoplásicos representan una amplia clase de medicamentos en la terapia contra el cáncer. Los agentes antineoplásicos se clasificaron recientemente como (1) agentes alquilantes, (2) antimetabolitos, (3) antibióticos antitumorales, (4) agentes hormonales, (5) misceláneos, (6) modificadores de la respuesta biológica, (7) anticuerpos monoclonales, (8) inhibidores de proteína quinasa, (9) taxanos, (10) inhibidores de topoisomerasa, (11) alcaloides de la vinca, (12) inhibidores de histona desacetilasa (Antineoplastic Agents, 2012). El mecanismo de acción de los agentes

alquilantes interfiere en la transcripción del ADN en ARN y, por lo tanto, lo que detiene la síntesis de proteínas y desencadena la muerte celular programada (apoptosis) en las células tumorales. Aunque es un mecanismo inespecífico, las células tumorales son especialmente susceptibles a este, debido a su alta tasa de proliferación. Los complejos que contienen platino (cisplatino, carboplatino, oxaliplatino), derivados de la etilenamina y de la metilenamina (altretamina, tiotepa), los sulfonatos de alquilo (busulfán), las nitrosoureas (carmustina, lomustina), los triazenos (dacarbazina, procarbazona, temozolomida), las mostazas nitrogenadas (mecloretamina, ciclofosfamida) están involucrados en los agentes alquilantes (Tew, 2012) o bien producen un efecto similar a estos (como los platinos que forman aductos). Los antimetabolitos actúan compitiendo con los metabolitos normales por el sitio catalítico o regulador de una enzima clave o sustituyendo un metabolito que normalmente se incorpora al ADN o al ARN. Este grupo de fármacos se subdivide en antifolatos (metotrexato, pemetrexed), análogos de purina (azatioprina, cladribina), análogos de pirimidina (capecitabina, fluorouracilo, gemcitabina) (Carlson, 1996). Los antibióticos antitumorales tienen, por su parte, diversos mecanismos de acción, indicaciones diferentes, además de una gama de eficacias y toxicidades distintivas. Los antibióticos que se utilizan actualmente en el tratamiento del cáncer en EE.UU. son (con nombre comercial y año de aprobación): bleomicina (*Blenoxane*, 1973), dactinomicina (*Cosmegen*, 1964), daunorrubicina (*Cerubidine*, 1979), doxorrubicina (*Adriamycin*, 1974), epirubicina (*Ellence*, 1999), idarrubicina (*Idamycin*, 1990), plicamicina (anteriormente conocida como mitramicina, todavía experimental), mitomicina (*Mutamycin*, 2002) y mitoxantrona (*Novantrone*, 1987) (Cytotoxic Antibiotics, 2012). Los agentes hormonales se clasifican en antiandrógenos (abiraterona, nilutamida), antiestrógenos (tamoxifeno, letrozol, raloxifeno), análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (Degarelix, goserelina), hormonas peptídicas (lanreotida, octreotida, pasireotida). Mientras que la aldesleucina (IL-2), la denileucina diftotox y el interferón-gamma están incluidos en los modificadores de la respuesta biológica, el belinostat, el panobinostat, la romidepsina y el vorinostat están implicados en los inhibidores de la histona desacetilasa. La asparaginasa y la

hidroxiurea se muestran como agentes misceláneos comunes. (Antineoplastic Agents, 2012). Se han desarrollado anticuerpos monoclonales (bevacizumab, alemtuzumab, ramucirumab, cetuximab) destinados a inhibir la actividad de enzimas específicas, transportadores de superficie celular o moléculas de señalización (Monoclonal Antibodies, 2012). Los inhibidores de la proteína quinasa (regorafenib, erlotinib, neratinib) se dirigen específicamente a las proteínas quinasas que están alteradas en las células cancerosas y que explican parte de su crecimiento anormal (Protein Kinase Inhibitors, 2012). Los taxanos (cabazitaxel, docetaxel y paclitaxel) se usan comúnmente en el tratamiento de cánceres de cabeza y cuello, ovario, mama, pulmón, esófago, próstata, vejiga y tienen un mecanismo de acción distintivo como inhibidores mitóticos (Taxanes, 2012). Los inhibidores de la topoisomerasa (etopósido, irinotecán, tenipósido, topotecán) inhiben la proliferación celular al prevenir la replicación del ADN, estimular el daño del ADN e inducir la detención del ciclo celular (Liu *et al.*, 2019). El mecanismo principal de los alcaloides vinca (vinblastina, vincristina, vinorelbina) se debe a sus interacciones con la tubulina y la interrupción de la función de los microtúbulos, lo que provoca directamente la detención de la metafase (Moudi *et al.*, 2013).

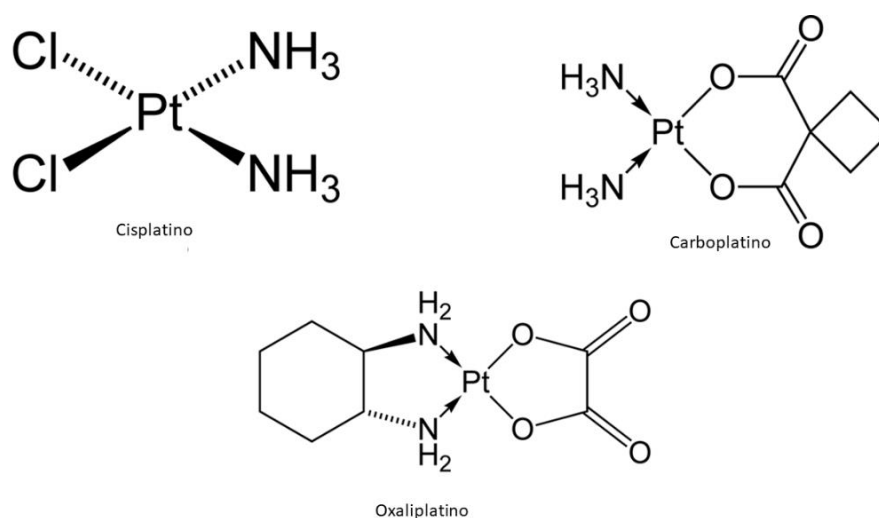
## **1.7. Metalofármacos**

Al observar la historia de los metalofármacos, su uso se encuentra en civilizaciones antiguas. El oro, la plata y el cobre, como otros metales, se habían utilizado con fines terapéuticos en ese momento. La era de la medicina moderna basada en metales comenzó a mediados del siglo XX con el descubrimiento fortuito del fármaco contra el cáncer cisplatino por Rosenberg (Rosenberg *et al.*, 1965). Actualmente, varios tipos de complejos metálicos se están utilizando como metalofármacos con fines tanto terapéuticos como de diagnóstico para diferentes tipos de enfermedades como el cáncer, las cardiovasculares, la diabetes, la inflamación y las enfermedades neurodegenerativas (Wang *et al.*, 2019).

La diversidad biológica y química de los metalofármacos generalmente los hace ventajosos sobre los ligandos orgánicos que los componen. En primer lugar, poseen una gran variedad topológica que incluyen formas cuadrada plana, cuadrada piramidal, tetraédrica, trigonal bipiramidal, formas octaédricas, o incluso geometrías más complejas, dependiendo de los números de coordinación variables de los iones metálicos centrales que dotan a los complejos de una amplia gama de bioactividades en los procesos biológicos. En segundo lugar, los propios iones metálicos poseen características fisicoquímicas únicas pueden dar lugar a la síntesis de diversos complejos. Por ejemplo, los iones metálicos con múltiples estados de oxidación pueden hacer que los complejos presenten un comportamiento redox distintivo y muestren nuevos y diversos mecanismos de acción en los procesos biológicos. Por último, los complejos metálicos de metales luminiscentes pueden ejercer un potencial de diagnóstico con excelentes características ópticas. Distintos metalofármacos son utilizados en técnicas de diagnóstico como agentes de contraste en tomografía de emisión de positrones, resonancia magnética, y tomografía computarizada de emisión de fotones en hospitales de todo el mundo (Wang *et al.*, 2019).

De manera sinérgica, los ligandos de iones metálicos también contribuyen considerablemente a las actividades farmacológicas de los metalofármacos (Wang *et al.*, 2019), debido a que se ha observado en diversos casos intercambio de ligandos, una propiedad que es responsable del modo de acción de los fármacos basados en metales más conocidos aprobados en la clínica, a saber, los complejos anticancerígenos Pt(II) cisplatino, oxaliplatino y carboplatino (**Figura 1.9**). El ion metálico (y los co-ligandos no lábiles) se unen covalentemente a biomoléculas esenciales, por ejemplo, ADN, proteínas, enzimas, etc., lo que puede conducir a la inhibiendo sus funciones, e inducir muerte celular a través de diferentes vías celulares (por ejemplo, apoptosis, necrosis, etc.) (Boros *et al.*, 2020). Por otro lado, los graves efectos secundarios observados por los pacientes sometidos a quimioterapia con metalofármacos que ejercen su principal modo de acción a través de la unión covalente a biomoléculas se deben a la falta de

selectividad de esta unión covalente. La introducción directa de estos medicamentos en el torrente sanguíneo también daña las células no tumorales y causa efectos secundarios graves, como infecciones, anemia, sangrado, alopecia y náuseas (Boros *et al.*, 2020; Ding *et al.*, 2016). Es por lo tanto relevante el desarrollo de vehículos que posibiliten una administración adecuada con el objetivo de reducir los efectos secundarios indeseables.



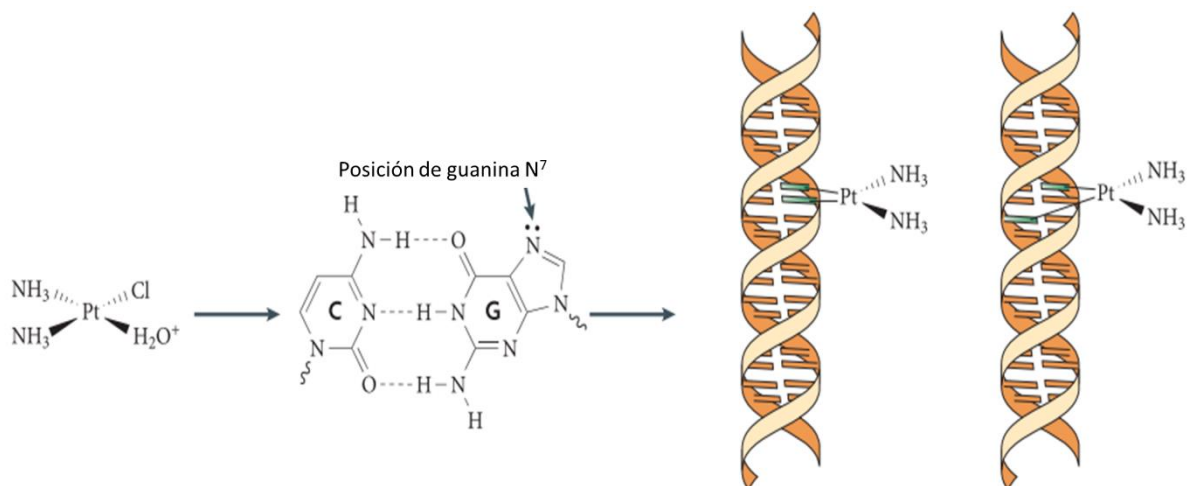
**Figura 1.9.** Estructura química del cisplatino, carboplatino y oxaliplatino.

### 1.7.1. Cisplatino

El cisplatino se descubrió en 1970 y se convirtió en uno de los agentes más utilizados en quimioterapia. El cisplatino [cis-diaminodicloroplatino (II)] es capaz de inhibir el crecimiento celular de *Escherichia coli* (Rosenberg *et al.*, 1969). Posteriormente, la actividad anticancerígena del cisplatino se demostró en un modelo de cáncer *in vitro*, y luego se trató al primer paciente en 1971. En 1978, el cisplatino fue el primer fármaco de platino utilizado en quimioterapia aprobado por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos, EE.UU.) para curar el cáncer de vejiga y testículo (Kelland, 2007b). El cisplatino es uno de los fármacos más utilizados para el tratamiento de diversas neoplasias sólidas, incluidos los cánceres testiculares, de ovario, de pulmón, de cabeza y cuello y de vejiga. Especialmente, el cisplatino demuestra tasas de respuesta

superiores al 90% en el tratamiento de tumores testiculares de células germinales. Su eficacia terapéutica en el cáncer de colon es insuficiente debido a la resistencia al cisplatino en este tipo de células cancerosas (Köberle & Schoch, 2021). Sin embargo, incluso los tumores sensibles pueden volverse resistentes al cisplatino con el tiempo (Fuertes *et al.*, 2003).

Después de que el cisplatino es activado intracelularmente por el agua, los iones de cloro sueltos se intercambian con dos moléculas de agua y pueden interactuar con el ADN. Los átomos N7 en los anillos de imidazol de las bases de adenina y guanina en el ADN son la región más reactiva donde el cisplatino puede unirse covalentemente al ADN (**Figura 1.10**). La actividad antitumoral del cisplatino se basa en la capacidad de unirse al ADN y producir aductos de tres formas: monoaductos, entrecruzamiento intracatenario e intercatenario (Rabik & Dolan, 2007). Los aductos que se cree que inducen la apoptosis son los entrecruzamientos intracatenarios 1,2-d(GpG) y 1,2-d(ApG), que forman el 65% y el 25% de las lesiones (McQuitty, 2014).



**Figura 1.10.** Mecanismo de acción del cisplatino (Adaptado de Kelland, 2007b).

La resistencia y la toxicidad limitante de la dosis de cisplatino son los principales problemas de su uso en la clínica (Amable, 2016). La captación de cisplatino en la célula ocurre mediante dos mecanismos no excluyentes: por difusión pasiva y/o por

proteínas transportadoras ubicadas en la membrana. Los mecanismos de captación y eflujo del cisplatino están correlacionados con las vías metabólicas del cobre que interfieren entre sí y dan lugar a resistencias cruzadas (Wang & Lippard, 2005). Los efectos secundarios limitantes de la dosis que causa el cisplatino son nefrotoxicidad (daño renal) y ototoxicidad (daño en los oídos). La concentración de cisplatino en las células epiteliales del túbulo proximal puede alcanzar cinco veces más concentración de cisplatino que en el suero. Este exceso de cisplatino, que se acumula en el tejido renal, produce nefrotoxicidad (Kuhlmann *et al.*, 1997). Además, el cisplatino afecta el oído interno, lo que resulta en el desarrollo de trastornos auditivos y del equilibrio. Y se pueden observar hipoacusia, tinnitus, otalgia y alteraciones vestibulares (Oun *et al.*, 2018).

### **1.7.2. Carboplatino**

El carboplatino o cis-diamina (1,1-ciclobutano dicarboxilato) platino (II) se considera uno de los mejores fármacos de platino de segunda generación (Kelland, 2007b). El carboplatino presenta menos efectos secundarios que el cisplatino, pero no posee actividad adicional en tumores resistentes y, por lo tanto, está aprobado únicamente para el tratamiento de los mismos tipos de cáncer (Köberle & Schoch, 2021). Debido a su mayor solubilidad en agua, el riesgo de insuficiencia renal se reduce en comparación con el cisplatino (Harrap, 1985). El mecanismo de acción del carboplatino es comparable al de cisplatino; y se ha demostrado que presenta interacción con sitios nucleófilos en el ADN como el cisplatino, y también un mecanismo de resistencia muy similar al del cisplatino (Go & Adjei, 1999; Stewart, 2007). Sin embargo, la mielosupresión está determinada por la toxicidad limitante de la dosis de carboplatino (es decir, una dosis de 400 mg/m<sup>2</sup>), especialmente la trombocitopenia (van der Vijgh, 1991).

### 1.7.3. Oxaliplatino

El oxaliplatino (trans-L-diaminociclohexano oxalato de platino (II)) es el fármaco de platino de tercera generación que se mejoró para proporcionar un mejor perfil de seguridad que los fármacos de platino de primera y segunda generación. Aunque el oxaliplatino se introdujo en la década de 1970, fue aprobado recién en el año 2002 por la *FDA* para tratar el cáncer colorrectal metastásico (Kelland, 2007b). El oxaliplatino contiene un oxalato como grupo saliente y un ligando DACH (diaminociclohexano) que difiere del carboplatino y el cisplatino en sus mecanismos de actividad y resistencia (Ahmad, 2010). A diferencia de la resistencia al cisplatino, los mecanismos de resistencia al oxaliplatino están menos investigados, pero se ha demostrado que la acumulación modificada y el transporte intracelular del fármaco contribuyen a la resistencia de las células tumorales (Kalayda *et al.*, 2017). La glicoproteína P (P-gp) es un transportador de membrana plasmática de la familia ABC e implica el transporte de compuestos hidrofóbicos. P-gp desempeña un papel crucial en la disminución de la acumulación intracelular de complejos antitumorales y se detectó la sobreexpresión de P-gp en células de cáncer colorrectal resistentes al oxaliplatino (Yuan *et al.*, 2016). La neurotoxicidad sensorial periférica (PSN) parece ser la toxicidad limitante de la dosis para el oxaliplatino. Entre el 60% y el 95% de los pacientes tratados con oxaliplatino experimentan algún nivel de neurotoxicidad (Oun *et al.*, 2018). Sin embargo, en los primeros ensayos clínicos con oxaliplatino, la tasa de respuesta del paciente en el tratamiento del cáncer colorrectal fue muy baja con solo un 10%, su quimioterapia combinada con leucovorina y 5-fluorouracilo demostró una mejor tasa de respuesta del 50,7% (de Gramont *et al.*, 2000; Machover *et al.*, 1996).

### 1.7.4. Medicamentos basados en platino de nueva generación

#### 1.7.4.1. Satraplatino

El satraplatino es una molécula de bis-(acetato)-amina dicloro-(ciclohexilamina) platino (IV) (**Figura 1.11.a**); con la abreviatura JM216. JM216 se propone como el



primer compuesto de platino administrable por vía oral que posee un efecto anticancerígeno en líneas de células de platino resistentes y sensibles, como ovario, próstata, pulmón, cuello uterino (Kelland, 2007b; Wheate *et al.*, 2010). La estructura química del satraplatino se compone de dos cloruros como grupos salientes que se une al platino como en el cisplatino (Bhargava & Vaishampayan, 2009). Sin embargo, estructuralmente el satraplatino posee dos acetatos axiales que mejoran su biodisponibilidad oral (Choy *et al.*, 2008) y, además, el ligando portador estable de DACH (diaminociclohexano) proporciona una administración segura y una mayor tolerabilidad. Una vez absorbido el satraplatino, es metabolizado eliminando sus grupos acetato y genera su principal metabolito denominado JM118 cis-amina dicloro (ciclohexilamina) platino (II) (Doshi *et al.*, 2012). Su captación celular se produce por difusión pasiva debido a su elevada lipofilia (Sharp *et al.*, 1995). Una vez que el metabolito JM118 ingresa a la célula, actúa de manera similar al cisplatino uniéndose a las bases de purina del ADN y generando aductos de ADN intracatenario e intercatenario (Choy *et al.*, 2008).

#### 1.7.4.2. Picoplatino

El picoplatino (cis-amminedicloro, 2-metilpiridina, platino (II) (**Figura 1.11.b**); ZD0473, AMD473) con su ligando estable 2-metilpiridina (picolina) supera la resistencia al platino en ciertos tipos de líneas celulares tumorales debido al aumento de los niveles de glutatión dado por el volumen estérico de sus ligandos alrededor del centro de platino (Kelland, 2007a). Por lo tanto, se consideró que uno de los mecanismos de resistencia al platino que mejoraba la desintoxicación celular es a través del aumento de los niveles de glutatión (Raynaud *et al.*, 1997). Holford y colaboradores han informado que el picoplatino eludió la resistencia adquirida al cisplatino en células ováricas humanas que se sabe que tienen niveles elevados de GSH o disminución del transporte de fármacos o reparación elevada del ADN/tolerancia mejorada de los aductos de platino-ADN (Holford *et al.*, 1998). Sharp y colaboradores han investigado la potencia del picoplatino en las cuatro líneas celulares tumorales resistentes al oxaliplatino,

incluidas dos de ovario humano (A2780 y CH1) y dos de colon humano (HCT116 y HT-29). El picoplatino logró superar la resistencia en las cuatro líneas celulares (Sharp *et al.*, 2002).

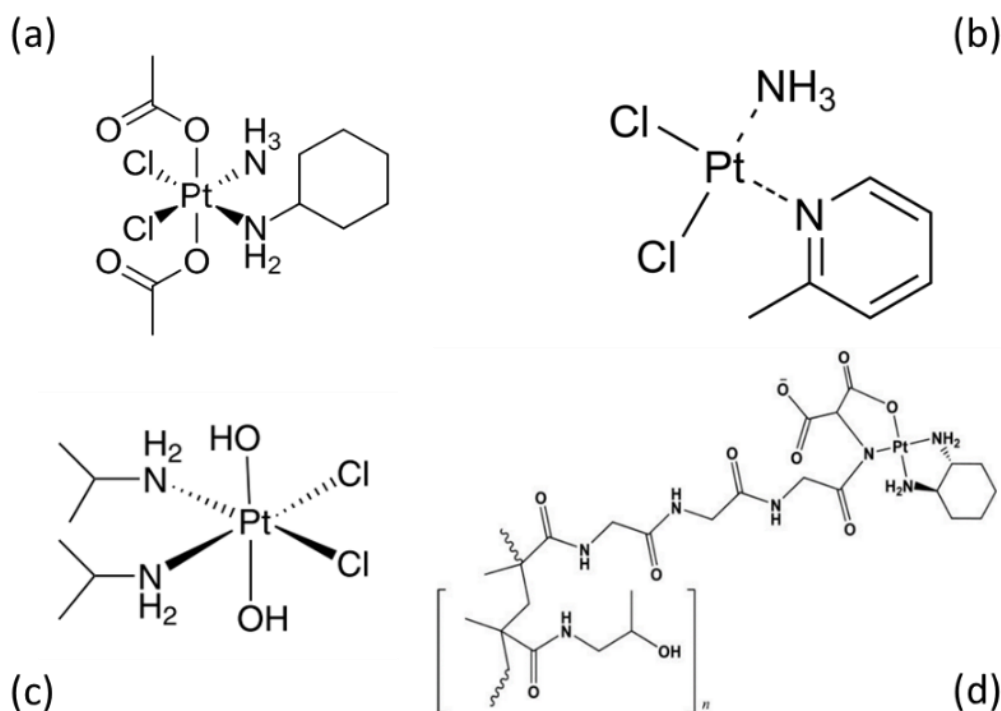
### 1.7.4.3. Iproplatino

Otro complejo notable de platino (IV) que se ha sometido a ensayos clínicos es el iproplatino (también conocido como JM9 y CHIP), *cis, trans, cis*-diclorodihidroxidobis(isopropilamina) platino (IV) (**Figura 1.11.c**). Contiene dos grupos cloruros ecuatoriales que son *cis* el uno al otro. Los estudios de marcado con carbono 14 demostraron que el mecanismo de acción del iproplatino implica la reducción del centro de platino (IV) a platino (II) seguida de la formación de un enlace covalente con el ADN. Un aspecto a destacar es su altísima solubilidad en agua (44,1 mM), lo que permite una formulación y administración más sencilla (Timothy *et al.*, 2016).

### 1.7.4.4. Prolindac™

Prolindac™ o AP5346 poli(HPMA-co-MA-GGG-Ama = Pt-1R,2R-DACH N,O-chelate) (Access Pharmaceuticals, Inc.) está constituido por el ligando DACH activo de oxaliplatino y un copolímero hidrofílico biocompatible N-(2-hidroxipropil) metacrilamida (HPMA) (**Figura 1.11.d**). El platino de ciclohexilamina se une al copolímero a través de un grupo quelante sensible al pH. Debido a la mayor labilidad del quelato O,O' que el quelato N,O de Prolindac™, el ambiente ácido del tumor lleva a una elevación en la tasa de liberación de platino (Boztepe *et al.*, 2021). Wheate y colaboradores han informado que Prolindac™ indujo 20 veces más generación de aductos de platino-ADN a pH= 3,0 en comparación con pH= 7,4 demostrando la respuesta sensitiva a el pH de este tipo de sistemas (Wheate *et al.*, 2010). Además, Prolindac™ mostró mayor efecto citotóxico que el oxaliplatino y el cisplatino en varias líneas celulares de cáncer, incluidas las líneas celulares de colon, ovario, mama, pulmón, próstata y leucemia (Bonetti *et al.*, 2009). Estudios *in vivo* demostraron que Prolindac™ exhibió un nivel

más alto de actividad antitumoral comparado con carboplatino y oxaliplatino en Colo-26, pulmón de Lewis, ovario humano, colorrectal humano. (Thurmond *et al.*, 2006).

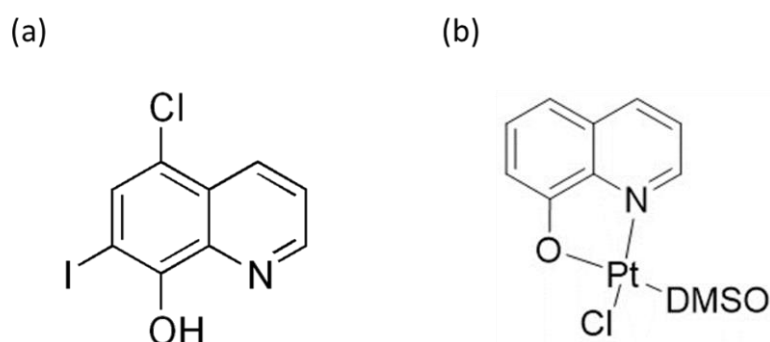


**Figura 1.11.** Estructura química del satraplatino (a), picoplatino (b), iproplatin (c), Prolindac™ (d).

#### 1.7.4.5. 8-oxiquinolinato-platino (II)

El fármaco utilizado como modelo en este trabajo es el 8-oxiquinolinato-platino (II) [PtCl(8-O-quinolina)(DMSO)] (8-QO-Pt) (**Figura 1.12.b**), teniendo un ligando derivado del clioquinol (**Figura 1.12.a**). El clioquinol se ha utilizado para aplicaciones médicas durante muchos años como agente antimicrobiano y, más recientemente, en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Debido a su capacidad para unir cobre y zinc, metales esenciales, se convirtió en un objetivo potencial para el desarrollo de fármacos contra el cáncer (Ding *et al.*, 2005). Al actuar como un ionóforo metálico, el clioquinol transporta iones metálicos desde el entorno extracelular hacia la célula y moviliza reservas intracelulares débilmente unidas. Luego dirige el metal al proteasoma, lo que provoca la interrupción de este complejo enzimático (Schimmer, 2011). El

clioquinol también es miembro de una familia de medicamentos llamados hidroxiquinolinas. La característica importante de la hidroxiquinolina es su capacidad de unión a metales debido a la formación de anillos de quelato de cinco miembros con diferentes metales (por ejemplo, Zn o Cu). Se ha informado que los complejos de platino que contienen ligandos de 8-hidroxiquinolina tienen una buena actividad antitumoral contra diferentes líneas celulares de cáncer, incluidas HBL-100 (mama), HeLa (cuello uterino), SW1573 (pulmón de células no pequeñas) y WiDr (colon) y con un perfil citotóxico diferente y mejor que el cisplatino (Santos *et al.*, 2013).



**Figura 1.12.** Estructura química del clioquinol (a) y el 8-QO-Pt (b).

### 1.8. Nanosistemas farmacéuticos

El concepto de nanotecnología fue introducido por primera vez por el físico estadounidense y premio Nobel Richard Feynman en 1959. Feynman presentó una conferencia titulada "There's Plenty of Room at the Bottom" (Feynman, 1960) y describió una visión del uso de máquinas para construir máquinas más pequeñas y a nivel molecular durante la reunión anual de la *American Physical Society*. Después de Feynman, el científico japonés Norio Taniguchi utilizó por primera vez la definición "nanotecnología" en 1974 como; "la nanotecnología consiste principalmente en el procesamiento de separación, consolidación y deformación de materiales por un átomo o una molécula". Actualmente, la nanotecnología es una de las tecnologías más prometedoras del siglo XXI. (Bayda *et al.*, 2019).

La Iniciativa Nacional de Nanotecnología (NNI) en los Estados Unidos define la Nanotecnología como un campo que abarca la ciencia, la ingeniería y la tecnología a nanoescala en campos como la química, la biología, la física, la ciencia de los materiales y la ingeniería, e implica la creación de imágenes, la medición, el modelado y la manipulación de materia entre aproximadamente 1 y 100 nanómetros (*National Nanotechnology Initiative*, n.d.).

La encapsulación de agentes terapéuticos o fármacos en diferentes nanosistemas es muy prometedora en el avance de la nanomedicina y presenta ventajas frente a las metodologías médicas convencionales. Tienen la capacidad de apuntar y entrar en el tejido blanco a nivel molecular y, por lo tanto, no deberían ser peligrosos para el tejido sano y la toxicidad medicinal tiende a disminuir. Proporcionan una mejor absorción que los fármacos poco solubles, por lo que se requiere una dosis más baja para lograr un rendimiento terapéutico equivalente. Además, se reduce la posibilidad de que se produzca resistencia a los medicamentos (Montané *et al.*, 2020). Numerosos trabajos sobre nanosistemas aplicados a la administración de fármacos, como sistemas liposomales (Stathopoulos *et al.*, 2005), NPs lipídicas (Rajpoot & Jain, 2018), poliméricas (Ringsdorf, 1975) y metálicas (Hu & Du, 2020), sistemas micelares (Shahin *et al.*, 2014), y conjugados poliméricos (Rice, 2006) etc. La selección de materiales basados en nanotecnología utilizados para la administración el diagnóstico y el tratamiento del cáncer está influenciada por una variedad de factores como; el tamaño, la biocompatibilidad y la biodegradabilidad del nanosistema, el perfil deseado de atrapamiento, la liberación del fármaco, las características del fármaco atrapado en el nanosistema (estabilidad y solubilidad), así como la toxicidad y antigenicidad del fármaco encapsulado. Las nanopartículas inorgánicas (de oro, plata, óxido de hierro y sílice) se utilizan en bioimágenes, biosensores, administración sostenida de fármacos y terapia de fotoablación debido a sus propiedades particulares, como la resonancia de plasmones superficiales (SPR). Ser no biodegradable, mostrar alta toxicidad y requerimiento de recubrimiento aparecen como desventajas, mientras que las nanopartículas inorgánicas

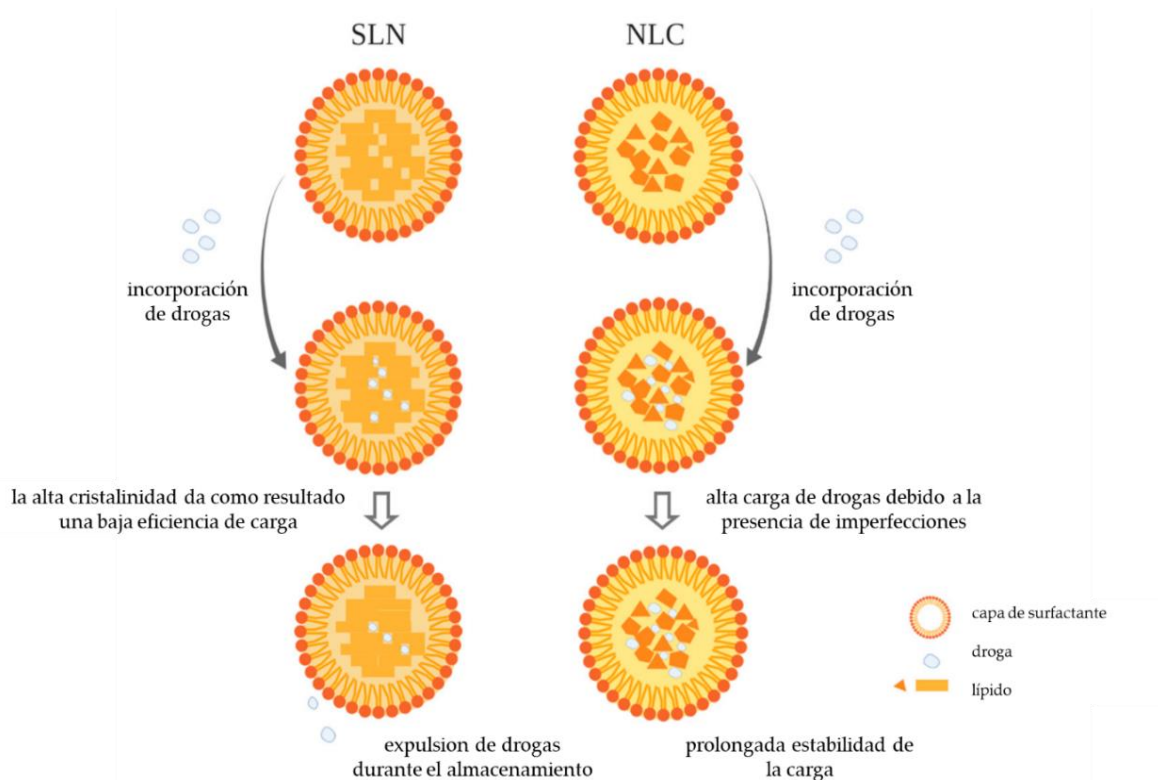
proporcionan una fácil síntesis, fácil funcionalización superficial, buena estabilidad y versatilidad (Kudr *et al.*, 2017; Montané *et al.*, 2020). Las nanopartículas de proteínas muestran baja toxicidad y buenas propiedades mecánicas, pero normalmente se requieren modificaciones químicas de su superficie para producir nanomedicamentos que respondan al estímulo (Montané *et al.*, 2020). Además de esto, tienen una baja capacidad de carga de drogas. Las micelas poliméricas, por su parte, son nanoportadores con núcleo y estructuras de capa que pueden encapsular medicamentos contra el cáncer en su núcleo hidrofóbico. Una limitación de las micelas se puede mostrar como baja estabilidad (Shahin *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2017). Las nanopartículas biopoliméricas se producen a partir de biomateriales que se aíslan de abundantes recursos naturales como el almidón, la celulosa, el quitosano, los glicosaminoglicanos, el ácido hialurónico, el dextrano, etc. Sus dimensiones geométricas, su alta área de superficie específica, sus propiedades mecánicas y de barrera, la falta de toxicidad, biocompatibilidad, y la biodegradabilidad proporcionan ventajas pero muestran resistencia contra la degradación enzimática (Montané *et al.*, 2020). La capacidad de encapsular compuestos hidrófilos e hidrófobos hace que los liposomas sean atractivos. Además, los liposomas son termodinámicamente inestables. El cambio del tamaño de los liposomas con el tiempo produce una incertidumbre del contenido del fármaco, y también la liberación cinética del fármaco es más o menos impredecible. La estabilidad de los liposomas depende de que adquieran un tamaño y una distribución de tamaños constantes durante un período prolongado (Panahi *et al.*, 2017).

### **1.8.1. Nanopartículas lipídicas**

Las nanopartículas sólidas lipídicas (SLN) constituyen un sistema nanotecnológico con mejoras respecto de las desventajas encontradas para nanosistemas lipídicos de generaciones anteriores como las micelas y los liposomas. Dentro de esas desventajas se destacan su inestabilidad termodinámica (particularmente relevante en fluidos biológicos), la escasa reproducibilidad lote a lote, una cinética impredecible y los

problemas en el proceso de esterilización, (Ruiz *et al.*, 2013). Las SLN poseen como ventajas a la formación de componentes biocompatibles y biodegradables, que no requieren el uso de solventes orgánicos en su síntesis, muy bajo costo de producción y fácil escalamiento (Puri *et al.*, 2009). Las SLN constituyen un sistema transportador coloidal hecho de lípidos con un alto punto de fusión ( $pf \geq 40 - 45 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y típicamente varía en tamaño de 50 a 300 nm (Malam *et al.*, 2009). Una formulación de SLN puede contener de 0,1% a 30% de lípidos sólidos, incluidos triglicéridos, ácidos grasos, esteroides, glicéridos parciales y ceras, de 0,5% a 30% de estabilizador de surfactante y 5% de fármaco (Mehnert & Mader, 2001; Puri *et al.*, 2009). El mayor problema potencial de los sistemas de SLN es la dependencia de la estructura cristalina con el tiempo que puede influir en la eficiencia de carga del fármaco, el estado, la localización del fármaco en la nanopartícula, el tiempo de almacenamiento, la viscosidad de la formulación y las propiedades de liberación (Andonova & Peneva, 2018; Haider *et al.*, 2020). Después de la preparación de SLN, se producen modificaciones energéticas en las nanopartículas que reducen la energía libre a un valor mínimo y, en consecuencia, obtienen una estructura cristalina estable determinada por las condiciones ambientales fisicoquímicas durante el almacenamiento. Esta cristalización podría provocar la expulsión de fármacos de las partículas y consecuentemente puede implicar una disminución de la eficiencia terapéutica (Pardeike *et al.*, 2009) (**Figura 1.13**).

A finales de la década de los años 90, los vehículos lipídicos nanoestructurados (NLC) son a veces llamados SLN de segunda generación y se desarrollaron para superar algunos inconvenientes de SLN. Las NLC proporcionan una mayor capacidad y estabilidad de carga de fármacos y evitan la fuga de fármacos descrita anteriormente (Li *et al.*, 2017). La composición de NLC es un lípido sólido, lípido líquido a temperatura ambiente (esto es, un aceite) y surfactante disperso en una solución acuosa (Haider *et al.*, 2020). La proporción de lípido sólido a lípido líquido puede ser de 70:30 hasta una proporción de 99.1:0.1 (Pardeike *et al.*, 2009). La variación en los mismos le otorgará características distintivas a la nanoformulación generada.

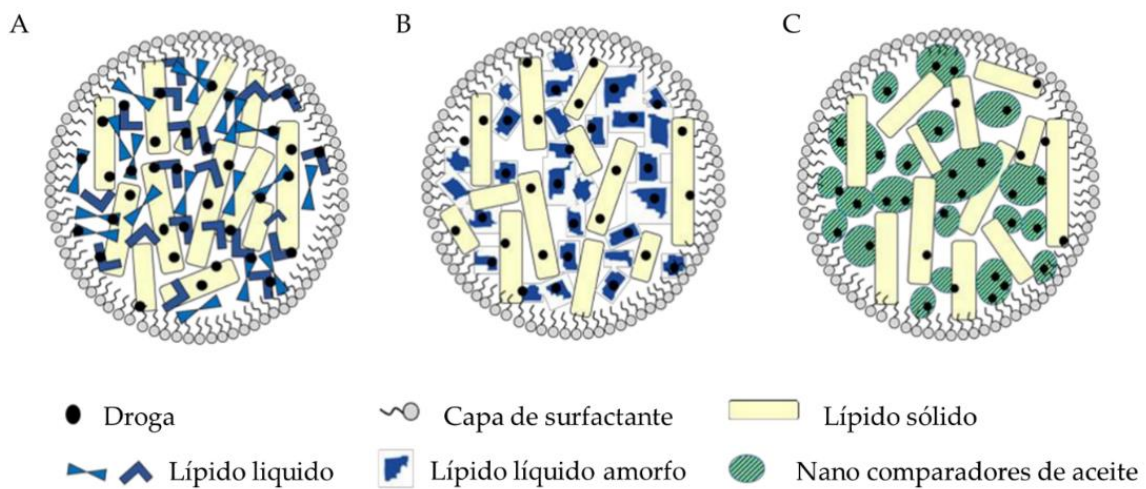


**Figura 1.13.** Diferencia entre las eficiencias de carga SLN y NLC (Adaptado de Borges *et al.*, 2020).

Las NLC se clasifican en tres grupos según la estructura de la matriz lipídica: NLC imperfecto, NLC amorfo y NLC múltiples (**Figura 1.14**). Los NLC imperfectos están constituida por la mezcla de diferentes lípidos que provocan imperfecciones en el cristal que proporcionan una mayor incorporación de la molécula del fármaco soluble en lípidos, mejorando así la encapsulación de la fármaco y evitando su expulsión. Los NLC amorfos son un estado no cristalino de la matriz amorfa que se compone de una mezcla de lípidos particulares como el miristato de isopropilo con el lípido sólido. El fármaco se distribuye uniformemente en la matriz y esta estructura garantiza mantener la molécula encapsulada evitando así la fuga de esta. Por último, los NLC múltiples son portadoras de aceite en grasa en agua (A/G/A) que involucran una mayor cantidad de nano compartimentos de aceite en la matriz sólida. La capacidad de carga del fármaco aumenta porque el fármaco es más soluble en lípidos líquidos que en lípidos sólidos (Khosa *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2017). Los NLC imperfectos y amorfos tienden



a exhibir más flexibilidad para obtener el perfil de liberación sostenida deseado (Müller *et al.*, 2002).



**Figura 1.14.** Los tipos de NLC: imperfecto (A); amorfo (B); y múltiples (C) (Adaptado de Haider *et al.*, 2020).

### 1.8.2. Síntesis y características fisicoquímicas de las NPs lipídicas

La cinética de liberación de fármacos a partir de nanopartículas lipídicas va a depender principalmente de las características fisicoquímicas de la molécula, tipos y cantidades de los componentes de la formulación (lípido sólido, lípido líquido o surfactante) y técnica de preparación (Andonova & Peneva, 2018). Las nanopartículas de lípidos se pueden preparar mediante varios métodos, como ultrasonificación (Boztepe *et al.*, 2021), microemulsión (Gasco & Antonelli, 1993), homogeneización a alta presión (Müller, 2000), , difusión de solventes (Trotta *et al.*, 2003) y desplazamiento de solventes (Schubert & Müller-Goymann, 2003).

El proceso de caracterización de nanopartículas de lípidos es fundamental para producir un sistema de administración de fármacos coloidales eficaz, de calidad, reproducible, y seguro con las propiedades deseadas. La composición típica de SLN y NLC se define por características como el tamaño y la distribución del tamaño de partícula, la morfología de la superficie, la funcionalización y el potencial zeta (*i.e.*, carga

superficial de la nanopartícula), la estructura, según el grado de cristalinidad, la modificación de lípidos, la incorporación del fármaco y la capacidad de carga, la liberación de fármaco, etc. (Andonova & Peneva, 2018).

Las suspensiones de partículas de tamaño nanométrico proporcionan una administración sostenida de fármacos durante períodos prolongados, en algunos casos con una mayor biodisponibilidad en comparación con las suspensiones estándar. Sin embargo, las suspensiones de nanopartículas suelen ser físicamente inestables debido a la aglomeración de partículas y/o la expulsión de fármacos. Las NLC son la versión de estabilidad física mejorada de las SLN. Al mezclar dos lípidos con diferentes puntos de fusión, la red cristalina se vuelve menos ordenada, evitando la expulsión del fármaco, mejorándose el atrapamiento del fármaco y la estabilidad a largo plazo lo que logra una liberación del fármaco más lenta en comparación con las suspensiones estándar. El mecanismo de liberación sostenida del fármaco a partir de matrices lipídicas se puede describir generalmente mediante el mecanismo de libre difusión expresado por las leyes de Fick. El mismo consiste en el que el agua penetra en la matriz, disuelve el fármaco, ocupa los poros generados por la difusión de partículas de fármaco disueltas y crea canales llenos de agua que aumentan la porosidad de la matriz y la movilidad del fármaco lo que permite la difusión continua del fármaco fuera de la forma de dosificación y hacia el medio de liberación (Rosiaux *et al.*, 2014). Sin embargo, se han descrito otros mecanismos de mayor complejidad para la liberación de fármacos de nanopartículas lipídicas, los cuales dependen de la composición lipídica de la matriz, así como de la estructura química del fármaco y de las interacciones fisicoquímicas de los componentes de la matriz y con su medio ambiente.

### **1.8.3. Administración dirigida pasiva y activa**

Las nanopartículas son nanosistemas transportadores preferibles para fármacos quimioterapéuticos debido a que pueden ser captados preferencialmente a las células tumorales, mejoran la eficacia y disminuyen la toxicidad sistémica (Shohdy & Alfaar,

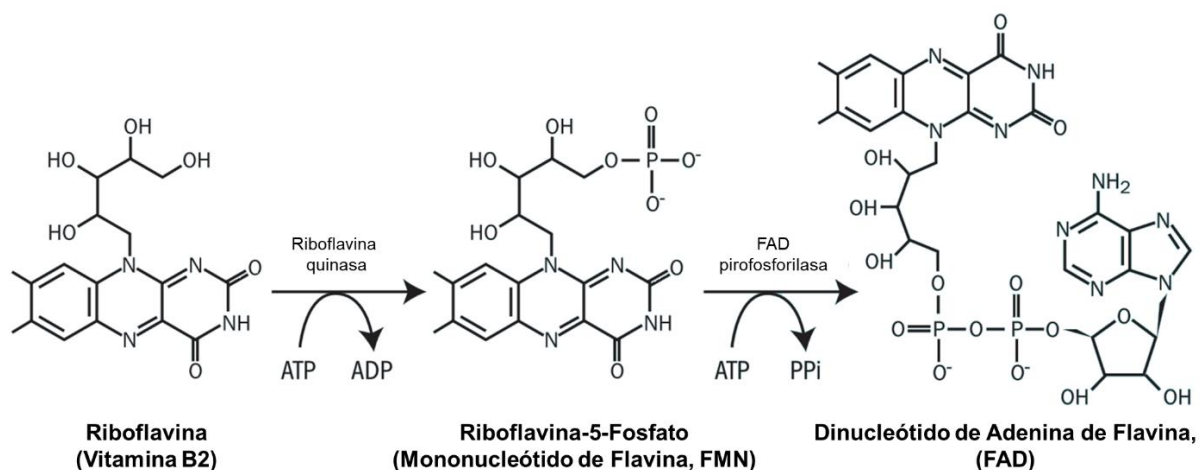
2013). Las nanopartículas poseen una función crucial en el aumento de la concentración del fármaco en las células tumorales al mejorar la acumulación del fármaco a través de mecanismos de dirigidos pasivos y activos, así como al reducir la salida del fármaco de las células tumorales (Muhamad *et al.*, 2018). La captación celular de nanopartículas se produce mediante endocitosis inespecífica, que se basa principalmente en las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas, como la composición de la superficie, la funcionalización y la carga (Delehanty *et al.*, 2010). Dirigido pasivo funciona a través de la difusión simple y el efecto mejorado de permeación y retención (EPR). Dado que los fármacos de quimioterapia máximos son de tamaño pequeño, se acumulan tanto en las células sanas como en las tumorales por difusión y luego desaparecen de la célula tumoral por retrodifusión. Generalmente se considera que las nanopartículas con tamaños comprendidos entre 100 y 500 nm poseen mayor capacidad de ingresar a las células cancerosas mediante una captación selectiva. Además, las nanopartículas pueden evitar la filtración, la eliminación renal, y prolongar los tiempos de residencia en el plasma. Estos hechos les permite acumularse con mayor probabilidad en los tumor a través de EPR (Hughes, 2005; Shohdy & Alfaar, 2013). El sistema linfático deteriorado en los tumores proporciona una retención adicional para que las nanopartículas se descompongan y liberen su contenido. Aunque la mayoría de las nanoterapias aprobadas se basan principalmente en la administración pasiva, el EPR no puede lograr una alta concentración de fármaco en el sitio del tumor (Chauhan *et al.*, 2011).

La administración dirigida activa implica la decoración de la superficie de la nanopartícula con moléculas biológicas (como por ejemplo péptidos, proteínas o ácidos nucleicos) o químicas (como; reactivos de transfección basados en lípidos, fármacos o pequeños nutrientes) dirigidas a receptores específicos de la superficie celular (Delehanty *et al.*, 2010). Esto da como resultado un aumento de la captación celular por endocitosis mediada por receptores y, por lo tanto, una mayor acumulación de fármacos en las células cancerosas (Muhamad *et al.*, 2018). Los receptores en las células

tumorales se expresan de forma única o se sobreexpresan (Shohdy & Alfaar, 2013). Por consiguiente, los receptores tumorales son un objetivo potencial para las capacidades de administración específicas para la terapia del cáncer.

### 1.8.3.1. Riboflavina (RFV)

La RFV (7,8-dimetil-10-ribitil-isoaloxazina), también conocida como vitamina B2, contiene un anillo de isoaloxazina conjugada (flavina) y un carbohidrato de cinco carbonos, el ribitol, es una molécula soluble en agua y está disponible en muchos alimentos como carne, pescado, leche y productos lácteos, ciertas frutas y especialmente verduras de color verde oscuro (Powers, 2003; *Riboflavin. Monograph*, 2008). RFV participa en el metabolismo energético y respiratorio de las células a través de la síntesis de las dos principales coenzimas de flavina (es decir, mononucleótido de flavina y dinucleótido de adenina de flavina). Dentro de las células, la riboflavina quinasa fosforila la riboflavina a FMN y posteriormente la pirofosforilasa FAD la metaboliza a FAD (Tutino *et al.*, 2018) (**Figura 1.15**). Aunque las coenzimas FMN y FAD son estructuralmente diferentes, participan en reacciones similares de fosforilación oxidativa a nivel celular que están involucrados en varias reacciones redox que regulan el metabolismo de carbohidratos, aminoácidos y lípidos (*Riboflavin. Monograph*, 2008).



**Figura 1.15.** Conversión de riboflavina a las formas activas de coenzima (Adaptado de *Riboflavin. Monograph*, 2008).

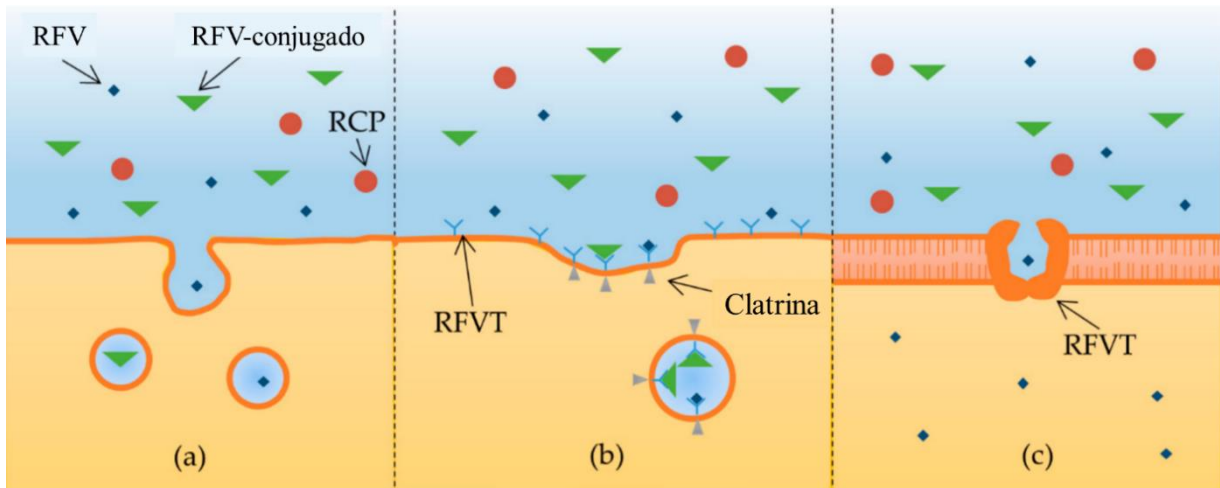
### 1.8.3.2. Transporte de RFV

La proteína transportadora de RFV (RCP) no es un transportador que atraviesa la membrana, sino una proteína soluble que se une a RFV; sin embargo, aún se desconoce el papel exacto en el almacenamiento y transporte de RFV (Darguzyte *et al.*, 2020). Sin embargo, se ha identificado la sobreexpresión de RCP en pacientes con cáncer. Rao y colaboradores han demostrado que los niveles de RCP en suero eran aproximadamente 10 veces más altos en mujeres con cáncer de mama (6,06 ng/mL) en comparación con mujeres sanas (0,70 ng/mL) (Rao *et al.*, 1999). Otro estudio reveló que los niveles séricos de RCP en pacientes con cáncer de mama en ciclo son de 3 a 4 veces más altos que los de las sanas. Incluso parece haber una buena correlación entre el aumento de los niveles de RCP y la progresión de la enfermedad, porque se observó que se encuentran concentraciones de RCP significativamente más elevadas en pacientes con cáncer de mama avanzado con metástasis en comparación con aquellos con enfermedad temprana (Karande *et al.*, 2001). Además del cáncer de mama, se obtuvieron resultados similares de otros tipos de cáncer, como en pacientes con carcinoma hepatocelular (Rao *et al.*, 2006) y estudios *in vitro* e *in vivo* con células de cáncer de próstata (Johnson, 2009). La sobreexpresión de RCP en células malignas lo convierte en un biomarcador potencial para la detección de tumores, el control de la terapia y una herramienta prometedora para los sistemas de administración de fármacos dirigidos (Darguzyte *et al.*, 2020).

Tres miembros específicos de la familia de transportadores de solutos 52 (SLC52A), identificados y denominados transportador de riboflavina 1 (RFVT1; SLC52A1), RFVT2 (SLC52A2) y RFVT3 (SLC52A3). RFVT3 es el responsable de la absorción de RFV en la membrana apical de los enterocitos y se observa que es el que muestra un mayor nivel de expresión en comparación con RFVT1 y RFVT2. Después de la absorción, el RFV se libera en la sangre por RFVT1 y RFVT2 que se encuentran en el dominio de la membrana basolateral (Tutino *et al.*, 2018). Cuando se examinó la distribución tisular de los transportadores, se determinó que RFVT1 se expresaba en

gran medida en la placenta y el intestino delgado, RFVT2 en el cerebro y las glándulas salivales y RFVT3 en los testículos y el intestino delgado (Yonezawa & Inui, 2013).

La riboflavina puede ingresar a la célula de tres maneras: pinocitosis, endocitosis mediada por clatrina y transporte mediado por transportadores (**Figura 1.16**).



**Figura 1.16.** Vías de internalización de RFV: (a) pinocitosis; (b) endocitosis mediada por clatrina; (c) transporte mediado por transportista. RFV; riboflavina, RCP; proteína transportadora de riboflavina, RFVT; transportador de riboflavina (Adaptado de Darguzyte *et al.*, 2020).

La pinocitosis es una forma de endocitosis líquida en la que se pueden transportar moléculas pequeñas (RFV) y grandes (RFV-conjugados) a través de la membrana (**Figura 1.16.a**). RFV se internaliza con la ayuda de RCP y RFVT y se supone que es una combinación de endocitosis mediada por clatrina (**Figura 1.16.b**) y transporte mediado por transportadores (**Figura 1.16.c**) (Darguzyte *et al.*, 2020).

En reportes previos, los transportadores de RFV muestran regulación positiva en varios tipos de tumores. Bartman y colaboradores han observado que RFVT2 y 3 se sobre-expresaron significativamente en el melanoma, RFVT1 y 3 en el cáncer de mama luminal A y RFVT1–3 en el carcinoma de células escamosas (SCC) humano, mientras que se encontraron niveles bajos de expresión de RFVT1–3 en todos los tejidos sanos (Bartmann *et al.*, 2019). Además, la sobreexpresión de RFVT3 se mostró en la carcinoma

de células escamosas de esófago (ESCC) (Jiang *et al.*, 2014; Long *et al.*, 2018) y glioma (Fu *et al.*, 2016). Tutino y colaboradores investigaron la expresión de RFVTs en células de carcinoma de colon. Se encontró que los niveles de expresión de proteínas y genes RFVT3 y RFVT2 eran más altos en DLD-1 y HT-29 en comparación con las células Caco-2. En tejidos tumorales de pacientes con cáncer colorrectal, los niveles de expresión de los genes RFVT3 y RFVT2 aumentaron (Tutino *et al.*, 2018). Teniendo en cuenta estos resultados, RFV podría ser un ligando de sitio-dirección eficaz para la administración de fármacos específicos de tumores. Se han funcionalizado varios sistemas de nano-administración diferentes con RFV, como liposomas (Beztsinna *et al.*, 2016), conjugados de polímeros (Bareford *et al.*, 2013) y telodendrimeros (Guo *et al.*, 2017), nanoportadores poliméricos de PEG (Tsvetkova *et al.*, 2017), para dirigir activamente las células tumorales.

#### **1.8.4. Aplicaciones terapéuticas de los nanosistemas de lípidos cargadas con Pt en el campo del cáncer en fase preclínica**

Raut y colaboradores sintetizaron SLN cargadas con cisplatino mediante la técnica de microemulsión. El diámetro de las nanopartículas fue de 119 nm y la eficiencia de encapsulación fue de aproximadamente el 90%. La liberación del fármaco desde la SLN analizada *in vitro* se mantuvo como se deseaba y alcanzó el 82,6% después de 48 h (Raut *et al.*, 2018). Las nanopartículas lipídicas cargadas con cisplatino con una capacidad de carga de fármaco del 80,8% proporcionaron una absorción significativa del fármaco *in vivo* en células tumorales de melanoma humano A375M, lo que aumentó el efecto antitumoral sin inducir nefrotoxicidad (Guo *et al.*, 2013). La NLC cargada con cisplatino y doxorubicina se ensayó en la quimioterapia del cáncer de mama. Se sintetizaron formulaciones de doxorubicina + cisplatino (D-C-NLC), doxorubicina sola (D-NLC) y cisplatino solo (C-NLC) mediante procedimientos de evaporación de emulsión y solidificación a baja temperatura. Los efectos antitumorales de cada formulación se evaluaron y compararon en el modelo de células MCF-7/ADR de células de cáncer

de mama humanas resistentes a la doxorubicina y murinas portadoras de MCF-7/ADR. Todas las formulaciones tuvieron una alta eficiencia de encapsulación (entre 85 y 90%) y el rango de tamaño de las nanopartículas estuvo entre 100 y 110 nm. D-C-NLC mostró *in vitro* e *in vivo* la mayor actividad anticancerígena en ambos modelos (Di *et al.*, 2016). La encapsulación del compuesto Pt(L)PPh<sub>3</sub> por NLC se realizó mediante la técnica de emulsificación por fusión. El efecto citotóxico de las nanopartículas de NLC cargadas se probó en la línea celular de carcinoma de mama MCF-7. El compuesto de platino mostró una velocidad de liberación lenta de la matriz sólida de NLC. Se sugirió que una liberación sostenida del fármaco es crucial para disminuir la frecuencia de ingesta del fármaco y así disminuir las toxicidades limitantes de la dosis (Xian *et al.*, 2016). La formulación de NLC cargada con oxaliplatino se produjo mediante la técnica de homogeneización en caliente a alta presión y su carácter fisicoquímico se analizó mediante XRD y DSC. El tamaño de la NLC cargada fue de 121 nm con una eficiencia de encapsulación del 67,7%. Aunque se produjo una liberación repentina en las 2 h iniciales de la liberación *in vitro*, luego continuó con una velocidad más lenta durante las 24 h (Qiu *et al.*, 2012).

El EPR es un fenómeno único de los tumores sólidos relacionado con sus diferencias anatómicas y fisiopatológicas con respecto a los tejidos normales. Las nanopartículas se acumulan selectivamente en el tumor a través del efecto EPR. Se llama vehiculización pasiva (Fang *et al.*, 2011). El sistema activo de dirección y administración de fármacos se centra en la interacción entre el fármaco y las biomoléculas específicas que se sobre-expresan en varios tipos de células tumorales y difieren de las sanas (Boztepe *et al.*, 2021). CD44 es una glicoproteína de la membrana celular y también es el receptor del ácido hialurónico (HA). Se ha informado que CD44 muestra sobreexpresión en varios tipos de células cancerosas. Por lo tanto, las nanopartículas recubiertas de HA cargadas con fármacos son más eficaces que el tratamiento con un solo fármaco (Negi *et al.*, 2015; Wang & Guo, 2013). Lei-Ming y colaboradores han investigado la quimioterapia combinada de 5-fluorouracilo y cisplatino mediante la encapsulación de NLC



recubierta de HA para el cáncer gástrico. La formulación de NLC cargada de fármaco combinada se sintetizó mediante el método de emulsificación y solidificación a baja temperatura. Las nanopartículas cargadas mostraron una alta eficiencia de encapsulación (89% para ambos fármacos) con el perfil de liberación sostenida. La actividad anticancerígena contra tumores gástricos en el modelo animal fue superior en comparación con el cisplatino libre (Lei-Ming *et al.*, 2015). El receptor de folato es otro biomarcador que se sobre-expresa en el tejido canceroso que se une al ácido fólico (FA). La quimioterapia combinada de cisplatino con paclitaxel se administró desde NLC decorado con FA para el cáncer de cabeza y cuello. El efecto citotóxico de la NLC cargada decorada con FA contra las células FaDu fue superior en comparación con la NLC cargada no decorada, la NLC con cisplatino solo, la NLC con paclitaxel solo, el cisplatino libre o el paclitaxel libre (Yang *et al.*, 2017). La SLN conjugada con FA que contiene oxaliplatino se probó en células de cáncer colorrectal HT-29. La formulación de SLN se sintetizó mediante el método de difusión de solventes, luego se llevó a cabo la conjugación de FA con SLN. Las nanopartículas mostraron una eficiencia de encapsulación del 49% y se observó una administración sostenida del fármaco *in vitro*, que alcanzó casi el 100% después de 144 h. El efecto citotóxico del SLN cargado fue mayor que el del oxaliplatino libre (Rajpoot & Jain, 2018).

Los liposomas son reservorios similares a esferas hechos de fosfolípidos y/o anfífilos sintéticos integrados con esteroides, como el colesterol, para mejorar la permeabilidad de la membrana (Bulbake *et al.*, 2017). Menos toxicidad, liberación lenta y controlada dependiente del tiempo del fármaco, biocompatibilidad, tasa de eliminación más baja y ser objetivo para tejidos específicos se muestran como sus ventajas. Sin embargo, entre sus limitaciones podemos mencionar su inestabilidad termodinámica que conducen a procesos de agregación y cambio de tamaño, y la carencia de una cinética establecida. Además, una de las principales limitaciones de los liposomas es su eliminación por el sistema fagocítico mononuclear. Cuando los liposomas son mayores de 400 nm, los sistemas fagocíticos mononucleares les permiten eliminarlos (Malam *et al.*,

2009). Por lo tanto, la bicapa de fosfolípidos del liposoma se introduce con polietilenglicol (PEG) para disminuir la opsonización y estabilizar el liposoma y, en consecuencia, mejorar el tiempo de circulación en el torrente sanguíneo. La tecnología de PEGilación proporciona inhibición de la interacción entre las proteínas séricas y la superficie del liposoma, por lo que se reduce su captación por las células fagocíticas mononucleares (Harper *et al.*, 2010; Malam *et al.*, 2009; Voinea & Simionescu, 2002). Los liposomas PEGilados son SPI-077 y Lipoplatin, que también se denominan liposomas STEALTH® (Farooq *et al.*, 2019). Sin embargo, la PEGilación de sistemas de administración de fármacos presentan problemas debido a una respuesta inmune tardía, razón por la cual se han abandonado para la administración de diversos fármacos, como por ejemplo la insulina y factores de crecimiento.

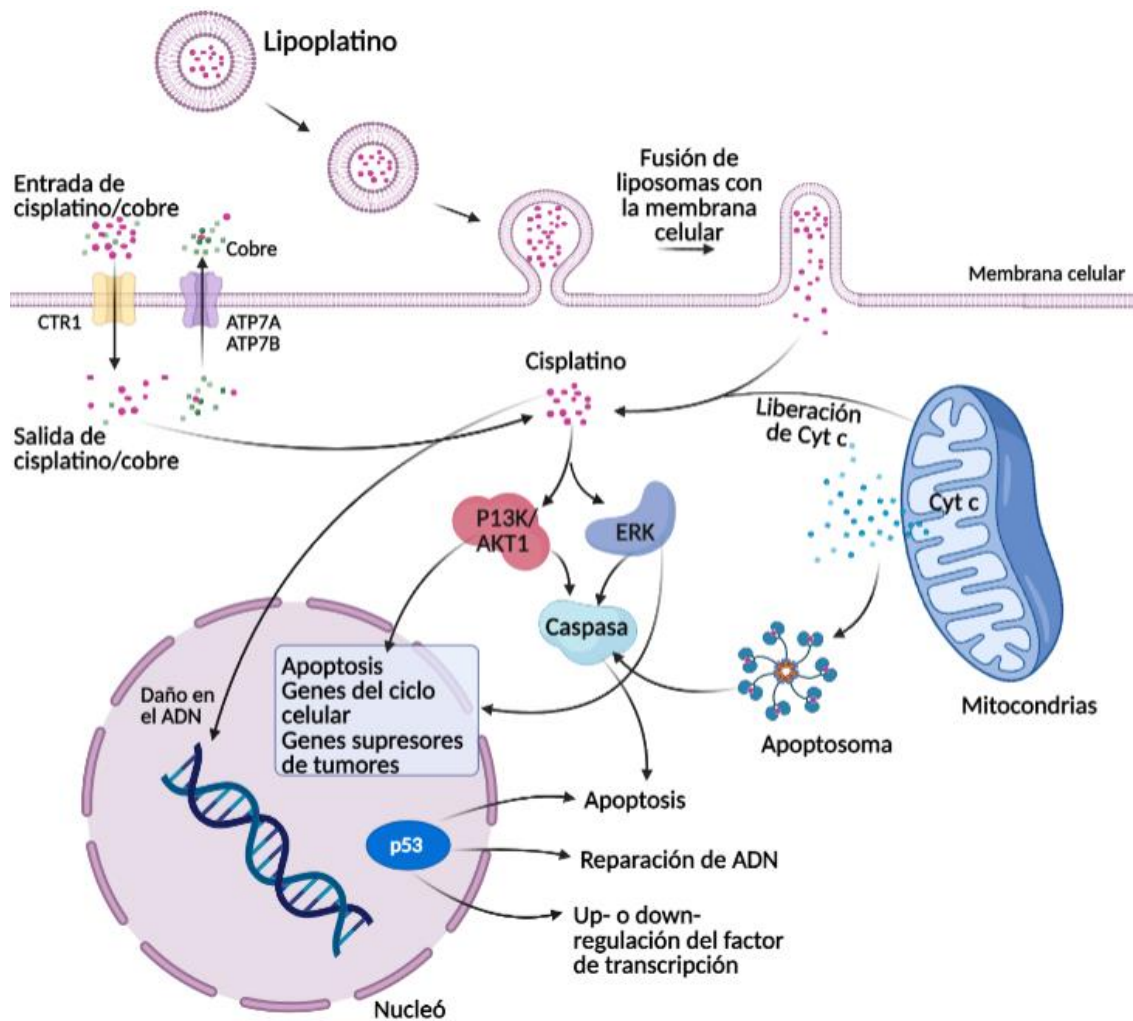
#### **1.8.4.1. SPI-077**

SPI-077 (ALZA *Pharmaceuticals*, CA, EE.UU.) consiste en liposomas cargados con cisplatino y fosfatidilcolina de soja hidrogenada, colesterol y fosfatidiletanolamina modificada con PEG (Farooq *et al.*, 2019). Sin embargo, la capacidad de carga de fármacos de SPI-077 es muy baja (proporción de fármacos a lípidos ~1:70) (Dilruba & Kalayda, 2016). Además de un tiempo de circulación sanguínea más prolongado, el efecto anti-tumoral de SPI-077 fue significativamente mayor que el del cisplatino empelado en la misma dosis y mostró un AUC (el área bajo la curva de concentración plasmática/tiempo) plasmático 60 veces mayor que el del cisplatino en dos modelos de tumores murinos (carcinoma de colon C26 y pulmón de Lewis). Además, SPI-077 exhibió un volumen de distribución elevado de 55 veces y una reducción de cuatro veces en la cantidad de platino administrado a los riñones (Newman *et al.*, 1999).

#### **1.8.4.2. Lipoplatino**

El lipoplatino (*Regulon Inc.*, CA, EE.UU.) es una formulación del cisplatino liposomal de 110 nm de diámetro aprobado por la FDA y que fuera diseñado para

disminuir la toxicidad del cisplatino y presentar un perfil de toxicidad más seguro (Boulikas, 2009; Wheate *et al.*, 2010). En comparación con SPI-077, el lipoplatino difiere según el método de carga, el tipo de lípidos y la proporción de fármaco: lípidos (Boulikas, 2009). El lipoplatino consta de 8,9% de cisplatino y 91,1% de lípidos que son colesterol, fosfatidilcolina de soja (SPC-3), dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG) y metoxi-polietilen glicoldiestearoil fosfatidiletanolamina (mPEG 2000-DSPE) (Monneret, 2011; Stathopoulos & Boulikas, 2012). Mientras que los liposomas no pegilados son absorbidos por los macrófagos hepáticos y destruidos con una vida media en los fluidos corporales de 20 min, los liposomas pegilados de lipoplatino muestran una vida media de 5 días en los fluidos corporales (Boulikas, 2009). El lípido DPPG en la superficie del lipoplatino facilita que el fármaco atraviese la membrana celular más fácilmente que el cisplatino solo al romper la membrana y luego fusionar la nanopartícula con la membrana celular (Boulikas, 2007) (**Figura 1.17**). Una vez que el lipoplatino ingresa a la célula, las moléculas de cisplatino se liberan en el citoplasma de la célula cancerosa y desencadenan la cascada apoptótica (Stathopoulos & Boulikas, 2012). La fusión directa de lipoplatino con la membrana celular proporciona un efecto terapéutico incluso después de que se desarrolla la resistencia al cisplatino. Xue y colaboradores informaron que la infusión de lipoplatino en células tumorales mostró una actividad antitumoral de 10 a 50 veces mayor con menos toxicidad limitante de la dosis en comparación con las células normales adyacentes (Xue *et al.*, 2013).



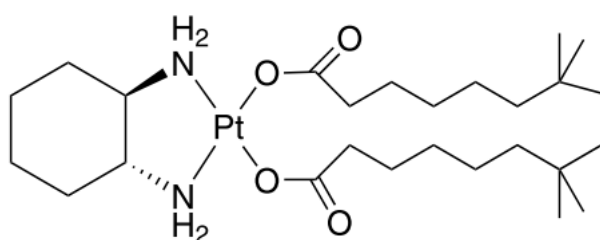
**Figura 1.17.** Penetración del lipoplatino a través de la membrana celular de las células tumorales (Adaptado de Xue *et al.*, 2013).

En comparación con el cisplatino libre, el lipoplatino demostró un mayor efecto antitumoral en las células de NSCLC y carcinoma renal (Arienti *et al.*, 2008). Además, el efecto apoptótico del lipoplatino en las células cocleares fue menor que el generado por el cisplatino. Por lo tanto, se sugirió que se utilizara lipoplatino para disminuir la ototoxicidad del cisplatino (Serinan *et al.*, 2018). La menor nefrotoxicidad del lipoplatino, en comparación con el cisplatino, fue reportada por Devarajan y colaboradores. Mientras que los animales inyectados con cisplatino desarrollaron insuficiencia renal con clara evidencia de daño tubular, aquellos inyectados con la misma dosis de

lipoplatino estaban casi completamente libres de daño renal (Devarajan *et al.*, 2004). El lipoplatino también mostró inhibición del crecimiento tumoral en modelos de xenoinjertos de cáncer de cuello uterino y de ovario (Casagrande *et al.*, 2013, 2014).

### 1.8.4.3. Aroplatin™

Aroplatin™ (DACH-L-NDDP, *Antigenic Inc.*, Lexington, MA, EE.UU.), es una formulación liposomal del análogo de oxaliplatino, químicamente *cis*-bis-neodecanoato-*trans*-*R,R*-1,2-diaminociclohexano platino (II) (Dragovich *et al.*, 2006) (**Figura 1.18**). Las limitaciones de Aroplatin™ son la dificultad de la caracterización química completa debido a la formación de 15 a 20 isómeros y su rápida degradación química (Perez-Soler *et al.*, 1994). Los datos preclínicos muestran que Aroplatin™ tiene diferentes perfiles de biodistribución y toxicidad que cisplatino o carboplatino, y no comparte resistencia cruzada con cisplatino (Wang & Guo, 2013). Perez-Soler y colaboradores informaron que Aroplatin™ fue más activo contra la leucemia y exhibió una mayor distribución tisular, incluido el bazo (15 veces), el pulmón (5 veces), el hígado (3 veces) y la sangre (4 veces) que el cisplatino a la misma dosis *i.v.* administración (Perez-Soler *et al.*, 1987).



**Figura 1.18.** Estructura química del Aroplatin™.

## 1.9. Hipótesis y objetivos

### 1.9.1. Hipótesis

El presente trabajo de tesis se basó en la hipótesis de que el desarrollo de nanosistemas lipídicos con características hidrofóbicas pueden dar origen a novedosas matrices con capacidad de transporte de agentes bioactivos con propiedades fisicoquímicas diversas y versátiles para un transporte eficiente y una liberación controlada, potenciando efectos terapéuticos. A su vez, la presencia de diversas estructuras en una matriz permite mayor facilidad de modificación mediante métodos convencionales y escalables, con lo cual se pueden adicionar marcadores de superficie característicos del tumor para incrementar la interacción de la partícula con las célula blanco.

### 1.9.2. Objetivo general

El objetivo general de la tesis es sintetizar, caracterizar y evaluar nanopartículas constituidas por lípidos que posean propiedades distintivas combinadas y que contengan nanoestructuras para el transporte activo de metalofármacos de platino(II). Estos deben tener características adecuadas para su localización sitio-específica mediante patrones superficiales que permitan una eficiente actividad antitumoral y reduzcan los efectos adversos.

### 1.9.3. Objetivos específicos

- ❖ Desarrollar nanosistemas lipídicos: Producir nanopartículas compatibles (NLC) cargadas con moléculas de origen hidrofóbico como la metalodroga platino(II).
- ❖ Desarrollar nanosistemas lipídicos funcionalizados con riboflavina: Decorar las superficies de las matrices y direccionarlas específicamente hacia las células tumorales de cáncer colorectal.
- ❖ Caracterizar los sistemas sintetizados por sus propiedades fisicoquímicas mediante la determinación del tamaño, el análisis de la superficie, la carga neta, la

estabilidad térmica, el grado de cristalinidad, la dispersión de tamaños de las nanopartículas.

- ❖ Realizar estudios de liberación *in vitro*: Realizar la liberación sostenida del meta-  
lofármaco a partir de nanopartículas para determinar los modelos de liberación.
- ❖ Evaluar la citotoxicidad en cultivos celulares: Evaluar la citotoxicidad, así como  
los mecanismos de acción activados de la formulación seleccionada desarrollada  
en cultivos de líneas celulares tumoral de colorrectales (i.e., HT-29 y HCT 116).
- ❖ Evaluar la captación celular y la muerte celular programada (apoptosis) en las  
líneas celulares tumorales colorrectales (i.e., HT-29 y HCT 116).
- ❖ Desarrollar sistemas de cultivo 3D de la línea HCT 116: Evaluar las propiedades  
antitumorales y la actividad antimetastásica de las nanopartículas cargadas con  
la metalodroga en el cultivo 3D.

# Capítulo 2

## *Sistema 1: Desarrollo de los sistemas de NLC cargados con 8-QO-Pt*

### 2.1. Materiales y métodos

#### 2.1.1. Materiales

Se utilizaron un lípido sólido a temperatura ambiente para la preparación de las formulaciones: La cera de esteres cetílicos NF (cera, Crodamol® SS, temperatura de fusión de alrededor de 44 °C). En las formulaciones también se incluyó un aceite compuesto por lípidos triglicéridos cápricos (Crodamol® GTCC-LQ, punto de fusión de -4 °C) o aceite de oliva (comercial, punto de fusión de -6 °C). Crodamol® SS y Crodamol® GTCC-LQ fueron donados amablemente por Croda (Argentina). El surfactante poloxámero P188 (Kolliphor® P188), el perclorato de 3,3'-dioctadeciloxacarbocianina (DiOC18), agua destilada, agua calidad HPLC y agua ultrapura Mili-Q fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina). DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles Medium*) y TrypLE™ fueron adquiridos en Gibco (Gaithersburg, MD, EE.UU.), y FBS (suero bovino fetal) fue adquirido de Internegocios S.A. (Argentina). Anexina V, isotiocianato de fluoresceína (FITC)/IP y sal de tetrazolio MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) de Invitrogen Co. (Buenos Aires, Argentina). Otros reactivos de grado analítico fueron adquiridos de fuentes comerciales disponibles y se usaron tal como se recibieron de Merck (Darmstadt, Alemania) o una marca similar.

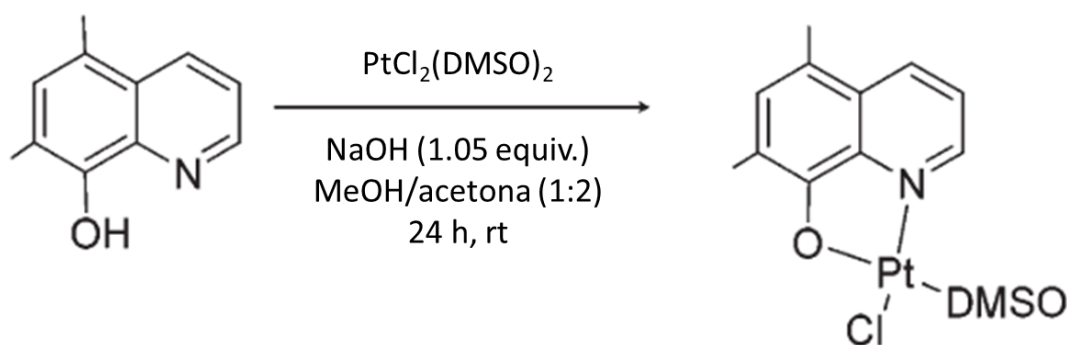
#### 2.1.2. Síntesis de 8-QO-Pt

El 8-oxiquinolinato-platino (II) [PtCl(8-O-quinolina) (DMSO)] (8-QO-Pt) fue sintetizado y caracterizado según Santos y colaboradores (**Figura 2.1.**) (Santos *et al.*, 2013).



El producto se obtuvo siguiendo el procedimiento general como un sólido amarillo anaranjado (78% de rendimiento) sin purificación adicional.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)** δ 9.41 (dd, J = 10.7, 1.2 Hz, 1H), 8.38 (dd, J = 8.4, 1.1 Hz, 1H), 7.58-7.40 (m, 2H), 7.02-7.06 (m, 2H), 3.61 (s, 6H). **<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)** δ 148.6, 148.3, 140.3, 140.2, 131.5, 131.0, 121.7, 115.6, 114.6, 46.6. **<sup>195</sup>Pt NMR (64.5 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)** δ: -2760.7. **HRMS (FAB+):** *calcd* por C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>ClNO<sub>2</sub>PtS (M<sup>+</sup>): 452.9915; *found*: 452.9928. Fórmula analítica. calculada mediante C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>ClNO<sub>2</sub>PtS: C, 29.18; H, 2.67; N, 3.09; *found*: C, 29.00; H, 2.67; N, 2.94.



**Figura 2.1.** Síntesis del 8-QO-Pt.

### 2.1.3. Preparación de nanosistemas lipídicos de 8-QO-Pt

Los NLC cargados con 8-QO-Pt se prepararon mediante la técnica de ultrasonificación (Rodenak-Kladniew *et al.*, 2017; Scioli Montoto *et al.*, 2018). Brevemente, se fundieron 400 mg de ésteres cetílicos de lípidos sólidos (SS) (2,0%, p/v) en un baño de agua a 70 °C y se mezclaron con 2,0 mg del compuesto 8-QO-Pt. Se disolvió 8-QO-Pt en 200 µl de triglicérido cáprico o aceite de oliva (1,0%, v/v). Después de 15 min, se añadieron a la fase lipídica 20 ml de la solución acuosa caliente de poloxámero 188 (4,5%, p/v). Instantáneamente, la mezcla fue ultrasonificada al 65% de amplitud durante 30 min equipada con una punta de titanio de 6 mm (procesador ultrasónico Cole Parmer, EE.UU., 130 Watts). Después de la sonicación, la formulación se enfrió a temperatura

ambiente y se almacenó a 4 °C. Se sintetizaron dos grupos diferentes de formulaciones lipídicas. El primer grupo contenía triglicéridos cápricos: (8-QO-Pt)-NLCA y su control NLCA sin el compuesto. El segundo se preparó de manera similar y contenía aceite de oliva (74% de ácido oleico, 13% de ácido palmítico y una pequeña cantidad de otros ácidos grasos): (8-QO-Pt)-NLCA y su control NLCA.

#### **2.1.4. Cuantificación de 8-QO-Pt en las formulaciones**

El análisis cromatográfico se realizó mediante HPLC (Gilson SAS, Villiers-Le-Bel, Francia) con detección UV. La separación cromatográfica se realizó en una columna Lichrosphere® 100 RP-18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). La fase móvil fue metanol y solución de ácido fosfórico al 0,1% (60:40). El sistema se hizo funcionar isocráticamente a un caudal de 1,0 ml/min y la detección se realizó a 262 nm. Las muestras se diluyeron con fase móvil y se centrifugaron (15.000 xg durante 5 min a 4 °C) antes de su inyección (20 µL). El método fue validado en términos de linealidad, precisión y especificidad, en el rango de concentraciones esperadas (0,1 – 200 µM). Se observó regresión lineal para el compuesto de Pt ( $p < 0,0001$ ) en el rango de concentración de 0,2 – 110 µM, con un coeficiente de determinación  $R^2 = 0,99$ . El intervalo de confianza del 95% del intercepto fue [-1,2322 – 0,6447]. La precisión del método se estableció en tres niveles de concentración: 0,2, 44 y 110 µM, y en todos los casos los valores de RSD estuvieron por debajo del 3%. El método fue específico para el compuesto 8-QO-Pt y no se observaron máximos que interfirieran.

#### **2.1.5. Eficiencia de encapsulación**

La eficiencia de encapsulación (EE,%) se calculó determinando la concentración del fármaco libre en solución. Brevemente, se transfirieron 500 µL de la suspensión final a un dispositivo centrífugo de ultrafiltración (MWCO 10.000 Da., Microcon®, Millipore, MA, EE.UU.) y se centrifugaron a 12.000 xg durante 30 min. Después de la

centrifugación, se midió por HPLC el sobrenadante que contenía el fármaco libre. Las EE (%) de los NLC se estimaron siguiendo la ecuación 2.1:

$$EE (\%) = (w_i - w_{fd}) / w_i \times 100 \quad \text{Ecuación 2.1}$$

donde  $w_i$  es la cantidad inicial de compuesto de Pt añadido a la formulación y  $w_{fd}$  es la cantidad de compuesto de Pt libre después del proceso de ultrafiltración.

### 2.1.6. Caracterización fisicoquímica

Para la caracterización de los sistemas de administración de fármacos a nanoescala, se emplean comúnmente la dispersión dinámica de la luz (DLS), los métodos de microscopía electrónica (TEM, SEM, etc...) y la microscopía de fuerza atómica (AFM) para obtener información confiable sobre la morfología y las propiedades estructurales de los nanovehículos. La técnica DLS proporciona información sobre el tamaño de partícula hidrodinámico promedio y la distribución de tamaño de partículas de tamaño submicrométrico. El tamaño de partícula obtenido se correlacionó bien con el análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM). La microscopía electrónica de barrido (SEM) proporciona imágenes tridimensionales de las partículas y se enfoca en su superficie, mientras que TEM proporciona visualización bidimensional y detalles sobre la composición interna de las partículas (Andonova & Peneva, 2018; Beloqui *et al.*, 2016; Kathe *et al.*, 2014). El potencial Zeta ( $\zeta$ ) es una medida de la carga eléctrica efectiva en la superficie que ganan las nanopartículas en las dispersiones. El potencial Zeta se puede analizar mediante dispersión de luz electroforética (ELS, electroforesis láser Doppler). SLN y NLC con una carga comprendida entre los valores de menores a -30 mV y mayores a +30 se consideran estables (Andonova & Peneva, 2018).

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) y la difracción de rayos X (XRD) pueden proporcionar información estructural sobre las partículas dispersas. Proveen información sobre el grado de cristalinidad y modificación de lípidos. Las alteraciones estructurales de los materiales van acompañadas de intercambios de calor, por

ejemplo, absorción de calor durante la fusión o emisión de calor durante la cristalización. DSC mide estos intercambios de calor durante programas de temperatura controlada y permite sacar conclusiones sobre las propiedades estructurales de una muestra (Bunjés & Unruh, 2007).

La carga de fármaco (DL) y la eficiencia de encapsulación (EE) son parámetros cruciales que están relacionados con el régimen de dosis y la eficiencia de las nanopartículas. La DL y la EE dependen de la solubilidad del fármaco en los lípidos a temperatura elevada y después del enfriamiento, de la solubilidad del fármaco en la mezcla agua-surfactante, de la relación fármaco/lípido, del grado de cristalinidad y modificación lipídica, y del proceso de obtención del SLN y NLC (Andonova & Peneva, 2018).

#### **2.1.6.1. Distribución de tamaño de partículas e índice de polidispersión**

El diámetro promedio y la distribución de tamaño de las nanopartículas de lípidos se midieron mediante dispersión de luz dinámica (DLS) utilizando el equipo Nano ZS Zetasizer (Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra) a 25 °C en cubetas de poliestireno con un camino óptico de 10 mm. Las mediciones se realizaron en celdas capilares de 10 mm de camino óptico, utilizando agua desionizada (Milli-Q®, Millipore, Ma., EE.UU.). También se determinó el índice de polidispersión (PDI, polydispersity index) como medida adimensional de la distribución de tamaños. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

#### **2.1.6.2. Microscopía de transmisión electrónica (TEM)**

El análisis TEM se realizó con el microscopio Jeol-1200 EX II-TEM (Jeol, MA, EE.UU.). La dispersión de NLC se diluyó 1:10 con agua ultrapura Milli-Q® y colocando 10 µl de cada dilución en grillas de cobre recubiertas con colodión (malla 400). El exceso de líquido se eliminó con papel de filtro y, para mejorar el contraste, se agregó una gota de ácido fosfotúngstico a la dispersión de NLC.

### **2.1.6.3. Análisis por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)**

Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier se realizó utilizando un espectrómetro Nicolet 6700 (Thermo Scientific *Inc.*, Waltham, MA, EE.UU.). El modo de reflectancia total atenuada (ATR) se utilizó para registrar espectros en el rango de 600 a 4.000  $\text{cm}^{-1}$  que son la solución de 2  $\text{cm}^{-1}$ .

### **2.1.6.4. Análisis termogravimétrico (TGA)**

El análisis de TGA se logró con el objetivo de analizar la estabilidad térmica de los ésteres cetílicos (SS), el compuesto libre (8-QO-Pt), NLCA, (8-QO-Pt)-NLCA, NLCB, (8-QO-Pt)-NLCB. Se utilizó el aparato TGA Q500 (TA Instruments, New Castle, DE, EE.UU.) para obtener datos de TGA. Las muestras de 2,0 – 9,0 mg se pesaron con precisión en una bandeja de platino y las mediciones se realizaron desde temperatura ambiente hasta 600 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min en atmósfera de nitrógeno para evitar termooxidación.

### **2.1.6.5. Análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

Las propiedades térmicas de las nanopartículas de ésteres de cetilo (SS), compuesto libre (8-QO-Pt), NLCA, (8-QO-Pt)-NLCA, NLCB, (8-QO-Pt)-NLCB se determinaron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC Q5000, TA *Instruments*, EE.UU.) bajo atmósfera de nitrógeno. Los escaneos se realizaron en un rango de 0 a 200 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

### **2.1.6.6. Análisis de difracción de rayos X (XRD)**

Los patrones de difracción de rayos X se obtuvieron con un difractómetro PANalytical X'Pert PRO equipado con una fuente de rayos X (Phillips PW 1830, PANalytical BV, Países Bajos) utilizando radiación  $\text{CuK}\alpha$  a 40 kV y 40 mA, en un rango de  $2\theta$  de 5° – 60° con un tiempo de adquisición de 1s/s en cada paso de 0,02°.

### 2.1.7. Ensayos de liberación *in vitro*

Los ensayos de liberación se realizaron utilizando membranas de diálisis (MWCO 10 kDa, Millipore, Waltham, EE.UU.). La membrana se remojó en agua destilada *overnight* y se llenó con 2,0 ml de cada formulación seguido de inmersión en 15,0 ml de buffer de acetato 200 mM (pH= 4,4 y 5,5), y buffer de fosfato 200 mM (pH= 7,3) a 37 °C, con agitación continua a 200 rpm. Se tomaron muestras de 200 µL a intervalos regulares durante 72 horas y se midió la concentración del fármaco en HPLC.

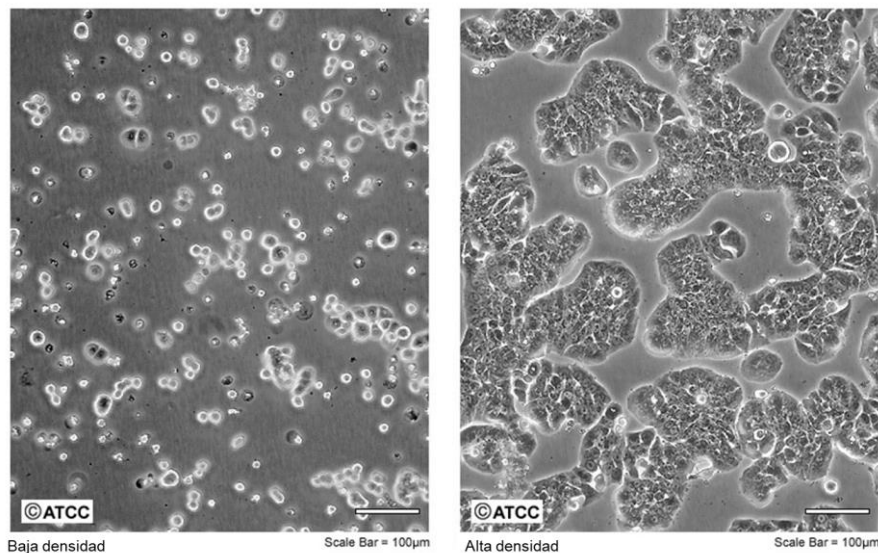
### 2.1.8. Ensayos *in vitro*

#### 2.1.8.1. Cultivo de células

La línea celular HT-29 (células de carcinoma de colon humano) se obtuvo de la *American Type Culture Collection* (ATCC®, HTB-38™) (**Figura 2.2**). La línea celular HT-29 es uno de los modelos *in vitro* más utilizados en los estudios de descubrimiento de nuevos fármacos anticancerígenos. Se ha informado que la línea celular HT-29 mostró resistencia a los fármacos de quimioterapia (El Khoury *et al.*, 2016; Mohammadian *et al.*, 2017) y se ha estado utilizando como modelo para aclarar el mecanismo de la resistencia adquirida en las investigaciones preclínicas del cáncer (Gotink *et al.*, 2014). HT-29 es una línea celular con morfología epitelial que se aisló en 1964 de un tumor primario obtenido de un paciente caucásica de 44 años con adenocarcinoma colorrectal (Martínez-Maqueda *et al.*, 2015). Las células HT-29 se derivan del adenocarcinoma de colon humano en estadio C de Duke (Gala de Pablo *et al.*, 2018). Se ha encontrado que varios receptores de hormonas o péptidos están presentes en estas células, como receptores funcionales para el péptido intestinal vasoactivo (VIP), receptores alfa-2-adrenérgicos o receptores para insulina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), neurotensina, prostaglandinas y catecolaminas (Rousset, 1986). La CD44 es una de las moléculas más investigadas en el proceso metastásico de varias neoplasias malignas, entre ellas

la del cáncer colorrectal. Las células de HT-29 muestran una sobreexpresión de los receptores CD44 (Bánky *et al.*, 2012).

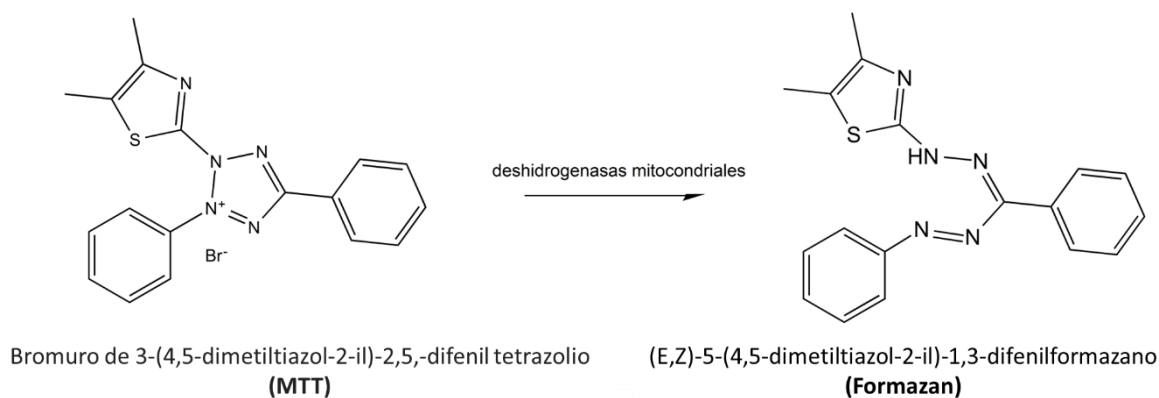
Las células se cultivaron en medio *Eagle* modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco, Invitrogen Corporation, EE.UU.) suplementado con 10,0% de suero fetal bovino (FBS; Internegocios, Buenos Aires, Argentina) y antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina; Gibco, Invitrogen Corporation, EE.UU.). Las células se mantuvieron en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire atmosférico humidificado a 37 °C.



**Figura 2.2.** Fotografías de la línea celular HT-29, obtenidas de la página de *American Type Culture Collection* de líneas celulares (<https://www.atcc.org/>).

### 2.1.8.2. Estudios de citotoxicidad

La viabilidad celular se examinó utilizando la sal de tetrazolio amarilla MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Mosmann, 1983). Esta sal es reducida por células metabólicamente activas, por la acción de deshidrogenasas mitocondriales, como NADH y NADPH, a formazan (E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazano, un cristal insoluble color violeta (**Figura 2.3**). Los cristales de formazan son solubilizados y cuantificados con un lector de placa a 570 nm.



**Figura 2.3.** Conversión de MTT a formazan.

Se sembraron células de HT-29 entre 15.000 a 20.000 cel/pocillo en una placa de 96 pocillos durante 24 h para unir las a la superficie de la placa. Luego, las células se trataron con diferentes concentraciones de compuesto libre (8-QO-Pt), nanopartículas NLCA, (8-QO-Pt)-NLCA, NLCB, (8-QO-Pt)-NLCB en DMEM sin suero durante 24 h. Al finalizar este periodo, se eliminó el medio, la placa se lavó con 100  $\mu$ L de PBS y las células se incubaron con reactivo MTT (0,5 mg/ml de MTT en medio DMEM suplementado) durante 3 h. Posteriormente se leyó la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas (*multiplate reader* multiskan FC, Thermo Scientific). La viabilidad celular se indicó como el porcentaje (%) del valor del control sin tratar (100% de supervivencia).

### 2.1.8.3. Captación celular

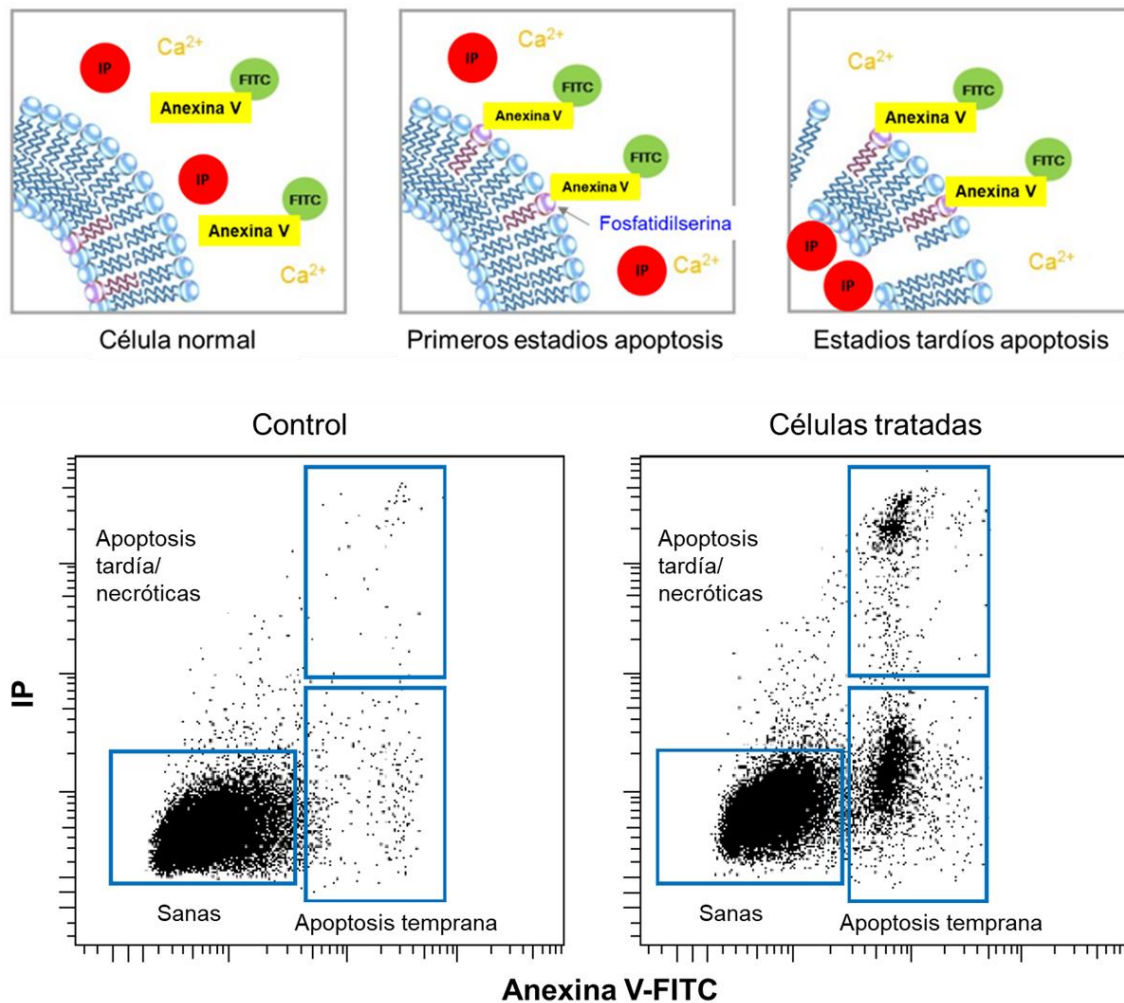
La captación celular se evaluó utilizando nanopartículas vacías marcadas con la sonda fluorescente verde DiOC18 ( $\lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{em}} = 484/501$  nm). De manera concisa, se mezcló 1,0 mg de DiOC18 con la fase lipídica fundida (a 70 °C) y se protegió de la luz. La formulación se preparó como se describió anteriormente mediante la adición de fase acuosa y sonicación al 65% de potencia durante 30 min. Como resultado, el DiOC18 se encapsuló al 100% en las nanopartículas. La captación celular de nanopartículas marcadas con fluorescencia se evaluó mediante citometría de flujo.



Las células de HT-29 se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de 200.000 cel/pocillo. Después de 24 h, las células se trataron con DMEM sin suero que contenía tres concentraciones diferentes de NLC vacías (NLCA y NLCB; cantidad equivalente para 5,0 10,0 y 25,0  $\mu\text{M}$  de (8-QO-Pt)-NLCA y (8-QO-Pt)-NLCB) y se incubaron durante 6 h. Al final del tratamiento, las células se lavaron una vez con PBS. Luego, las células se trataron con 300  $\mu\text{L}$  de tripLe y después, se agregaron 600  $\mu\text{L}$  del medio que contenía suero a cada pocillo. Posteriormente, las células se recolectaron de cada pocillo en microtubos y se centrifugaron a 2.500  $\times\text{g}$  durante 5 min. Se retiraron los sobrenadantes y las células se dispersaron en 200  $\mu\text{L}$  de PBS. La fluorescencia se analizó mediante *FACSCalibur* (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) y los valores resultantes se evaluaron mediante el software FlowJo 7.6.

#### **2.1.8.4. Apoptosis**

En las células que mueren por muerte celular programada (apoptosis), las moléculas de fosfatidilserina de la superficie citoplásmica de la membrana celular migran a la superficie exterior de la membrana celular como una señal temprana de apoptosis celular. Para evaluar si hay presencia de apoptosis se utiliza la sonda anexina-V que se puede unir a la fosfatidilserina en la superficie exterior de la célula. Así, las células apoptóticas a las que se conjuga FITC con anexina-V pueden hacerse visibles (Serinan *et al.*, 2018). Por otro lado, el yoduro de propidio (IP) tiñe las células apoptóticas determinando así el porcentaje de apoptosis (Tummala *et al.*, 2016) (**Figura 2.4**).



**Figura 2.4.** Panel superior representación de la externalización de la fosfatidilserina, y en el panel inferior, análisis de citometría de flujo de células no tratadas (izquierda) o tratadas (derecha) utilizando el kit de detección temprana de apoptosis de Anexina V-FITC.

Las células se trataron con tres concentraciones diferentes (1,0, 2,5, 5,0  $\mu\text{M}$ ) de 8-QO-Pt libre y (8-QO-Pt)-NLCA y se incubaron durante 24 h antes del análisis. Para la tinción, las células se lavaron con PBS y se diluyeron con buffer de unión 1X, Anexina V-FITC y IP y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente antes del análisis. Las células se recogieron mediante citometría de flujo (BD FACSCalibur™) y los resultados se analizaron mediante el software FlowJo 7.6. Se definieron cuatro subpoblaciones en el gráfico de puntos: el vital no dañado (Anexina V-/PI-), el vital dañado

mecánicamente (Anexina V/PI+), el apoptótico temprano (Anexina V+/PI-) y el apoptótico tardío (Anexina V+ /PI+) subpoblaciones.

### **2.1.9. Análisis estadístico**

Los experimentos se realizaron con un mínimo de 3 réplicas independientes. Las comparaciones de las medias se realizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de 5,0% ( $\alpha= 0,05$ ) seguido de la prueba de diferencias mínimas significativas de Fisher.

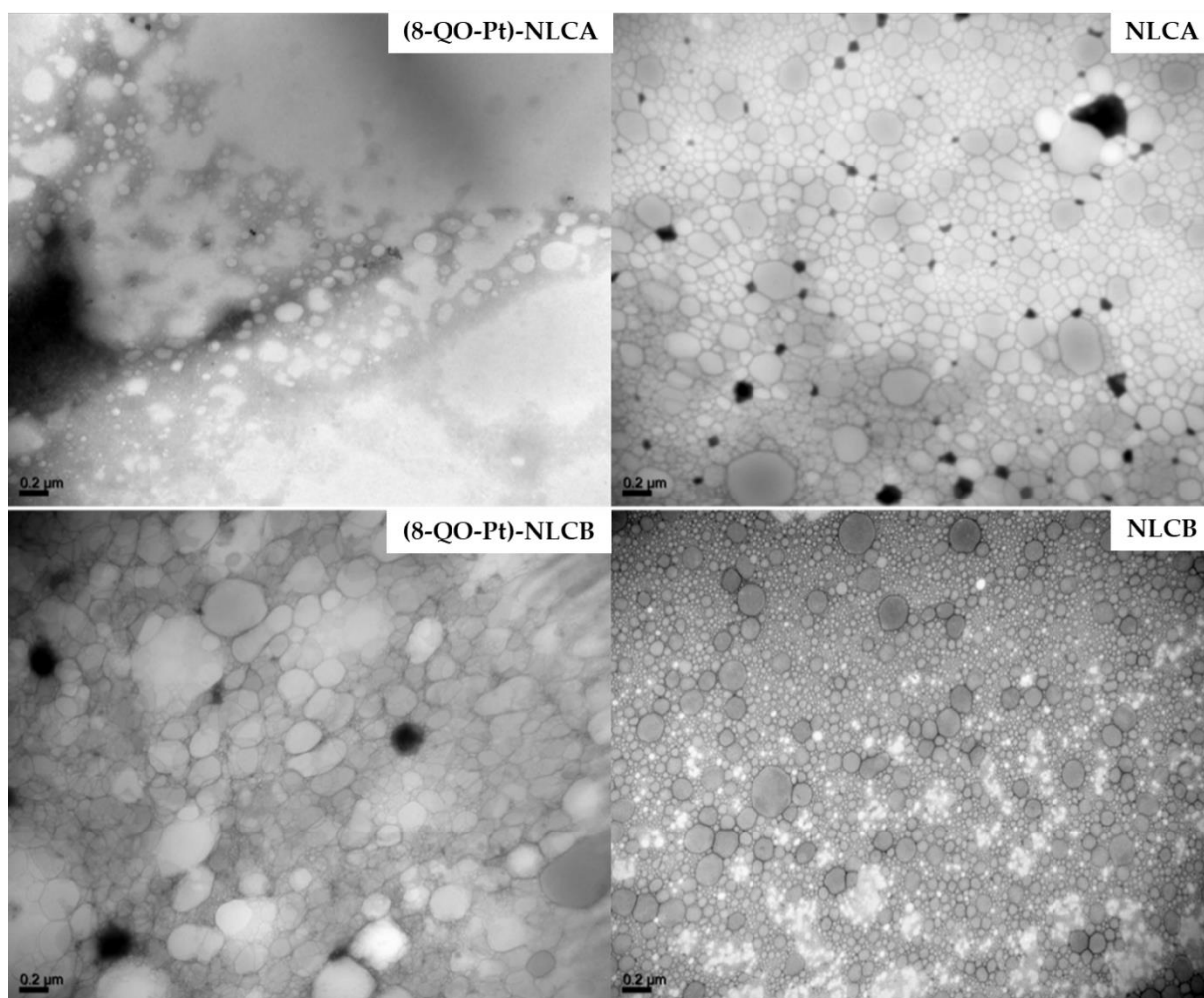
## 2.2. Resultados y discusión

### 2.2.1. Desarrollo de formulaciones y morfología de nanopartículas

Las dos formulaciones estudiadas se produjeron con el mismo tipo y cantidad de lípido sólido (ésteres cetílicos (SS) (2,0%, p/v)) y surfactante (poloxámero 188, 4,5%, p/v), intercambiando solo el aceite líquido, para NLCA se utilizó triglicéridos cápricos mientras que para NLCB se usó aceite de oliva. Para ambas formulaciones cargadas con el compuesto 8-QO-Pt, la cantidad inicial de fármaco fue constante (2,0 mg). Las dos formulaciones evidenciaron una eficiencia de encapsulación muy elevada siendo las mismas de  $82,1 \pm 0,9$  y  $81,5 \pm 3,7$  para (8-QO-Pt)-NLCA y (8-QO-Pt)-NLCB, respectivamente.

La estructura morfológica y la distribución de tamaño de las nanopartículas fueron analizadas por TEM (**Figura 2.5**). Ambos sistemas de nanopartículas exhibieron una morfología esférica y el tamaño de ambas formulaciones es inferior a 200 nm. Las imágenes TEM revelaron que el tamaño de las NLCA es más pequeño que el de las NLCB. Estos resultados fueron confirmados por el análisis de DLS.

El tamaño medio de partícula y el índice de polidispersidad (PdI) de las formulaciones se determinaron mediante DLS. El tamaño de partícula promedio ( $\pm$  SD) de NLCA, (8-QO-Pt)-NLCA, NLCB y (8-QO-Pt)-NLCB fue de  $136,0 \pm 1,1$ ,  $136,3 \pm 0,5$ ,  $159,0 \pm 2,0$  y  $144,0 \pm 2,0$  nm respectivamente (**Tabla 2.1**). Los valores de PdI para todas las formulaciones se determinaron alrededor de 0,2, lo que indica tamaños de partículas monodispersas (Schärtl, 2007).



**Figura 2.5.** Imágenes TEM de NLC; Compuesto de 8-QO-Pt cargado (izquierda), vacío (derecha).

**Tabla 2.1.** Tamaño promedio y PDI de NLC por DLS. No se encontraron diferencias significativas entre formulaciones (ANOVA,  $p > 0,05$ ).  $Z_{av}$  - Tamaño promedio (nm), PDI - Índice de polidispersidad.

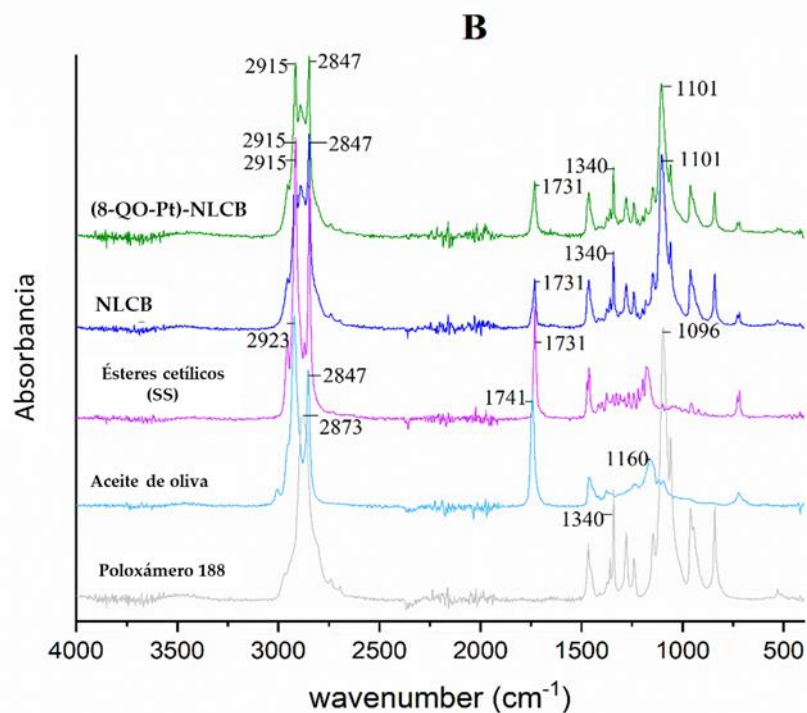
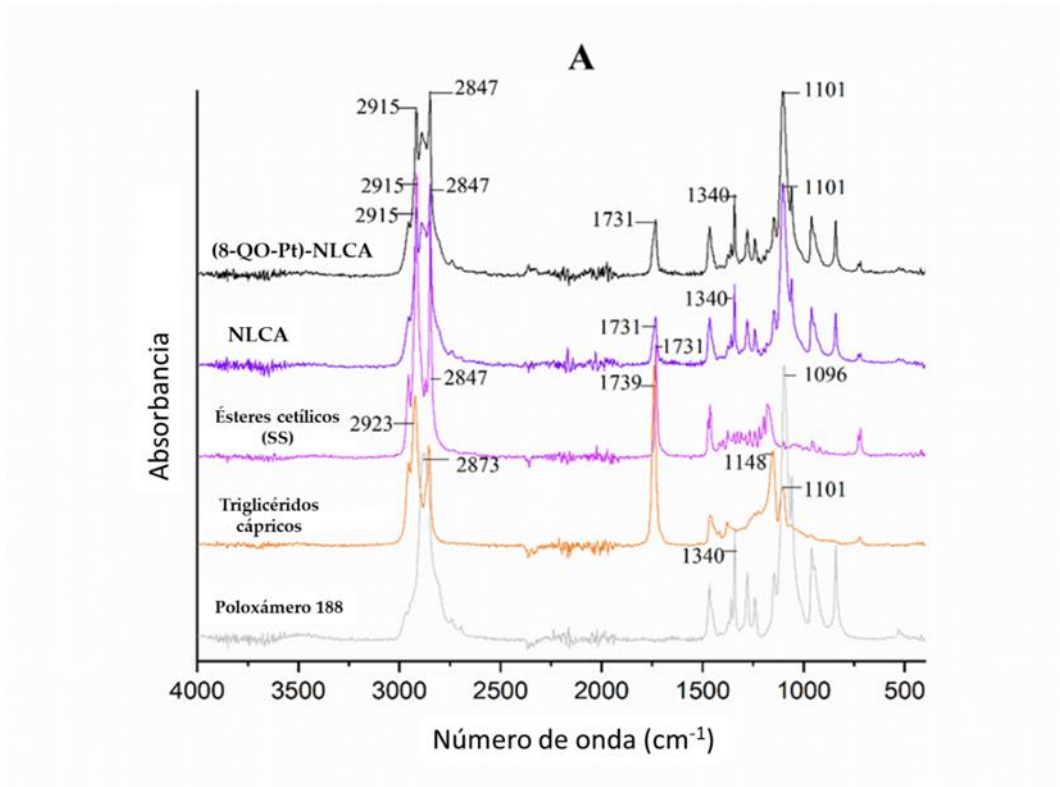
<b>Formulaciones</b>	<b><math>Z_{av}</math> (nm)</b>	<b>PDI</b>
<b>NLCA</b>	$136,0 \pm 1,1$	$0,218 \pm 0,016$
<b>NLCB</b>	$159,0 \pm 2,0$	$0,226 \pm 0,010$
<b>(8-QO-Pt)-NLCA</b>	$136,3 \pm 0,5$	$0,218 \pm 0,050$
<b>(8-QO-Pt)-NLCB</b>	$144,0 \pm 2,0$	$0,210 \pm 0,013$

## 2.2.2. Caracterización fisicoquímica

### 2.2.2.1. Análisis por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

Se realizó un análisis de FTIR para identificar los grupos funcionales de superficie y su interacción con la matriz. Como puede observarse en la **Figura 2.6**, los ésteres cetílicos (SS) presentaron máximos característicos en el rango de  $2915\text{ cm}^{-1}$  y  $2847\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento del grupo C-H de alcano) y  $1731\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento del grupo C=O de aldehído). Estos máximos se observaron en los espectros de nanopartículas NLCA, (8-QO-Pt)-NLCA, NLCB y (8-QO-Pt)-NLCB. De esta forma, coincide con lo observado en el estudio de Rodenak-Kladniew *et al.*, 2017.

Los espectros FTIR del surfactante poloxámero 188 mostraron máximos característicos del grupo alcano (máximo C-H a  $2873\text{ cm}^{-1}$ ), el grupo alcohol (máximo de estiramiento O-H a  $1340\text{ cm}^{-1}$ ) y el grupo de alcohol secundario (máximo de estiramiento C-O a  $1096\text{ cm}^{-1}$ ) (Yan *et al.*, 2010). El triglicérido cáprico de aceite líquido que se incorporó en las formulaciones NLCA y (8-QO-Pt)-NLCA mostró las bandas de absorción a  $2923\text{ cm}^{-1}$ ,  $1739\text{ cm}^{-1}$  y  $1148\text{ cm}^{-1}$  que están relacionadas con estiramiento C-H de alcano, estiramiento C=O de aldehído y estiramiento C-O de éter alifático, respectivamente. El aceite de oliva contenido en las formulaciones NLCB y (8-QO-Pt)-NLCB exhibió algunas bandas a  $2923\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento C-H de alcano),  $1741\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento C=O de ésteres) y  $1160\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento C-O de alcohol terciario) (Lei *et al.*, 2018; Pan *et al.*, 2018).

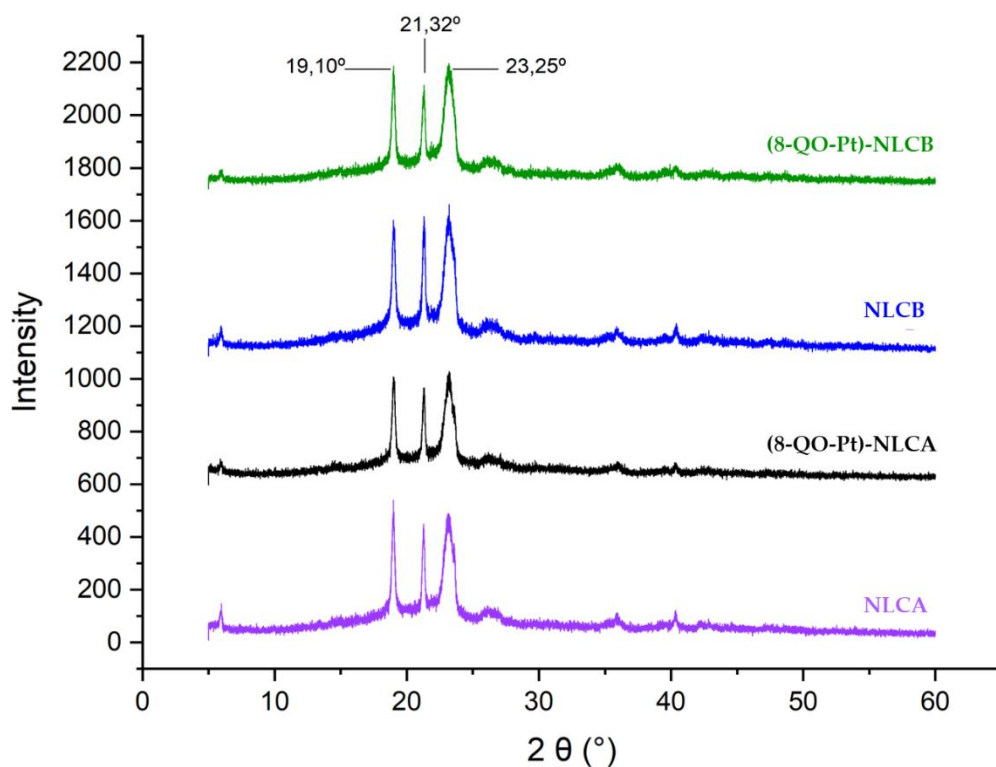


**Figura 2.6.** Espectros FTIR de ésteres cetílicos (SS), poloxámero 188, aceites líquidos; triglicérido cáprico y aceite de oliva y nanopartículas NLCA, (8-QO-Pt)-NLCA, NLCB y (8-QO-Pt)-NLCB.

### 2.2.2.2. Análisis por difracción de rayos X (XRD)

Las estructuras cristalinas de los NLC con o sin el compuesto 8-QO-Pt (NLCA, (8-QO-Pt)-NLCA, NLCB y (8-QO-Pt)-NLCB) se analizaron mediante XRD para identificar el polimorfismo del lípido matriz. Las grasas pueden cristalizar en formas polimórficas  $\alpha$  (inestable),  $\beta'$  (metaestable) y  $\beta$  (estable) (Rousseau *et al.*, 1998). La asignación de los máximos XRD indica una mezcla de formas  $\beta$  y  $\beta'$  de los lípidos. Los patrones equivalentes a las formulaciones de NLC mostraron máximos correlativos a los ésteres de cetilo SS ( $19,10^\circ$ ,  $21,32^\circ$  y  $23,25^\circ$ ) y confirman la estructura cristalina sólida de los NLC (**Figura 2.7**) (Scioli Montoto *et al.*, 2018). Se utiliza un espacio corto (d) de redes cristalinas para caracterizar las formas polimórficas. Las formulaciones de NLC exhibieron un espacio corto a 0,46 nm (forma  $\beta$ ), 0,42 nm (forma  $\beta'$ ) y 0,38 nm (forma  $\beta$  o  $\beta'$ ) donde los máximos se observaron a  $19,10^\circ$ ,  $21,32^\circ$  y  $23,25^\circ$ , respectivamente (ten Grotenhuis *et al.*, 1999). El comportamiento polimórfico debido a la estructura cristalina de las nanopartículas lipídicas es crucial para la estabilidad durante el almacenamiento y las propiedades de liberación del fármaco cargado de las nanopartículas. Las formas  $\beta$  o  $\beta'$  muestran empaquetamiento de orden superior y la mayor estabilidad termodinámica (Rodenak-Kladniew *et al.*, 2017; Rosiaux *et al.*, 2015).



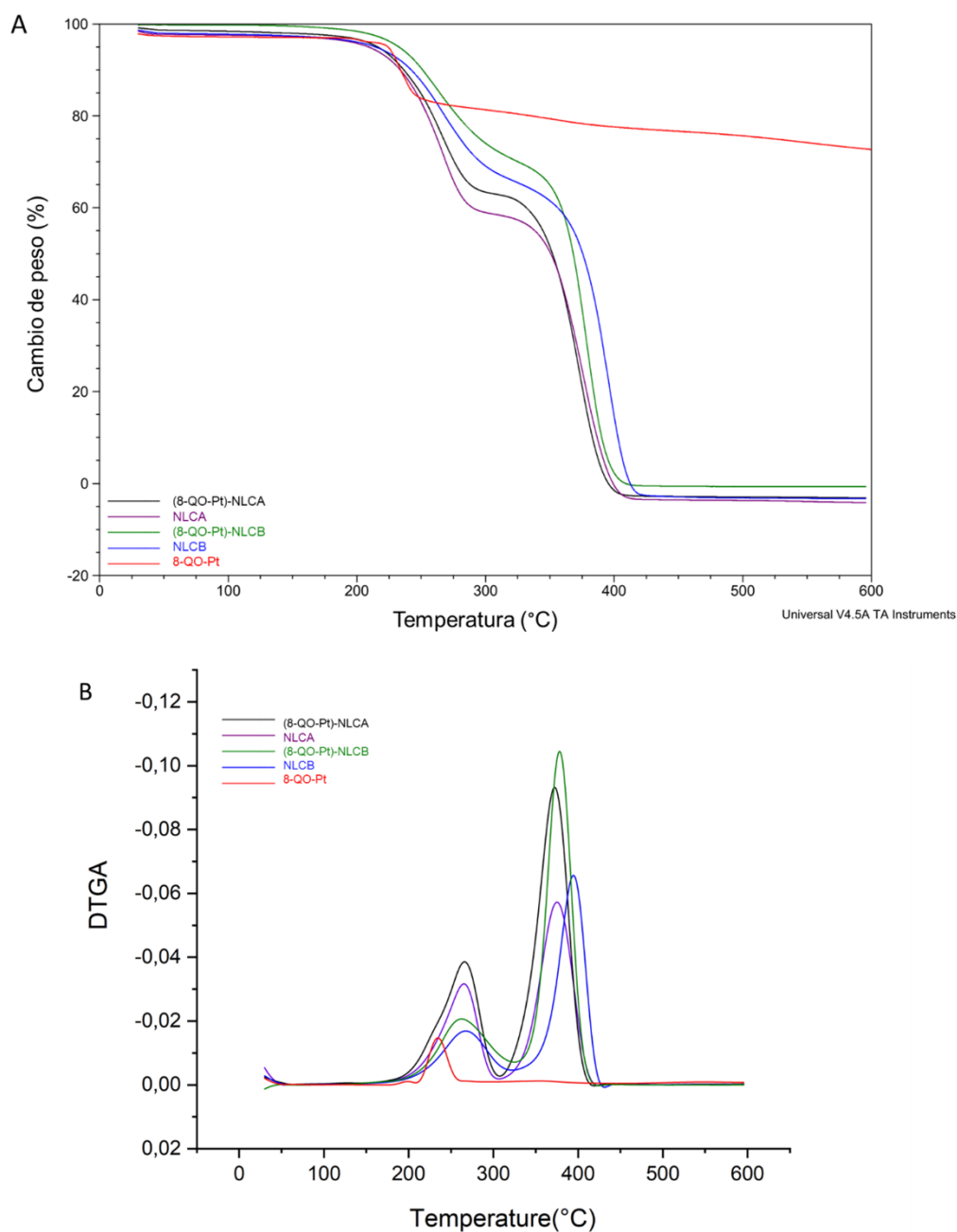


**Figura 2.7.** Patrones XRD de nanopartículas NLCA, (8-QO-Pt)-NLCA, NLCB y (8-QO-Pt)-NLCB.

### 2.2.2.3. Análisis termogravimétrico (TGA)

Se realizó el análisis termogravimétrico de muestras de nanopartículas NLCA, (8-QO-Pt)-NLCA, NLCB, (8-QO-Pt)-NLCB, y 8-QO-Pt libre (**Figura 2.8**). NLCA, (8-QO-Pt)-NLCA, NLCB y (8-QO-Pt)-NLCB exhibieron un comportamiento térmico bifásico. Las primeras degradaciones térmicas se presentaron en el rango de 186 – 338 °C con una pérdida de peso de 37,3%, 33,9%, 33,2% y 30,3%, respectivamente, y están relacionadas con los ésteres cetílicos (SS). Todas las formulaciones conservaron sus consistencias hasta los 185 °C permitiendo que los NLC perduren en los medios de liberación. Las segundas degradaciones térmicas se presentaron en el rango de 338 – 421 °C con una pérdida de peso de 62,5%, 65,9%, 66,0% y 68,7% respectivamente. El gráfico TGA mostró que las formulaciones NLCB eran más estables que las formulaciones NLCA. Este hecho se puede atribuir a la presencia de un alto contenido de

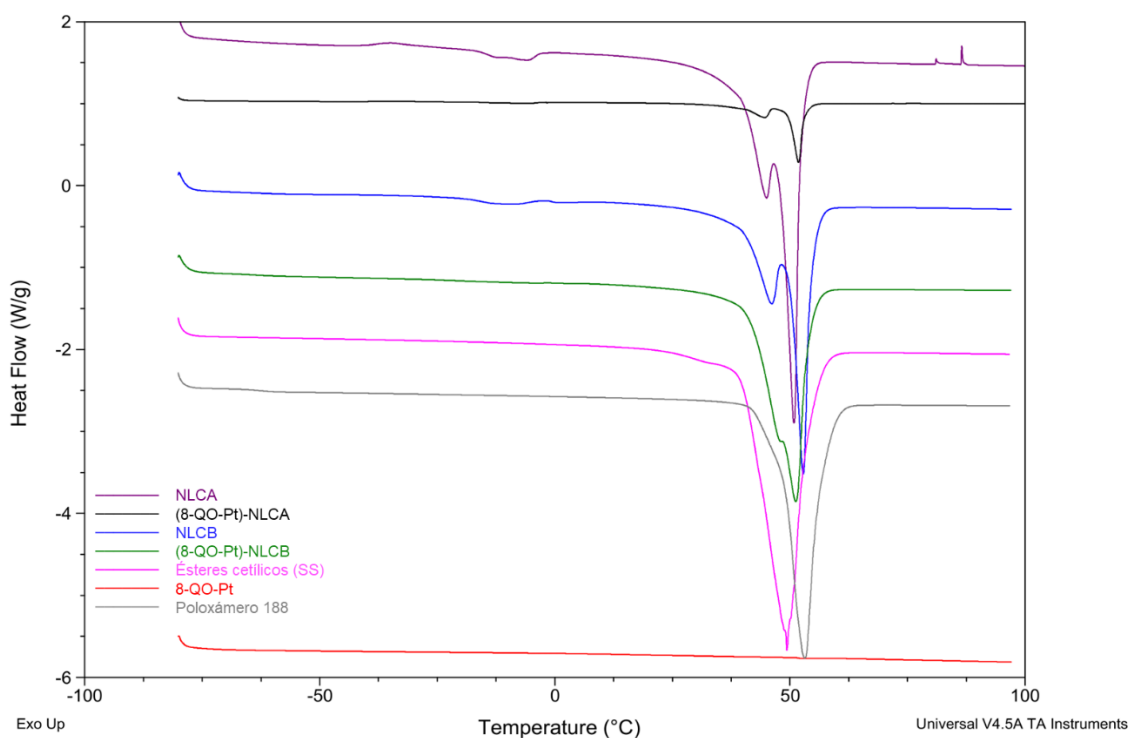
ácidos grasos insaturados (es decir, alrededor del 85%) en el aceite de oliva en la formulación de NLCB que permite una mejor interacción con el fármaco (Lei *et al.*, 2018).



**Figura 2.8.** Termogramas (TGA, A) y su derivada (DTGA, B) obtenidos por análisis termogravimétrico de (8-QO-Pt)-NLCA (negro), NLCA (violeta), (8-QO-Pt)-NLCB (verde), NLCB (azul), y 8-QO-Pt (rojo).

#### 2.2.2.4. Análisis calorimetría diferencial de barrido (DSC)

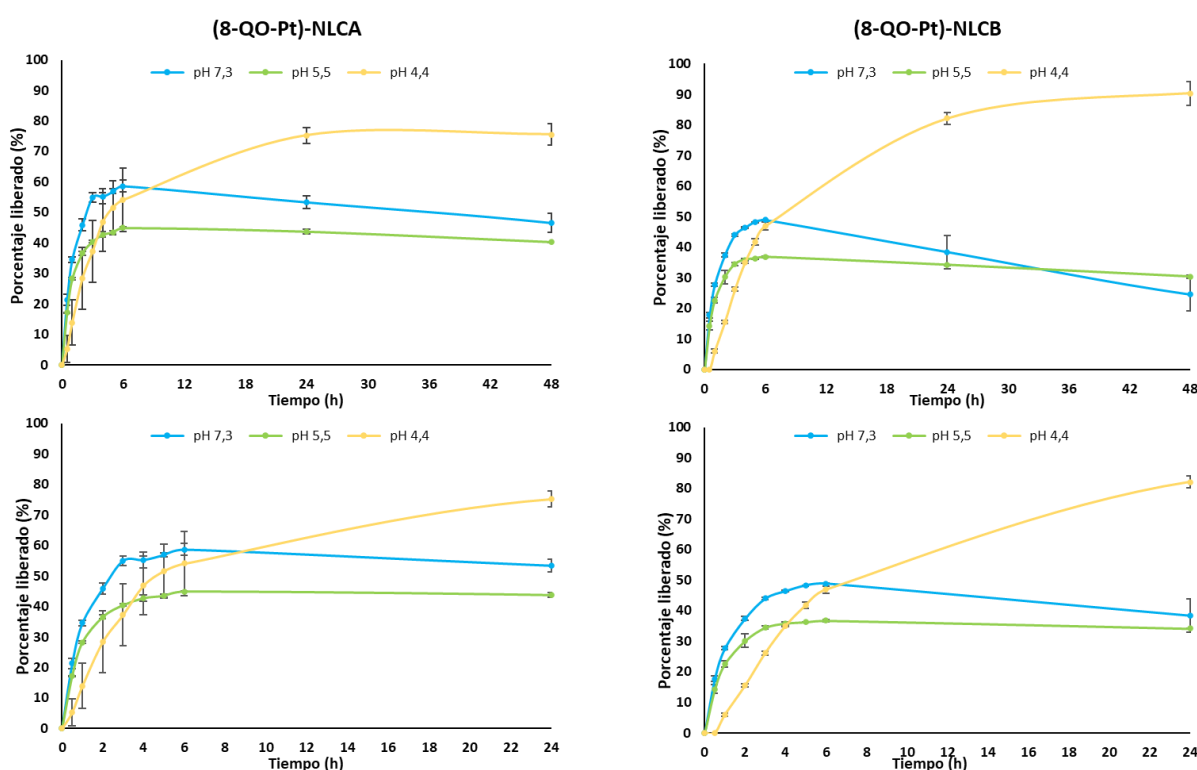
Las curvas de DSC del compuesto 8-QO-Pt libre, NLCA, (8-QO-Pt)-NLCA, NLCB, (8-QO-Pt)-NLCB, ésteres cetílicos (SS) y poloxámero 188 se muestran en la **Figura 2.9**. Todas las formulaciones mostraron dos máximos endotérmicos. Los primeros máximos se observaron en el rango de 44 a 48 °C y se pueden atribuir a la temperatura del punto de fusión de los ésteres cetílicos de lípidos sólidos (SS), que es de aproximadamente 44 °C (Scioli Montoto *et al.*, 2018). Los segundos máximos se observaron en el rango de 46 – 52 °C que podría estar asociado con la temperatura del punto de fusión del poloxámero 188 (aproximadamente 53 °C). El compuesto 8-QO-Pt libre no mostró degradación hasta los 100 °C, lo que indica su buena estabilidad en las condiciones utilizadas.



**Figura 2.9.** Termogramas DSC para NLCA (violeta), (8-QO-Pt)-NLCA (negro), NLCB (azul), (8-QO-Pt)-NLCB (verde), ésteres cetílicos (SS) (rosa), 8-QO-Pt (rojo), y poloxámero 188 (gris).

### 2.2.3. Ensayo de liberación *in vitro*

El ensayo de liberación del fármaco de platino *in vitro* se realizó a pH= 4,4 y 5,5 en buffer de acetato de 200 mM y a pH= 7,3 en buffer de fosfato de 200 mM por el método de diálisis. Se colocaron 2,0 ml de cada formulación, así como una suspensión de fármaco libre en bolsas de diálisis y se analizaron los perfiles de liberación. En la **Figura 2.10** pueden observarse los perfiles de liberación de 8-QO-Pt a los tres diferentes pH desde las nanopartículas. Ambas formulaciones mostraron mejor perfil de liberación del 8-QO-Pt a pH 4,4 en comparación con pH 7,3 y pH 5,5.



**Figura 2. 10.** Perfiles de liberación (Medio  $\pm$  SD) de las nanopartículas (8-QO-Pt)-NLCA y (8-QO-Pt)-NLCB en los tres medios ensayados (pH 7,3, pH 5,5, y pH 4,4) durante 48 h y 24 h.

De acuerdo a estos resultados se realizó la comparación de los perfiles de liberación de (8-QO-Pt)-NLCA, (8-QO-Pt)-NLCB y el 8-QO-Pt a pH 4,4 en buffer acetato y se determinaron sus modelos de liberación.

El 8-QO-Pt libre alcanzó el 100% de liberación en las primeras 3 h. En comparación con la suspensión de 8-QO-Pt libre, ambas formulaciones mostraron una tasa de liberación lenta del fármaco, con aproximadamente el 75% (8-QO-Pt)-NLCA y 90% (8-QO-Pt)-NLCA liberado en 72 h. La **Figura 2.11** evidencia curvas hiperbólicas para la liberación de compuesto 8-QO-Pt desde las nanopartículas. La mejor correlación de liberación del 8-QO-Pt de las nanopartículas se encontró con el modelo de primer orden (P. Costa & Sousa Lobo, 2001) (**Ecuación 2.2**), de acuerdo con todas las medidas de estadística de las medidas de ajuste ( $R^2$ ,  $R^2$ -adj, AIC, MSE y estructura residual). Los resultados del análisis de modelado se muestran en la **Tabla 2.2**, junto con algunas medidas de ajuste.

Se empleó el programa complementario DDSolver Excel para ajustar los diferentes modelos cinéticos que podrían dar una idea del comportamiento de liberación del fármaco (Zhang *et al.*, 2010). La cinética de liberación de primer orden establece que el cambio en la concentración con respecto al cambio en el tiempo depende únicamente de la concentración (Bruschi, 2015a).

**Ecuación 2.2**, según todas las medidas estadísticas de bondad de ajuste que considere ( $R^2$ ,  $R^2$ -adj, AIC, MSE y estructura residual).

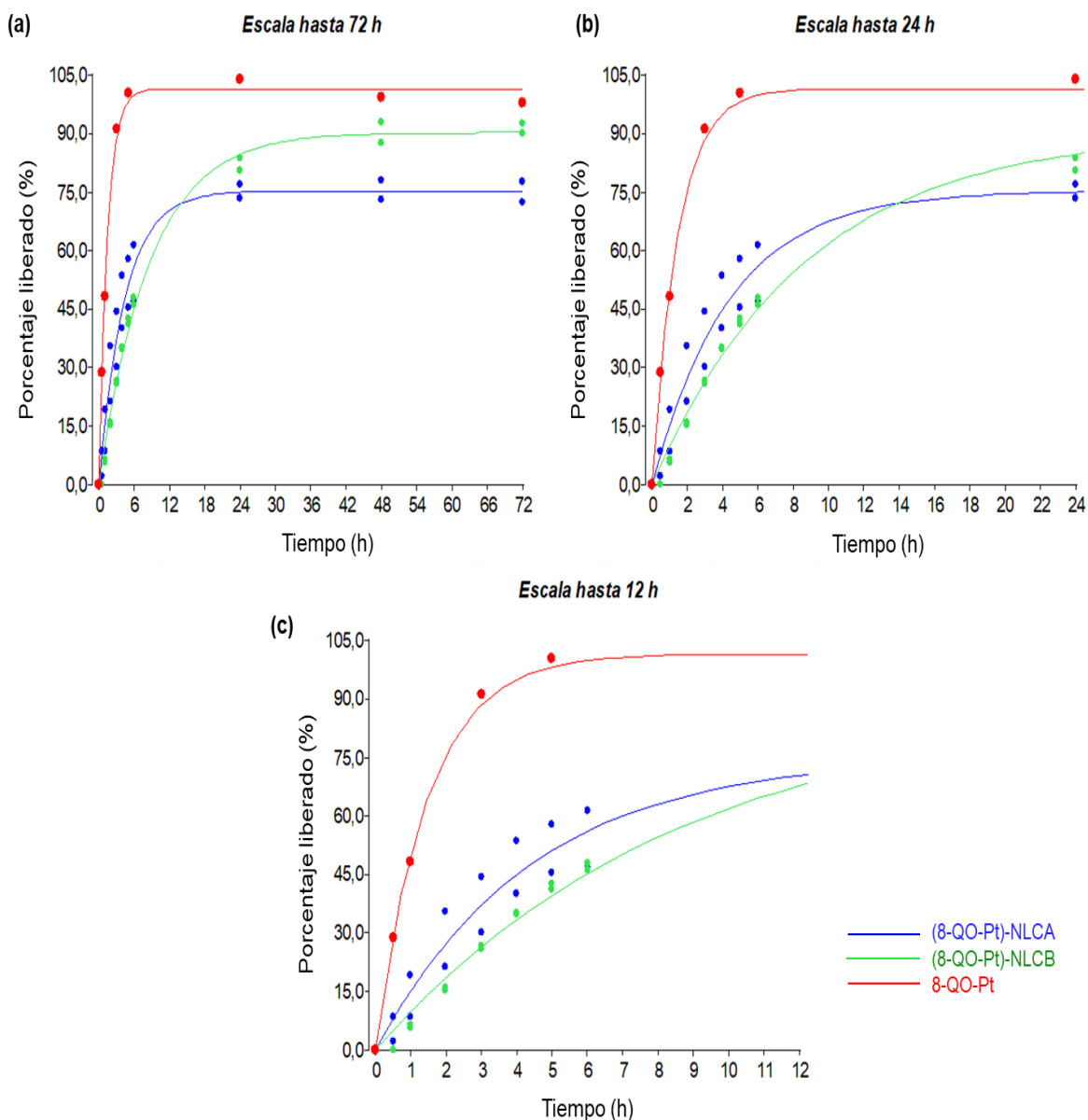
$$Ft = \frac{Mt}{M\infty} \times 100 = Fmax (1 - e^{-k.t}) \quad \text{Ecuación 2.2}$$

En la ecuación,  $Ft$  es el porcentaje liberado en el tiempo  $t$ ,  $Mt$  y  $M\infty$  son las cantidades acumuladas del compuesto liberado en el tiempo  $t$  y el tiempo infinito, respectivamente;  $Fmax$  y  $k$  son los parámetros para estimar, también conocidos como parámetros de escala y forma, respectivamente.

**Tabla 2.2.** Análisis de modelado de los perfiles de liberación de las nanopartículas y el fármaco libre. Se muestran las siguientes medidas de bondad de ajuste:  $R^2$ ,  $R^2$  ajustado, error cuadrático medio (MSE), el criterio de información de Akaike (AIC).

<b>(8-QO-Pt)-NLCA</b>			
Parámetro	Estimado	Error estándar	p-valor
$F_{max}$	75,3	2,3	<0,0001
$k$	0,23	0,02	<0,0001
<i>N: 22; R<sup>2</sup>: 0,96; R<sup>2</sup>-adj: 0,96; MSE: 31,43; AIC: 142,2</i>			
<b>(8-QO-Pt)-NLCB</b>			
Parámetro	Estimado	Error estándar	p-valor
$F_{max}$	90,3	1,3	<0,0001
$k$	0,12	0,01	<0,0001
<i>N: 22; R<sup>2</sup>: 0,99; R<sup>2</sup>-adj: 0,99; MSE: 8,14; AIC: 112,4</i>			
<b>8-QO-Pt libre</b>			
Parámetro	Estimado	Error estándar	p-valor
$F_{max}$	101,6	1,4	<0,0001
$k$	0,70	0,04	<0,0001
<i>N: 8; R<sup>2</sup>: 1,0; R<sup>2</sup>-adj: 1,0; MSE: 6,79; AIC: 41,7</i>			

Una cinética de primer orden significa que el dispositivo libera el fármaco de forma proporcional a la cantidad de fármaco que queda en su interior. A pesar de que es difícil conceptualizar este modelo en una base teórica (Bruschi, 2015b), es informativo comparar el valor de la constante cinética  $k$  (parámetro de escala) entre las formulaciones, ya que contiene información sobre la influencia de la formulación en la liberación del fármaco. Como se puede observar en la **Tabla 2.2**, mientras el compuesto 8-QO-Pt libre en la bolsa de diálisis muestra un  $k=0,7$ , las nanopartículas poseen valores de 0,23 y 0,12 (para NLCA y NLCB, respectivamente). En otras palabras, las nanopartículas pudieron controlar la velocidad de liberación al disminuir la constante cinética más de la mitad, en comparación con el compuesto 8-QO-Pt libre.

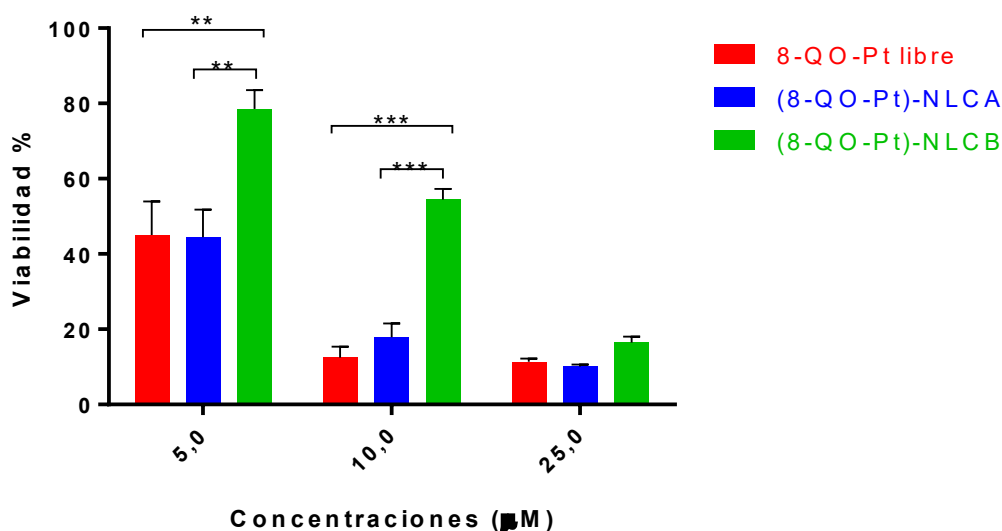


**Figura 2.11.** Perfiles de liberación (Medio  $\pm$  SD) de las nanopartículas (8-QO-Pt)-NLCA (azul), (8-QO-Pt)-NLCB (verde), y el compuesto libre 8-QO-Pt (rojo) durante 72 h (a), 24 h (b) y 12 h (c).

#### 2.2.4. Ensayos de citotoxicidad

Se realizó un ensayo de citotoxicidad celular para las NLC y el compuesto 8-QO-Pt libre en la línea celular de carcinoma de colon HT-29 mediante análisis MTT (**Figura 2.12**). Las células se trataron con concentraciones de 5,0, 10,0 y 25,0  $\mu$ M de 8-QO-Pt libre, (8-QO-Pt)-NLCA y (8-QO-Pt)-NLCB y las nanopartículas vacías (NLCA y NLCB)

durante 24 h. Los resultados mostraron que las NLC vacías no eran tóxicas, mientras que (8-QO-Pt)-NLCA y (8-QO-Pt)-NLCB mostraron un efecto citotóxico en las células HT-29 correlacionado con la concentración del fármaco. Los valores de viabilidad celular se redujeron al 45,0% (8-QO-Pt libre), 44,4% ((8-QO-Pt)-NLCA), 78,5% ((8-QO-Pt)-NLCB) para 5,0  $\mu$ M, 12,0% , 17,9%, 54,4% para 10,0  $\mu$ M y 11,0%, 10,1%, 16,5% para 25,0  $\mu$ M, respectivamente. Además, el tipo de aceite líquido tiene un efecto diferente sobre la viabilidad celular. (8-QO-Pt)-NLCA sintetizado con triglicérido cáprico exhibió mayor citotoxicidad que (8-QO-Pt)-NLCB sintetizado con aceite de oliva, pero mostró un efecto citotóxico similar al compuesto 8-QO-Pt libre. Este resultado se puede atribuir a que el compuesto 8-QO-Pt se liberó de forma controlada en función del tiempo desde la nanopartícula en 24 h. En la **Figura 2.11** se muestra que la liberación de 8-QO-Pt de NLCA y NLCB es aproximadamente del 75% en comparación con el 100% del fármaco libre, lo que significa que (8-QO-Pt)-NLCA posee aproximadamente un 25% más de efecto citotóxico que el fármaco libre. Esta ventaja podría ser significativa considerando una posible administración intravenosa en la que la formulación inyectada circule en el flujo sanguíneo para reducir los efectos secundarios indeseables.



**Figura 2.12.** Citotoxicidad celular de formulaciones de NLC cargadas con 8-QO-Pt en la línea celular HT-29. Citotoxicidad dependiente de la concentración del



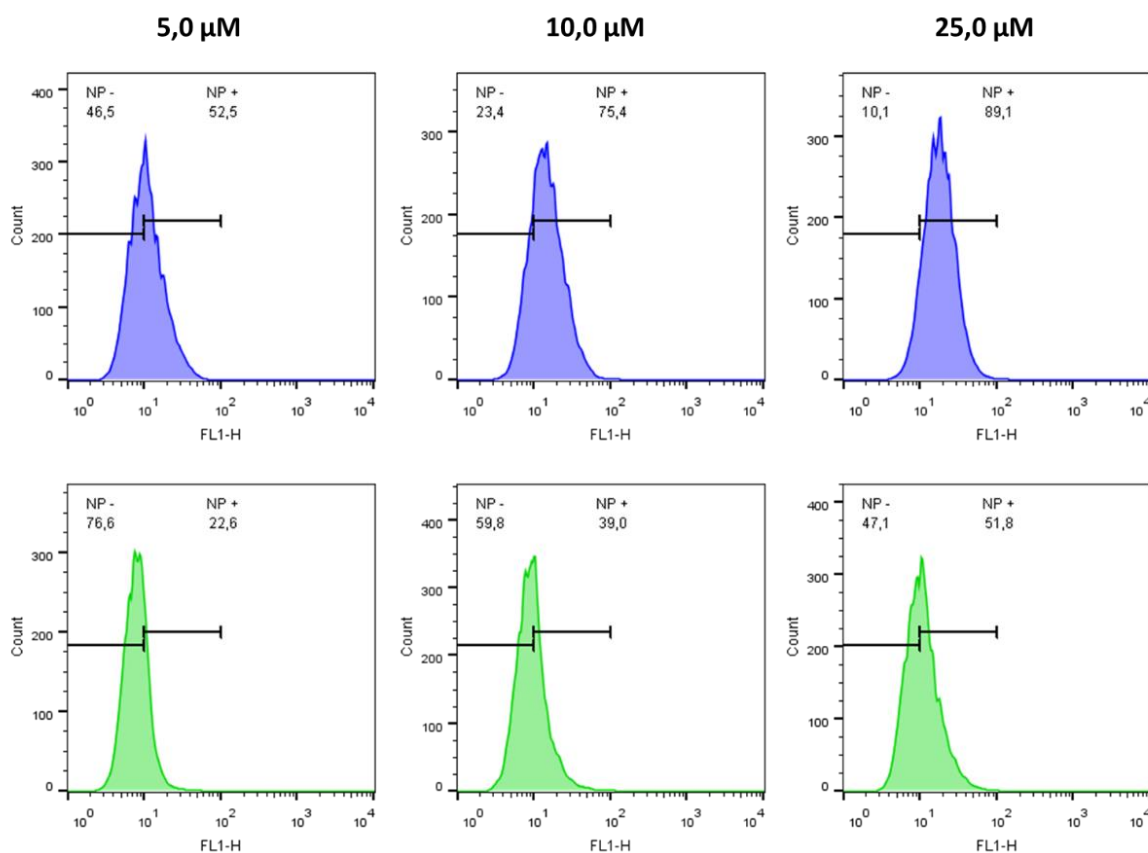
compuesto 8-QO-Pt libre y NLC cargados con 8-QO-Pt en células HT-29 durante 24 h. Los datos se muestran como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) (n= 9). ( $p^{**}< 0,003$ ;  $p^{***}< 0,0007$ ).

### 2.2.5. Captación celular de las NLC

Se realizó la captación celular de NLC en células HT-29 para evaluar la internalización de las nanopartículas. En primer lugar, las NLC se marcaron con la sonda fluorescente DiOC18 y, a continuación, las células se incubaron con las nanopartículas vacías marcadas utilizando tres concentraciones diferentes de NLCA y NLCB (cantidad equivalente para 5,0, 10,0 y 25,0  $\mu\text{M}$  de (8-QO-Pt)-NLCA y (8-QO-Pt)-NLCB) durante 6 h. Posteriormente, las señales fluorescentes fueron seguidas por citometría de flujo (**Figura 2.13**). Se observó que la captación celular de NLC aumentó directamente en correlación con sus concentraciones. Además, los resultados mostraron que NLCA era capaz de penetrar en las células HT-29 en mayor proporción que NLCB. **Tabla 2.3** muestra los valores medios de los porcentajes de captación celular para las formulaciones en las tres concentraciones. Estos datos confirmaron el resultado del ensayo de citotoxicidad y podrían explicar el mayor efecto de NLCA sobre NLCB .

Neves y colaboradores compararon las propiedades de captación celular de NLC y SLN y enfatizaron que las NLC exhibieron una mayor internalización en las células de carcinoma de colon debido a la presencia de aceite líquido (Neves *et al.*, 2016). Además de la presencia de aceite líquido, nuestro estudio también reveló la importancia del tipo de aceite líquido. Las NLC con triglicéridos cápricos lograron una mayor eficiencia de captación celular que las NLC con aceite de oliva. Safwat y colaboradores analizaron el efecto de 3 tipos de aceites líquidos (Labrafil<sup>®</sup>, Labrasol<sup>®</sup> y Labrafac lipophile<sup>®</sup>) sobre la actividad antitumoral de NLC. Las NLC cargados con simvastatina con Labrasol<sup>®</sup> mostraron la captación celular y el efecto citotóxico más altos en las células tumorales de mama MCF-7 (Safwat *et al.*, 2017). Lan y colaboradores informaron que el cisplatino recubierto de lípido mostró una captación celular mejorada en las

líneas celulares de cáncer CAL 27, SCC 15 y FaDu en comparación con el cisplatino libre (Lan *et al.*, 2018).



**Figura 2.13.** Captación celular de nanopartículas vacías (-) marcadas con DiOC18 de NLCA (azul) y NLCB (verde) en células HT-29 medidas por citometría de flujo. Las células se incubaron durante 6 h a la concentración equivalente a 5,0, 10,0, y 25,0  $\mu\text{M}$  de formulaciones de NLC cargadas con 8-QO-Pt (+).

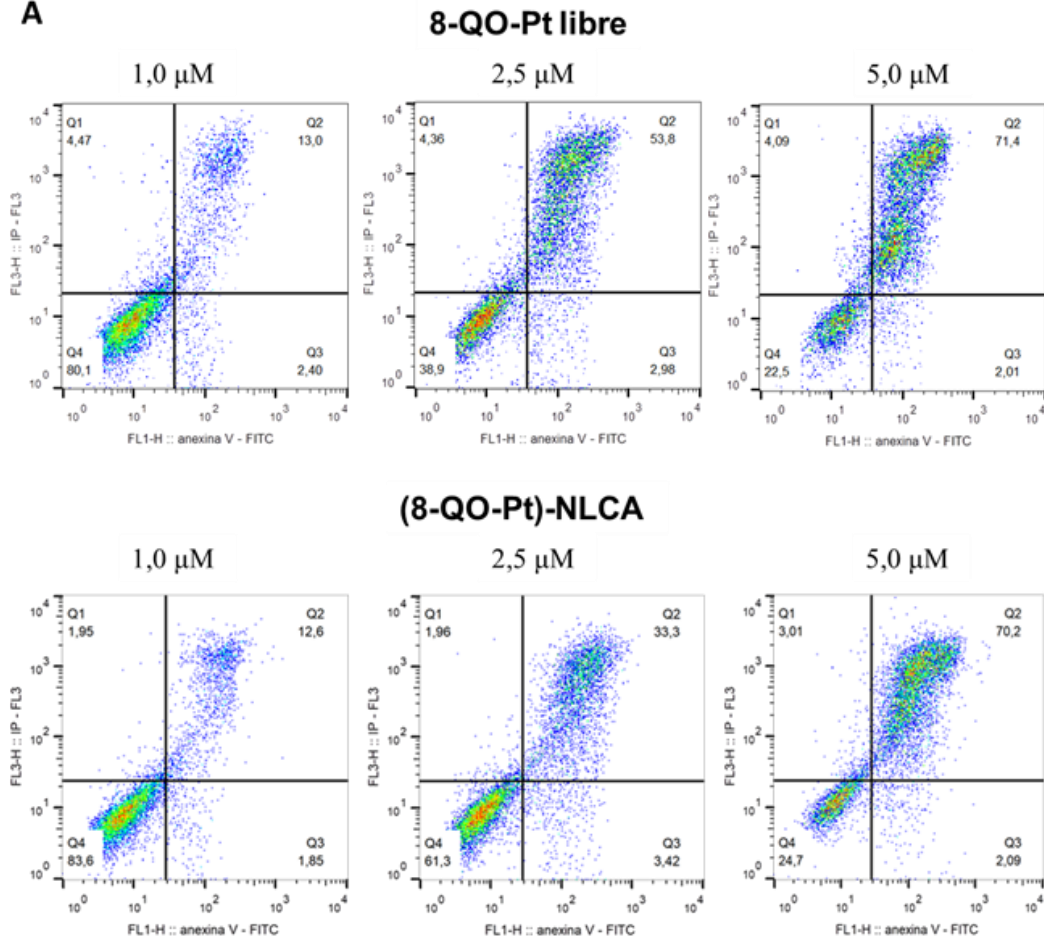
**Tabla 2.3.** La captación celular (%) para las formulaciones en las tres concentraciones.

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	NLCA (%)	NLCB (%)
5,0	54,7 $\pm$ 7,1	22,5 $\pm$ 2,7
10,0	72,1 $\pm$ 7,4	30,7 $\pm$ 11,7
25,0	88,1 $\pm$ 3,1	55,0 $\pm$ 9,4

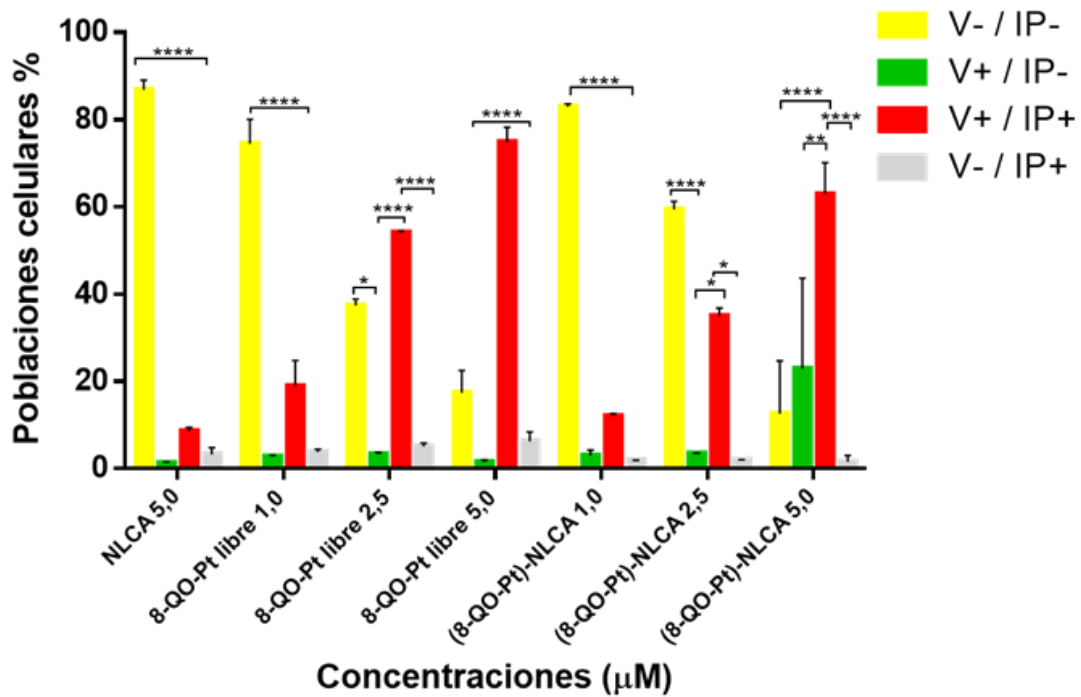
### 2.2.6. Apoptosis

Las células HT-29 se marcaron con el kit de detección de apoptosis de Anexina V-FITC/IP después de 48 h de tratamiento. La actividad antitumoral del compuesto 8-QO-Pt libre y (8-QO-Pt)-NLCA se confirmó mediante citometría de flujo (**Figura 2.14.A**). Se seleccionó a las (8-QO-Pt)-NLCA debido a su mayor citotoxicidad comprobada anteriormente. La **Figura 2.14.B** muestra el porcentaje de subpoblaciones vitales (V-/IP-), apoptóticas tempranas (V+/IP-), apoptóticas tardías (V+/IP+) y necróticas (V-/IP+). Los resultados demostraron que el compuesto 8-QO-Pt libre y (8-QO-Pt)-NLCA indujeron 13,0% y 12,6% para 1,0  $\mu$ M, 53,8% y 33,3% para 2,5  $\mu$ M, 71,4% y 70,3% de células en apoptosis tardía. (V+/IP+), respectivamente. Estos resultados confirman lo observado en los ensayos de viabilidad celular con resultados dependientes de la concentración en células tratadas con el compuesto 8-QO-Pt libre y (8-QO-Pt)-NLCA. Por otro lado, las nanopartículas vacías (control en este caso) exhibieron un nivel de apoptosis muy bajo. Los fármacos a base de platino muestran una estabilidad plasmática limitada y un bajo suministro, aunque sus efectos apoptóticos (Dilruba & Kalayda, 2016). La estabilidad del fármaco aumenta con la nanoencapsulación debido a la interacción del fármaco con el lípido (Puri *et al.*, 2009). Cacicedo y colaboradores demostraron que la actividad antitumoral de metvan se mejoró mediante la encapsulación de NLC. Este resultado se atribuyó a la propiedad de protección de fármacos inestables como el metvan por parte de la NLC y, por lo tanto, se produjo una mayor acumulación de fármaco en las células tumorales y provocó mayor apoptosis (Cacicedo *et al.*, 2019).

**A**



**B**



**Figura 2.14.** Efectos apoptóticos del compuesto 8-QO-Pt libre y (8-QO-Pt)-NLCA a 1,0  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$  y 5,0  $\mu\text{M}$  después de 48 h de incubación con células HT-29. (A) muestra los dot-plot obtenidos del análisis por citometría de flujo y (B) muestra el porcentaje de subpoblaciones vitales (V-/IP-), apoptóticas tempranas (V+/IP-), apoptóticas tardías (V+/IP+) y necróticas (V-/IP+).

# Capítulo 3

## *Sistema 2: Desarrollo De Los Sistemas De NLC Funcionalizados con RFV*

### **3.1. Materiales y métodos**

#### **3.1.1. Materiales**

Para la preparación de las formulaciones se utilizó un lípido sólido a temperatura ambiente miristil miristato (cera, Crodamol® MM, punto de fusión de alrededor de 41 °C). Análogamente a lo comentado en el capítulo anterior (ver Sección 2.2.1.) también se incluyó un aceite compuesto por triglicéridos de cadena media (aceite, Crodamol® GTCC-LQ, punto de fusión de -4 °C). La riboflavina, el surfactante poloxámero 188 (Kolliphor® P188), y el perclorato de 3,3'-dioctadeciloxacarbocianina (DiOC18) se adquirieron de Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina). DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles Medium*) y TrypLE™ se adquirieron de Gibco (Gaithersburg, MD, EE.UU.). El FBS (suero fetal bovino) fue comprado a Internegocios S.A. (Argentina). Anexina V, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ioduro de propidio (IP) y sal de tetrazolio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio-bromuro) de Invitrogen Co. (Buenos Aires, Argentina). Otros reactivos de grado analítico fueron adquiridos en fuentes comerciales disponibles y se usaron tal como se recibieron de Merck (Darmstadt, Alemania) o una marca similar.

#### **3.1.2. Preparación de las formulaciones**

Las formulaciones de NLC/RFV cargadas con compuesto 8-QO-Pt se sintetizaron mediante la técnica de ultrasonificación (Boztepe *et al.*, 2021). Se añadieron diferentes

proporciones de RFV a las fases lipídica o acuosa según la **Tabla 3.1**. Para la primera formulación (R1-8-QO-Pt-NLC), se fundieron 400 mg de miristil miristato (MM) (2,0%, p/v) en un baño de agua a 70 °C y se mezclaron con 2,0 mg del 8-QO-Pt, previamente disuelto en 200 µL de triglicérido cáprico (1,0%, v/v). A la fase lipídica se añadieron 20 mL de una solución acuosa caliente con 10,0 mg de RFV (0,05%, p/v) y Poloxámero 188 (4,5%, p/v). Instantáneamente, la mezcla se ultrasonicó al 65% de amplitud durante 30 min utilizando una sonda de punta de titanio de 6 mm (procesador ultrasónico, Cole Parmer, EE.UU., 130 Watts). Después de la sonicación, la formulación se enfrió a temperatura ambiente y se almacenó a 4 °C para estudios adicionales. Por otro lado, en la segunda formulación (R2-8-QO-Pt-NLC) la RVF (10,0 mg) se incorporó directamente a la fase lipídica, mientras que en la tercera (R3-8-QO-Pt-NLC) Se incorporaron 5,0 mg de RVF en la fase acuosa y 5,0 mg de RFV en la fase lipídica antes de mezclar.

**Tabla 3.1.** La cantidad de RFV en las formulaciones.

<b>Formulaciones</b>	<b>Fase RFV (mg)</b>	
	<b>Acuosa</b>	<b>Lipídica</b>
R1-8-QO-Pt-NLC	10,0	-
R2-8-QO-Pt-NLC	-	10,0
R3-8-QO-Pt-NLC	5,0	5,0

### 3.1.3. La eficiencia de encapsulación

Se determinó la eficiencia de encapsulación (EE,%) utilizando las ecuaciones presentadas en el Capítulo 2 (**Ecuación 2.1**). Se transfirió un volumen de 500 µL de cada formulación a un filtro centrifugó de corte (MWCO 10.000 Da., Microcon®, Millipore, MA, EE.UU.) y se centrifugó a 12.000 ×g durante 30 min. El 8-QO-Pt en el filtrado se midió por HPLC.

### **3.1.4. Tamaño de partículas, índice de polidispersidad (PDI), potencial zeta y microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

El diámetro promedio y la distribución del tamaño de partícula de las NLC se midieron mediante dispersión de luz dinámica (DLS) (Nano ZS Zetasizer, Malvern Instruments Co., Reino Unido) a 25 °C en cubetas de poliestireno con un espesor de 10 mm. Las mediciones se llevaron a cabo en células capilares de 10 mm de paso óptico, utilizando agua desionizada (Milli-Q®, Millipore, MA, EE.UU.). También se determinaron los valores de PDI y los potenciales Zeta ( $\zeta$ ). Todas las medidas se realizaron por triplicado para obtener el valor medio.

El análisis TEM se realizó con un microscopio Jeol-1200 EX II-TEM (Jeol, MA, EE.UU.). En primer lugar, las formulaciones de NLC se diluyeron 10 veces con agua ultrapura Milli-Q® y se esparcieron 10  $\mu$ L de la muestra sobre una rejilla de cobre recubierta de colodión (400 mallas). El exceso de líquido se eliminó con papel de filtro y, para mejorar el contraste, se agregó una gota de ácido fosfotúngstico a las muestras.

### **3.1.5. Ensayo de liberación *in vitro***

El ensayo de liberación del fármaco *in vitro* se realizó utilizando dispositivos de diálisis Float-A-Lyzer®G2 (MWCO: 100 kDa). Los dispositivos de diálisis se empaparon previamente en etanol al 10% durante 10 min y luego se dejaron en agua destilada durante 20 min. A continuación, los dispositivos se llenaron con 2,0 mL de cada formulación y se sumergieron en 15 mL de una solución de alcohol isopropílico al 30% a 37 °C, con agitación continua a 200 rpm (Rohrs, 2001; *The United States Pharmacopeia 42. United States Pharmacopeia Convention, Rockville, MD, 2019*). Para la liberación libre del fármaco, se disolvieron 2,5 mg del 8-QO-Pt en 25 mL de medio de liberación y se transfirieron 2,0 mL de la solución al dispositivo de diálisis. Se extrajeron muestras de 200  $\mu$ L a intervalos regulares durante 24 horas y se midió la concentración del fármaco mediante HPLC.



### 3.1.6. Método para la cuantificación de 8-QO-Pt en HPLC

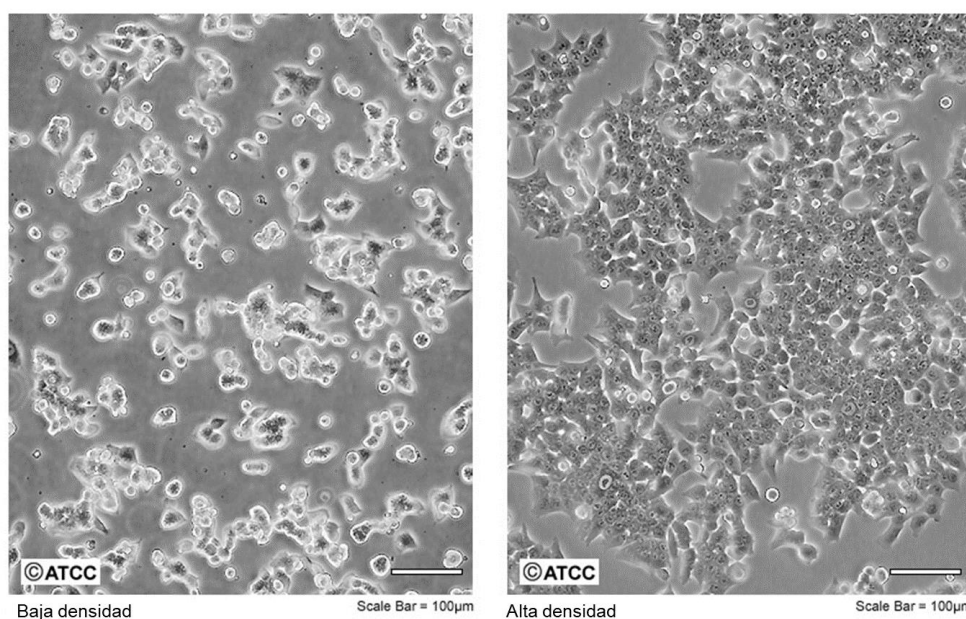
El análisis cromatográfico se realizó mediante HPLC (Gilson SAS, Villiers-Le-Bel, Francia) con detección UV-DAD y un Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, California, USA) columna como fase estacionaria. La fase móvil consistió en una mezcla de metanol y agua (55:45). El sistema se hizo funcionar isocráticamente a un caudal de 0,6 ml/min y la detección se realizó a 262 nm. Las muestras se diluyeron con fase móvil y se centrifugaron (15.000 xg durante 5 min a 4 °C) antes de su inyección (20 µL). La linealidad, precisión y especificidad del método se validaron en el rango de concentraciones esperadas (0,25 – 50,00 µg/mL).

### 3.1.7. Ensayo de citotoxicidad celular

Además de la línea celular HT-29 (ver sección 2.2.8.1), se incluyeron en el estudio las células tumorales HCT 116. HCT 116 (células de carcinoma de colon humano) se obtuvieron de la *American Type Culture Collection* (ATCC<sup>®</sup>, CCL-247<sup>™</sup>) (**Figura 3.1**). La línea celular HCT 116 derivada de un hombre de 44 años, carcinoma de colon clasificación D en la escala de Dukes, sobreexpresa la glicoproteína CD44 en membrana y el receptor EGFR y tiene una mutación en el codón 13 del protooncogén ras. La misma tiene un genotipo y fenotipo metastásico mayor que las HT-29.

Las células se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco, Invitrogen Co., EE.UU.) suplementado con FBS al 10% (Internegocios, Buenos Aires, Argentina) y antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina; Gibco, Invitrogen Corporation, EE.UU.) a 37 °C y en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>. El ensayo de citotoxicidad celular se realizó utilizando el reactivo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Mosmann, 1983). Las células se sembraron en una placa *multiwell* de 96 y se cultivaron a 37 °C durante 24 h. Para el ensayo de citotoxicidad, las células se trataron con diferentes concentraciones (2,5, 5,0, 7,5 y 10,0 µM) para HT-29 y (2,5, 5,0 y 10,0 µM) para HCT 116 de 8-QO-Pt libre, R1-8-

QO-Pt-NLC, R2-8-QO-Pt-NLC y R3-8-QO-Pt-NLC en DMEM sin suero durante 24 h. Después de este tratamiento, las células se lavaron con PBS y se incubaron con 0,5 mg/mL de MTT en medio DMEM suplementado durante 3 h. A continuación, se leyó espectrofotométricamente la absorbancia en un lector de microplacas (*multiplate reader multiscan* FC, Thermo Scientific, Ma, EE.UU.) a 570 nm. La viabilidad celular se expresó como el porcentaje (%) del valor del control sin tratar (100% de supervivencia).



**Figura 3.1.** Fotografías de la línea celular HCT 116, obtenidas de la página de *American Type Culture Collection* de líneas celulares (<https://www.atcc.org/>).

### 3.1.8. El ensayo de captación celular

El ensayo de captación celular se realizó utilizando formulaciones vacías (-) de NLC/RfV (R1-NLC, R2-NLC y R3-NLC) cargadas con la sonda fluorescente verde DiOC18 ( $\lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{em}} = 484/501$  nm) añadiendo 1,0 mg de DiOC18 a la fase lipídica a 70 °C. Las formulaciones marcadas con DiOC18 se sintetizaron mediante ultrasonidos como se mencionó anteriormente. El DiOC18 se incorporó al 100% en las NLC. Se utilizó citometría de flujo para evaluar la internalización de las nanopartículas marcadas en las células HT-29 y HCT 116. Las células se sembraron en una placa de 12 pocillos para

permitir que se adhirieran a las superficies inferiores de los pocillos durante 24 h. Posteriormente, las células se trataron con 2,5  $\mu\text{M}$  para HT-29 y 0,5  $\mu\text{M}$  para HCT 116 de las formulaciones durante 24 h. Después de 24 h de tratamiento, las células se lavaron con PBS y se trataron con 300  $\mu\text{L}$  de TrypLE™ hasta que las células se despegaron de la superficie. A continuación, se colocaron 600  $\mu\text{L}$  del medio que contenía suero en cada pozo y las células se transfirieron a los tubos Eppendorf y se centrifugaron a 2.500  $\times\text{g}$  a 4 °C durante 5 min. Los sobrenadantes se separaron con cuidado y los sedimentos se lavaron una vez con PBS. Posteriormente, los sedimentos se dispersaron en 200  $\mu\text{L}$  de PBS. La fluorescencia fue analizada por *FACSCalibur* (Becton–Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) y los valores fueron leídos por el software FlowJo 7.6.

### **3.1.9. Ensayo de apoptosis**

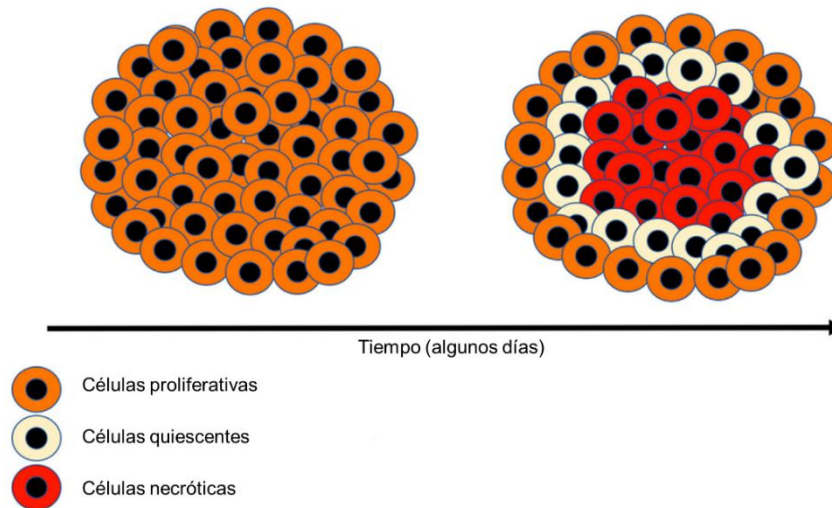
Las células apoptóticas tempranas y tardías se determinaron mediante tinción con anexina V-FITC y IP. Las células se sembraron en una placa de 12 pocillos durante 24 h después y se trataron con dos concentraciones diferentes (2,5 y 5,0  $\mu\text{M}$ ) para HT-29 y (1,0 y 2,5  $\mu\text{M}$ ) para HCT 116 de las formulaciones durante 24 h. Después del tratamiento y para la tinción, las células se lavaron con PBS y se diluyeron con tampón de unión 1X, Anexina V-FITC y IP, y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min antes del análisis. Las células se recogieron mediante citometría de flujo (BD FACSCalibur™) y los resultados se analizaron mediante el software FlowJo 7.6. Para cada análisis, se registraron 10.000 recuentos sincronizados en el gráfico de puntos FSC frente a SSC. Se definieron cuatro subpoblaciones en el diagrama de puntos: el vital no dañado (FITC-/IP-), el vital dañado mecánicamente (FITC-/IP+), el apoptótico temprano (FITC+/IP-) y el apoptótico tardío (FITC+/IP+) subpoblaciones.

### **3.1.10. Sistema de cultivo 3D, Esferoides**

Los agregados celulares fuertemente unidos en forma de esfera 3D, conocidos como esferoides, son modelos de cultivo celular 3D *in vitro*. En comparación con las

monocapas 2D, los modelos 3D representan más fielmente la complejidad de diferentes tejidos humanos sanos y no sanos. Los esferoides pueden estar compuestos por diferentes tipos de células como ocurre en el microambiente tumoral y por lo tanto, se establece la señalización célula-célula, a través de factores de crecimiento e interacciones físicas célula-célula (p. ej., E-cadherinas) (Costa *et al.*, 2018). Los esferoides tumorales multicelulares (MCTS) tienen la capacidad de imitar la intrincada estructura tridimensional del tejido tumoral *in vivo*. Al igual que el tejido tumoral nativo, las células cultivadas como MCTS exhiben distintos gradientes de proliferación que reflejan los gradientes de distribución de oxígeno, nutrientes y energía. Además, también muestran la acumulación de metabolitos desde las regiones externas a las internas de los esferoides (Wenzel *et al.*, 2014)

Los esferoides que tienen más de 500  $\mu\text{m}$  de diámetro comienzan a tener núcleos necróticos debido a los gradientes anteriores, que están rodeados por una capa de células quiescentes y células proliferativas en la superficie del esferoide (**Figura 3.2**) (Bouchalova & Bouchal, 2022). Las células quiescentes en particular son difíciles de tratar y representan la mayor limitación para la eliminación del cáncer en los pacientes. El efecto citotóxico de la mayoría de los fármacos de quimioterapia convencionales depende del ciclo celular, mientras que las células quiescentes no se verán afectadas por estos agentes (Zhang *et al.*, 2015). Es crucial para evaluar los tratamientos contra el cáncer que los esferoides más grandes desarrollen necrosis central y áreas de hipoxia, que se observan en muchos tumores. Para un análisis preciso de la eficacia de los medicamentos, los microambientes celulares como la hipoxia, que se ha implicado como una fuente de resistencia a los fármacos, se pueden replicar y producir dentro de los esferoides. Además, la matriz extracelular en los tumores limita la penetración de las nanopartículas utilizadas en la obtención de imágenes y el tratamiento del cáncer. Los esferoides proporcionan excelentes modelos para estudiar cómo los medicamentos y sus portadores ingresan a los órganos y tejidos (Mehta *et al.*, 2012).



**Figura 3.2.** Una configuración de cultivo de cáncer esferoide (Velliou *et al.*, 2020).

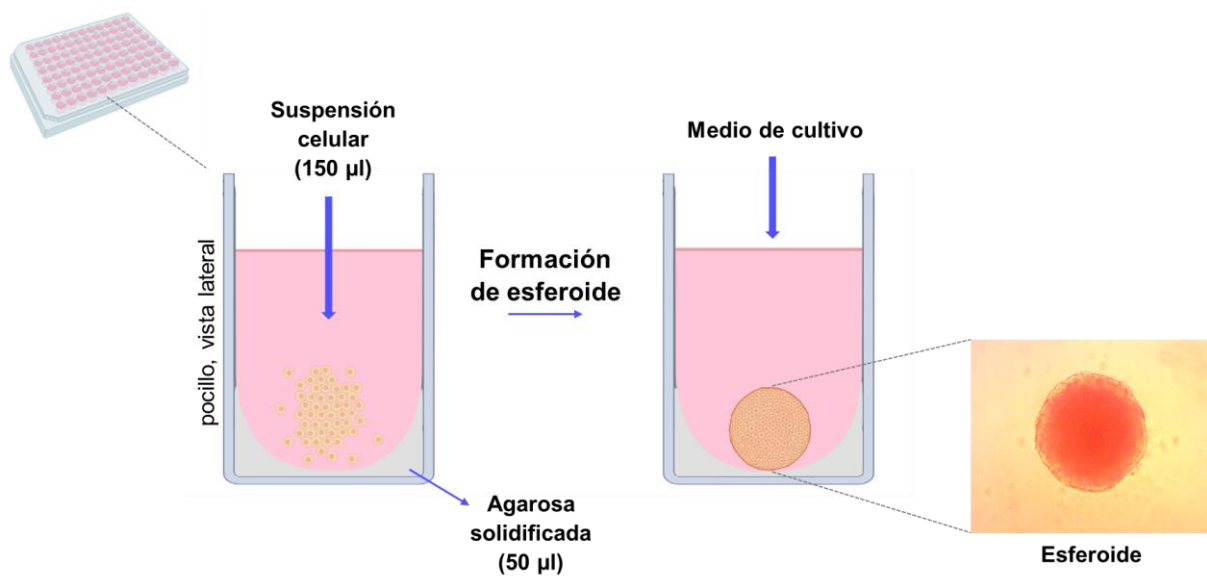
### 3.1.10.1. Formación de los esferoides de HCT 116

Existen diferentes técnicas para la generación de MCTs que incluyen *hanging drop*, *spinner flask*, *liquid overlay*, *roller bottle*, *surface modified scaffolds* y *microfabricated microstructures culture* (Khanna *et al.*, 2020). En este estudio, se utilizó la técnica *liquid overlay* para formar los esferoides de HCT 116 (**Figura 3.3**). Los esferoides se cultivan en suspensión líquida sobre una superficie no adhesiva como la agarosa (Carlsson & Yuhas, 1984). Por tanto, las interacciones célula-célula son más prominentes que las que se establecen entre las células y la superficie. En consecuencia, las células se agregan para formar esferoides a lo largo de 1 a 3 días, para la mayoría de las líneas celulares. Los esferoides producidos con un número de células inicial mayor (1000 células/pocillo) alcanzaron tamaños superiores a 500  $\mu\text{m}$  (aproximadamente después de 7 días de cultivo) (Costa *et al.*, 2018).

Las ventajas de la técnica *liquid overlay* son las siguientes: no requiere de un equipo especializado, es una técnica económica, es fácil de manejar y permite la producción a gran escala de esferoides. La variación en tamaño y forma podría mostrarse como una desventaja (Costa *et al.*, 2018).

La formación de los esferoides de HCT 116 se logró siguiendo las indicaciones reportadas por Klutzny y colaboradores (Klutzny *et al.*, 2017). Se gelificó agarosa al

1,5% durante 2 min, en microondas a potencia media. Se colocó 50  $\mu$ l de la misma en una placa de 96 pocillos y se dejó en el flujo hasta su solidificación. Luego el frasco con las células se lavó con PBS, se levantó con TrypLE™, y se adicionó el medio completo. Se contaron las células en el microscopio, para obtener la concentración deseada. Luego se procedió a sembrar 150  $\mu$ l de la dilución celular en cada pocillo (1200 células/pocillo). Finalizado el procedimiento se incubó en una estufa a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 7 días. El medio se cambió el día 4 y se dejó 3 días más. El día 7, los esferoides se trataron.

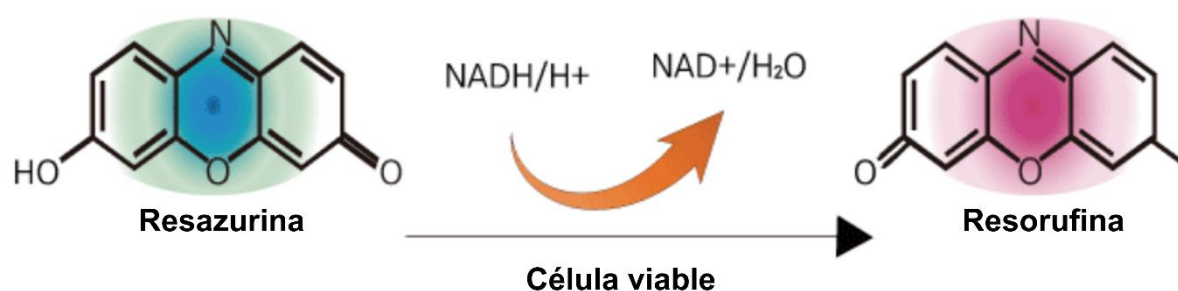


**Figura 3.3.** Técnica *liquid overlay*

### 3.1.10.2. Evaluación de la citotoxicidad en modelos 3D

El ensayo de viabilidad celular de resazurina es un ensayo fluorescente que detecta la actividad metabólica celular. La resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona 10-óxido) es una sonda azul no fluorescente reducida irreversiblemente por una enzima deshidrogenasa a la resorufina fluorescente de color rosa, en células metabólicamente activas (**Figura 3.4**). Se describen varios mecanismos para la reducción de la resazurina por células viables que usan NADH y NADPH como fuentes de electrones. Estos incluyen la reducción por enzimas mitocondriales o microsomales y por enzimas en la

cadena respiratoria. La resazurina y la resorufina también muestran diferentes propiedades espectrales; el máximo de absorbancia de la resazurina se encuentra en 605 nm y el de la resorufina en 573 nm. Pero solo la resorufina se puede determinar fluorimétricamente, en oposición a la resazurina (Präbst *et al.*, 2017). El ensayo de la resazurina es simple, rápido, sensible, reproducible, y prueba ser no tóxico para evaluar la viabilidad celular *in vitro* (Pereira *et al.*, 2020).



**Figura 3.4.** El principio del ensayo de viabilidad celular de resazurina (*Biomaxmall*, n.d.).

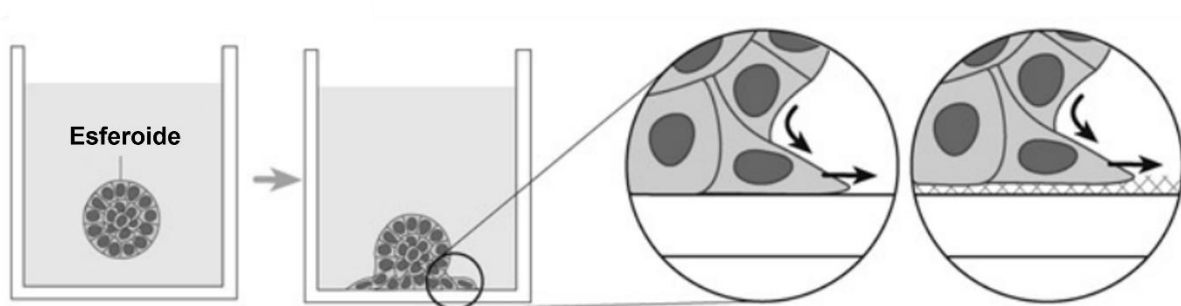
Para realizar este experimento se formaron los esferoides en 7 días, y luego se trataron con distintas concentraciones del 8-QO-Pt libre, R1-8-QO-Pt-NLC y R1-NLC, por 24 h. Luego se agregó sobre esa mezcla, 10  $\mu$ L de resazurina. La resazurina se incubó *overnight*. Pasado este tiempo, se procedió a la lectura de la fluorescencia en un espectrofluorómetro Shimadzu RF-6000 a longitudes de onda  $\lambda_{exc}$ = 560 nm y de  $\lambda_{emi}$ = 590 nm. Como blanco para el 8-QO-Pt libre y control medio, se realizaron pocillos que contenían DMEM y resazurina y se usaron DMEM, R1-NLC y resazurina para R1-8-QO-Pt-NLC y R1-NLC. La viabilidad fue expresada como porcentaje de las células control.

### 3.1.10.3. Migración de células 3D

La migración celular es una característica crucial esencial para varios procesos biológicos, incluido el desarrollo normal, la respuesta inmunitaria y la progresión de enfermedades como la metástasis del cáncer y la inflamación (Justus *et al.*, 2014). La

estructura 3D del esferoide representa una morfología más fisiológica similar a un tejido con contactos estrechos entre células y diferentes estados celulares en lo que respecta al suministro de nutrientes y oxígeno. Con respecto a la biología del tumor, la migración de células fuera de pequeños grupos de cáncer se puede imitar con este estudio (Kramer *et al.*, 2013).

Se producen esferoides multicelulares y se colocan en placas de cultivo de tejidos convencionales. Los esferoides se adhieren a la superficie y las células comienzan a moverse concéntricamente hacia afuera (**Figura 3.5**) (Kramer *et al.*, 2013). El aumento en el área de esparcimiento se puede medir con el tiempo.



**Figura 3.5.** Ensayo de migración de esferoides (Kramer *et al.*, 2013).

Se obtuvieron los esferoides de HCT 116 por el método de *liquid overlay*. Al séptimo día se formaron los esferoides, se trataron con distintas concentraciones del 8-QO-Pt libre, R1-8-QO-Pt-NLC y R1-NLC, por 24 h. Al día siguiente, los esferoides tratados se transfirieron a una placa convencional de 48 pocillos que contenía 500  $\mu$ L de DMEM más FBS al 10%. Se permitió que los esferoides se adhirieran y, después de 48 h, se tiñeron para revelar los resultados. En primer lugar, el medio se retiró cuidadosamente con una micropipeta y luego se lavó con PBS. Se fijó con metanol por 15 min y luego se colocó Giemsa al 5% por 10 min. Después de colorear, se tomaron fotos usando un microscopio invertido. Con el software ImageJ se midió la distancia de las extensiones desde el centro de los esferoides hasta el extremo de la migración y se realizó la comparación con los esferoides tratados y sus controles.



### **3.1.11. Ensayo de hemotoxicidad**

La sangre venosa se obtuvo de donantes sanos previo consentimiento informado por escrito y se recogió en tubos heparinizados. Luego, la sangre completa se diluyó en una placa de seis pocillos con medio de cultivo Ham F12 con FBS al 10% en un volumen final de 2,0 ml. Cada cultivo se expuso a diferentes tratamientos con 8-QO-Pt libre, RFV libre, sus combinaciones (8-QO-Pt y RFV) y formulaciones vacías o cargadas con 8-QO-Pt de NLC/RFV de acuerdo con cada experimento específico y se mantuvo en el cultivo a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h y 48 h. La hemoglobina liberada se cuantificó mediante la absorbancia leída a 540 nm en un espectrofotómetro TECAN-infinite M200 Pro para determinar el porcentaje de eritrocitos lisados. La hemólisis total (100%) se logró incorporando Triton X-100 al medio, mientras que la solución fisiológica se utilizó como control negativo.

### **3.1.12. Análisis estadístico**

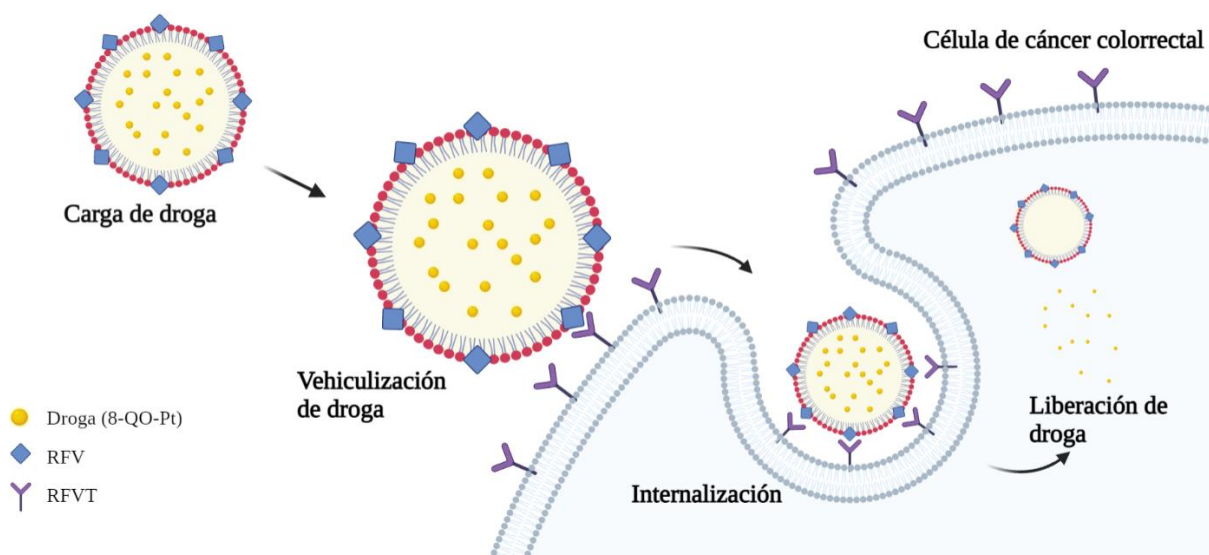
Todos los experimentos se realizaron con un mínimo de 3 réplicas independientes. Las comparaciones de medias se realizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de 5,0% ( $\alpha= 0,05$ ) seguido de la prueba de diferencias mínimas significativas de Fisher.

## 3.2. Resultados y discusión

### 3.2.1. Desarrollo de formulaciones y morfología de nanopartículas

Tomando como base los resultados obtenidos en el capítulo 2 se decidió continuar los estudios de este capítulo con las NLCA.

En esta parte, el objetivo fue diseñar, sintetizar, caracterizar y evaluar la actividad antitumoral de nuevas NLC cargadas con 8-QO-Pt funcionalizadas con RFV para el tratamiento del cáncer de colorrectal (**Figura 3.6**).



**Figura 3.6.** Esquema de administración de fármaco específicos de tumores dirigidos por RFV mediante NLC.

Las matrices lipídicas sintetizadas en este capítulo están compuestas por miristil miristato (MM, lípido sólido), triglicérido cáprico (lípido líquido), el surfactante Poloxámero 188 y la fase de RFV la cual fue modificada de acuerdo con la formulación. Las formulaciones en estudio fueron: R1-8-QO-Pt-NLC que contenía 10,0 mg de RFV en fase acuosa; R2-8-QO-Pt-NLC, 10,0 mg de RFV en la fase lipídica y finalmente R3-8-QO-Pt-NLC que contiene 5,0 mg de RFV en la fase acuosa y 5,0 mg de RFV en la fase lipídica. Las preparaciones se realizaron antes de la mezcla y la ultrasonicación.

Las tres formulaciones cargadas con 8-QO-Pt mostraron un EE (%) superior al 70%. Las eficiencias de encapsulación de las formulaciones de NLC/RFV cargadas con 8-QO-Pt (+) se muestran en la **Tabla 3.2**.

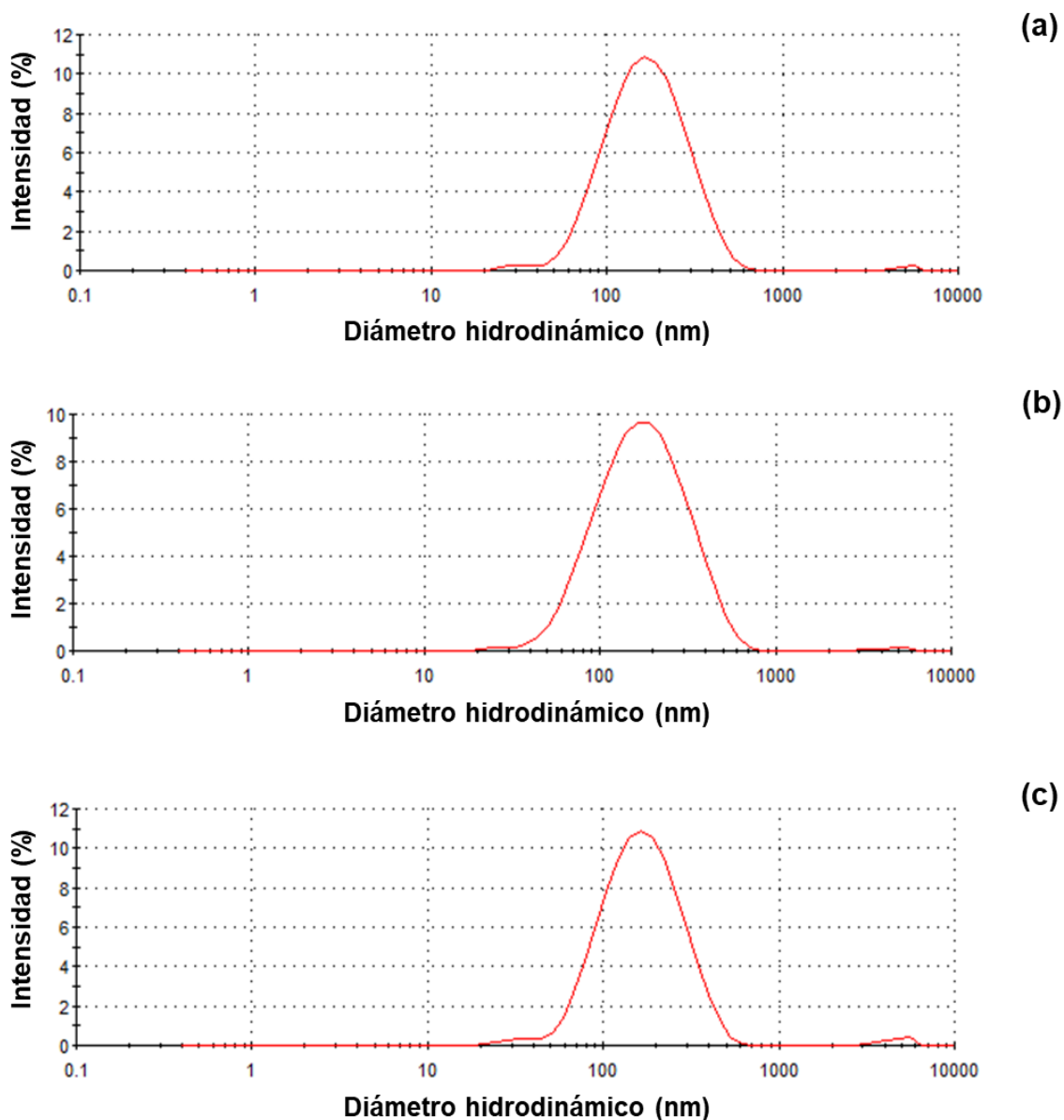
**Tabla 3.2.** Eficiencia de encapsulación de las formulaciones de NLC/RFV (EE,%).

<b>Formulaciones</b>	<b>Encapsulación de 8-QO-Pt (%)</b>
R1-8-QO-Pt-NLC	74,6 ± 1,7
R2-8-QO-Pt-NLC	79,4 ± 1,1
R3-8-QO-Pt-NLC	79,5 ± 2,3

Los valores de diámetro medio, índice de polidispersión (PdI) y Z-pot ( $\zeta$ ) de las formulaciones (con y sin el fármaco) se enumeran en la **Tabla 3.3**. Todas las formulaciones mostraron una distribución de tamaño estrecha con tamaños de partícula promedio de  $144,50 \pm 2,04$  a  $175,00 \pm 1,18$  nm. Estos resultados evidenciaron que la RFV no afectó significativamente el tamaño de partícula de las formulaciones de NLC/RFV cargadas con 8-QO-Pt (+). Las mediciones de DLS de las formulaciones de NLC/RFV cargadas con 8-QO-Pt (+) mostraron un máximo (**Figura 3.7**). Los tamaños de partícula fueron sustancialmente monodispersas con valores de PdI de alrededor de 0,2 excepto R2-NLC, que es inferior al límite máximo óptimo de 0,3 (Schärtl, 2007; Scioli Montoto *et al.*, 2018). El valor  $\zeta$  es una medida de la carga eléctrica efectiva en la superficie de las nanopartículas y también es uno de los indicadores de estabilidad de los sistemas coloidales. Las formulaciones cargadas con 8-QO-Pt (+) exhibieron un  $\zeta$  negativo más bajo que los controles. Los valores de  $\zeta$  tienden a disminuir en presencia de un compuesto de platino en las formulaciones (Xian *et al.*, 2016).

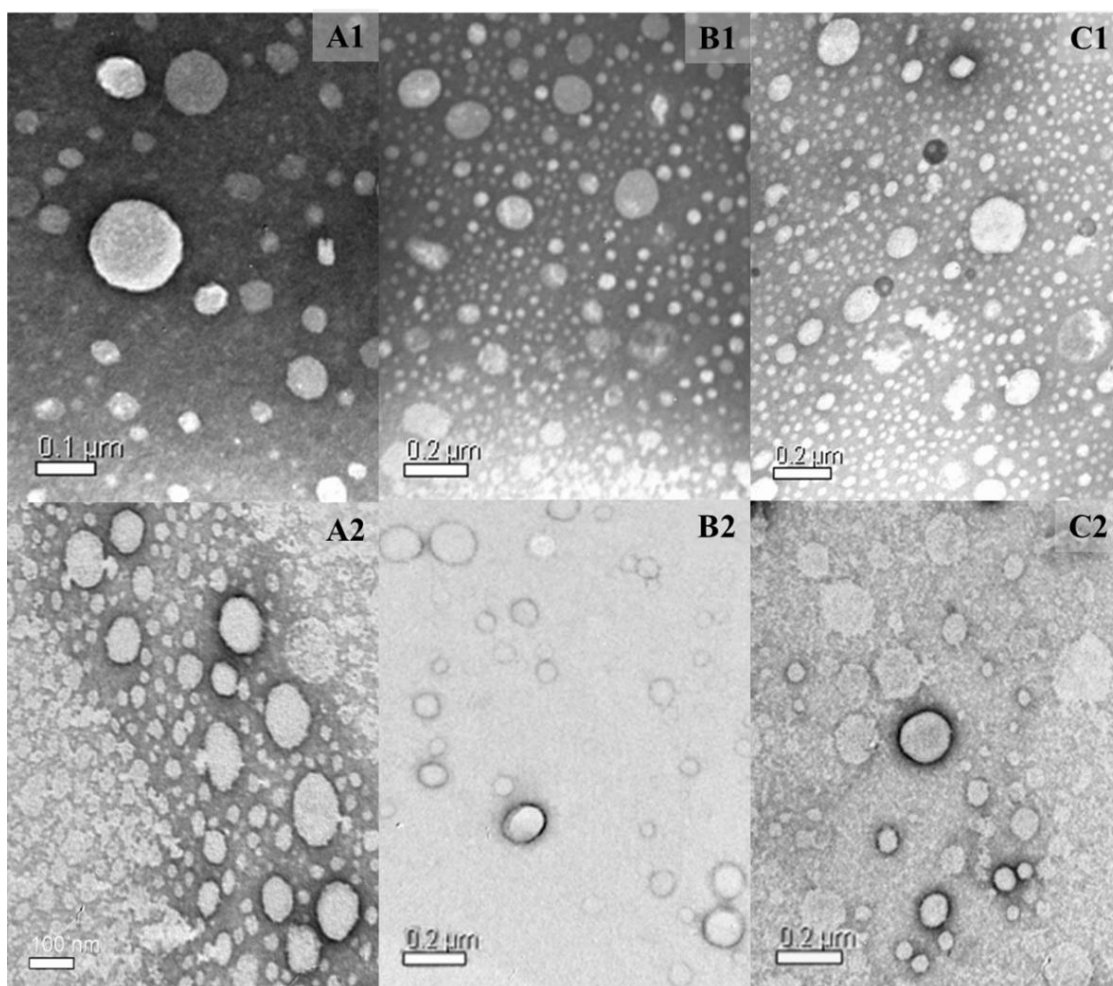
**Tabla 3.3.**  $Z_{av}$ , PDI y Z-pot de NLC obtenidos por DLS.  $Z_{av}$ : tamaño promedio (nm); PDI: índice de polidispersidad; Pote Z:  $\zeta$  (mV). Todos los valores son la media y la desviación estándar (n= 3).

<b>Formulaciones</b>	<b><math>Z_{av}</math> (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b><math>\zeta</math> (mV)</b>
R1-NLC	162,6 $\pm$ 6,6	0,29 $\pm$ 0,03	-6,14 $\pm$ 0,53
R2-NLC	175,0 $\pm$ 1,2	0,35 $\pm$ 0,04	-9,39 $\pm$ 1,69
R3-NLC	145,7 $\pm$ 1,4	0,24 $\pm$ 0,01	-13,30 $\pm$ 0,70
R1-8-QO-Pt-NLC	146,5 $\pm$ 1,6	0,23 $\pm$ 0,00	-5,75 $\pm$ 0,51
R2-8-QO-Pt-NLC	149,3 $\pm$ 0,8	0,24 $\pm$ 0,00	-8,27 $\pm$ 0,19
R3-8-QO-Pt-NLC	144,5 $\pm$ 2,0	0,23 $\pm$ 0,01	-11,70 $\pm$ 0,20



**Figura 3.7.** Distribución de tamaño de las formulaciones de NLC/RFV cargadas con 8-QO-Pt (+); R1-8-QO-Pt-NLC (a), R2-8-QO-Pt-NLC (b), R3-8-QO-Pt-NLC (c).

El TEM fue empleado para evaluar la morfología y la distribución de tamaños de las nanopartículas. Las imágenes de TEM mostraron que las nanopartículas tienen forma esférica. Además, la incorporación de 8-QO-Pt y RFV no influyó en la morfología de las nanopartículas (**Figura 3.8**).



**Figura 3.8.** Imágenes TEM de las nanopartículas de NLC/RfV; R1-8-QO-Pt-NLC (A1), R1-NLC (A2), R2-8-QO-Pt-NLC (B1), R2-NLC (B2), R3-8-QO-Pt-NLC (C1), R3-NLC (C2).

### 3.2.2. Ensayo de liberación *in vitro*

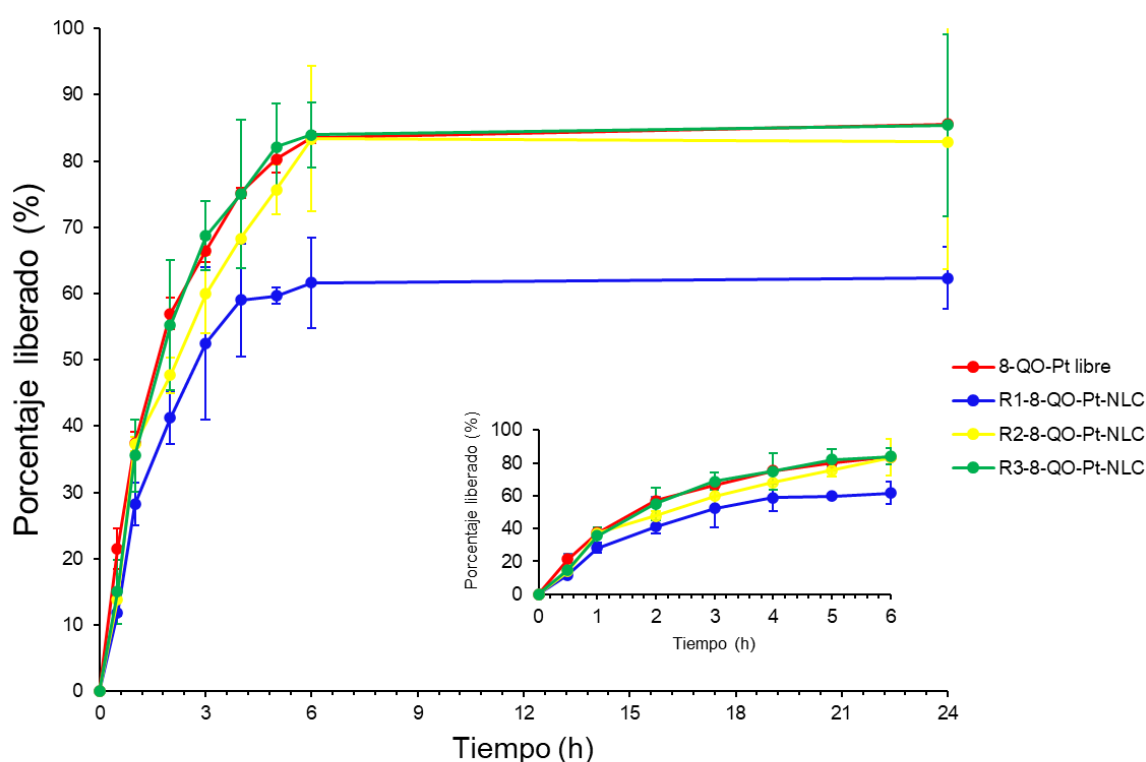
Los estudios de liberación *in vitro* de 8-QO-Pt del NLC se realizaron por el método de diálisis utilizando una solución de alcohol isopropílico al 30% (pH = 7,3) como medio de liberación. Se transfirieron 2,0 mL de cada formulación al dispositivo de diálisis Float-A-Lyzer® G2 y se analizó la liberación de 8-QO-Pt de las nanopartículas en función del tiempo. Todas las formulaciones fueron capaces de liberar efectivamente el fármaco en las condiciones ensayadas. Mientras que R1-8-QO-Pt-NLC alcanzó el 62% de liberación del fármaco después de 24 h, R2-8-QO-Pt-NLC y R3-8-QO-Pt-NLC mostraron un perfil de liberación similar al del fármaco libre, alcanzando más del 80%

del fármaco liberado en ese momento (**Figura 3.9**).

Los experimentos de liberación *in vitro* se realizaron para predecir la estabilidad de las formulaciones en términos de administración del fármaco una vez que alcanzan entornos fisiológicos. Varios estudios incluyeron la relación entre la estabilidad de la formulación y el perfil de liberación para seleccionar los mejores sistemas de nanopartículas que pudieran ser potencialmente administrados (Manosroi *et al.*, 2002; Mooranian *et al.*, 2014; Zielińska *et al.*, 2020). De acuerdo con los resultados de la **Figura 3.9**, se observó que las formulaciones R2-8-QO-Pt-NLC y R3-8-QO-Pt-NLC mostraron una inestabilidad tan pronto como fueron expuestas al medio de liberación ya que esas NLC comenzaron a liberar 8-QO-Pt tan rápido como la droga libre. Por otro lado, el R1-8-QO-Pt-NLC exhibió un perfil de liberación más controlado. Sin embargo, es importante señalar que el perfil de liberación *in vivo* de NLC estaría modulado por interacciones con diferentes moléculas del torrente sanguíneo, que tienen el potencial de formar una “corona de proteínas” que podría retrasar la liberación de las moléculas de carga (Li *et al.*, 2021).

Se usó el programa add-in DDSolver Excel (Zhang *et al.*, 2010) para ajustar diferentes modelos cinéticos estructurados que podrían dar una idea sobre el comportamiento de liberación. El análisis mostró que para la formulación R1-8-QO-Pt-NLC, el modelo de Baker y Lonsdale se ajustaba mejor a los datos, con un  $R^2$ -adj de 0,92. Este modelo, derivado del modelo de Higuchi, se utiliza generalmente para describir la liberación controlada de fármaco desde matrices esféricas, siendo la difusión y la degradación los principales factores responsables del mecanismo de liberación (Baker & Lonsdale, 1974). Este tipo de vehículo comprende una dispersión del fármaco sólido a través del medio de control de la velocidad (es decir, la matriz). Para niveles bajos de carga de fármaco, como en este caso, la liberación implica la disolución del fármaco en la matriz seguida de difusión a la superficie del vehículo. Por lo tanto, el perfil de liberación está determinado por la carga inicial, la naturaleza química de la matriz y su geometría (Baker & Sanders, 1986). El mejor ajuste a los datos se encontró en los

modelos de Peppas-Sahlin y Korsmeyer-Peppas para las formulaciones R2-8-QO-Pt-NLC y R3-8-QO-Pt-NLC con un  $R^2$ -adj de 0,88 y 0,93, respectivamente (Tabla 3.4). El primer 60% de todas las curvas de liberación se utilizaron para el análisis estadístico en los modelos Peppas-Sahlin y Korsmeyer y Peppas. En el modelo de Peppas-Sahlin, el valor del coeficiente  $m$  se determinó como 0,45, que es el exponente difusional en este caso, puramente de libre difusión o sea que obedece a las Leyes de Fick, y que comúnmente se denomina como comportamiento fickiano que generalmente se usa para describir la liberación controlada de fármacos a partir de cualquier forma geométrica. El modelo de Korsmeyer-Peppas fue diseñado específicamente para la liberación de una molécula de fármaco desde una matriz polimérica. El valor del exponente de liberación ( $n$ ) se calculó como 0,75 y el mecanismo de liberación es un modelo de transporte anómalo o no fickiano en el que la liberación se realizó como difusión o aumento de volumen de la matriz debido a la absorción de agua (Bruschi, 2015a).



**Figura 3.9.** Perfiles de liberación del 8-QO-Pt libre (rojo), R1-8-QO-Pt-NLC (azul), R2-8-QO-Pt-NLC (amarillo) y R3-8-QO-Pt-NLC (verde) durante 24 h.



**Tabla 3.4.** Medidas del ajuste a los modelos de liberación de los datos correspondientes a las formulaciones R1-8-QO-Pt-NLC, R2-8-QO-Pt-NLC y R3-8-QO-Pt-NLC. Se muestran las siguientes medidas de bondad de ajuste:  $R^2$ ,  $R^2$ -ajustado, error cuadrático medio (MSE), el criterio de información de Akaike (AIC).

<b>R1-8-QO-Pt-NLC</b>				
<b>Modelo</b>	<b><math>R^2</math></b>	<b><math>R^2</math>-adj</b>	<b>MSE</b>	<b>AIC</b>
Hixson-Crowell	0,84	0,84	92,8204	52,9419
Hopfenberg	0,85	0,82	105,9349	54,6170
<b>Baker-Lonsdale</b>	<b>0,92</b>	<b>0,92</b>	<b>45,4223</b>	<b>47,4329</b>
Peppas-Sahlin	0,95	0,91	52,5051	48,7076
Korsmeyer-Peppas	0,91	0,90	61,8671	49,6717
<b>R2-8-QO-Pt-NLC</b>				
<b>Modelo</b>	<b><math>R^2</math></b>	<b><math>R^2</math>-adj</b>	<b>MSE</b>	<b>AIC</b>
Hixson-Crowell	0,89	0,89	61,7634	43,1925
Hopfenberg	0,89	0,86	74,1161	45,1925
Baker-Lonsdale	0,85	0,85	98,4592	44,3139
<b>Peppas-Sahlin</b>	<b>0,94</b>	<b>0,88</b>	<b>60,1190</b>	<b>29,1574</b>
Korsmeyer-Peppas	0,90	0,86	67,9872	29,1793
<b>R3-8-QO-Pt-NLC</b>				
<b>Modelo</b>	<b><math>R^2</math></b>	<b><math>R^2</math>-adj</b>	<b>MSE</b>	<b>AIC</b>
Hixson-Crowell	0,91	0,91	71,4399	44,2760
Hopfenberg	0,92	0,90	78,1341	45,7188
Baker-Lonsdale	0,85	0,85	114,5276	47,7266
Peppas-Sahlin	0,97	0,90	55,1552	21,8998
<b>Korsmeyer-Peppas</b>	<b>0,95</b>	<b>0,93</b>	<b>41,2329</b>	<b>21,6368</b>

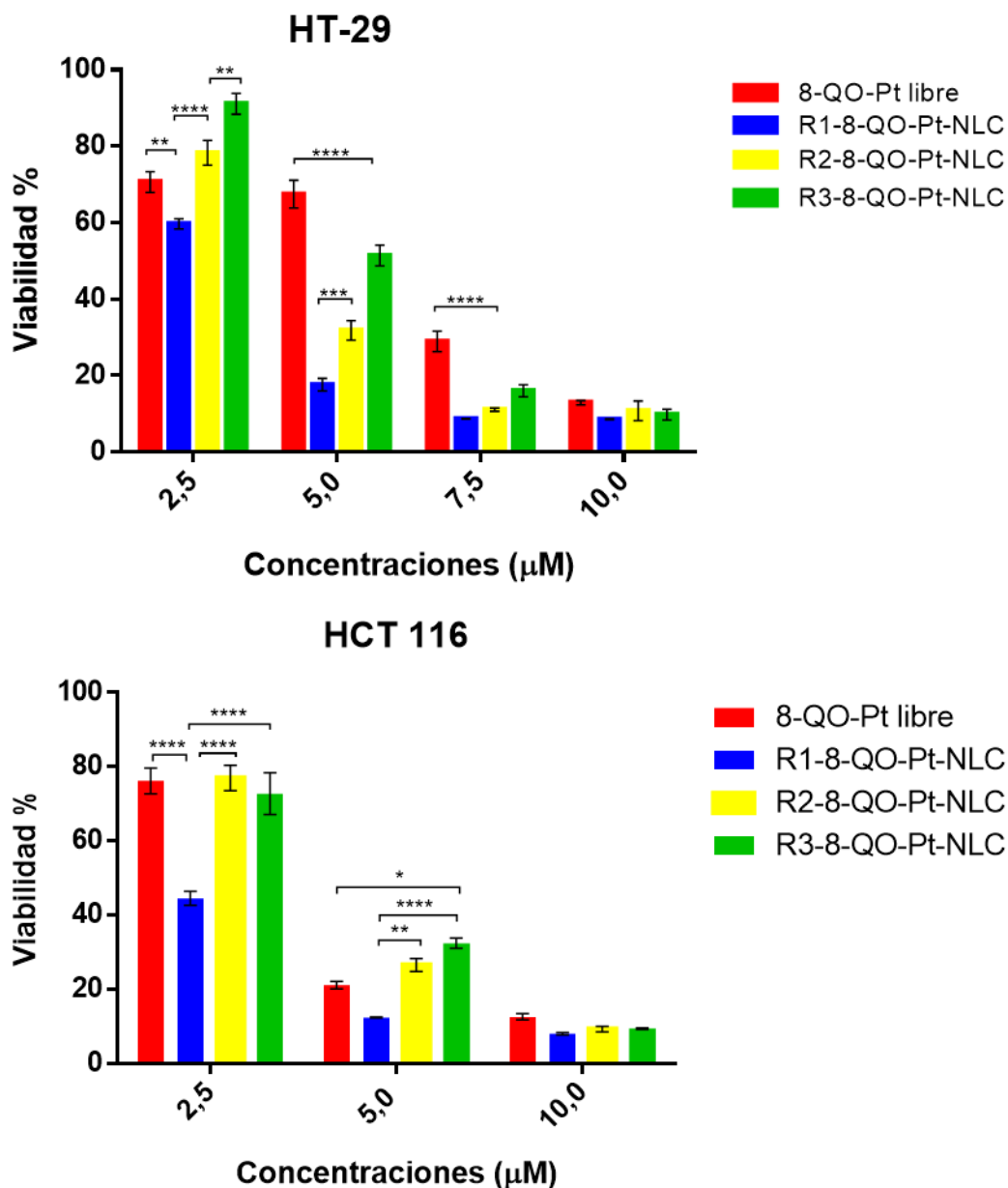
### 3.2.3. Estudios de citotoxicidad

La actividad citotóxica *in vitro* contra las líneas celulares de carcinoma de colon HT-29 y HCT 116 se investigó mediante el ensayo MTT. La selección de ambas líneas celulares tumorales colorrectales está motivada en sus distintas mutaciones,

características y su capacidad invasiva distintiva. La **Figura 3.10** presenta la viabilidad celular (%) con varias concentraciones de 8-QO-Pt libre y las formulaciones de NLC/RFV cargadas con 8-QO-Pt (+) después de 24 h de tratamiento. Los resultados revelaron que tanto el 8-QO-Pt libre y el cargado (en las tres formulaciones) mostraron un perfil de citotoxicidad dependiente de la dosis contra las células HT-29 y HCT 116, mientras que las formulaciones sin 8-QO-Pt no presentaron ningún perfil de toxicidad.

En la línea HT-29, la viabilidad celular (%) se redujo a 70,7% (8-QO-Pt libre), 59,7% (R1-8-QO-Pt-NLC), 78,3% (R2-8-QO-Pt-NLC) y 91,2% (R3-8-QO-Pt-NLC) para 2,5  $\mu$ M; 67,5%, 17,7%, 31,8% y 51,4% para 5,0  $\mu$ M; 29,0%, 8,7%, 11,1% y 16,1% para 7,5  $\mu$ M; 12,9%, 8,6%, 10,8% y 9,8% para 10,0  $\mu$ M, respectivamente. En la línea HCT 116, la viabilidad celular (%) se redujo a 76,3% (8-QO-Pt libre), 44,6% (R1-8-QO-Pt-NLC), 77,0% (R2-8-QO-Pt-NLC) y 72,8% (R3-8-QO-Pt-NLC) para 2,5  $\mu$ M; 21,2%, 12,4%, 26,6% y 32,5% para 5,0  $\mu$ M; 12,6%, 8,0%, 9,3% y 9,4% para 10,0  $\mu$ M, respectivamente (**Figura 3.10**).

Aunque las tres formulaciones contenían la misma cantidad de RFV (10,0 mg en total), la incorporación de RFV en distintas fases afecta a la viabilidad celular, especialmente a dosis bajas (2,5 y 5,0  $\mu$ M). Todas las formulaciones cargadas con 8-QO-Pt dirigidas a RFV demostraron un mayor efecto citotóxico que el compuesto de 8-QO-Pt libre (excepto a 2,5  $\mu$ M) en HT-29. Además, R1-8-QO-Pt-NLC pareció ser más efectivo, especialmente a 5,0  $\mu$ M, mostrando una mayor actividad antitumoral en comparación con 8-QO-Pt libre, R2-8-QO-Pt-NLC y R3-8-QO-Pt-NLC (3,8 veces, 1,8 veces y 2,9 veces, respectivamente). Sin embargo, en las células HCT 116, solo R1-8-QO-Pt-NLC mostró una mayor citotoxicidad a 2,5 y 5,0  $\mu$ M en comparación con el 8-QO-Pt libre. R2-8-QO-Pt-NLC y R3-8-QO-Pt-NLC no mejoraron la actividad antiproliferativa del 8-QO-Pt libre. Además, la **Tabla 3.5** muestra los valores  $IC_{50}$  para el compuesto 8-QO-Pt libre y las formulaciones en las células HT-29 y HCT 116, donde se evidencian los resultados expuestos anteriormente.



**Figura 3.10.** Citotoxicidad celular del compuesto 8-QO-Pt libre y las formulaciones cargadas (+) de 8-QO-Pt de NLC/RFV frente a las líneas celulares HT-29 y HCT 116 durante 24 h. Los datos se muestran como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) (n= 9). ( $p^* < 0,02$ ;  $p^{**} < 0,001$ ;  $p^{***} < 0,0003$ ;  $p^{****} < 0,0001$ ).

Como se muestra en la sección 2, el nanosistema 8-QO-Pt-NLC sin funcionalización de RFV no mostró un efecto citotóxico superior en comparación con el 8-QO-Pt libre en células HT-29. Estos resultados revelan que la funcionalización RFV de las nanopartículas aumenta la citotoxicidad (Guo *et al.*, 2017).

La tercera generación de fármacos contra el cáncer a base de platino, principalmente el oxaliplatino, fue aprobado por la *FDA* para tratar el cáncer de colon, principalmente el cáncer colorrectal metastásico (Boztepe *et al.*, 2021). El valor  $IC_{50}$  de oxaliplatino en las células HT-29 se determinó en 2,0  $\mu M$  para 24 h (Ruiz *et al.*, 2022) y otro estudio mostró un valor de 5,0  $\mu M$  después de 48 h de tratamiento (Attoub *et al.*, 2018). Se ha informado que el valor  $IC_{50}$  de las nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) cargadas con oxaliplatino resultó ser más alto que el de las SLN cargadas con oxaliplatino funcionalizado con ácido fólico (Rajpoot & Jain, 2018), pero fue más bajo que el oxaliplatino libre en las células HT-29 lo cual demuestra la importancia del sistema R1 y su actividad anticancerígena en comparación con esta droga de referencia.

**Tabla 3.5.** Valores  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ) de 8-QO-Pt libre y 8-QO-Pt cargadas (+) de NLC/RFV en células HT-29 y HCT 116 después de 24 h de incubación.

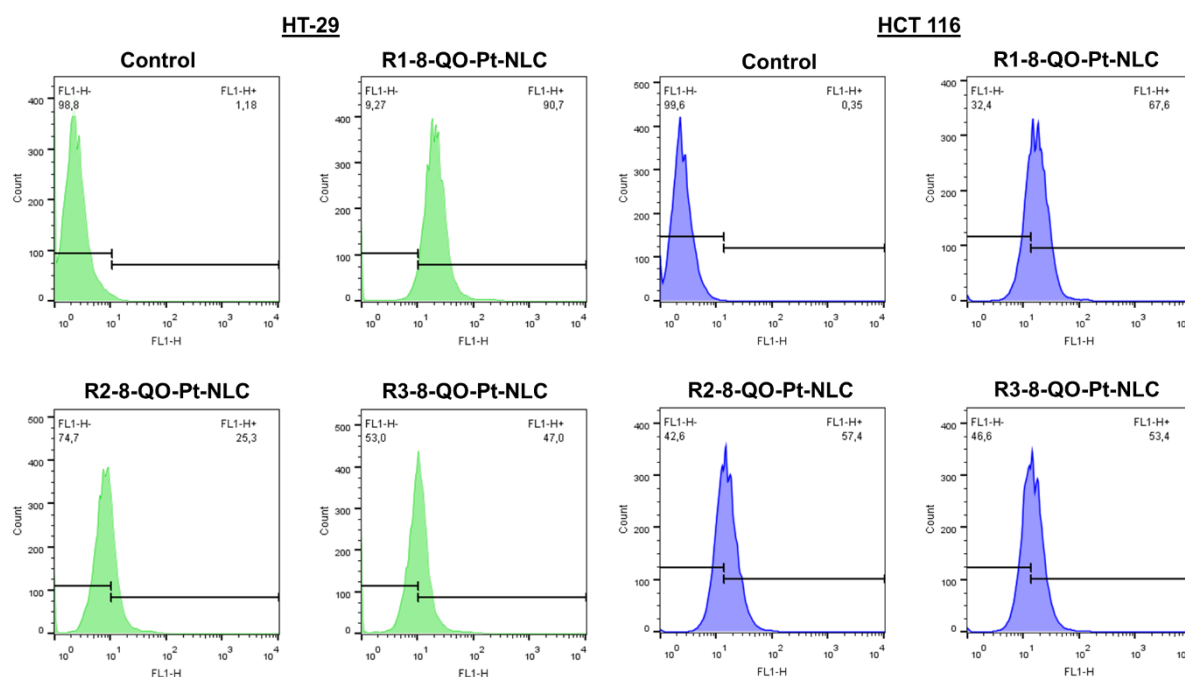
Formulación	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	
	HT-29	HCT 116
8-QO-Pt	5,9 $\pm$ 0,1	3,4 $\pm$ 0,6
R1-8-QO-Pt-NLC	3,3 $\pm$ 0,6	2,7 $\pm$ 0,7
R2-8-QO-Pt-NLC	4,0 $\pm$ 0,2	3,9 $\pm$ 0,6
R3-8-QO-Pt-NLC	5,3 $\pm$ 0,4	4,5 $\pm$ 0,7

### 3.2.4. Captación celular

Para evaluar la internalización celular de las nanopartículas NLC/RFV, se incorporó la sonda fluorescente DiOC18 en todas las formulaciones vacías (-). Luego, las células HT-29 y HCT 116 se trataron con nanopartículas marcadas vacías en la concentración equivalente a 2,5  $\mu M$  y 0,5  $\mu M$  de formulaciones de NLC/RFV cargadas con 8-QO-Pt (+) durante 24 h, respectivamente (**Figura 3.11**).

Según los resultados obtenidos, las células HT-29 y HCT 116 pudieron internalizar con éxito las nanopartículas. R1-8-QO-Pt-NLC demostró la captación celular más alta (89,0  $\pm$  0,6%) en comparación con R2-8-QO-Pt-NLC (26,0  $\pm$  0,6%) y R3-8-QO-Pt-

NLC ( $47,0 \pm 0,5\%$ ) en HT-29 a  $2,5 \mu\text{M}$ ;  $70,2 \pm 7,8\%$ ,  $60,6 \pm 4,5\%$  y  $51,4 \pm 2,1\%$  en HCT 116 a  $0,5 \mu\text{M}$ , respectivamente (**Tabla 3.6**). Estos datos podrían estar correlacionados con el efecto citotóxico superior de R1-8-QO-Pt-NLC observado en la **Figura 3.10**.



**Figura 3.11.** Captación celular de nanopartículas vacías (-) de NLC/RFV marcadas con DiOC18 en las células HCT 116 y HT-29 medidas por citometría de flujo. Las células se incubaron durante 24 h a la cantidad equivalente de concentración para formulaciones de NLC/RFV cargadas con 8-QO-Pt (+) a  $0,5 \mu\text{M}$  y  $2,5 \mu\text{M}$ , respectivamente.

**Tabla 3.6.** La captación celular (%) para las formulaciones.

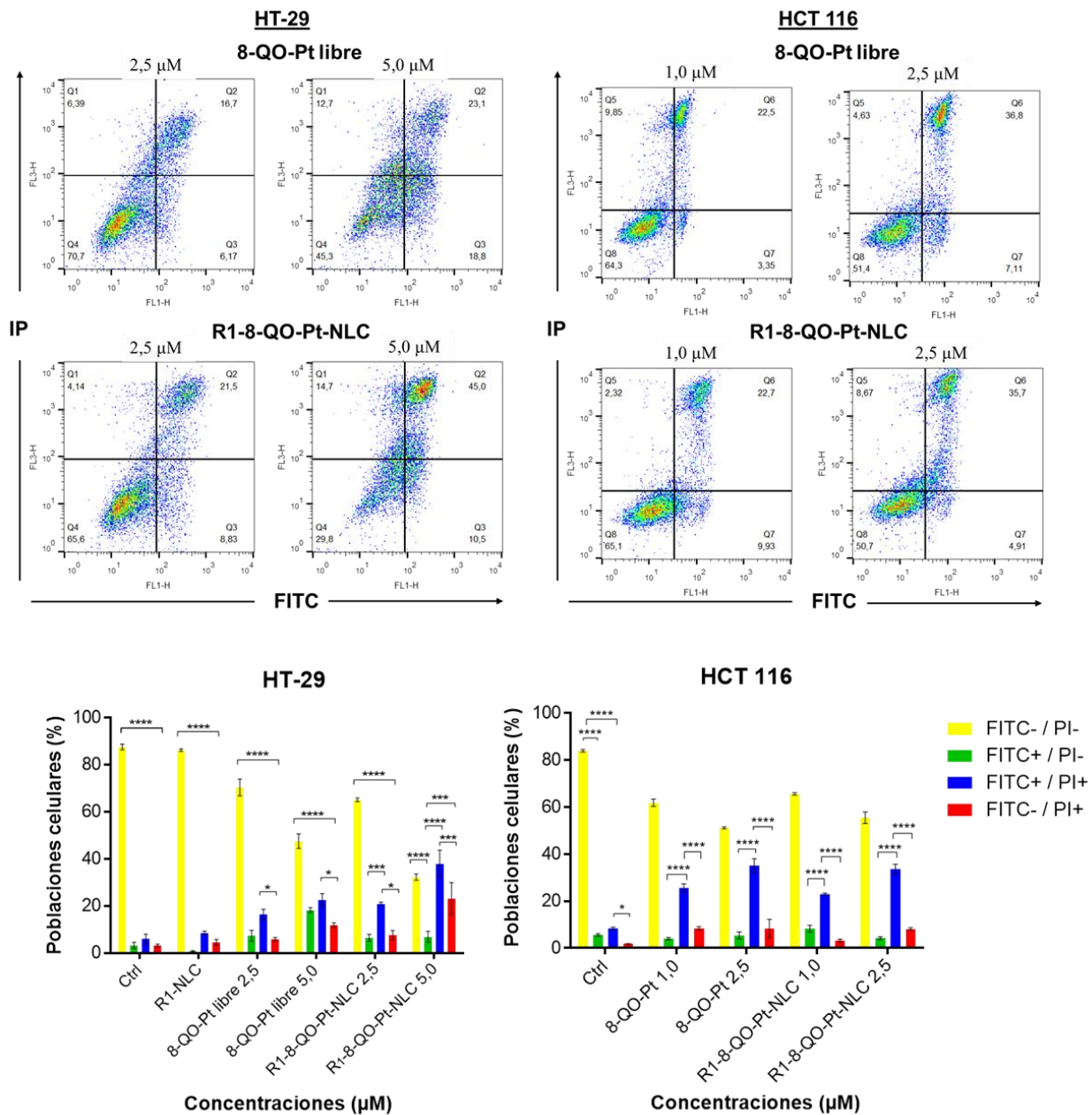
Formulaciones	HCT 116 ( $0,5 \mu\text{M}$ )	HT-29 ( $2,5 \mu\text{M}$ )
R1-8-QO-Pt-NLC	$70,2 \pm 7,8$	$89,0 \pm 0,6$
R2-8-QO-Pt-NLC	$60,6 \pm 4,5$	$26,0 \pm 0,6$
R3-8-QO-Pt-NLC	$51,4 \pm 2,1$	$47,0 \pm 0,5$

### 3.2.5. Apoptosis

Mientras los fármacos contra el cáncer causan la apoptosis celular, se pueden observar algunos cambios bioquímicos y morfológicos con el uso de marcadores. La membrana celular expone residuos de fosfatidilserina en la superficie externa que pueden detectarse con el colorante fluorescente Anexina V-FITC mediante ensayos de fluorescencia (Riccardi & Nicoletti, 2006).

Las células HT-29 y HCT 116 se marcaron con el kit de detección de apoptosis de Anexina V-FITC/IP después de 24 h de tratamiento con 8-QO-Pt libre y R1-8-QO-Pt-NLC (que fue seleccionado por su mayor actividad en el ensayo de viabilidad), a 2,5 y 5,0  $\mu\text{M}$ , y 1,0 y 2,5  $\mu\text{M}$ , respectivamente. La **Figura 3.12** muestra el porcentaje de subpoblaciones vitales (FITC-/IP-), apoptóticas tempranas (FITC+/IP-), apoptóticas tardías (FITC+/IP+) y necróticas (FITC-/IP+) en el diagrama de puntos. Según los resultados, en la línea celular HT-29, 8-QO-Pt libre y R1-8-QO-Pt-NLC indujeron 16,7% y 21,5% (con 2,5  $\mu\text{M}$ ) y 23,1% y 45,0% (con 5,0  $\mu\text{M}$ ) de células en apoptosis tardía (FITC+/PI+); en la línea celular HCT 116, 25,6% y 22,9% (con 1,0  $\mu\text{M}$ ) y 35,1% y 33,6% (con 2,5  $\mu\text{M}$ ), respectivamente.

Tutino y colaboradores han demostrado que los niveles de expresión de proteínas y genes RFVT3 y RFVT2 estaban elevados en HT-29, mientras que aún se desconoce el nivel de expresión de los transportadores de riboflavina en las células HCT 116 (Tutino *et al.*, 2018). El hecho de que R1-8-QO-Pt-NLC fuera capaz de generar más apoptosis en las células HT-29 se puede explicar teniendo en cuenta que esta formulación era la que tenía mayor capacidad de internalización celular, es decir, puede entregar más eficientemente el 8-QO-Pt en las células. Como se presenta en la sección 2, el 8-QO-Pt-NLC no dirigido y el 8-QO-Pt libre mostraron resultados muy similares en el ensayo de apoptosis. Cuando la misma formulación se funcionalizó con RFV, el efecto antiproliferativo de 8-QO-Pt aumentó debido a una mayor afinidad de RFV como agente de direccionamiento.



**Figura 3.12.** Efecto de apoptosis del compuesto 8-QO-Pt libre y R1-8-QO-Pt-NLC a 2,5 y 5,0 μM con HT-29, y 1,0 y 2,5 μM con HCT 116 después de 24 h. Los datos se muestran como media ± SEM (n= 3).

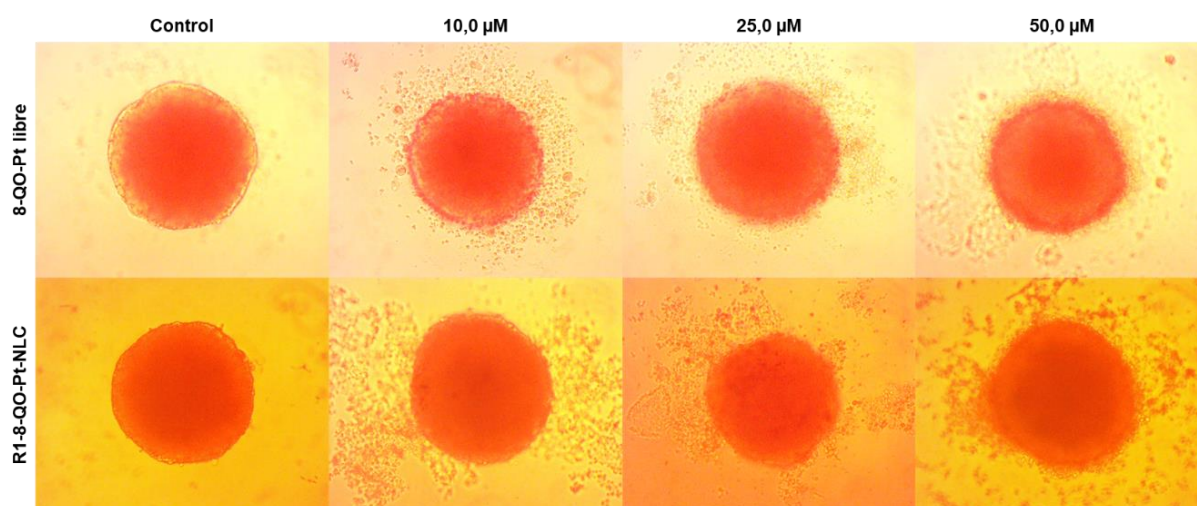
### 3.2.6. Evaluación de la citotoxicidad en modelos 3D

Los esferoides de la línea celular de HCT 116, fueron expuestos al compuesto 8-QO-Pt libre y R1-8QO-PT-NLC, en un rango de concentración de 10,0 - 50,0 μM, por un periodo de 24 h. Después de 24 h, se tomaron las fotos de los esferoides con el

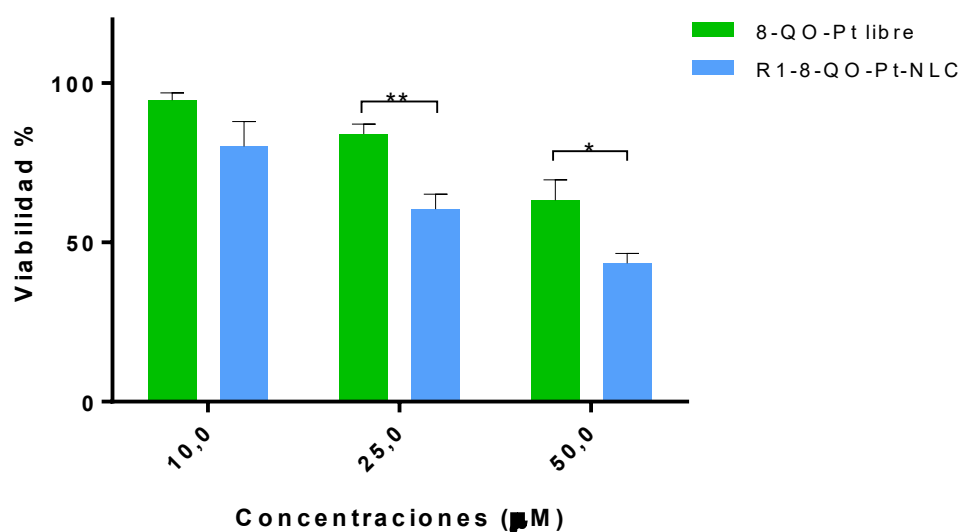
microscopio para evaluar su morfología (**Figura 3.13**). Finalizado el mismo se adicionó resazurina (marcador de viabilidad celular) y se incubó *overnight*, y se procedió a leer la fluorescencia es un espectrofluorómetro.

Los resultados indicaron que la viabilidad disminuye al  $94,6 \pm 1,9\%$ ,  $84,1 \pm 2,5\%$ , y  $63,3 \pm 5,2\%$  al incrementar la concentración del compuesto 8-QO-Pt libre (10,0, 25,0, y 50,0  $\mu\text{M}$ , respectivamente), obteniéndose un valor de  $\text{IC}_{50} > 50\mu\text{M}$ . Los valores que se obtuvieron para R1-8QO-PT-NLC fueron de  $80,1 \pm 6,4\%$ ,  $60,5 \pm 3,9\%$ , y  $43,4 \pm 2,5\%$  y el  $\text{IC}_{50}$  que se obtuvo fue de: 38,1  $\mu\text{M}$  (**Figura 3.14**). Con ambos el compuesto y la formulación se observa que la viabilidad disminuye en función al aumento de concentración, con un efecto dosis dependiente ( $p < 0,05$ ). En este modelo multicelular 3D, R1-8QO-PT-NLC mostró mayor actividad antitumoral que el 8-QO-Pt libre al igual que lo evidenciado en el modelo monocapa 2D. Sin embargo, las notables diferencias en los valores de  $\text{IC}_{50}$  entre las citotoxicidades 2D y 3D enfatizan la importancia de emplear modelos tumorales 3D como un paso intermedio antes de los experimentos animales *in vivo* para la detección de fármacos/nanomedicina (Abolhassani *et al.*, 2023). Karlsson y colaboradores han demostrado que los fármacos estándar como melfalán, 5-FU, oxaliplatino e irinotecán eran muy activos en los cultivos monocapa de HCT 116, pero en general perdían gradualmente la mayor parte de sus actividades y mostraban resistencia en los esferoides de HCT 116 (Karlsson *et al.*, 2012). Debido a las variaciones en la penetración del fármaco y la presencia de diferentes microambientes (como el pH, la hipoxia y la matriz extracelular), los esferoides tumorales suelen presentar una mayor resistencia a los compuestos antiproliferativos (De Grandis *et al.*, 2019). Las células tumorales primarias de colon humano que forman esferas retienen la expresión de CD133, un marcador asociado con las *stem cells* del cáncer de colon. Estas células formadoras de esferas tienen la capacidad de generar y expandir esferoides, iniciar tumores de xenoinjerto y demostrar resistencia a la apoptosis inducida por quimioterapia. Por el contrario, las células cultivadas en condiciones 2D no presentan estas características (Mehta *et al.*, 2012).



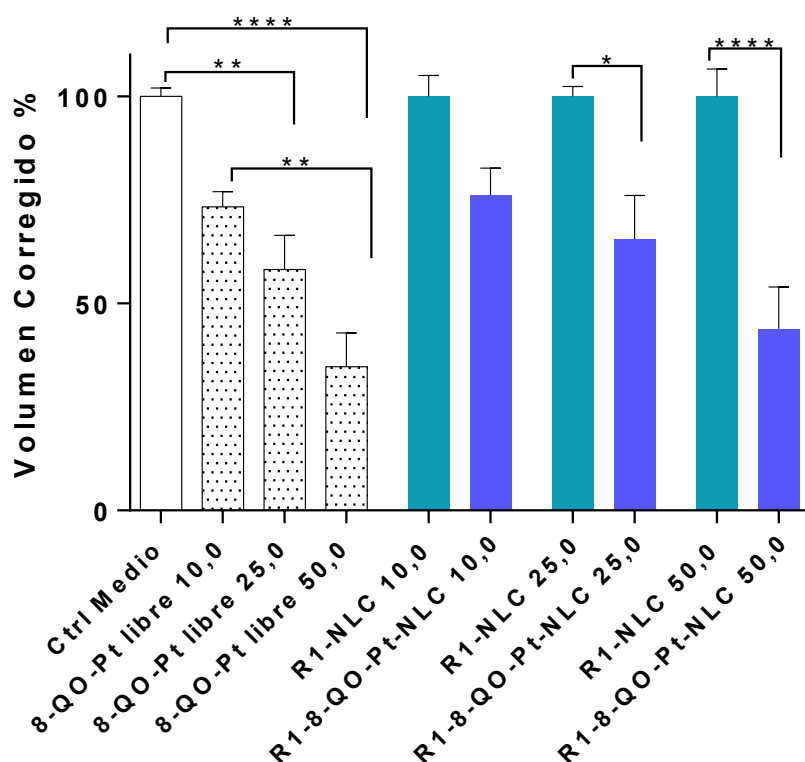


**Figura 3.13.** Microfotografías de esferoides de la línea HCT 116. Fotografías adquiridas con un microscopio óptico Olympus BX50, que posee un objetivo 40x luego del tratamiento con ambos el compuesto 8-QO-Pt libre y R1-8QO-PT-NLC con diferentes concentraciones.



**Figura 3.14.** Citotoxicidad celular del compuesto 8-QO-Pt libre y R1-8-QO-Pt-NLC frente a los esferoides de la línea celular de HCT 116 durante 24 h. Los datos se muestran como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) ( $n = 2$ ) ( $*p = 0,0248$ ,  $**p = 0,0064$ ).

La **Figura 3.15** muestra los cambios en los volúmenes corregidos (%) de los esferoides de HCT 116 con respecto a sus controles. Se observó que a medida que incrementamos la concentración del compuesto 8-QO-Pt libre y R1-8-QO-Pt-NLC, los volúmenes disminuyeron 26,7% y 23,8% (con 10,0  $\mu$ M), 41,8% y 34,5% (con 25,0  $\mu$ M), y 65,3% y 56,1% (con 50,0  $\mu$ M), respectivamente. Los esferoides perdieron su compactación y las células del exterior se desprendieron, alterando el borde externo de los mismos. Después del tratamiento, la agregación celular cambió debido a la interrupción o alteración de las interacciones entre las células vecinas y la matriz extracelular.



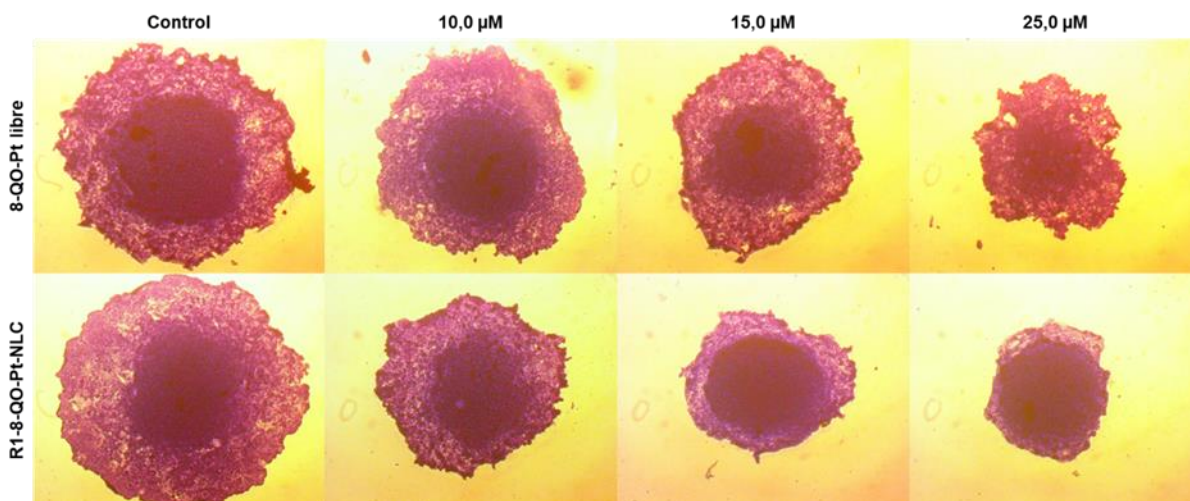
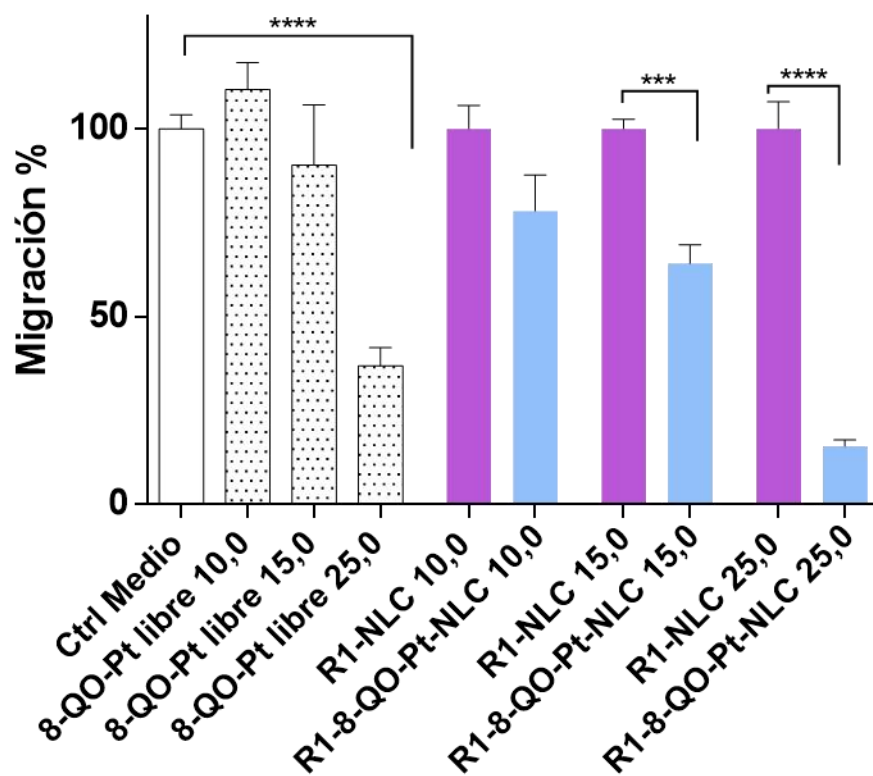
**Figura 3.15.** Los cambios en el volumen corregido (%) de los esferoides de HCT 116 después del tratamiento con el compuesto 8-QO-Pt libre, y R1-8-QO-Pt-NLC. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM (n = 2) (\* $p$  = 0,0289, \*\* $p$  < 0,0090, \*\*\* $p$  < 0,0001)

### 3.2.7. Migración de células 3D

El estudio de la migración celular en la investigación del cáncer es de especial

interés ya que la principal causa de muerte en pacientes con cáncer está relacionada con la progresión metastásica (Justus *et al.*, 2014).

La **Figura 3.16** mostró que el compuesto 8-QO-Pt libre y la formulación R1-8-QO-Pt-NLC interfieren con la migración de las células 3D de HCT 116 a la concentración de 10,0, 15,0, y 25,0  $\mu\text{M}$ . El 8-QO-Pt libre y R1-8-QO-Pt-NLC inhibió las propiedades de la migración celular de los esferoides multicelulares HCT 116 en una respuesta dependiente de la dosis de 10,0 a 25,0  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ). A 10,0  $\mu\text{M}$ , el 8-QO-Pt libre mostró una migración celular de  $110,6 \pm 7,1\%$  en comparación con las condiciones basales, mientras que a 15,0 y 25,0  $\mu\text{M}$  estos valores disminuyeron a  $90,4 \pm 16,0\%$  y  $36,9 \pm 3,9\%$ , respectivamente. El efecto de inhibición de la migración celular de R1-8-QO-Pt-NLC fue superior al de 8-QO-Pt libre. Los valores de migración celular se observaron al  $78,2 \pm 9,6\%$ ,  $64,2 \pm 5,0\%$  y  $15,5 \pm 1,7\%$  a 10,0, 15,0 y 25,0  $\mu\text{M}$ , respectivamente.



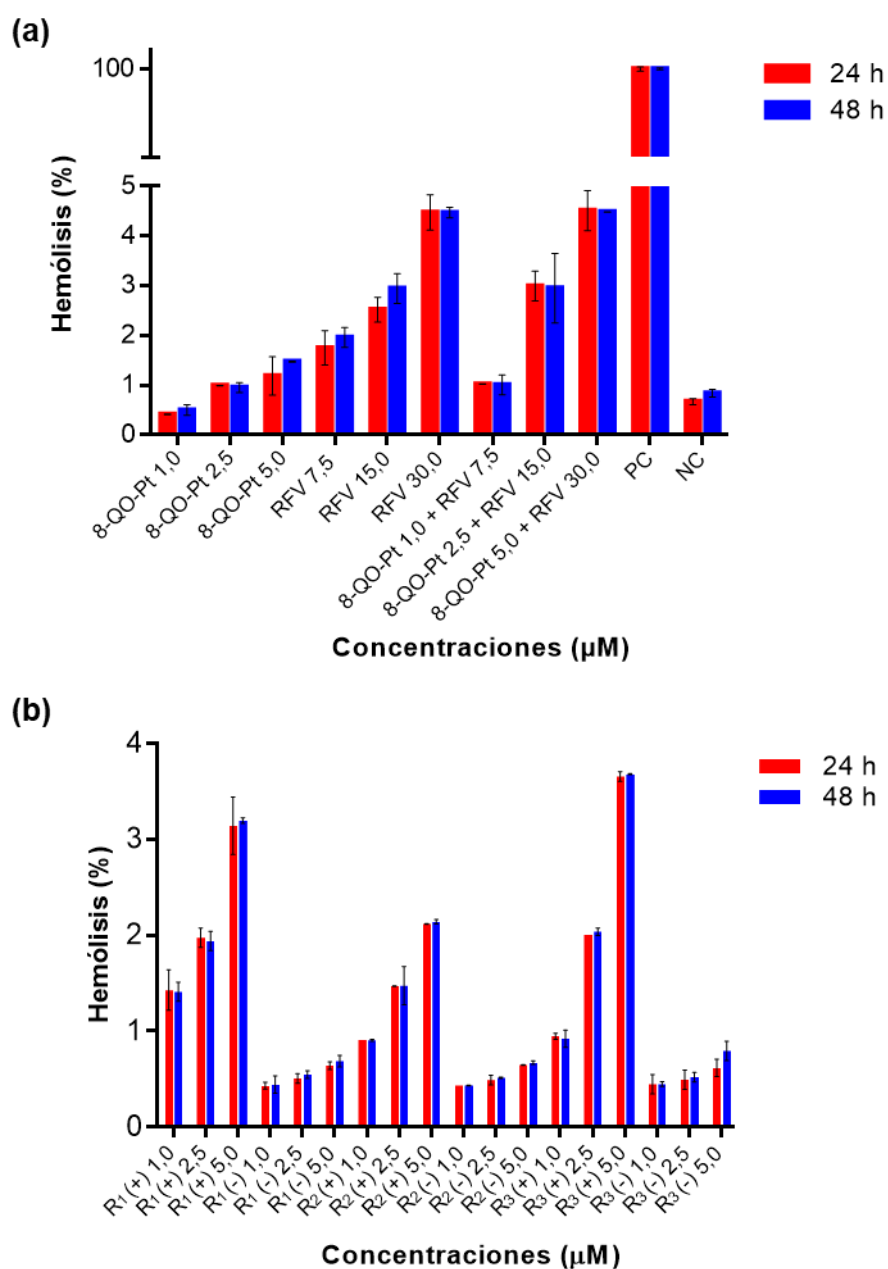
**Figura 3.16.** Efecto del compuesto 8-QO-Pt libre y R1-8-QO-Pt-NLC en la migración celular de esferoides 3D HCT 116 en comparación con sus controles. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM ( $n = 2$ ) (\*\* $p = 0,0003$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

### 3.2.8. Hemotoxicidad

La hemocompatibilidad de los nanosistemas de administración de fármacos se convierte en el primer enfoque para determinar los efectos citotóxicos potenciales después de la interacción de las células sanguíneas con las nanopartículas (de la Harpe *et al.*, 2019). Considerando una posible administración sistémica de nanopartículas cargadas con compuestos de platino por vía intravenosa, se estudió el efecto de las nanopartículas y sus componentes en sangre completa (**Figura 3.17**). El proceso de hemólisis podría estar relacionado con la naturaleza de las partículas, la presencia de surfactante o fuertes cargas negativas en la superficie (Mekkawy *et al.*, 2019; Toledo *et al.*, 2021). En el caso del 8-QO-Pt, se observó un efecto hemolítico dependiente de la dosis, pero produjo un grado de hemólisis inferior al 1,5% a la concentración más alta probada (5,0  $\mu\text{M}$ ) a las 24 h y 48 h (**Figura 3.17.a**). Se encontraron valores de hemotoxicidad más altos para RFV, con porcentajes de hemólisis alrededor de 2,0, 3,0 y 4,5% para concentraciones de 7,5, 15,0 y 30,0  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Las combinaciones de 8-QO-Pt y RFV en diferentes proporciones mostraron que el efecto hemotóxico de RFV se superponía con el efecto citotóxico de 8-QO-Pt sin que se observaran efectos aditivos y/o sinérgicos.

Por otro lado, se determinó el grado de hemólisis de las formulaciones cargadas (+) y vacías (-) de 8-QO-Pt de NLC/RFV después de la exposición a células sanguíneas humanas durante 24 h y 48 h (**Figura 3.17.b**). La hemotoxicidad disminuyó para las formulaciones que contenían 8-QO-Pt y RFV en comparación con las combinaciones de 8-QO-Pt libre y RFV. Se observó una respuesta del efecto dosis-hemolítico en el caso de NLC cargada con 8-QO-Pt y un porcentaje de hemólisis reducido en el caso de NLC vacío (menos del 1,0% en todos los casos). La formulación R1-8-QO-Pt-NLC mostró hemólisis alrededor del 3,0%, R2-8-QO-Pt-NLC alrededor del 2,0%, mientras que R3-8-QO-Pt-NLC alrededor del 3,7% a la concentración de 5,0  $\mu\text{M}$ . Estos resultados sugieren que R2-8-QO-Pt-NLC es la formulación más segura y R3-8-QO-Pt-NLC es la formulación hemotóxica más alta. Sin embargo, todas las formulaciones se encuentran en

un rango aceptable y bajo de hemotoxicidad por ser inferiores al 5,0%, que es el valor considerado como tóxico según la norma ISO/TR 7406 (Chinnaiyan *et al.*, 2019).



**Figura 3.17.** (a) Grado de hemólisis de 8-QO-Pt, RFV y sus combinaciones después de la exposición a células sanguíneas humanas durante 24 h y 48 h. Controles: positivo (PC) con Triton X-100 al 1,0%; y negativo (NC) con sangre no tratada. (b) Grado de hemólisis de formulaciones cargadas (+) y vacías (-) de 8-QO-Pt de NLC / RFV después de la exposición a células sanguíneas humanas durante 24 h y 48 h.

## Conclusiones Finales y Perspectivas

Los complejos a base de platino son agentes quimioterapéuticos eficientes que han demostrado su actividad anticancerígena contra varios tipos de cáncer. Sin embargo, se deben considerar muchos desafíos para producir formulaciones derivadas de fármacos de platino novedosas y eficientes. La resistencia intrínseca o adquirida, la toxicidad limitante de la dosis, la degradación del fármaco, la baja solubilidad y, en consecuencia, la baja biodisponibilidad, se presentan como algunas de los aspectos que limitan las aplicaciones clínicas de los nuevos fármacos de platino. Estudios recientes muestran que ha habido un gran interés en desarrollar nuevas formulaciones de estos fármacos, para asegurar una mejor administración y ampliar el aspecto terapéutico. En este sentido, los nuevos avances en el desarrollo de vehículos para la administración de fármacos de platino ayudarán a aumentar su estabilidad y biodisponibilidad, junto con la reducción de su degradación y los efectos tóxicos secundarios indeseables que limitan su uso.

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se han desarrollado dos sistemas de liberación (pasivo y activo) para el 8-QO-Pt, que aparece como un prometedor complejo de platino con actividad antitumoral, a la vez que un interesante modelo de estudio para fármacos poco solubles en agua.

El primer sistema fue diseñado en base al lípido de ésteres cetílicos (SS) con la presencia de dos aceites líquidos diferentes: triglicérido cáprico o aceite de oliva, para la liberación controlada y lenta en el colon que garantiza la biodistribución de las nanopartículas como tales, al mismo tiempo que liberan su cargamento. Aunque este sistema no pudo mostrar una actividad antitumoral superior sobre el fármaco libre, sí mostró efectos anticancerígenos comparables a él, pero sin los efectos deletéreos que se le relacionan y con una actividad biocida mejorada sobre las células cancerosas.

En el segundo sistema, la formulación con triglicéridos cápricos que demostró

mejores efectos en el primer sistema, se funcionalizó con riboflavina para generar un sistema de sitio-dirección activo. En este estudio se han desarrollado e investigado por primera vez sistemas NLC con riboflavina dirigida a la liberación controlada de fármacos. Los resultados son superiores a los sistemas anticancerígenos dirigidos a RFV publicados en literatura y a la acción del fármaco libre tanto en monocapa como en modelos 3D de cáncer colorrectal. Además, la formulación inhibió la migración celular de los esferoides multicelulares de colon, lo que demuestra que el sistema NLC con riboflavina dirigida evidenció también propiedades antimetastásicas.

Como perspectiva de futuro, se puede considerar el estudio de la eficacia antitumoral, así como de la toxicidad aparente en modelos *in vivo* de cáncer colorrectal tanto de la formulación R1-8-QO-Pt-NLC como del fármaco libre. En principio se podría considerar un modelo de xenotransplante con células de cáncer colorrectal humano para luego pasar a modelos más específicos como los singenéticos, con el fin de determinar efectos de estos nanosistemas sobre el sistema inmune.



## Referencias

- Abolhassani, H., Zaer, M., Shojaosadati, S. A., & Hashemi-Najafabadi, S. (2023). Rapid generation of homogenous tumor spheroid microtissues in a scaffold-free platform for high-throughput screening of a novel combination nanomedicine. *PLOS ONE*, *18*(2), e0282064. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282064>
- Aghabozorgi, A. S., Bahreyni, A., Soleimani, A., Bahrami, A., Khazaei, M., Ferns, G. A., Avan, A., & Hassanian, S. M. (2019). Role of adenomatous polyposis coli (APC) gene mutations in the pathogenesis of colorectal cancer; current status and perspectives. *Biochimie*, *157*, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.11.003>
- Ahmad, S. (2010). Platinum-DNA Interactions and Subsequent Cellular Processes Controlling Sensitivity to Anticancer Platinum Complexes. *Chemistry & Biodiversity*, *7*(3), 543–566. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200800340>
- Akdeniz, D. (2014). Retinoblastoma (Rb) gene pathway and cancer. *Türk Onkoloji Dergisi*, *29*(4), 173–180. <https://doi.org/10.5505/tjoncol.2014.1067>
- Amable, L. (2016). Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. *Pharmacological Research*, *106*, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.001>
- Andonova, V., & Peneva, P. (2018). Characterization Methods for Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC). *Current Pharmaceutical Design*, *23*(43), 6630–6642. <https://doi.org/10.2174/1381612823666171115105721>
- Antineoplastic Agents. (2012). In *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury* ([Updated 2]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548022/>
- Arienti, C., Tesei, A., Ravaioli, A., Ratta, M., Carloni, S., Mangianti, S., Ulivi, P., Nicoletti, S., Amadori, D., & Zoli, W. (2008). Activity of lipoplatin in tumor and in normal cells in vitro. *Anti-Cancer Drugs*, *19*(10), 983–990. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e3283114fb2>
- Attoub, S., Arafat, K., Khalaf, T., Sulaiman, S., & Iratni, R. (2018). Frondoside A Enhances the Anti-Cancer Effects of Oxaliplatin and 5-Fluorouracil on Colon Cancer Cells. *Nutrients*, *10*(5), 560. <https://doi.org/10.3390/nu10050560>
- Baker, R. W., & Lonsdale, H. K. (1974). Controlled release: mechanisms and rates. In A. C. Tanquary & R. E. Lacey (Eds.), *Controlled release of biologically active agents* (pp. 15–71). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7239-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7239-4_2)
- Baker, R. W., & Sanders, L. M. (1986). Controlled Release Delivery Systems. In *Synthetic Membranes: Science, Engineering and Applications* (pp. 581–624). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-4712-2\\_20](https://doi.org/10.1007/978-94-009-4712-2_20)
- Bánky, B., Rásó-Barnett, L., Barbai, T., Tímár, J., Becságh, P., & Rásó, E. (2012). Characteristics of CD44 alternative splice pattern in the course of human colorectal adenocarcinoma progression. *Molecular Cancer*, *11*(1), 83. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-11-83>
- Bareford, L. M., Avaritt, B. R., Ghandehari, H., Nan, A., & Swaan, P. W. (2013). Riboflavin-Targeted Polymer Conjugates for Breast Tumor Delivery. *Pharmaceutical Research*, *30*(7), 1799–1812. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1024-5>
- Bartmann, L., Schumacher, D., von Stillfried, S., Sternkopf, M., Alampour-Rajabi, S., van Zandvoort, M. A. M. J., Kiessling, F., & Wu, Z. (2019). Evaluation of Riboflavin Transporters as Targets for Drug Delivery and Theranostics. *Frontiers in Pharmacology*, *10*(FEB), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00079>

- Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., & Rizzolio, F. (2019). The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*, 25(1), 112. <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>
- Beloqui, A., Solinís, M. Á., Rodríguez-Gascón, A., Almeida, A. J., & Prést, V. (2016). Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12(1), 143–161. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.09.004>
- Beztsinna, N., Tsvetkova, Y., Bartneck, M., Lammers, T., Kiessling, F., & Bestel, I. (2016). Amphiphilic Phospholipid-Based Riboflavin Derivatives for Tumor Targeting Nanomedicines. *Bioconjugate Chemistry*, 27(9), 2048–2061. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00317>
- Bhargava, A., & Vaishampayan, U. N. (2009). Satraplatin: leading the new generation of oral platinum agents. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 18(11), 1787–1797. <https://doi.org/10.1517/13543780903362437>
- Biomaxmall*. (n.d.). <https://biomaxmall.com/>
- Bonetti, A., Leone, R., Muggia, F. M., & Howell, S. B. (2009). Platinum and Other Heavy Metal Compounds in Cancer Chemotherapy. In A. Bonetti, R. Leone, F. M. Muggia, & S. B. Howell (Eds.), *Platinum and Other Heavy Metal Compounds in Cancer Chemotherapy*. Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-459-3>
- Borges, A., de Freitas, V., Mateus, N., Fernandes, I., & Oliveira, J. (2020). Solid Lipid Nanoparticles as Carriers of Natural Phenolic Compounds. *Antioxidants*, 9(10), 998. <https://doi.org/10.3390/antiox9100998>
- Boros, E., Dyson, P. J., & Gasser, G. (2020). Classification of Metal-Based Drugs according to Their Mechanisms of Action. *Chem*, 6(1), 41–60. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2019.10.013>
- Bouchalova, P., & Bouchal, P. (2022). Current methods for studying metastatic potential of tumor cells. *Cancer Cell International*, 22(1), 394. <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02801-w>
- Boulikas, T. (2007). Molecular mechanisms of cisplatin and its liposomally encapsulated form, Lipoplatin™. Lipoplatin™ as a chemotherapy and antiangiogenesis drug. *Cancer Ther*, 5, 351–376.
- Boulikas, T. (2009). Clinical overview on Lipoplatin™: a successful liposomal formulation of cisplatin. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 18(8), 1197–1218. <https://doi.org/10.1517/13543780903114168>
- Boztepe, T., Scioli-Montoto, S., Ruiz, M. E., Alvarez, V. A., Castro, G. R., & León, I. E. (2021). 8-Hydroxyquinoline platinum(II) loaded nanostructured lipid carriers: synthesis, physicochemical characterization and evaluation of antitumor activity. *New Journal of Chemistry*, 45(2), 821–830. <https://doi.org/10.1039/D0NJ03940C>
- Boztepe, Tugce, Castro, G. R., & León, I. E. (2021). Lipid, polymeric, inorganic-based drug delivery applications for platinum-based anticancer drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 605(June), 120788. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120788>
- Brigle, K., & Rogers, B. (2017). Pathobiology and Diagnosis of Multiple Myeloma. *Seminars in Oncology Nursing*, 33(3), 225–236. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2017.05.012>
- Bruschi, M. L. (Ed.). (2015a). Mathematical models of drug release. In *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems* (pp. 63–86). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100092-2.00005-9>
- Bruschi, M. L. (2015b). Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems. In *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-02342-8>

- Bulbake, U., Doppalapudi, S., Kommineni, N., & Khan, W. (2017). Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics*, 9(4), 12. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012>
- Bunjes, H., & Unruh, T. (2007). Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(6), 379–402. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.04.013>
- Cacicedo, M. L., Ruiz, M. C., Scioli-Montoto, S., Ruiz, M. E., Fernández, M. A., Torres-Sanchez, R. M., Baran, E. J., Castro, G. R., & León, I. E. (2019). Lipid nanoparticles – Metvan: revealing a novel way to deliver a vanadium compound to bone cancer cells. *New Journal of Chemistry*, 43(45), 17726–17734. <https://doi.org/10.1039/C9NJ01634A>
- Cancer Classification-SEER Training. (n.d.). <https://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html>
- Cancer Research Product Guide Edition 3. (n.d.). <https://www.tocris.com/literature/product-guides>
- Cappell, M. S. (2008). Pathophysiology, Clinical Presentation, and Management of Colon Cancer. *Gastroenterology Clinics of North America*, 37(1), 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2007.12.002>
- Carlson, P. A. (1996). Antineoplastic agents. *Critical Care Nursing Quarterly*, 18(4), 1–15. <https://doi.org/10.1097/00002727-199602000-00002>
- Carlsson, J., & Yuhas, J. M. (1984). Liquid-Overlay Culture of Cellular Spheroids. In *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progrès dans les recherches sur le cancer* (Vol. 95, Issue Foa 4, pp. 1–23). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-82340-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-82340-4_1)
- Casagrande, N., Celegato, M., Borghese, C., Mongiat, M., Colombatti, A., & Aldinucci, D. (2014). Preclinical Activity of the Liposomal Cisplatin Lipoplatin in Ovarian Cancer. *Clinical Cancer Research*, 20(21), 5496–5506. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0713>
- Casagrande, N., De Paoli, M., Celegato, M., Borghese, C., Mongiat, M., Colombatti, A., & Aldinucci, D. (2013). Preclinical evaluation of a new liposomal formulation of cisplatin, lipoplatin, to treat cisplatin-resistant cervical cancer. *Gynecologic Oncology*, 131(3), 744–752. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.08.041>
- Center, M. M., Jemal, A., Smith, R. A., & Ward, E. (2010). Worldwide variations in colorectal cancer. *Diseases of the Colon and Rectum*, 53(7), 1099. <https://doi.org/10.1007/DCR.0b013e3181d60a51>
- Ceyssens, S., & Stroobants, S. (2011). *Sarcoma* (pp. 191–203). [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-062-1\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-062-1_11)
- Chinnaiyan, S. K., Karthikeyan, D., & Gadela, V. R. (2019). Development and Characterization of Metformin Loaded Pectin Nanoparticles for T2 Diabetes Mellitus. *Pharmaceutical Nanotechnology*, 6(4), 253–263. <https://doi.org/10.2174/2211738507666181221142406>
- Choy, H., Park, C., & Yao, M. (2008). Current Status and Future Prospects for Satraplatin, an Oral Platinum Analogue. *Clinical Cancer Research*, 14(6), 1633–1638. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-2176>
- Compagni, A., & Christofori, G. (2000). Recent advances in research on multistage tumorigenesis. *British Journal of Cancer*, 83(1), 1–5. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1309>
- Costa, E. C., de Melo-Diogo, D., Moreira, A. F., Carvalho, M. P., & Correia, I. J. (2018). Spheroids Formation on Non-Adhesive Surfaces by Liquid Overlay Technique: Considerations and Practical Approaches. *Biotechnology Journal*, 13(1), 1700417. <https://doi.org/10.1002/biot.201700417>
- Costa, P., & Sousa Lobo, J. M. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(2), 123–133. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00095-1](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00095-1)
- Cytotoxic Antibiotics. (2012). In *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*

([Updated 2, Issue Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31643644>

- D. Schimmer, A. (2011). Clioquinol – A Novel Copper-Dependent and Independent Proteasome Inhibitor. *Current Cancer Drug Targets*, 11(3), 325–331. <https://doi.org/10.2174/156800911794519770>
- Darguzyte, M., Drude, N., Lammers, T., & Kiessling, F. (2020). Riboflavin-Targeted Drug Delivery. *Cancers*, 12(2), 295. <https://doi.org/10.3390/cancers12020295>
- de Gramont, A., Figuer, A., Seymour, M., Homerin, M., Hmissi, A., Cassidy, J., Boni, C., Cortes-Funes, H., Cervantes, A., Freyer, G., Papamichael, D., Le Bail, N., Louvet, C., Hendler, D., de Braud, F., Wilson, C., Morvan, F., & Bonetti, A. (2000). Leucovorin and Fluorouracil With or Without Oxaliplatin as First-Line Treatment in Advanced Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 18(16), 2938–2947. <https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.16.2938>
- De Grandis, R. A., Santos, P. W. da S. dos, Oliveira, K. M. de, Machado, A. R. T., Aissa, A. F., Batista, A. A., Antunes, L. M. G., & Pavan, F. R. (2019). Novel lawsone-containing ruthenium(II) complexes: Synthesis, characterization and anticancer activity on 2D and 3D spheroid models of prostate cancer cells. *Bioorganic Chemistry*, 85(September 2018), 455–468. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.02.010>
- de la Harpe, K. M., Kondiah, P. P. D., Choonara, Y. E., Marimuthu, T., du Toit, L. C., & Pillay, V. (2019). The Hemocompatibility of Nanoparticles: A Review of Cell-Nanoparticle Interactions and Hemostasis. *Cells*, 8(10), 1–25. <https://doi.org/10.3390/cells8101209>
- Delehanty, J. B., Boeneman, K., Bradburne, C. E., Robertson, K., Bongard, J. E., & Medintz, I. L. (2010). Peptides for specific intracellular delivery and targeting of nanoparticles: Implications for developing nanoparticle-mediated drug delivery. *Therapeutic Delivery*, 1(3), 411–433. <https://doi.org/10.4155/tde.10.27>
- Devarajan, P., Tarabishi, R., Mishra, J., Ma, Q., Kourvetaris, A., Vougiouka, M., & Boulikas, T. (2004). Low renal toxicity of lipoplatin compared to cisplatin in animals. *Anticancer Research*, 24(4), 2193–2200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15330160>
- Di, H., Wu, H., Gao, Y., Li, W., Zou, D., & Dong, C. (2016). Doxorubicin- and cisplatin-loaded nanostructured lipid carriers for breast cancer combination chemotherapy. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 42(12), 2038–2043. <https://doi.org/10.1080/03639045.2016.1190743>
- Dilruba, S., & Kalayda, G. V. (2016). Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 77(6), 1103–1124. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-2976-z>
- Ding, C., Tong, L., Feng, J., & Fu, J. (2016). Recent Advances in Stimuli-Responsive Release Function Drug Delivery Systems for Tumor Treatment. *Molecules*, 21(12), 1715. <https://doi.org/10.3390/molecules21121715>
- Ding, W. Q., Lin, B., Vaught, J. L., Yamauchi, H., & Lind, S. E. (2005). Anticancer activity of the antibiotic clioquinol. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3577>
- Doshi, G., Sonpavde, G., & Sternberg, C. N. (2012). Clinical and pharmacokinetic evaluation of satraplatin. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 8(1), 103–111. <https://doi.org/10.1517/17425255.2012.636352>
- Dragovich, T., Mendelson, D., Kurtin, S., Richardson, K., Von Hoff, D., & Hoos, A. (2006). A Phase 2 trial of the liposomal DACH platinum L-NDDP in patients with therapy-refractory advanced colorectal cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 58(6), 759–764. <https://doi.org/10.1007/s00280-006-0235-4>
- Dukes, C. E. (1932). The classification of cancer of the rectum. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 35(3), 323–332. <https://doi.org/10.1002/path.1700350303>

- El Khoury, F., Corcos, L., Durand, S., Simon, B., & Le Jossic-Corcos, C. (2016). Acquisition of anticancer drug resistance is partially associated with cancer stemness in human colon cancer cells. *International Journal of Oncology*, 49(6), 2558–2568. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3725>
- Estadísticas - Incidencia.* (n.d.). <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/incidencia>
- 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. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(3), 136–151. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.04.009>
- Farooq, M. A., Aquib, M., Farooq, A., Haleem Khan, D., Joelle Maviah, M. B., Sied Filli, M., Kesse, S., Boakye-Yiadom, K. O., Mavlyanova, R., Parveen, A., & Wang, B. (2019). Recent progress in nanotechnology-based novel drug delivery systems in designing of cisplatin for cancer therapy: an overview. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1), 1674–1692. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1604535>
- Feynman, R. P. (1960). Plenty of Room at the Bottom. *Engineering and Science*, 23(5), 22–36.
- Fodde, R. (2002). The APC gene in colorectal cancer. *European Journal of Cancer*, 38(7), 867–871. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(02\)00040-0](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(02)00040-0)
- Fouad, Y. A., & Aanei, C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. *American Journal of Cancer Research*, 7(5), 1016–1036. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28560055>
- Fu, T., Liu, Y., Wang, Q., Sun, Z., Di, H., Fan, W., Liu, M., & Wang, J. (2016). Overexpression of riboflavin transporter 2 contributes toward progression and invasion of glioma. *NeuroReport*, 27(15), 1167–1173. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000674>
- Fuertes, M. A., Alonso, C., & Perez, J. M. (2003). Biochemical Modulation of Cisplatin Mechanisms of Action: Enhancement of Antitumor Activity and Circumvention of Drug Resistance. *ChemInform*, 34(19). <https://doi.org/10.1002/chin.200319278>
- Gala de Pablo, J., Armistead, F. J., Peyman, S. A., Bonthron, D., Lones, M., Smith, S., & Evans, S. D. (2018). Biochemical fingerprint of colorectal cancer cell lines using label-free live single-cell Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 49(8), 1323–1332. <https://doi.org/10.1002/jrs.5389>
- Gasco, M. R., & Antonelli, L. P. (1993). *Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution.* US5250236.
- Global Cancer Observatory.* (2022). <https://gco.iarc.fr/>
- Go, R. S., & Adjei, A. A. (1999). Review of the Comparative Pharmacology and Clinical Activity of Cisplatin and Carboplatin. *Journal of Clinical Oncology*, 17(1), 409–409. <https://doi.org/10.1200/JCO.1999.17.1.409>
- Gotink, K. J., Broxterman, H. J., Honeywell, R. J., Dekker, H., de Haas, R. R., Miles, K. M., Adelaiye, R., Griffioen, A. W., Peters, G. J., Pili, R., & Verheul, H. M. W. (2014). Acquired tumor cell resistance to sunitinib causes resistance in a HT-29 human colon cancer xenograft mouse model without affecting sunitinib biodistribution or the tumor microvasculature. *Oncoscience*, 1(12), 844–853. <https://doi.org/10.18632/oncoscience.106>
- Grilo, A. L., & Mantalaris, A. (2019). Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective. *Biotechnology Advances*, 37(October 2018), 459–475. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.012>
- Guo, D., Shi, C., Wang, X., Wang, L., Zhang, S., & Luo, J. (2017). Riboflavin-containing telodendrimer nanocarriers for efficient doxorubicin delivery: High loading capacity, increased stability, and improved anticancer efficacy. *Biomaterials*, 141(1), 161–175. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.06.041>

- Guo, S., Wang, Y., Miao, L., Xu, Z., Lin, C. M., Zhang, Y., & Huang, L. (2013). Lipid-coated cisplatin nanoparticles induce neighboring effect and exhibit enhanced anticancer efficacy. *ACS Nano*, 7(11), 9896–9904. <https://doi.org/10.1021/nn403606m>
- Haider, M., Abidin, S. M., Kamal, L., & Orive, G. (2020). Nanostructured Lipid Carriers for Delivery of Chemotherapeutics: A Review. *Pharmaceutics*, 12(3), 288. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030288>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Harper, B. W., Krause-Heuer, A. M., Grant, M. P., Manohar, M., Garbutcheon-Singh, K. B., & Aldrich-Wright, J. R. (2010). Advances in Platinum Chemotherapeutics. *Chemistry - A European Journal*, 16(24), 7064–7077. <https://doi.org/10.1002/chem.201000148>
- Harrap, K. R. (1985). Preclinical studies identifying carboplatin as a viable cisplatin alternative. *Cancer Treatment Reviews*, 12(SUPPL. A), 21–33. [https://doi.org/10.1016/0305-7372\(85\)90015-5](https://doi.org/10.1016/0305-7372(85)90015-5)
- Holford, J., Sharp, S., Murrer, B., Abrams, M., & Kelland, L. (1998). In vitro circumvention of cisplatin resistance by the novel sterically hindered platinum complex AMD473. *British Journal of Cancer*, 77(3), 366–373. <https://doi.org/10.1038/bjc.1998.59>
- Hu, C., & Du, W. (2020). Zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) combined with cisplatin and gemcitabine inhibits tumor activity of NSCLC cells. *Aging*, 12(24), 25767–25777. <https://doi.org/10.18632/aging.104187>
- Hughes, G. A. (2005). Nanostructure-mediated drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 1(1), 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2004.11.009>
- Jiang, X. R., Yu, X. Y., Fan, J. H., Guo, L., Zhu, C., Jiang, W., & Lu, S. H. (2014). RFT2 is overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma and promotes tumorigenesis by sustaining cell proliferation and protecting against cell death. *Cancer Letters*, 353(1), 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.07.013>
- Johnson, T. (2009). Biochemical characterization of riboflavin carrier protein (RCP) in prostate cancer. *Frontiers in Bioscience, Volume(14)*, 3634. <https://doi.org/10.2741/3477>
- Justus, C. R., Leffler, N., Ruiz-Echevarria, M., & Yang, L. V. (2014). *In vitro* Cell Migration and Invasion Assays. *Journal of Visualized Experiments*, 88, 1–8. <https://doi.org/10.3791/51046>
- K.Chauhan, M., Manchanda, A., Khurana, J. K., Jain, P., Sharma, D., Jain, S., & Bansal, S. (2011). Nanotechnology : The nano soldiers in the war against cancer. *Journal of Pharmacy Research*, 4(12), 4420–4423.
- Karande, A. A., Sridhar, L., Gopinath, K. S., & Adiga, P. R. (2001). Riboflavin carrier protein: A serum and tissue marker for breast carcinoma. *International Journal of Cancer*, 95(5), 277–281. [https://doi.org/10.1002/1097-0215\(20010920\)95:5<277::AID-IJC1047>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1097-0215(20010920)95:5<277::AID-IJC1047>3.0.CO;2-Y)
- Karlsson, H., Fryknäs, M., Larsson, R., & Nygren, P. (2012). Loss of cancer drug activity in colon cancer HCT-116 cells during spheroid formation in a new 3-D spheroid cell culture system. *Experimental Cell Research*, 318(13), 1577–1585. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.03.026>
- Kathe, N., Henriksen, B., & Chauhan, H. (2014). Physicochemical characterization techniques for solid lipid nanoparticles: principles and limitations. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 40(12), 1565–1575. <https://doi.org/10.3109/03639045.2014.909840>
- Kelland, L. (2007a). Broadening the clinical use of platinum drug-based chemotherapy with new

- analogues. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 16(7), 1009–1021. <https://doi.org/10.1517/13543784.16.7.1009>
- Kelland, L. (2007b). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 7(8), 573–584. <https://doi.org/10.1038/nrc2167>
- Khanna, S., Chauhan, A., Bhatt, A. N., & Dwarakanath, B. S. R. (2020). Multicellular tumor spheroids as in vitro models for studying tumor responses to anticancer therapies. In *Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation*. INC. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811710-1.00011-2>
- Khosa, A., Reddi, S., & Saha, R. N. (2018). Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 103(April), 598–613. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.055>
- Kleiner, D. E., & Stetler-Stevenson, W. G. (1999). Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 43(7), S42–S51. <https://doi.org/10.1007/s002800051097>
- Klutznny, S., Lesche, R., Keck, M., Kaulfuss, S., Schlicker, A., Christian, S., Sperl, C., Neuhaus, R., Mowat, J., Steckel, M., Riefke, B., Prechtel, S., Parczyk, K., & Steigemann, P. (2017). Functional inhibition of acid sphingomyelinase by Fluphenazine triggers hypoxia-specific tumor cell death. *Cell Death & Disease*, 8(3), e2709–e2709. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.130>
- Köberle, B., & Schoch, S. (2021). Platinum Complexes in Colorectal Cancer and Other Solid Tumors. *Cancers*, 13(9), 2073. <https://doi.org/10.3390/cancers13092073>
- Koelzer, V., Dawson, H., Zlobec, I., & Lugli, A. (2013). Colon: Colorectal adenocarcinoma. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, 17(5), 348–363. <https://doi.org/10.4267/2042/49706>
- Kramer, N., Walzl, A., Unger, C., Rosner, M., Krupitza, G., Hengstschläger, M., & Dolznig, H. (2013). In vitro cell migration and invasion assays. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 752(1), 10–24. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2012.08.001>
- Kudr, J., Haddad, Y., Richtera, L., Heger, Z., Cernak, M., Adam, V., & Zitka, O. (2017). Magnetic Nanoparticles: From Design and Synthesis to Real World Applications. *Nanomaterials*, 7(9), 243. <https://doi.org/10.3390/nano7090243>
- Kuhlmann, M. K., Burkhardt, G., & Köhler, H. (1997). Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 12(12), 2478–2480. <https://doi.org/10.1093/ndt/12.12.2478>
- Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (Eds.). (2017). *Robbins Basic Pathology 10th Edition* (10th ed.). Elsevier Inc.
- Labianca, R., Beretta, G. D., Kildani, B., Milesi, L., Merlin, F., Mosconi, S., Pessi, M. A., Prochilo, T., Quadri, A., Gatta, G., de Braud, F., & Wils, J. (2010). Colon cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 74(2), 106–133. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2010.01.010>
- Lan, X., She, J., Lin, D., Xu, Y., Li, X., Yang, W., Lui, V. W. Y., Jin, L., Xie, X., & Su, Y. (2018). Microneedle-Mediated Delivery of Lipid-Coated Cisplatin Nanoparticles for Efficient and Safe Cancer Therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10(39), 33060–33069. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b12926>
- Lei-Ming, X., Qu, C.-Y., Zhou, M., Chen, Y., Chen, M., & Feng Shen, F. (2015). Engineering of lipid prodrug-based, hyaluronic acid-decorated nanostructured lipid carriers platform for 5-fluorouracil and cisplatin combination gastric cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 3911–3920. <https://doi.org/10.2147/IJN.S83211>
- Lei, M., Jiang, F.-C., Cai, J., Hu, S., Zhou, R., Liu, G., Wang, Y.-H., Wang, H.-B., He, J.-R., & Xiong, X.-G. (2018). Facile microencapsulation of olive oil in porous starch granules: Fabrication, characterization, and oxidative stability. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 755–761. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.051>

- Li, H., Wang, Y., Tang, Q., Yin, D., Tang, C., He, E., Zou, L., & Peng, Q. (2021). The protein corona and its effects on nanoparticle-based drug delivery systems. *Acta Biomaterialia*, 129, 57–72. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.05.019>
- Li, Q., Cai, T., Huang, Y., Xia, X., Cole, S., & Cai, Y. (2017). A Review of the Structure, Preparation, and Application of NLCs, PNP, and PLNs. *Nanomaterials*, 7(6), 122. <https://doi.org/10.3390/nano7060122>
- Liu, J., Qu, L., Meng, L., & Shou, C. (2019). Topoisomerase inhibitors promote cancer cell motility via ROS-mediated activation of JAK2-STAT1-CXCL1 pathway. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), 370. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1353-2>
- Long, L., Pang, X.-X., Lei, F., Zhang, J.-S., Wang, W., Liao, L.-D., Xu, X.-E., He, J.-Z., Wu, J.-Y., Wu, Z.-Y., Wang, L.-D., Lin, D.-C., Li, E.-M., & Xu, L.-Y. (2018). SLC52A3 expression is activated by NF- $\kappa$ B p65/Rel-B and serves as a prognostic biomarker in esophageal cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(14), 2643–2661. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2757-4>
- Machover, D., Diaz-Rubio, E., de Gramont, A., Schilf, A., Gastiaburu, J.-J., Brienza, S., Itzhaki, M., Metzger, G., N'Daw, D., Vignoud, J., Abad, A., François, E., Gamelin, E., Marty, M., Sastre, J., Seitz, J.-F., & Ychou, M. (1996). Two consecutive phase II studies of oxaliplatin (L-OHP) for treatment of patients with advanced colorectal carcinoma who were resistant to previous treatment with fluoropyrimidines. *Annals of Oncology*, 7(1), 95–98. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.annonc.a010489>
- Malam, Y., Loizidou, M., & Seifalian, A. M. (2009). Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(11), 592–599. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.08.004>
- Manosroi, A., Podjanasoonthon, K., & Manosroi, J. (2002). Stability and release of topical tranexamic acid liposome formulations. *Journal of Cosmetic Science*, 53(6), 375–386. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12512014>
- Martín Santos, C., Cabrera, S., Ríos-Luci, C., Padrón, J. M., López Solera, I., Quiroga, A. G., Medrano, M. A., Navarro-Ranninger, C., & Alemán, J. (2013). Novel clioquinol and its analogous platinum complexes: importance, role of the halogen substitution and the hydroxyl group of the ligand. *Dalton Transactions*, 42(37), 13343. <https://doi.org/10.1039/c3dt51720a>
- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., & Recio, I. (2015). HT29 Cell Line. In K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, & H. Wichers (Eds.), *The Impact of Food Bioactives on Health* (pp. 113–124). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_11)
- Mattiuzzi, C., & Lippi, G. (2019). Current Cancer Epidemiology. *Journal of Epidemiology and Global Health*, 9(4), 217. <https://doi.org/10.2991/jegh.k.191008.001>
- McQuitty, R. J. (2014). Metal-based drugs. *Science Progress*, 97(1), 1–19. <https://doi.org/10.3184/003685014X13898980185076>
- Mehnert, W., & Mader, K. (2001). Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(2–3), 165–196. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00105-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00105-3)
- Mehta, G., Hsiao, A. Y., Ingram, M., Luker, G. D., & Takayama, S. (2012). Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *Journal of Controlled Release*, 164(2), 192–204. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.045>
- Mekkawy, I. A., Mahmoud, U. M., Hana, M. N., & Sayed, A. E. D. H. (2019). Cytotoxic and hemotoxic effects of silver nanoparticles on the African Catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 171(August 2018), 638–646.



<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.011>

- Mohammadian, M., Zeynali, S., Azarbaijani, A., Khadem Ansari, M., & Kheradmand, F. (2017). Cytotoxic effects of the newly-developed chemotherapeutic agents 17-AAG in combination with oxaliplatin and capecitabine in colorectal cancer cell lines. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 12(6), 517. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.217432>
- Monneret, C. (2011). Platinum anticancer drugs. From serendipity to rational design. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 69(6), 286–295. <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2011.10.001>
- Monoclonal Antibodies. (2012). In *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury* ([Updated 2, Issue Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31644151>
- Montané, X., Bajek, A., Roszkowski, K., Montornés, J. M., Giamberini, M., Roszkowski, S., Kowalczyk, O., Garcia-Valls, R., & Tylkowski, B. (2020). Encapsulation for Cancer Therapy. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(7), 1605. <https://doi.org/10.3390/molecules25071605>
- Mooranian, A., Negrulj, R., Mathavan, S., Martinez, J., Sciarretta, J., Chen-Tan, N., Mukkur, T., Mikov, M., Lalic-Popovic, M., Stojančević, M., Golocorbin-Kon, S., & Al-Salami, H. (2014). Stability and Release Kinetics of an Advanced Gliclazide-Cholic Acid Formulation: The Use of Artificial-Cell Microencapsulation in Slow Release Targeted Oral Delivery of Antidiabetics. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 9(2), 150–157. <https://doi.org/10.1007/s12247-014-9182-5>
- Morin, P. J. (1999).  $\beta$ -catenin signaling and cancer. *BioEssays*, 21(12), 1021–1030. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199912\)22:1<1021::AID-BIES6>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199912)22:1<1021::AID-BIES6>3.0.CO;2-P)
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Moudi, M., Go, R., Yien, C. Y. S., & Nazre, M. (2013). Vinca alkaloids. *International Journal of Preventive Medicine*, 4(11), 1231–1235. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24404355>
- Muhamad, N., Plengsuriyakarn, T., & Na-Bangchang, K. (2018). Application of active targeting nanoparticle delivery system for chemotherapeutic drugs and traditional/herbal medicines in cancer therapy: a systematic review. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 13, 3921–3935. <https://doi.org/10.2147/IJN.S165210>
- Müller, R. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50(1), 161–177. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(00\)00087-4](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(00)00087-4)
- Müller, R. ., Radtke, M., & Wissing, S. . (2002). Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 242(1–2), 121–128. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00180-1](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00180-1)
- National Nanotechnology Initiative. (n.d.). [www.nano.gov](http://www.nano.gov)
- Negi, L. M., Jaggi, M., Joshi, V., Ronodip, K., & Talegaonkar, S. (2015). Hyaluronic acid decorated lipid nanocarrier for MDR modulation and CD-44 targeting in colon adenocarcinoma. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 569–574. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.09.005>
- Neves, A. R., Queiroz, J. F., Costa Lima, S. A., Figueiredo, F., Fernandes, R., & Reis, S. (2016). Cellular uptake and transcytosis of lipid-based nanoparticles across the intestinal barrier: Relevance for oral drug delivery. *Journal of Colloid and Interface Science*, 463, 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.10.057>
- Newman, M. S., Colbern, G. T., Working, P. K., Engbers, C., & Amantea, M. A. (1999). Comparative pharmacokinetics, tissue distribution, and therapeutic effectiveness of cisplatin encapsulated in

- long-circulating, pegylated liposomes (SPI-077) in tumor-bearing mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 43(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s002800050855>
- Ok, C. Y., Woda, B., & Kurian, E. (2018). The Pathology of Cancer. In *Cancer Concepts: A Guidebook for the Non-Oncologist* (Vol. 19, Issue 2, pp. 0–11). University of Massachusetts Medical School. [https://doi.org/10.7191/cancer\\_concepts.1023](https://doi.org/10.7191/cancer_concepts.1023)
- Oun, R., Moussa, Y. E., & Wheate, N. J. (2018). The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: A review for chemists. *Dalton Transactions*, 47(19), 6645–6653. <https://doi.org/10.1039/c8dt00838h>
- Pan, M., Sun, S., Zhou, Q., & Chen, J. (2018). A Simple and Portable Screening Method for Adulterated Olive Oils Using the Hand-Held FTIR Spectrometer and Chemometrics Tools. *Journal of Food Science*, 83(6), 1605–1612. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14190>
- Panahi, Y., Farshbaf, M., Mohammadhosseini, M., Mirahadi, M., Khalilov, R., Saghi, S., & Akbarzadeh, A. (2017). Recent advances on liposomal nanoparticles: synthesis, characterization and biomedical applications. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45(4), 788–799. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1282496>
- Pardeike, J., Hommos, A., & Müller, R. H. (2009). Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics*, 366(1–2), 170–184. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.10.003>
- Pereira, M. I. A., Monteiro, C. A. P., de Oliveira, W. F., Santos, B. S., Fontes, A., & Cabral Filho, P. E. (2020). *Resazurin-Based Assay to Evaluate Cell Viability After Quantum Dot Interaction* (pp. 213–221). [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0463-2\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0463-2_12)
- Perez-Soler, R., Khokhar, A. R., & Lopez-Berestein, G. (1987). Treatment and prophylaxis of experimental liver metastases of M5076 reticulosarcoma with cis-bis-neodecanoato-trans-R,R-1,2-diaminocyclohexaneplatinum (II) encapsulated in multilamellar vesicles. *Cancer Research*, 47(24 Pt 1), 6462–6466. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3315188>
- Perez-Soler, Roman, Han, I., Al-Baker, S., & Khokhar, A. R. (1994). Lipophilic platinum complexes entrapped in liposomes: improved stability and preserved antitumor activity with complexes containing linear alkyl carboxylate leaving groups. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 33(5), 378–384. <https://doi.org/10.1007/BF00686266>
- Powers, H. J. (2003). Riboflavin (vitamin B-2) and health. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(6), 1352–1360. <https://doi.org/10.1093/ajcn/77.6.1352>
- Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., & Hübner, H. (2017). *Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin* (Vol. 1601, pp. 1–17). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_1)
- Protein Kinase Inhibitors. (2012). In *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury* ([Updated 2, Issue Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31643906>
- Puri, A., Loomis, K., Smith, B., Lee, J., Yavlovich, A., Heldman, E., & Blumenthal, R. (2009). Lipid-Based Nanoparticles as Pharmaceutical Drug Carriers: From Concepts to Clinic. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 26(6), 523–580. <https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v26.i6.10>
- Qiu, L., Yang, L., Zhou, H., Long, M., Jiang, W., & Wang, D. (2012). Encapsulation of oxaliplatin in nanostructured lipid carriers-preparation, physicochemical characterization and in vitro evaluation. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(5), 352–358.
- Rabik, C. A., & Dolan, M. E. (2007). Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treatment Reviews*, 33(1), 9–23. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2006.09.006>
- Rajpoot, K., & Jain, S. K. (2018). Colorectal cancer-targeted delivery of oxaliplatin via folic acid-grafted

- solid lipid nanoparticles: preparation, optimization, and in vitro evaluation. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(6), 1236–1247. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1366338>
- Rao, P. N., CRIPPIN, J., LEVINE, E., HUNT, J., BALIGA, S., BALART, L., ANTHONY, L., MULEKAR, M., & RAJ, M. (2006). Elevation of serum riboflavin carrier protein in hepatocellular carcinoma. *Hepatology Research*, 35(2), 83–87. <https://doi.org/10.1016/j.hepres.2006.03.009>
- Rao, P. N., Levine, E., Myers, M. O., Prakash, V., Watson, J., Stolier, A., Kopicko, J. J., Kissinger, P., Raj, S. G., & Raj, M. H. (1999). Elevation of serum riboflavin carrier protein in breast cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 8(11), 985–990. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10566553>
- Raut, I. D., Doijad, R. C., Mohite, S. K., & Manjappa, A. S. (2018). Preparation and Characterization of Solid Lipid Nanoparticles Loaded with Cisplatin. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 8(6), 125–131. <https://doi.org/10.22270/jddt.v8i6.2033>
- Raynaud, F. I., Boxall, F. E., Goddard, P. M., Valenti, M., Jones, M., Murrer, B. A., Abrams, M., & Kelland, L. R. (1997). cis-Amminedichloro(2-methylpyridine) platinum(II) (AMD473), a novel sterically hindered platinum complex: in vivo activity, toxicology, and pharmacokinetics in mice. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 3(11), 2063–2074. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9815598>
- Riboflavin. Monograph. (2008). *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic*, 13(4), 334–340. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19152481>
- Riccardi, C., & Nicoletti, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols*, 1(3), 1458–1461. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.238>
- Rice, J. R. (2006). Preclinical Efficacy and Pharmacokinetics of AP5346, A Novel Diaminocyclohexane-Platinum Tumor-Targeting Drug Delivery System. *Clinical Cancer Research*, 12(7), 2248–2254. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2169>
- Ringsdorf, H. (1975). Structure and properties of pharmacologically active polymers. *Journal of Polymer Science: Polymer Symposia*, 51(1), 135–153. <https://doi.org/10.1002/polc.5070510111>
- Rodenak-Kladniew, B., Islan, G. A., de Bravo, M. G., Durán, N., & Castro, G. R. (2017). Design, characterization and in vitro evaluation of linalool-loaded solid lipid nanoparticles as potent tool in cancer therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 154, 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.03.021>
- Rohrs, B. R. (2001). Dissolution Method Development for Poorly Soluble Compounds. *Dissolution Technologies*, 8(3), 6–12. <https://doi.org/10.14227/DT080301P6>
- ROSENBERG, B., VAN CAMP, L., & KRIGAS, T. (1965). Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature*, 205(4972), 698–699. <https://doi.org/10.1038/205698a0>
- ROSENBERG, B., VANCAMP, L., TROSKO, J. E., & MANSOUR, V. H. (1969). Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature*, 222(5191), 385–386. <https://doi.org/10.1038/222385a0>
- Rosiaux, Y., Jannin, V., Hughes, S., & Marchaud, D. (2014). Solid lipid excipients — Matrix agents for sustained drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 188, 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.004>
- Rosiaux, Y., Jannin, V., Hughes, S., & Marchaud, D. (2015). Solid Lipid Excipients as Matrix Agents for Sustained Drug Delivery. In A. S. Narang & S. H. S. Boddu (Eds.), *Excipient Applications in Formulation Design and Drug Delivery* (pp. 237–271). Springer International Publishing.

[https://doi.org/10.1007/978-3-319-20206-8\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-20206-8_9)

- Rousseau, D., Marangoni, A. G., & Jeffrey, K. R. (1998). The influence of chemical interesterification on the physicochemical properties of complex fat systems. 2. morphology and polymorphism. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(12), 1833–1839. <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0339-6>
- Rousset, M. (1986). The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: Two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie*, 68(9), 1035–1040. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(86\)80177-8](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(86)80177-8)
- Ruiz, M. C., Perelmutter, K., Levín, P., Romo, A. I. B., Lemus, L., -Fogolín, M. B., León, I. E., & Di Virgilio, A. L. (2022). Antiproliferative activity of two copper (II) complexes on colorectal cancer cell models: Impact on ROS production, apoptosis induction and NF- $\kappa$ B inhibition. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 169(September 2021), 106092. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.106092>
- Ruiz, M., Gantner, M., & Talevi, A. (2013). Applications of Nanosystems to Anticancer Drug Therapy (Part II. Dendrimers, Micelles, Lipid-based Nanosystems). *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 9(1), 99–128. <https://doi.org/10.2174/1574891X113089990038>
- Safwat, S., Ishak, R. A. H., Hathout, R. M., & Mortada, N. D. (2017). Nanostructured lipid carriers loaded with simvastatin: effect of PEG/glycerides on characterization, stability, cellular uptake efficiency and in vitro cytotoxicity. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43(7), 1112–1125. <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1293681>
- Sameer, A. S. (2013). Colorectal cancer: Molecular mutations and polymorphisms. *Frontiers in Oncology*, 3 May(May), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00114>
- Sánchez-Danés, A., & Blanpain, C. (2018). Deciphering the cells of origin of squamous cell carcinomas. *Nature Reviews Cancer*, 18(9), 549–561. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0024-5>
- Schärtl, W. (2007). Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions. In *Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-71951-9>
- Schubert, M. A., & Müller-Goymann, C. C. (2003). Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles - Evaluation of the method and process parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 55(1), 125–131. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(02\)00130-3](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(02)00130-3)
- Scioli Montoto, S., Sbaraglini, M. L., Talevi, A., Couyoupetrou, M., Di Ianni, M., Pesce, G. O., Alvarez, V. A., Bruno-Blanch, L. E., Castro, G. R., Ruiz, M. E., & Islan, G. A. (2018). Carbamazepine-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Physicochemical characterization and in vitro/in vivo evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 167, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.03.052>
- Serinan, E., Altun, Z., Aktas, S., Cecen, E., & Olgun, N. (2018). Comparison of Cisplatin with Lipoplatin in Terms of Ototoxicity. *The Journal of International Advanced Otology*, 14(2), 211–215. <https://doi.org/10.5152/iao.2018.4097>
- Shahin, M., Safaei-Nikouei, N., & Lavasanifar, A. (2014). Polymeric micelles for pH-responsive delivery of cisplatin. *Journal of Drug Targeting*, 22(7), 629–637. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2014.921925>
- Shankland, K. R., Armitage, J. O., & Hancock, B. W. (2012). Non-Hodgkin lymphoma. *The Lancet*, 380(9844), 848–857. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60605-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60605-9)
- Sharp, S. ., O'Neill, C. ., Rogers, P., Boxall, F. ., & Kelland, L. . (2002). Retention of activity by the new generation platinum agent AMD0473 in four human tumour cell lines possessing acquired resistance to oxaliplatin. *European Journal of Cancer*, 38(17), 2309–2315.

[https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(02\)00244-7](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(02)00244-7)

- Sharp, S. Y., Rogers, P. M., & Kelland, L. R. (1995). Transport of cisplatin and bis-acetato-ammine-dichlorocyclohexylamine Platinum(IV) (JM216) in human ovarian carcinoma cell lines: identification of a plasma membrane protein associated with cisplatin resistance. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 1(9), 981–989. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9816070>
- Shi, Y., Lammers, T., Storm, G., & Hennink, W. E. (2017). Physico-Chemical Strategies to Enhance Stability and Drug Retention of Polymeric Micelles for Tumor-Targeted Drug Delivery. *Macromolecular Bioscience*, 17(1), 1600160. <https://doi.org/10.1002/mabi.201600160>
- Shohdy, K. S., & Alfaar, A. S. (2013). Nanoparticles targeting mechanisms in cancer therapy: current limitations and emerging solutions. *Therapeutic Delivery*, 4(9), 1197–1209. <https://doi.org/10.4155/tde.13.75>
- Skubitz, K. M., & D'Adamo, D. R. (2007). Sarcoma. *Mayo Clinic Proceedings*, 82(11), 1409–1432. <https://doi.org/10.4065/82.11.1409>
- Stathopoulos, G., Boulikas, T., Vougiouka, M., Deliconstantinos, G., Rigatos, S., Darli, E., Viliotou, V., & Stathopoulos, J. (2005). Pharmacokinetics and adverse reactions of a new liposomal cisplatin (Lipoplatin): Phase I study. *Oncology Reports*, 13(4), 589–595. <https://doi.org/10.3892/or.13.4.589>
- Stathopoulos, G. P., & Boulikas, T. (2012). Lipoplatin Formulation Review Article. *Journal of Drug Delivery*, 2012, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2012/581363>
- Stewart, D. J. (2007). Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 63(1), 12–31. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2007.02.001>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Taxanes. (2012). In *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury* ([Updated 2, Issue Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7912519>
- ten Grotenhuis, E., van Aken, G. A., van Malssen, K. F., & Schenk, H. (1999). Polymorphism of milk fat studied by differential scanning calorimetry and real-time X-ray powder diffraction. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(9), 1031–1039. <https://doi.org/10.1007/s11746-999-0201-5>
- Tew, K. D. (2012). Alkylating Agents. In *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury* ([Updated 2, Issue Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31643188>
- The United States Pharmacopeia 42. United States Pharmacopeia Convention, Rockville, MD.* (2019). <https://www.usp.org/resources/dissolution-methods-database>
- Thurmond, K. B., McEwan, J., Moro, D. G., Rice, J. R., Russell-Jones, G., St. John, J. V., Sood, P., Stewart, D. R., & Nowotnik, D. P. (2006). Targeted and Non-targeted Polymer Drug Delivery Systems. In *Polymeric Drug Delivery I: Particulate Drug Carriers* (pp. 137–154). <https://doi.org/10.1021/bk-2006-0923.ch010>
- Timothy, C. J., Kogularamanan, S., & Stephen, J. L. (2016). The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chemical Reviews*, 116(5), 3436–3486. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00597>.The
- Toledo, C., Gambaro, R. C., Padula, G., Vela, M. E., Castro, G. R., Chain, C. Y., & Islan, G. A. (2021). Binary Medical Nanofluids by Combination of Polymeric Eudragit Nanoparticles for

- Vehiculization of Tobramycin and Resveratrol: Antimicrobial, Hemotoxicity and Protein Corona Studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 110(4), 1739–1748. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.01.005>
- Trotta, M., Debernardi, F., & Caputo, O. (2003). Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification–diffusion technique. *International Journal of Pharmaceutics*, 257(1–2), 153–160. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00135-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00135-2)
- Tsvetkova, Y., Beztsinna, N., Baues, M., Klein, D., Rix, A., Golombek, S. K., Al Rawashdeh, W., Gremse, F., Barz, M., Koynov, K., Banala, S., Lederle, W., Lammers, T., & Kiessling, F. (2017). Balancing Passive and Active Targeting to Different Tumor Compartments Using Riboflavin-Functionalized Polymeric Nanocarriers. *Nano Letters*, 17(8), 4665–4674. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.7b01171>
- Tummala, S., Kumar, M. N. S., & Pindiprolu, S. K. (2016). Improved anti-tumor activity of oxaliplatin by encapsulating in anti-DR5 targeted gold nanoparticles. *Drug Delivery*, 23(9), 3505–3519. <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1199606>
- Tutino, V., Defrancesco, M. L., Tolomeo, M., De Nunzio, V., Lorusso, D., Paleni, D., Caruso, M. G., Notarnicola, M., & Barile, M. (2018). The Expression of Riboflavin Transporters in Human Colorectal Cancer. *Anticancer Research*, 38(5), 2659–2667. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12508>
- van der Vijgh, W. J. F. (1991). Clinical Pharmacokinetics of Carboplatin. *Clinical Pharmacokinetics*, 21(4), 242–261. <https://doi.org/10.2165/00003088-199121040-00002>
- Velliou, E., Gupta, P., Ricci, C., & Danti, S. (2020). Biomaterial-based in vitro models for pancreatic cancer. In *Biomaterials for 3D Tumor Modeling* (pp. 235–249). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818128-7.00011-3>
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Smits, A. M. M., & Bos, J. L. (1988). Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development. *New England Journal of Medicine*, 319(9), 525–532. <https://doi.org/10.1056/NEJM198809013190901>
- Voinea, M., & Simionescu, M. (2002). Designing of “intelligent” liposomes for efficient delivery of drugs. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 6(4), 465–474. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2002.tb00450.x>
- Wang, D., & Lippard, S. J. (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(4), 307–320. <https://doi.org/10.1038/nrd1691>
- Wang, Xiaohui, Wang, X., Jin, S., Muhammad, N., & Guo, Z. (2019). Stimuli-Responsive Therapeutic Metallodrugs [Review-article]. *Chemical Reviews*, 119(2), 1138–1192. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00209>
- Wang, Xiaoyong, & Guo, Z. (2013). Targeting and delivery of platinum-based anticancer drugs. *Chem. Soc. Rev.*, 42(1), 202–224. <https://doi.org/10.1039/C2CS35259A>
- Warren, C. F. A., Wong-Brown, M. W., & Bowden, N. A. (2019). BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death & Disease*, 10(3), 177. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1407-6>
- Wenzel, C., Riefke, B., Gründemann, S., Krebs, A., Christian, S., Prinz, F., Osterland, M., Golfier, S., Räse, S., Ansari, N., Esner, M., Bickle, M., Pampaloni, F., Mattheyer, C., Stelzer, E. H., Parczyk, K., Prechtel, S., & Steigemann, P. (2014). 3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions. *Experimental Cell Research*, 323(1), 131–143. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.01.017>
- Wheate, N. J., Walker, S., Craig, G. E., & Oun, R. (2010). The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Transactions*, 39(35), 8113. <https://doi.org/10.1039/c0dt00292e>
- Wild CP, Weiderpass E, S. B. (2020). World cancer report 2020. In *World Health Organization*.

<http://publications.iarc.fr/586>

- Witsch, E., Sela, M., & Yarden, Y. (2010). Roles for Growth Factors in Cancer Progression. *Physiology*, 25(2), 85–101. <https://doi.org/10.1152/physiol.00045.2009>
- Woda, B., Liebmann, J., & Kurian, E. (2017). Cancer Biology. In *Cancer Concepts: A Guidebook for the Non-Oncologist* (pp. 0–7). University of Massachusetts Medical School. [https://doi.org/10.7191/cancer\\_concepts.1005](https://doi.org/10.7191/cancer_concepts.1005)
- World Health Organization. (n.d.). <https://www.who.int/>
- Xian, T. S., Onn, W. J., Misran, M., & Ali, H. M. (2016). Encapsulation of Platinum Complex of Indole-7-Carbaldehyde Thiosemicarbazone, Pt(L)(PPh<sub>3</sub>) into Nanolipid Carrier for Sustain Released Anti-Cancer Treatment. *Materials Today: Proceedings*, 3(2), 635–639. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2016.01.102>
- Xue, X., Hall, M. D., Zhang, Q., Wang, P. C., Gottesman, M. M., & Liang, X.-J. (2013). Nanoscale Drug Delivery Platforms Overcome Platinum-Based Resistance in Cancer Cells Due to Abnormal Membrane Protein Trafficking. *ACS Nano*, 7(12), 10452–10464. <https://doi.org/10.1021/nn405004f>
- Yan, F., Zhang, C., Zheng, Y., Mei, L., Tang, L., Song, C., Sun, H., & Huang, L. (2010). The effect of poloxamer 188 on nanoparticle morphology, size, cancer cell uptake, and cytotoxicity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(1), 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.05.004>
- Yang, J., Ju, Z., & Dong, S. (2017). Cisplatin and paclitaxel co-delivered by folate-decorated lipid carriers for the treatment of head and neck cancer. *Drug Delivery*, 24(1), 792–799. <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1236849>
- Yip, K. W., & Reed, J. C. (2008). Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene*, 27(50), 6398–6406. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.307>
- Yonezawa, A., & Inui, K. (2013). Novel riboflavin transporter family RFVT/SLC52: Identification, nomenclature, functional characterization and genetic diseases of RFVT/SLC52. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2–3), 693–701. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.014>
- Yuan, Q., Zhan, L., Zhang, L.-L., Wang, Q., Liu, J., Jiang, Z.-Y., Hu, X.-M., & Yuan, X.-C. (2016). Stanniocalcin 2 induces oxaliplatin resistance in colorectal cancer cells by upregulating P-glycoprotein. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 94(9), 929–935. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2015-0530>
- Zhang, Xiaojun, Karim, M., Hasan, M. M., Hooper, J., Wahab, R., Roy, S., & Al-Hilal, T. A. (2022). Cancer-on-a-Chip: Models for Studying Metastasis. *Cancers*, 14(3), 648. <https://doi.org/10.3390/cancers14030648>
- Zhang, Xiaonan, de Milito, A., Olofsson, M., Gullbo, J., D’Arcy, P., & Linder, S. (2015). Targeting Mitochondrial Function to Treat Quiescent Tumor Cells in Solid Tumors. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 27313–27326. <https://doi.org/10.3390/ijms161126020>
- Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C., & Xie, S. (2010). DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. *The AAPS Journal*, 12(3), 263–271. <https://doi.org/10.1208/s12248-010-9185-1>
- Zielińska, A., Ferreira, N. R., Feliczak-Guzik, A., Nowak, I., & Souto, E. B. (2020). Loading, release profile and accelerated stability assessment of monoterpenes-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). *Pharmaceutical Development and Technology*, 25(7), 832–844. <https://doi.org/10.1080/10837450.2020.1744008>

## Listado de Figuras

<b>Figura 1.1.</b> Mapa mundial del cáncer como causa principal de muerte prematura.....	2
<b>Figura 1.2.</b> Tasas de incidencia estimadas estandarizadas por edad en 2020 en América del Sur, todos los cánceres, ambos sexos, todas las edades. (OMS, Observatorio Global del Cáncer, 2020).....	4
<b>Figura 1.3.</b> Características principales del cáncer (Adaptado de Hanahan, 2022).....	8
<b>Figura 1.4.</b> Mecanismos de apoptosis (Adaptado de Kumar <i>et al.</i> , 2017).....	11
<b>Figura 1.5.</b> El papel del gen p53 en la formación de tumores malignos (Adaptado de "Robbins Basic Pathology, 10ª edición, 2017").....	12
<b>Figura 1.6.</b> Las etapas principales en la metástasis (Adaptado de Zhang <i>et al.</i> , 2022).	14
<b>Figura 1.7.</b> Número estimado de casos nuevos en 2020 en todo el mundo, ambos sexos, todas las edades (Observatorio Global del Cáncer, 2020). ....	15
<b>Figura 1.8.</b> Grados del cáncer de colon .....	17
<b>Figura 1.9.</b> Estructura química del cisplatino, carboplatino y oxaliplatino. ....	23
<b>Figura 1.10.</b> Mecanismo de acción del cisplatino (Adaptado de Kelland, 2007b). ....	24
<b>Figura 1.11.</b> Estructura química del satraplatino (a), picoplatino (b), iproplatino (c), Prolindac™ (d).....	29
<b>Figura 1.12.</b> Estructura química del clioquinol (a) y el 8-QO-Pt (b).....	30
<b>Figura 1.13.</b> Diferencia entre las eficiencias de carga SLN y NLC (Adaptado de Borges <i>et al.</i> , 2020).....	34



<b>Figura 1.14.</b> Los tipos de NLC: imperfecto (A); amorfo (B); y múltiples (C) (Adaptado de Haider <i>et al.</i> , 2020).....	35
<b>Figura 1.15.</b> Conversión de riboflavina a las formas activas de coenzima (Adaptado de <i>Riboflavin. Monograph</i> , 2008).....	38
<b>Figura 1.16.</b> Vías de internalización de RFV: (a) pinocitosis; (b) endocitosis mediada por clatrina; (c) transporte mediado por transportista. RFV; riboflavina, RCP; proteína transportadora de riboflavina, RFVT; transportador de riboflavina (Adaptado de Darguzyte <i>et al.</i> , 2020).....	40
<b>Figura 1.17.</b> Penetración del lipoplatino a través de la membrana celular de las células tumorales (Adaptado de Xue <i>et al.</i> , 2013). ....	46
<b>Figura 1.18.</b> Estructura química del Aroplatin <sup>™</sup> . ....	47
<b>Figura 2.1.</b> Síntesis del 8-QO-Pt.....	51
<b>Figura 2.2.</b> Fotografías de la línea celular HT-29, obtenidas de la página de <i>American Type Culture Collection</i> de líneas celulares ( <a href="https://www.atcc.org/">https://www.atcc.org/</a> ). ....	57
<b>Figura 2.3.</b> Conversión de MTT a formazan.....	58
<b>Figura 2.4.</b> Panel superior representación de la externalización de la fosfadilserina, y en el panel inferior, análisis de citometría de flujo de células no tratadas (izquierda) o tratadas (derecha) utilizando el kit de detección temprana de apoptosis de Anexina V-FITC.....	60
<b>Figura 2.5.</b> Imágenes TEM de NLC; Compuesto de 8-QO-Pt cargado (izquierda), vacío (derecha). ....	63

<b>Figura 2.6.</b> Espectros FTIR de ésteres cetílicos (SS), poloxámero 188, aceites líquidos; triglicérido cáprico y aceite de oliva y nanopartículas NLCA, (8-QO-Pt)-NLCA, NLCB y (8-QO-Pt)-NLCB.....	65
<b>Figura 2.7.</b> Patrones XRD de nanopartículas NLCA, (8-QO-Pt)-NLCA, NLCB y (8-QO-Pt)-NLCB. ....	67
<b>Figura 2.8.</b> Termogramas (TGA, A) y su derivada (DTGA, B) obtenidos por análisis termogravimétrico de (8-QO-Pt)-NLCA (negro), NLCA (violeta), (8-QO-Pt)-NLCB (verde), NLCB (azul), y 8-QO-Pt (rojo). ....	68
<b>Figura 2.9.</b> Termogramas DSC para NLCA (violeta), (8-QO-Pt)-NLCA (negro), NLCB (azul), (8-QO-Pt)-NLCB (verde), ésteres cetílicos (SS) (rosa), 8-QO-Pt (rojo), y poloxámero 188 (gris). ....	69
<b>Figura 2. 10.</b> Perfiles de liberación (Medio $\pm$ SD) de las nanopartículas (8-QO-Pt)-NLCA y (8-QO-Pt)-NLCB en los tres medios ensayados (pH 7,3, pH 5,5, y pH 4,4) durante 48 h y 24 h. ....	70
<b>Figura 2.11.</b> Perfiles de liberación (Medio $\pm$ SD) de las nanopartículas (8-QO-Pt)-NLCA (azul), (8-QO-Pt)-NLCB (verde), y el compuesto libre 8-QO-Pt (rojo) durante 72 h (a), 24 h (b) y 12 h (c).....	73
<b>Figura 2.12.</b> Citotoxicidad celular de formulaciones de NLC cargadas con 8-QO-Pt en la línea celular HT-29. Citotoxicidad dependiente de la concentración del compuesto 8-QO-Pt libre y NLC cargados con 8-QO-Pt en células HT-29 durante 24 h. Los datos se muestran como media $\pm$ error estándar de la media (SEM) (n= 9). ( $p^{**}< 0,003$ ; $p^{***}< 0,0007$ ).....	74

<b>Figura 2.13.</b> Captación celular de nanopartículas vacías (-) marcadas con DiOC18 de NLCA (azul) y NLCB (verde) en células HT-29 medidas por citometría de flujo. Las células se incubaron durante 6 h a la concentración equivalente a 5,0, 10,0, y 25,0 $\mu\text{M}$ de formulaciones de NLC cargadas con 8-QO-Pt (+). .....	76
<b>Figura 2.14.</b> Efectos apoptóticos del compuesto 8-QO-Pt libre y (8-QO-Pt)-NLCA a 1,0 $\mu\text{M}$ , 2,5 $\mu\text{M}$ y 5,0 $\mu\text{M}$ después de 48 h de incubación con células HT-29. (A) muestra los dot-plot obtenidos del análisis por citometría de flujo y (B) muestra el porcentaje de subpoblaciones vitales (V-/IP-), apoptóticas tempranas (V+/IP-), apoptóticas tardías (V+/IP+) y necróticas (V-/IP+). .....	79
<b>Figura 3.1.</b> Fotografías de la línea celular HCT 116, obtenidas de la página de <i>American Type Culture Collection</i> de líneas celulares ( <a href="https://www.atcc.org/">https://www.atcc.org/</a> ). .....	84
<b>Figura 3.2.</b> Una configuración de cultivo de cáncer esferoide (Velliou <i>et al.</i> , 2020). ...	87
<b>Figura 3.3.</b> Técnica <i>liquid overlay</i> .....	88
<b>Figura 3.4.</b> El principio del ensayo de viabilidad celular de resazurina ( <i>Biomaxmall</i> , n.d.).....	89
<b>Figura 3.5.</b> Ensayo de migración de esferoides (Kramer <i>et al.</i> , 2013).....	90
<b>Figura 3.6.</b> Esquema de administración de fármaco específicos de tumores dirigidos por RFV mediante NLC.....	92
<b>Figura 3.7.</b> Distribución de tamaño de las formulaciones de NLC/RFV cargadas con 8-QO-Pt (+); R1-8-QO-Pt-NLC (a), R2-8-QO-Pt-NLC (b), R3-8-QO-Pt-NLC (c). .....	95

<b>Figura 3.8.</b> Imágenes TEM de las nanopartículas de NLC/RFV; R1-8-QO-Pt-NLC (A1), R1-NLC (A2), R2-8-QO-Pt-NLC (B1), R2-NLC (B2), R3-8-QO-Pt-NLC (C1), R3-NLC (C2). .....	96
<b>Figura 3.9.</b> Perfiles de liberación del 8-QO-Pt libre (rojo), R1-8-QO-Pt-NLC (azul), R2-8-QO-Pt-NLC (amarillo) y R3-8-QO-Pt-NLC (verde) durante 24 h. ....	98
<b>Figura 3.10.</b> Citotoxicidad celular del compuesto 8-QO-Pt libre y las formulaciones cargadas (+) de 8-QO-Pt de NLC/RFV frente a las líneas celulares HT-29 y HCT 116 durante 24 h. Los datos se muestran como media $\pm$ error estándar de la media (SEM) (n= 9). ( $p^* < 0,02$ ; $p^{**} < 0,001$ ; $p^{***} < 0,0003$ ; $p^{****} < 0,0001$ ). ....	101
<b>Figura 3.11.</b> Captación celular de nanopartículas vacías (-) de NLC/RFV marcadas con DiOC18 en las células HCT 116 y HT-29 medidas por citometría de flujo. Las células se incubaron durante 24 h a la cantidad equivalente de concentración para formulaciones de NLC/RFV cargadas con 8-QO-Pt (+) a 0,5 $\mu$ M y 2,5 $\mu$ M, respectivamente. ....	103
<b>Figura 3.12.</b> Efecto de apoptosis del compuesto 8-QO-Pt libre y R1-8-QO-Pt-NLC a 2,5 y 5,0 $\mu$ M con HT-29, y 1,0 y 2,5 $\mu$ M con HCT 116 después de 24 h. Los datos se muestran como media $\pm$ SEM (n= 3). ....	105
<b>Figura 3.13.</b> Microfotografías de esferoides de la línea HCT 116. Fotografías adquiridas con un microscopio óptico Olympus BX50, que posee un objetivo 40x luego del tratamiento con ambos el compuesto 8-QO-Pt libre y R1-8QO-PT-NLC con diferentes concentraciones. ....	107

**Figura 3.14.** Citotoxicidad celular del compuesto 8-QO-Pt libre y R1-8-QO-Pt-NLC frente a los esferoides de la línea celular de HCT 116 durante 24 h. Los datos se muestran como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) (n = 2) (\* $p$  = 0,0248, \*\* $p$  = 0,0064)..... 107

**Figura 3.15.** Los cambios en el volumen corregido (%) de los esferoides de HCT 116 después del tratamiento con el compuesto 8-QO-Pt libre, y R1-8QO-PT-NLC . Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM (n = 2) (\* $p$  = 0,0289, \*\* $p$  < 0,0090, \*\*\*\* $p$  < 0,0001) ..... 108

**Figura 3.16.** Efecto del compuesto 8-QO-Pt libre y R1-8-QO-Pt-NLC en la migración celular de esferoides 3D HCT 116 en comparación con sus controles. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM (n = 2) (\*\*\* $p$  = 0,0003, \*\*\*\* $p$  < 0,0001)..... 110

**Figura 3.17.** (a) Grado de hemólisis de 8-QO-Pt, RFV y sus combinaciones después de la exposición a células sanguíneas humanas durante 24 h y 48 h. Controles: positivo (PC) con Triton X-100 al 1,0%; y negativo (NC) con sangre no tratada. (b) Grado de hemólisis de formulaciones cargadas (+) y vacías (-) de 8-QO-Pt de NLC / RFV después de la exposición a células sanguíneas humanas durante 24 h y 48 h. .... 112

## Listado de Tablas

<b>Tabla 2.1.</b> Tamaño promedio y PDI de NLC por DLS. No se encontraron diferencias significativas entre formulaciones (ANOVA, $p > 0,05$ ). $Z_{av}$ - Tamaño promedio (nm), PDI - Índice de polidispersidad. ....	63
<b>Tabla 2.2.</b> Análisis de modelado de los perfiles de liberación de las nanopartículas y el fármaco libre. Se muestran las siguientes medidas de bondad de ajuste: $R^2$ , $R^2$ ajustado, error cuadrático medio (MSE), el criterio de información de Akaike (AIC).....	72
<b>Tabla 2.3.</b> La captación celular (%) para las formulaciones en las tres concentraciones. ....	76
<b>Tabla 3.1.</b> La cantidad de RFV en las formulaciones. ....	81
<b>Tabla 3.2.</b> Eficiencia de encapsulación de las formulaciones de NLC/RFV (EE,%). ...	93
<b>Tabla 3.3.</b> $Z_{av}$ , PDI y Z-pot de NLC obtenidos por DLS. $Z_{av}$ : tamaño promedio (nm); PDI: índice de polidispersidad; Pote Z: $\zeta$ (mV). Todos los valores son la media y la desviación estándar ( $n = 3$ ). ....	94
<b>Tabla 3.4.</b> Medidas del ajuste a los modelos de liberación de los datos correspondientes a las formulaciones R1-8-QO-Pt-NLC, R2-8-QO-Pt-NLC y R3-8-QO-Pt-NLC. Se muestran las siguientes medidas de bondad de ajuste: $R^2$ , $R^2$ -ajustado, error cuadrático medio (MSE), el criterio de información de Akaike (AIC). ....	99
<b>Tabla 3.5.</b> Valores $IC_{50}$ ( $\mu M$ ) de 8-QO-Pt libre y 8-QO-Pt cargadas (+) de NLC/RFV en células HT-29 y HCT 116 después de 24 h de incubación. ....	102

**Tabla 3.6.** La captación celular (%) para las formulaciones..... 103