



**UNIVERSIDAD DE GRANADA
ESCUELA DE DOCTORADO DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE DOCTORADO
MEDICINA CLÍNICA Y SALUD PÚBLICA**

TESIS DOCTORAL

**LA INHIBICIÓN DE LA POLI (ADP-RIBOSA) POLIMERASA-1
MEDIANTE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS
FUNCIONALIZADAS CON ABT-888 POTENCIA LA
CITOTOXICIDAD DE TEMOZOLOMIDA EN LÍNEAS
CELULARES DE HEPATOCARCINOMA**

ANDRÉS BARRIENTOS DELGADO

GRANADA 2015

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autor: Andrés Barrientos Delgado

ISBN: 978-84-9125-453-9

URI: <http://hdl.handle.net/10481/42051>

A mis padres

**EL DR. FRANCISCO JAVIER SALMERÓN ESCOBAR,
CATEDRÁTICO DE DIGESTIVO DEL DEPARTAMENTO DE
MEDICINA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal D. Andrés Barrientos Delgado sobre el tema “La inhibición de la Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa-1 mediante nanopartículas poliméricas funcionalizadas con ABT888 potencia la citotoxicidad de Temozolomida en líneas celulares de hepatocarcinoma”, ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica y científica de su autor, en condiciones tan aventajadas que lo hacen acreedor del título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada, a 26 de Octubre de 2015

Fdo. Dr. Francisco Javier Salmerón Escobar

**EL DR. JOSE ANTONIO MUÑOZ GÁMEZ, CONTRATADO
POST-DOCTORAL EN EL COMPLEJO HOSPITALARIO
UNIVERSITARIO DE GRANADA**

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal D. Andrés Barrientos Delgado sobre el tema “La inhibición de la Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa-1 mediante nanopartículas poliméricas funcionalizadas con ABT888 potencia la citotoxicidad de Temozolomida en líneas celulares de hepatocarcinoma”, ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica y científica de su autor, en condiciones tan aventajadas que lo hacen acreedor del título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada, a 26 de Octubre de 2015

Fdo. Dr. Jose Antonio Muñoz Gámez

El doctorando ***Andrés Barrientos Delgado***, y los directores de la tesis el ***Dr. Francisco Javier Salmerón Escobar y el Dr. Jose Antonio Muñoz Gámez***, garantizamos al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis, y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo se han respetado los derechos de otros autores a ser citados cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

En Granada, a 26 de Octubre de 2015

Directores de la Tesis :

Doctorando:

Fdo:Fco Javier Salmerón Escobar

Fdo: Andrés Barrientos Delgado

Fdo: Jose Antonio Muñoz Gámez

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS	21-24
RESUMEN	25-30
INTRODUCCIÓN	31-66
1. CARCINOMA HEPATOCELULAR	33-48
1.1. Epidemiología	33-35
1.2. Factores de riesgo	36-39
1.2.1. Virus de la hepatitis C.....	37
1.2.2. Virus de la hepatitis B	37-38
1.2.3. Otros factores de riesgo	38-39
1.3. Manifestaciones clínicas.....	39
1.4. Diagnóstico precoz de CHC.....	39-40
1.5. Diagnóstico de confirmación de CHC.....	40-42
1.6. Evaluación pronóstica.....	42-44
1.7. Tratamiento.....	44-48
1.7.1. Resección quirúrgica	45
1.7.2. Trasplante hepático	45-46
1.7.3. Técnicas de ablación tumoral percutánea	46-47
1.7.4. Técnicas intraarteriales	47-48
1.7.5. Tratamiento sistémico: Sorafenib.....	48
2. PARP	49-60
2.1. Familia PARP.....	49-50
2.2. Estructura de PARP-1.....	51-52
2.3. Actividad enzimática de PARP-1.....	52-54
2.4. Funciones de PARP-1	54-57
2.5. Sobre-expresión de PARP-1 en el CHC y otros tumores	57
2.6. Resistencia a fármacos inhibidores de PARP-1.....	57-58

2.7. PARP-1 en combinación con agentes antitumorales.....	58-59
2.8. Inhibidores de PARP-1 en ensayos clínicos.....	59-60
3. NANOPARTÍCULAS.....	61-66
3.1. Nanopartículas magnéticas.....	63-64
JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	67-70
OBJETIVOS	71-74
MATERIAL Y MÉTODOS	75-88
1. Líneas celulares y fármacos.....	77
2. Preparación de Nanopartículas y su caracterización.....	77-81
2.1. Materiales	78
2.2. Preparación de los núcleos de hierro monodispersos.....	78
2.3. Oxidación controlada de NP de hierro a NP Magnetita.....	79
2.4. Síntesis de NP Fe/Fe ₃ O ₄ recubiertas por Sílice	79-80
2.5. NP Fe/Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ vehiculizadas con Temozolomida	80
2.6. NP Fe/Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ vehiculizadas simultáneamente con TMZ y ABT-888	81
3. Métodos de caracterización.....	81-84
3.1. Tamaño	81
3.2. Caracterización de la carga eléctrica de las NPs.....	82
3.3. Determinación de la concentración de TMZ y ABT-888 adsorbidas por las NPs	82-83
3.4. Determinación de la concentración de fármacos liberados de NP/TMZ/ABT-888	83
3.5. Estudio de la estabilidad de suspensiones de NPs	83-84
4. Inmunofluorescencia.....	84-85
5. Análisis de viabilidad celular.....	85-86
6. Medición del ciclo celular, despolarización mitocondrial	

y muerte por apoptosis	86
7. Determinación de la expresión genética de genes relacionados con PARP-1, obtención de ARN mensajero, de ADN complementario y cuantificación por PCR	87
8. Inmunoblotting.....	87-88
9. Análisis estadístico.....	88
RESULTADOS I: Síntesis y caracterización de nanopáticas.....	89-100
RESULTADOS II: Resultados en líneas celulares de CHC	101-118
1. Capacidad de las Nanopartículas para penetrar en las células tumorales hepáticas	103-104
2. El tratamiento con NPs vehiculizadas con fármacos (TMZ) provoca la activación de PARP-1 y el inhibidor ABT-888 bloquea dicha activación	105-107
3. Estudio de viabilidad celular tras tratamiento con NP/TMZ/ABT-888	107-111
4. El tratamiento con ABT-888 induce parada del ciclo celular, acumulación de daño en el ADN, despolarización mitocondrial y muerte celular apoptótica.....	111-117
5. La inhibición de PARP-1 inducida por ABT-888 reduce la expresión de genes claves involucrados en la supervivencia celular.....	117-118
7. DISCUSIÓN	119-126
8. CONCLUSIONES	127-130
9. ARTÍCULOS Y COMUNICACIONES	131-134

10. BIBLIOGRAFÍA	135-147
-------------------------------	----------------

ABREVIATURAS

A₀: Adsorbancia inicial
ABT-888: Veliparib
AFP: Alfafetoproteína
ADN: Ácido Desoxirribonucleico
BCLC: Barcelona Clinic Liver Cancer
BER: Reparación por escisión de bases
CH: Cirrosis hepática
CHC: Carcinoma hepatocelular
cm: Centímetro
CV: Carga viral
DBD: Dominio de unión al ADN
DDL: Dispersión dinámica de luz
DS: Desviación standard
EEUU: Estados Unidos
HBeAg: Antígeno "e" del Virus de la Hepatitis B
HBsAg: Antígeno "s" del Virus de la Hepatitis B
h: Horas
Hg: Mercurio
IC: Intervalo de confianza
IFN: Interferón
IP: Ioduro de Propidio
IPE: Inyección percutánea de etanol
kDa: KiloDalton
MCL: Microscopía confocal Laser
MET: Microscopía electrónica de transmisión
mg: Miligramo
mL: Mililitro
mM: Milimol
mm: Milímetro
NAD: Nicotinamida Adenina Dinucleótido

NLS: Secuencia de localización nuclear

nM: Nanomolar

nm: Nanometro

NP: Nanopartícula

NPM: Nanopartícula magnética

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAAF: Punción-Aspiración con aguja fina

PAR: Poli (ADP-ribosa)

PARG: Poli (ADP-Ribosa) Glico Hidrolasa

PARP: Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa

QETA: Quimioembolización transarterial

RE: Radioembolización

RF: Radiofrecuencia

RM: Resonancia Magnética

rpm: Revoluciones por minuto

s: Segundo

SSBR: Sistema de reparación de daños de cadena simple

t: Tiempo

TC: Tomografía computerizada

TOH: Trasplante ortotópico hepático

TMZ: Temozolamida

VHB: Virus de la hepatitis B

VHC: Virus de la hepatitis C

µg: Microgramo

µL: Microlitro

°C: Grado centígrado

RESUMEN

RESUMEN

➤ **Introducción**

El carcinoma hepatocelular (CHC), o hepatocarcinoma, es el tumor primario de hígado más frecuente (85-90%) y constituye un problema de salud mundial. Es el sexto cáncer más frecuente y la tercera causa de muerte relacionada con el cáncer, representando el 7% del cáncer global. En fases tempranas, la resección quirúrgica, el trasplante hepático y la ablación percutánea, pueden considerarse como tratamiento curativo; pero en fases avanzadas, existe un pobre pronóstico a largo plazo.

Poli (ADP-ribosa)-1 (PARP-1) es una proteína de detección de daños en el ADN y es capaz de unirse a roturas de cadena producidas por agentes genotóxicos, así como señalar el daño en el ADN a los complejos de reparación. Se ha observado un incremento de expresión de PARP-1 en líneas celulares de hepatocarcinoma, y en tejido hepático tumoral, en comparación con tejido hepático sano peritumoral. El uso de inhibidores de PARP ha demostrado incrementar la sensibilidad celular frente a agentes citotóxicos, como es el caso de la Temozolamida (alquilantes).

Por otro lado, la Nanoterapia ha surgido como una innovadora alternativa a la quimioterapia convencional, con el objetivo de vehicular el fármaco de forma selectiva hacia el tumor y evitar los fenómenos de resistencia a fármacos antitumorales. El empleo de NP magnéticas permite evadir estos mecanismos de resistencia antitumoral, permitiendo incrementar la concentración intracelular del fármaco, mejorando así su efecto citotóxico.

➤ **Justificación**

El hepatocarcinoma (CHC) es un tumor con un pobre pronóstico cuando se diagnostica en estadios avanzados, siendo escaso el arsenal terapéutico, con bajas tasas de respuesta y elevados efectos adversos.

Por otro lado, se ha estudiado la *inhibición enzimática de la actividad de PARP-1* en un amplio rango de enfermedades, incluyendo el infarto, daño por isquemia-reperfusión, diabetes, shock y otras formas de inflamación, demostrando mejorar distintas formas de daño hepático. Además, se están utilizando varios inhibidores de PARP-1 en ensayos clínicos en el campo de fármacos antitumorales en diversos tipos de tumores, incluido el hepatocarcinoma celular.

En este contexto, hemos decidido evaluar la nanotecnología como vehículos transportadores de fármacos, (inhibidor de PARP-1 conocido como ABT-888 y la Temozolomida como agente inductor de daños en el ADN), en el tratamiento del carcinoma hepatocelular. Pensamos que esta propuesta puede constituir una aproximación terapéutica efectiva del CHC.

➤ **Hipótesis**

Con estos antecedentes, nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo: “La vehiculización del inhibidor de PARP-1, ABT888, en combinación con Temozolomida en nanopartículas magnéticas poliméricas dirigidas hacia el hepatocarcinoma podría constituir una interesante estrategia terapéutica”

➤ **Objetivos**

1. Vehiculización del agente alquilante Temozolomida y el inhibidor de PARP-1 ABT-888, de forma simultánea, usando el diseño de nanopartículas magnéticas.

2. Estudio de la caracterización de las nanopartículas.

3. Estudio de la estabilidad de las nanopartículas conjugadas con fármacos y liberación de los mismos.

4. Determinar la capacidad de los nanotransportadores para alcanzar el interior de las células tumorales.

5. Análisis de la liberación de ambos fármacos en el interior de las células y del efecto citotóxico inducido por éstos en comparación con el efecto que producirían si no fuesen vehiculizados.

➤ **Material y Métodos**

Los núcleos de magnetita (Fe_3O_4) fueron encapsulados por una capa de sílice que facilitase la incorporación simultánea de ABT-888 y TMZ.

Las pruebas *in vitro* fueron realizadas con líneas celulares hepáticas tumorales HepG2, Hep3B y PLC-PRF-5, y con una línea celular hepática no tumoral WRL-68.

➤ **Resultados**

Las nanopartículas magnéticas fueron cargadas simultáneamente con ABT-888 y TMZ. Se alcanzó una alta estabilidad y una liberación prolongada en el medio de cultivo. Las imágenes por microscopía confocal mostraron que las nanopartículas cargadas con fármacos alcanzaron el citoplasma de las células tumorales hepáticas, desencadenando los siguientes efectos: detención del ciclo celular G2/M ($P<0.05$), acumulación de daño en el ADN ($P<0.05$), despolarización mitocondrial ($P<0.01$), reducción de la expresión de genes BCL-xL, FOS y JUND ($P<0.05$), fragmentación de PARP-1, activación de Caspasa-3 y muerte celular apoptótica ($P<0.05$).

Los fármacos vehiculizados mediante nanopartículas demostraron una mayor eficiencia que los fármacos libres (la muerte celular desencadenada por nanosistemas de liberación de fármacos fue de un 53.5% versus un 34.5% de los fármacos libres, $P=0.01$).

➤ **Conclusiones**

Estas nanopartículas magnéticas son capaces de incorporar ambos fármacos de forma simultánea, penetrando en las células tumorales y permitiendo la liberación de los fármacos. NP/TMZ/ABT-888 disminuye la transcripción de genes clave involucrados en la supervivencia tumoral e induce la muerte celular apoptótica de una forma más efectiva que la alcanzada por los fármacos libres.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. CARCINOMA HEPATOCELULAR

1.1. EPIDEMIOLOGÍA

El carcinoma hepatocelular (CHC), o hepatocarcinoma, es el tumor primario de hígado más frecuente (85-90%) y constituye un problema de salud mundial. Es el sexto cáncer más frecuente (749.000 nuevos casos), la tercera causa de muerte relacionada con el cáncer (692.000 casos) y supone un 7% del cáncer global. Muestra un intenso predominio en el sexo masculino, con una relación de varones a mujeres que se estima en 2,4 (Ferlay et al. 2010).

El patrón de presencia del CHC muestra una clara distribución geográfica, con las tasas de incidencia máximas en Asia Oriental, África Subsahariana y Melanesia, en donde se da el 85% del total de casos. En los países desarrollados la incidencia es baja, excepto en el sur de Europa, donde la incidencia en varones es significativamente superior a la de otros países desarrollados (Bosetti et al. 2008). Hay una incidencia creciente del CHC a nivel mundial. Globalmente, las tasas de incidencia y de mortalidad fueron de 65.000 y 60.240 casos en Europa y de 21.000 y 18.400 en los Estados Unidos (EEUU), respectivamente, en 2008. Se estima que al llegar el año 2020 el número de casos alcanzará los 78.000 y 27.000, respectivamente. En España se estima una incidencia anual de 7,2 y 5,5 casos por 100000 habitantes en varones y mujeres, respectivamente (Ferlay et al. 2010).

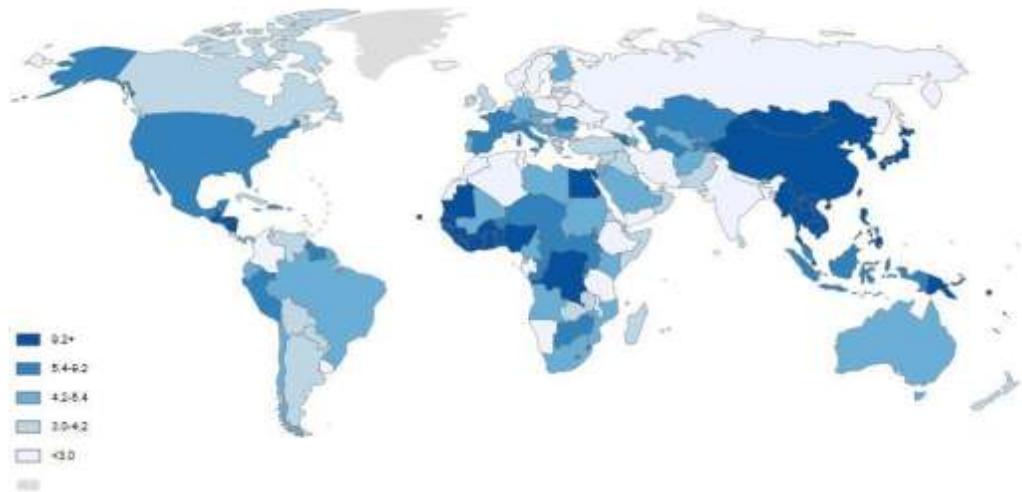


Figura 1. Tasa de incidencia de hepatocarcinoma según distribución mundial. *Tasas de incidencia de CHC por 100000, ajustadas para la edad en 2008. La intensidad del color es proporcional a la magnitud de la incidencia. (Datos de: Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10.)*

En África y Asia Oriental, la parte más importante de casos atribuibles de CHC es la de los debidos al virus de la hepatitis B (VHB), mientras que en los países occidentales desarrollados solamente un 20% de los casos pueden atribuirse a la infección por el VHB, y la infección crónica por el virus de la hepatitis C (VHC) es el principal factor de riesgo. A nivel mundial, aproximadamente el 54% de los casos pueden atribuirse a la infección por VHB (que afecta a 400 millones de personas en todo el mundo) mientras que un 31% de los casos pueden atribuirse a la infección por VHC (que afecta a 170 millones de personas), con lo que quedan aproximadamente un 15% asociados a otras causas (Parkin et al. 2005).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que unos 160 millones de personas están infectadas por el VHC en todo el mundo, lo que supone aproximadamente un 2.35 % de la población (Lavanchy 2011). En

España la prevalencia oscila entre el 1,6-2,6%, unos 480.000-760.000 infectados crónicos por el VHC. Entre el 75-85% de los casos la infección progresa a una forma crónica, de los cuales un 20-30% desarrollan una cirrosis hepática (CH) en un tiempo medio desde el inicio de la infección de 20 años (Alazawi et al. 2010) (Figura 2).

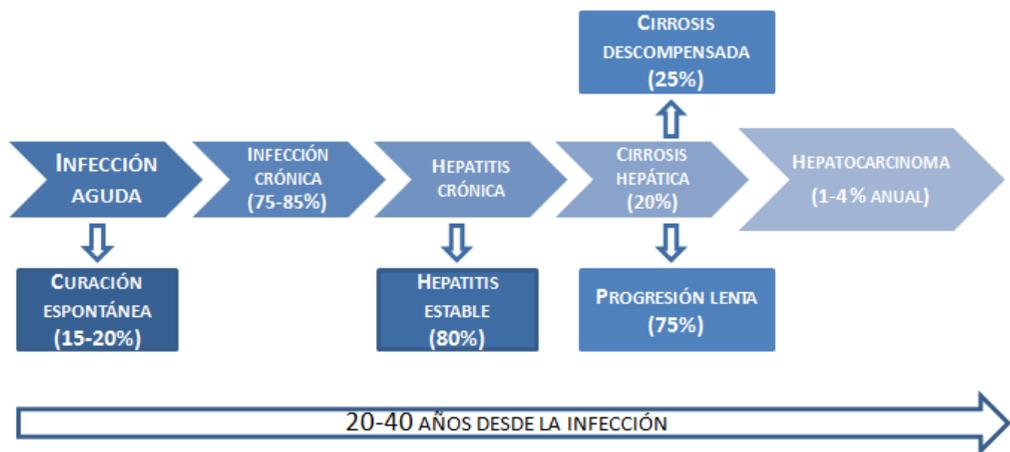


Figura 2. Historia natural de la infección por el virus de la hepatitis C (VHC)

Las personas infectadas por el VHC en Europa, durante el periodo 1940-1960, y en EEUU, una década después, han llevado al actual aumento de la incidencia del CHC. En EEUU, la tasa de muertes por CHC parece haber aumentado en alrededor de un 40% a lo largo del periodo 1990-2004, mientras que la tasa global de muertes por cáncer ha disminuido en aproximadamente un 18% durante el mismo periodo de tiempo (Jemal et al. 2008).

Este aumento de la incidencia puede también deberse a un aumento del CHC relacionado con el VHB, en especial en los inmigrantes procedentes de países endémicos. Se ha observado una reducción de la tasa de CHC asociado al VHB en países endémicos, como consecuencia de la vacunación universal en niños frente al VHB (Chang et al. 2009).

1.2. FACTORES DE RIESGO

Todos los agentes que pueden dar lugar a daño hepático con evolución a cirrosis hepática (CH) constituyen factores de riesgo para el desarrollo de hepatocarcinoma, pero el riesgo es clínicamente relevante cuando se ha establecido la CH y especialmente cuando hay hipertensión portal (Bruix et al. 2011). No obstante, no todos los pacientes desarrollan cáncer y, por tanto, debe haber un mecanismo que facilite o impida su aparición, aunque la enfermedad hepática sea aparentemente idéntica. Los mecanismos relacionados con el desarrollo de cáncer incluyen estrés oxidativo, detoxificación, metabolismo del hierro, inflamación, síntesis y reparación del ADN (Farazi and DePinho 2006). Obviamente, la anulación de la replicación viral, el abandono del alcohol y el control de sobrepeso contribuyen a disminuir el riesgo, pero factores intrínsecos del paciente pueden ser determinantes para un mayor riesgo de CHC. Se recogen los factores de riesgo de CHC en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Factores de riesgo de Hepatocarcinoma

Virus de la hepatitis C (VHC)

Virus de la hepatitis (VHB)

Alcohol

Factores ambientales (Aflatoxina)

Esteatohepatitis no alcohólica

1.2.1 VIRUS HEPATITIS C

Se ha observado una fuerte asociación entre la infección crónica por VHC y el CHC. El CHC en pacientes con infección crónica por VHC se produce casi exclusivamente en estadios avanzados de fibrosis o cirrosis hepática (Lok et al. 2009).

En general se cree que el CHC es consecuencia de la inflamación crónica inducida por el VHC. Una de las teorías describe un desequilibrio entre el microambiente y la liberación de citocinas del hígado infectado por VHC, lo que lleva a una mayor inflamación y renovación celular, desencadenando finalmente en cirrosis hepática. Los hepatocitos pobremente diferenciados probablemente proliferan y se desarrollan nódulos displásicos y posteriormente CHC (Budhu and Wang 2006). En apoyo de esta hipótesis se ha observado que el CHC inducido por VHC se correlaciona más bien con el grado de inflamación y necrosis. Por el contrario, el CHC relacionado con VHB no se correlaciona tanto con la inflamación, sino que parece haber oncogenes específicos inducidos por el virus que implican mayor riesgo de CHC.

Se ha asociado el uso de Interferón como tratamiento para la hepatitis C con un menor riesgo de CHC. Los beneficios son más notorios sobre todo entre los pacientes que logran una respuesta virológica sostenida (Shen et al. 2012).

1.2.2. VIRUS HEPATITIS B

El CHC puede desarrollarse en pacientes con infección crónica por VHB, incluso en ausencia de CH; sin embargo, del 70 al 90% de los pacientes con VHB que desarrollan CHC presenta una CH subyacente. Varios estudios han demostrado la asociación existente entre la infección crónica por VHB y el desarrollo de hepatocarcinoma (Tsukuma et al. 1993, Yu and Chen 1994). Se han

asociado otros factores con el riesgo de desarrollar CHC entre los pacientes con infección crónica por VHB, incluyendo la carga viral, la replicación viral activa (presencia de Antígeno “e”, HBeAg), y la presencia del antígeno de superficie (HBsAg)(Yang et al. 2002, Chen et al. 2006).

El riesgo de CHC también es elevado en pacientes portadores inactivos en comparación con la población general (Chen et al. 2010). Existe evidencia de que los pacientes con infección resuelta serológicamente mantienen un elevado riesgo para CHC. A pesar de que el pronóstico es generalmente favorable, el aclaramiento de HBsAg no impide el desarrollo de CH o CHC (Tong et al. 2007).

Varios estudios han evaluado el impacto del tratamiento para la infección crónica del VHB sobre el riesgo de desarrollar CHC. Los datos disponibles indican que el riesgo relativo se reduce en aproximadamente un 60% después del tratamiento con interferón o análogos de nucleós(t)idos (Sung et al. 2008). Sin embargo, el tratamiento no elimina completamente el riesgo y no se ha observado beneficio en pacientes que desarrollan resistencias al tratamiento antiviral.

1.2.3. OTROS FACTORES DE RIESGO

La relación entre el alcohol y el CHC puede ser debida a un efecto tóxico directo o indirecto, ya que el alcohol representa un factor de riesgo importante para el desarrollo de CH, que es un factor predisponente para el CHC (Velazquez et al. 2003).

La aflatoxina es una micotoxina producida por *Aspergillus* que puede contaminar el maíz, la soja y los cacahuets. El consumo elevado de aflatoxinas se asocia con CHC (Chen et al. 1996), además se han descrito mutaciones del gen

supresor tumoral p53 en pacientes con CHC con exposición continua a aflatoxinas (Bressac et al. 1991).

Algunos factores, como el café (Bravi et al. 2013), la metformina (Chen et al. 2013) o fármacos betabloqueantes (Nkontchou et al. 2012), se han asociado con un menor riesgo a través de mecanismos no conocidos, pero que participan en la oncogénesis.

1.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Los pacientes que presentan un CHC generalmente presentan la misma sintomatología de su hepatopatía crónica. La sospecha de CHC debería ser mayor en aquellos pacientes con CH compensada que se descompensan, presentando ascitis, encefalopatía, ictericia o hemorragia digestiva por varices esofágicas. A menudo estas complicaciones se asocian con la extensión del tumor a través de la vena porta o hepática, o por desarrollo de shunts arteriovenosos inducidos por el propio tumor (Sugano et al. 1994).

En fases avanzadas, algunos pacientes pueden presentar dolor leve en hemiabdomen superior, pérdida de peso, saciedad precoz, o una masa abdominal palpable. En la mayoría de los pacientes, los hallazgos en la exploración física reflejan la enfermedad hepática subyacente, tales como ascitis, esplenomegalia, ictericia, y ocasionalmente hepatomegalia.

1.4. DIAGNÓSTICO PRECOZ DE CHC

Se recomienda incluir en programas de cribado a aquellos pacientes que, en el caso de que fueran diagnosticados de CHC, pudiesen someterse a tratamiento del mismo. Teniendo en cuenta que la única posibilidad de aplicar tratamientos con intención curativa es diagnosticando la enfermedad en una fase

inicial, asintomática, esta posibilidad solo es factible si se efectúa un cribado de la población en riesgo. Dado que el principal factor de riesgo del CHC es la presencia de CH, deben considerarse candidatos a cribado todos los sujetos cirróticos, independientemente de la etiología, así como aquellos pacientes con infección crónica de VHB sin CH, pero con largo tiempo de evolución o adquisición perinatal de la infección.

Se recomienda un seguimiento mediante ecografía abdominal realizada por personal experto cada seis meses. La ecografía abdominal posee una sensibilidad del 65-80% y una especificidad superior del 90% para la detección precoz del CHC (Bolondi 2003). La realización de tomografía computarizada (TC) como técnica de cribado no se aconseja por su baja rentabilidad y el riesgo asociado a la irradiación (Brenner and Hall 2007).

La alfafetoproteína (AFP) ha mostrado un bajo rendimiento diagnóstico, dado que sus valores en muchos casos son normales en tumores en fase precoz y que los sujetos con cirrosis hepática pueden presentar elevaciones transitorias de AFP en ausencia de CHC (Sherman 2001).

1.5. DIAGNÓSTICO DE CONFIRMACIÓN DE CHC

La probabilidad de que un nódulo detectado en un hígado cirrótico se trate de CHC es muy elevada, especialmente si el diámetro excede los 10 mm. Por tanto, si el nódulo detectado supera este límite, se recomienda realizar estudios complementarios para llegar a un diagnóstico concluyente. El CHC presenta una vascularización predominantemente arterial, a diferencia del parénquima hepático en donde la vascularización es mixta: arterial y portal (Kojiro and Roskams 2005). Esto determina un patrón vascular específico, caracterizado por una intensa captación de contraste en fase arterial (hipervascularización) seguido

de un lavado de contraste en fase venosa (o fase tardía), lo cual permite establecer un diagnóstico no invasivo de CHC.

Actualmente, se acepta el uso de una sola técnica de imagen, TC o Resonancia Magnética (RM), para el diagnóstico de CHC en lesiones mayores de 10 mm [Figura 3] (de Lope et al. 2012). En el caso de nódulos menores de 1 cm, dada la baja probabilidad de que sean de naturaleza maligna y dada la dificultad que supone su correcta caracterización, se recomienda realizar un seguimiento estrecho mediante ecografía cada 3-6 meses con la finalidad de detectar su posible crecimiento (Forner et al. 2008).

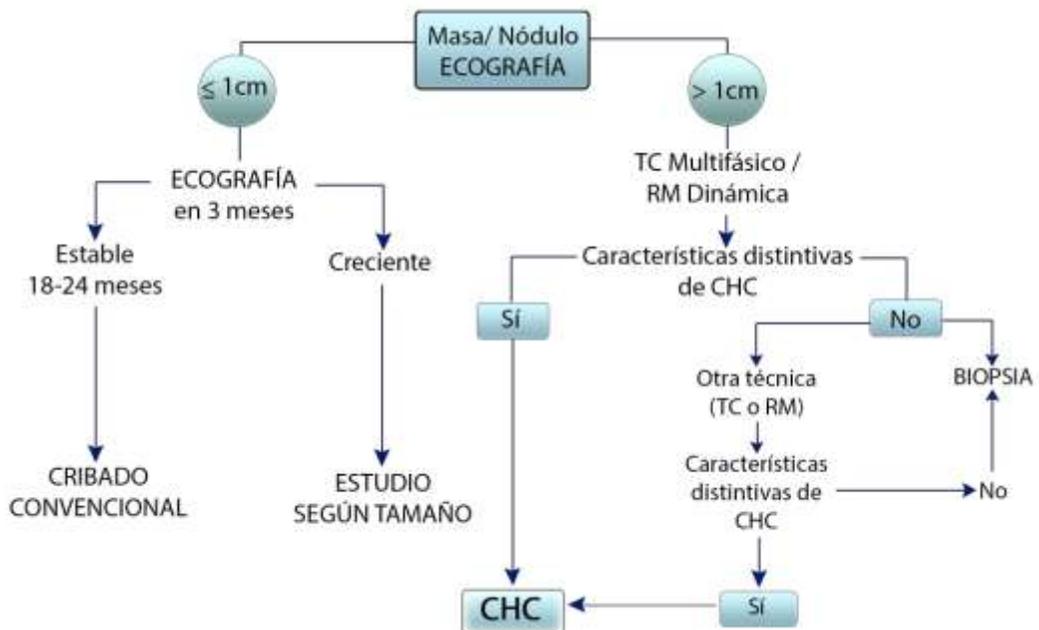


Figura 3. Algoritmo diagnóstico del Carcinoma Hepatocelular.

Adaptado de Bruix y Sherman 2011. CHC, Carcinoma hepatocelular; RM, Resonancia magnética; TC, Tomografía computerizada.

Si el patrón vascular no es específico, el diagnóstico concluyente de CHC debe basarse en la anatomía patológica. Ante el resultado negativo de una PAAF (punción-aspiración con aguja fina) no se puede descartar el diagnóstico de CHC y se debe valorar una nueva PAAF o un seguimiento estrecho del nódulo hepático (Forner et al. 2009).

1.6. DIAGNÓSTICO PRECOZ DE CHC

El sistema de clasificación BCLC (“Barcelona Clinic Liver Cancer”) relaciona la estratificación y el tratamiento del CHC, siendo el recomendado por la Asociación Americana del Estudio de Enfermedades Hepáticas (AASLD) por su capacidad predictiva y por su utilidad en la decisión de tratamiento (de Lope et al. 2012). Incluye variables asociadas al estadio tumoral, la función hepática y la presencia de síntomas; además, establece el pronóstico de acuerdo con cinco estadios que se vinculan a una potencial indicación de tratamiento [Figura 4].

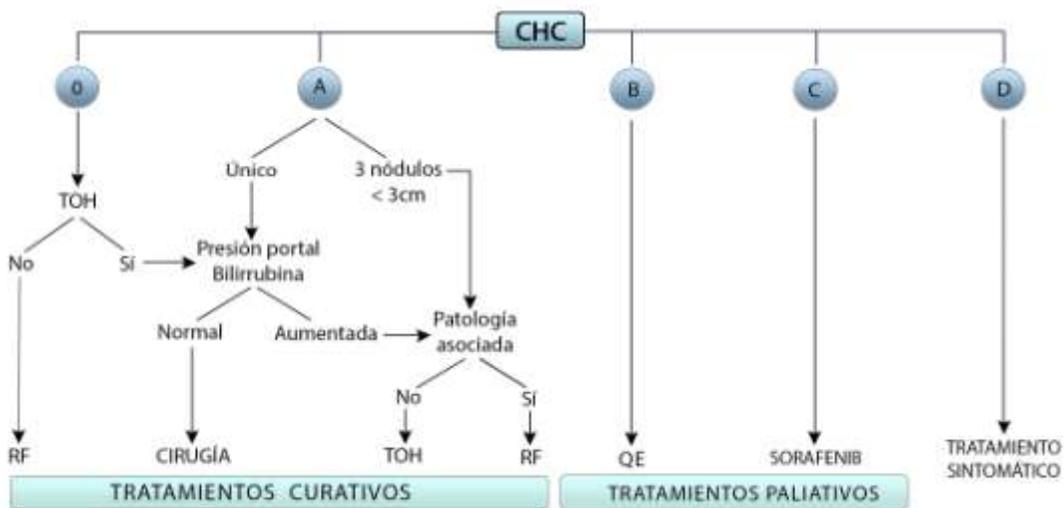


Figura 4. Sistema de cribado y algoritmo terapéutico propuesto por Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC). Adaptado de Forner et al. 2012.
 CHC, Carcinoma hepatocelular; QE, Quimioembolización; RF, Radiofrecuencia; TOH, Trasplante hepático.

El estadio 0 incluye a pacientes con CHC muy inicial (correspondería al concepto de carcinoma “in situ”), cirrosis hepática compensada (Child-Pugh A), asintomáticos y que presentan tumores únicos menores de 2 cm, sin invasión vascular ni diseminación extrahepática. En estos casos, la cirugía o la ablación por radiofrecuencia (RF) ofrecen una alta probabilidad de curación, con una supervivencia a los 5 años superior al 90%(D'Amico et al. 2006).

El estadio inicial (estadio A) incluye a sujetos asintomáticos con función hepática conservada (Child-Pugh A y B) con un CHC solitario o con un máximo de 3 nódulos de hasta 3 cm de diámetro. Estos sujetos pueden tratarse con intención curativa mediante resección quirúrgica, ablación percutánea y trasplante hepático, con una supervivencia estimada a los 5 años en el 50 al 75 % de los casos. Si no se tratan, la mediana de supervivencia no alcanza los tres años.

El estadio intermedio (estadio B) incluye sujetos con tumores multinodulares que exceden los criterios anteriormente descritos, sin invasión vascular ni extrahepática, con función hepática y estado general conservado. La quimioembolización transarterial es la primera opción de tratamiento y su supervivencia fluctúa entre 15 y 27 meses (Sangro 2014).

Los sujetos con función hepática conservada, pero que presentan un CHC con invasión vascular, invasión extrahepática o con afectación leve del estado general se catalogan como sujetos en fase avanzada (estadio C). En este grupo de sujetos, el único tratamiento que hasta la fecha ha mostrado beneficios en términos de supervivencia es el tratamiento con sorafenib. La supervivencia estimada es de 8 meses, incrementándose en un 30% con tratamiento (Llovet et al. 2008).

Por último, los sujetos que presentan afectación grave del estado general o función hepática muy afectada (Child-Pugh C) y que no son candidatos a trasplante hepático corresponden al estadio D. En ellos, la mediana de supervivencia es menor a 3 meses y el tratamiento debe estar orientado hacia el bienestar del paciente.

El único parámetro que se ha consolidado como marcador de enfermedad avanzada y predictor de peor pronóstico es la AFP. Los pacientes con valores elevados de AFP presentan mayor probabilidad de progresión en lista de espera para trasplante hepático y también mayor probabilidad de recidiva postrasplante (Toso et al. 2010).

1.7. TRATAMIENTO

Las guías terapéuticas recomiendan el tratamiento a aplicar según la extensión tumoral, la función hepática y el estado general del paciente. Según el sistema BCLC, los pacientes diagnosticados de CHC en fase inicial y con función hepática conservada se consideran para resección quirúrgica o trasplante hepático. Estas opciones pueden ofrecer supervivencia libre de enfermedad a largo plazo y, por tanto, se consideran potencialmente curativas. En pacientes asintomáticos con enfermedad multifocal sin invasión vascular o diseminación extrahepática se debe considerar la quimioembolización transarterial como primera opción, y para aquellos con tumor más avanzado y/o sintomático debe considerarse el tratamiento con sorafenib (de Lope et al. 2012).

1.7.1. RESECCIÓN QUIRÚRGICA

La resección quirúrgica es la primera opción en aquellos tumores únicos que aparecen sobre hígados sanos, en los que se pueden realizar resecciones amplias con un bajo riesgo de complicaciones. La recurrencia se produce hasta en el 80% de los pacientes, a los cinco años (Imamura et al. 2003).

En aquellos sujetos con cirrosis hepática compensada es fundamental la adecuada selección de los candidatos a resección quirúrgica, evaluando el grado de reserva funcional. Los mejores candidatos son aquellos sujetos con tumores únicos, con valores normales de bilirrubina y ausencia de hipertensión portal clínicamente relevante (recuento de plaquetas superior a 100000/mm³, gradiente de presión venosa hepática inferior a 10 mm Hg, y ausencia de varices esofagogástricas o de esplenomegalia)(Llovet et al. 2005). Respecto al tamaño de la lesión, no hay un punto de corte que contraindique la resección, aunque no se recomiendan las resecciones extensas. Así mismo, se prefiere la resección anatómica a la no anatómica, ya que puede reducir la tasa de recidivas y mejorar la supervivencia (Arii et al. 2010).

1.7.2. TRASPLANTE HEPÁTICO

El trasplante ortotópico de hígado tiene como ventaja, sobre la resección quirúrgica, que puede eliminar los focos tumorales intrahepáticos así como el hígado cirrótico con capacidad oncogénica.

Aplicando los criterios de Milán (tumor único ≤ 5 cm o múltiple, con un máximo de 3 nódulos ≤ 3 cm, sin invasión vascular ni diseminación extrahepática) se obtienen los mejores resultados. Cumpliendo estos criterios, la supervivencia a los 5 años supera el 70%, con una tasa de recidiva del 5-15%. Por tanto, el trasplante hepático es el tratamiento de elección en aquellos sujetos

con CHC sin afectación extrahepática que no son candidatos óptimos para resección quirúrgica y que cumplan los criterios de Milán (de Lope et al. 2012).

1.7.3. TÉCNICAS DE ABLACIÓN TUMORAL PERCUTÁNEA

La ablación tumoral se basa en la inducción de necrosis mediante la inyección de productos químicos (frecuentemente alcohol o ácido acético) o mediante la modificación de la temperatura intratumoral (radiofrecuencia, microondas, crioablación o láser).

Aunque la inyección percutánea de etanol (IPE) es la técnica con mayor disponibilidad y se ha usado en los últimos 20-30 años, en la actualidad se considera la radiofrecuencia (RF) como la técnica ablativa de primera elección, debido a la mayor capacidad para inducir necrosis (Brunello et al. 2008) y la superioridad en términos de supervivencia respecto a la IPE (Orlando et al. 2009).

Ambas técnicas (IPE y RF) son capaces de obtener, en la mayoría de los pacientes, necrosis completa de tumores menores de 2 cm, aunque la eficacia de estas técnicas disminuye con el tamaño de la lesión. En estas lesiones menores de 2 cm, ambas técnicas son iguales de eficaces y ofrecen los mismos resultados en términos de supervivencia (Germani et al. 2010). Ambas técnicas poseen buena tolerancia, con una tasa de complicaciones menores del 3% (Shiina et al. 2012).

Teniendo en cuenta que el CHC en estadio inicial tiene una probabilidad de diseminación muy baja, los pacientes con cirrosis hepática compensada en ausencia de hipertensión portal presenta una expectativa de supervivencia de más del 90% a los 5 años, y dado que la ablación percutánea es capaz de producir necrosis completa en la gran mayoría de los tumores menores de 2 cm

con mínimas complicaciones, la ablación percutánea podría competir con la resección quirúrgica en este grupo de pacientes BCLC 0. En los últimos años se han recogido excelentes tasas de supervivencia en pacientes con CHC muy inicial tratados con RF, alcanzando supervivencias a los 5 años mayores al 70%, lo que compite claramente con los resultados obtenidos con la resección quirúrgica (Livraghi et al. 2008).

1.7.4. TÉCNICAS INTRAARTERIALES: QUIMIOEMBOLIZACIÓN TRANSARTERIAL (QETA) Y RADIOEMBOLIZACIÓN (RE)

La doble irrigación del hígado (portal y arterial) y la irrigación predominantemente arterial del hepatocarcinoma permiten que al provocar la obstrucción del flujo arterial se produzca una isquemia aguda, extensa y selectiva del tumor.

La Quimiembolización transarterial (QETA) consiste en la cateterización selectiva de la arteria hepática y la inyección de un agente quimioterápico (Doxorrubicina) mezclado con lipiodol (un agente de contraste oleoso y yodado que es selectivamente retenido por las lesiones del CHC), seguido de la embolización de las arterias que nutren la lesión tumoral. Se realiza en varias sesiones cada 4-8 semanas.

La Radioembolización (RE) es una forma de braquiterapia que consiste en la inyección intraarterial de microesferas cargadas con Itrio 90 como fuente de irradiación, un emisor puro con una penetración media en tejidos de 2 mm. Generalmente se realiza en una única sesión.

Las guías adoptadas por las principales sociedades científicas apoyan el uso de QETA para el tratamiento paliativo de los pacientes con CHC irresecable en estadio intermedio o B de la clasificación BCLC (Bruix et al. 2011). Este

estadio comprende a los pacientes con tumores habitualmente multinodulares que no son susceptibles de ablación percutánea, siempre que se encuentren asintomáticos, no exista invasión vascular tumoral ni metástasis a distancia y la función hepática permanezca conservada. Se contraindica formalmente en ausencia de un flujo portal adecuado o con invasión vascular. La supervivencia varía del 8 al 26% a los 5 años y la mediana de es de 16-40 meses en estadio precoz y de 15-27 meses en estadio intermedio (Sangro 2014).

1.7.5. TRATAMIENTO SISTÉMICO. SORAFENIB

El Sorafenib es un inhibidor multiquinasa efectos antiangiogénicos y antiproliferativos que ha demostrado mejorar la supervivencia en pacientes con CHC avanzado (con supervivencia media sin tratamiento es de seis a ocho meses) en comparación con placebo con buen perfil de seguridad en dos ensayos controlados aleatorizados. En el primer ensayo, la mediana de supervivencia para el grupo placebo fue de 7,9 meses, mientras que fue de 10,7 meses para el grupo de pacientes tratados con Sorafenib (Llovet et al. 2008).

Es una molécula de bajo peso molecular y gran biodisponibilidad que se administra por vía oral y que actúa bloqueando diferentes vías de señalización asociadas a la hepatocarcinogénesis, en especial la vía Raf/MEK/ERK a través de la inhibición de Raf kinasa y diferentes tirosinkinasa.

El Sorafenib ha demostrado que los tratamientos moleculares pueden ser útiles en el tratamiento del CHC y abre el camino para evaluar el bloqueo de múltiples vías de señalización de la misma forma que ya se está haciendo desde hace años en otras neoplasias.

2. POLI (ADP-RIBOSA) POLIMERASA 1

Poli(ADP-Ribosa) Polimerasa-1 (PARP-1; EC2.4.2.30) [también conocida como poli(ADP-ribosa) sintetasa y poli(ADP-ribosa) transferasa] es una enzima nuclear altamente expresada, presente en células eucariotas que fue por primera vez descrita hace más de 40 años por (Chambon et al. 1963). Esta proteína cataliza la transferencia de monómeros de ADP-ribosa obtenidos del sustrato NAD⁺, sobre una serie de proteínas nucleares implicadas en procesos de reparación de daños en el ADN y transcripción genética. PARP-1 es una proteína de reconocimiento del daño en el ADN que participa activamente en los procesos de reparación de daños de cadena simple y doble. PARP-1 se activa principalmente en respuesta a daños inducidos por diferentes agentes genotóxicos. La modificación transitoria de proteínas nucleares por poli-ADP-ribosilación, constituye un tipo de modificación post-traduccional necesaria para la activación así como desactivación de una serie de procesos celulares.

2.1. FAMILIA PARP

Hasta la fecha, han sido identificadas 18 enzimas que presentan homología de secuencia con el dominio catalítico de PARP-1, si bien, sólo se conocen las propiedades enzimáticas y bioquímicas de algunos de los miembros de la familia (**Figura 5**). La proteína PARP-1 es el fundador y principal miembro de esta familia y se le han atribuido múltiples funciones que serán descritas a continuación. Tradicionalmente, los inhibidores de PARP-1 han presentado una reducida selectividad, ya que eran capaces de reducir, en mayor o menor grado, la actividad de otros miembros de la familia. Esto se debía a que presentaban una alta homología en su dominio catalítico, blanco de la acción de los inhibidores químicos de la actividad de PARP. No obstante, los inhibidores actuales (de tercera generación), presentan una gran selectividad frente a la proteína PARP-

1, debida a que su diana farmacológica es el dominio N terminal exclusivo de dicha proteína.

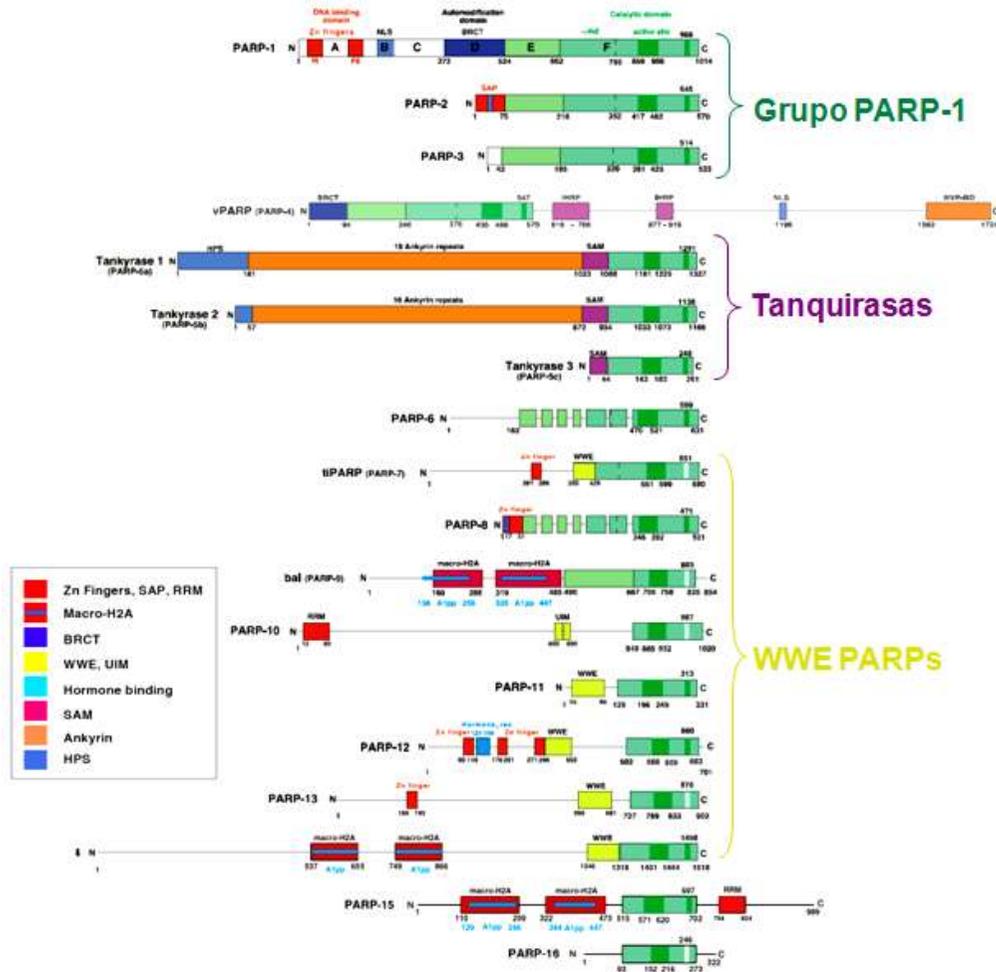


Figura 5. Estructura en dominios de los miembros de la superfamilia PARP. La caracterización de la familia de proteínas PARP se ha realizado en base a una búsqueda exhaustiva en la base de datos del NCBI usando el dominio catalítico de la PARP-1 como motor de búsqueda. Se representan con recuadros coloreados los dominios más característicos localizados en los diferentes miembros de la familia. La gran diversidad de dominios presentes en las proteínas de la familia PARP sugiere la implicación de estas proteínas en una gran variedad de procesos celulares. Figura adaptada de (Ame et al. 2004).

2.2. ESTRUCTURA DE PARP-1

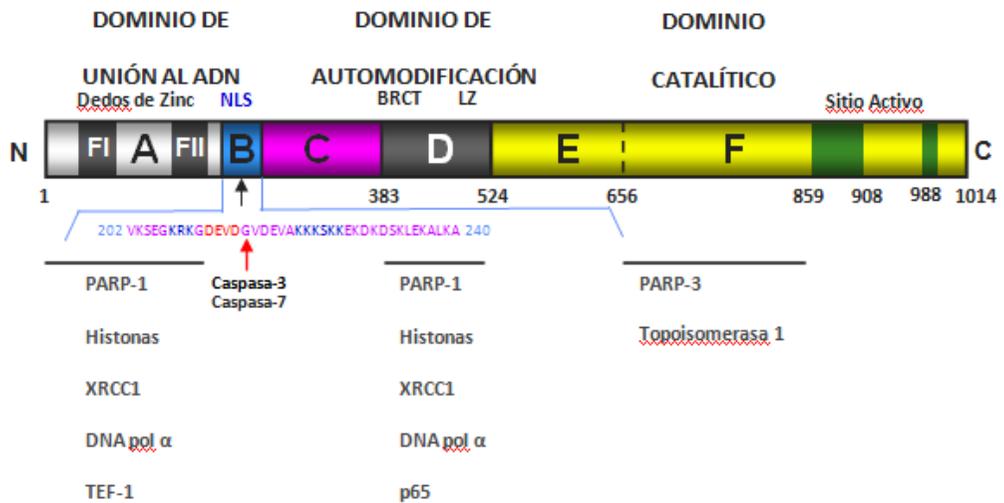


Figura 6. Dominios estructurales de PARP-1. Dominio de unión al ADN (DBD); FI y FII, estructura en dedos de zinc; secuencia de localización nuclear (NLS); dominio de automodificación y dominio catalítico. Motivo BRCT (BRCA1 like C-terminus); lugar de corte de las caspasas-3 y -7; motivo cremallera de leucina (LZ, Leucine zipper). Además se indican los posibles sitios de interacción con otras proteínas.

PARP-1 es una proteína de 113-kDa, altamente conservada en la escala filogenética (aunque no existen evidencias de su presencia en levaduras), que está formada por seis dominios estructurales (**Figura 6**), de los cuales sólo tres están perfectamente descritos funcionalmente. Presenta un dominio de unión al ADN (DBD, *DNA Binding Domain*) de 46-kDa localizado en el extremo N-terminal. Este dominio presenta dos estructuras en dedos de zinc (denominadas FI y FII), mediante las cuales se produce la interacción de PARP-1 con el ADN estimulando la actividad catalítica del enzima (Lindahl et al. 1995). Otro dominio descrito es el dominio de automodificación de 22-kDa. PARP-1 es el principal aceptor de polímero de ADP-ribosa (Kawaichi et al. 1981). Este cambio post-transduccional incide negativamente en la actividad del enzima por repulsión

electrostática entre la proteína modificada y el ADN dañado (D'Amours et al. 1999). Finalmente, presenta un dominio catalítico, de 46-kDa. Se localiza en el extremo C-terminal y es el responsable de la actividad de la enzima transformando residuos de NAD⁺ en largos y ramificados polímeros de poli ADP-ribosa sobre proteínas nucleares aceptoras.

2.3. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PARP-1

PARP-1 es una proteína de detección de daños en el ADN, que posee la capacidad de unirse tanto a roturas de cadena simple como de cadena doble, producidas por agentes genotóxicos como la radiación ionizante, los radicales libres, los inhibidores de la topoisomerasa I y II y los agentes alquilantes [Figura 7]. Asimismo, actúa como una proteína de señalización a los complejos de reparación del daño producido en el ADN. Tras la detección del daño y su unión al mismo a través de las estructuras en dedos de zinc presentes en el dominio de unión al ADN, PARP-1 se activa y forma homodímeros principalmente a través de la estructura FII (segundo dedo de zinc) y cataliza la hidrólisis de β -nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺), en nicotinamida y monómeros de ADP-ribosa que posteriormente utilizará como sustrato para formar largos y ramificados polímeros de poli (ADP-ribosa) sobre residuos γ -carboxilo de ácido glutámico y ácido aspártico de determinadas proteínas nucleares mediante enlace tipo éster [Figura 8].

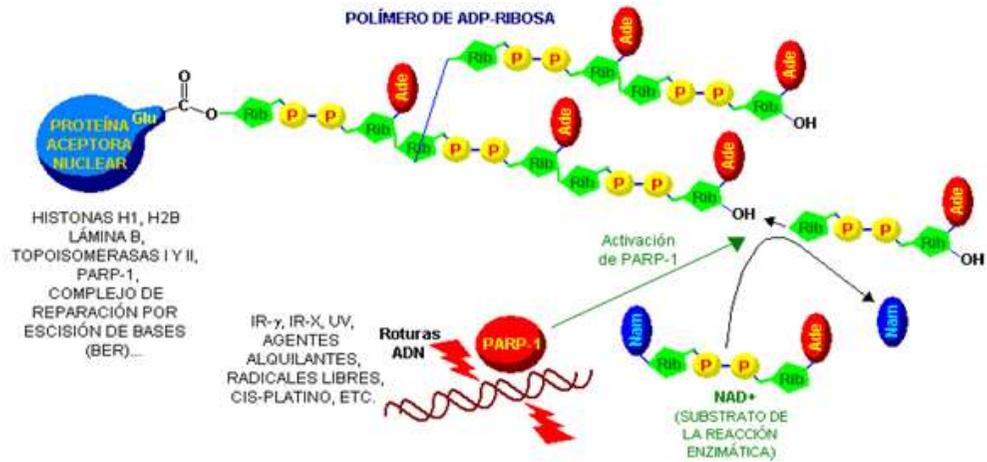


Figura 7. Mecanismo de activación de PARP-1 tras daño en el ADN. *Determinados agentes genotóxicos activan PARP-1. Se muestra el procedimiento de activación, síntesis de polímero a partir de NAD⁺ y la consiguiente modificación de determinadas proteínas nucleares.*

La poli ADP-ribosilación de proteínas es un proceso dinámico con una vida media del polímero inferior a un minuto (Whitacre et al. 1995). Finalmente, la poli(ADP-ribose) glicohidrolasa (PARG), dotada de actividad exoglicosidasa y endoglicosidasa actúa degradando el polímero y dejando de nuevo a la proteína PARP-1 preparada para nuevos ciclos de reconocimiento y señalización del daño en el ADN (Davidovic et al. 2001).

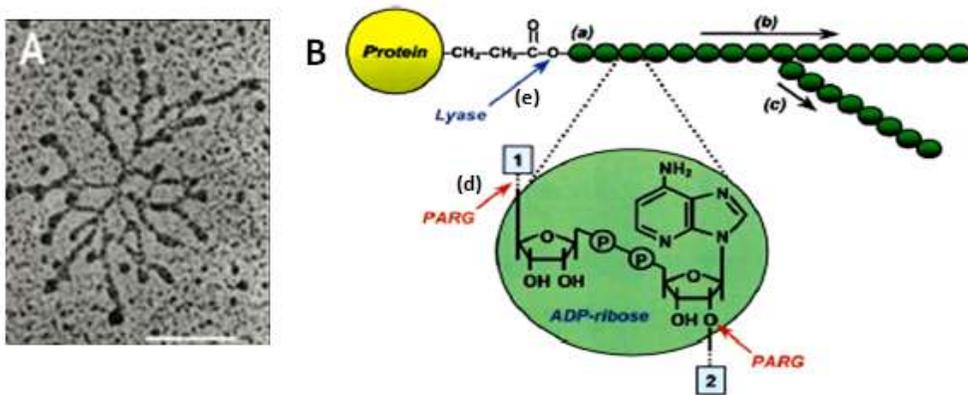


Figura 8. A) Imagen de la poli (ADP-ribosa). Estructura ramificada del polímero de poli (ADP-ribosa) observada por microscopía electrónica (20.000x). **(B) Actividades enzimáticas implicadas en el metabolismo de la poli (ADP-ribosa).** (a) Iniciación, (b) elongación y (c) ramificación, catalizadas por PARP-1; (d) actividad enzimática de PARPG; (e) actividad enzimática de la ADP-ribosa liasa. Figura adaptada de (Kraus and Lis 2003).

2.4. FUNCIONES DE PARP-1

Se han descrito múltiples funciones para dicha proteína, entre las que cabe destacar las siguientes:

1.- PARP-1 participa activamente en los procesos de reparación de determinados daños en el ADN y en el mantenimiento de la integridad genómica (de Murcia et al. 1994). Numerosos trabajos demuestran la participación de PARP-1 en los procesos de reparación de daños de cadena simple a través de complejo de reparación por escisión de bases (BER, *Base Escisión Repair*) o mediante el sistema de reparación de daños de cadena simple (SSBR, *Single Strand Break Repair*)(Shall and de Murcia 2000). En estos sistemas PARP-1 participa en el reclutamiento y regulación funcional de las proteínas XRCC1, DNA-polimerasa β y DNA ligasa III que forman parte de estos complejos de

reparación por modificación por poli (ADP-ribosilación) y por interacción directa proteína-proteína, formando de esta manera parte del complejo de reparación por escisión de bases (**Figura 9**)(Leppard et al. 2003). Además, PARP-1 también modula la reparación de daños de cadena doble a través de sistema de reparación no homologa, regulando el funcionamiento de la proteína de reparación DNA-PK mediante modificación post-transcripcional por poli (ADP-ribosilación) de esta proteína (**Figura 10**)(Chalmers et al. 2004).

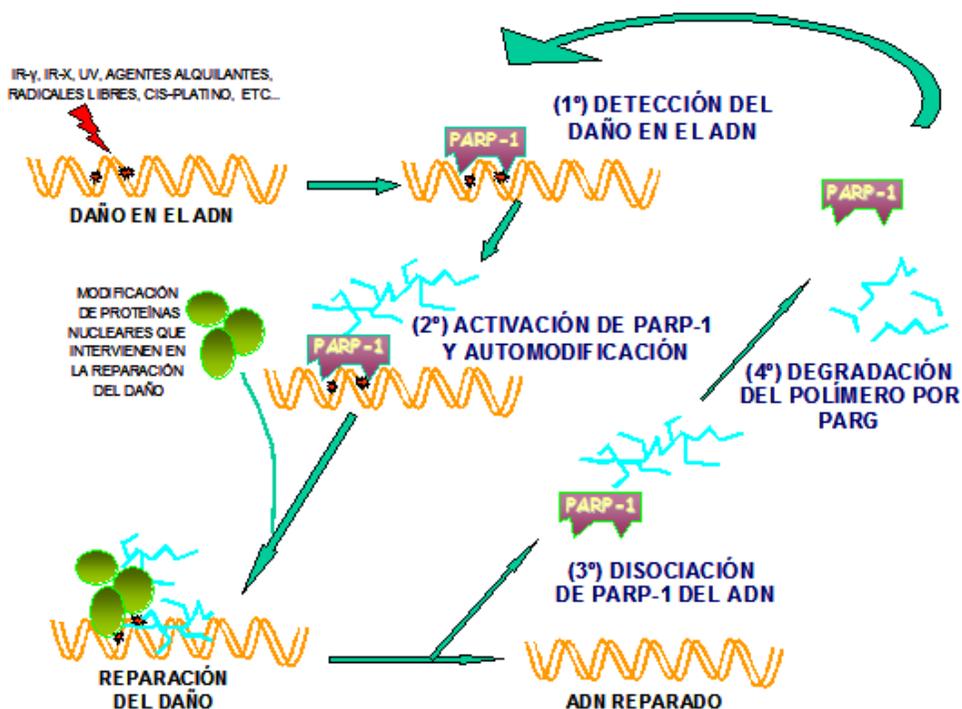


Figura 9. Modelo de actuación y regulación de PARP-1. (1) PARP-1 detecta el daño y se une al mismo; (2) esta unión activa al enzima y se produce tanto su automodificación como la de otras proteínas aceptoras; (3) inactivación del enzima, separación del ADN y entrada del complejo de reparación; (4) rápida degradación del polímero por la PARG y el ciclo se ha completado, dejando libre a la PARP-1, lista para un nuevo ciclo de activación-regulación.

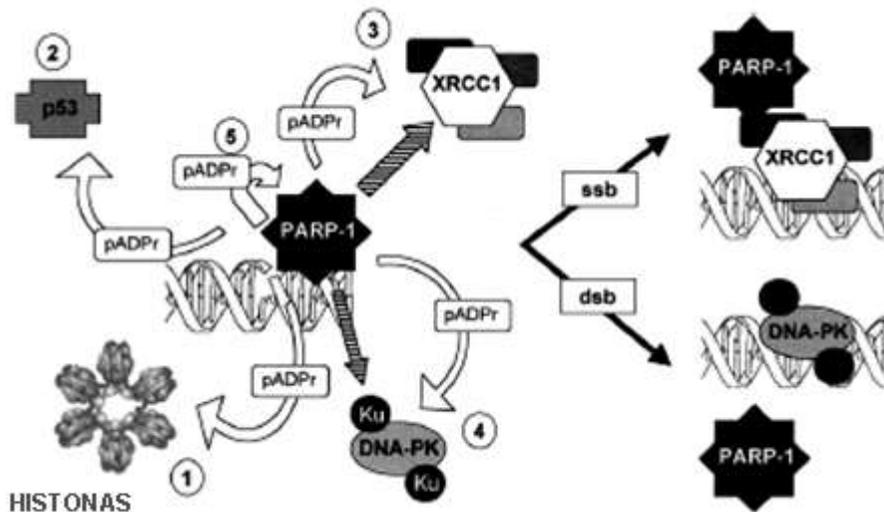


Figura 10. PARP-1 y reparación. (1) PARP-1 modifica a las histonas y produce relajación de la cromatina en las zonas dañadas. (2) p53 es modificada por poli (ADP-ribosilación) en respuesta a daños en el ADN. (3) PARP-1 participa en BER (Reparación por escisión de bases), tanto por modificación de sus componentes como por interacción directa con los mismos. (4) Modificación de DNA-PK por el polímero como consecuencia de roturas dobles de cadena. (5) Automodificación de PARP-1 que implica pérdida de afinidad por el ADN. Figura adaptada de (Chalmers et al. 2004).

Otro mecanismo a resaltar es la capacidad de PARP-1 de modificar de forma transitoria mediante ADP-ribosilación, proteínas involucradas en la estructura de la cromatina, especialmente histonas y las proteínas HMG (*High Mobility Group*), produciendo alteraciones en la estructura de la cromatina en los lugares del ADN dañados facilitando la reparación (D'Amours et al. 1999).

2.- Se ha demostrado que PARP-1 regula la transcripción génica. PARP-1 tiene un efecto dual en la regulación de la transcripción, comportándose como un estimulador o como un represor de la misma (Simbulan-Rosenthal et al. 2000). De especial importancia es la regulación por PARP-1 de varios factores de

transcripción implicados en inflamación, angiogénesis así como con carcinogénesis entre los que cabe destacar a NF-kB, AP-1 y HIF-1/2 (Hassa and Hottiger 1999).

2.5. SOBRE-EXPRESIÓN DE PARP-1 EN EL HEPATOCARCINOMA Y EN OTROS TUMORES

Un aspecto a destacar de PARP-1 es la sobreexpresión en las células tumorales de CHC en comparación con las células del tejido hepático sano. Los datos presentados por Shimizu indican que la expresión de PARP-1 en CHC era significativamente mayor que en hígado sano, y que esta expresión era mayor en CHC moderadamente diferenciado que en CHC bien diferenciado (Shimizu et al. 2004). Nuestro grupo de investigación ha puesto de manifiesto la sobreexpresión de PARP-1 tanto en líneas celulares derivadas de CHC, así como en biopsias de tejido hepático tumoral en comparación con tejido hepático sano (Quiles-Perez et al. 2010, Munoz-Gamez et al. 2011). Además, su inhibición en modelos *in vitro* (cultivos celulares) e *in vivo* (modelo animal murino), disminuye el crecimiento de células tumorales de CHC potenciando el efecto genotóxico del agente quimioterápico doxorrubicina, así como modulando la expresión de genes relacionados con angiogénesis, supervivencia y proliferación celular. También se ha observado una sobreexpresión de PARP-1 en otros tumores tales como mama, endometrio, pulmón, ovario y piel.

2.6. RESISTENCIA A FÁRMACOS E INHIBIDORES DE PARP-1

La resistencia a fármacos antitumorales se define como un estado de susceptibilidad disminuida al efecto de una concentración determinada de un fármaco, que en condiciones normales causa inhibición del crecimiento o muerte celular. Esta resistencia es el principal obstáculo hacia la curación de varias patologías humanas, entre ellas el cáncer.

Existen diferentes tipos de mecanismos de resistencia a fármacos: i) las bombas de flujo, ii) la modificación metabólica y detoxificación, iii) la activación de los mecanismos de reparación del ADN iv) y la inactivación de los mecanismos de muerte celular. Los inhibidores de PARP-1 actúan sobre estos dos últimos mecanismos.

2.7. PARP-1 EN COMBINACIÓN CON AGENTES ANTITUMORALES

El uso de inhibidores de PARP ha proporcionado evidencias convincentes de que la inhibición de PARP-1 produce un incremento de la sensibilidad celular frente a agentes alquilantes (Metil nitroso urea, Temozolomida), inhibidores de la topoisomerasa I y radiación ionizante, además se ha demostrado igualmente, que no produce ningún efecto en combinación con fármacos antitumorales que no basan su acción en la inducción de daños en el ADN, demostrando de esta forma su alta especificidad. No está claro el papel de los inhibidores de PARP-1 utilizados en combinación con otras moléculas de importancia en oncología clínica, por ejemplo, ciertos inhibidores de la topoisomerasa II.

En este trabajo se ha empleado Temozolamida (TMZ) como agente citotóxico. La TMZ es un agente alquilante-metilante con actividad antitumoral, empleado en el tratamiento de tumores cerebrales y metástasis cerebrales de melanoma (Daniel et al. 2010). Debido a su componente lipófilo, tiene una alta biodisponibilidad y atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica (Newlands et al. 1997). Actúa introduciendo grupos metilos en el ADN, formando principalmente N7-metilguanina (70%), N3-metiladenina (12%) y O6-metilguanina (10%), los cuales si no se reparan son citotóxicos y/o mutagénicos. La proteína Metil guanina metil transferasa (MGMT) repara la O6-metilguanina, y las otras dos bases metiladas son reparadas por BER. Si no se repara, O6-metilguanina se aparea de forma errónea con una timina, activando el proceso de reparación por malapareamiento (MMR, *Mismatch repair*) y desencadando la

detención del ciclo celular y apoptosis. Dado que PARP-1 y PARP-2 tienen un papel fundamental en la reparación del daño en el ADN inducido por agentes metilantes, especialmente de N7-metilguanina y N3-metiladenina, los inhibidores de PARP pueden tener un potencial para incrementar la actividad antitumoral de estos fármacos quimioterápicos (Krishnakumar and Kraus 2010).

Los inhibidores de PARP sensibilizan a las células tumorales a la acción de la TMZ, demostrado en investigaciones *in vitro* (Tentori et al. 2003, Calabrese et al. 2004). Las células tratadas con TMZ e inhibidores de PARP demostraron más roturas de cadena de ADN, inhibición del crecimiento y apoptosis. Estos efectos se han observado en células tumorales de glioma, melanoma, leucemia, cáncer de colon, ovario y pulmón. Se ha observado una citotoxicidad incrementada en células con mutación p53, lo cual es de gran importancia ya que los tumores con mutación p53 son a menudo resistentes a agentes quimioterápicos, incluyendo la TMZ (Tentori et al. 2003). El efecto del poder citotóxico de la TMZ es en gran parte dependiente de la capacidad de reparación MMR, las células con MMR defectuoso muestran una resistencia incrementada a TMZ. La inhibición de la actividad PARP restablece la sensibilidad a la TMZ en células deficientes en MMR (Griffin et al. 1995).

2.8. INHIBIDORES EN ENSAYOS CLÍNICOS

Los inhibidores de PARP-1 se están utilizando en ensayos clínicos, así se conocen más de cien relacionados con patologías tumorales así como relacionados con enfermedades de origen inflamatorio (<http://www.clinicaltrials.gov>). En concreto, el inhibidor más empleado es el ABT888, también conocido como Veliparib® (Abbott, 68 ensayos), el cual se ha seleccionado para su uso en esta tesis. ABT888 es un inhibidor PARP 1 y 2 con buena biodisponibilidad oral y penetración en el sistema nervioso central. Además, cinco de estos ensayos clínicos están usando ABT888 en

Hepatocarcinoma y dos de ellos lo usan en combinación con Temozolomida (TMZ, ensayos en reclutamiento, fase I y II).

Empleando en combinación, ABT888 y TMZ se han obtenido resultados estadísticamente significativos en ensayos clínicos en otras patologías tumorales como cáncer colorrectal (Pishvaian et al. 2011), cáncer de mama (Isakoff et al. 2010) y melanoma (Middleton et al. 2011), observándose una mejora tanto del tiempo de progresión tumoral así como de la supervivencia media. También se han descrito resultados de ABT888 con otros agentes antitumorales, como son la doxorrubicina, cisplatino y gemcitabina.

3. NANOPARTÍCULAS

La nanotecnología se define como la actividad científico-tecnológica involucrada en el diseño, síntesis, caracterización y aplicación de materiales y dispositivos con al menos una de las dimensiones en la nanoescala (generalmente 1-100 nanómetros).

El campo de acción de herramientas nanotecnológicas aplicadas a biomedicina se ha dividido de forma general en tres grupos principales: el diagnóstico, la liberación controlada de fármacos y la medicina regenerativa. El nanodiagnóstico consiste en el desarrollo de sistemas analíticos y de imagen para detectar una enfermedad en las etapas más tempranas posibles tanto *in vivo* como *in vitro*. La nanoterapia pretende dirigir sistemas de liberación de fármacos de forma activa que contengan elementos de reconocimiento para actuar o transportar y liberar medicamentos exclusivamente en las células o zonas afectadas, a fin de conseguir un tratamiento más efectivo, minimizando los efectos secundarios. La medicina regenerativa tiene como objetivo reparar o reemplazar tejidos y órganos dañados aplicando herramientas nanotecnológicas (Lechuga 2011).

La Nanoterapia ha surgido como una innovadora alternativa a la quimioterapia convencional, con el objetivo de vehicular el fármaco de forma selectiva hacia el tumor y evitar los fenómenos de resistencia a fármacos antitumorales, en concreto los fenómenos mediados por las bombas de flujo. Existen dos tipos de bombas: i) unas tienen como función bloquear la entrada del fármaco a la célula, ii) otras bombas, pertenecientes a la superfamilia ABC (*ATP-binding cassette*), se encargan de expulsar el fármaco quimioterápico cuando ha sido internalizado a nivel celular impidiéndole que realice su función antitumoral. El empleo de NP magnéticas permite evadir estos mecanismos de resistencia antitumoral, permitiendo incrementar la concentración intracelular

del fármaco, mejorando así su efecto citotóxico. Esta estrategia ha demostrado recientemente su eficacia terapéutica, reduciendo los efectos adversos, en comparación con los tratamientos sistémicos clásicos.

Los diferentes tipos de nanopartículas (NP) empleadas como sistemas de liberación de fármacos son: NP liposómicas, NP poliméricas y co-poliméricas, nanotubos de carbono, NP quantum dots, NP mesoporosas de sílice y NP magnéticas.

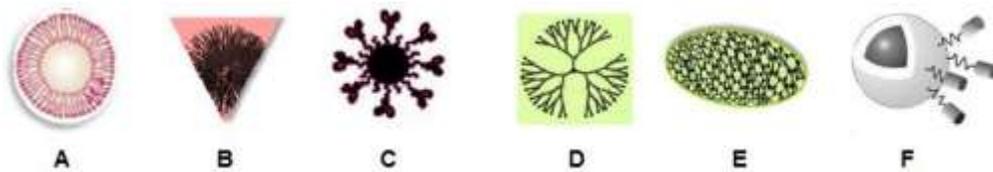


Figura 11. Tipos de Nanopartículas. A) Liposómicas, B) Poliméricas, C) Quantum-dots, D) Dendrimeros, E) Nanotubos de carbono, F) Magnéticas.
Adaptado de Jabir et al. 2012.

Las principales ventajas de la utilización de nanomateriales en aplicaciones biomédicas son: i) Su escala de tamaño similar a biomoléculas, tales como receptores, anticuerpos y ácidos nucleicos. Los nanomateriales también funcionalizados con biomoléculas pueden ser dirigidos específicamente hacia un órgano o tejido diana. ii) Estas nanoestructuras a menudo pueden superar los problemas de solubilidad y estabilidad que presentan formulaciones tradicionales basadas en biomoléculas a través de procesos de modificación superficial. iii) Algunas nanoestructuras presentan nuevas propiedades físicas, tales como las propiedades ópticas en el caso de los quantum-dots, que se pueden utilizar como herramientas de imagen (Liu et al. 2013). iv) Debido al tamaño nanométrico, presentan una elevada relación área superficial/volumen y

por tanto una gran capacidad de carga terapéutica útil en su superficie (isótopos radiactivos o fármacos de quimioterapia) que se puede dirigir o encapsular en dicha nanoestructura. Una vez en el sitio diana y reconocido por un receptor, la alta dosis de carga terapéutica puede causar un efecto mayor en el lugar de destino. v) Estos nanosistemas, a través de procesos de direccionalización pasiva o activa, pueden realizar el proceso de liberación del fármaco de una forma mucho más controlada y reducir procesos de toxicidad y efectos adversos si se compara con formulaciones tradicionales (Wang et al. 2013).

3.1. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

En la última década del siglo XX, comienza la aplicación en seres humanos de productos basados en Nanopartículas magnéticas (NPM) de óxido de hierro. El hierro como material presenta ventajas significativas para su uso en biomedicina: puede ser metabolizado por el organismo, la superficie de las NPM de óxido de hierro puede ser modificada para unir biomoléculas de interés, las partículas poseen un elevado momento magnético y pueden ser manipuladas con un imán externo puesto que las líneas de campo pueden atravesar el cuerpo humano , (Huber 2005, Laurent et al. 2008), Pankhurst et al. 2003). Este tipo de nanopartículas multifuncionales permitiría combinar en una única formulación propiedades de diagnóstico y terapéuticas (Ferrari 2005, Shubayev et al. 2009). Aplicadas a la terapia del cáncer, estos sistemas presentan grandes ventajas respecto a las terapias tradicionales de quimio y radioterapia. Se podría realizar un diagnóstico temprano de la enfermedad, el seguimiento y visualización en tiempo real del tratamiento y sus efectos mediante RM, así como reducir la toxicidad, efectos adversos y acortar el tiempo de tratamiento mediante la administración local del fármaco (Rahman et al. 2012).

La principal ventaja de las NPM es la posibilidad de manipulación bajo la influencia de un campo magnético externo. Dentro del campo de la biomedicina es necesario que las nanopartículas presenten un carácter superparamagnético donde no exista magnetización remanente una vez que se retira el campo magnético (Colombo et al. 2012). Las NPM sólo se “transforman” en magnéticas en presencia de un imán externo y, al retirarlo, regresan a su estado no magnético. Esto evita la presencia de un momento magnético neto en las nanopartículas en ausencia de campo magnético. Al ser administradas *in vivo*, las partículas pueden ser manipuladas aplicando un campo magnético externo, lo cual constituye una gran ventaja en el desarrollo de sistemas de liberación controlada de medicamentos.

Las aplicaciones biomédicas de NPM de óxido de hierro se encuentran divididas en dos grupos fundamentales: herramientas de diagnóstico (agentes de contraste para RM (Rosen et al. 2012)) o aplicaciones terapéuticas (Wust et al. 2002) y liberación controlada de fármacos (Arruebo et al. 2007). Sin embargo, existen determinados factores que condicionan el uso de nanopartículas magnéticas para aplicaciones *in vivo*: el tamaño de partícula, tipo de recubrimiento superficial y las propiedades magnéticas.

DIAGNÓSTICO	TRATAMIENTO
Resonancia Magnética (RM)	Liberación controlada de fármacos
Detección	Hipertermia/Termoablación
Clasificación celular	Radioterapia combinada con RM
Bioseparación	
Inmovilización enzimática	

Tabla 2. Aplicaciones biomédicas de Nanopartículas magnéticas

El tamaño es un parámetro que influye de manera directa en el comportamiento *in vivo* de las nanopartículas ya que condiciona su farmacocinética y biodistribución en los tejidos (**Figura 12**).

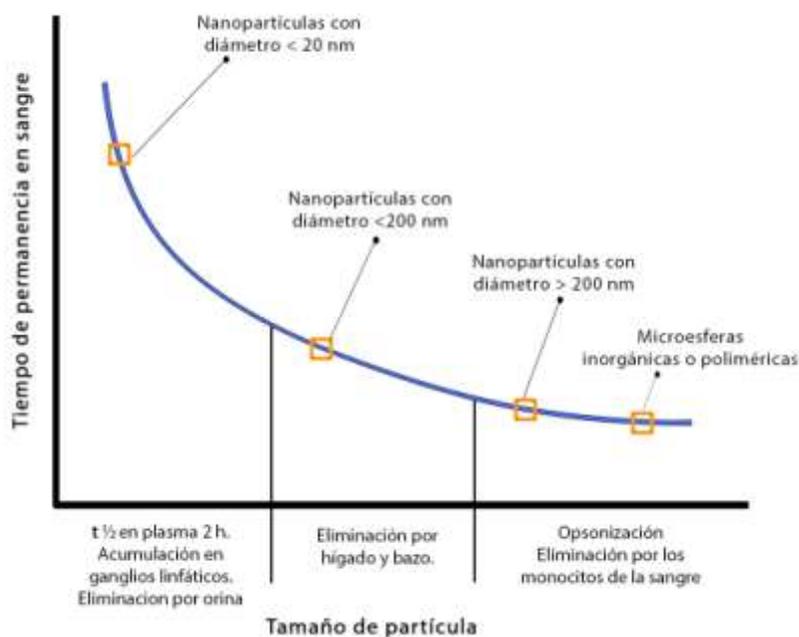


Figura 12. Esquema cualitativo del tiempo de permanencia en sangre de las nanopartículas en función del tamaño. Adaptado de Arruebo et al. 2007.
h, horas; nm, nanómetro; t, tiempo.

Las nanopartículas de tamaños cercanos a los 200 nm se acumulan rápidamente en el hígado donde son detectadas por macrófagos y eliminadas por el sistema retículo endotelial, mientras que partículas muy pequeñas son inmediatamente filtradas por el riñón (Berry, 2009). Si disminuye el tamaño de partícula se observa que aumenta su tiempo de vida media en sangre. Bajo condiciones fisiológicas normales partículas ~10 nm no podrían atravesar el endotelio, sin embargo, en el caso de enfermedades como procesos inflamatorios o infiltración tumoral, la permeabilidad de los tejidos aumenta y admite el paso

de partículas de hasta 700 nm (Neuberger et al. 2005). Para nanopartículas de 30-100 nm administradas intravenosamente, las de mayor tamaño son rápidamente filtradas por los sinusoides hepáticos y solo las más pequeñas presentan un mayor tiempo de vida media en sangre (Chouly et al. 1996). Por otra parte, partículas demasiado pequeñas (~4 nm) presentan un mejor perfil farmacocinético, pero se ven afectadas sus propiedades magnéticas debido a efectos de superficie (Roca et al. 2007).

Existe por tanto un intervalo de tamaño 10-30 nm óptimo cuando se busca una aplicación biomédica de las nanopartículas de óxido de hierro y éste es el rango de tamaño seleccionado en este trabajo. Otro parámetro que condiciona el comportamiento de las nanopartículas magnéticas *in vivo* es el recubrimiento superficial. La estabilización de las nanopartículas en una suspensión coloidal está dada por el impedimento estérico o la repulsión electrostática que aporta el recubrimiento para contrarrestar las fuerzas atractivas entre las nanopartículas debidas a fuerzas de Van der Waals e interacciones magnéticas (Laurent et al. 2008). De forma general, se ha observado que la carga superficial que le confiere el recubrimiento a las nanopartículas va a determinar su biodistribución *in vivo*, así como su patrón de internalización celular *in vitro* (Reddy et al. 2012). Hay numerosas moléculas que se han empleado para el recubrimiento y funcionalización de nanopartículas de óxido de hierro dirigidas a posibles aplicaciones biomédicas (Hao et al. 2010, Laurent and Mahmoudi 2011). Son muy frecuentes las estrategias basadas en la modificación superficial con pequeñas moléculas bifuncionales como pueden ser el DMSA (Roca et al. 2009), la dopamina (Xie et al. 2007), o moléculas con grupos silanos que en general se unen fuertemente a la superficie de óxido de hierro (DePalma et al. 2007). Otra forma de aumentar la estabilidad coloidal y mejorar la biocompatibilidad de las nanopartículas es mediante estrategias de recubrimiento polimérico (Xie et al. 2007, Laurent et al. 2008, Amstad et al. 2009), o encapsulación en liposomas (Dubertret et al. 2002).

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

JUSTIFICACIÓN

El hepatocarcinoma (CHC) es un tumor con un pobre pronóstico cuando se diagnostica en estadios avanzados, siendo escaso y complicado el arsenal terapéutico, con bajas tasas de respuesta y elevados efectos adversos.

Por otro lado, se ha estudiado la *inhibición enzimática de la actividad de PARP-1* en un amplio rango de enfermedades, incluyendo el infarto, daño por isquemia-reperfusión, diabetes, shock y otras formas de inflamación y ha demostrado mejorar distintas formas de daño hepático. Además, en este contexto, se ha observado un incremento de expresión de PARP-1 en el tejido tumoral hepático en relación al peritumoral y se están utilizando varios inhibidores de PARP-1 en ensayos clínicos en el campo de fármacos antitumorales en diversos tipos de tumores, incluido el hepatocarcinoma celular.

En este contexto, decidimos evaluar la nanotecnología como vehículos transportadores de fármacos, (inhibidor de PARP-1 conocido como ABT-888 y la Temozolomida como agente inductor de daños en el ADN), en el tratamiento del carcinoma hepatocelular. Pensamos que esta propuesta puede constituir una aproximación efectiva en el tratamiento del CHC.

HIPÓTESIS

Con estos antecedentes, nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo:

“La vehiculización del inhibidor de PARP-1, ABT888, en combinación con Temozolomida en nanopartículas magnéticas poliméricas dirigidas hacia el hepatocarcinoma podría constituir una interesante estrategia terapéutica”

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- 1.** Vehiculización del agente alquilante Temozolomida y el inhibidor de PARP-1 ABT-888, de forma simultánea, usando el diseño de nanopartículas magnéticas.
- 2.** Estudio de la caracterización de las nanopartículas.
- 3.** Estudio de la estabilidad de las nanopartículas conjugadas con fármacos y liberación de los mismos.
- 4.** Determinar la capacidad de los nanotransportadores para alcanzar el interior de las células tumorales.
- 5.** Análisis de la liberación de ambos fármacos en el interior de las células y del efecto citotóxico inducido por éstos en comparación con el efecto que producirían si no fuesen vehiculizados.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. LÍNEAS CELULARES Y FÁRMACOS

Para los ensayos *in vitro* adquirimos tres líneas celulares de cáncer de hígado humano bien caracterizadas: PLC-PRF-5 (Ref 8506113), HepG2 (Ref 85011430) y Hep3B (Ref 86062703), y una línea celular de hígado sano WRL-68 (Ref 89121403), de ECACC (colección europea de cultivos celulares). Las células fueron mantenidas como una capa monomolecular adherente en RPMI-1640 (GIBCO, Paislay, Reino Unido) suplementado con suero fetal bovino 10% (GIBCO, Paislay, Reino Unido), 100 U/ml de Penicilina y 100 µg/ml de Estreptomicina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) y se incubó a 37° C en 5% de CO₂. ABT-888, también denominado Veliparib (2-(2R)-2-Metilpyrrolidin-Diclorhidrato de 2-yl-1H-Benzimidazol-4-carboxamida Benzimidazol carboxamida, Alexis Biochemicals, Nueva York, NY, EEUU), fue utilizado para inhibir la actividad catalítica de PARP-1. Temozolomida [4-metil-5-oxi-2,3,4,6,8-pentazabicyclo (4.3.0) nona-2,7,9-trieno-9-carboxamida, TMZ, Sigma-Aldrich] fue empleado como agente genotóxico (agente causante de daño a ADN).

2. PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS Y SU CARACTERIZACIÓN

Los núcleos magnéticos de hierro y magnetita (Fe/Fe₃O₄) fueron sintetizados usando métodos de descomposición a temperaturas elevadas, y una capa final de sílice (SiO₂) fue incorporada al recubrimiento del nanocompuesto.

2.1. MATERIALES

El agua usada para la preparación de todas las suspensiones y soluciones fue desionizada en un sistema de purificación de agua *Milli-Q Academic* (Millipore, Francia) y filtrada a través de membranas de 200 nm; su conductividad de salida fue inferior a 0.06 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Los productos químicos (pentacarbonido de hierro, queroseno, oleilamina, 1-octadeceno, isopropanol, acetona, etanol, N-óxido trimetilamina, ostosilicato de tetraetilo, ciclohexano, 1-octanol, amonio y Temozolomida) fueron comprados a *Sigma-Aldrich* (Estados Unidos), de calidad analítica y no fueron purificados de forma adicional. El Tritón X-100 fue comprado a *Merck*, y el inhibidor de PARP (ABT-888) se adquirió de *Enzo Life Sciences*.

2.2. PREPARACIÓN DE LOS NÚCLEOS DE HIERRO MONODISPERSOS

Las nanopartículas de hierro se sintetizaron siguiendo el método de descomposición del hierro pentacarbónido a altas temperaturas, descrito por (Peng et al. 2006). Brevemente, bajo una atmósfera N_2 , se mezclaron 20 mL de 1-octadeceno y 0,3 mL (0,9 mmol) de oleilamina durante 30 minutos a 120°C. Se elevó la temperatura a 180°C, y 20 minutos después se añadió rápidamente 0,7 mL (5,52 mmol) de solución de pentacarbonilo de hierro a la mezcla, y se mantuvo la misma temperatura durante otros 20 minutos antes de enfriarlo a temperatura ambiente. El producto de la reacción se decantó con la ayuda de un imán y se lavó con hexano bajo protección de atmósfera de N_2 . Este proceso se repitió tres veces más por precipitación de la suspensión con etanol absoluto y resuspensión con hexano. Finalmente el producto se dispersó en 15 mL de hexano y se mantuvo bajo atmósfera N_2 .

2.3. OXIDACIÓN CONTROLADA DE LAS NANOPARTÍCULAS DE HIERRO (Fe) A NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA (Fe₃O₄)

Se añadió 6 mg de N-óxido de trimetalinamina a 15 mL de 1-octadeceno y se agitó mecánicamente bajo una atmósfera N₂ durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después la mezcla se calentó a 130°C durante 30 minutos. Finalmente se añadió 2 mL de la suspensión de la suspensión de partículas de hierro hexano sintetizada previamente a través de una jeringa a esa temperatura, rápidamente y sin exponerlo al aire, calentándolo al menos durante 2 horas. El proceso de síntesis concluyó elevando la temperatura de la suspensión a 250°C durante 30 minutos. Durante este proceso, se mantuvo la atmósfera N₂. Tras este tiempo, el producto final de síntesis se enfrió a temperatura ambiente, y se centrifugó durante 10 minutos a 8.000 rpm tras añadir 25 mL de isopropanol. El precipitado se dispersó en hexano y se lavó repitiendo tres ciclos, añadiendo etanol y hexano. El producto final se dispersó en 15 mL de hexano.

2.4. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS Fe/Fe₃O₄ RECUBIERTAS POR SÍLICE

La capa de sílice de nanopartículas Fe/Fe₃O₄ fue llevada a cabo mediante el procedimiento de microemulsión inversa (Rudzka et al). 600 µL de las nanopartículas Fe/Fe₃O₄ fueron dispersadas en un matraz de fondo redondo que contenía 120 mL de ciclohexano bajo agitación mecánica (550 rpm). Con el fin de evitar la formación de agregados, el matraz se colocó dentro de un baño de ultrasonidos y toda la síntesis se llevó a cabo bajo sonicación. Se añadió a la solución 1,2 mL de Triton X-100, 200 µL de tetraetilo ortosilicato y 150 µL de solución de amonio (30%). La solución inicialmente transparente se volvió turbia después de la adición de amoniaco. Finalmente, se añadió 400 µL de 1-octanol a la dispersión para eliminar la turbidez. La síntesis se mantuvo bajo

agitación mecánica y ultrasonidos durante 4 horas. Finalmente se centrifuga la síntesis a 4.000 rpm, eliminando así el sobrenadante, quedando las partículas dispersadas en el agua. Con el fin de eliminar todos los productos no deseados de la síntesis, incluyendo nanopartículas no magnéticas, se lavaron mediante decantación magnética y re-dispersión en agua. Se repitió este proceso varias veces, hasta que la conductividad del sobrenadante fue inferior a 2 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Todas las muestras que se describen a continuación se prepararon a partir de la solución madre de nanopartículas en suspensión en agua (1 mg/ml o 5×10^{10} partículas/mL).

2.5. NANOPARTÍCULAS Fe/Fe₃O₄/SiO₂ VEHICULIZADAS CON TEMOZOLOMIDA (NP/TMZ)

Las nanopartículas recubiertas por Temozolomida fueron preparadas añadiendo gota a gota 200 μL de la solución madre Fe/Fe₃O₄/SiO₂ a 200 μL de soluciones acuosas de Temozolomida (TMZ) con diferentes concentraciones del fármaco. Las soluciones de TMZ a diferentes concentraciones se prepararon diluyendo la solución madre de TMZ con agua a pH=5 (el pH óptimo para lograr la adsorción de TMZ en la superficie de las nanopartículas, comentado en el apartado Resultados I). Todas las muestras se prepararon bajo agitación vigorosa con ayuda de un agitador. Después de 24 horas, las partículas se centrifugaron a 13.000 rpm, eliminado el sobrenadante y las NPs se dispersaron en agua a pH=5.

2.6. NANOPARTÍCULAS Fe/Fe₃O₄/SiO₂ VEHICULIZADAS SIMULTÁNEAMENTE CON TEMOZOLOMIDA Y ABT-888 (NP/TMZ/ABT-888)

El inhibidor de PARP-1 conocido como ABT-888 (Veliparib) se incorporó a las NP/TMZ añadiendo gota a gota las nanopartículas a una solución acuosa ABT-888 a pH=7, conservando la mezcla a 4°C toda la noche (este pH es el óptimo para lograr la adsorción máxima de ABT-888 sobre la superficie de las nanopartículas). Después de este tiempo, las partículas fueron centrifugadas, eliminando el sobrenadante y dispersando el sedimento de NPs en agua destilada.

3. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN

3.1. TAMAÑO

La determinación del tamaño de las partículas sintetizadas se llevó a cabo como se describe a continuación:

1. Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión se analizaron usando el software *ImageJ*. Las imágenes se obtuvieron usando un microscopio electrónico de transmisión *Philips CM20*.

2. El tamaño medio de las partículas en solución acuosa se obtuvo mediante estudios de dispersión con el método de "*Light Scattering*", usando un aparato *Malver NanoZS* (Malvern Instruments, Reino Unido). Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente y a pH=7.4. Los valores de tamaños de las partículas se presentan como media \pm desviación estándar de tres mediciones independientes. La homogeneidad de tamaño de las partículas se representa por el índice de polidispersidad.

3.2. CARACTERIZACIÓN DE LA CARGA ELÉCTRICA DE LAS NPS

La movilidad electroforética es un indicador de carga superficial de las NPs, que determina la estabilidad de los nanocompuestos en dispersión y la funcionalización de superficie. Las medidas de la movilidad electroforética se realizaron usando un instrumento Malvern NanoZS a 25°C, 24 horas después de ajustar el pH de la solución. Desde un punto de vista electrocinético, estas medidas confirmaron la adsorción de TMZ y ABT-888 en la superficie de las nanopartículas.

Además del tamaño y la forma del material, la carga superficial dicta el destino celular con respecto a las nanopartículas. Varios estudios han confirmado el papel fundamental de las nanopartículas cargadas en la respuesta biológica. Las nanopartículas cargadas son absorbidas de forma más rápida que las neutras. Asimismo, la carga superficial juega un papel importante en la estabilidad coloidal acuosa y fisiológica. Esta carga puede ser controlada fácilmente teniendo en cuenta la naturaleza de los grupos de superficie a un pH particular. Para optimizar las condiciones de preparación y determinar la carga superficial final más adecuada para la administración de fármacos, se han investigado partículas sin funcionalizar y recubiertas, usando las medidas de movilidad electroforética.

3.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TMZ Y ABT-888 ADSORBIDAS POR LAS NANOPARTÍCULAS

Para determinar la concentración de fármacos adsorbida por nuestros nanocompuestos, se realizaron mediciones espectrofotométricas, utilizando un espectrofotómetro UV-VIS Perkin-Elmer Lambda 11 (Perkir-Elmer, EEUU). Las mediciones se realizaron a las respectivas longitudes de onda de absorbancia máximas (330 nm para TMZ, 270 nm para ABT-888) en cubetas de cuarzo de 1

cm de longitud. Se utilizó la ley de Beer para obtener la concentración del compuesto adsorbido en las soluciones 24 horas después del contacto con las partículas. Todas las muestras se centrifugaron a 18.000 rpm durante 35 minutos, y las mediciones se realizaron tres veces. Los plots de calibración de la concentración de absorbancia mostraron la relación lineal esperada para las bajas concentraciones utilizadas. El método fue previamente validado y verificado para su exactitud y precisión frente a soluciones de la concentración conocida.

La concentración usada para el estudio in vitro (líneas celulares de CHC) fue 100 μM de TMZ y 30 μM de ABT-888, los valores más eficientes en nuestros estudios previos de potenciación de muerte celular.

3.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FÁRMACOS LIBERADOS DE NP/TMZ/ABT-888

Para los estudios de liberación de fármacos, las partículas cargadas fueron re-dispersadas en medio de cultivo (1 mL, RPMI-1640), y se mantuvieron a 37°C durante los experimentos de liberación. A intervalos específicos de tiempo, la muestra se centrifugó y se extrajeron 4 μL . La absorbancia de esta muestra se evaluó para las respectivas longitudes de onda (330 nm para TMZ, 270 nm para ABT-888) en un Nanofotómetro Implen P-300 (Spectra Services, EEUU). Todas las mediciones se realizaron a 37 °C.

3.5. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE SUSPENSIONES DE NANOPARTÍCULAS

La estabilidad de las suspensiones de los nanocompuestos se comprobó mediante el siguiente estudio espectroscópico: evolución temporal del cociente de absorbancias A_t/A_0 , donde A_t es la absorbancia en el tiempo t , y A_0 es el valor

basal de las suspensiones en el medio de cultivo (1 mL, RPMI-1640). Para ello se midieron dichos parámetros en nanopartículas sin funcionalizar con fármacos (NP), nanopartículas con Temozolomida (NP/TMZ) y con Temozolomida y ABT-888 (NP/TMZ/ABT-888).

4. INMUNOFUORESCENCIA

Para el experimento con Inmunofluorescencia, la línea celular PLC-PRF-5 se sembró en un *chamber slide* (6 x 10⁴ células/pocillo, 4"chamber slide", Sigma-Aldrich) y se cultivó durante 24 horas. A continuación, se reemplazó el medio de cultivo con otro medio fresco que contenía el tratamiento apropiado.

Para determinar si las NP podían introducirse en el interior celular, las nanopartículas (NPs) fueron marcadas con Alexa Fluor® 488 (emite en verde, 525 nm, Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, EEUU) y estudiadas microscópicamente. Las NP sin marcaje de fluorocromo se usaron como control para distinguir posibles auto-fluorescencias. Dos horas después del tratamiento con las NP, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4%, a 4°C durante 15 minutos. El citoplasma se tiñió con anticuerpos monoclonales anti-β-actina (Sigma-Aldrich). El anticuerpo secundario para detectar la β-actina fue el IgG anti-mouse Alexa Fluor® 555 (emite en color Rojo, λ_{emisión_{max}}=580 nm, Molecular Probes, Invitrogen). La contratinción nuclear se realizó con DAPI (emite en Azul, λ_{emisión_{max}}=461 nm, 4'-6-diamino-2-fenilindol, Sigma-Aldrich) tras eliminar el exceso de anticuerpos secundarios.

La inmunotinción para el polímero de Poli (ADP-ribosa) (PAR) se realizó 2 horas después del tratamiento con NPs en células fijadas en metanol-acetona (1:1) durante 10 minutos a 4°C. El anticuerpo primario utilizado fue el anticuerpo 10H (Alexis). El anticuerpo secundario utilizado fue el anticuerpo anti-rabbit Alexa Fluor® 488 (emite en Verde, λ_{emisión_{max}}=525 nm, Molecular

Probes, Invitrogen). Los núcleos celulares se tiñieron con solución de Ioduro de Propidio (IP, emite en Rojo, $\lambda_{\text{emisión}_{\text{max}}}=617$ nm, Sigma-Aldrich).

El daño en el ADN sin reparar fue evaluado 12 horas tras el tratamiento con NP/TMZ/ABT-888, mediante inmunotinción de γ -H2AX, en células fijadas con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos. El anticuerpo primario utilizado fue anti- γ -H2AX purificado de ratón (BD Pharmigen™) y el anticuerpo secundario utilizado fue el anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor® 488 (emite en Verde, $\lambda_{\text{emisión}_{\text{max}}}=525$ nm, Molecular Probes, Invitrogen). La contratinción del núcleo con DAPI se llevó a cabo después de eliminar el exceso de anticuerpo secundario (Azul, $\lambda_{\text{emisión}_{\text{max}}}=461$ nm, 4'-6-diamino-2-fenilindol, Sigma-Aldrich).

Los resultados de la inmunotinción se visualizaron con un microscopio confocal espectral de Leica modelo SP2. Las imágenes de DAPI fueron capturadas con una cámara digital Leica DC200. EL análisis de la intensidad de fluorescencia relativa se realizó con el software ImageJ.

5. ANÁLISIS DE VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT (Roche Diagnostics) y se completó con ensayos de muerte celular mediante el método de exclusión con tinción Trypan Blue (Sigma-Aldrich). Los nanocompuestos cargados con fármacos y los fármacos libres (sin vehiculizar sobre nanopartículas) se añadieron a las concentraciones indicadas y se incubaron durante 48 horas. A continuación, se añadió 10 μ l de MTT (5mg/mL en PBS) a las células y se incubaron durante 4 horas a 37°C en una atmósfera humidificada. La viabilidad celular relativa se determinó mediante un lector de ELISA equipado con un filtro de 595 nm. Para el método de exclusión con Trypan Blue, las células se recogieron al final de experimento (48 horas después del tratamiento con NP)

y se tiñeron con colorante Trypan Blue. Las células muertas se identificaron como aquellas con un color azul característico, observadas con un microscopio invertido de luz transmitida modelo Olympus IX51.

6. MEDICIÓN DEL CICLO CELULAR, DESPOLARIZACIÓN MITOCONDRIAL Y MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS

Se cuantificaron las diferentes fases del ciclo celular (G1, S y G2/M), 24 horas después del tratamiento con NPs mediante el protocolo de tinción con Ioduro de Propidio (Kit IP + RNAsa), siguiendo el protocolo del fabricante. Los datos se adquirieron con un citómetro BD FACSARIA II y se analizaron con el software BD FACSDIVA 6.0™ (BD Biosciences).

La despolarización mitocondrial asociada a la muerte celular por apoptosis se analizó 24 horas después del tratamiento con NPs, mediante el método BD MitoScreen (Kit de detección del potencial de membrana mitocondrial mediante Citometría de flujo, BD Biosciences). Los datos se adquirieron con un citómetro BD FACSARIA II usando el software BD FACSDIVA 6.0™ (BD Biosciences).

Se midieron los niveles de apoptosis 48 horas después del tratamiento con NPs, usando el Kit de detección de Apoptosis Annexin FITC (BD Pharmingen), siguiendo el protocolo del fabricante. Los datos se adquirieron con un citómetro BD FACSARIA II usando el software BD FACSDIVA 6.0™ (BD Biosciences).

7. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNÉTICA DE GENES RELACIONADOS CON PARP-1, OBTENCIÓN DE ARN MENSAJERO, DE ADN COMPLEMENTARIO Y CUANTIFICACIÓN POR PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL

El ARN total fue aislado de las células mediante el kit RNeasy (Qiagen Inc.). Una cantidad similar de ARN fue transcrita de forma inversa a ADN complementario y amplificada mediante PCR con el kit de síntesis de ADNc iScript (Laboratorios BioRad), según el protocolo del fabricante. Finalmente, para analizar la expresión de genes relacionados con PARP-1, se realizaron PCRs en tiempo real con la tecnología EvaGreen® usando el kit SsoFast SuperMix EvaGreen® (Laboratorios Bio-Rad) y siguiendo el protocolo del fabricante. Todos los valores se normalizaron según la expresión de tres genes de expresión constante "Housekeeping": PPIA, RPS13 y UBC. En todos los casos, se realizaron curvas estándar con al menos cuatro concentraciones diferentes y conocidas de ADN complementario (en todos los casos el coeficiente de correlación > 0.98). La cuantificación relativa de expresión de genes se determinó usando el método comparativo Ct. Todos los análisis de muestras se repitieron por cuadruplicado, y se usaron valores medios de expresión.

8. INMUNOBLOTTING

Las células se sembraron en un matraz de cultivo T25 y, tras el tratamiento con NPs o fármacos sin vehiculizar, se lavaron con PBS frío e incubaron en un buffer de lisis (50mM Tris-HCl pH 7.4, 150nM NaCl, 0.1% SDS, 1% Igepal C, 0.5% deoxicolato de sodio, 1 mM Na₃VO₄, 10 mg/ml leupeptina, 2 mg/ml aprotinina y 1 mg/ml pepstatina, 1 mM PMSF, 10 nM NaF) en hielo durante 45 minutos. Los lisados se centrifugaron a 16.000 g durante 10 minutos a 4°C y los precipitados celulares fueron desechados. La concentración de proteínas se estimó usando el reactivo de Bradford (Sigma). Se cargaron 50 µg

de proteínas totales en un gel de SDS-poliacrilamida al 12%. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con anticuerpos frente a PARP-1, C2-10 (Santa Cruz Biotechnology) y anti-Caspasa-3 activa (Immunostep) que fueron analizados por incubación con los anticuerpos secundarios conjugados HRP (horse rabbit peroxidase). Se usó anti-actina I-19 (Santa Cruz Biotechnology) para el control de carga. Las imágenes fueron captadas usando el sistema ChemiDoc XRS y el software Quantity One (Laboratorios BioRad).

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La gestión y el análisis de los datos se realizaron con el programa SPSS 15.0 para Windows. El criterio de significación estadística fue $P \leq 0.05$. Los datos analizados en este estudio fueron variables cuantitativas que se expresaron como valores medios \pm DS (desviación estándar). Como las variables cuantitativas no se distribuyen normalmente ($n < 30$), se usó el test de U Mann-Whitney para determinar la significación estadística.

RESULTADOS I

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

RESULTADOS I

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

La estructura de las nanopartículas magnéticas sintetizadas se representa en la **Figura 13**. Están formadas por un núcleo interior de Fe revestido de magnetita (Fe_3O_4), tras la cual se añade una capa de sílice para finalmente ser recubiertas con TMZ y ABT-888 (NPs/TMZ/ABT-888). El tamaño, la forma y la composición de las nanopartículas afectan tanto a la capacidad de transporte de fármacos antitumorales como a la cinética de la captación celular; por tanto, es necesario llevar a cabo un estudio detallado de la morfología de esta nanopartícula.

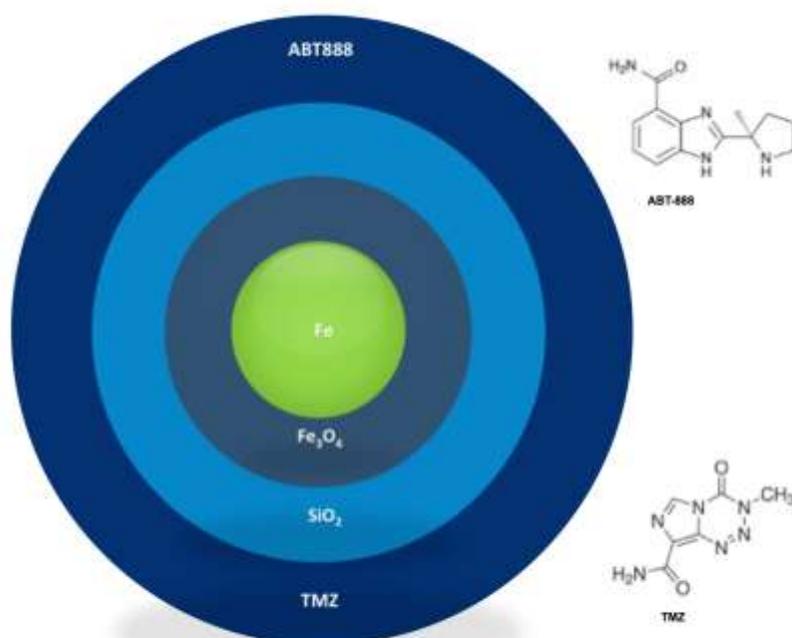


Figura 13. Representación gráfica de las Nanopartículas diseñadas.
Nanopartículas magnéticas recubiertas por una capa de sílice y por los fármacos Temozolomida (TMZ) y ABT-888.

Las mediciones realizadas mediante Dispersión dinámica de luz (DDL) mostraron que el diámetro de los núcleos de magnetita ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Fe}$) era de 11 ± 3 nm (diámetro medio \pm DS) con un índice de polidispersión de 0,08, indicando una distribución de tamaño razonablemente estrecha del núcleo. El recubrimiento con sílice de los núcleos de magnetita mostró gran estabilidad y las mediciones mediante DDL mostraron un tamaño de 16 ± 4 nm con un índice de polidispersión de 0,12. Estos datos (tamaño, homogeneidad y geometría) fueron confirmados mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) (**Figura 14**).

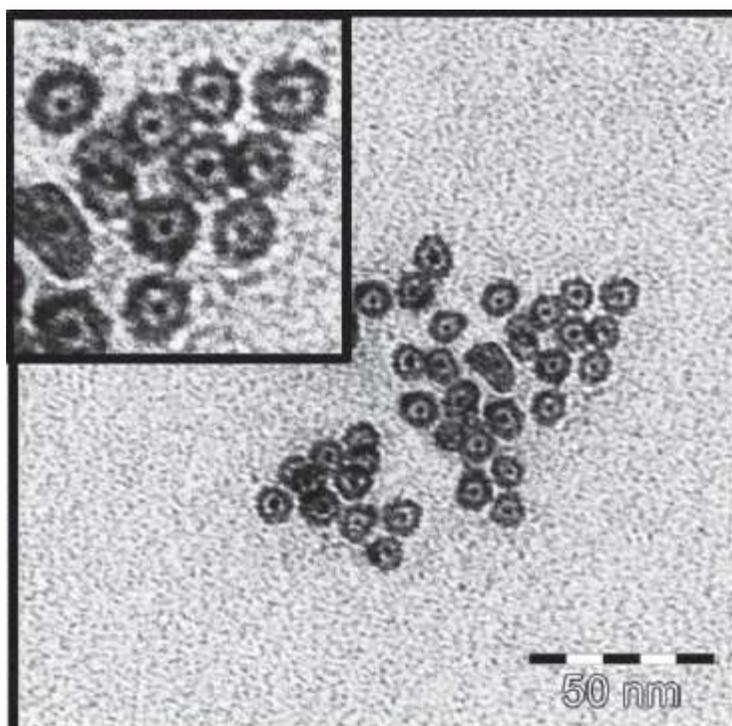


Figura 14. Nanopartículas magnéticas visualizadas mediante Microscopía electrónica de transmisión (MET).

Se muestra el alto grado de homogeneidad y geometría. El contraste intenso del núcleo corresponde al hierro, las capas sucesivas corresponden a la magnetita (capa media) y sílice (capa externa). Escala: 50 nm.

Para el estudio de la carga de la partícula asociado al pH óptimo de incorporación de los fármacos, se realizaron pruebas de movilidad electroforética. En la **figura 15** se muestra el efecto del pH sobre la carga de las NPs expuestas a diferentes concentraciones de TMZ. El análisis de la figura indica que las NPs por si solas (sin funcionalizar con TMZ), a partir de pH 4 presentan carga negativa (debido a la capa de sílice), haciéndose esta carga relativamente estable a partir del pH 5,5. En relación a la temozolomida, a pH relativamente ácidos, presenta carga positiva, por lo que teóricamente, su incorporación electrostática óptima sobre la NPs cargadas negativamente se producirá a pH ácidos. Este evento se confirma en el análisis de los resultados obtenidos. Así, a pH=5 se observan las mayores incorporaciones de TMZ (mayor cambio producido en la carga de la NP).

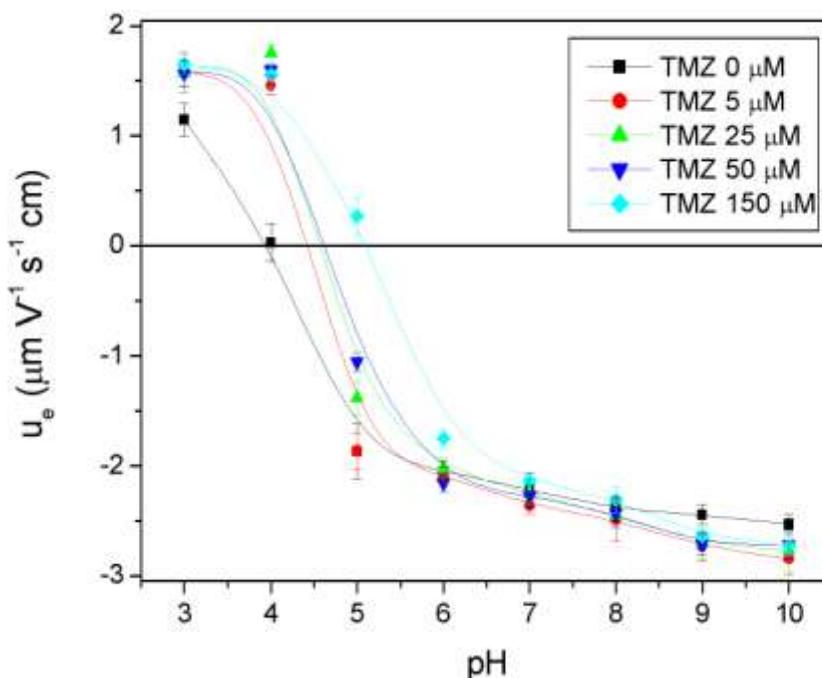


Figura 15. Ensayo de movilidad electroforética de las NPs sin funcionalizar así como de partículas expuestas a diferentes concentraciones de TMZ en función del pH.

TMZ, Temozolomida; μM , micromolar

Para evaluar la concentración máxima de TMZ que podemos incorporar a nuestros compuestos se realizaron mediciones de movilidad electroforética (**Figura 16**) con un pH fijo de 5 así como determinaciones de absorbancia a este mismo pH (**Figura 17**).

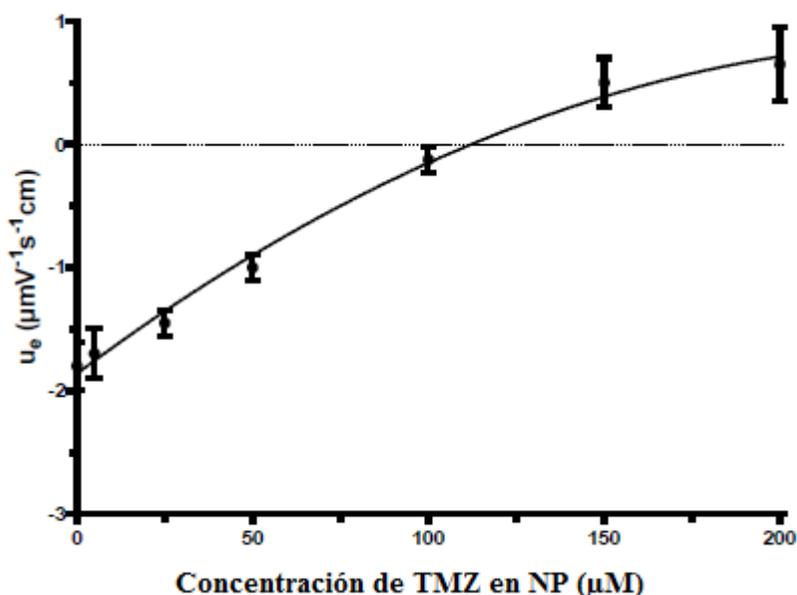


Figura 16. Movilidad electroforética de las Nanopartículas en función de la concentración de TMZ a pH 5.

TMZ, Temozolomida; μM , micromolar

Las mediciones de electromobilidad en las NPs expuestas a diferentes concentraciones de TMZ confirmaron la adsorción por parte de las NPs de compuestos cargados positivamente (TMZ) con una tendencia creciente en relación a la concentración de TMZ. A medida que la TMZ es adsorbida en la superficie de la nanopartícula, la carga superficial se va volviendo más positiva. Estos datos sugieren que la interacción electrostática es el mecanismo principal de adsorción. Además, a partir de una concentración de 110 nM de TMZ, la carga

de la partícula se vuelve ligeramente positiva por lo que la incorporación del fármaco se reduce significativamente. Este hecho se ve confirmado mediante el análisis de la absorbancia. Así, en la **Figura 17** se muestra la capacidad de adsorción de TMZ por parte de las nanopartículas (pH=5). La concentración de TMZ (medida espectrofotométricamente como absorbancia del compuesto a 330 nm) incorporada a la NP aumenta a medida que se incrementan las concentraciones de TMZ disueltas en el medio, hasta que se alcanza el equilibrio de concentración máximo (sobre 175 μM de TMZ por miligramo de NP).

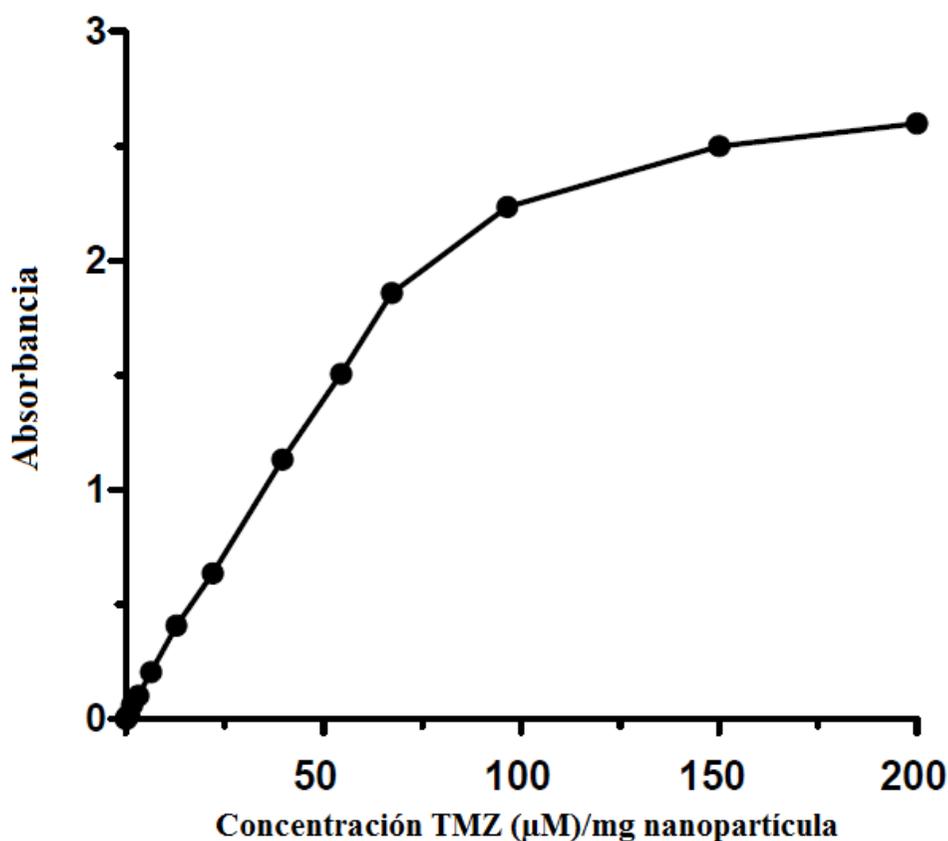


Figura 17. Capacidad de incorporación de TMZ por las Nanopartículas mg, miligramo; TMZ, Temozolomida; μM , micromolar.

Por otro lado, se realizó un estudio de movilidad electroforética para determinar el pH más indicado para la incorporación del compuesto ABT-888 (**Figura 18**). Los resultados indican que a partir de pH=7 se produce una óptima incorporación de ABT-888.

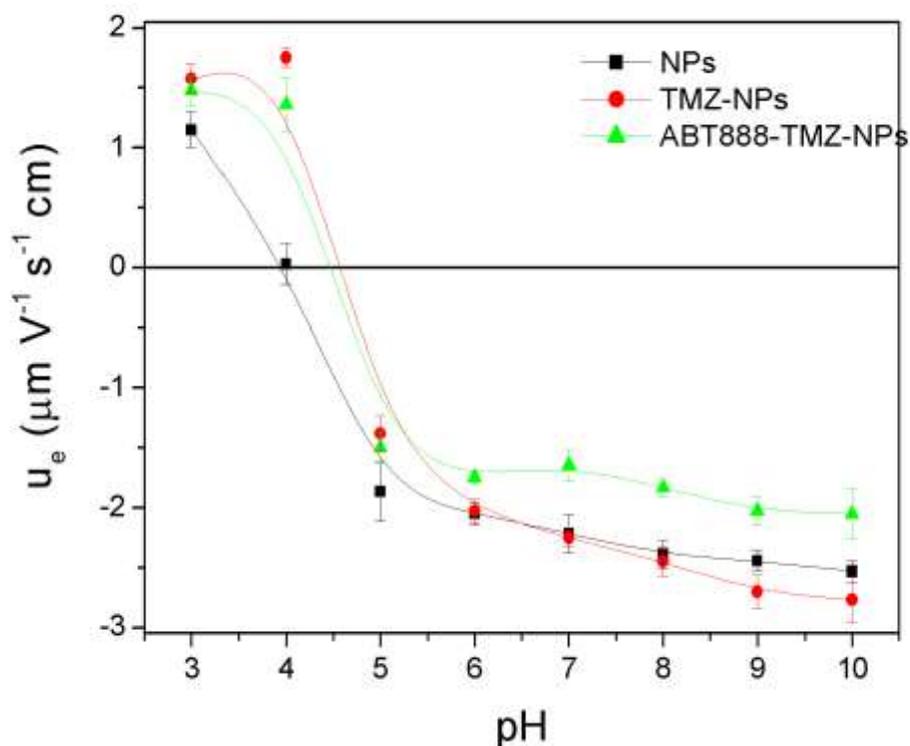


Figura 18. Movilidad electroforética en función del pH de NPs (■), NP/TMZ (●) y NP/TMZ/ABT-888 (▲).

Concentración de TMZ: 25 μM y de ABT-888: 30 μM .

ABT-888, Veliparib; NPs, Nanopartículas; TMZ, Temozolomida

Además, la adsorción de ABT-888 a pH=7 (cargado positivamente) en la superficie de las NP/TMZ fue moderadamente dependiente de la concentración de TMZ previamente incorporada (**Figura 19**), lo cual indica que el principal mecanismo de unión de ABT-888 debe ser electrostático. De este modo, existe un equilibrio entre la incorporación de TMZ y la concentración de ABT-888 que podemos incorporar a la NP. Así, la funcionalización previa de la NP con TMZ fija la concentración máxima que se puede adsorber de ABT-888.

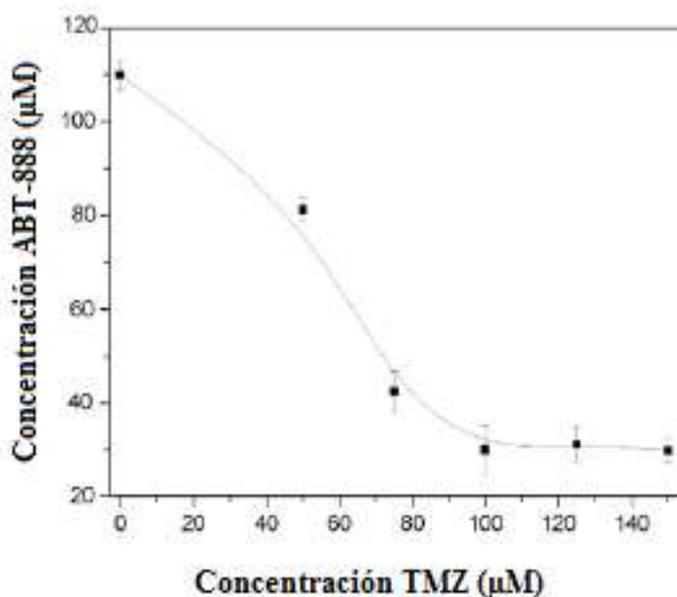


Figura 19. Comparación de las concentraciones de ABT-888 y TMZ adsorbidos de forma simultánea en las Nanopartículas.

ABT-888, Veliparib; TMZ, Temozolomida, µM, micromolar

Para este estudio, se eligió una concentración de fármacos adsorbidos sobre las nanopartículas de 100 μM TMZ y de 30 μM de ABT-888 por miligramo de partícula.

Las NP/TMZ/ABT-888 presentaron un alto nivel de estabilidad en el medio de cultivo (**Figura 20**) y tras casi tres horas, solo una pequeña proporción de las partículas sedimentaron o agregaron (< 5,5%, datos no significativos).

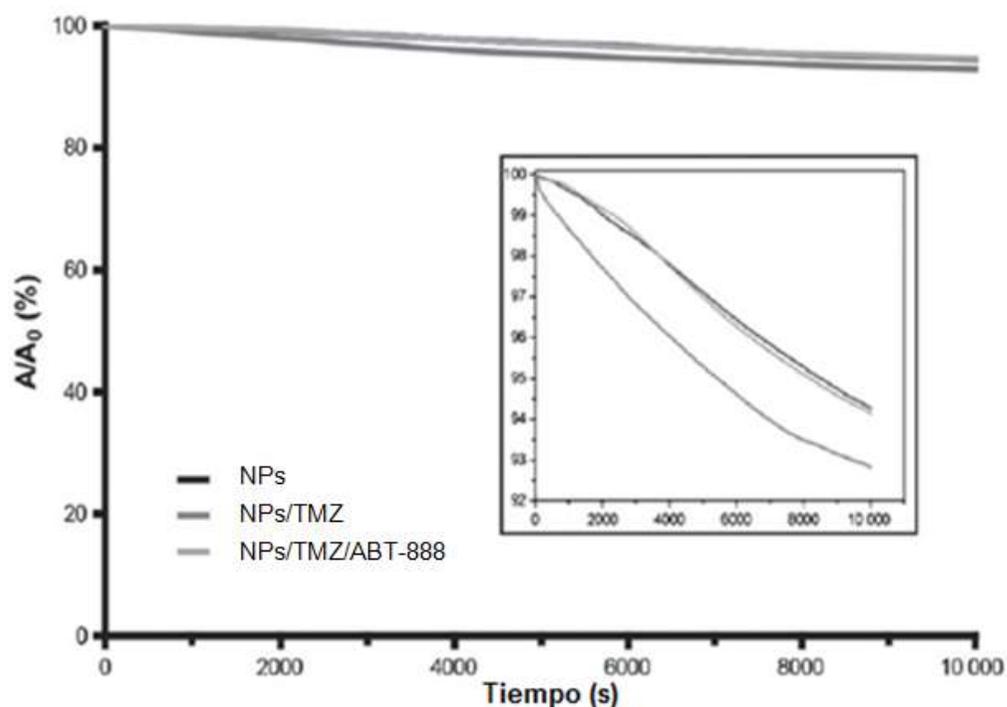


Figura 20. Estudio de la estabilidad de las Nanopartículas magnéticas.

Se representa la absorbancia (expresada como una proporción de absorbancias, absorbancia a tiempo X (A) dividido por la absorbancia inicial (A_0)) de las suspensiones de NPs ($\text{Fe}/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$), NP/TMZ y NP/TMZ/ABT-888, como una función de tiempo (segundos) en medio de cultivo. Se muestra también la amplificación del eje "y".

Finalmente se presentan los valores de liberación del fármaco en el medio de cultivo en la **Figura 21**. El análisis de los datos mostró que la incorporación de estos compuestos en las nanopartículas permite su liberación de forma gradual y extendida. Como puede observarse, la liberación del 50% de ambos fármacos se alcanzó entre las 10-15 horas tras la disolución de las NP/TMZ/ABT-888 en el medio de cultivo. Los patrones de liberación de ambos fármacos se ajustan a la ecuación de Higuchi ($Q_t = K_H \cdot t^{1/2}$) con altos valores de r^2 , indicando que el mecanismo predominante de liberación es el de difusión (TMZ: $K_H = 12.2 \pm .0.3$, $r^2 = 0.96$; ABT-888: $K_H = 12.1 \pm .0.2$, $r^2 = 0.97$). No existieron diferencias estadísticamente significativas entre la liberación de los dos fármacos (TMZ y ABT-888).

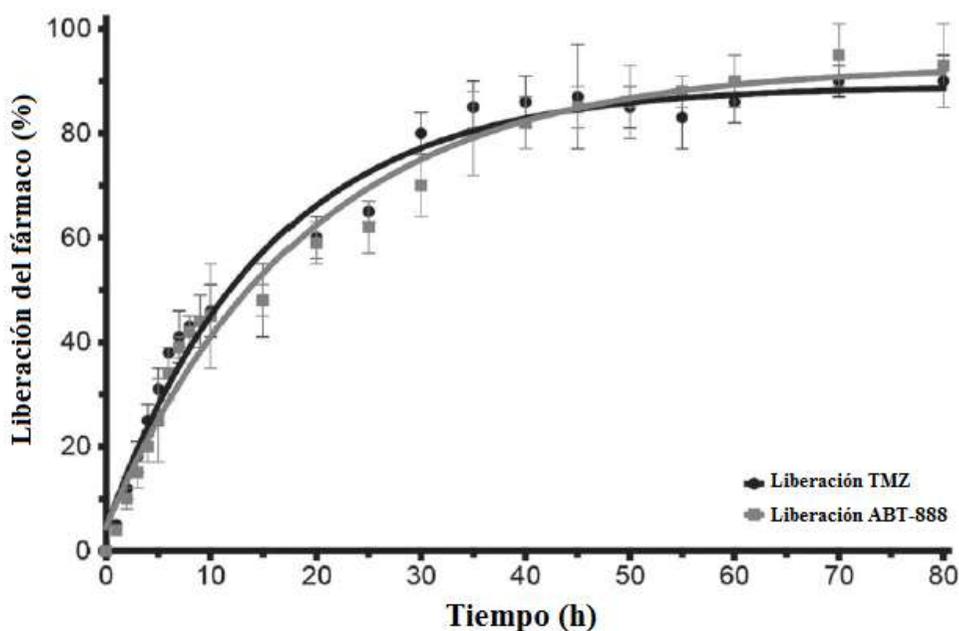


Figura 21. Cinética de liberación de ABT-888 y TMZ de las Nanopartículas.
Datos ajustados según ecuación de liberación de Higuchi.
ABT-888, Veliparib; h, horas; TMZ, Temozolomida

RESULTADOS II

RESULTADOS EN LÍNEAS CELULARES DE CARCINOMA HEPATOCELULAR

RESULTADOS IN VITRO (líneas celulares de Hepatocarcinoma)

1. CAPACIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS PARA PENETRAR EN LAS CÉLULAS TUMORALES HEPÁTICAS

Para determinar si esas partículas podrían llegar a ser internalizadas en las células y definir su localización subcelular, las NPs fueron marcadas con el fluorocromo Alexa Fluor® 488, (Molecular Probes, Invitrogen). Las imágenes por microscopía láser confocal demostraron que las NPs marcadas con Alexa-488 fueron capaces de penetrar en las células tumorales hepáticas (PLC-PRF-5) y que su localización, como era de esperar, fue exclusivamente citoplasmática (Figura 22). Los motivos de esta localización y de que estas NPs no entren en el núcleo son varias, principalmente por el pequeño tamaño de los poros nucleares y el hecho de que nuestras NP no tienen una señal de localización nuclear. Además, el análisis de la cinética de entrada en la célula demostró la rápida captación de las NP (menos de 2 horas).

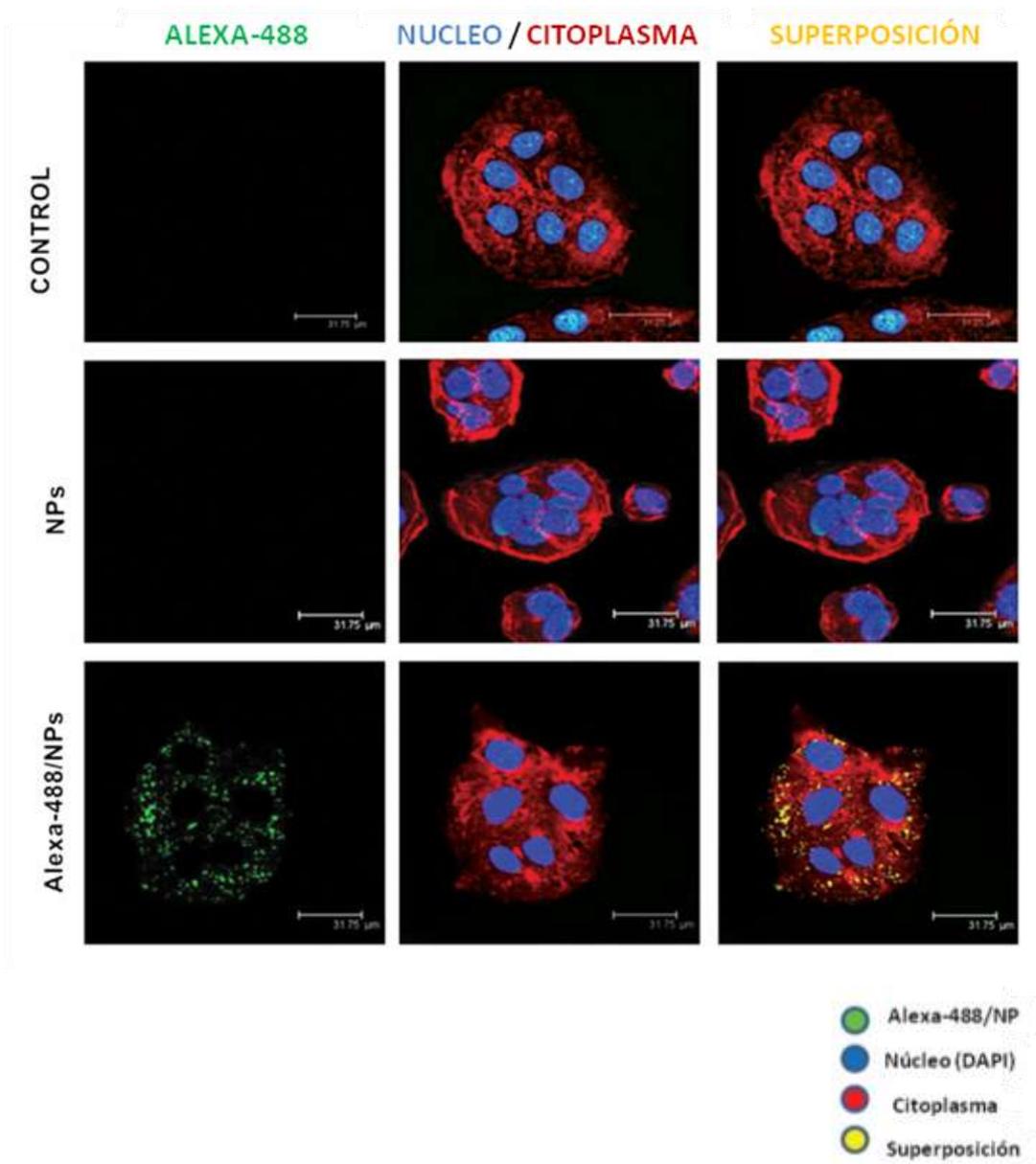


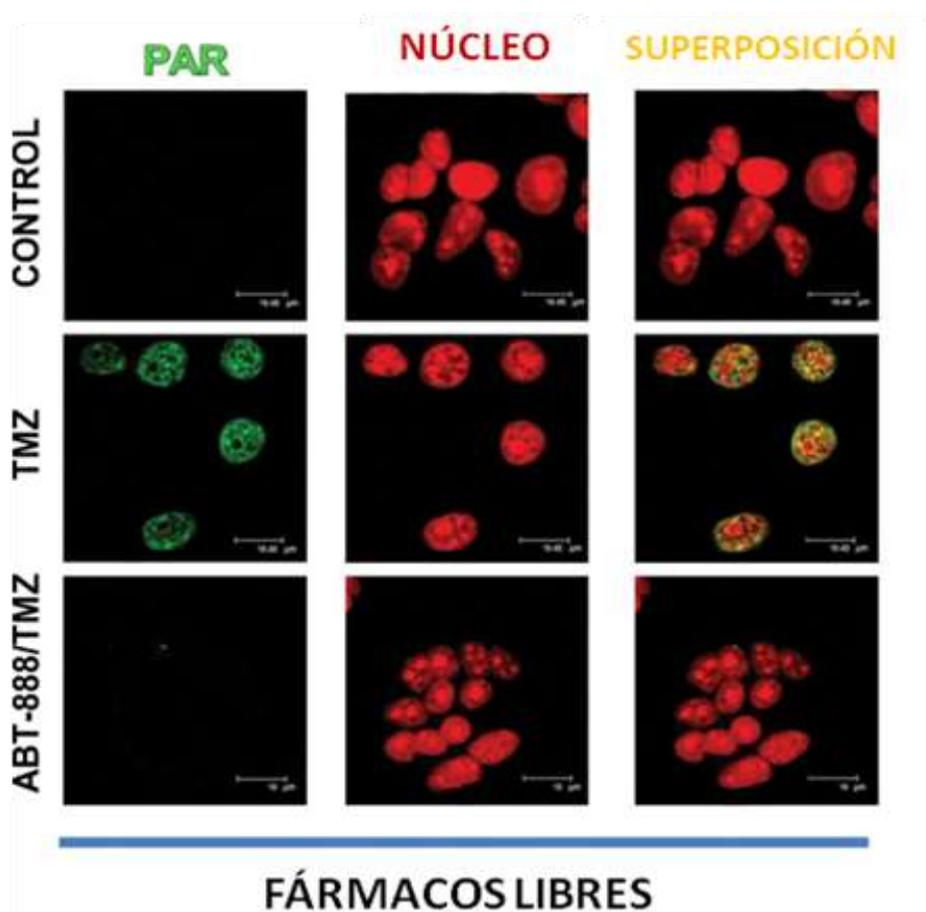
Figura 22. Estudio de la captación celular de las Nanopartículas. Determinación de la localización celular de las Nanopartículas.

Inmunofluorescencia de NP marcadas con Alexa Fluor®488 (verde) y NP sin marcaje. Las NP marcadas con fluorocromo se visualizan como puntos verdes brillantes fluorescentes dentro del citoplasma de las células tumorales (marcado con anticuerpo anti-β-actina, aparece en color rojo). El núcleo de las células fue teñido de azul (DAPI). La inmunofluorescencia se realizó 2 h después del tratamiento con NP (20 µg/ml).

h, horas; ml, mililitro; NP, nanopartículas; µg, microgramo

2. EL TRATAMIENTO CON NANOPARTÍCULAS VEHICULIZADAS CON FÁRMACOS (TEMOZOLOMIDA) PROVOCA LA ACTIVACIÓN DE PARP-1 Y EL INHIBIDOR ABT-888 BLOQUEA DICHA ACTIVACIÓN

El análisis de la figura 23 revela que ambos fármacos fueron liberados de las NP dentro de las células . De esta forma, se observa que al tratar las células tumorales PLC-PRF-5 con las NP/TMZ, la TMZ es liberada de su inclusión en la NP e induce daño en el ADN (medido como activación de PARP-1 mediante la formación de polímero PAR). Por otra parte, la activación de PARP-1 se vio reducida por el tratamiento con NP vehiculizadas conjuntamente con el inhibidor de PARP-1 (NP/TMZ/ABT-888).



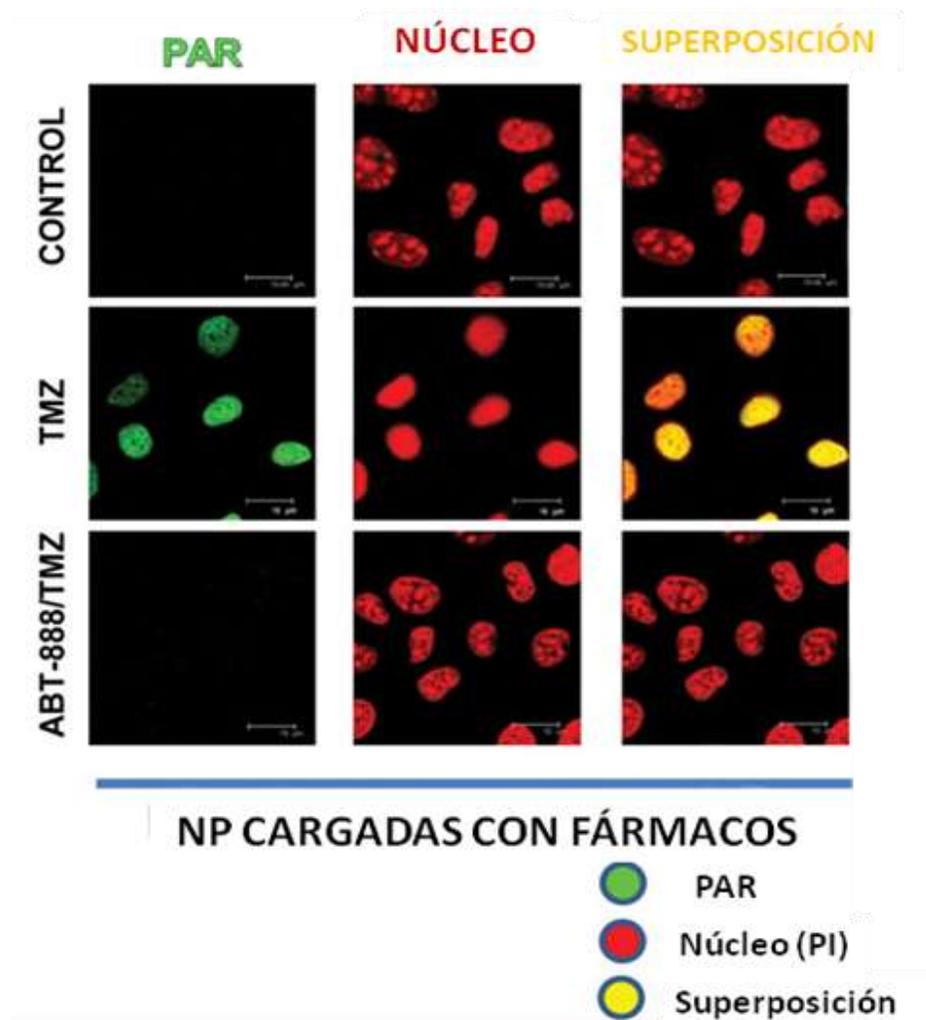


Figura 23. Estudio de la activación de PARP-1 y su inhibición tras tratamiento con fármacos libres y vehiculizados en NPs.

Inmunofluorescencia para el estudio de la activación de PARP-1 mediante el análisis de la formación de PAR (verde), 2 h después del tratamiento (NP 20µg/ml, ABT-888 30 µM, TMZ 100 µM). Los núcleos se tiñeron con PI (rojo). Las imágenes superpuestas muestran la formación de PAR en el núcleo (amarillo), por TMZ libre y NP/TMZ. Esta señal desaparece tras el tratamiento con ABT-888 libre así como vehiculizado con nanopartículas.

ABT-888, Veliparib; ml, mililitro; PAR, poli(ADP-ribosa); PI, yoduro de propidio; TMZ, Temozolomida; µg, microgramo; µM, micromolar

Resulta interesante el hecho de que el tratamiento con NP/TMZ provoque más daño en el ADN que el tratamiento con fármacos libres a la misma concentración (fármacos libres: fármacos sin vehiculizar con NP, la intensidad de fluorescencia relativa para NP/TMZ fue de 100 ± 17 en comparación con 48 ± 7 de los fármacos libres, $P = 0.02$). Además, la inhibición de PARP-1 desencadenada tanto por ABT-888 libre como por ABT-888 vehiculizado por NP fue casi completa (la intensidad media de fluorescencia para NP/TMZ/ABT-888 fue 0.09 ± 0.03 en comparación con 0.48 ± 0.07 para los fármacos libres).

3. ESTUDIO DE VIABILIDAD CELULAR TRAS TRATAMIENTO CON NP/TMZ/ABT-888

Realizamos el análisis de la viabilidad celular en varias líneas celulares hepáticas tras tratarlas con diferentes concentraciones de fármacos cargados en partículas (**Figuras 24 y 25**). En todas las líneas celulares tumorales usadas, el tratamiento combinado con ABT-888 (30 μ M) y con las diferentes dosis de TMZ presentaron una viabilidad celular más baja (sobre 27-35%) que la desencadenada a dosis iguales de NP/TMZ (nanopartículas sin ABT-888, $P < 0.05$). El efecto más potente alcanzado con el inhibidor de PARP-1 fue con la dosis de TMZ de 100 μ M. Sin embargo, cuando usamos la línea celular no tumoral (WRL-68), el tratamiento con NP/TMZ/ABT-888 solo redujo la viabilidad celular en un 9% en comparación con NP/TMZ. Es importante señalar que la expresión de PARP-1 es mayor en líneas celulares de hepatocarcinoma que en células hepáticas sanas, lo cual refleja la importancia del papel de PARP-1 en el desarrollo, la progresión y la supervivencia tumoral (Quiles-Perez et al. 2010, Munoz-Gamez et al. 2011). Estos datos indican que los diferentes resultados entre las células tumorales y las células hepáticas sanas, en respuesta a TMZ y ABT-888, podrían estar asociados a las diferentes concentraciones de PARP-1.

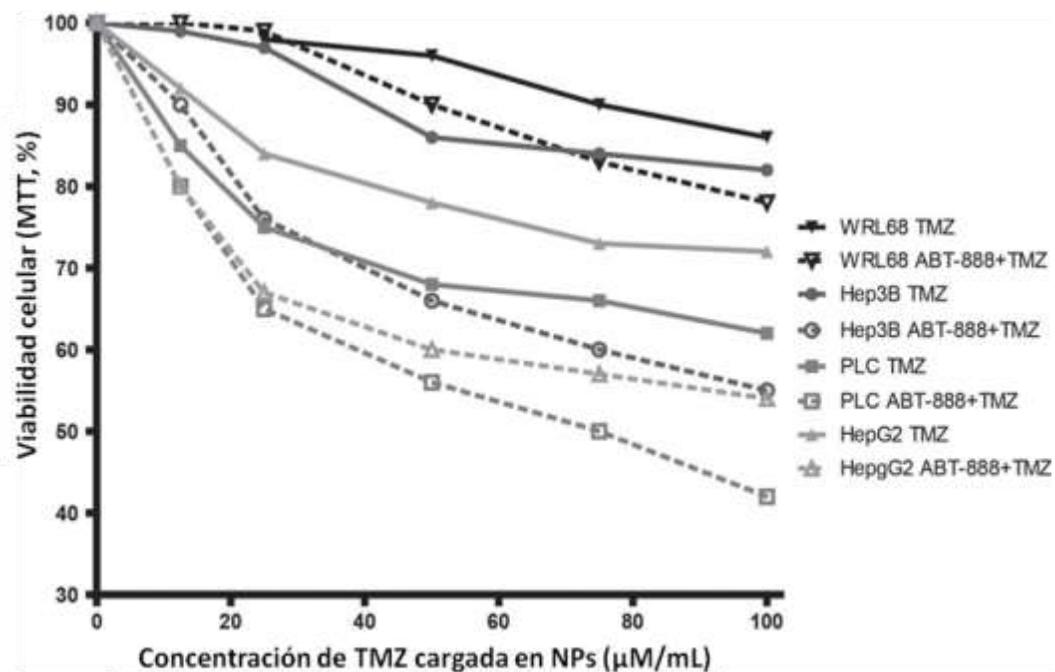


Figura 24. Ensayo de viabilidad celular usando NP recubiertas con ABT-888 y TMZ. Determinación de la viabilidad celular mediante ensayo MTT para líneas celulares hepáticas tumorales HepG2, Hep3B, PLC-PRF-5 y células hepáticas no tumorales WRL-68.

Las células fueron tratadas 48h con NPs cargadas con ABT-888 (30 μM) y distintas concentraciones de TMZ.

ABT-888, Veliparib; ml, mililitro; TMZ, Temozolomida; μg, microgramo; μM, micromolar

Por otro lado, el análisis de la **figura 25** muestra que el tratamiento con NPs cargadas con TMZ (100 μM) asociadas a diferentes concentraciones de ABT-888, presentó la tasa de muerte celular más elevada con la dosis de ABT-888 de 30 μM . Por esta razón, las concentraciones elegidas para los ensayos *in vitro* fueron de 30 μM para ABT-888 y de 100 μM para TMZ.

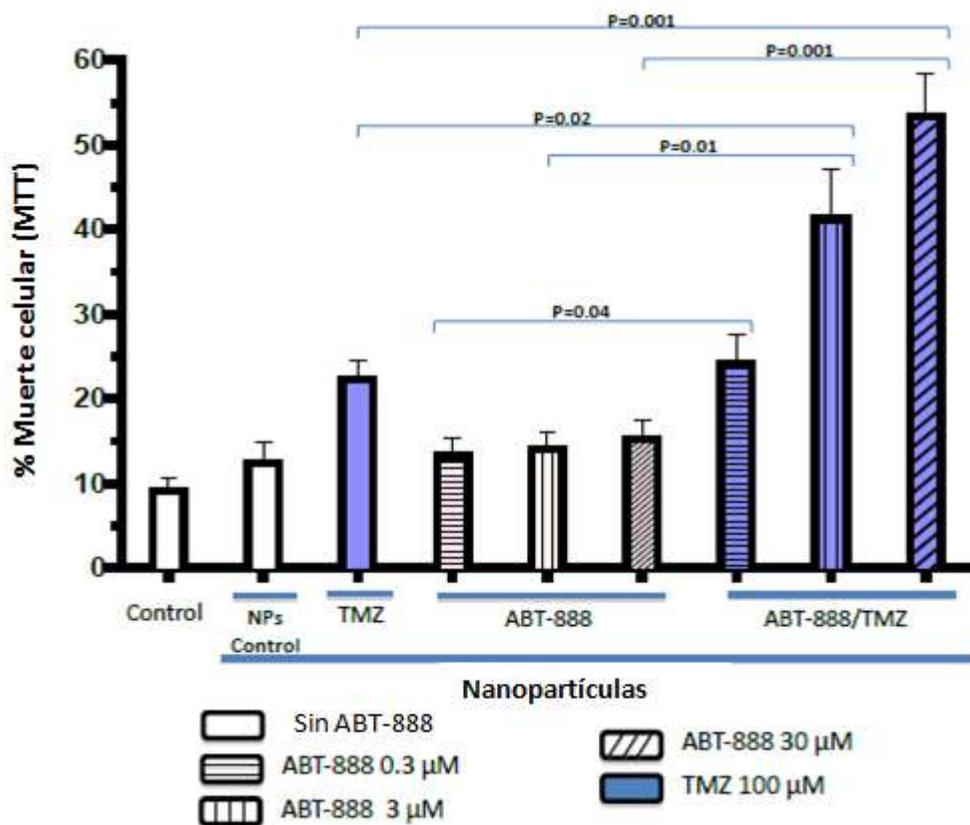


Figura 25. Ensayo de muerte celular usando Nanopartículas cargadas con 100 μM de TMZ y tres diferentes concentraciones de ABT-888 en la línea celular hepática tumoral PLC-PRF5.

Concentración ABT-888: 30 μM , TMZ: 100 μM .

ABT-888, Veliparib; ml, mililitro; TMZ, Temozolomida; μM , micromolar

La **figura 26** compara el efecto citotóxico producido por los fármacos libres con el efecto ocasionado por los fármacos vehiculizados mediante NP, a iguales concentraciones.

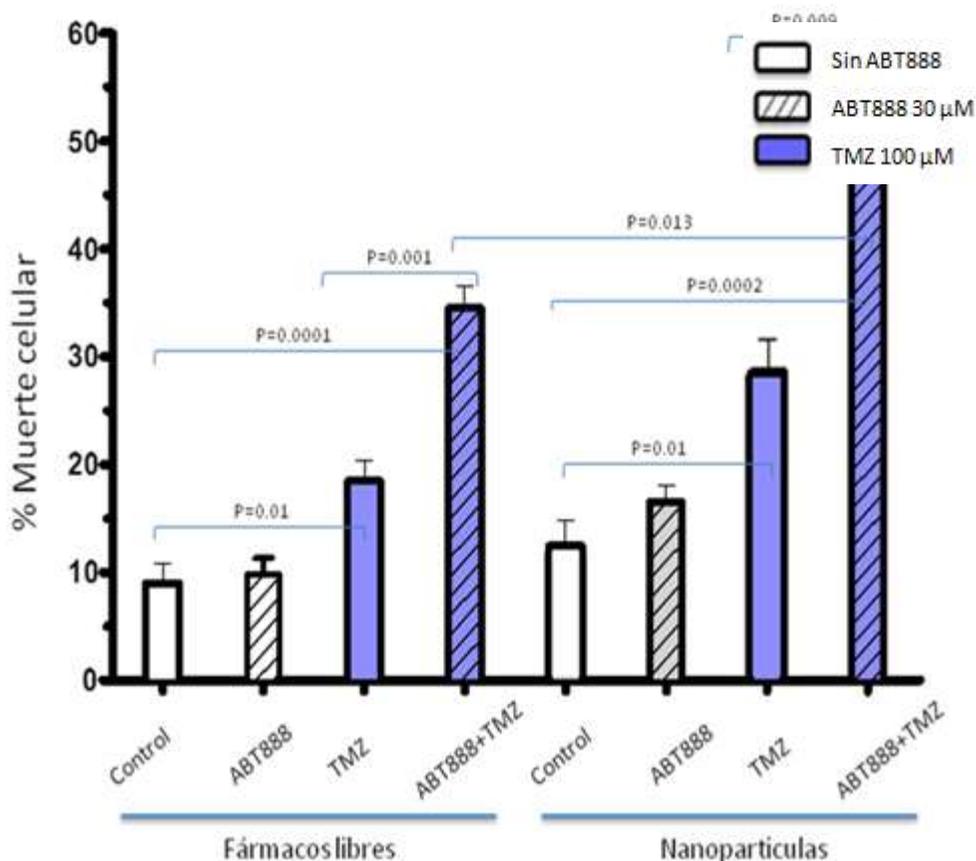


Figura 26. Ensayo de muerte celular para la línea celular hepática tumoral PLC-PRF-5 comparando el tratamiento con NP cargadas con TMZ y ABT-888 con las mismas concentraciones de fármacos libres (sin vehicular por NP).

Concentración ABT-888: 30 μ M, TMZ: 100 μ M.

ABT-888, Veliparib; ml, mililitro; TMZ, Temozolomida; μ M, micromolar

Los resultados demuestran que: i) las NP *per se* (sin fármacos) no indujeron muerte celular; (ii) el tratamiento con ABT-888, tanto libre como vehiculizado en NP, no incrementó significativamente la toxicidad con respecto a las células control no tratadas; (iii) el tratamiento con NP/TMZ incrementó la tasa de muerte celular en comparación con TMZ libre a iguales concentraciones (aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa, $P=0.06$); (iv) el tratamiento combinado con ABT-888 y TMZ potenció de forma significativa la muerte celular inducida por TMZ, tanto con los fármacos libres ($P=0.001$) como con los fármacos vehiculizados mediante NP ($P=0.009$); (v) el tratamiento con NP/TMZ/ABT-888 produjo un aumento de la eficiencia citotóxica en comparación con el efecto citotóxico de los fármacos libres (Fármacos vehiculizados por NP: 53.5%; fármacos libres: 34.5%; $P=0.013$).

4. EL TRATAMIENTO CON ABT-888 INDUCE PARADA DEL CICLO CELULAR, ACUMULACIÓN DE DAÑO EN EL ADN, DESPOLARIZACIÓN MITOCONDRIAL Y MUERTE CELULAR APOPTÓTICA

En vistas de los resultados descritos anteriormente y dado el hecho de que TMZ podría inducir diferentes tipos de muerte celular (Knizhnik et al. 2013), decidimos evaluar el mecanismo por el cual NP/TMZ/ABT-888 induce muerte celular. La **figura 27** muestra que el tratamiento con NP/TMZ/ABT-888 incrementó de forma significativa la parada del ciclo celular en fase G2/M, en comparación con otras condiciones (el promedio de células en fase G2/M fue del 67% para NP/TMZ/ABT-888 versus 24% para el grupo control, 21% para las células tratadas con NP/TMZ y 30% para las tratadas con NP/ABT-888, $P>0.05$).

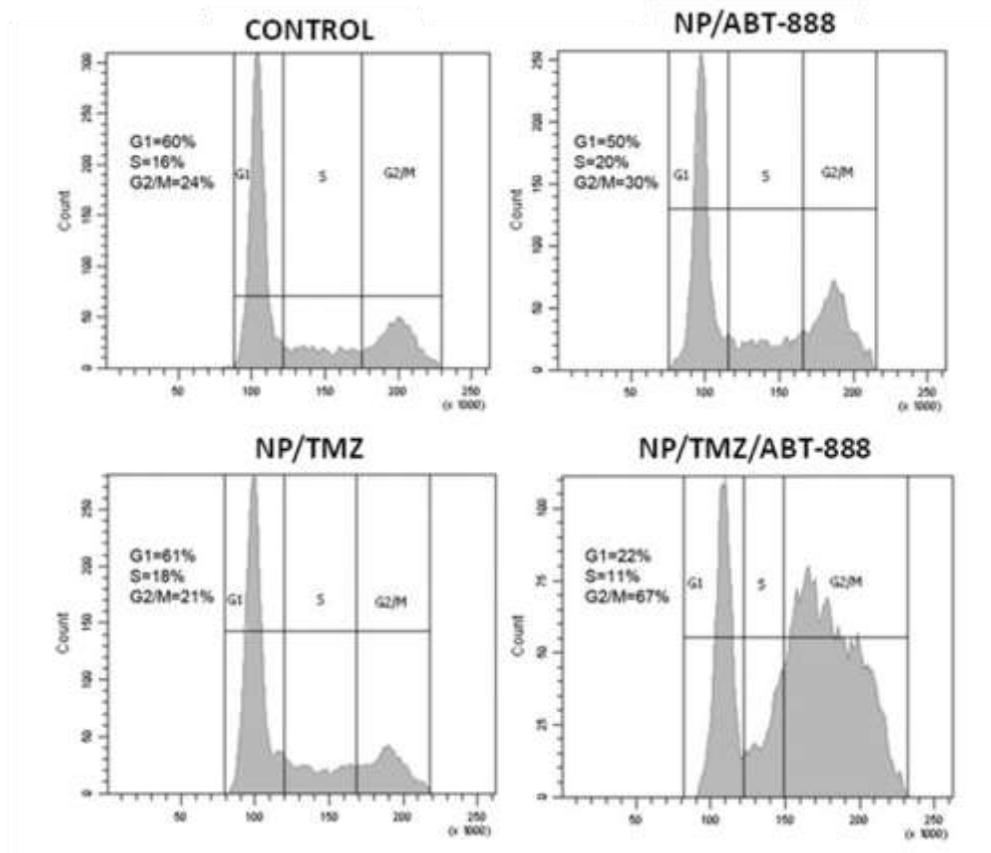


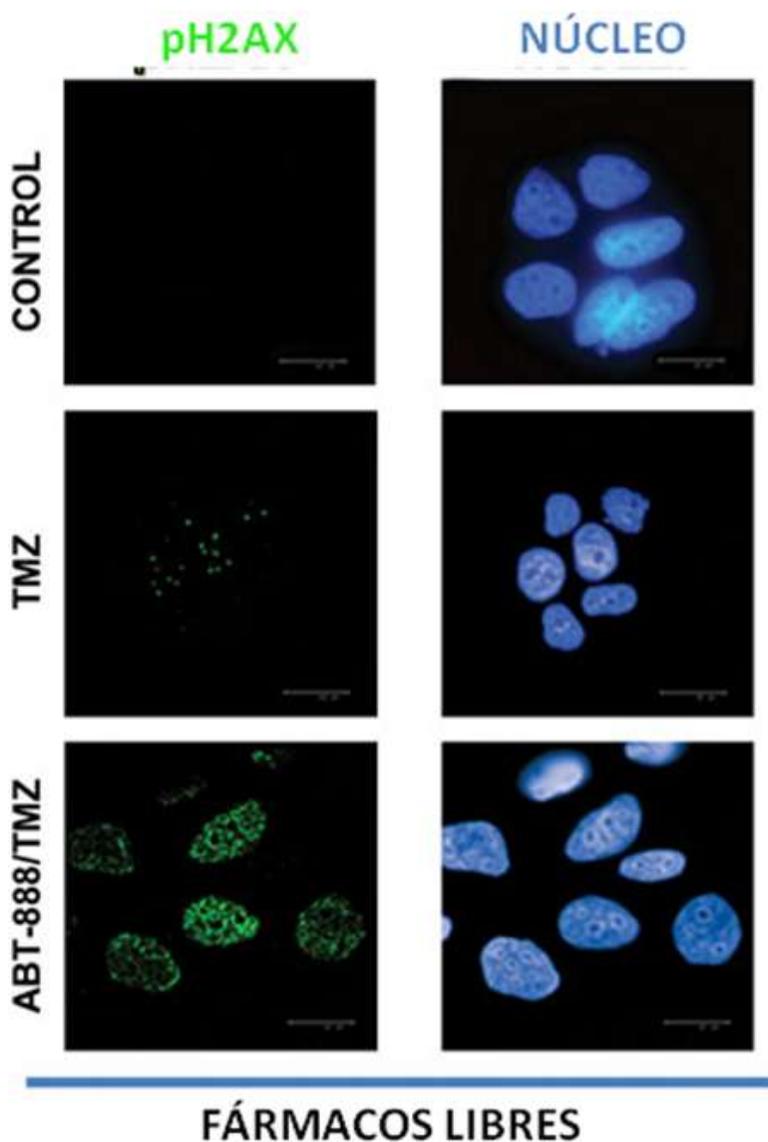
Figura 27. El cotratamiento con ABT-888 y TMZ vehiculizado mediante Nanopartículas induce la detención del ciclo celular en células tumorales hepáticas PLC-PRF-5 tras 24 horas.

Concentración de nanopartículas: 20µg/ml, ABT-888: 30 µM, TMZ: 100 µM.

ABT-888, Veliparib; ml, mililitro; TMZ, Temozolomida; µg, microgramo; µM, micromolar

Por otra parte, la **figura 28** muestra que el tratamiento con NP/TMZ/ABT-888 indujo una acumulación de daños en al ADN (demostrado mediante inmunotinción de focis γ H2AX). Además, la acumulación del daño no reparado fue mayor con los fármacos vehiculizados mediante NP que con los fármacos libres (la intensidad de fluorescencia relativa para NP/TMZ/ABT-888

fue de 100 ± 13 en comparación con 29 ± 9 para fármacos libres, $P=0.004$). Complementario a estos resultados, las células expuestas a NP/ABT-888 (sin TMZ) no mostraron daño en el ADN (datos no mostrados).



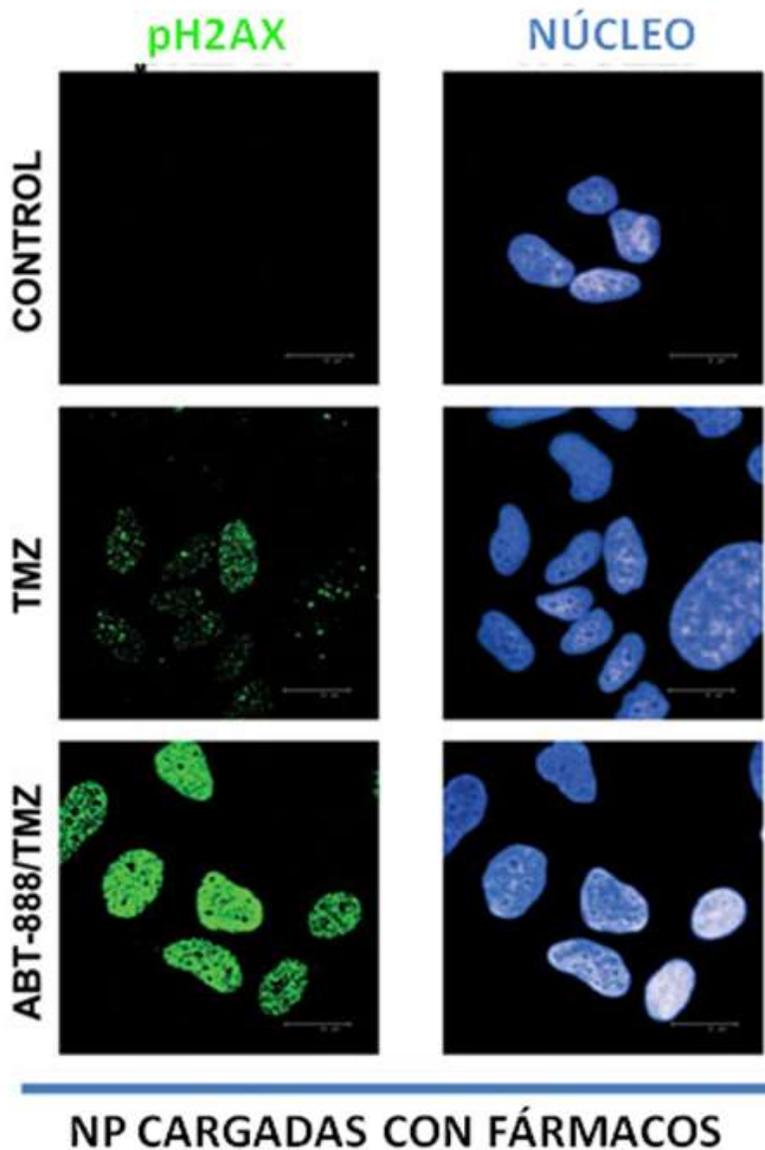


Figura 28. La inhibición de PARP-1 con ABT-888 inhibe la reparación de daño en el ADN

Las células PLC-PRF-5 fueron tratadas durante 12 horas con ABT-888 y TMZ libres y vehiculizadas mediante Nanopartículas. La inmunotinción de focos γ H2AX en verde muestra daño en el ADN celular. El núcleo de estas células fue teñido de azul (DAPI). Las imágenes fueron tomadas mediante MCL.

Concentración ABT-888: 30 μ M, TMZ: 100 μ M.

ABT-888, Veliparib; ml, mililitro; TMZ, Temozolomida; μ M, micromolar

Finalmente, las células PLC-PRF-5 tratadas con NP/TMZ/ABT-888 presentaron niveles incrementados de despolarización mitocondrial (**figura 29**), tinción positiva con Annexin V (característica de apoptosis, **Figura 30**), fragmentación de PARP-1 (la escisión de PARP-1 mediado por caspasa-3 es propio de apoptosis) y activación de caspasa-3 (**figura 31**), en contraste con el tratamiento con partículas NP/TMZ y NP/ABT-888 ($P < 0.05$). Estos hallazgos indican que el mecanismo de muerte celular inducido por NP/TMZ/ABT-888 se produce principalmente por un número incrementado de células sometidas a apoptosis.

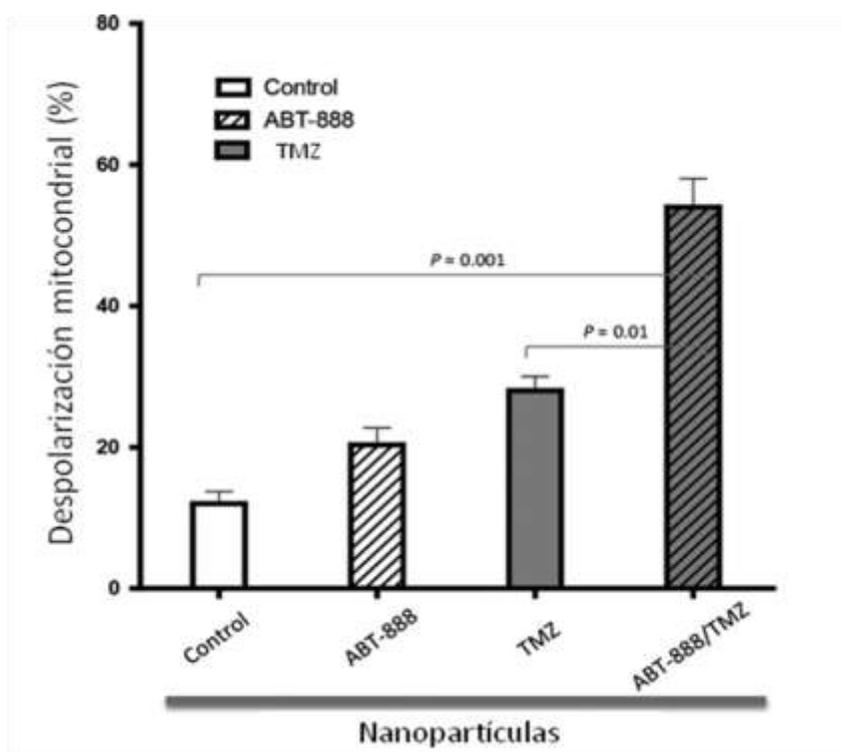


Figura 29. Análisis de despolarización mitocondrial de células tumorales hepáticas PLC-PRF-5 24 horas después del tratamiento con fármacos vehiculizados mediante Nanopartículas

Concentración ABT-888: $30 \mu\text{M}$, TMZ: $100 \mu\text{M}$.

ABT-888, Veliparib; ml, mililitro; TMZ, Temozolomida; μM , micromolar

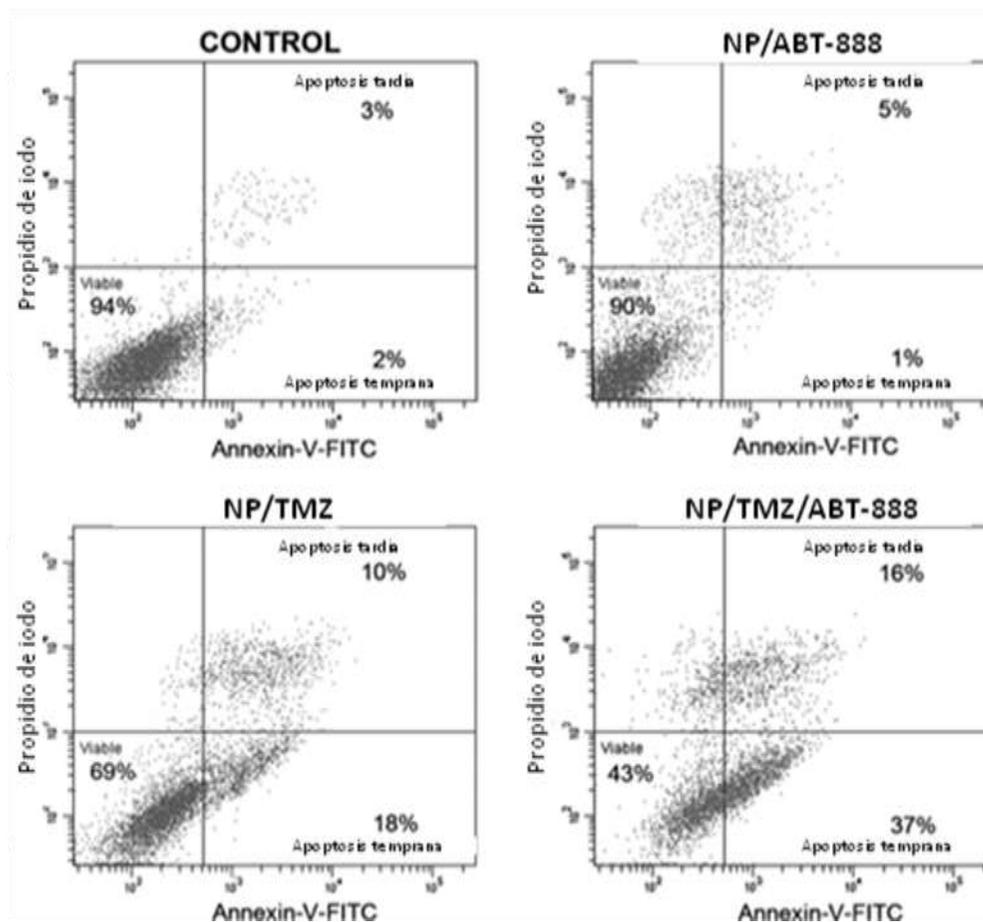


Figura 30. Determinación de la muerte celular apoptótica desencadenada por el tratamiento con Nanopartículas en células tumorales hepáticas PLC-PRF-5

El ensayo con AnnexinV/PI se realizó 48 horas después del tratamiento.

Concentración ABT-888: 30 μ M, TMZ: 100 μ M.

ABT-888, Veliparib; ml, mililitro; TMZ, Temozolomida; μ M, micromolar

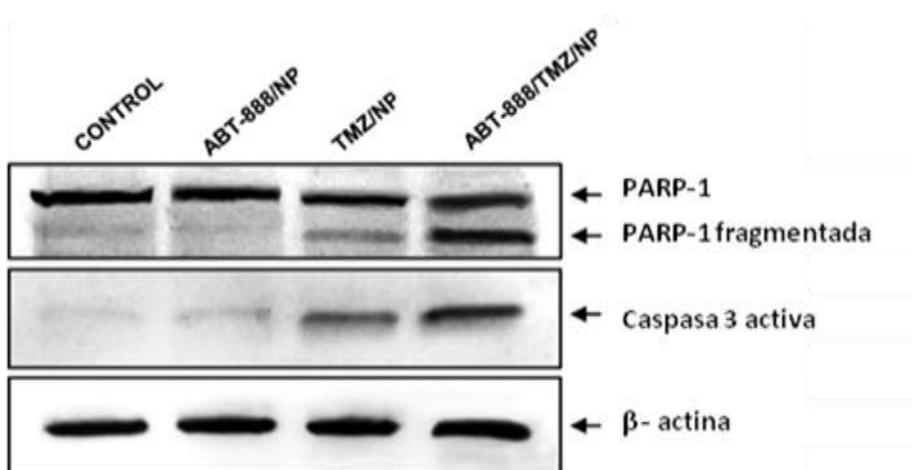


Figura 31. Immunoblotting de fragmentación de PARP-1y activación de Caspasa-3 48 horas tras el tratamiento con Nanopartículas.

Concentración de nanopartículas: 20 μ g/ml, ABT-888: 30 μ M, TMZ: 100 μ M. ABT-888, Veliparib; ml, mililitro; TMZ, Temozolomida; μ g, microgramo; μ M, micromolar

5. LA INHIBICIÓN DE PARP-1 INDUCIDA POR ABT-888 REDUCE LA EXPRESIÓN DE GENES CLAVES INVOLUCRADOS EN LA SUPERVIVENCIA CELULAR

La regulación de la transcripción mediante PARP-1 ha sido ampliamente descrito y esta habilidad de PARP-1 se conoce por estar implicada en en la evolución de distintas enfermedades, incluyendo la carcinogénesis(Aguilar-Quesada et al. 2007). La **tabla 3** muestra que el cotratamiento con TMZ y el inhibidor de PARP (NP/TMA/ABT-888, 8 horas) disminuyen de forma significativa la expresión génica de BCL-xL, FOS y JUND. Estos resultados indican que PARP-1 podría contribuir a la resistencia frente a fármacos genotóxicos, tanto por su capacidad de reparación de ADN, como por las posibilidades de modulación de la transcripción, apoyando el concepto de resistencia de PARP-1 a agentes genotóxicos.

Variable n = 4	Control (a)	ABT-888/NP (b)	TMZ/NP (c)	ABT-888/TMZ/NP	Valor P
BCL-xL	4.44 ± 0.28	2.00 ± 0.13	2.34 ± 0.20	1.00 ± 0.09	<0.05*
FOS	2.51 ± 0.37	1.77 ± 0.23	3.28 ± 0.20	1.00 ± 0.10	<0.05*
JUND	8.97 ± 2.11	4.71 ± 0.40	2.47 ± 0.16	1.00 ± 0.24	<0.05*
MDM2	1.32 ± 0.11	1.40 ± 0.17	1.55 ± 0.31	1.00 ± 0.10	ns

Tabla 3. Efectos de la inhibición de PARP-1 en la expresión génica determinada mediante PCR cuantitativo.

Los datos representan el incremento de expresión del gen en interés con respecto al tratamiento con NP/TMZ/ABT-888 (valor de referencia 1).

** NP/TMZ/ABT-888 en comparación con el control, NP/ABT-888 y NP/TMZ.*

ns, no significativo

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El hepatocarcinoma (CHC) es un tumor con un pobre pronóstico y un tratamiento complicado, en el que las opciones clásicas de tratamiento obtienen tasas de respuesta bajas y presentan efectos adversos graves. Por tanto, es necesario hacer hincapié en una amplia investigación en busca de alternativas. En este contexto, decidimos evaluar la nanotecnología como vehículos transportadores de fármacos, en concreto el inhibidor de PARP-1 conocido como ABT-888 y la Temozolomida como agente inductor de daños en el ADN. Pensamos que esta propuesta puede constituir una aproximación efectiva en el tratamiento del CHC.

La inhibición de PARP-1 ha emergido como un prometedor tratamiento para un amplio rango de enfermedades, incluyendo el infarto, daño isquemia-reperusión, diabetes, shock y otras formas de inflamación (Curtin and Szabo 2013) y ha demostrado mejorar distintas formas de daño hepático (Gero and Szabo 2006, Mota et al. 2008). Además la sobreexpresión de PARP-1 ha sido descrita tanto en CHC como en líneas celulares tumorales hepáticas (Quiles-Perez et al. 2010, Munoz-Gamez et al. 2011). Se están utilizando varios inhibidores de PARP-1 en ensayos clínicos enfocados en el campo de fármacos antitumorales, con el fin de mejorar la citotoxicidad de numerosos agentes que dañan el ADN. ABT-888 (nombre comercial: *Veliparib*) es un fármaco oral que actúa como inhibidor de PARP-1 y puede mejorar la actividad citotóxica de la Temozolomida (TMZ), con resultados prometedores (Megnin-Chanet et al. 2010). TMZ (nombre comercial: *Temodar*, *Temodal* y *Temcad*) es un fármaco oral genotóxico, que daña el ADN, empleado en el tratamiento del glioma de alto grado y en el melanoma metastásico (Jiang et al. 2011). Sin embargo, la terapia combinada de TMZ y ABT-888 ha demostrado ser efectiva en un amplio rango de tipos de tumores (Palma et al. 2009) y actualmente está siendo evaluada en ensayos clínicos para el tratamiento del CHC [Fase 1: NCT00526617 (estudio completado pero sin

resultados comunicados) y fase 2: NCT01205828 (estudio en activo)]. Estos datos indican que la resistencia a TMZ podría superarse mediante la inhibición de PARP-1 y podría ampliarse el uso clínico de TMZ a otros tumores que previamente no hubiesen mostrado respuesta.

No obstante, el tratamiento con TMZ tiene dos serias limitaciones: tiene una corta vida media (menos de 2 horas en plasma humano) e importantes efectos secundarios (Dario and Tomei 2006, Trinh et al. 2009). Recientemente, *Huang et al* ha propuesto el uso de sistemas de nanodispositivos de liberación de TMZ como una interesante propuesta para superar estas limitaciones (Huang et al. 2008, Tian et al. 2011). La nanotecnología es uno de los grandes avances de la ingeniería que ha creado gran expectación en los campos de medicina y salud pública. Una de las aplicaciones más interesantes de la nanotecnología es el uso de nanovehículos para el diagnóstico y tratamiento del cáncer, en particular el CHC. Este concepto supone el diagnóstico por imagen para localizar el tumor maligno, la acumulación selectiva de nanopartículas en el tejido afectado y el tratamiento de estas células de manera selectiva y no invasiva a través de sencillos nanomateriales multifuncionales (Fan et al. 2014). Entre los diferentes tipos de nanopartículas, decidimos usar las nanopartículas magnéticas dada la variedad de posibilidades para su manipulación y su transporte a la localización deseada mediante el uso de campos magnéticos externos. Por otra parte, las nanopartículas magnéticas tienen un gran potencial terapéutico y diagnóstico para la Nanomedicina, dadas sus propiedades especiales. *Shen et al* defiende que los nanotransportadores de magnetita (Fe_3O_4) presentan una toxicidad extremadamente baja y son idóneos para la adquisición de imágenes mediante resonancia magnética, para la liberación de fármacos en el tejido deseado y para la terapia fototérmica en la ablación tumoral *in vivo* (Shen et al. 2013). La funcionalización de la superficie de nanopartículas magnéticas es crucial para su destino biológico. Para este fin, algunos autores han propuesto que los núcleos de hierro y magnetita sean recubiertos por una capa de sílice, un excelente

material biodegradable estabilizador de la superficie de las NPs (Slowing et al. 2008, Rudzka et al. 2013). Este tipo de nanopartículas fueron examinadas en estos estudios anteriormente citados, y los resultados indican que presentan propiedades físico-químicas apropiadas y que permiten la liberación prolongada de los fármacos Doxorubicina y Gentamicina. Por otro lado, este recubrimiento con sílice facilita la incorporación simultánea de ABT-888 y TMZ debido a las interacciones electrostáticas que pueden presentar con estos fármacos.

Nuestros resultados demuestran que las Nanopartículas estudiadas en este trabajo presentan las características físico-químicas adecuadas, que son capaces de incorporar simultáneamente ambos fármacos, entrar en las células y liberar de forma prolongada ambos fármacos. Además, el inhibidor ABT-888 potencia la muerte celular desencadenada por TMZ en células tumorales hepáticas (comparando NP/TMZ/ABT-888 con NP/TMZ), y por tanto que NP/TMZ/ABT-888 es más efectiva que NP/TMZ, confirmando así su potencial clínico y el papel directo de PARP-1 en la resistencia de fármacos del CHC. Se ha descrito que TMZ puede inducir necrosis, apoptosis y autofagia (diferentes tipos de muerte celular) en función del tipo celular y la dosis de TMZ (Knizhnik et al. 2013). Por esta razón, decidimos evaluar el mecanismo por el cual la combinación de TMZ y ABT-888 vehiculizadas mediante NP induce muerte celular en nuestros modelos tumorales de hígado. Nuestros datos indican que NP/TMZ/ABT-888 induce una acumulación de daños sin reparar en el ADN, detención del ciclo celular en fase G2/M, despolarización mitocondrial, fragmentación de PARP-1 (fragmentos de 85KDa asociados a muerte celular apoptótica), activación de Caspasa-3 y un aumento de células positivas con tinción *annexina V*. Todas estas características son propias de muerte celular por apoptosis. Además, la inhibición de PARP-1 en líneas celulares de CHC tratadas con NP/TMZ/ABT-888 modula la expresión de la supervivencia de genes tales como BCL-xL, FOS y JUND. Estos hallazgos son consistentes con nuestros datos previamente publicados y con el estudio de Stilmann, en el cual la inhibición

enzimática de la actividad polimerasa y/o el silenciamiento genético de PARP-1 disminuye la expresión de genes anti-apoptóticos, incluyendo BCL-xL en células tratadas con irradiación, etopóxido o doxorubicina (Stilmann et al. 2009, Munoz-Gamez et al. 2011). Además nuestro grupo de investigación ha demostrado que el tratamiento en monoterapia con inhibidores de PARP-1, modula la expresión de genes relacionados con la supervivencia, angiogénesis y proliferación celular, tanto en modelos *in vitro* (cultivos celulares) como *in vivo* (modelos animales murinos)(Quiles-Perez et al. 2010).

Otro punto interesante es que el uso de este sistema de liberación de fármacos incrementa el efecto citotóxico de TMZ y ABT-888, en comparación con el uso de estos fármacos libres (no vehiculizados mediante nanopartículas). Por otra parte, el tratamiento con NP tuvo como consecuencia los siguientes eventos: 1) el uso de NPs cargadas con TMZ produjo un incremento en la formación de PAR [Poli (ADP-ribosa)], 2) tras tratamiento con NP/TMZ/ABT-888, se observó un incremento en la inhibición de PARP-1, 3) en la parada del ciclo celular en fase G2/M, y 4) en la rotura de cadenas de ADN en comparación con el efecto de los fármacos libres. Todos estos datos apuntan que este nanotransportador de fármacos puede incrementar la concentración intracelular de los fármacos utilizados, mejorando así el efecto citotóxico de los mismos y por tanto su eficiencia terapéutica (Figura 32).

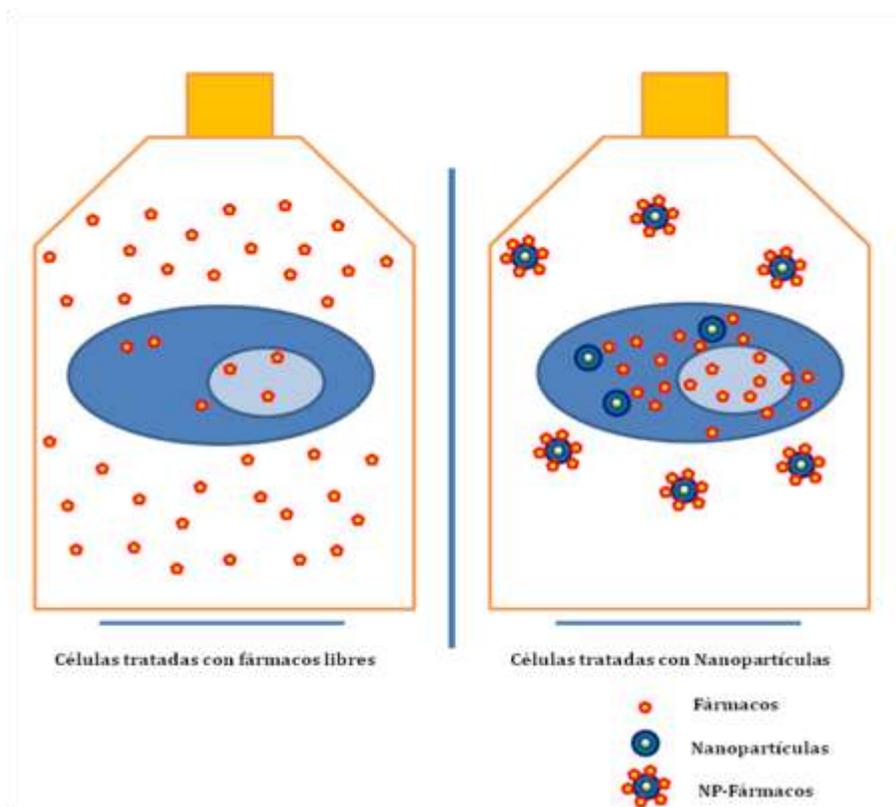


Figura 32. Modelo esquemático del mecanismo de actuación de las Nanopartículas

Esta hipótesis se correlaciona con datos publicados previamente, en el que el uso de nanocompuestos recubiertos con varios fármacos antitumorales demostró mejorar el efecto citotóxico de los mismos (Shapira et al. 2011, Rudzka et al. 2013, Viota et al. 2013). También se ha demostrado que nanopartículas lipídicas cargadas con doxorrubicina (SLN-Dox), al penetrar en el citoplasma mediante endocitosis, pueden evitar el mecanismo de resistencia presente en la membrana celular conocido como bombas de eflujo o MDR pumps (*multidrug resistance*), manteniendo una concentración intracelular elevada del fármaco, causando así la muerte por apoptosis de las células tumorales (Kang et al. 2010).

Estas características hacen que las nanopartículas cargadas con fármacos adquieran gran interés para el futuro tratamiento de resistencias tumorales, y podría permitir una reducción de las dosis de TMZ y por tanto de la toxicidad sistémica. Además, nuestras nanopartículas cargadas con fármacos podrían ser una nueva y prometedora propuesta para el tratamiento del carcinoma hepatocelular en pacientes con cirrosis hepática (CH, entre el 80-90% de los hepatocarcinomas se presentan sobre hígados cirróticos) dado que la quimioterapia convencional empeora la disfunción hepática asociada a la CH.

Por consiguiente, nuestro nuevo modelo, basado en nanosistemas magnéticos cargados con fármacos, podría representar una estrategia interesante para disminuir los efectos adversos sistémicos y en concreto los hepáticos en pacientes cirróticos, al reducir las dosis de los fármacos y, especialmente, al conseguir un transporte efectivo del fármaco hacia la localización selectiva del tumor, bajo el uso de campos magnéticos externos.

En conclusión, los datos presentados indican que nuestras nanopartículas cargadas con fármacos constituyen una nueva y prometedora propuesta terapéutica. En consecuencia el uso de inhibidores de PARP-1, TMZ y nanotecnología podría constituir una nueva terapia efectiva contra el CHC.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Los fármacos TMZ y ABT888 pueden ser vehiculizados de forma simultánea usando el diseño de nanopartículas empleado.
- Los nanotransportadores son capaces de llegar al interior de las células tumorales y liberar ambos fármacos.
- Este hecho incrementa el efecto citotóxico inducido por los fármacos en comparación con el efecto que producirían si no fuesen vehiculizados.
- Combinando la vehiculización de fármacos con las propiedades magnéticas de los transportadores se demuestra una mejora tanto de la biodisponibilidad como de la selectividad.

ARTÍCULOS Y COMUNICACIONES

ARTÍCULOS Y COMUNICACIONES

Hasta la fecha, derivados de este proyecto de investigación han sido presentados los siguientes artículos y comunicaciones:

➤ ARTÍCULOS

- Muñoz Gámez JA, López Viota J, **Barrientos A**, Carazo A, Sanjuán Nuñez L, Quiles Perez R, Muñoz Rueda P, Delgado A, Ruiz Extremera A, Salmeron J. Synergistic cytotoxicity of the Poly (ADP-Ribose) inhibitor ABT-888 and Temozolomide in dual-drug targeted Magnetic Nanoparticles. Aceptado y próxima publicación por Liver International.

➤ COMUNICACIONES

- Viota JL, Muñoz-Gámez JA, Carazo A, **Barrientos A**, Rudzka K, Delgado AV, SanJuan L, León J, Casado J, Jiménez S, Ruiz-Extremera A, Salmerón J. Functionalized magnetic nanoparticles as vehicles for the delivery of the antitumor drug gemcitabine to liver tumor cells: physicochemical in vitro evaluation. VI Jornadas Científicas CIBERehd. Barcelona. Octubre 2012. *Comunicación poster.*

- Viota JL, Muñoz-Gómez JA, Carazo A, **Barrientos A**, Rudzka K, Delgado AV, SanJuan L, León J, Casado J, Jiménez S, Ruiz-Extremera A, Salmerón J. Functionalized magnetic nanoparticles as vehicles for the delivery of the antitumor drug gemcitabine to liver tumor cells. physicochemical in vitro evaluation. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Boston, Massachusetts, EEUU. 9-13 de Noviembre 2012. *Comunicación poster*.
- Muñoz-Gamez JA, Lopez Viota J, Carazo A, Sanjuan-Nuñez L, **Barrientos A**, Jimenez Ruiz S, Leon J, Casado J, Ruiz-Extremera A, Salmeron J. La inhibición de la Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa-1 mediante nanopartículas poliméricas funcionalizadas con ABT888 potencia la citotoxicidad de Temozolomida en líneas celulares de hepatocarcinoma. XXXVIII Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). Madrid. 20-22 Febrero 2013. *Comunicación poster*.
- Munoz-Gamez JA, Lopez Viota J, Carazo A, Quiles Perez R, Sanjuan-Nuñez L, **Barrientos A**, Jimenez Ruiz S, Leon J, Casado J, Muñoz-de-Rueda P, Pavon Castellero EJ, Ruiz-Extremera A, Salmeron J. Synergistic cytotoxicity of Temozolomide and ABT-888 in dual-drug targeted polymeric nanoparticles. 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). Amsterdam, Holanda. 24-28 Abril 2013. *Comunicación poster*.

- Muñoz-Gamez JA, Sanjuan L, Quiles R, **Barrientos A**, Lopez Viota J, León J, Carazo A, Casado J, PavónCastillero E, Martín A, Ruiz-Extremera A, Salmeron J. Synergistic cytotoxicity of Temozolomide and ABT-888 in dual-drug targeted polymeric nanoparticles. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Washington DC, EEUU. 1-5 Noviembre 2013. *Comunicación poster*.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Aguilar-Quesada R, Munoz-Gamez JA, Martin-Oliva D, Peralta-Leal A, Quiles-Perez R, Rodriguez-Vargas JM, et al. Modulation of transcription by PARP-1: consequences in carcinogenesis and inflammation. *Curr Med Chem*. 2007; 14(11): 1179-1187.

Alazawi W, Cunningham M, Dearden J, Foster GR. Systematic review: outcome of compensated cirrhosis due to chronic hepatitis C infection. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010; 32(3): 344-355.

Ame JC, Spenlehauer C, de Murcia G. The PARP superfamily. *Bioessays*. 2004; 26(8): 882-893.

Amstad E, Gillich T, Bilecka I, Textor M, Reimhult E. Ultrastable iron oxide nanoparticle colloidal suspensions using dispersants with catechol-derived anchor groups. *Nano Lett*. 2009; 9(12): 4042-4048.

Arii S, Tanaka S, Mitsunori Y, Nakamura N, Kudo A, Noguchi N, Irie T. Surgical strategies for hepatocellular carcinoma with special reference to anatomical hepatic resection and intraoperative contrast-enhanced ultrasonography. *Oncology*. 2010; 78: 125-130.

Arruebo M, Fernandez-Pacheco R, Ibarra RM, et al. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today*. 2007; 2: 22-32.

Berry CC. Progress in functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J Physics D. Applied Physics*. 2009; 42: 224.

Bolondi L. Screening for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *J Hepatol*. 2003; 39(6): 1076-1084.

Bosetti C, Levi F, Boffetta P, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Trends in mortality from hepatocellular carcinoma in Europe, 1980-2004. *Hepatology*. 2008; 48(1): 137-145.

Bravi F, Bosetti C, Tavani A, Gallus S, La Vecchia C. Coffee reduces risk for hepatocellular carcinoma: an updated meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013; 11(11): 1413-1421.

Brenner DJ, Hall EJ. Computed tomography an increasing source of radiation exposure. *N Engl J Med*. 2007; 357(22): 2277-2284.

Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*. 1991; 350(6317): 429-431.

Bruix J, Sherman M. American Association for the Study of Liver. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*. 2011; 53(3): 1020-1022.

Brunello F, Veltri A, Carucci P, Pagano E, Ciccone G, Moretto P, et al. Radiofrequency ablation versus ethanol injection for early hepatocellular carcinoma: A randomized controlled trial. *Scand J Gastroenterol*. 2008; 43(6): 727-735.

Budhu A, Wang XW. The role of cytokines in hepatocellular carcinoma. *J Leukoc Biol*. 2006; 80(6): 1197-1213.

Calabrese CR, Almassy R, Barton S, Batey MA, Calvert AH, Canan-Koch S, et al. Anticancer chemosensitization and radiosensitization by the novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor AG14361. *J Natl Cancer Inst*. 2004; 96(1): 56-67.

Colombo M, Carregal-Romero S, Casula MF, Gutierrez L, Morales MP, Bohm IB, et al. Biological applications of magnetic nanoparticles. *Chem Soc Rev*. 2012; 41(11): 4306-4334.

Curtin NJ, Szabo C. Therapeutic applications of PARP inhibitors: anticancer therapy and beyond. *Mol Aspects Med*. 2013; 34(6): 1217-1256.

Chalmers A, Johnston P, Woodcock M, Joiner M, Marples B. PARP-1, PARP-2, and the cellular response to low doses of ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004; 58(2): 410-419.

Chambon P, Weill JD, Mandel P. Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem Biophys Res Commun*. 1963; 11: 39-43.

Chang MH, You SL, Chen CJ, Liu CJ, Lee CM, Lin SM, et al. Taiwan Hepatoma Study. Decreased incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B vaccinees: a 20-year follow-up study. *J Natl Cancer Inst*. 2009; 101(19): 1348-1355.

Chen CJ, Wang LY, Lu SN, Wu MH, You SL, Zhang YJ, et al. Elevated aflatoxin exposure and increased risk of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1996; 24(1): 38-42.

Chen C J, Yang H I, Su J, Jen C L, You S L, Lu S N, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA*. 2006; 295(1): 65-73.

Chen HP, Shieh JJ, Chang CC, Chen TT, Lin JT, Wu MS, et al. Metformin decreases hepatocellular carcinoma risk in a dose-dependent manner: population-based and in vitro studies. *Gut*. 2013; 62(4): 606-615.

Chen JD, Yang HI, Iloeje UH, You SL, Lu SN, Wang LY, et al. Carriers of inactive hepatitis B virus are still at risk for hepatocellular carcinoma and liver-related death. *Gastroenterology*. 2010; 138(5): 1747-1754.

Chouly C, Pouliquen D, Lucet I, Jeune JJ, Jallet P. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *J Microencapsul*. 1996; 13(3): 245-255.

D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J Hepatol*. 2006; 44(1): 217-231.

D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J*. 1999; 342: 249-268.

Daniel RA, Rozanska AL, Mulligan EA, Drew Y, Thomas HD, Castelbuono DJ, et al. Central nervous system penetration and enhancement of temozolomide activity in childhood medulloblastoma models by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor AG-014699. *Br J Cancer*. 2010; 103(10): 1588-1596.

Dario A, Tomei G. The safety of the temozolomide in patients with malignant glioma. *Curr Drug Saf*. 2006; 1(2): 205-222.

Davidovic L, Vodenicharov M, Affar EB, Poirier GG. Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism. *Exp Cell Res*. 2001; 268(1): 7-13.

de Lope CR, Tremosini S, Forner A, Reig M, Bruix J. Management of HCC. *J Hepatol*. 2012; 56 (1): S75-87.

de Murcia G, Schreiber V, Molinete M, Saulier B, Poch O, Masson M, et al. Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol Cell Biochem*. 1994; 138(1-2): 15-24.

DePalma R, Peeters S, Bael MJV, Rul HVd, Bonroy K, Laureyn W, et al. Silane ligand exchange to make hydrophobic superparamagnetic nanoparticles water-dispersible. *Chemistry of Materials*. 2007; 19: 1821.

Dubertret B, Skourides P, Norris DJ, Noireaux V, Brivanlou AH, Libchaber A. In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science*. 2002; 298(5599): 1759-1762.

Fan Z, Fu PP, Yu H, Ray PC. Theranostic nanomedicine for cancer detection and treatment. *J Food Drug Anal*. 2014; 22(1): 3-17.

Farazi PA, DePinho RA. The genetic and environmental basis of hepatocellular carcinoma. *Discov Med*. 2006; 6(35): 182-186.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010; 127(12): 2893-2917.

Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5(3): 161-171.

Forner A, Ayuso C, Real MI, Sastre J, Robles R, Sangro B, et al. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Med Clin*. 2009; 132(7): 272-287.

Forner A, Vilana R, Ayuso C, Bianchi L, Sole M, Ayuso JR, et al. Diagnosis of hepatic nodules 20 mm or smaller in cirrhosis: Prospective validation of the noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008; 47(1): 97-104.

Germani G, Pleguezuelo M, Gurusamy K, Meyer T, Isgro G, Burroughs AK. Clinical outcomes of radiofrequency ablation, percutaneous alcohol and acetic acid injection for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J Hepatol*. 2010; 52(3): 380-388.

Gero D, Szabo C. Role of the peroxynitrite-poly (ADP-ribose) polymerase pathway in the pathogenesis of liver injury. *Curr Pharm Des*. 2006; 12(23): 2903-2910.

Griffin RJ, Curtin NJ, Newell DR, Golding BT, Durkacz BW, Calvert AH. The role of inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase as resistance-modifying agents in cancer therapy. *Biochimie*. 1995; 77(6): 408-422.

Hao R, Xing R, Xu Z, Hou Y, Gao S, Sun S. Synthesis, functionalization, and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles. *Adv Mater*. 2010; 22(25): 2729-2742.

Hassa PO, Hottiger MO. A role of poly (ADP-ribose) polymerase in NF-kappaB transcriptional activation. *Biol Chem*. 1999; 380(7-8): 953-959.

Huang G, Zhang N, Bi X, Dou M. Solid lipid nanoparticles of temozolomide: potential reduction of cardiac and nephric toxicity. *Int J Pharm*. 2008; 355(1-2): 314-320.

Huber DL. Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small*. 2005; 1(5): 482-501.

Imamura H, Matsuyama Y, Tanaka E, Ohkubo T, Hasegawa K, Miyagawa S, et al. Risk factors contributing to early and late phase intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *J Hepatol*. 2003; 38(2): 200-207.

Isakoff SJ, Overmoyer B, Tung NM, et al. A phase II trial of the PARP inhibitor veliparib (ABT888) and temozolomide for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010; 28 (15): 1019.

Jabir N, Tabrez S, Ashraf G, et al. Nanotechnology-based approaches in anticancer research. *Int J Nanomedicine*. 2012; 7: 4391-4408.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. *Cancer J Clin*. 2008; 58(2): 71-96.

Jiang G, Wei ZP, Pei DS, Xin Y, Liu YQ, Zheng JN. A novel approach to overcome temozolomide resistance in glioma and melanoma: Inactivation of MGMT by gene therapy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 406(3): 311-314.

Kang KW, Chun MK, Kim O, Subedi RK, Ahn SG, Yoon JH. Doxorubicin-loaded solid lipid nanoparticles to overcome multidrug resistance in cancer therapy. *Nanomedicine*. 2010; 6(2): 210-213.

Kawaichi M, Ueda K, Hayaishi O. Multiple autopoly(ADP-ribosyl)ation of rat liver poly(ADP-ribose) synthetase. Mode of modification and properties of automodified synthetase. *J Biol Chem*. 1981; 256(18): 9483-9489.

Knizhnik AV, Roos WP, Nikolova T, Quiros S, Tomaszowski KH, Christmann M, et al. Survival and death strategies in glioma cells: autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage. *PLoS One*. 2013; 8(1): 55665.

Kojiro M, Roskams T. Early hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules. *Semin Liver Dis*. 2005; 25(2): 133-142.

Kraus WL, Lis JT. PARP goes transcription. *Cell*. 2003; 113(6): 677-683.

Krishnakumar R, Kraus WL. The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Mol Cell*. 2010; 39(1): 8-24.

Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L, et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev.* 2008; 108(6): 2064-2110.

Laurent S, Mahmoudi M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: promises for diagnosis and treatment of cancer. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2011; 2(4): 367-390.

Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17(2): 107-115.

Lechuga LM. Nanomedicina: aplicación de la nanotecnología en la salud. *Biocología aplicada a la salud humana.* Barcelona: Edikamed; 2011. p. 98-112.

Leppard JB, Dong Z, Mackey ZB, Tomkinson AE. Physical and functional interaction between DNA ligase IIIalpha and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair. *Mol Cell Biol.* 2003; 23(16): 5919-5927.

Lindahl T, Satoh MS, Poirier GG, Klungland A. Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *Trends Biochem Sci.* 1995; 20(10): 405-411.

Liu J, Erogbogbo F, Yong KT, Ye L, Liu J, Hu R, et al. Assessing clinical prospects of silicon quantum dots: studies in mice and monkeys. *ACS Nano.* 2003; 7(8): 7303-7310.

Livraghi T, Meloni F, Di Stasi M, Rolle E, Solbiati L, Tinelli C, et al. Sustained complete response and complications rates after radiofrequency ablation of very early hepatocellular carcinoma in cirrhosis: Is resection still the treatment of choice?. *Hepatology.* 2008; 47(1): 82-89.

Lok AS, Seeff LB, Morgan TR, di Bisceglie AM, Sterling RK, Curto TM, et al. H.-C. T. Group. Incidence of hepatocellular carcinoma and associated risk factors in hepatitis C-related advanced liver disease. *Gastroenterology.* 2009; 136(1): 138-148.

Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, et al. S. I. S. Group. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 2008; 359(4): 378-390.

Llovet JM, Schwartz M, Mazzaferro V. Resection and liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis.* 2005; 25(2): 181-200.

Megnin-Chanet F, Bollet MA, Hall J. Targeting poly(ADP-ribose) polymerase activity for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci.* 2010; 67(21): 3649-3662.

Middleton M, Friedlander P, Hamid O, Daud A, Plummer R, Schuster R, et al. Efficacy of Veliparib (ABT-888) Plus Temozolomide Versus Temozolomide Alone: a Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Trial in Patients with Metastatic Melanoma. *Eur J Cancer*. 2011; 47(2): 8.

Mota, R. A., D. Hernandez-Espinosa, L. Galbis-Martinez, A. Ordonez, A. Minano, P. Parrilla, V. Vicente, J. Corral and J. Yelamos (2008). "Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibition increases expression of heat shock proteins and attenuates heat stroke-induced liver injury." *Crit Care Med* 36(2): 526-534.

Munoz-Gamez JA, Quiles-Perez R, Ruiz-Extremera A, Martin-Alvarez AB, Sanjuan-Nunez L, Carazo A, et al. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase-1 enhances doxorubicin activity against liver cancer cells. *Cancer Lett*. 2011; 301(1): 47-56.

Neuberger T, Schöpf B, Hofmann H, Hoffman M, von Rechenberg B. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *J Magn Magn Mater*. 2005; 293: 483-496.

Newlands ES, Stevens MF, Wedge SR, Wheelhouse RT, Brock C. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treat Rev*. 1997; 23(1): 35-61.

Nkontchou G, Aout M, Mahmoudi A, Roulot D, Bourcier V, Grando-Lemaire V, et al. Effect of long-term propranolol treatment on hepatocellular carcinoma incidence in patients with HCV-associated cirrhosis. *Cancer Prev Res*. 2012; 5(8): 1007-1014.

Orlando A, Leandro G, Olivo M, Andriulli A, Cottone M. Radiofrequency thermal ablation vs. percutaneous ethanol injection for small hepatocellular carcinoma in cirrhosis: meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Gastroenterol*. 2009; 104(2): 514-524.

Palma JP, Wang YC, Rodriguez LE, Montgomery D, Ellis PA, Bukofzer G, et al. ABT-888 confers broad in vivo activity in combination with temozolomide in diverse tumors. *Clin Cancer Res*. 2009; 15(23): 7277-7290.

Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J Phys D Appl Phys*. 2003; 36: 167-181.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005; 55(2): 74-108.

Peng S, Wang C, Xie J, Sun S. Synthesis and stabilization of monodisperse Fe nanoparticles. *J Am Chem Soc*. 2006; 128: 10676-7.

Pishvaian MJ, Slack R, Witkiewicz A, et al. A phase II study of the PARP inhibitor ABT-888 plus temozolomide in patients with heavily pretreated, metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2011; 29 (3502).

Quiles-Perez R, Munoz-Gamez JA, Ruiz-Extremuera A, O'Valle F, Sanjuan-Nunez L, Martin-Alvarez AB, et al. Inhibition of poly adenosine diphosphate-ribose polymerase decreases hepatocellular carcinoma growth by modulation of tumor-related gene expression. *Hepatology.* 2010; 51(1): 255-266.

Rahman M, Ahmad MZ, Kazmi I, Akhter S, Afzal M, Gupta G, et al. Emergence of nanomedicine as cancer targeted magic bullets: recent development and need to address the toxicity apprehension. *Curr Drug Discov Technol.* 2012; 9(4): 319-329.

Reddy LH, Arias JL, Nicolas J, Couvreur P. Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chem Rev.* 2012; 112(11): 5818-5878.

Roca AG, Marco JF, Morales MP, Serna CJ. Effect of nature and particle size on properties of uniform magnetite and maghemite nanoparticles. *J Phys Chem.* 2007; 111: 18577-18584.

Roca AG, Veintemillas-Verdaguer S, Port M, Robic C, Serna CJ, Morales MP. Effect of nanoparticle and aggregate size on the relaxometric properties of MR contrast agents based on high quality magnetite nanoparticles. *J Phys Chem.* 2009; 113(19): 7033-7039.

Rosen JE, Chan L, Shieh DB, Gu FX. Iron oxide nanoparticles for targeted cancer imaging and diagnostics. *Nanomedicine.* 2012; 8(3): 275-290.

Rudzka K, Delgado AV, Viota JL. Maghemite Functionalization for Antitumor Drug Vehiculization. *Mol Pharm.* 2012; 9 (7): 2017-2028.

Rudzka K, Viota JL, Munoz-Gamez JA, Carazo A, Ruiz-Extremuera A, Delgado AV. Nanoengineering of doxorubicin delivery systems with functionalized maghemite nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013; 111: 88-96.

Sangro B. Survival benefit with intraarterial techniques in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Hepatol.* 2014; 37 (2): 95-101.

Shall S, de Murcia G. Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model?. *Mutat Res.* 2000; 460(1): 1-15.

Shapira A, Livney YD, Broxterman HJ, Assaraf YG. Nanomedicine for targeted cancer therapy: towards the overcoming of drug resistance. *Drug Resist Updat*. 2011; 14(3): 150-163.

Shen S, Kong F, Guo X, Wu L, Shen H, Xie M, et al. CMCTS stabilized Fe₃O₄ particles with extremely low toxicity as highly efficient near-infrared photothermal agents for in vivo tumor ablation. *Nanoscale*. 2013; 5(17): 8056-8066.

Shen YC, Hsu C, Cheng CC, Hu FC, Cheng AL. A critical evaluation of the preventive effect of antiviral therapy on the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C or B: a novel approach by using meta-regression. *Oncology*. 2012; 82(5): 275-289.

Sherman M. Alpha-fetoprotein: an obituary. *J Hepatol*. 2001; 34(4): 603-605.

Shiina S, Tateishi R, Arano T, Uchino K, Enooku K, Nakagawa H, et al. Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: 10-year outcome and prognostic factors. *Am J Gastroenterol*. 2012; 107(4): 569-577.

Shimizu S, Nomura F, Tomonaga T, Sunaga M, Noda M, Ebara M, et al. Expression of poly(ADP-ribose) polymerase in human hepatocellular carcinoma and analysis of biopsy specimens obtained under sonographic guidance. *Oncol Rep*. 2004; 12(4): 821-825.

Shubayev VI, Pisanic TR, Jin S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009; 61(6): 467-477.

Simbulan-Rosenthal CM, Ly DH, Rosenthal DH, Konopka G, Luo R, Wang ZQ, et al. Misregulation of gene expression in primary fibroblasts lacking poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc Natl Acad Sci*. 2000; 97(21): 11274-11279.

Slowing, II, J. L. Vivero-Escoto, C. W. Wu and V. S. Lin (2008). "Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers." *Adv Drug Deliv Rev* 60(11): 1278-1288.

Stilmann M, Hinz M, Arslan SC, Zimmer A, Schreiber V, Scheidereit C. A nuclear poly(ADP-ribose)-dependent signalosome confers DNA damage-induced I κ B kinase activation. *Mol Cell*. 2009; 36(3): 365-378.

Sugano S, Miyoshi K, Suzuki T, Kawafune T, Kubota M. Intrahepatic arteriovenous shunting due to hepatocellular carcinoma and cirrhosis, and its change by transcatheter arterial embolization. *Am J Gastroenterol*. 1994; 89(2): 184-188.

Sung JJ, Tsoi KK, Wong VW, Li KC, Chan HL. Meta-analysis: Treatment of hepatitis B infection reduces risk of hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008; 28(9): 1067-1077.

Tentori L, Portarena I, Barbarino M, Balduzzi A, Levati L, Vergati M, et al. Inhibition of telomerase increases resistance of melanoma cells to temozolomide, but not to temozolomide combined with poly (adp-ribose) polymerase inhibitor. *Mol Pharmacol.* 2003; 63(1): 192-202.

Tian XH, Lin XN, Wei F, Feng W, Huang ZC, Wang P, et al. Enhanced brain targeting of temozolomide in polysorbate-80 coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2011; 6: 445-452.

Tong MJ, Blatt LM, Kao JH, Cheng JT, Corey WG. Basal core promoter T1762/A1764 and precore A1896 gene mutations in hepatitis B surface antigen-positive hepatocellular carcinoma: a comparison with chronic carriers. *Liver Int.* 2007; 27(10): 1356-1363.

Toso C, Mentha G, Majno P. Selection of patients with hepatocellular carcinoma before liver transplantation: need to combine alpha-fetoprotein with morphology?. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2010; 9(5): 460-461.

Trinh VA, Patel SP, Hwu WJ. The safety of temozolomide in the treatment of malignancies. *Expert Opin Drug Saf.* 2009; 8(4): 493-499.

Tsukuma HT, Hiyama T, Tanaka S, Nakao M, Yabuuchi T, Kitamura T, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. *N Engl J Med.* 1993; 328(25): 1797-1801.

Velazquez RF, Rodriguez M, Navascues CA, Linares A, Perez R, Sotorrios NG. Prospective analysis of risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis. *Hepatology.* 2003; 37(3): 520-527.

Viota JL, Carazo A, Munoz-Gamez JA, Rudzka K, Gomez-Sotomayor R, Ruiz-Extremera A, et al. Functionalized magnetic nanoparticles as vehicles for the delivery of the antitumor drug gemcitabine to tumor cells. *Physicochemical in vitro evaluation. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013; 33(3): 1183-1192.

Wang R, Billone PS, Mullett WM. Nanomedicine in action: An overview of cancer nanomedicine on the market and in clinical trials. *J Nanomater.* 2013; 2013: 629681.

Whitacre CM, Hashimoto H, Tsai ML, Chatterjee S, Berger SJ, Berger NA. Involvement of NAD-poly(ADP-ribose) metabolism in p53 regulation and its consequences. *Cancer Res.* 1995; 55(17): 3697-3701.

Wust PB, Hildebrandt G, Sreenivasa B, Rau B, Gellermann J, Riess H, et al. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol.* 2002; 3(8): 487-497.

Xie J, Xu C, Kohler N, Hou Y, Sun S. Controlled PEGylation of monodisperse Fe₃O₄ nanoparticles for reduced non-specific uptake by macrophage cells. *Adv Mater.* 2007; 19: 3163-3166.

Yang HI, Lu SN, Liaw YF, You SL, Sun CA, Wang LY, et al. Chen and G. Taiwan Community-Based Cancer Screening Project. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 2002; 347(3): 168-174.

Yu MW, Chen CJ. Hepatitis B and C viruses in the development of hepatocellular carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1994; 17(2): 71-91.

