

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA



TESIS DOCTORAL

**MEJORA DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE  
AGENTES CITOTÓXICOS MEDIANTE EL USO DE  
NANOPLATAFORMAS POLIMÉRICAS: APLICACIÓN EN  
CÁNCER DE COLON, MAMA Y PULMÓN**

Memoria presentada por **Dña. Laura Cabeza Montilla**  
para optar al grado de Doctora por la Universidad de Granada  
Granada, 26 de junio de 2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autora: Laura Cabeza Montilla

ISBN: 978-84-9163-629-8

URI: <http://hdl.handle.net/10481/48614>

La doctoranda, **Laura Cabeza Montilla** y los directores de la tesis, **Consolación Melguizo Alonso, José Carlos Prados Salazar y Raúl Ortiz Quesada**, garantizamos al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda 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.

**GRANADA A 26/06/2017**

Directores de la tesis

Doctoranda

Fdo.: **Consolación Melguizo Alonso**

Fdo.: **Laura Cabeza Montilla**

Fdo.: **José Carlos Prados Salazar**

Fdo.: **Raúl Ortiz Quesada**



**Dra. CONSOLACIÓN MELGUIZO ALONSO,**  
CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA  
HUMANA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

**HACE CONSTAR:**

Que Dña. Laura Cabeza Montilla ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: “MEJORA DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE AGENTES CITOTÓXICOS MEDIANTE EL USO DE NANOPLATAFORMAS POLIMÉRICAS: APLICACIÓN EN CÁNCER DE COLON, MAMA Y PULMÓN”.

Una vez redactada la presente memoria que ha sido revisada por mí y se corresponde fielmente con los resultados obtenidos, la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 26 de junio de 2017.

Fdo: Dra. Dña. Consolación Melguizo Alonso

Catedrática de Universidad



**Dr. JOSÉ CARLOS PRADOS SALAZAR,**

CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA  
HUMANA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

**HACE CONSTAR:**

Que Dña. Laura Cabeza Montilla ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: “MEJORA DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE AGENTES CITOTÓXICOS MEDIANTE EL USO DE NANOPLATAFORMAS POLIMÉRICAS: APLICACIÓN EN CÁNCER DE COLON, MAMA Y PULMÓN”.

Una vez redactada la presente memoria que ha sido revisada por mí y se corresponde fielmente con los resultados obtenidos, la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 26 de junio de 2017.

Fdo: Dr. D. José Carlos Prados Salazar

Catedrático de Universidad





**Dr. RAÚL ORTIZ QUESADA,**

PROFESOR CONTRATADO DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA  
SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE JAÉN.

**HACE CONSTAR:**

Que Dña. Laura Cabeza Montilla ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: "MEJORA DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE AGENTES CITOTÓXICOS MEDIANTE EL USO DE NANOPLATAFORMAS POLIMÉRICAS: APLICACIÓN EN CÁNCER DE COLON, MAMA Y PULMÓN".

Una vez redactada la presente memoria que ha sido revisada por mí y se corresponde fielmente con los resultados obtenidos, la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 26 de junio de 2017.

Fdo: Dr. D. Raúl Ortiz Quesada

Profesor Contratado Doctor



# Índice

---



<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>17</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>19</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>25</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>31</b>
<b>1.1. GENERALIDADES SOBRE EL CÁNCER .....</b>	<b>33</b>
1.1.1. CÁNCER DE PULMÓN .....	36
1.1.1.1. <i>Factores de riesgo</i> .....	36
1.1.1.2. <i>Clasificación del cáncer de pulmón</i> .....	37
1.1.1.3. <i>Tratamiento del cáncer de pulmón</i> .....	40
1.1.2. CÁNCER COLORRECTAL.....	41
1.1.2.1. <i>Factores de riesgo</i> .....	42
1.1.2.2. <i>Clasificación del cáncer colorrectal</i> .....	42
1.1.2.3. <i>Tratamiento del cáncer colorrectal</i> .....	46
1.1.3. CÁNCER DE MAMA.....	47
1.1.3.1. <i>Factores de riesgo</i> .....	47
1.1.3.2. <i>Clasificación del cáncer de mama</i> .....	49
1.1.3.3. <i>Tratamiento del cáncer de mama</i> .....	54
<b>1.2. FÁRMACOS ANTITUMORALES: MECANISMO DE ACCIÓN Y LIMITACIONES.....</b>	<b>56</b>
1.2.1. DOXORRUBICINA.....	56
1.2.2. 5-FLUOROURACILO .....	58
1.2.3. PACLITAXEL .....	60
<b>1.3. NANOMEDICINA DEL CÁNCER .....</b>	<b>63</b>
1.3.1. PROPIEDADES DE LAS NANOFORMULACIONES .....	64
1.3.1.1. <i>Tamaño, forma y superficie</i> .....	64
1.3.1.2. <i>Direccionamiento</i> .....	65
1.3.1.3. <i>Biodegradabilidad</i> .....	71
1.3.1.4. <i>Toxicidad</i> .....	72
1.3.2. NANOFORMULACIONES UTILIZADAS EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER. 74	
1.3.2.1. <i>Tipos de nanoformulaciones</i> .....	74
1.3.2.2. <i>Mecanismo de acción</i> .....	81
1.3.2.3. <i>Comercialización y ensayos clínicos</i> .....	83
1.3.3. NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS TRANSPORTADORAS DE FÁRMACOS .....	87
1.3.3.1. <i>Nanopartículas de poli (butilcianoacrilato)</i> .....	88
1.3.3.2. <i>Nanopartículas de poli (ε-caprolactona)</i> .....	89
1.3.3.3. <i>Nanopartículas de ácido poli (láctico-co-glicólico)</i> .....	91
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>95</b>
<b>3. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS .....</b>	<b>99</b>
<b>3.1. CAPÍTULO 1. VEHICULIZACIÓN DE DOXORRUBICINA.....</b>	<b>101</b>

<b>ARTÍCULO 1</b> .....	<b>101</b>
<b>ARTÍCULO 2</b> .....	<b>139</b>
<b>ARTÍCULO 3</b> .....	<b>169</b>
<b>3.2. CAPÍTULO 2. VEHICULIZACIÓN DE 5-FLUOROURACILO</b> .....	<b>205</b>
<b>ARTÍCULO 4</b> .....	<b>205</b>
<b>3.3. CAPÍTULO 3. VEHICULIZACIÓN DE PACLITAXEL</b> .....	<b>241</b>
3.3.1. INTRODUCCIÓN .....	241
3.3.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	244
3.3.2.1. <i>Fármacos y reactivos</i> .....	244
3.3.2.2. <i>Síntesis de las nanopartículas de PLGA</i> .....	244
3.3.2.3. <i>Métodos de caracterización</i> .....	245
3.3.2.3.1. <i>Condiciones cromatográficas</i> .....	246
3.3.2.3.2. <i>Determinación de la incorporación de fármaco en las nanopartículas</i> ....	246
3.3.2.3.3. <i>Liberación <i>in vitro</i> de PTX de las nanopartículas</i> .....	247
3.3.2.4. <i>Cultivo celular</i> .....	247
3.3.2.5. <i>Ensayo de hemólisis</i> .....	248
3.3.2.6. <i>Ensayos de proliferación celular</i> .....	249
3.3.2.7. <i>Análisis del ciclo celular</i> .....	250
3.3.2.8. <i>Ensayos de internalización celular</i> .....	251
3.3.2.8.1. <i>Citometría de flujo y microscopía de fluorescencia</i> .....	251
3.3.2.8.2. <i>Microscopía confocal</i> .....	251
3.3.2.9. <i>Tratamiento de esferoides tumorales multicelulares</i> .....	252
3.3.3. RESULTADOS .....	253
3.3.3.1. <i>Tamaño de partícula, carga eléctrica de superficie y almacenamiento</i> .....	253
3.3.3.2. <i>Carga de PTX en las nanopartículas de PLGA</i> .....	255
3.3.3.3. <i>Liberación de PTX de las nanopartículas de PLGA</i> .....	255
3.3.3.4. <i>Ensayo de hemólisis</i> .....	256
3.3.3.5. <i>Ensayos de proliferación celular</i> .....	257
3.3.3.6. <i>Análisis del ciclo celular</i> .....	260
3.3.3.7. <i>Ensayos de internalización celular</i> .....	261
3.3.3.8. <i>Tratamiento de esferoides tumorales multicelulares</i> .....	264
<b>4. DISCUSIÓN</b> .....	<b>267</b>
<b>4.1. LAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE PBCA Y PCL MEJORAN EL EFECTO CITOTÓXICO <i>IN VITRO</i> DE LA DOX EN CÁNCER DE PULMÓN Y MAMA</b> .....	<b>271</b>
<b>4.2. LA DOX ASOCIADA A PBCA Y PCL TIENE UN MAYOR EFECTO ANTITUMORAL EN MODELOS <i>IN VIVO</i> DE CÁNCER DE MAMA Y PULMÓN</b> .....	<b>277</b>
<b>4.3. LAS NANOPARTÍCULAS DE PBCA Y PCL MEJORAN EL EFECTO CITOTÓXICO DEL 5-FU EN MODELOS <i>IN VITRO</i> DE CÁNCER DE COLON</b> .....	<b>280</b>

<b>4.4. MEJORA DEL EFECTO ANTITUMORAL <i>IN VITRO</i> DEL PTX MEDIANTE EL USO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE PLGA .....</b>	<b>283</b>
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>289</b>
<b>6. CONCLUSIONS .....</b>	<b>293</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>297</b>
<b>ANEXO 1. PUBLICACIONES .....</b>	<b>357</b>





## Abreviaturas

### 5

5-ALA: Ácido 5-aminolevulínico

5-FU: 5-Fluorouracilo

### A

ABC: ATP binding cassette

ACE: Antígeno carcinoembrionario

AJCC: American Joint Committee on Cancer

### B

BCRP: Proteína de resistencia de cáncer de mama

### C

CCHNP: Cáncer colorrectal hereditario no polipósido

CCK-8: Cell counting kit-8

CDIS: Carcinoma ductal in situ

CLIS: Carcinoma lobulillar in situ

CPCNP: Cáncer de pulmón de células no pequeñas

CPCP: Cáncer de pulmón de células pequeñas

CRP: C-reactive protein

Ct: Citotoxicidad

CTA: Células tumorales aisladas

CV: Coeficiente de variación

### D

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DCM: Dichloromethane

DL: Capacidad de carga

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

DOX: Doxorubicina

DPD: Dihidropirimidina deshidrogenasa

dTMP: Desoxitimidina monofosfato

dUMP: Desoxiuridina monofosfato

### E

ECACC: European Collection of Cell Culture

ED: Estadio diseminado

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EE: Eficiencia de encapsulación

EFG: factor de crecimiento epidérmico

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

EL

EPR: Permeabilidad y retención aumentadas

### F

FBS: Suero bovino fetal

FDA: Food and Drug Administration

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

### G

GALA: Glutamato-alanina-leucina-alanina

### H

HEPA: High efficiency particulate air

HEPES: 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid

HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HPMA: N-(2-hidroxipropil)metacrilamida

HRTEM: High resolution transmission electron microscopy

### I

IC<sub>50</sub>: Concentración inhibitoria al 50%

IMF: Increase in mean fluorescence

IR: Relative inhibition

### L

LOD: Límite de detección

LOQ: Límite de cuantificación

### M

MDR: Resistencia a multidroga

MET: Microscopía electrónica de transmisión

MMP-9: Matrix metalloproteinase

MRP1: Proteína de resistencia a multidroga

## Abreviaturas

MTS: Esferoides tumorales multicelulares  
MTT: 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio

### N

NPs: Nanoparticulas  
NR: Rojo nilo

### O

OD: Optical density

### P

PAF: Poliposis adenomatosa familiar  
PBCA: Poli (butilcianoacrilato)  
PBS: Buffer fosfato salino  
PCL: Poli( $\epsilon$ -caprolactona)  
PCPH: Poli (1,6-bis(p-carboxifenoxi)hexano)  
PCS: Espectroscopía de correlación de fotones  
PdI: Índice de polidispersión  
PEG: Polietilenglicol  
PEI: Polietilenimina  
Pf: Proliferación  
PFA: Paraformaldehyde  
P-GP: P-glicoproteína  
PIHCA: Poly(isohexylcyanoacrylate)  
PLA: Poli(ácido láctico)  
PLGA: Ácido poli(láctico-co-glicólico)  
PLLA: Poli (L-ácido láctico)  
PM: Peso molecular  
PNVP: Poly(N-vinylpyrrolidone)  
PSMA: Antígeno prostático específico de membrana  
PTX: Paclitaxel

### R

RE: Receptor de estrógeno  
RGR: Relative growth rates  
RMN: Resonancia magnética nuclear  
ROS: Especies reactivas del oxígeno  
RP: Receptor de progesterona; Relative proliferation  
RP-HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa

### S

SD: Desviación estándar  
SEM: Microscopía electrónica de barrido  
SPIONs: Superparamagnetic iron oxide nanoparticles  
SPSS: Statistical package for the social sciences  
SRB: Sulforrodamina B  
sVACM-1: Vascular cell adhesion molecule-1

### T

TCA: Ácido tricloroacético  
TGF- $\beta$ 1: Factor de crecimiento transformante beta-1  
Top2: Topoisomerasa 2  
TS: Timidilato sintasa

### U

UV-Vis: Ultraviolet-visible

### Z

ZP: Potencial Z

## Resumen

La **quimioterapia**, una de las herramientas más potentes para el tratamiento del cáncer, se enfrenta desde hace tiempo a una serie de limitaciones difíciles de superar que están evitando progresar en la mejora de la respuesta de los pacientes afectados de esta patología. Si bien es cierto que, usada tras la cirugía y/o radioterapia para erradicar el tumor primario y como tratamiento adyuvante, es capaz de curar una fracción importante de pacientes, su uso como tratamiento de primera opción en muchos tipos de cáncer o en pacientes con metástasis ya desarrolladas no produce una respuesta satisfactoria. Este fracaso terapéutico, no cabe duda, se relaciona con las características específicas de los antineoplásicos usados y puede tener muy diverso origen, habiéndose descrito una rápida eliminación del compartimento intracelular, un insuficiente transporte al interior celular, un metabolismo intracelular acelerado, un incremento de la capacidad de reparación del daño producido al ADN, la activación de vías de señalización de supervivencia de la célula y/o la inhibición de vías de señalización de muerte celular programada (apoptosis), entre otras. El diseño de fármacos que sean capaces de superar estas limitaciones supondrá una mayor efectividad contra los diferentes tipos de cáncer y por ende una mejora significativa del pronóstico de estos pacientes.

Entre los fármacos antitumorales más efectivos, pero también con mayores limitaciones en su uso, se encuentran la doxorubicina (DOX), el 5-fluorouracilo (5-FU) y el paclitaxel (PTX), fármacos de elección y de uso clínico habitual en el cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer pulmón, que representan, según Instituto nacional de Salud de EEUU las tres patologías tumorales más frecuentes en la actualidad (febrero de 2017). Los tres agentes citados poseen una baja especificidad por el tejido tumoral contra el que actúan lo que les lleva a inducir severos daños en los tejidos sanos que se manifiestan como efectos secundarios, muchos de ellos causa del abandono del tratamiento por parte del paciente. Así, la DOX induce una severa cardiotoxicidad mientras que el PTX provoca un intenso dolor neuropático y reacciones de hipersensibilidad, especialmente por los solventes utilizados dada su baja solubilidad. En el caso del 5-FU, su rápida metabolización que disminuye su biodisponibilidad y por tanto reduce su concentración en el tejido tumoral, es causa

de su bajo rendimiento terapéutico. A estos factores, debemos sumar la presencia de tumores considerados “quimiorresistentes” por muy diversos mecanismos, para lo que la quimioterapia no es pues una alternativa terapéutica ya que su uso no aumenta significativamente la supervivencia de los pacientes.

En este contexto, la **nanotecnología** está consiguiendo desarrollar nuevos sistemas de transporte de fármacos antitumorales que evitan sus limitaciones y mejoran su actividad incluyendo su protección frente a una rápida eliminación y/o degradación, un aumento de su vida media en la circulación sanguínea, la mejora de su solubilidad, el aumento de su especificidad antitumoral, la asociación a otros agentes antitumorales o el bloqueo de posibles mecanismos de resistencia. Todas estas ventajas que aparecen tras la encapsulación de los fármacos son posibles debido a las propiedades físico-químicas de las nuevas nanoformulaciones, propiedades que nos permiten modular su tamaño, su carga superficial, su biodegradabilidad y biocompatibilidad e incluso, su afinidad hacia un determinado tipo tumoral (direccionamiento). En el caso de la terapia frente al cáncer, las nanoformulaciones más comúnmente utilizadas para el transporte de fármacos son los liposomas, las nanopartículas (NPs) poliméricas, las NPs magnéticas o las NPs lipídicas sólidas.

El presente trabajo de investigación se centra en el estudio de NPs poliméricas de poli (butilcianoacrilato) (PBCA), poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) y ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), como sistemas transportadores de los fármacos antitumorales DOX, 5-FU y PTX, orientados hacia la mejora del tratamiento del cáncer de mama, pulmón y colon. En concreto, hemos sido capaces de generar tres grupos de NPs que en base al fármaco transportado han sido denominadas DOX-PBCA y DOX-PCL, 5-FU-PBCA y 5-FU-PCL y PTX-PLGA. Estas nuevas nanoformulaciones han sido ensayadas *in vivo* y/o *in vitro* sobre modelos experimentales de cáncer de mama, colon y pulmón pudiendo demostrar una significativa mejora de la actividad antitumoral de dichos nanocompuestos en relación al uso de los agentes libres (no asociados a NPs). Todos los resultados obtenidos se recogen en cuatro publicaciones en revistas internacionales de alto impacto (Anexo 1) y en un quinto manuscrito que se encuentra en fase de revisión.

Las nanoformulaciones utilizadas en el presente estudio han sido desarrolladas mediante métodos de nanoprecipitación, disposición interfacial de polímeros y emulsión/polimerización. La síntesis ha sido llevada a cabo en los Departamentos de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Granada y Sevilla bajo la supervisión del Dr. Jose Luis Arias y la Dra. Lucía Martín, respectivamente. Se obtuvieron NPs de tamaños homogéneos menores de 250 nm, adecuadas para su uso *in vitro* e *in vivo* (administración intravenosa) presentando un perfil de liberación de fármaco bifásico consistente en una primera fase de liberación rápida, seguida de una segunda fase de liberación continuada. Tras su completa caracterización, las NPs con las propiedades físico-químicas más adecuadas y con los mejores perfiles de internalización y liberación de fármaco, fueron seleccionadas para realizar los ensayos en modelos *in vitro* e *in vivo* de cáncer de mama, pulmón y colon.

Los estudios *in vitro* fueron llevados a cabo en cultivos celulares utilizando tanto células de cáncer de mama, pulmón y colon humanas y de ratón, como células no tumorales humanas. Las NPs vacías (sin fármaco) fueron ensayadas en cultivos determinando la modulación de la proliferación celular con objeto de valorar su toxicidad. Los resultados obtenidos demostraron que todas las NPs testadas presentaron una excelente biocompatibilidad a las dosis empleadas, tanto en líneas tumorales como no tumorales. Posteriormente, se analizó el efecto antiproliferativo de nuestras nanoformulaciones (DOX-PBCA y DOX-PCL, 5-FU-PBCA y 5-FU-PCL y PTX-PLGA) en comparación con los fármacos DOX, 5-FU y PTX libres. Nuestros resultados demostraron que, en todos los casos, la asociación del fármaco a la NP provocaba una significativa mejora de su efecto antitumoral. Así, pudimos comprobar una reducción de la concentración inhibitoria 50% (IC<sub>50</sub>) de 21,7 veces para la DOX vehiculizada en NPs de PBCA (DOX-PBCA) en la línea de cáncer de mama de ratón E0771 o de 42 veces en el caso del 5-FU vehiculizado en NPs de PBCA (5-FU-PBCA) en la línea humana de cáncer de colon T84.

Por otra parte, se realizaron estudios para determinar la mejora en la internalización celular de las moléculas transportadas por las NPs. Fluoróforos asociados a dichas NPs (*i.e.* rojo nilo-NR) o las propiedades fluorescentes de

algunos fármacos (*i.e.* DOX) fueron utilizados para determinar la presencia de las nanoformulaciones en el interior celular mediante técnicas de citometría de flujo, microscopía de fluorescencia y confocal. Nuestros resultados demostraron un significativo incremento dosis-dependiente de la internalización de las moléculas transportadas por nuestros nanocomplejos en todos los tipos celulares testados. Así, observamos un significativo incremento de fluorescencia, y por tanto de entrada de las moléculas en células humanas de cáncer de mama (MCF-7), tras la exposición a los nanocomplejos DOX-PBCA (media hora) y NR-PLGA (dos horas) que fue estimado en un 51,9% y 70,1%, respectivamente. Además, los nanocomplejos provocaron cambios en el patrón de localización de las moléculas transportadas, debido posiblemente a su diferente mecanismo de entrada en el interior celular (endocitosis, pinocitosis, fagocitosis) en relación a las moléculas libres (difusión simple).

Los ensayos *in vivo* fueron realizados sobre modelos murinos, utilizando ratones inmunocompetentes de la cepa C57BL/6 inoculados vía subcutánea con células tumorales de las líneas E0771 (cáncer de mama), LL2 (cáncer de pulmón) y MC38 (cáncer de colon), procedentes de la misma cepa de ratón. Tras la generación de los tumores, los ratones fueron sometidos a tratamiento con las nanoformulaciones DOX-PBCA, DOX-PCL, 5-FU-PBCA y 5-FU-PCL, y con el fármaco libre. Los estudios incorporaron tratamientos con NPs vacías (sin fármaco). Los ratones tratados fueron monitorizados en relación a la modificación de su peso, volumen del tumor y supervivencia. Los tratamientos con NPs de DOX-PCL, se acompañaron de estudios de toxicidad tisular producida por el fármaco, incluyendo el análisis de los parámetros sanguíneos y de marcadores de daño cardiovascular. Nuestros resultados demostraron que todos los tratamientos con nanoformulaciones con DOX o 5-FU indujeron reducción significativa del volumen tumoral en comparación con los fármacos libres. Así, en ratones con cáncer de pulmón inducidos y tratados con DOX-PBCA se observó una reducción del volumen tumoral de hasta un 28% más que con el uso de la DOX libre. Esta reducción fue de un 36% en el caso de los modelos de cáncer de mama y pulmón tratados con DOX-PCL. Este incremento en el efecto antitumoral podría estar

relacionado con el direccionamiento pasivo producido por el “efecto de permeabilidad y retención aumentada” (EPR) que favorece la extravasación de macromoléculas hacia los tejidos tumorales debido a la producción de mediadores vasculares, los procesos de angiogénesis y al defectuoso drenaje linfático que acontece en estos tejidos. Además, la mayoría de los tratamientos con nanoformulaciones indujeron un incremento significativo de la supervivencia de los ratones en relación al uso del fármaco libre. Este incremento fue observado con el uso de 5-FU-PBCA, 5-FU-PCL en modelos de cáncer de colon y con DOX-PCL en modelos de cáncer de pulmón. No obstante, no pudimos observar diferencias significativas con el uso de DOX-PCL en modelos de cáncer de mama en comparación con el fármaco libre.

Por último, la monitorización del peso de los ratones, un factor indicativo de la toxicidad del tratamiento, nos permitió demostrar que ninguna de las nanoformulaciones utilizadas asociadas a DOX o 5-FU, indujeron un aumento de la toxicidad en relación al fármaco libre. Por el contrario, las NPs de DOX-PCL fueron capaces de reducir la toxicidad de DOX en relación al uso del fármaco libre. De hecho, los ratones tratados con DOX-PCL no mostraron modificaciones en los niveles de la serie blanca de la sangre (WBC) ni de los marcadores de daño cardiovascular MMP-9 (Matrix metallopeptidase 9), sVACM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) y CRP (C-reactive protein), que sí fueron detectados alterados tras el tratamiento con DOX. Además, el uso de los nanocomplejos no indujo cambios histológicos indicativos de daño cardíaco al contrario que los detectados tras el tratamiento con la DOX libre.

En conclusión, los resultados del presente trabajo de investigación demuestran que las NPs generadas para el transporte de los fármacos DOX, 5-FU y PTX son altamente biocompatibles y que el uso de los nanocomplejos generados DOX-PBCA y DOX-PCL, 5-FU-PBCA y 5-FU-PCL y PTX-PLGA producen una significativa mejora de su efecto antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo* tanto en cáncer de mama, de pulmón como cáncer de colon, en relación al uso de los fármacos libres. Además, algunas nanoformulaciones, como es el caso de DOX-PCL, son capaces de reducir la toxicidad sistémica del fármaco. A diferencia de otras

## *Resumen*

nanoformulaciones (vesículas lipídicas o liposomas) con poca efectividad para penetrar en los tejidos tumorales, nuestros nanocomplejos han mostrado ser vehículos eficientes de los fármacos antitumorales, pudiendo ser una herramienta muy útil para salvar las actuales limitaciones del tratamiento quimioterápico en cáncer de mama, pulmón y colon, y mejorar el pronóstico de los pacientes afectados de estas patologías.



## Summary

**Chemotherapy**, one of the most powerful tools for the treatment of cancer, has certain limitations difficult to overcome that limiting the improvement of the response of patients affected by this pathology. If it is used after surgery and/or radiotherapy to eradicate the primary tumor and as an adjuvant treatment, it may cure a significant fraction of patients, but if is used as a first-line treatment in many types of cancer or in patients with metastasis does not produce a satisfactory response. This therapeutic failure, is related to the specific characteristics of the antineoplastic agents used and may have diverse origins, for example: a rapid elimination of the intracellular compartment, an insufficient cell uptake, an accelerated intracellular metabolism, an increase of the ability to repair DNA damage, the activation of cell survival signaling pathways and/or inhibition of the signaling pathways for programmed cell death (apoptosis), among others. The design of drugs that are able to overcome these limitations will lead a greater effectiveness against different types of cancer and therefore a significant improvement in the prognosis of these patients.

The most effective antitumor drugs, but also with greater limitations, are doxorubicin (DOX), 5-fluorouracil (5-FU) and paclitaxel (PTX). These are drugs of choice and usual in clinical use in the breast, colon and lung cancer treatment. According to the National Institute of Health of the USA, they are the three most common tumor pathologies currently (February 2017). The three drugs mentioned have a low specificity for the tumor, so they induce severe damages in healthy tissues that are manifested as side effects, which in many cases causes the patient to leave the treatment. Thus, DOX induces severe cardiotoxicity, while PTX causes intense neuropathic pain and hypersensitivity reactions, especially by the solvents used due to its low solubility. In the case of 5-FU, its rapid metabolism, which decreases its bioavailability and its concentration in tumor tissue, is the cause of its poor therapeutic performance. To these factors, we must add the presence of tumors considered "chemoresistant" by many different mechanisms. Therefore, for these tumors chemotherapy treatment is not a therapeutic alternative since it does not significantly increase the survival of the patients.

In this context, **nanotechnology** is developing new systems which transport antitumor drugs, avoiding their limitations and improve their activity by the protection against fast elimination and/or degradation, an increase in their half-life in blood circulation, the improvement of their solubility, the increase of tumor specificity, the association with other antitumor agents or the blockage of possible resistance mechanisms. All these advantages from the encapsulation of the drugs are possible due to the physicochemical properties of the new nanoformulations. These properties allow us to modulate its size, its surface charge, its biodegradability and biocompatibility and even its affinity for a specific type of tumor (targeting). In the case of cancer therapy, the most commonly used nanoformulations for drug delivery are liposomes, polymer NPs, magnetic NPs or solid lipid NPs.

The present research work focuses on the study of polymeric NPs of poly(butylcyanoacrylate) (PBCA), poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL), poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) as transport system of the antitumor drugs DOX, 5-FU and PTX to improve the treatment of breast, lung and colon cancer. In particular, we have been able to generate three groups of NPs that have been denominated DOX-PBCA and DOX-PCL, 5-FU-PBCA and 5-FU-PCL and PTX-PLGA. These new nanoformulations have been tested *in vivo* and/or *in vitro* on experimental models of breast, colon and lung cancer, showing a significant improvement in the antitumor activity of these nanocomposites in relation to the use of free agents (not associated with NPs). All the results obtained are collected in four publications of international journals with high impact (Annex 1) and in a fifth paper that is under review.

The nanoformulations used in the present study have been developed by methods of nanoprecipitation, interfacial polymer disposition and emulsion/polymerization procedures. The synthesis has been carried out in the Departments of Pharmacy and Pharmaceutical Technology of the Universities of Granada and Sevilla under the supervision of Dr. Jose Luis Arias and Dr. Lucía Martín, respectively. We obtained NPs of homogeneous sizes smaller than 250 nm that were suitable for *in vitro* and *in vivo* use (intravenous administration), and they have a biphasic drug release profile consisting of a first phase of rapid release, followed by a second phase of sustained release. After their complete

characterization, the NPs with the most appropriate physicochemical properties and the best profiles of internalization and drug release were selected to perform the tests in *in vitro* and *in vivo* models of breast, lung and colon cancer.

*In vitro* studies were carried out in cell cultures using both human and mouse breast, lung and colon cancer cells, as well as human non-tumor cells. The empty NPs (without drug) were tested in cultures to determinate their toxicity. The results showed that all the NPs tested showed excellent biocompatibility at the doses used in both tumor and non-tumor cell lines. The antiproliferative effect of our nanoformulations (DOX-PBCA, DOX-PCL, 5-FU-PBCA, 5-FU-PCL and PTX-PLGA) were analyzed and compared to free DOX, 5-FU and PTX drugs. Our results showed that, in all cases, the association of the drug with NPs resulted in a significant improvement of its antitumor effect. Thus, we could observe a reduction of the inhibitory concentration 50% ( $IC_{50}$ ) of 21.7 times for the DOX-loaded PBCA NPs (DOX-PBCA) in the mouse breast cancer cell line E0771, or 42 times in the case of 5-FU-loaded PBCA NPs (5-FU-PBCA) in the human cell line of colon cancer T84.

On the other hand, some studies were carried out to determine the improvement in the cellular internalization of the molecules transported by the NPs. Fluorophores (*i.e.* Nile red-NR) or the fluorescent properties of some drugs (*i.e.* DOX), were used to determine the presence of nanoformulations within the cell by flow cytometry and fluorescence and confocal microscopy techniques. Our results demonstrated a significant dose-dependent increase of the internalization of the molecules transported by our NPs in all cell types tested. Thus, we observed a significant increase in fluorescence, and therefore a better uptake of the molecules into human breast cancer cells (MCF-7), after exposure to the DOX-PBCA (half an hour) and NR-PLGA nanoformulations (two hours) which was estimated at 51.9% and 70.1%, respectively. In addition, the nanoformulations caused changes in the intracellular localization of the transported molecules that may be due to their different mechanism of cell entry (endocytosis, pinocytosis, phagocytosis) in relation to free molecules (simple diffusion).

## Summary

*In vivo* assays were performed in immunocompetent mice from the C57BL/6 strain that were inoculated subcutaneously with tumor cells from the E0771 (breast cancer), LL2 (lung cancer) and MC38 (colon cancer) cells, from of the same mouse strain. After tumor generation, the mice were treated with the nanoformulations DOX-PBCA, DOX-PCL, 5-FU-PBCA and 5-FU-PCL and with free drugs. The studies also have treatments with empty NPs (without drug). The treated mice were monitored for changes of body weight, tumor volume and survival. The tissues toxicity produced by the drug, including analysis of blood parameters and markers of cardiovascular damage were also analyzed in the case of DOX-PCL NPs. Our results demonstrated that all treatments with NPs loaded with DOX or 5-FU induced significant reduction of the tumor volume compared to free drugs. Thus, in mice with induced lung cancer and treated with DOX-PBCA, a reduction of the tumor volume of up to 28% was observed, and it was higher compared to DOX treatment. This reduction was 36% for the models of breast and lung cancer treated with DOX-PCL. This increase in the antitumor effect could be related to the passive targeting produced by the "enhanced permeability and retention effect" (EPR). This favors the extravasation of macromolecules towards tumor tissues due to the production of vascular mediators, angiogenesis processes and to the defective lymphatic drainage of tumor tissues. In addition, most nanoformulations induced a significant increase in mouse survival compared to free drug treatment. This increase was observed with the use of 5-FU-PBCA, 5-FU-PCL in colon cancer models and with DOX-PCL in lung cancer models. However, we could not observe significant differences with the use of DOX-PCL in breast cancer models in comparison to the free drug.

Finally, by the monitorization of the body weight of the mice that is indicative of the treatments toxicity, allowed us to demonstrate that none of the nanoformulations used in combination with DOX or 5-FU induced an increase in toxicity in relation to free drug. In contrast, DOX-PCL NPs were able to reduce DOX toxicity compared to free drug treatment. In fact, DOX-PCL-treated mice did not showed changes in blood white cell (WBC) or markers of cardiovascular damage MMP-9 (Matrix metalloproteinase 9), sVACM-1 (vascular cell adhesion molecule-1)

and CRP (C-reactive protein), which were modified after DOX treatment. In addition, the use of NPs did not induce histological changes that indicate cardiac damage in contrast to those detected after free DOX treatment.

In conclusion, the results of the present research work demonstrate that the NPs which transport DOX, 5-FU and PTX drugs are highly biocompatible. Furthermore, the use of the nanocomplexes DOX-PBCA, DOX-PCL, 5-FU-PBCA, 5-FU-PCL and PTX-PLGA produced a significant improvement in their antitumor effect in both *in vitro* and *in vivo* in breast, lung and colon cancer compared to the free drugs treatment. In addition, some nanoformulations, such as DOX-PCL, are able to reduce the systemic toxicity of the drug. Unlike other nanoformulations (lipid vesicles or liposomes) with little effectiveness to penetrate tumor tissues, our nanocomplexes have shown to be efficient vehicles of the antitumor drugs, being a very useful tool to overcome the current limitations of the chemotherapy treatment in breast, lung and colon cancer to improve the prognosis of patients affected by these pathologies.



# **1. Introducción**

---





## **1.1. Generalidades sobre el cáncer**

El cáncer es una enfermedad que puede originarse en cualquier tejido del cuerpo humano cuando las células muestran un comportamiento inusual y comienzan a dividirse sin control, viéndose truncado su mecanismo de muerte celular programada o apoptosis. En el caso de los tumores sólidos, la división incontrolada de estas células causa la formación progresiva de una masa en la que se originan nuevos vasos sanguíneos que la irrigan manteniendo su integridad, proceso conocido como angiogénesis. Además, a medida que el tumor va creciendo, algunas células cancerígenas pueden separarse de la masa tumoral y viajar a través de la circulación sanguínea o linfática extendiéndose a otras partes del cuerpo desarrollando allí nuevos tumores, proceso denominado metástasis (American Cancer Society, 2015).

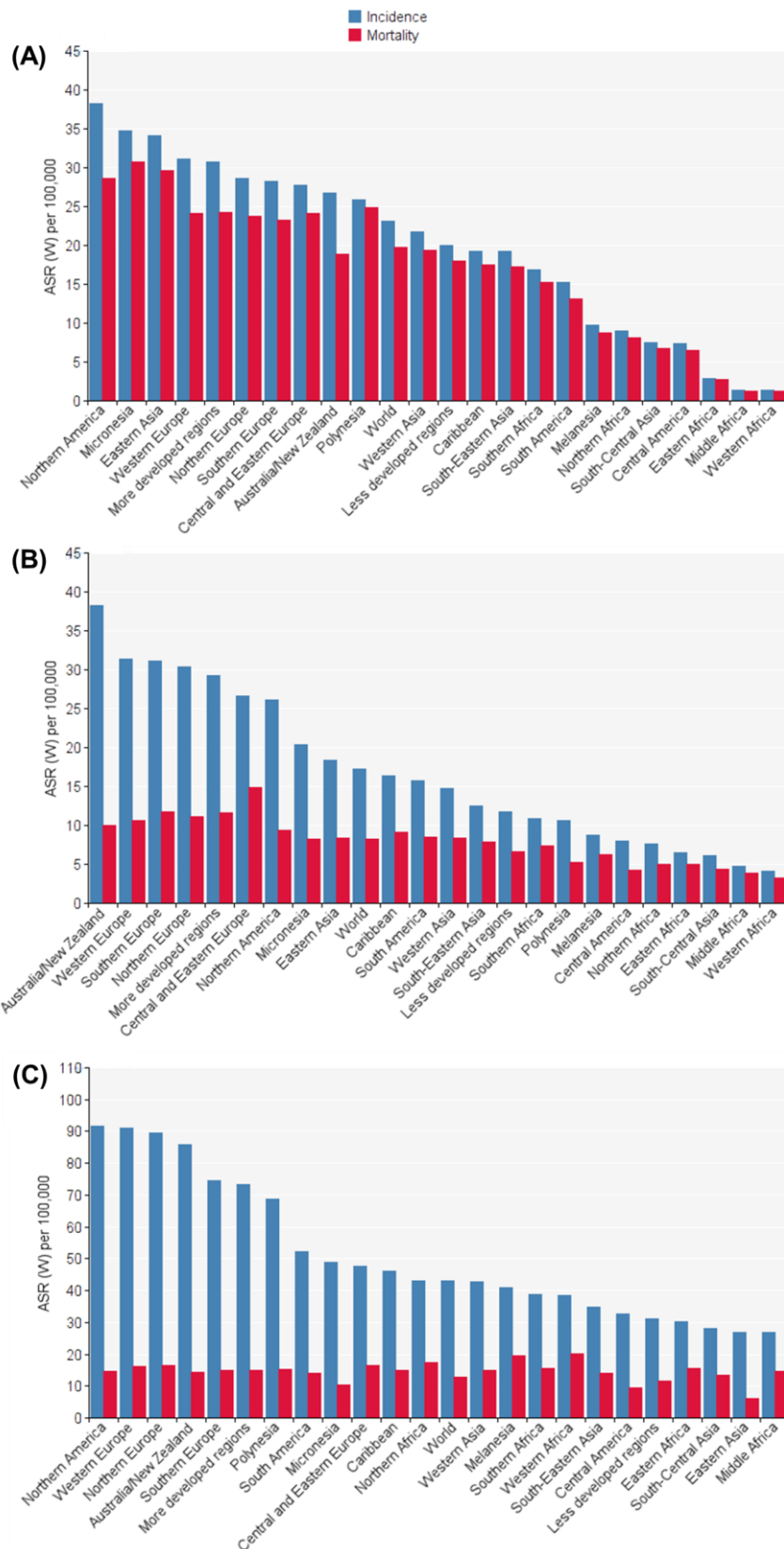
Una característica importante de los tumores es que no son una masa homogénea de células, están constituidos por diferentes tipos de poblaciones celulares con características diferentes, que pueden verse reflejadas en los diferentes patrones de expresión de marcadores celulares que pueden mostrar. Además, en el inicio de la formación del tumor, se parte de una única célula que muestra un comportamiento aberrante que sería la célula de origen. A partir de ahí, cuando la masa tumoral está formada, existe una subpoblación de células que se encarga de renovar la población de células tumorales, de la propagación e invasividad del tumor e incluso de producir células no tumorales. Estas células responsables de la agresividad de un tumor son comúnmente conocidas como células madre cancerígenas (Rycaj y Tang, 2015; Visvader, 2011).

Normalmente, las células que presentan un comportamiento anormal como las tumorales son reconocidas y eliminadas por el sistema inmune, pero puede ocurrir que en ocasiones consigan evadirse de este sistema y pasar desapercibidas continuando con su crecimiento sin control. Este comportamiento anormal suele estar producido por alteraciones en su ADN que suelen ser mutaciones o daños en genes que controlan el ciclo celular, como los genes reparadores del ADN,

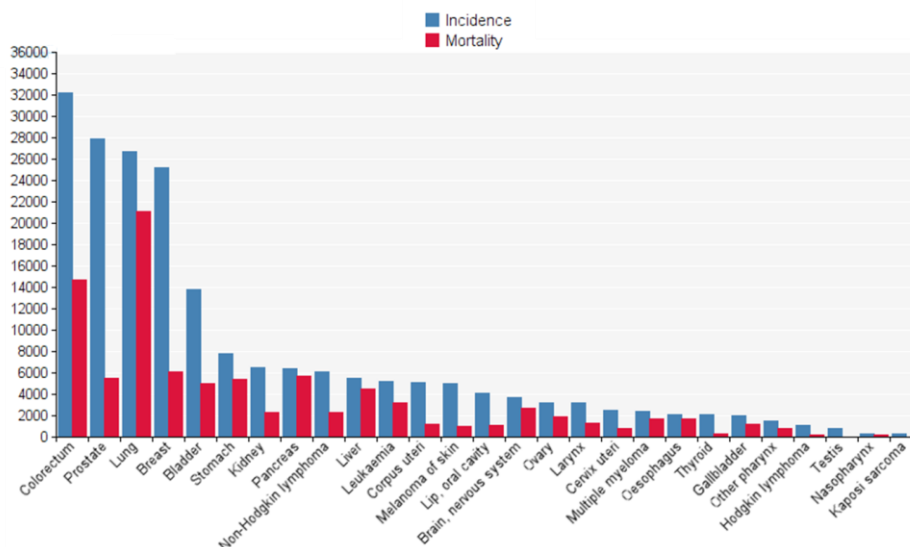
protooncogenes y genes supresores de tumores. Estas alteraciones en el ADN pueden ser hereditarias o adquiridas durante la vida del individuo por la exposición a ciertos factores ambientales como los agentes químicos o la radiación ultravioleta (American Cancer Society, 2015).

A pesar de los avances en medicina y ciencia en general, el cáncer sigue siendo una enfermedad muy común a nivel mundial para la que no se ha encontrado un tratamiento eficaz, capaz de diferenciar entre las células tumorales y sanas evitando los efectos secundarios en los pacientes (American Cancer Society, 2015). Los datos más recientes de la Organización Mundial de la Salud, en el año 2012, muestran un total de 14,1 millones de nuevos casos en el mundo, de los cuales 8,2 millones de personas fallecieron a causa de esta enfermedad. En Europa, con un total de 3,7 millones de nuevos casos se produjeron 1,9 millones de muertes (GLOBOCAN, 2012). Más concretamente en España, el número de nuevos casos de cáncer en el año 2012 fue de 215.534 y el número de muertes de 102.762, siendo la estimación poblacional de mortalidad para el año 2020 de 117.859 personas. El tipo de cáncer con mayor incidencia a nivel mundial es el cáncer de pulmón con 1,8 millones de nuevos casos en 2012, seguido del cáncer de mama (1,6 millones) y el cáncer de colon (1,3 millones). Por otro lado, en España el cáncer más diagnosticado en el año 2012 fue el cáncer de colon con 32.240 nuevos casos, seguido por el cáncer de próstata (27.853), el de pulmón (26.715) y el de mama (25.215). Sin embargo, tanto a nivel mundial como a nivel nacional, el tipo de cáncer que produjo mayor número de muertes en el año 2012 fue el cáncer de pulmón con 1,6 millones de muertes a nivel mundial y 21.118 muertes a nivel nacional. (GLOBOCAN, 2012; SEOM, 2016) (Figuras 1 y 2).

Estos datos ponen de manifiesto la necesidad de seguir investigando para encontrar nuevas estrategias terapéuticas que mejoren el pronóstico de los pacientes afectados de estos tipos de cáncer, disminuyendo en lo posible su tasa de mortalidad.



**Figura 1.** Incidencia y mortalidad a nivel mundial de cáncer de pulmón (A), cáncer colorrectal (B) y cáncer de mama (C) ( GLOBOCAN, 2012).



**Figura 2.** Incidencia y mortalidad del cáncer en España ( GLOBOCAN, 2012).

### 1.1.1. Cáncer de pulmón

Es el tipo de cáncer más frecuente a nivel mundial, manifestándose más en hombres que en mujeres. Además, es el que tiene una tasa de mortalidad mayor considerándose que una de cada cinco muertes producidas por cáncer es debida al cáncer de pulmón (GLOBOCAN, 2012).

#### 1.1.1.1. Factores de riesgo

El principal factor de riesgo en el cáncer de pulmón es el tabaco, que contiene 60 carcinógenos reconocidos por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (Hoffmann y cols., 2001) de los cuales destacan los hidrocarburos policíclicos como el benzopireno y la nitrosamina del tabaco (4-metilnitroamino-1-3piridil-1-butanona o NKK). Se ha demostrado que estas sustancias son capaces de producir carcinomas pulmonares en ratones, de las mismas características que los que se desarrollan en humanos (Gray y cols., 2007; Smith y cols., 2000). De hecho, los patrones demográficos indican una fuerte correlación del cáncer de pulmón con las zonas históricamente influenciadas por el hábito de fumar, salvo ciertas

excepciones como un grupo de afroamericanos en los que existe una alta incidencia de cáncer de pulmón que no puede relacionarse solamente al tabaquismo (Pinsky, 2006). Se estima que en individuos fumadores el riesgo de padecer cáncer de pulmón es unas diez veces mayor que en personas no fumadoras y que un 18% de los fumadores desarrollará la enfermedad. En el caso de los ex fumadores el riesgo disminuye entre un 80 y un 90% para aquellos que lleven más de 15 años sin fumar. En individuos no fumadores los factores de riesgo más importantes están relacionados con factores medioambientales como la exposición pasiva al humo del tabaco, exposiciones a radiación ionizante o a carcinógenos relacionados con la actividad laboral como el asbestos o radón (Schwartz y Cote, 2016; Darby y cols., 2005).

### ***1.1.1.2. Clasificación del cáncer de pulmón***

Existen diferentes criterios para clasificar el cáncer de pulmón siendo la histología y el estadio los más utilizados.

Según la clasificación histológica de la Organización Mundial de la Salud existen dos tipos de cáncer de pulmón: el cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) o microcítico y el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) o no microcítico (Sullivan y cols., 2010). El primero de ellos representa el 20% de los casos de cáncer de pulmón y se caracteriza por estar constituido por células pequeñas con límites poco definidos y escaso citoplasma. Es el tipo más agresivo, y suele estar muy diseminado en el momento del diagnóstico (Agra y cols., 2003; Comis y cols., 1998).

El CPCNP por el contrario representa el 80% de los casos de cáncer de pulmón. Responde peor al tratamiento por quimioterapia y radioterapia en comparación con el tipo anterior, aunque es menos agresivo ya que su crecimiento y diseminación es más lento. Es un grupo muy heterogéneo mostrando en la mayoría de los casos más de un patrón histológico. Dentro de este tipo tumoral se incluyen (Sullivan y cols., 2010):

- El carcinoma de células escamosas o epidermoide que representa el 30% de los tumores de pulmón. Se origina en las células epiteliales de los bronquios afectando a los bronquios segmentarios y por extensión a los bronquios principales y lobares. Se caracteriza por la presencia de queratinización y por la existencia de puentes intercelulares.
- El adenocarcinoma es el más frecuente de todos ellos, representando el 30-40% de los tumores de pulmón. Se origina en el epitelio alveolar o en las glándulas de la submucosa por lo que se caracteriza por la producción de mucina y la formación de gándulas.
- El carcinoma de células grandes es el menos frecuente representando el 15% de los tumores de pulmón. Es el más indiferenciado de todos con células de gran tamaño y abundante citoplasma.

En segundo lugar podemos establecer una clasificación en cuatro estadios (IA y B, IIA y B, IIIA y B y IV) según el sistema TNM establecido por La American Joint Committee on Cancer (AJCC) (Tablas 1 y 2) (Edge y cols., 2010) que se basa en el tamaño del tumor, su capacidad para afectar a estructuras vecinas y a ganglios linfáticos y la afectación de órganos a distancia.

**Tabla 1.** Clasificación TNM del cáncer de pulmón (Lababede y cols., 2011).

Categoría	División	Subdivisión	Características
<b>T</b> (tamaño del tumor)	<b>TX</b>		Citología positiva, no es posible medirlo o hallarlo
	<b>T1</b>	<b>T1a</b>	≤ 2 cm
		<b>T1b</b>	>2 cm; <3 cm
	<b>T2</b>	<b>T2a</b>	En bronquio a≥ 2 cmde la carina traqueal, invade la pleura visceral, atelectasia parcial. > 3 cm;< 5 cm

**Tabla 1. (Continuación)** Clasificación TNM del cáncer de pulmón (Lababede y cols., 2011).

<b>Categoría</b>	<b>División</b>	<b>Subdivisión</b>	<b>Características</b>
<b>T</b> (tamaño del tumor)	<b>T2</b>	<b>T2b</b>	En bronquio principal $\geq 2$ cm de la carina traqueal, invade la pleura visceral, atelectasia parcial. > 5 cm; < 7 cm
			> 7 cm
	<b>T3</b>		En pared torácica, diafragma, pericardio, pleura mediastínica o bronquio principal a < 2 cm desde la carina traqueal, atelectasia total. Nódulo/s tumorales separados en el mismo lóbulo
	<b>T4</b>		Invasión de cavidad mediastínica, corazón, grandes vasos, carina, traquea, esófago, vértebras. Nódulo/s tumorales separados en diferentes lóbulos ipsilaterales
<b>N</b> (afectación ganglios linfáticos)	<b>N1</b>		Afectación de ganglios peribronquiales ipsilaterales, hilares ipsilaterales.
		<b>N2</b>	Ganglio subcarinal, mediastínico ipsilateral
		<b>N3</b>	Ganglio mediastínico contralateral, hilar, escaleno, supraclavicular
<b>M</b> (metástasis)	<b>M1</b>	<b>M1a</b>	Metástasis distante. Nódulo/s tumorales separados en un lóbulo contralateral; nódulos pleurales o pleura maligna, o efusión pericárdica
		<b>M1b</b>	Metástasis distante

**Tabla 2.** Clasificación del cáncer de pulmón por estadios según la AJCC.

Estadio	Categoría T	Categoría N	Categoría M
<b>Oculto</b>	TX	N0	M0
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>IA</b>	T1	N0	M0
<b>IB</b>	T2	N0	M0
<b>IIA</b>	T1	N1	M0
<b>IIB</b>	T2 T3	N1 N0	M0 M0
<b>IIIA</b>	T1 T2 T3 T3	N2 N2 N1 N2	M0 M0 M0 M0
<b>IIIB</b>	Cualquier T T4	N3 Cualquier N	M0 M0
<b>IV</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1

### ***1.1.1.3. Tratamiento del cáncer de pulmón***

El tratamiento del cáncer de pulmón depende del estadio en el que se encuentre el tumor, así en este caso puede dividirse en enfermedad de estadio limitado (EL) donde el cáncer se encuentra en un área limitada por el hemitórax, mediastino o los ganglios linfáticos supraclaviculares y estadio diseminado (ED) que se extiende más allá de estos límites. La clasificación TNM establece el EL dentro de los estadios I a IIIB y el ED en estadio IV con metástasis a distancia M1 (Tablas 1 y 2) (Micke y cols., 2002; Zelen, 1973). El tratamiento por resección quirúrgica por sí solo no suele conseguir buenos resultados de supervivencia a largo plazo debido a la frecuente presencia de metástasis, siendo la quimioterapia, sola o en combinación con radioterapia la que permite alcanzar una mejora notable en la supervivencia. Normalmente se suelen usar regímenes en los que se combinan platino y etopósido en primera línea de tratamiento y topotecán en segunda línea. En el caso de la



radioterapia además de en tórax y mediastino en el caso del EL, se suele aplicar en el sistema nervioso central para prevenir la metástasis cerebral tanto en EL como en ED (Alvarado-Luna y Morales-Espinosa, 2016).

En el tratamiento de los CPCNP es fundamental como terapia curativa la cirugía, por ello es necesaria la estadificación del proceso dividiéndose los tumores en quirúrgicamente resecables, enfermedad avanzada local o regional y enfermedad metastásica a distancia. En el primer caso, estarían los tumores del estadio I, II y algunos del estadio III, en los que se procede a la resección quirúrgica del tumor y al tratamiento con cisplatino como adyuvante para tumores del estadio II y IIIA. Son los pacientes que presentan mejor pronóstico. En la enfermedad avanzada local, que abarca tumores en estadios T3-T4 o regional donde estarían tumores N2-N3, se puede usar terapia combinada. En el caso de que el tumor sea resecable, se puede aplicar también quimioterapia antes o después de la intervención.

En el caso de tumores no resecables se combinan quimioterapia y radioterapia, utilizando como fármacos de primera línea cisplatino y carboplatino en combinación con paclitaxel (PTX), gemcitabina o docetaxel. En cuanto al cáncer de pulmón metastásico incluyendo el estadio M1 se utiliza radioterapia sobre el tumor primario o quimioterapia combinando el platino con otros fármacos como son gemcitabina, docetaxel, paclitaxel o vinorelbina (Grossi y cols., 2008; Harper y Marx, 2002; Scagliotti y cols., 2002).

### **1.1.2. Cáncer colorrectal**

A nivel mundial el cáncer colorrectal es el tercer tipo de cáncer más común en hombres, representando un 10% del total de casos de cáncer y, el segundo en mujeres, siendo ligeramente inferior con un 9,2% del total (GLOBOCAN, 2012). En España por el contrario es el primer cáncer más diagnosticado, representando un 14,98% del total de casos (SEOM, 2016).

### ***1.1.2.1. Factores de riesgo***

Los diferentes factores de riesgo del cáncer colorrectal suelen estar relacionados entre sí. Uno de los principales factores es la edad ya que ha sido demostrado que la incidencia de cáncer colorrectal aumenta a partir de los 50 años (El-Bolkainy y cols., 2006), potenciándose en la actualidad su detección precoz mediante pruebas de screening (GLOBOCAN, 2012). En general, el estilo de vida del individuo juega también un papel muy importante en la aparición de este tipo de cáncer. En este sentido, son factores de riesgo dietas hipercalóricas constituidas por carnes rojas, carbohidratos y almidones refinados que unidas al sedentarismo, consumo de tabaco y alcohol potencian en gran medida la incidencia del cáncer colorrectal (Chan y Giovannucci, 2010; Chang y Yang, 2016; Marley y Nan, 2016).

Los factores genéticos representan un 15-20% de todos los casos de cáncer colorrectal (Casimiro, 2002), destacando entre ellos los de componente hereditario que como la poliposis adenomatosa familiar (PAF), cáncer colorrectal hereditario no polipósico (CCHNP) o las variantes I y II del síndrome de Lynch y una historia clínica de colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn (Butterworth y cols., 2006; Thorson y cols., 1999). Además, también se consideran en grupos de riesgo personas con antecedentes de cáncer colorrectal o adenomas y personas en cuya historia clínica aparece cáncer de ovario, de endometrio o de mama (Fuchs y cols., 1994; Ransohoff y Lang, 1991). Los genes que podemos encontrar alterados son los genes supresores de tumores como P53 y el gen deletado de cáncer de colon (DCC), protooncogenes como K-Ras o genes relacionados con la reparación del ADN como hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 y hMSH6.

### ***1.1.2.2. Clasificación del cáncer colorrectal***

En la clasificación histológica del cáncer colorrectal el adenocarcinoma es la más común, representando un 90-95% de los casos diagnosticados. Normalmente comienza con un pólipo adenomatoso o adenoma de origen epitelial que mediante

la acumulación de mutaciones pasa de ser un tumor benigno a convertirse en maligno llegando al nivel de adenocarcinoma. Dentro de este tipo encontramos el adenocarcinoma coloide o mucinoso y el adenocarcinoma de células en anillo de sello. Otros tipos histológicos menos frecuentes son (NIH, 2017a; Saclarides y cols., 1994):

- Carcinoma de células pequeñas que representa menos del 1% del total.
- Carcinoma escamoso y adenoescamoso, con una incidencia inferior al 1%.
- Tumores carcinoides, tumores neuroendocrinos de mal pronóstico.
- Linfomas.
- Sarcomas, son los de menor incidencia representando tan solo el 0,1% de los tumores colorrectales.

La estadificación del cáncer colorrectal se obtiene utilizando la clasificación TNM establecida por la AJCC (Tabla 3) (NIH, 2017a).

**Tabla 3.** Sistema de clasificación por etapas TNM para el cáncer colorrectal según la AJCC.

Estadio 0		
Estadio	TNM	Descripción
<b>0</b>	<b>Tis, N0, M0</b>	* Tis: Carcinoma <i>in situ</i> (intraepitelial o invasión de la lámina propia) * N0: No se observa metástasis de ganglios linfáticos regionales * M0: No se observa metástasis a distancia
Estadio I		
Estadio	TNM	Descripción
<b>I</b>	<b>T1, N0, M0</b>	* T1: El tumor primario invade la submucosa * T2: El tumor primario invade la capa muscular propia * N0: No se observa metástasis de ganglios linfáticos regionales
	<b>T2, N0, M0</b>	* M0: No se observa metástasis a distancia
Estadio II		
Estadio	TNM	Descripción
<b>IIA</b>	<b>T3, N0, M0</b>	* T3: El tumor primario invade la capa muscular propia alcanzando tejidos pericólicas * N0: No se observa metástasis de ganglios linfáticos regionales * M0: No se observa metástasis a distancia
<b>IIB</b>	<b>T4a, N0, M0</b>	* T4a: El tumor primario invade la superficie del peritoneo visceral * N0: No se observa metástasis de ganglios linfáticos regionales * M0: No se observa metástasis a distancia

**Tabla 3. (Continuación)** Sistema de clasificación por etapas TNM para el cáncer colorrectal según la AJCC.

Estadio II		
Estadio	TNM	Descripción
<b>IIC</b>	<b>T4b, N0, M0</b>	* T4b: El tumor primario invade directamente o se adhiere a otros órganos o estructuras * N0: No se observa metástasis de ganglios linfáticos regionales * M0: No se observa metástasis a distancia
Estadio III		
Estadio	TNM	Descripción
<b>IIIA</b>	<b>T1-T2, N1/N1c, M0</b>	* T1: El tumor primario invade la submucosa * T2: El tumor primario invade la capa muscular propia * N1: Se observa metástasis en 1-3 ganglios linfáticos regionales
	<b>T1, N2a, M0</b>	* N1c: El tumor primario se infiltra en la subserosa, el mesenterio, los tejidos pericólicos o perirrectales extraperitoneales, sin metástasis de ganglios linfáticos regionales * N2a: Se observa metástasis en 4-6 ganglios linfáticos regionales * M0: No se observa metástasis a distancia
<b>IIIB</b>	<b>T3-T4a, Ni/N1c, M0</b>	* T1: El tumor primario invade la submucosa * T2: El tumor primario invade la capa muscular propia * T3: El tumor primario invade la capa muscular propia alcanzando tejidos pericólicas * T4a: El tumor primario invade la superficie del peritneo visceral * N1: Se observa metástasis en 1-3 ganglios linfáticos regionales * N1c: El tumor primario se infiltra en la subserosa, el mesenterio, los tejidos pericólicos o perirrectales extraperitoneales, sin metástasis de ganglios linfáticos regionales
	<b>T2-T3, N2a, M0</b>	* N2a: Se observa metástasis en 4-6 ganglios linfáticos regionales * N2b: Se observa metástasis en 7 o más ganglios linfáticos regionales
	<b>T1-T2, N2b, M0</b>	* M0: No se observa metástasis a distancia
<b>IIIC</b>	<b>T4a, N2a, M0</b>	* T3: El tumor primario invade la capa muscular propia alcanzando tejidos pericólicas * T4a: El tumor primario invade la superficie del peritneo visceral * T4b: El tumor primario invade directamente o se adhiere a otros órganos o estructuras
	<b>T3-T4a, N2b, M0</b>	* N1: Se observa metástasis en 1-3 ganglios linfáticos regionales * N2: Se observa metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales * N2a: Se observa metástasis en 4-6 ganglios linfáticos regionales
	<b>T4b, N1-N2, M0</b>	* N2b: Se observa metástasis en 7 o más ganglios linfáticos regionales * M0: No se observa metástasis a distancia

**Tabla 3. (Continuación)** Sistema de clasificación por etapas TNM para el cáncer colorrectal según la AJCC.

Estadio IV		
Estadio	TNM	Descripción
<b>IVA</b>	<b>Cualquier T, cualquier N, M1a</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Tx: No se puede evaluar el tumor primario</li> <li>* T0: No hay constancia de la existencia de tumor primario</li> <li>* Tis: Carcinoma <i>in situ</i> (intraepitelial o invasión de la lámina propia)</li> <li>* T1: El tumor primario invade la submucosa</li> <li>* T2: El tumor primario invade la capa muscular propia</li> <li>* T3: El tumor primario invade la capa muscular propia alcanzando tejidos pericólicas</li> <li>* T4a: El tumor primario invade la superficie del peritneo visceral</li> <li>* T4b: El tumor primario invade directamente o se adhiere a otros órganos o estructuras</li> <li>* NX: No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales</li> <li>* N0: No se observa metástasis de ganglios linfáticos regionales</li> <li>* N1: Se observa metástasis en 1-3 ganglios linfáticos regionales</li> <li>* N1a: Se observa metástasis en 1 ganglio regional</li> <li>* N1b: Se observa metástasis en 2-3 ganglios regionales</li> <li>* N1c: El tumor primario se infiltra en la subserosa, el mesenterio, los tejidos pericólicos o perirrectales extraperitoneales, sin metástasis de ganglios linfáticos regionales</li> <li>* N2: Se observa metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales</li> <li>* N2a: Se observa metástasis en 4-6 ganglios linfáticos regionales</li> <li>* N2b: Se observa metástasis en 7 o más ganglios linfáticos regionales</li> <li>* M1a: Se observa metástasis en un órgano o sitio concreto (hígado, pulmones, ovario o ganglio no regional)</li> </ul>
<b>IVB</b>	<b>Cualquier T, cualquier N, M1b</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Tx: No se puede evaluar el tumor primario</li> <li>* T0: No hay constancia de la existencia de tumor primario</li> <li>* Tis: Carcinoma <i>in situ</i> (intraepitelial o invasión de la lámina propia)</li> <li>* T1: El tumor primario invade la submucosa</li> <li>* T2: El tumor primario invade la capa muscular propia</li> <li>* T3: El tumor primario invade la capa muscular propia alcanzando tejidos pericólicas</li> <li>* T4a: El tumor primario invade la superficie del peritneo visceral</li> <li>* T4b: El tumor primario invade directamente o se adhiere a otros órganos o estructuras</li> <li>* NX: No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales</li> <li>* N0: No se observa metástasis de ganglios linfáticos regionales</li> <li>* N1: Se observa metástasis en 1-3 ganglios linfáticos regionales</li> <li>* N1a: Se observa metástasis en 1 ganglio regional</li> <li>* N1b: Se observa metástasis en 2-3 ganglios regionales</li> <li>* N1c: El tumor primario se infiltra en la subserosa, el mesenterio, los tejidos pericólicos o perirrectales extraperitoneales, sin metástasis de ganglios linfáticos regionales</li> <li>* N2: Se observa metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales</li> <li>* N2a: Se observa metástasis en 4-6 ganglios linfáticos regionales</li> <li>* N2b: Se observa metástasis en 7 o más ganglios linfáticos regionales</li> <li>* M1b: Se observa metástasis en más de un órgano/sitio o en el peritoneo</li> </ul>

### ***1.1.2.3. Tratamiento del cáncer colorrectal***

La prescripción del tratamiento más adecuado se realiza en función del estadio de la enfermedad. (Compton y Greene, 2004; Edge y cols., 2010; NIH, 2017a). En general, el tratamiento se basa en la cirugía, combinada o no con quimioterapia, radioterapia, ablación local o terapias dirigidas. La resección tumoral se realiza mediante técnicas de laparoscopia, que presenta grandes ventajas como son la reducción del dolor y el tiempo postoperatorio de recuperación. La radioterapia, a diferencia de la cirugía y quimioterapia, sólo está recomendada para cáncer de recto, aunque puede ser recomendada en T4 o cuando existe enfermedad residual tras la intervención quirúrgica, perforación local u obstrucción.

En cáncer de colon en estadios 0, I y II, el tratamiento inicial es quirúrgico, realizándose la resección del tumor y en muchos casos de los nódulos linfáticos primarios y regionales mediante técnicas de laparoscopia. Existe cierta controversia en el uso de quimioterapia adyuvante en pacientes en el estadio II ya que en algunos casos concretos el riesgo de recidiva después del tratamiento quirúrgico puede ser mayor. Sin embargo, no hay pruebas que sostengan que la quimioterapia adyuvante en este estadio aumente la supervivencia de los pacientes (Moertel y cols., 1995; NIH, 2017a). En el estadio III, el tratamiento consiste en cirugía y quimioterapia adyuvante. Antes del año 2000 el único fármaco que se administraba a pacientes de cáncer colorrectal en este estadio era el 5-Fluorouracilo (5-FU). Después del año 2000 se empezaron a utilizar otros fármacos como la capecitabina (prodroga del 5-FU) y el oxaliplatino. En este estadio se suele usar la combinación de fármacos denominada FOLFOX que está compuesta por leucovorina cálcica (ácido folínico), 5-FU y oxaliplatino. Por último, el tratamiento en el estadio IV depende de la localización de la metástasis y de la existencia de recidivas. No obstante, el tratamiento se basa nuevamente en la cirugía en la que se incluye también la resección de metástasis, además de radioterapia y quimioterapia paliativas y terapias dirigidas. En este estadio existen 13 fármacos para quimioterapia y terapia dirigida que pueden usarse tanto solos como en combinación que son: 5-FU, capecitabina, irinotecán, oxaliplatino, bevacizumab, FOLFOXIRI (combinación de irinotecán,

oxaliplatino, leucovorina y 5-FU), cetuximab, aflibercept, ramucirumab, panitumumab, regorafenib y TAS-102 (Mármol y cols., 2017; NIH, 2017a).

Respecto al cáncer de recto, el tratamiento en el estadio 0 se basa solamente en cirugía, mientras que desde el estadio I se puede recomendar el uso de quimioterapia postoperatoria a partir de tumores en estado T2 o superiores en los que aparecen porcentajes elevados de nódulos linfáticos afectados (19,6%) (Sitzler y cols., 1997). Para los estadios II y III, a parte de la cirugía se suele administrar quimioterapia preoperatoria o postoperatoria en combinación o no con radioterapia. Los fármacos que se suelen administrar son 5-FU, leucovorina y oxaliplatino. Para el estadio IV, el tratamiento consiste en la resección tumoral y metastásica que se suele acompañar de quimioterapia y radioterapia. En el caso de la quimioterapia es frecuente el uso de los mismos fármacos que para el cáncer de colon en este estadio (NIH, 2017a).

### **1.1.3. Cáncer de mama**

Es el segundo tipo de tumor más común a nivel mundial y el más frecuente en mujeres representando en éstas el 25% de todos los cánceres diagnosticados, siendo la quinta causa por muerte por cáncer en ambos sexos (GLOBOCAN, 2012).

#### ***1.1.3.1. Factores de riesgo***

Los factores de riesgo que pueden influir en la aparición de esta enfermedad son múltiples. Entre los más importantes se encuentran el sexo y la edad. El cáncer de mama afecta principalmente a mujeres representando un 99% de los casos (Charlot y cols., 2013). El riesgo de padecer esta enfermedad aumenta con la edad, sobre todo a partir de los 40. De hecho, tan solo alrededor de un 24% de los cánceres de mama se diagnostican en mujeres menores de 50 años (Brinton y cols., 2008).

Los antecedentes familiares y la predisposición genética son también factores de riesgo muy importantes, aunque solo un 5-10% de los casos tiene un fuerte componente hereditario y solo un 4-5% se debe a una marcada predisposición genética (herencia autosómica dominante) (Colditz y cols., 2012; Lalloo y Evans, 2012). Entre los genes más importantes implicados en esta predisposición genética se encuentran los protooncogenes BRCA1 y BRCA2. Mutaciones en el gen BRCA1 aumentan el riesgo relativo de padecer cáncer de mama entre un 60-85% en mujeres hasta los 20 años, disminuyendo este porcentaje con la edad (33% entre 30-39 años y 14% entre 60-69 años). Las mutaciones en el gen BRCA2 aumentan el riesgo relativo de padecer cáncer de mama en un 40-85% (Lalloo y Evans, 2012). Los cánceres de mama de individuos que portan mutaciones BRCA1 y BRCA2 son diferentes de los cánceres de mama esporádicos. Sin embargo, el comportamiento tras el tratamiento de los BRCA1 es similar a los esporádicos, siendo diferente en los BRCA2 que son más agresivos y recidivantes (Goodwin y cols., 2012).

El componente hormonal también juega un papel muy importante en este tipo de patología ya que niveles anormalmente altos de estrógenos y hormonas sexuales esteroideas se consideran factores de riesgo para la aparición de cáncer de mama (Liang y Shang, 2013).

Factores ambientales como la exposición a radiación o factores relacionados con el estilo de vida como una dieta poco saludable, el tabaquismo, el consumo de alcohol y el sedentarismo también están relacionados con el desarrollo de cáncer de mama (Berrino, 2014; Jevtic y cols., 2010; Sholl y cols., 2017; Singletary y Gapstur, 2001).

Finalmente, entre los factores de riesgo se encuentran los antecedentes personales del propio paciente, siendo éstos las mujeres que han padecido una enfermedad benigna de la mama (aumento del riesgo 1,3-5,3 veces) o las mujeres que ya han padecido cáncer de mama (aumento el riesgo 3-4 veces), sobre todo se incrementa el riesgo de que aparezca la neoplasia en el seno contralateral (Colditz y cols., 2014; Lizarraga y cols., 2013).



### 1.1.3.2. Clasificación del cáncer de mama

La clasificación por estadios del cáncer de mama se establece fundamentalmente en base al tamaño del tumor y su capacidad de diseminación (Tabla 4), siendo su estadificación TNM esencial para prescribir el tratamiento. (Tablas 5, 6, 7 y 8) (Edge y cols., 2010; NIH, 2017b).

**Tabla 4.** Clasificación por estadios del cáncer de mama según la AJCC

Estadio anatómico-Grupos pronósticos			
Estadio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
	T1	N1mi	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

**Tabla 5.** Clasificación TNM para el cáncer de mama según la AJCC para el tumor primario.

Tumor primario (T)	
<b>TX</b>	* No puede evaluarse el tumor primario
<b>T0</b>	* No hay indicios de la existencia de tumor primario
<b>Tis</b>	* Carcinoma <i>in situ</i>
<b>Tis CDIS</b>	* Carcinoma ductal <i>in situ</i>
<b>Tis CLIS</b>	* Carcinoma lobulillar <i>in situ</i>
<b>Tis (Paget)</b>	* Enfermedad de Paget del pezón que no relacionada con CDIS o CLIS en el parénquima mamario subyacente.
<b>T1</b>	* Tumor $\leq 20$ mm
<b>T1mi</b>	* Tumor $\leq 1$ mm
<b>T1a</b>	* Tumor $>1$ mm y $\leq 5$
<b>T1b</b>	* Tumor $>5$ mm y $\leq 10$ mm
<b>T1c</b>	* Tumor $>10$ mm y $\leq 20$
<b>T2</b>	* Tumor $>20$ mm y $\leq 50$ mm
<b>T3</b>	* Tumor $>50$ mm
<b>T4</b>	* Tumor de cualquier tamaño diseminado a la pared pectoral o a la piel
<b>T4a</b>	* Tumor diseminado a la pared torácica (no incluye solo adherencia o invasión a los músculos pectorales)
<b>T4b</b>	* Ulceración o nódulos satélites ipsilaterales o edema (también piel de naranja). No cumple los criterios de carcinoma inflamatorio
<b>T4c</b>	* Ambos: T4a y T4b
<b>T4d</b>	Carcinoma inflamatorio.

**Tabla 6.** Sistema de clasificación por etapas TNM para el cáncer de mama según la AJCC para los ganglios linfáticos regionales.

Ganglios linfáticos regionales (N)	
<b>NX</b>	* Imposibilidad de evaluar los ganglios linfáticos
<b>N0</b>	* No se observa metástasis regional a los ganglios linfáticos
<b>N1</b>	* Se observa metástasis ipsilateral de grado I o II en los ganglios linfáticos axilares
<b>N2</b>	* Se observa metástasis ipsilateral de grado I o II en los ganglios linfáticos axilares fijos o apelmazados * O bien, se observa metástasis en los ganglios mamarios internos ipsilaterales sin metástasis en los ganglios linfáticos axilares
<b>N2a</b>	* Se observa metástasis ipsilateral de grado I o II en los ganglios linfáticos axilares fijos o apelmazado o a otras estructuras
<b>N2b</b>	* Se observa metástasis solo en los ganglios mamarios internos ipsilaterales sin metástasis en los ganglios linfáticos axilares de grado I o II
<b>N3</b>	* Se observa metástasis en ganglios linfáticos infraclaviculares ipsilaterales (grado III axilar) con compromiso o no de los ganglios linfáticos axilares (grado I, II) * O bien, se observa metástasis en ganglios linfáticos mamarios ipsilaterales internos con metástasis en los ganglios linfáticos axilares (grado I o II) * O bien, se observa metástasis en ganglios linfáticos supraclaviculares ipsilaterales con o sin compromiso axilar o mamario interno de ganglios linfáticos
<b>N3a</b>	* Se observa metástasis en ganglios linfáticos infraclaviculares ipsilaterales
<b>N3b</b>	* Se observa metástasis en ganglios linfáticos mamarios internos ipsilaterales y ganglios linfáticos axilares
<b>N3c</b>	* Se observa metástasis en ganglios linfáticos supraclaviculares ipsilaterales

**Tabla 7.** Sistema de clasificación por etapas TNM para el cáncer de mama según la AJCC tras la disección de ganglios linfáticos axilares con o sin biopsia de ganglio linfático centinela.

Patológico (pN)	
<b>pNX</b>	* Imposibilidad de evaluar los ganglios linfáticos regionales
<b>pN0</b>	* No se observa metástasis en los ganglios linfáticos regionales
<b>pN0(i-)</b>	* No se observa metástasis en los ganglios linfáticos regionales * Células tumorales aisladas (CTA) negativas
<b>pN0(i+)</b>	* Células malignas en ganglios linfáticos regionales $\leq 0,2$ mm

**Tabla 7. (Continuación)** Sistema de clasificación por etapas TNM para el cáncer de mama según la AJCC tras la disección de ganglios linfáticos axilares con o sin biopsia de ganglio linfático centinela.

Patológico (pN)	
<b>pN0(mol-)</b>	* No se observa metástasis en los ganglios linfáticos regionales * No se encontraron marcadores moleculares
<b>pN0(mol+)</b>	* No se observa metástasis en los ganglios linfáticos regionales * Se encontraron marcadores moleculares
<b>pN1</b>	* Se observa micrometástasis * O bien, metástasis en 1–3 ganglios linfáticos axilares * O bien, metástasis en ganglios mamaros internos con metástasis
<b>pN1mi</b>	* Se observa micrometástasis (> 0,2 mm o > 200 células, no > 2,0 mm)
<b>pN1a</b>	* Se observa metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos axilares (> 2,0 mm)
<b>pN1b</b>	* Se observa metástasis en ganglios mamaros internos
<b>pN1c</b>	* Se observa metástasis en 1–3 ganglios linfáticos axilares y ganglios linfáticos mamaros internos
<b>pN2</b>	* Se observa metástasis en 4-9 ganglios linfáticos axilares * O bien, metástasis en ganglios linfáticos mamaros internos sin metástasis en ganglios linfáticos axilares
<b>pN2a</b>	* Se observa metástasis en 4–9 ganglios linfáticos axilares (> 2 mm)
<b>pN2b</b>	* Se observa metástasis en los ganglios linfáticos mamaros internos sin metástasis en los ganglios linfáticos axilares
<b>pN3</b>	* Se observa metástasis en $\geq 10$ ganglios linfáticos axilares * O bien, metástasis en los ganglios linfáticos infraclaviculares (grado III axilar) * O bien, metástasis en los ganglios linfáticos mamaros internos ipsilaterales ( $\geq 1$ ganglios linfáticos axilares positivos, grado I o II) * O bien, metástasis en > 3 ganglios linfáticos axilares y ganglios linfáticos internos mamaros * O bien, metástasis en los ganglios linfáticos ipsilaterales supraclaviculares
<b>pN3a</b>	* Se observa metástasis en $\geq 10$ ganglios linfáticos axilares (> 2,0 mm) * O bien, metástasis en los ganglios infraclaviculares (grado III)
<b>pN3b</b>	* Se observa metástasis en >3 ganglios linfáticos axilares y ganglios mamaros internos con metástasis de 1 o más ganglios linfáticos axilares * O bien, metástasis en >3 ganglios linfáticos axilares y ganglios linfáticos mamaros internos
<b>pN3c</b>	* Se observa metástasis en ganglios linfáticos supraclaviculares ipsilaterales

**Tabla 8.** Sistema de clasificación por etapas TNM para el cáncer de mama según la AJCC para la metástasis a distancia.

Metástasis a distancia (M)	
<b>M0</b>	* No hay pruebas de la existencia de metástasis a distancia
<b>cM0(i+)</b>	* No hay pruebas de la existencia de metástasis a distancia * Vía molecular o microscópica se detecta la presencia de células tumorales en sangre circulante, médula ósea u otros tejidos ganglionares no regionales ( $\leq 0,2$ mm)
<b>M1</b>	* Se observa metástasis a distancia ( $> 0,2$ mm)

En el cáncer de mama, es también fundamental para establecer el pronóstico y la respuesta clínica de los pacientes la clasificación según el patrón molecular y genético (Guiu y cols., 2012; Holliday y Speirs, 2011; Subik y cols., 2010). Según esta clasificación podemos encontrar los siguientes tipos:

- Luminal A y luminal B: son tumores hormonosensibles caracterizados por la presencia de receptores de estrógeno (RE) y/o progesterona (RP) y representan el 70% del total de cánceres de mama. El luminal A es un tumor bien diferenciado y de buen pronóstico con bajos niveles de Ki67, lo contrario del tipo B que es un tumor indiferenciado, de mal pronóstico con elevados niveles de Ki67 (Cheang y cols., 2009).
- HER2 positivos: son tumores que presentan amplificación del gen HER2 (receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano) o sobreexpresión de la proteína HER2. Representan el 10% de los tumores de mama y suelen ser de mal pronóstico.
- Subtipo basal: es negativo para receptores de estrógeno y progesterona y de HER2 denominándosele como triple negativo y siendo el de mayor agresividad. Normalmente se encuentra relacionado con mutaciones del gen BRCA1.

### ***1.1.3.3. Tratamiento del cáncer de mama***

En el caso de estadios tempranos, la principal vía de tratamiento es la cirugía que consta de lumpectomía (cirugía conservadora de la mama) con biopsia del ganglio linfático centinela. En caso de ganglio linfático centinela positivo para metástasis se procede a la disección del nódulo linfático axilar. También puede utilizarse la mastectomía radical con o sin reconstrucción de la mama y con análisis del ganglio linfático centinela del mismo modo que en el caso anterior (Damgaard y cols., 2013; Kaviani y cols., 2013; NIH, 2017b).

Tras la cirugía se suele aplicar también radioterapia y terapia sistémica. La radioterapia ha demostrado que junto a la cirugía conservadora de la mama consigue una supervivencia similar a la mastectomía radical (Cao y cols., 2013). Cuando el tumor se ha extendido a 4 o más ganglios linfáticos axilares se recomienda también la radioterapia regional (NIH, 2017b). La terapia sistémica depende del estadio y del patrón molecular (Parise y Caggiano, 2014; Yin y cols., 2014). En este sentido, en terapia sistémica postoperatoria o adyuvante los fármacos que suelen usarse son tamoxifeno (pacientes RE+ o RP+), inhibidores de la aromataasa, tratamientos hormonales (pacientes RE+ o RP+), trastuzumab (pacientes HER2+) o quimioterápicos (sobre todo en pacientes RE-, RP- y HER2-: cáncer de mama triple negativo) fundamentalmente taxanos como el PTX o el docetaxel y antraciclinas como doxorubicina (DOX) y epirrubicina o alquilantes como la ciclofosfamida en combinación con docetaxel. En estadios tempranos más extendidos también puede aplicarse la terapia sistémica preoperatoria o neoadyuvante para reducir el volumen del tumor y permitir la cirugía, a base de quimioterapia con taxanos y antraciclinas (Bear y cols., 2003; NIH, 2017b; Vriens y cols., 2013).

En el caso del cáncer de mama localmente avanzado o inflamatorio el tratamiento también será con intención curativa. Primeramente, se administra quimioterapia preoperatoria y en función de la respuesta al tratamiento se elige entre cirugía conservadora o radical de la mama con disección del nódulo linfático axilar, aunque en el caso de cáncer de mama inflamatorio se desaconseja la cirugía

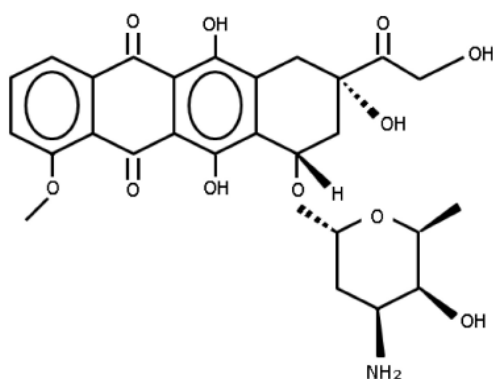
conservadora. Tras la operación, se procede al tratamiento postoperatorio mediante radioterapia, quimioterapia y terapia hormonal para pacientes RE+ y RP+ (NIH, 2017b).

En cuanto al cáncer de mama metastásico, la intención del tratamiento será paliativa, aunque se produzca una mejora en la supervivencia incluso a largo plazo (Greenberg y cols., 1996). En este caso, el tratamiento se basa en terapia hormonal (tamoxifeno e inhibidores de la aromatasa generalmente para pacientes postmenopáusicas), terapias dirigidas (trastuzumab, lapatinib, etc.), quimioterapia (antraciclinas, taxanos, fluoropirimidinas, etc.) y cirugía más radioterapia en metástasis sintomáticas limitadas (NIH, 2017b).

## 1.2. Fármacos antitumorales: mecanismo de acción y limitaciones

### 1.2.1. Doxorrubicina

La DOX es un antibiótico hidrofóbico de la familia de las antraciclinas que posee efecto antitumoral frente numerosos tipos de tumores sólidos como mama o pulmón y enfermedades hematopoyéticas (Weiss, 1992) (Figura 3).



**Figura 3.** Molécula de DOX (Cabeza y cols., 2013).

La primera formulación comercial de la DOX fue la Adriamicina<sup>®</sup> y se aprobó por la *Food and Drug Administration* (FDA) en 1974 como clorhidrato de DOX (DOX HCl) que es su forma soluble (Cagel y cols., 2017; NIH, 2017c). Es capaz de inducir la muerte de la célula tumoral a través de tres vías. Su principal mecanismo de acción se basa en su capacidad de actuar como agente intercalante del ADN, que inhibe la síntesis de ADN y ARN bloqueando los procesos de replicación y transcripción e incrementando la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en las mitocondrias (Doroshov, 1983; Govender y cols., 2014; Tacar y cols., 2013; Thorn y cols., 2011). En segundo lugar, la DOX interacciona con la enzima topoisomerasa 2 (Top2) inhibiéndola y dando lugar a daños en el ADN que conllevan la muerte celular (Vejpongsa y Yeh, 2014; Zhang y cols., 2012a). Finalmente, es capaz de inhibir la migración celular y la formación de metástasis

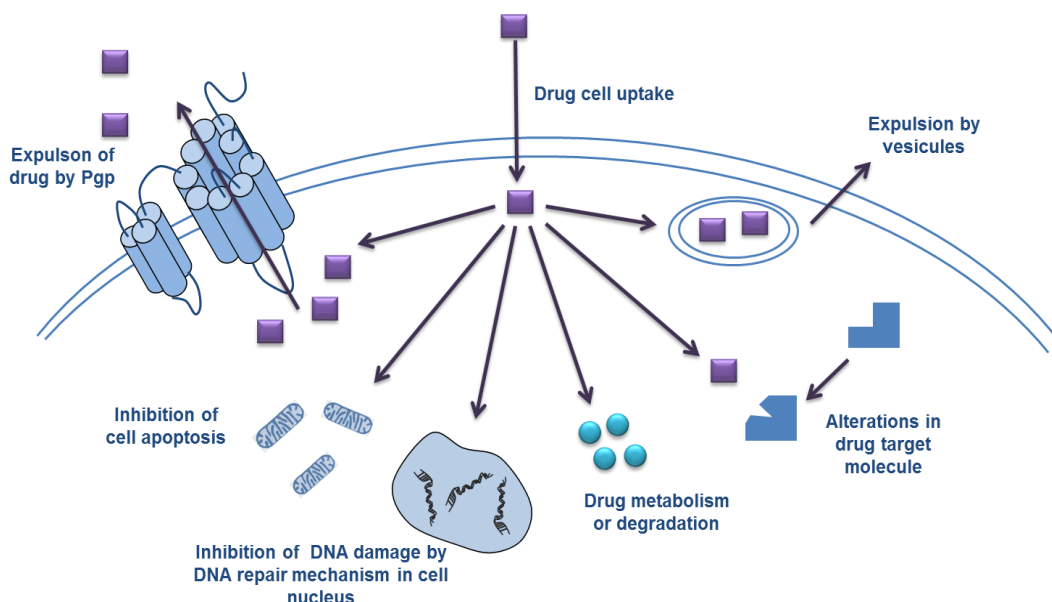


mediante la inhibición de la vía de señalización del factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF- $\beta$ 1), que se encuentra sobreactivada en las células tumorales y puede ser responsable de favorecer la migración celular y por ende la metástasis (Filyak y cols., 2008; Panis y cols., 2013).

A pesar de su elevado efecto antitumoral, presenta serias limitaciones derivadas de su inespecificidad y de los efectos secundarios que provoca en los pacientes. Uno de los principales efectos secundarios es la producción de cardiotoxicidad que además se ve agravada en la terapia combinada con taxanos (Salvatorelli y cols., 2006). Aunque no se conoce exactamente el porqué de esta elevada cardiotoxicidad en pacientes tratados con DOX, se manejan algunas hipótesis (Ghigo y cols., 2016; Kankeu y cols., 2017). Como hemos comentado anteriormente la DOX interacciona con la enzima Top2, concretamente sobre la isoenzima Top2 $\alpha$ , que se encuentra sobreexpresada en células con altas tasas de proliferación como son las células tumorales. Sin embargo, la DOX también interacciona con la isoenzima Top2 $\beta$  que se ha encontrado sobreexpresada en ciertos tejidos como el tejido cardíaco de ratón (Capranico y cols., 1992). De hecho, la expresión de Top2 $\beta$  en bajos niveles en células cardíacas está relacionado con una menor cardiotoxicidad y una reducción de la producción de ROS (Vejpongsa y Yeh, 2014; Zhang y cols., 2012a). La acción de la DOX sobre las mitocondrias de las células cardíacas parece verse favorecida por la afinidad de ésta por determinados lípidos (cardiolipinas) de la membrana interna mitocondrial abundantes en tejido cardíaco. Algunos autores plantean la hipótesis de que la cardiotoxicidad es provocada por una acumulación de hierro en la mitocondria de las células cardíacas inducida por el tratamiento con DOX (Ichikawa y cols., 2014; Rahman y cols., 2007).

Otras limitaciones para el uso en clínica de la DOX, son su baja solubilidad en agua y la existencia de células que son resistentes al tratamiento con este fármaco y a fármacos quimioterápicos en general, fenómeno que se conoce como fenotipo de resistencia a multidrogas (MDR) (Figura 4) (Jeong y cols., 2010; Zhao y cols., 2007). Esta resistencia puede estar presente en las células antes de la exposición al fármaco o bien puede adquirirse tras el tratamiento (Fodale y cols., 2011; Yadav y

cols., 2009). Las células con fenotipo MDR presentan alteraciones en la manera de metabolizar el fármaco o bien tienen sobreexpresados determinados transportadores de membrana como es el caso de los transportadores de membrana dependientes de ATP o transportadores ABC (proviene de *ATP binding cassette*). Dentro de esta familia de proteínas, las que presentan una relevancia clínica más importante en la resistencia a la quimioterapia y en concreto a la DOX es la P-glicoproteína (P-GP), la proteína de resistencia de cáncer de mama (BCRP), y la proteína de resistencia a multidrogas 1 (MRP1) (Choudhuri y Klaassen, 2006; Cole, 2014; Davis y cols., 2015; Mao y Unadkat, 2015; Wesolowska, 2011).



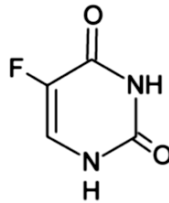
**Figura 4.** Mecanismos de resistencia a multidrogas (MDR) más relevantes (Ortiz y cols., 2017).

### 1.2.2. 5-Fluorouracilo

El 5-fluorouracilo (5-FU) es un fármaco quimioterápico ampliamente usado para el tratamiento del cáncer colorrectal, además de en otros cánceres gastrointestinales, cáncer de mama y cáncer de cabeza y cuello. En 1954 se obtuvieron resultados que evidenciaban la actividad antitumoral del 5-FU, pero fue a finales de los años 50 cuando se elucidó el mecanismo de acción de los derivados 5-fluoropirimidina del antimetabolito 5-FU (Heidelberger y cols., 1957; Rutman y

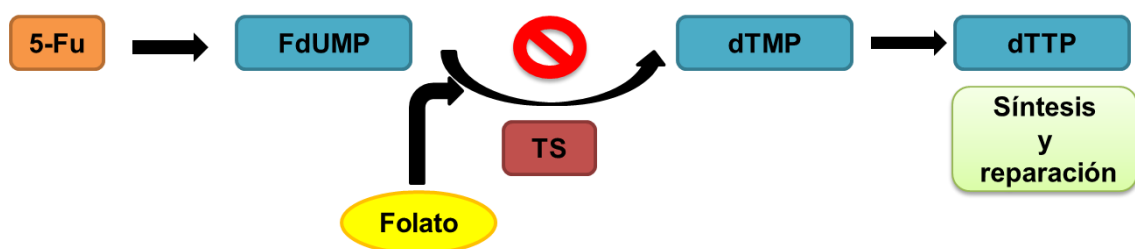
cols., 1954). Finalmente fue aprobado su uso en clínica en el año 1962 por la FDA (NIH, 2017c).

Es un análogo de la pirimidina, concretamente una pirimidina fluorada y un inhibidor de la enzima timidilato sintasa (TS) (Zhang y cols., 2008) (Figura 5).



**Figura 5.** Molécula de 5-FU (Prados y cols., 2013).

Esta enzima metiltransferasa forma parte de la ruta de síntesis de la desoxitimidina monofosfato (dTMP) a partir de desoxiuridina monofosfato (dUMP) utilizando como donador del grupo metilo al 5,10-metilen-tetrahydrofolato (Carreras y Santi, 1995). Concretamente, el mecanismo de acción del 5-FU se basa en que una vez en el interior celular se transforma en metabolitos activos como la fluorodesoxiuridina monofosfato, fluorodesoxiuridina trifosfato y la fluorouridina trifosfato. Éstos, inhiben a la enzima TS lo que da lugar a una falta del nucleótido timidina trifosfato impidiendo así los procesos de replicación y transcripción celular y produciendo en consecuencia la muerte celular. Además, los metabolitos del 5-FU también son capaces de incorporarse al ADN y al ARN produciendo también la muerte celular (Ghiringhelli y Apetoh, 2015; Wohlhueter y cols., 1980; Zhang y cols., 2008) (Figura 6). Recientemente se ha demostrado que el 5-FU podría ejercer un efecto inmunomodulador ya que es capaz de sensibilizar a las células tumorales frente a linfocitos T citotóxicos CD8+ (Bergmann-Leitner y Abrams, 2001).



**Figura 6.** Mecanismo de acción del 5-FU sobre la enzima TS (Prados y cols., 2013).

El efecto antitumoral del 5-FU se encuentra limitado como consecuencia de su rápido metabolismo y de su excreción a través del riñón, de manera que solo una pequeña fracción (un 5% del fármaco administrado) consigue alcanzar el tumor (Casale y cols., 2004; Chen y cols., 2012). Esto se debe a la acción de la enzima dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD) que forma parte de la ruta catabólica de las pirimidinas. Esta enzima, se expresa en gran manera en el hígado y es responsable de la metabolización y eliminación de hasta el 80% del 5-FU administrado (Borràs y cols., 2012). De hecho, en pacientes que tienen un déficit congénito de DPD y se les administra un tratamiento con 5-FU, experimentan unos efectos secundarios similares a los de una sobredosis (fiebre, mucositis, estomatitis, diarrea, etc.) pudiendo llegar incluso a aparecer complicaciones neurológicas y la muerte (López Sobella y cols., 2008).

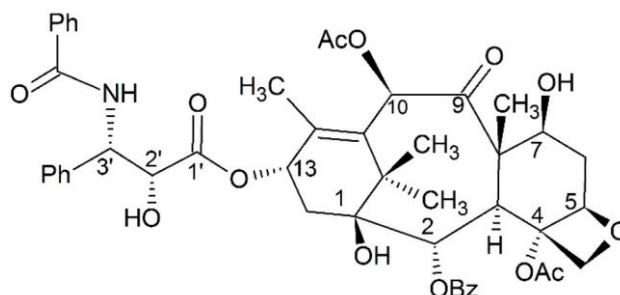
Por otra parte, muchas células tumorales son resistentes al tratamiento con este fármaco debido al fenotipo MDR (Song y cols., 2012). En este caso la resistencia suele estar relacionada con una sobreexpresión de la TS que puede estar inducida por el propio tratamiento con 5-FU. Inicialmente el tratamiento con 5-FU produce una reducción de los niveles de TS, seguida más tarde de una fuerte elevación (2 a 5 veces) (Johnston y cols., 1995; Peters y cols., 2002).

Por último, su inespecificidad por los tejidos tumorales da lugar a la aparición de efectos secundarios en gran medida gastrointestinales y otros que abarcan la mielosupresión, cardiotoxicidad y excepcionalmente neurotoxicidad (Kelly y cols., 2013; López Sobella y cols., 2008; Ribeiro y cols., 2016; Sorrentino y cols., 2012).

### **1.2.3. Paclitaxel**

El paclitaxel (PTX) o su fórmula comercial denominada taxol, es un fármaco usado principalmente en el tratamiento del cáncer de mama, ovario, pulmón y sarcoma de Kaposi (Redig y McAllister, 2013; Weaver, 2014). El taxol fue aislado por primera vez de la planta *Taxus brevifolia* y se caracterizó e identificó su efecto

antitumoral entre los años 60 y 70 (Wani y cols., 1971) (Figura 7). Sin embargo, no es hasta 1992 cuando la FDA aprueba el uso de este fármaco inicialmente en cáncer de ovario (NIH, 2017c; Weaver, 2014).



**Figura 7.** Molécula de PTX (Meng y cols., 2016).

Su mecanismo de acción se basa en la unión a la  $\beta$ -tubulina que es una de las subunidades que junto con la  $\alpha$ -tubulina forman los microtúbulos. La unión a esa subunidad impide el dinamismo de los microtúbulos inhibiendo su polimerización-despolimerización. De esta manera se estabilizan, bloqueando la correcta formación del huso mitótico y produciendo un arresto del ciclo celular en la fase G<sub>2</sub>/M que da lugar a la apoptosis (Jordan y Wilson, 2004; Prota y cols., 2013; Rowinsky, 1997).

El tratamiento del cáncer por quimioterapia con PTX presenta tres limitaciones importantes. La primera viene dada por la falta de especificidad de este fármaco tal y como pasa con otros fármacos antitumorales. A pesar de que el PTX actúa sobre todo en células con altas tasas de proliferación celular, éste también afecta a células que tienen bajas tasas de proliferación como por ejemplo las neuronas, degenerando sus axones y dando lugar a efectos secundarios dependientes de la dosis en pacientes, como el dolor neuropático y reacciones de hipersensibilidad (Gornstein y Schwarz, 2014).

La segunda limitación son los solventes que en muchos casos son necesarios para solubilizar fármacos insolubles. Las sustancias utilizadas para solubilizar el PTX son el aceite de ricino polietoxilado o Cremophor<sup>®</sup> EL y el etanol (50% v/v) (©Vidal Vademecum, 2017; Adams y cols., 1993). El Cremophor<sup>®</sup> EL es una sustancia tóxica y produce efectos secundarios severos como son hipersensibilidad aguda e inmunestimulación sistémica (Weiszhar y cols., 2012). Esto hace necesario

que los pacientes reciban tratamientos con corticoides y antihistamínicos antes de comenzar el tratamiento quimioterápico con PTX y que los tiempos de infusión del mismo sean muy largos (Michaud, 1997; Surapaneni y cols., 2012; Weiss y cols., 1990). Además, se ha demostrado que el Cremophor® EL limita la biodistribución de paclitaxel y su acumulación en el tejido tumoral, debido a la formación de micelas polares en el plasma donde quedan incluidas las moléculas del antineoplásico. Por este motivo, el comportamiento farmacocinético de este agente antitumoral es no lineal y no existe una relación directamente proporcional entre la dosis administrada y la actividad antitumoral (Miele y cols., 2009).

La tercera limitación viene dada por el fenotipo MDR que también afecta al tratamiento con PTX puesto que este fármaco es sustrato de la P-GP, que lo expulsa del interior celular mediante un mecanismo dependiente de ATP, haciendo ineficaz el tratamiento (Leonessa y Clarke, 2003). Para evitar esta resistencia se han intentado administrar conjuntamente con el PTX sustancias inhibitoras de la actividad de P-GP como el verapamilo. Sin embargo, los resultados no son muy alentadores ya que incrementa la toxicidad del PTX y altera su farmacocinética (Berg y cols., 1995).

### **1.3. Nanomedicina del cáncer**

La nanotecnología es la ciencia que diseña, caracteriza, sintetiza y estudia los materiales de tamaño en escala nanométrica. Abarca diferentes disciplinas (química, física, ingeniería, biología, medicina, etc.), lo que permite su aplicación en diferentes campos (Sahoo y cols., 2007). Recientemente, la nanotecnología aplicada a la medicina ha surgido como una nueva estrategia terapéutica para mejorar el pronóstico de ciertas enfermedades como el cáncer. La nanomedicina en el campo de la oncología implica el uso de nanomateriales para el diagnóstico, seguimiento y tratamiento del cáncer (Tong y Kohane, 2016; Doello y cols., 2015). De esta manera, las nanoformulaciones pueden desarrollarse para transportar fármacos, ácidos nucleicos, proteínas para el tratamiento del cáncer o también pueden transportar agentes de imagen como fluoróforos o núcleos magnéticos para su diagnóstico, e incluso pueden sintetizarse nanoformulaciones que combinen el tratamiento con el diagnóstico (teragnosis). El uso de nanoformulaciones en aplicaciones oncológicas presenta una serie de ventajas respecto a las aplicaciones clásicas (Shi y cols., 2017):

- Aumentan la eficacia de los fármacos antitumorales y/o reducen su toxicidad.
- Permiten la liberación del fármaco en un tejido, célula u órgano específico.
- Mejoran las propiedades farmacéuticas de los fármacos como son su vida media en circulación, solubilidad, estabilidad y concentración en el tumor.
- Permite una liberación del fármaco sostenida o activada por un estímulo.
- Facilitan la liberación de macromoléculas como ADN, siARN, mARN y proteínas.
- Posibilitan la liberación simultánea de varios fármacos para mejorar el efecto terapéutico y superar los mecanismos de resistencia celulares.
- Permiten el paso de los fármacos a través de barreras, en ocasiones infranqueables, como la barrera gastrointestinal o la barrera hematoencefálica.
- Mejoran la sensibilidad del diagnóstico y la visualización del cáncer.

- Proporcionan nuevas estrategias para el desarrollo de vacunas sintéticas.
- Permiten el uso de determinados nanomateriales con propiedades terapéuticas inherentes una vez que son estimulados como en el caso de las NPs de oro u óxido de hierro.

Todas estas ventajas convierten a las NPs en una nueva estrategia terapéutica y diagnóstica en el cáncer que permite mejorar el pronóstico de los pacientes afectados de esta patología.

### **1.3.1. Propiedades de las nanoformulaciones**

#### ***1.3.1.1. Tamaño, forma y superficie***

El tamaño de las nanoformulaciones va a estar directamente relacionado con su acumulación en los tejidos tumorales, siendo ésta por tanto una de las propiedades físico-químicas más importantes. En este sentido, para la aplicación biomédica debe encontrarse el tamaño óptimo de la nanoplataforma siendo además compatible con el resto de propiedades físico-químicas como la forma o la carga de superficie. Ese tamaño debería oscilar entre los 2 y 200 nm, ya que las de mayor tamaño podrían obstruir capilares sanguíneos o ser eliminadas por el sistema reticuloendotelial y las más pequeñas podrían ser excretadas por los riñones (Choi y cols., 2007; Duan y Li, 2013; Moghimi y cols., 2001; Yang y cols., 2012).

En cuanto a la forma, normalmente las nanoformulaciones adquieren una morfología esférica, ya sean NPs, liposomas, micelas, nanocápsulas, etc. Sin embargo, es interesante el estudio de cómo nanoplataformas de diferentes formas pueden mejorar la eficiencia de la misma respecto a las tradicionales con forma redondeada, como por ejemplo, mejorando su toxicidad celular. Las formas pueden ser muy variadas: disco, filamentos, tubos, agujas o incluso arborescente como en el caso de los dendrímeros (Stoehr y cols., 2011; Truong y cols., 2015).



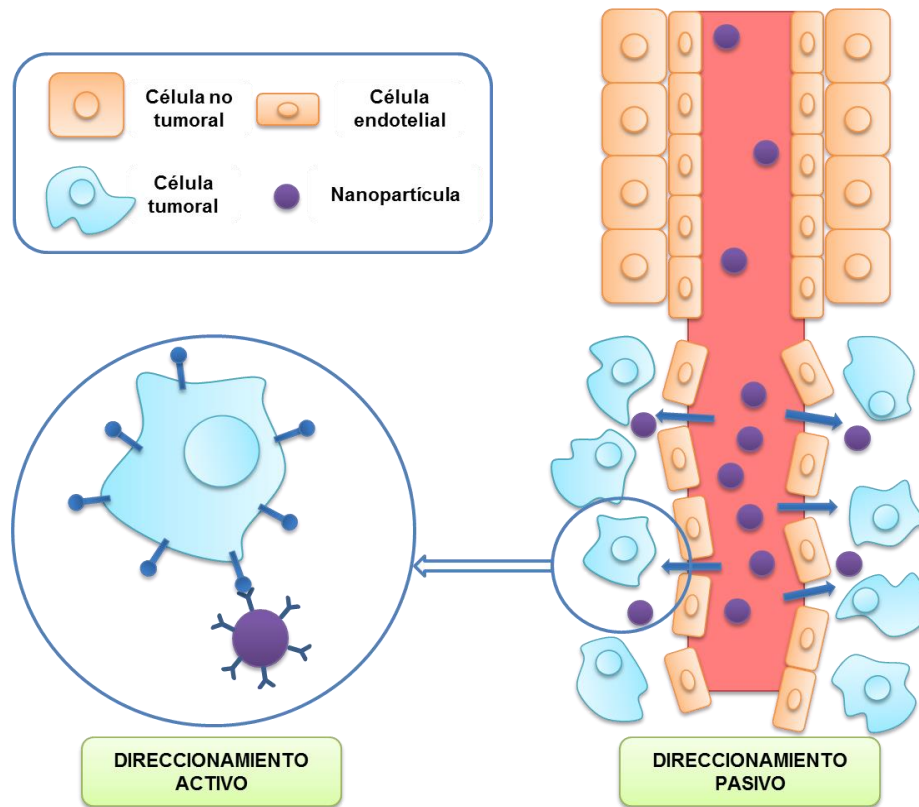
La superficie de la nanoplataforma va a definir la relación que va a mantener con el ambiente que la rodee, como por ejemplo el tiempo de vida media en el flujo sanguíneo o la interacción con las células (Schipper y cols., 2009; Verma y Stellacci, 2010). La carga de superficie es un aspecto fundamental en este sentido ya que las nanoformulaciones que no tienen carga neutra mejoran la internalización celular si se comparan con NPs con carga neutra (Kettler y cols., 2014).

Sin embargo, la carga por sí sola no es una propiedad que defina el comportamiento de la nanoplataforma ya que se ha observado una mejor internalización celular de NPs con carga positiva, pero un mayor tiempo de vida media en el torrente sanguíneo y mejor entrada en el tejido tumoral con NPs con carga negativa (Kenzaoui y cols., 2012; Xiao y cols., 2011). Por lo tanto, es una adecuada combinación de las propiedades físico-químicas de las nanoformulaciones como son tamaño, forma y carga lo que va a determinar que tengan un buen comportamiento para poder ser utilizadas con éxito en el tratamiento antitumoral (Duan y Li, 2013).

### ***1.3.1.2. Direccinamiento***

El direccinamiento permite la acumulación específica de las moléculas transportadas por las nanoformulaciones en los tejidos tumorales, evitando su incorporación a los tejidos sanos, Esta propiedad les confiere dos grandes ventajas, en primer lugar disminuye los efectos secundarios producidos por el tratamiento quimioterápico, que reducen en gran medida la calidad de vida del paciente y en ocasiones pueden ser fatales, y en segundo lugar incrementan la cantidad de fármaco en el tejido tumoral consiguiendo una mejora de su actividad antitumoral.

En nanomedicina, se diferencian dos tipos de direccionamiento (Figura 8).



**Figura 8.** Tipos de direccionamiento de las NPs hacia los tejidos tumorales (Doello y cols., 2015).

Por un lado, encontramos el direccionamiento pasivo propio del tratamiento de los tumores sólidos, en el que son las propias características físico-químicas de las nanoformulaciones las que hacen que se acumulen más en el tejido tumoral, no necesitando éstas ninguna modificación especial en su estructura. Este direccionamiento se produce gracias al efecto de permeabilidad y retención aumentadas (EPR), que fue descrito por Matsumura y Maeda (1986) al observar que un polímero conjugado con neocarcinoestatina se acumulaba más en los tejidos tumorales que la neocarcinoestatina por sí sola (Matsumura y Maeda, 1986). El efecto EPR se basa en la mayor extravasación de moléculas de cierto tamaño, normalmente mayores de 7 nm y macromoléculas, debido a los procesos de angiogénesis tumoral, a un mal drenaje linfático y a una producción de mediadores vasculares en los tejidos tumorales. Las características requeridas para que se

produzca el efecto EPR quedan resumidas en la Tabla 9. Respecto a la angiogénesis, los nuevos vasos sanguíneos que se forman en los tumores tienen una estructura aberrante donde se pueden observar grandes brechas, huecos o *gaps* entre las células endoteliales, lo que unido a la liberación excesiva de mediadores vasculares (monóxido de carbono, monóxido de nitrógeno, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), prostaglandinas o la bradiquinina) en estos tejidos incrementa la permeabilidad de los vasos sanguíneos y favorecen el efecto EPR. Finalmente, el mal drenaje linfático en los tejidos tumorales hace que esas macromoléculas se eliminen más lentamente en comparación con un tejido normal (Bertrand y cols., 2014; Fang y cols., 2012; Maeda, 2012; Maeda y cols., 2003, 2016; Nakamura y cols., 2015; Wu y cols., 2001).

**Tabla 9.** Propiedades de las nanoformulaciones necesarias para que se produzca el efecto EPR.

Propiedad	Descripción
<b>Biocompatibilidad del nanomaterial</b>	No debe aparecer: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Interacción con componentes sanguíneos</li> <li>- Interacción con vasos sanguíneos</li> <li>- Antigenicidad</li> <li>- Eliminación por el sistema reticuloendotelial</li> <li>- Lisis celular</li> </ul>
<b>Tamaño molecular</b>	- Deben ser mayores de 40 kDa para no ser eliminados por aclaramiento renal
<b>Carga de superficie</b>	- Ligeramente negativa, casi neutra
<b>Tiempo</b>	- Más de algunas horas en circulación sistémica en ratones - La acumulación se observa a los 30 min
<b>Tiempo de retención del fármaco</b>	- Desde horas a días, incluso semanas

A pesar de que el efecto EPR puede observarse de forma generalizada en la mayoría de los tumores sólidos, se ve reducido en los tumores que poseen pobre vascularización como es el caso de de los tumores de próstata y páncreas. También puede verse afectado debido a la heterogeneidad de los tejidos tumorales y la obstrucción del flujo sanguíneo por coagulación o formación de trombos en tejidos necróticos tumorales (Maeda y cols., 2016).

Por otro lado, encontramos el direccionamiento activo propio de tumores sólidos y no sólidos en el que, al contrario del caso anterior, se añade algún tipo de modificación al nanomaterial que lo hace más específico por la célula tumoral. Normalmente estas modificaciones se realizan en la superficie de la nanoformulación mediante la adición de alguna molécula como anticuerpos o ligandos que son específicos para células diana tumorales, siendo por tanto estas NPs funcionalizadas. En el caso de tumores sólidos, las nanoformulaciones se acumulan en el tejido tumoral mediante direccionamiento pasivo y una vez allí se unen de manera específica al receptor o ligando diana de membrana. Estas dianas suelen estar sobreexpresadas en células tumorales o en células endoteliales de los vasos sanguíneos de los tumores, pero no en las células sanas. De esta manera se consigue una internalización del nanosistema, así como de la molécula que transporta mucho más específico y por tanto mucho más eficiente, sobre todo en determinados tipos de cáncer donde como hemos comentado anteriormente el efecto EPR puede no ser suficiente (Byrne y cols., 2008; Maeda y cols., 2016). Otro aspecto importante a tener en cuenta es que el nanosistema funcionalizado debe llegar a estar cerca de la célula diana para interactuar con ella y poder realizar el direccionamiento activo (Florence, 2012). Una de las estrategias para aumentar la probabilidad de contacto con las células tumorales es prolongar el tiempo de vida medio en sangre de la nanoformulación (Kamaly y cols., 2012). De ahí que muchos estudios se basen en la síntesis de NPs a partir de proteínas sanguíneas como albúmina o lipoproteínas. Por otro lado, estas proteínas plasmáticas se pueden unir a la superficie de las NPs de forma espontánea cuando van por el torrente sanguíneo y puede influir en el direccionamiento de las mismas (Hadjidemetriou y cols., 2015).

Se han utilizado muchos tipos de moléculas para el direccionamiento activo como polisacáridos, anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos, ácidos nucleicos, ácido fólico, proteínas, péptidos, etc. (Byrne y cols., 2008; Saha y cols., 2010; Zhong y cols., 2014). Las moléculas más usadas han sido los anticuerpos monoclonales, así como fragmentos de los mismos debido a su gran especificidad. Sin embargo, su uso en nanomedicina es complejo ya que hay que solventar una serie de problemas como por ejemplo el tamaño. Los anticuerpos, son moléculas de

gran tamaño, lo que dificulta su incorporación en la superficie de los nanosistemas y aumenta considerablemente su tamaño, con lo que es recomendable solo usar pequeños fragmentos de la región hipervariable o Fab (Allen, 2002; Kirpotin y cols., 2006). Además, el anticuerpo puede generar inmunogenicidad haciendo que el nanosistema sea eliminado por el sistema inmune alterando su efecto terapéutico y su biodistribución (Weinberg y cols., 2005). Por último, los anticuerpos son moléculas sensibles a factores como cambios de temperatura, enzimas, concentración de sales o presencia de solventes orgánicos, lo que dificulta aún más el proceso de preparación de NPs funcionalizadas con anticuerpos (Bertrand y cols., 2014). A pesar de todas estas limitaciones, se han desarrollado numerosos nanosistemas funcionalizados con anticuerpos que están siendo testados a nivel de investigación básica con prometedores resultados como las NPs de ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA) cargadas con rapamicina y funcionalizadas con anticuerpos para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que mejoran su incorporación intracelular hasta 13 veces en comparación con las no funcionalizadas (Acharya y cols., 2009). Así como NPs de PLGA cargadas con tamoxifeno y funcionalizadas con un anticuerpo que reconoce Her2 para cáncer de mama demostrando también una incorporación de hasta un 35% más en comparación con NPs sin anticuerpo, así como un aumento del efecto citotóxico del fármaco (Vivek y cols., 2014).

Actualmente, existen nanoformulaciones funcionalizadas con anticuerpos que ya están en ensayos clínicos, siendo la más relevante una de las primeras nanoformulaciones aprobadas para su uso en clínica el Doxil<sup>®</sup>/Caelyx<sup>®</sup> (liposomas pegilados cargados con DOX), al que además se le incorpora un fragmento de la región Fab del anticuerpo anti-EGFR cetuximab (Erbix<sup>®</sup>). El ensayo clínico en fase I se realizó en 26 pacientes con sobreexpresión de EGFR en sus tumores con buenos resultados (incluida una respuesta completa al tratamiento) que garantizan su continuación hacia la fase II (Mamot y cols., 2012). Otras dos nanoformulaciones funcionalizadas con anticuerpos que se encuentran en ensayos clínicos (fase I) son MCC-465 y SGT-53. El primero es un liposoma con una cubierta de polietilenglicol (PEG), cargado con DOX y funcionalizado con un fragmento de la región Fab del

anticuerpo GAH que es específico para cáncer de estómago. Este liposoma fue bien tolerado por los pacientes estableciéndose la dosis para la fase II (Matsumura y cols., 2004). El segundo es un liposoma funcionalizado con un fragmento del anticuerpo para el receptor de la transferrina que lleva un supresor de la proteína p53. Los resultados mostraron una buena liberación del supresor específicamente en las células tumorales tanto en el tumor primario como en metástasis (Senzer y cols., 2013). Como comentábamos anteriormente, otras moléculas usadas para el direccionamiento activo de nanoformulaciones son proteínas como la transferrina y la lactoferrina o péptidos como GE11 (reconocido de manera específica por EGFR), ácido fólico y ácido hialurónico (Cho y cols., 2011; Gan y Feng, 2010; Milane y cols., 2011; Su y cols., 2014; Zhang y cols., 2010). Además, también se considera direccionamiento activo el introducir algún factor en la nanoformulación que haga que libere la molécula transportada bajo determinadas condiciones como es el caso de nanoformulaciones sensibles a pH (generalmente ácido) mediante la adición de grupos protonables a su estructura (Kanamala y cols., 2016).

Por último, las nanoformulaciones también pueden ser funcionalizadas mediante la adición de núcleos magnéticos. Un ejemplo lo forman las micelas magnéticas de PCL y PEG cargadas con DOX, que consiguieron un aumento en la acumulación de fármaco en los tejidos tumorales de ratones con hepatocarcinoma murino inducido con la línea celular H22 (Tang y cols., 2016). Otro ejemplo lo constituyen las NPs con núcleos formados por óxido de hierro que además transportan micelas poliméricas de ácido hialurónico. Estas NPs resultaron ser tóxicas para las células tumorales de cáncer de colon humano HT29, pero no lo fueron para células no tumorales humanas en cocultivo con las anteriores. Además, mediante imágenes obtenidas por resonancia magnética nuclear de ratas con glioblastoma tratadas con estas NPs, pudieron demostrar una mayor acumulación de las mismas en los tejidos tumorales (Smejkalova y cols., 2014).

### **1.3.1.3. Biodegradabilidad**

La biodegradabilidad es una propiedad fundamental para el desarrollo de una nanoformulación para aplicaciones biomédicas, ya que permite en la mayoría de los casos la liberación de la molécula terapéutica transportada. Sin embargo, es necesario hacer la distinción entre los términos biodegradable, biorreabsorbible, bioerodible y bioabsorbible ya que, aunque una nanoformulación sea biodegradable no necesariamente tiene que ser ninguna de las tres siguientes.

Entendemos por biodegradable, aquel material sólido cuya estructura comienza a romperse y dispersarse *in vivo* al ser atacada por elementos biológicos, pero no es totalmente eliminada del organismo, excluyendo la degradación que pueden producir microorganismos de la microbiota humana o ambientales.

En cambio, los materiales biorreabsorbibles sólidos, una vez que se degradan y se alejan de su sitio de acción son totalmente eliminados del organismo, tanto los productos iniciales, como los subproductos de la degradación, sin producir efectos secundarios, debido a que son eliminados mediante vías naturales por simple filtración o a través de su metabolización. El uso pues de este término, implica la eliminación total del material introducido en el organismo.

Por otra parte, el material sólido bioerodible es aquel que sufre una bioerosión o degradación de su superficie y además es reabsorbido *in vivo*. Por lo tanto, este concepto también implica la eliminación total del material, sin la producción de efectos secundarios.

Por último, el término bioabsorbible se refiere a aquellos materiales sólidos que pueden disolverse en los fluidos corporales sin necesidad de romper la estructura del polímero o de disminuir su peso molecular. Estos polímeros pueden ser también biorreabsorbibles siempre y cuando las moléculas disueltas sean excretadas (Vert y cols., 1992; Woodruff y Hutmacher, 2010).

#### **1.3.1.4. Toxicidad**

Esta propiedad es muy importante y un factor limitante para la aplicación de la nanomedicina en el tratamiento del cáncer cuyo estudio está actualmente en auge. Normalmente para la síntesis de los nanomateriales se suelen utilizar componentes que han demostrado ampliamente no ser tóxicos en humanos y por tanto ser bioseguros, como por ejemplo, los lípidos que forman parte de los liposomas, el PEG o NPs de PLGA o poli (ácido láctico) (PLA) (Estella-Hermoso de Mendoza y cols., 2009; Kumari y cols., 2010; Schwendener, 2007). Sin embargo, para el desarrollo de nuevos nanotransportadores es necesario estudiar y conocer a fondo su umbral de toxicidad (Scheinberg y cols., 2010).

Los órganos más afectados por la toxicidad de las nanoformulaciones son aquellos que están más relacionados con el metabolismo, como el hígado y también los que tienen una mayor irrigación sanguínea, como los pulmones o los riñones (Aillon y cols., 2009). La toxicidad también va a variar en función de otros factores que vienen definidos fundamentalmente por la dosis y también por las propiedades físico-químicas de las nanoformulaciones como la carga de superficie, el tamaño o la forma, ya que debido a su pequeño tamaño tienen una gran superficie respecto al volumen que ocupan y por tanto son más “reactivas” ya que tienen una mayor probabilidad de interactuar con las células y otros componentes biológicos (Lanone y Boczkowski, 2006; Sajid y cols., 2015; Tarantola y cols., 2011).

La administración de las nanoformulaciones puede dar lugar a la producción de ROS a nivel tanto intracelular como extracelular, que producen estrés oxidativo pudiendo dañar a la célula mediante peroxidación lipídica de su membrana o alterando su funcionalidad (Fu y cols., 2014; Suh y cols., 2009). Además, las NPs de gran tamaño pueden producir daños mecánicos irreversibles en las membranas celulares cuando son internalizadas e incluso daños en orgánulos citoplasmáticos como el retículo endoplasmático, el núcleo o lisosomas (Suh y cols., 2009). Asimismo, también puede producirse toxicidad alterando la expresión génica de las células o incluso por daños directos en el ADN. Por ejemplo, se ha observado que determinadas formulaciones catiónicas son capaces de afectar a la diferenciación y



proliferación celular, así como la expresión de genes inductores de la apoptosis en células epiteliales humanas (Curtis y cols., 2006; Vega-Villa y cols., 2008). Adicionalmente se han podido observar daños oxidativos en el ADN en tejidos de hígado y riñón de ratones tratados durante una semana con NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Ma y cols., 2012). Otro de los aspectos importantes a valorar es la toxicidad de estos nanomateriales a nivel ambiental, ya que muchos de sus productos son liberados al medio tras su administración en humanos. Por lo tanto, sería necesario conocer el comportamiento de estas nanoformulaciones en el ambiente, desarrollar metodologías y dispositivos que permitan medir los niveles de estos materiales y caracterizarlos y asegurar la seguridad del uso de la nanotecnología (Curtis y cols., 2006).

Los nanomateriales en los que más se centran los estudios de toxicidad son sobre todo NPs metálicas de diferente naturaleza ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{CO}_3\text{O}_4$ ,  $\text{CuO}$ , etc.), NPs de sílice y los puntos cuánticos (Akhtar y cols., 2010; Valdiglesias y cols., 2016; Wang y cols., 2011; Winnik y Maysinger, 2013). Siendo las NPs de óxido de hierro las más estudiadas, no hay un consenso claro sobre su mecanismo de toxicidad, lo que se debe en gran parte a la alta variabilidad de NPs entre los diferentes estudios. Sin embargo, se considera que las NPs de óxido de hierro tienen una toxicidad baja, aunque se necesitan aún muchos más estudios para confirmarlo, sobre todo a nivel epidemiológico que actualmente son casi inexistentes (Valdiglesias y cols., 2016). A pesar de esto, algunas formulaciones han sido aprobadas por la FDA para su uso en clínica como el Ferumoxytol (Feraheme<sup>®</sup>) para el tratamiento de anemia por deficiencia de hierro (Arami y cols., 2015; Lu y cols., 2010).

## 1.3.2. Nanoformulaciones utilizadas en el tratamiento del cáncer

### 1.3.2.1. Tipos de nanoformulaciones

Existe un amplio rango de tipos de nanoformulaciones enfocadas al tratamiento del cáncer con la misión de obtener un transportador biodegradable que sea capaz de transportar la/s molécula/s de interés de manera específica a los tejidos tumorales, donde se libera de manera continua y sostenida, siendo las nanoformulaciones transportadoras de fármacos antitumorales las más estudiadas. Un resumen de todos estos tipos de nanoformulaciones queda reflejado en la tabla 10 (Alam y cols., 2015; Cabeza L, 2016; Ortiz y cols., 2017). A continuación, comentaremos los tipos más relevantes en la nanomedicina del cáncer:

- **Liposomas.** Los liposomas son vesículas artificiales de forma esférica formadas por una bicapa de fosfolípidos. Son estructuras anfipáticas pueden transportar sustancias tanto solubles (en el interior y el exterior del liposoma), como insolubles en agua (dentro de la membrana). Su tamaño puede variar desde varios nanómetros hasta micrómetros, pero en nanomedicina se suelen usar liposomas entre 50 y 450 nm (Bozzuto y Molinari, 2015; Etheridge y cols., 2013). Son una de las nanoformulaciones más estudiadas en nanomedicina por su buena biocompatibilidad debido a la naturaleza de sus componentes similares a la bicapa lipídica celular y también por su capacidad para transportar varios tipos de moléculas con además una elevada capacidad de carga. Sin embargo, su gran tamaño hace que sean fácilmente reconocidos por el sistema reticuloendotelial (Fanciullino y Ciccolini, 2009; Mok y cols., 2009) por lo que normalmente son recubiertos con PEG para evitar ser eliminados y prolongar el tiempo de vida medio en sangre, aumentando la probabilidad de alcanzar el tejido tumoral

(Akbarzadeh y cols., 2013; Mok y cols., 2009). Los liposomas han sido cargados con numerosos tipos de fármacos antitumorales entre los que están la DOX, PTX, oxaliplatino, irinotecán, cisplatinato, daunorrubicina, etc. Entre todas estas variantes que han sido ampliamente estudiadas *in vitro* y en modelos animales, algunas además se encuentran en ensayos clínicos y unas pocas incluso están disponibles en el mercado, siendo ya utilizadas de rutina en clínica (ver siguiente apartado) (Slingerland y cols., 2012).

- ***Nanopartículas poliméricas.*** Las NPs poliméricas son sistemas coloidales constituidos por polímeros biodegradables de tamaño menor de un micrómetro. Estas NPs presentan muchas ventajas en comparación con otras nanoformulaciones debido a que sus características físico-químicas pueden ser controladas y modificadas fácilmente. Son biocompatibles y biodegradables y permiten un alto porcentaje de carga de fármaco, su liberación controlada y sostenida y además lo protegen de su degradación, permitiendo en ocasiones la liberación simultánea de dos fármacos diferentes (Hu y cols., 2010; Paranjpe y Müller-Goymann, 2014; Wang y cols., 2009). Además, el fármaco puede ser transportado inmerso en la matriz o en la superficie del polímero en función del tipo de método de síntesis utilizado, las nanocápsulas, sin embargo, en el núcleo interno de la NP (Parveen y Sahoo, 2008; Sahoo y Labhassetwar, 2003). Entre las NPs poliméricas más estudiadas para el tratamiento del cáncer se encuentran aquellas compuestas por polímeros sintéticos como PLA, PLGA, PEG, poli (ε-caprolactona) (PCL) o poli (butilcianoacrilato) PBCA. También es muy amplio el estudio de aquellas compuestas por elementos naturales como la albúmina, gelatina, heparina, colágeno o quitosano (Jabir y cols., 2012; Wang y cols., 2009). El desarrollo de nuevas NPs poliméricas ha permitido el uso de nuevos fármacos muy insolubles, inestables y de amplia biodisponibilidad como es el caso del resveratrol o la curcumina (Anitha y cols., 2014; Jung y cols., 2015). También se ha investigado su uso en terapias alternativas a la quimioterapia o incluso para el diagnóstico. Por ejemplo, se han empleado co-polímeros de

PEG y quitosano cargados con ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) en terapia fotodinámica. Esta sustancia produce la fotooxidación de materiales biológicos cuando es expuesta a una luz de determinada longitud de onda y dosis. En este caso, al incrementar la concentración de 5-ALA en las células tumorales cuando es transportada por las NPs se consigue una mayor muerte celular que con la 5-ALA libre (Chung y cols., 2013; Gilaberte y cols., 2006). En otro caso se utilizaron NPs de poli (L-ácido láctico) (PLLA) cargadas con verde de indocianina y funcionalizadas con el anticuerpo para el antígeno carcinoembrionario (CEA) y se observó que se unían de manera específica a células de cáncer de colon (Kolitz-Domb y cols., 2014).

- ***Nanopartículas magnéticas.*** Son aquellas sintetizadas con materiales con propiedades magnéticas o paramagnéticas. Una de sus principales características es que pueden ser direccionadas al aplicar un campo magnético externo hacia los tejidos tumorales consiguiendo una mayor acumulación de la molécula terapéutica transportada, siendo por tanto un tipo de direccionamiento activo (Akbarzadeh y cols., 2012). Las propiedades de estas NPs hacen que puedan ser usadas para tratamiento y diagnóstico del cáncer de manera separada y de manera conjunta (teragnosis). Las NPs magnéticas pueden estar compuestas por diferentes metales como Zn, Co o Ni, pero las más estudiadas son aquellas compuestas por Fe concretamente las SPIONs (*superparamagnetic iron oxide nanoparticles*). (Doello y cols., 2015). En el campo del diagnóstico, estas NPs son muy útiles ya que pueden ser observadas mediante resonancia magnética nuclear (RMN) debido al núcleo paramagnético que portan y pueden utilizarse como agentes de contraste que indican la situación del tumor (Hu y cols., 2013; Tiefenauer y cols., 1993). De hecho existen varias formulaciones que ya han sido aprobadas para su uso en clínica como el Feridex® y Resovist® ambas para la monitorización del hígado o el Combidex® para metástasis ganglionares (Wang, 2011).

Respecto a la terapia encontramos NPs magnéticas que transportan y liberan fármacos antitumorales en el tejido de interés, con la ventaja de que

estas NPs pueden mantenerse en el área donde se encuentran las células tumorales liberando el fármaco mediante la aplicación de un campo magnético externo. Éstas, normalmente suelen ser nanoformulaciones formadas por un núcleo magnético y un polímero que transporta el fármaco (Banerjee y Chen, 2007; Rahimi y cols., 2010; Shabestari Khiabani y cols., 2017). Los ensayos de Maeng y cols., revelaron que NPs magnéticas cargadas con DOX presentaban un mayor efecto antitumoral *in vivo* que la DOX libre en tumores hepáticos (Maeng y cols., 2010). En glioblastomas inducidos en ratones, la utilización de NPs magnéticas que transportan cetuximab (anti-EGFR) mostraron un buen direccionamiento y un incremento del efecto antitumoral respecto al anticuerpo solo (Kaluzova y cols., 2015).

Una nueva estrategia terapéutica es la hipertermia que se basa en la menor resistencia de las células tumorales a altas temperaturas que oscilan entre 43 y 49 °C, temperaturas que sí resisten las células sanas. La aplicación del campo magnético en las NPs hace que la energía magnética se transforme en energía térmica generando calor y elevando la temperatura en el sitio del tumor (Hervault y Thanh, 2014). Ya han sido ensayadas con éxito en el tratamiento de tumores pancreáticos inducidos en modelos animales, observándose un incremento de un 31% en la supervivencia en comparación con los grupos control (Basel y cols., 2012). El Resovist® también se ha utilizado como agente de hipertermia mostrando muy buenos resultados en la reducción del volumen tumoral *in vivo* en xenoinjertos de cáncer de pulmón humano en ratones “nude” (Araya y cols., 2013).

Sin embargo, lo más común es la combinación de hipertermia con tratamientos de quimioterapia o radioterapia, ya que se ha observado que puede incrementar el efecto citotóxico (Hervault y Thanh, 2014; Rao y cols., 2010). Recientemente, Abbasi y colaboradores (2015) sintetizaron NPs poliméricas fluorescentes con óxido de manganeso y docetaxel que permitieron su localización en el tejido tumoral de ratones y la evaluación de su efecto terapéutico (Abbasi y cols., 2015). La combinación de hipertermia y radioterapia también ha permitido obtener buenos resultados en tumores

subcutáneos prostáticos en ratones inoculados con SPIONs, en los que se pudo observar una mayor reducción del volumen tumoral en los grupos sometidos a hipertermia en comparación a los tratados únicamente con radioterapia (Attaluri y cols., 2015).

- **Nanopartículas lipídicas sólidas.** Se caracterizan por ser sistemas coloidales sólidos a temperatura fisiológica. Están formadas por lípidos sólidos como mono, di o triglicéridos, mezclas de glicéridos o ceras; un producto biocompatible que estabiliza la emulsión como lecitina, ácidos biliares o polisorbatos y todo ello en solución acuosa (Wong y cols., 2007). Han sido muy estudiados en los últimos años para la terapia del cáncer debido a que presentan ciertas ventajas respecto a otras nanoformulaciones lipídicas como los liposomas, ya que su producción a gran escala tiene un coste mucho menor, tienen menos problemas en lo referente al almacenamientos y pérdida de fármaco y además tienen una alta biocompatibilidad (Heath, 1988; Müller y cols., 1997, 2000). Se han utilizado estas nanoformulaciones para transportar fármacos, ácidos nucleicos y para su funcionalización con anticuerpos. Además, existen muchas variantes ya que pueden ser sensibles a cambios en el pH, pueden combinarse con núcleos magnéticos o sintetizarlas con carga de superficie catiónica (Rostami y cols., 2014). Muchos tipos de fármacos antitumorales han sido cargados en este tipo de NPs como antraciclinas, taxanos, camptotecinas, etopósido, etc. (Wong y cols., 2007). Se ha observado una reducción de los efectos tóxicos de estos fármacos mediante su transporte en NPs lipídicas sólidas. Este es el caso de este tipo de NPs asociadas a DOX y que tras administrarlas en ratones mostraron una reducción de la cardiotoxicidad en comparación con la DOX libre, ya que las NPs alteraron la biodistribución normal del fármaco disminuyendo su acumulación en el tejido cardíaco (Pereverzeva y cols., 2008). NPs lipídicas sólidas cargadas con PTX también demostraron que mostraron un mayor efecto antitumoral y biodisponibilidad *in vivo* tras su inoculación intravenosa en comparación con el PTX libre, presentaron

menos toxicidad a nivel sistémico que el fármaco por sí solo (Baek y cols., 2015). Incluso en algunos casos, se ha podido observar como son capaces de obviar el fenotipo MDR de células tumorales resistentes a fármacos antitumorales como en el caso de NPs lipídicas sólidas sensibles a pH que transportan DOX. Estas NPs fueron capaces de producir más muerte celular (2/3) en la línea de cáncer de mama humana resistente a fármacos MCF-7/MDR en comparación con el fármaco solo (1/3), puede que por una inhibición de P-GP (Chen y cols., 2015).

**Tabla 10.** Resumen de las nanoformulaciones utilizadas en la nanomedicina del cáncer.

Nanoformulación	Descripción
<b>Liposomas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vesículas formadas por una bicapa lipídica</li> <li>- Pueden transportar fármacos solubles e insolubles en agua</li> </ul>
<b>Polimerosomas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vesículas esféricas con estructura bicapa formadas a partir de polímeros sintéticos</li> <li>- Pueden transportar fármacos solubles e insolubles en agua</li> <li>- Buenos candidatos para sintetizar nanoformulaciones multifuncionales</li> </ul>
<b>Micelas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vesículas formadas por una monocapa lipídica</li> <li>- Pueden transportar fármacos solubles e insolubles en agua</li> </ul>
<b>Nanopartículas poliméricas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sistemas coloidales formados por polímeros biodegradables</li> <li>- Según cómo transportan el fármaco pueden ser nanoesferas o nanocápsulas</li> </ul>
<b>Nanopartículas magnéticas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Formadas por materiales con propiedades magnéticas o paramagnéticas</li> <li>- Debido a sus propiedades son utilizadas en diagnóstico, tratamiento o teragnosis</li> <li>- Pueden ser utilizadas para tratamiento por hipertermia</li> </ul>
<b>Nanopartículas lipídicas sólidas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sistemas coloidales sólidos a la temperatura fisiológica</li> <li>- Pueden ser sensibles a cambios en el pH, magnéticas o catiónicas</li> </ul>
<b>Nanopartículas de oro</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nanopartículas con un núcleo de oro</li> <li>- Debido a sus propiedades ópticas están siendo ampliamente estudiadas para su uso en diagnóstico mediante técnicas de imagen, terapia fototérmica</li> <li>- También se usan como transportadoras y liberadoras de fármacos</li> </ul>
<b>Puntos cuánticos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nanocristales formados por elementos semiconductores</li> <li>- Se utilizan para el diagnóstico y la monitorización a tiempo real</li> <li>- También para el tratamiento por terapia fototérmica</li> </ul>

**Tabla 10. (Continuación)** Resumen de las nanoformulaciones utilizadas en la nanomedicina del cáncer.

Nanoformulación	Descripción
<b>Nanopartículas de sílice</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Las más comunes son las nanopartículas de sílice mesoporosas</li> <li>- Pueden ser utilizadas tanto para diagnóstico como para tratamiento</li> <li>- También se utilizan para transportar y liberar siARN</li> </ul>
<b>Nanogeles</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nanopartículas compuestas por una red formada por polímeros sintéticos o biopolímeros hidrofílicos entrecruzados</li> <li>- Pueden utilizarse para el transporte y liberación de macromoléculas</li> <li>- Pueden liberar la molécula transportada en respuesta a un estímulo</li> </ul>
<b>Nanocáscaras (<i>Nanoshells</i>)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nanopartículas esféricas con un núcleo dieléctrico cubierto por una capa de metal</li> <li>- En nanomedicina se suelen usar las que tienen un núcleo de sílice y una cubierta de oro</li> <li>- Se usan tanto en diagnóstico como en tratamiento</li> </ul>
<b>Nanohilos (<i>Nanowires</i>)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nanoformulaciones con forma alargada que pueden estar formadas por hierro, silicio o níquel</li> <li>- Pueden utilizarse para diagnóstico precoz del cáncer mediante la detección de biomarcadores específicos</li> <li>- También se pueden utilizar en tratamiento mediante transporte de fármacos y terapia fototérmica</li> </ul>
<b>Nanobarras (<i>Nanorods</i>)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nanoformulaciones con forma de barra formadas por metales y materiales semiconductores</li> <li>- Usados en la teragnosis del cáncer</li> </ul>
<b>Nanovigas (<i>Nanocantilevers</i>)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nanoformulaciones formadas por materiales semiconductores con forma de vigas flexibles</li> <li>- Usados fundamentalmente como biosensores de marcadores tumorales</li> </ul>
<b>Nanotubos de carbono</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nanoformulaciones con forma de cilindro hueco formadas por carbono</li> <li>- Podemos encontrarlos de una sola capa o de múltiples capas</li> <li>- Se utilizan para diagnóstico mediante la detección de biomarcadores</li> <li>- También en tratamiento por transporte y liberación de fármacos</li> </ul>
<b>Dendrímeros</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nanoformulaciones poliméricas con forma arborescente, con un patrón geométrico de numerosas ramas que se extienden desde el núcleo</li> <li>- Se utilizan tanto para diagnóstico como para tratamiento</li> </ul>



### 1.3.2.2. Mecanismo de acción

Las nanoformulaciones, concretamente las NPs, uno de los tipos más numerosos y que abarcan mayor número de nanoformulaciones, son internalizadas en las células por mecanismos de endocitosis, que puede verse afectada por el tamaño, forma, superficie y propiedades mecánicas de las NPs (Canton y Battaglia, 2012). Sin embargo, también se ha observado internalización por medio de fusión con la membrana celular, siendo este caso especialmente importante en el transporte y liberación de proteínas, que evitan de esta forma la degradación en el lisosoma celular (Tang y cols., 2013).

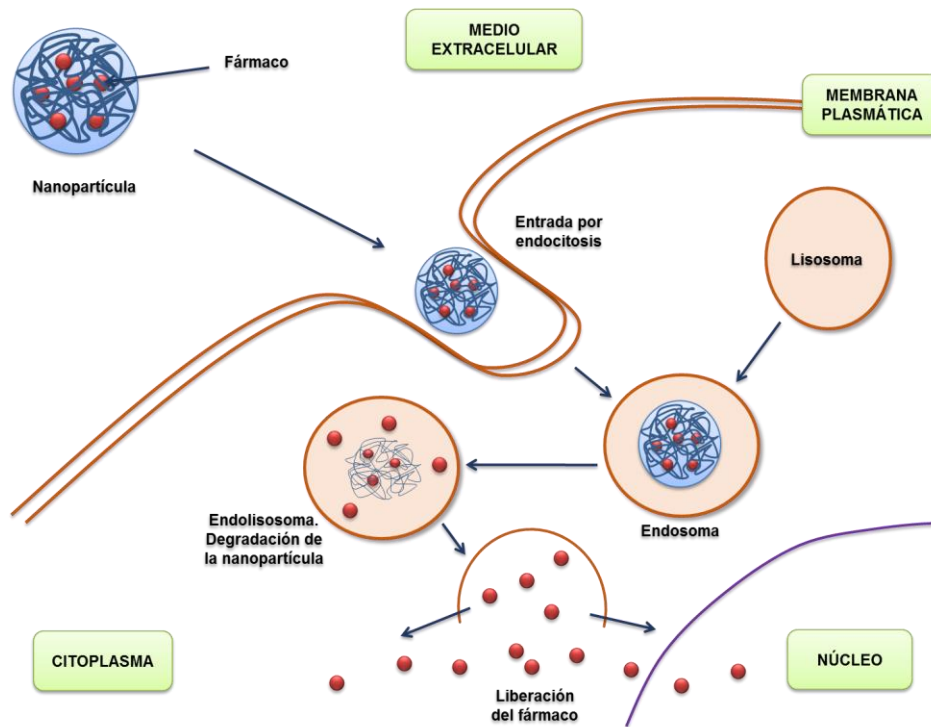
Las NPs pueden por tanto entrar a la célula por vía endocítica mediada por receptor, dependiente de clatrina, caveolina o endocitosis independientes de estas vías (*rafts* lipídicos) y además, más de uno de estos mecanismos puede ocurrir simultáneamente (Kirkham y Parton, 2005; Sahay y cols., 2010). Una vez endocitadas, las NPs comienzan su degradación debido al ambiente ácido y a la presencia de enzimas hidrolíticas del endolisosoma (Sahay y cols., 2010; Selby y cols., 2017). Cuando comienza la degradación de la nanopartícula, también empieza la liberación de la molécula terapéutica transportada que debe escapar de la vesícula de endocitosis y alcanzar su sitio de acción. Existen diferentes hipótesis para explicar esta liberación (Selby y cols., 2017):

- ***Efecto de esponja de protones.*** Ocurre con ciertos polímeros catiónicos que tienen una buena capacidad como tamponadores de pH ya que presentan grupos aminos protonables. Cuando son endocitadas y se encuentran dentro del endosoma, durante la maduración del mismo las bombas de protones ATPasas de la membrana endosomal introducen protones dentro del endosoma acidificando el ambiente y activando enzimas hidrolíticas. Los polímeros catiónicos van siendo protonados y tamponan la acidificación del endosoma, con lo que más protones van entrando continuamente al endosoma. Ante esta entrada de protones, se produce una

entrada pasiva de iones Cl<sup>-</sup> que aumenta la concentración de iones dentro del endosoma, lo que da lugar a una entrada de agua para regular el equilibrio osmótico que puede causar la rotura de la membrana endosomal y la liberación del contenido al citosol (Liang y Lam, 2012). Esta teoría está siendo ampliamente discutida, ya que se ha observado que no todos los polímeros que son capaces de tamponar en un rango de pH ácido son capaces de producir la rotura del endosoma y que conforme aumenta la capacidad tamponadora no aumenta la liberación del endosoma (Funhoff y cols., 2004).

- ***Fusión de membrana.*** Se produce en nanoformulaciones lipídicas o anfipáticas como los liposomas, cuya bicapa lipídica podría fusionarse con la membrana del endosoma, liberando la molécula transportada directamente al citosol (Zelphati y Szoka, 1996).
  
- ***Desorganización de la membrana y formación de poros.*** En ocasiones la desorganización de la membrana puede producirse por la interacción de las NPs en degradación o de los péptidos con la membrana del endosoma. Mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) se ha observado como la polietilenimina (PEI) interacciona directamente con la membrana del endosoma desorganizándola. En el caso de NPs aniónicas, se produce un aumento de la hidrofobicidad dentro del endosoma que rompe su membrana (Bieber y cols., 2002; Jones y cols., 2003). Asimismo, se ha observado desorganización de la membrana por medio de péptidos y materiales que presentan grupos guanidinio (Appelbaum y cols., 2012; Pantos y cols., 2008) o por péptidos transportados como GALA (glutamato-alanina-leucina-alanina) que se fusionan con la membrana del endosoma de forma dependiente de pH y se organizan formando poros transmembrana que pueden transportar moléculas de hasta 5000 Da (Li y cols., 2004).

Es importante por tanto conocer el mecanismo de acción de cada nanoformulación y cómo pueden liberar la molécula transportada al citoplasma celular a la hora de diseñarla, ya que este hecho va a influir profundamente en su efecto terapéutico (Figura 9).



**Figura 9.** Mecanismo de acción de las NPs portadoras de fármacos.

### ***1.3.2.3. Comercialización y ensayos clínicos***

Actualmente podemos encontrar numerosas nanoformulaciones en el mercado y otras que están siendo testadas actualmente en ensayos clínicos. Un resumen de estas nanoformulaciones queda reflejado en las tablas 11 y 12 (Wicki y cols., 2015). Concretamente, hasta marzo de 2017 aparecieron en “clinicaltrials.gov” un total de 2.235 ensayos clínicos con liposomas, NPs o micelas, de los cuales 1.843 estaban relacionados con el cáncer (Clinicaltrials.gov, 2017). La mayoría de las nanoformulaciones que se encuentran en ensayos clínicos o que han sido aprobadas para su uso en clínica son los liposomas. De hecho, la primera nanoformulación aprobada por la FDA para su uso en el tratamiento del cáncer fue en 1995 y su

nombre es Doxil<sup>®</sup>/Caelyx<sup>®</sup>: un liposoma cargado con DOX y con una cubierta de PEG que mejora la biodistribución del fármaco reduciendo así su toxicidad sistémica debido al efecto EPR (Barenholz, 2012). Actualmente, existen otras cinco formulaciones lipídicas aprobadas para su uso en clínica, la mayoría liposomas sin cubierta de PEG que transportan diferentes fármacos como DOX, daunorrubicina y citarabina (Myocet<sup>®</sup>, DaunoXome<sup>®</sup>, DepoCyt<sup>®</sup>) y liposomas con sulfato de vincristina y mifamurtida (Marqibo<sup>®</sup>, Mepact<sup>®</sup>) que aumentan la vida media de los fármacos y reducen su toxicidad (Chan y cols., 2004; Frampton, 2010; Gill y cols., 1996; Gökbuget y cols., 2011; O'Brien y cols., 2013).

También ha sido aprobada en clínica una nanoformulación formada por proteínas, en este caso NPs de albúmina que transportan PTX denominada como nab-PTX o Abraxane<sup>®</sup>. Esta nanopartícula se usa en el tratamiento del cáncer de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de páncreas. La principal ventaja del uso de esta nanoformulación es la solubilización del PTX sin necesidad de utilizar Cremophor<sup>®</sup> EL y por lo tanto evitando la toxicidad del solvente. También supone una mejora en el tratamiento en cuanto a la supervivencia de los pacientes (Wicki y cols., 2015) aunque no ha conseguido reducir la toxicidad provocada por los taxanos. Como se ha comentado en apartados anteriores, también han sido comercializadas NPs magnéticas como el Combidex<sup>®</sup> para metástasis ganglionares, Feridex<sup>®</sup> y Resovist<sup>®</sup> para la monitorización del hígado (Wang, 2011) o el Ferumoxytol (Feraheme<sup>®</sup>), que es una nanopartícula magnética de óxido de hierro utilizada para tratar la anemia por deficiencia de hierro en adultos con enfermedad renal y que actualmente se está investigando su uso como agente de contraste para técnicas de imagen (Arami y cols., 2015; Finn y cols., 2016; Lu y cols., 2010).

En cuanto a los ensayos clínicos encontramos una amplia variedad como hemos comentado anteriormente, de los cuales vamos a comentar los más importantes relacionados con los tipos de cáncer referidos en la presente tesis doctoral. En fase I, encontramos un estudio con liposomas funcionalizados con EGFR y cargados con DOX para el tratamiento de tumores sólidos, que ha demostrado la buena biocompatibilidad y tolerabilidad de esta nanoformulación en

humanos con tumores sólidos con sobreexpresión de EGFR (Mamot y cols., 2012). En fase II, liposomas con carga positiva en superficie que llevan encapsulado PTX (Endo TAG-1) para el tratamiento de cáncer de páncreas, de mama triple negativo y de cabeza y cuello, también ha demostrado la tolerancia por los pacientes y un buen efecto antitumoral (Awada y cols., 2014; Schuch, 2005). Por último, el ensayo clínico realizado en pacientes con cáncer de pulmón con liposomas administrados mediante aerosol cargados con 9-nitro-20 (S)-camptotecina, mostró la ausencia de efectos secundarios graves derivados del tratamiento y que el fármaco es incorporado correctamente de forma sistémica, observándose incluso la estabilización de la enfermedad en dos pacientes (Verschraegen y cols., 2000).

Los ensayos clínicos con NPs poliméricas son menos frecuentes aunque también han obtenido excelentes resultados como en el caso de pacientes con tumores sólidos en estado avanzado que fueron tratados con NPs poliméricas funcionalizadas con el antígeno prostático específico de membrana (PSMA) y cargadas con docetaxel (BIND-014), se observó un mayor tiempo en circulación en comparación con el docetaxel libre y un perfil farmacocinético diferente (Von Hoff y cols., 2016).

**Tabla 11.** Resumen de las nanoformulaciones aprobadas para su uso en la medicina del cáncer.

Nombre comercial	Nanoformulación	Fármaco	Tipo de cáncer	Compañía
<b>Abraxane®</b>	Nanopartículas de albúmina	PTX	Mama, páncreas, de pulmón de células no pequeñas	Abaxis/ Celgene
<b>DaunoXome®</b>	Liposoma	Daunorrubicina	Sarcoma de Kaposi	Galen
<b>DepoCyt®</b>	Liposoma	Citarabina	Meningitis neoplásica	Pacira
<b>Doxil®/ Caelyx®</b>	Liposoma	DOX	Sarcoma de Kaposi, ovario, mama, mieloma múltiple	Johnson & Johnson

**Tabla 11. (Continuación)** Resumen de las nanoformulaciones aprobadas para su uso en la medicina del cáncer.

Nombre comercial	Nanoformulación	Fármaco	Tipo de cáncer	Compañía
<b>Genexol-PM®</b>	Micela polimérica PEG-PLA	PTX	Mama, pulmón, ovario	Samyang Biopharm
<b>Lipo-Dox®</b>	Liposoma	DOX	Sarcoma de Kaposi, mama, ovario	Taiwan Liposome
<b>Marqibo®</b>	Liposoma	Vincristina	Leucemia linfocítica aguda	Talon
<b>Mepact®</b>	Liposoma	Mifamurtida	Osteosarcoma	Takeda
<b>Myocet®</b>	Liposoma	DOX	Mama	Cephalon
<b>NanoTherm®</b>	Nanopartículas de óxido de hierro	-	Glioblastoma	Magforce Nanotechnologies
<b>Oncaspar®</b>	Conjugados PEG-proteína	L-Asparaginasa	Leucemia	Enzon/Sigma-tau
<b>Zinostatin stimalamer®</b>	Conjugados polímero-proteína	Poli (estireno-co-anhídrido maleico)-neocarzinostatina	Hígado, riñón	Yamanouchi

**Tabla 12.** Resumen de algunos de los ensayos clínicos con nanoformulaciones para la nanomedicina del cáncer.

Nanoformulación	Fármaco	Tipo de cáncer	Código	Fase
<b>Nanopartículas de albúmina</b>	Docetaxel	Mama metastásico	NCT00531271	II
<b>Micelas poliméricas</b>	PTX	Mama avanzado	NCT00915369	I
<b>Liposoma</b>	PTX	Mama triple negativo	NCT00448305	II
<b>Nanopartículas poliméricas PEG-PLGA funcionalizadas con antígeno prostático</b>	Docetaxel	Cáncer metastásico, tumores sólidos	NCT01300533	I

**Tabla 12. (Continuación)** Resumen de algunos de los ensayos clínicos con nanoformulaciones para la nanomedicina del cáncer.

Nanoformulación	Fármaco	Tipo de cáncer	Código	Fase
<b>Liposoma funcionalizado con EGFR</b>	DOX	Tumores sólidos	NCT01702129	I
<b>Liposoma</b>	Docetaxel	Tumores sólidos	NCT01041235	I
<b>Liposoma</b>	9-nitro-20 (S)-camptotecina	Pulmón (células no pequeñas), endometrial metastásico	NCT00250068 NCT00249990	II II
<b>Liposoma</b>	Irinotecán HCL: Floxuridina	Colorrectal	NCT00361842	II
<b>Nanopartículas de ciclodextrina</b>	Camptotecina	Pulmón (células no pequeñas), carcinoma de células renales	NCT01380769 NCT01625936	II I
<b>Nanopartícula polimérica PEG-PGA</b>	SN-38 (metabolito activo del irinotecán)	Tumores sólidos, cáncer de pulmón (células pequeñas), mama	NCT00542958 NCT00951613 NCT00951054	I II II
<b>Liposoma</b>	Inhibidor de la TS	Colorrectal	NCT00081237	II

### 1.3.3. Nanopartículas poliméricas transportadoras de fármacos

Para realizar los artículos que componen esta tesis doctoral nos hemos centrado en el uso de NPs poliméricas como transportadoras y liberadoras de fármacos antitumorales. Una amplia variedad de fármacos, pueden ser transportados y liberados usando NPs poliméricas que tienen la habilidad de modificar su farmacocinética, su biodistribución, así como aumentar su efecto terapéutico. Concretamente, se han vehiculizado los fármacos DOX, 5-FU y PTX en NPs de PBCA, PCL y PLGA. A continuación, se expone una breve revisión de cada una de las nanoformulaciones.

### ***1.3.3.1. Nanopartículas de poli (butilcianoacrilato)***

Las NPs de PBCA están compuestas de n-butilcianoacrilato que es un tipo de alquilo cianoacrilato. Actualmente se está investigado su uso en determinadas enfermedades como el cáncer, enfermedades del sistema nervioso central, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida e infecciones producidas por bacterias o virus. Sin embargo, estos polímeros ya han sido ampliamente utilizados en otras aplicaciones como por ejemplo, pegamento para tejidos (Indermil® y Liquiband®) (Couvreur y cols., 1979; Gao y cols., 2015). Las NPs de PBCA se caracterizan por ser biocompatibles, biodegradables, fácilmente modificables, fácilmente sintetizadas a gran escala y además pueden transportar una gran variedad de moléculas, como antibióticos, péptidos, ácidos nucleicos o fármacos antitumorales, mejorando en todos los casos su actividad farmacológica (Couvreur y cols., 1979; Evangelatov y cols., 2016; Gao y cols., 2015, 2013; Tomcin y cols., 2014; Xu y cols., 2011, 2015).

La biodegradación de las NPs de PBCA se produce por medio de la hidrólisis de su enlace éster por medio de esterasas, siendo menor y prácticamente inapreciable el efecto de otras enzimas hidrolíticas como la amilasa o la pepsina. La acción de las esterasas da lugar a la eliminación de las cadenas laterales del polímero, haciéndolo más hidrofóbico. Los productos de la degradación del polímero son finalmente eliminados en el riñón (Mahapatro y Singh, 2011; O'Sullivan y Birkinshaw, 2002; Scherer y cols., 1994; Sullivan y Birkinshaw, 2004).

Los monómeros de butilcianoacrilato polimerizan fácilmente en entorno ácido sin necesidad de un aporte de energía externo. Existen dos métodos principales utilizados en la síntesis de las NPs de PBCA, uno de ellos está basado en la polimerización y el otro en la nanoprecipitación, dando lugar cada método o bien a nanoesferas o bien a nanocápsulas. Dentro del método de polimerización se distinguen dos tipos según el desencadenante de dicha polimerización; polimerización por radicales libres y polimerización aniónica, incluyendo la polimerización por emulsión (uno de los más usados), la polimerización interfacial y la polimerización por miniemulsión. En el caso de la nanoprecipitación se parte de un polímero presintetizado de PBCA donde se completa la formación de las NPs.



En este caso, no se requieren reacciones enzimáticas lo que puede ser importante a la hora de preservar la actividad biológica del fármaco que se desee transportar (Gao y cols., 2015).

Se ha estudiado el uso de NPs de PBCA en cáncer mediante la incorporación de diversos fármacos antitumorales como la DOX, 5-FU, cisplatino, epirubicina, curcumina, PTX, etc. (Bagherpour Doun y cols., 2014; Duan y cols., 2012a; Ebrahimi Shahmabadi y cols., 2014; Mulik y cols., 2012; Ren y cols., 2011; Yordanov y cols., 2012, 2013a, 2013b; Zhang y cols., 2016). En esta tesis doctoral hemos utilizado las NPs de PBCA para vehicular los fármacos DOX y 5-FU testándose tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* de cáncer de mama, pulmón y colon. Estos trabajos quedan expuestos en los capítulos 1 y 2.

### ***1.3.3.2. Nanopartículas de poli ( $\epsilon$ -caprolactona)***

El material poli ( $\epsilon$ -caprolactona) es un polímero sintético semicristalino e hidrofóbico que se ha estudiado como material base para la construcción de NPs que transportan y liberan fármacos debido a su alta permeabilidad a numerosos tipos de fármacos, así como por su degradación a largo plazo que permite una liberación sostenida del mismo (Hakkarainen y Albertsson, 2002; Sinha y cols., 2004). También se ha estudiado en ingeniería tisular, síntesis de apósitos, anticonceptivos y en materiales usados en odontología, debido a su buena biocompatibilidad ya que es un material muy versátil y sus propiedades físico-químicas son fácilmente modificables (Woodruff y Hutmacher, 2010). Su gran versatilidad también radica en la amplia variedad de tipos de formulaciones que pueden sintetizarse a partir de este material como son NPs, micelas, hidrogeles, fibras, capas (*films*) y *scaffolds* y a su combinación con otros materiales y polímeros como PEG, quitosano o PLGA (Chen y cols., 2010; Dash y Konkimalla, 2012; Gou y cols., 2011; Song y cols., 2016).

En comparación con otros polímeros la biodegradación de PCL es lenta debido a su naturaleza semicristalina. Esta degradación está dividida en dos fases.

Una primera fase no enzimática, que se basa en una hidrólisis autocatalizada por los grupos terminales carbonilo en la que se rompen los enlaces éster del polímero. La segunda fase ocurre cuando el polímero es más cristalino y de bajo peso molecular. Es entonces cuando se produce la degradación intracelular en los fagosomas celulares (Sinha y cols., 2004; Woodruff y Hutmacher, 2010; Woodward y cols., 1985).

Se obtiene mediante la polimerización por apertura de anillo del monómero cíclico  $\epsilon$ -caprolactona (Van Natta y cols., 1934). Existen varios mecanismos que afectan a la polimerización del PCL de manera que puede ser polimerización aniónica, catiónica, coordinada y radical (Pitt, 1990). Cada método varía en cuanto al control de la distribución del peso molecular, la composición de los grupos de los extremos moleculares y la estructura química y peso molecular de los copolímeros, características que son importantes en cuanto a la permeabilidad del polímero a diferentes fármacos y a su biodegradabilidad (Murthy, 1997; Pitt, 1990). Los métodos de preparación de NPs de PCL más comunes, son el método de evaporación del disolvente, de desplazamiento del disolvente, de disposición interfacial del polímero, de diálisis, de emulsión-evaporación del disolvente y el método de emulsión-difusión del disolvente, siendo estos dos últimos los más utilizados (Dash y Konkimalla, 2012; Sinha y cols., 2004).

El polímero de PCL es por tanto un material adecuado como sistema de transporte y liberación de fármacos debido a su gran biocompatibilidad, su alta permeabilidad a diferentes tipos de fármacos y a que cuando es degradado es totalmente excretado del cuerpo. Una vez que el fármaco es incorporado al polímero, su liberación puede verse afectada por el método utilizado para la polimerización del PCL, su tamaño y la cantidad de fármaco transportado (Sinha y cols., 2004). Se han utilizado estas NPs para transportar fármacos como indometacina, flurbiprofeno, anfotericina B, ciclosporina, PTX, DOX, camptotecina, curcumina, etc. (Dash y Konkimalla, 2012; Sinha y cols., 2004). En esta tesis doctoral hemos utilizado una nueva formulación de NPs de PCL para transportar los fármacos DOX y 5-FU testándose tanto en modelos *in vitro* como *in*

*vivo* de cáncer de mama, pulmón y colon. Estos trabajos quedan expuestos en los capítulos 1 y 2.

### ***1.3.3.3. Nanopartículas de ácido poli (láctico-co-glicólico)***

Las NPs de PLGA, son una de las nanoformulaciones más adecuadas para el transporte y liberación de fármacos antitumorales ya que son altamente biocompatibles, biodegradables y sus productos de degradación (ácido láctico y ácido glicólico) no son tóxicos, ya que se metabolizan fácilmente en el ciclo de Krebs. Además, tienen una gran estabilidad y permiten una liberación sostenida del fármaco (Danhier y cols., 2012; Mundargi y cols., 2008; Sadat Tabatabaei Mirakabad y cols., 2014). Normalmente se suelen identificar según el porcentaje de cada uno de los monómeros que la constituyen, es decir, NPs de PLGA 50:50 quiere decir que están formadas por un 50% de ácido láctico y un 50% de ácido glicólico (Danhier y cols., 2012). Los polímeros de PLGA han sido aprobado por la FDA y de hecho pueden encontrarse fácilmente en el mercado (Somatuline<sup>®</sup> LA, Nutropin Depot<sup>®</sup>, Lupron Depot<sup>®</sup>, Arestin<sup>®</sup>, Decapeptyl<sup>®</sup>, Suprecur<sup>®</sup> MP, Sandostatin LAR<sup>®</sup> Depot, Trelstar<sup>™</sup> Depot, Risperidal<sup>®</sup> Consta<sup>™</sup>) (Mundargi y cols., 2008).

Las NPs de PLGA entran a las células por endocitosis mediada por clatrina y pinocitosis. Una vez son internalizadas, escapan rápidamente de los lisosomas y son liberadas en el citoplasma celular aproximadamente en los primeros 10 minutos de exposición (Danhier y cols., 2012; Vasir y Labhasetwar, 2007). La degradación se produce por hidrólisis del polímero y está afectada por diversos factores como el método de preparación, la morfología, el tamaño, la forma, el peso molecular, hidrofobicidad, cristalinidad, etc. (Anderson y Shive, 1997; Dinarvand y cols., 2011; Jain, 2001; Sadat Tabatabaei Mirakabad y cols., 2014). Por lo general, el tiempo de degradación es menor en polímeros de bajo peso molecular, con mayor contenido en ácido glicólico, más amorfos e hidrófilos (Dinarvand y cols., 2011; Sadat Tabatabaei Mirakabad y cols., 2014).

El polímero de PLGA es sintetizado mediante la copolimerización por apertura de anillo de dos monómeros: ácido glicólico y ácido láctico, utilizando catalizadores metálicos como el 2-etilhexanoato de estaño (II) (Astete y Sabliov, 2006; Lü y cols., 2009; Sadat Tabatabaei Mirakabad y cols., 2014). El método de síntesis más utilizado es el de emulsión-evaporación del disolvente utilizando generalmente el alcohol de polivinilo como estabilizante (Danhier y cols., 2012; Mundargi y cols., 2008). Este método hace posible el transporte de fármacos insolubles en agua disolviendo el polímero y el compuesto en un compuesto orgánico. La emulsión aceite/agua se prepara añadiendo un tensoactivo y agua a la solución del polímero. Después, se homogeniza la solución o se sonica para conseguir el tamaño nanométrico y tras la evaporación o la extracción del disolvente, finalmente las NPs se obtienen mediante centrifugación o liofilización. Para fármacos hidrofílicos, se puede usar el mismo protocolo modificado mediante una doble o múltiple emulsión (agua/aceite/agua), donde primero el fármaco y un estabilizador se disuelven en agua. Se realiza la primera emulsión dispersando la fase acuosa en un disolvente orgánico que contiene el polímero disuelto. Después se vuelve a emulsionar en otra fase acuosa que vuelve a contener el estabilizador (Danhier y cols., 2012; Hans y Lowman, 2002; Song y cols., 1997; Vila y cols., 2002).

Las NPs de PLGA tienen ciertos inconvenientes que pueden limitar su uso en nanomedicina, como por ejemplo uno de sus grandes obstáculos es que no pueden transportar grandes cantidades de fármaco ya que, a pesar de tener una buena eficiencia de encapsulación la cantidad de fármaco encapsulado suele ser de un 1% (1 mg de fármaco/100 mg de polímero). Otra limitación importante, es que inicialmente tienen una fuerte liberación rápida del fármaco, que luego va seguida de una liberación sostenida. Esta liberación inicial rápida puede estar causada por el fármaco que se encuentra en la superficie de la nanopartícula y puede hacer que no sea liberado en el tejido tumoral (Danhier y cols., 2012; Kumari y cols., 2010; Sadat Tabatabaei Mirakabad y cols., 2014). Además, en las NPs de PLGA el transporte de proteínas se dificulta bastante ya que la hidrólisis de estas NPs da lugar a dos tipos de monómeros ácidos que reducen el pH del medio en el que se encuentran y por lo tanto, puede dar lugar a la desnaturalización de las proteínas transportadas (Bittner y

cols., 1998; Mundargi y cols., 2008). Por tanto, para que estas NPs sean aptas para su uso en nanomedicina, es necesario añadir algunas modificaciones para mejorar las limitaciones comentadas anteriormente, como por ejemplo, la adición de sustancias que actúen como antiácido tamponando la solución resultante de la hidrólisis de la nanopartícula o la adición de determinadas moléculas como PEG o polisorbato para mejorar en general la estabilidad de la molécula transportada y su liberación (Jiang y cols., 2004; Péan y cols., 1999; Rojas y cols., 1999; Zhu y cols., 2000).

Se han sintetizado NPs de PLGA para transportar gran variedad de moléculas terapéuticas para el tratamiento del cáncer como PTX, DOX, cisplatino, 9-nitro-camptotecina, etopósido, curcumina, rapamicina, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, e incluso moléculas específicas para inmunoterapia (Danhier y cols., 2012; Sadat Tabatabaei Mirakabad y cols., 2014). En esta tesis doctoral hemos usado una nueva formulación de NPs de PLGA para transportar PTX, siendo testadas en modelos *in vitro* de cáncer de mama. Estos trabajos quedan expuestos en el capítulo 3.



## **2. Objetivos**

---





El objetivo principal de este trabajo es evaluar la capacidad de diferentes tipos de NPs poliméricas para vehicular y liberar fármacos utilizados actualmente en la quimioterapia del cáncer como la DOX, 5-FU y PTX, con el propósito de mejorar su actividad antitumoral en modelos tanto *in vitro* como *in vivo* de cáncer de mama, pulmón y colon.

Para desarrollar este objetivo principal se planteron los siguientes objetivos parciales:

- 1- Sintetizar NPs poliméricas de PBCA, PCL y PLGA capaces de transportar con la máxima eficacia los fármacos antitumorales DOX, 5-FU y PTX.
- 2- Estudiar la toxicidad de las NPs vacías (sin fármaco) sobre modelos *in vitro* e *in vivo* de diferentes tipos de cáncer.
- 3- Determinar si la vehiculización de la DOX, el 5-FU y el PTX mediante NPs produce una mejora de la concentración inhibitoria 50% (IC<sub>50</sub>) de los fármacos respecto a su utilización convencional (fármaco libre).
- 4- Determinar la localización intracelular y la capacidad de internalización celular de las NPs mediante el uso de fluoróforos.
- 5- Determinar la mejora en el efecto antitumoral de los fármacos vehiculizados por nanopartículas de PBCA, PCL y PLGA en modelos *in vivo* de cáncer de mama, pulmón y colon inducidos subcutáneamente en ratones inmunocompetentes.



### **3. Material, métodos y resultados**



### 3.1. Capítulo 1. Vehiculización de doxorubicina

#### Artículo 1

### Enhanced antitumor activity of doxorubicin in breast cancer through the use of poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles

Laura Cabeza<sup>1,\*</sup>, Raúl Ortiz<sup>1,2,\*</sup>, José L Arias<sup>3</sup>, Jose Prados<sup>1,4</sup>, Maria Adolfin Ruiz Martínez<sup>3</sup>, José M Entrena<sup>5,6</sup>, Raquel Luque<sup>7</sup>, Consolación Melguizo<sup>1,4</sup>.

<sup>1</sup>*Institute of Biopathology and Regenerative Medicine (IBIMER), Granada, Spain*

<sup>2</sup>*Department of Health Science, University of Jaén, Jaén, Spain*

<sup>3</sup>*Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, University of Granada, Granada, Spain*

<sup>4</sup>*Biosanitary Institute of Granada (ibs GRANADA), SAS -Universidad de Granada, Granada, Spain*

<sup>5</sup>*Institute of Neuroscience, Biomedical Research Center*

<sup>6</sup>*Animal Behavior Research Unit, Scientific Instrumentation Center, University of Granada, Armilla, Granada, Spain*

<sup>7</sup>*Service of Medical Oncology, Virgen de las Nieves Hospital, Granada, Spain*

*\*These authors contributed equally to this work*

#### Publicado en:

Int J Nanomedicine. 2015 Feb 13; 10: 1291-306.

Doi: 10.2147/IJN.S74378

**Abstract**

The use of doxorubicin (DOX), one of the most effective antitumor molecules in the treatment of metastatic breast cancer, is limited by its low tumor selectivity and its severe side effects. Colloidal carriers based on biodegradable poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles (PBCA NPs) may enhance DOX antitumor activity against breast cancer cells, thus allowing a reduction of the effective dose required for antitumor activity and consequently the level of associated toxicity. DOX loading onto PBCA NPs was investigated in this work via both drug entrapment and surface adsorption. Cytotoxicity assays with DOX-loaded NPs were performed *in vitro* using breast tumor cell lines (MCF-7 human and E0771 mouse cancer cells), and *in vivo* evaluating antitumor activity in immunocompetent C57BL/6 mice. The entrapment method yielded greater drug loading values and a controlled drug release profile. Neither *in vitro* nor *in vivo* cytotoxicity was observed for blank NPs. The 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of DOX-loaded PBCA NPs was significantly lower for MCF-7 and E0771 cancer cells (4 and 15 times, respectively) compared with free DOX. Furthermore, DOX-loaded PBCA NPs produced a tumor growth inhibition that was 40% greater than that observed with free DOX, thus reducing DOX toxicity during treatment. These results suggest that DOX-loaded PBCA NPs have great potential for improving the efficacy of DOX therapy against advanced breast cancers.

**Keywords**

Biodegradable polymer, carcinoma, cytotoxicity, chemotherapeutic drug, drug delivery, nanopolymer.

## **Introduction**

Breast cancer is the most common malignancy affecting women in the world. Thirty percent of patients eventually develop an untreatable metastatic disease, their average life expectancy being no more than 3 years.<sup>1</sup> At present, systemic chemotherapy is considered the standard strategy against metastatic breast cancer. Despite the important advances in breast cancer therapy, including the development of new molecules (eg, trastuzumab, fulvestrant, eribulinmesylate), combinations of well-established drugs continue to be the first-line therapy against the malignant disease.<sup>2</sup> Doxorubicin (DOX)-based regimens, due to the molecule's high antitumor efficacy, are one of the most interesting approaches toward improving the level of clinical success in treating metastatic breast cancers. However, DOX-based chemotherapy is characterized by poor tumor selectivity plus severe (dose-limiting) side effects in healthy tissues and cells.<sup>3,4</sup> Furthermore, DOX can lead to drug resistance in breast cancer cells, which may be another pertinent cause of chemotherapy failure.<sup>5</sup> Therefore, new research efforts are needed to reduce the effective dose required for antitumor activity, the toxicity, and the drug resistance associated with DOX in such chemotherapy programs.<sup>6</sup>

In this context, the use of nanotechnology may be a promising strategy to improve DOX efficacy and safety. Drug-delivery nanoplatforms have been formulated to protect the antitumor agents that are loaded onto them from *in vivo* metabolization and elimination (thus optimizing the pharmacokinetic profile of the antitumor agent), and to increase drug accumulation at the site of the tumor, thereby reducing the drug dose needed to obtain a greater antitumor effect and minimizing toxicity.<sup>7</sup> Poly(alkylcyanoacrylates) have been used as promising nanoplatforms in targeted tissue/cell drug delivery, because of their well-known biodegradability and low toxicity in chronic treatments (multiple dosing), good tolerance, and biocompatibility.<sup>8-11</sup> Furthermore, cell recovery after the metabolization of poly(alkylcyanoacrylate)-based nanoparticles (NPs) occurs easily *in vivo*, thanks to the very low contact time between healthy tissues and the NP biodegradation products that are carried away from the degradation site by the blood flow.<sup>12</sup> These

nanocarriers have been engineered for the efficient delivery of numerous anticancer drugs to the tumor site (targeted drug delivery), thus increasing the patient survival rate.<sup>13</sup> In this regard, they have demonstrated a promising capacity to reverse the multidrug resistance mechanisms developed by malignant cells. For instance, the adsorption of drug-loaded poly(alkylcyanoacrylate) NPs onto the surface of cancer cells, along with the formation of drug–poly(cyanoacrylic acid) ion pairs (as polymer degradation occurs), has been described as preventing drug recognition by the P-glycoprotein.<sup>14</sup> Some authors have produced a large volume of particularly interesting work with respect to the development of DOX-loaded poly(alkylcyanoacrylate) NP. However, their work is entirely focused on the application of such nanoplatfoms to glioblastoma models.<sup>8,15–17</sup> To the best of our knowledge, the possibilities of these DOX-loaded polymeric nanoplatfoms have not been fully investigated in other cancer models, eg, that of breast cancers.

The present work, therefore, is devoted to the engineering of DOX-loaded poly(butylcyanoacrylate) (PBCA) NPs with the aim of optimizing DOX therapies used against breast cancers. To that end, the best formulation conditions have been investigated. Compared with the free drug, our nanoparticulate DOX delivery system gave rise to a significant enhancement of the *in vitro* antiproliferative efficacy of DOX molecules. In addition, *in vivo* experiments demonstrated that the DOX-loaded PBCA nanoparticulate formulations clearly reduced tumor growth without evidence of an associated systemic toxicity. Therefore, this (nano-) formulation may be a promising candidate for improving the efficacy of DOX altherapies against advanced breast cancers, while also minimizing the toxicity associated with doxorubicin's activity.



## Materials and methods

### *Materials*

All chemicals used were of analytical grade from Sigma-Aldrich Chemical Co. (Spain), except for DOX hydrochloride (purchased from Dr M Damas, San Cecilio Hospital, Granada, Spain), and butylcyanoacrylate (generous gift from Henkel Loctite, Ireland).

### *Preparation of poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles*

PBCA NPs were synthesized following the well-known emulsion/polymerization procedure for butylcyanoacrylate monomers in an aqueous solution.<sup>18,19</sup> Briefly, a 1% (w/v) acetonic solution of the monomer was added dropwise, under stirring at 1,200 rpm, to 10 mL of an aqueous polymerization medium containing 10<sup>-4</sup> N HNO<sub>3</sub> and the stabilizing agent Pluronic® F-68 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) (1%, w/v). The mixture was maintained under polymerization conditions for 3 hours, after which the medium was finally neutralized with 10 µL of an aqueous NaOH (10<sup>-1</sup> M) solution to ensure total consumption of the monomer. The remaining acetone was then fully evaporated using a BuchiRotavapor® (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) rotary evaporator to obtain an aqueous suspension of PBCA NPs. Finally, the nanoparticulate system was cleaned by subjecting it to repeated cycles of centrifugation (60 min at 10,700 rpm using a Centrikon T-124 high-speed centrifuge, Kontron, France) and redispersion in water, until the conductivity of the supernatant was  $\leq 10 \mu\text{S}/\text{cm}$ .

### *Loading to the polymeric nanoplatform with doxorubicin*

The polymeric NPs were loaded with antitumor drug by: 1) DOX entrapment within the (nano-)matrix; and 2) DOX surface adsorption onto

previously prepared NPs. DOX entrapment/adsorption within/onto the NPs was assessed through UV–Vis spectroscopy by determining the amount of drug remaining in the supernatant solutions (see below), which were obtained by filtering the nanoparticulate suspensions through a 0.1  $\mu\text{m}$  membrane filter, after the entrapment/adsorption process. No DOX adsorption on the filter membrane was determined spectrophotometrically.

DOX entrapment involved the preparation of an aqueous polymerization medium, containing  $10^{-4}$  N  $\text{HNO}_3$  and Pluronic® F-68 (1%, w/v) (Sigma-Aldrich), and the subsequent dropwise addition of an acetonic solution of the butylcyanoacrylate monomer (1%, w/v) containing increasing concentrations of DOX ( $10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-3}$ , and  $10^{-2}$  M). All other steps previously described to prepare the PBCA NPs remained unchanged. Finally, DOX surface adsorption was performed at  $25.0^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$  by combining suspensions of PBCA NPs ( $\approx 2\%$ , w/v) with aqueous DOX solutions of known concentrations ( $10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-3}$ , and  $10^{-2}$  M). The suspensions were then stirred (50 rpm) for 24 hours. All experiments were performed in triplicate.

### ***Characterization methods***

The geometry of the NPs was deduced from scanning electron microscopy images (Zeiss DSM 950 scanning electron microscope, Germany). Before taking images, a dilute aqueous NP suspension ( $\approx 0.1\%$ , w/v) was sonicated for 5 minutes, and then drops of the suspension were placed on copper grids with Formvar film. The grids were then dried in a convection oven at  $35.0^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ .

Mean particle diameters were also determined in triplicate at  $25.0^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$  by photon correlation spectroscopy (PCS) (Malvern Autosizer® 4700, Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK), with the scattering angle set at  $60^\circ$ . Measurements were made after suitably diluting the aqueous NP dispersions ( $\approx 0.1\%$ , w/v). The stability of the DOX-loaded PBCA NPs was assessed by measuring both their size and DOX loading values after 1 month of storage in water at  $4.0^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ . The surface electrical properties of the PBCA NPs (in a  $\approx 0.1\%$  w/v aqueous

suspension) were examined by electrophoresis (Malvern Zetasizer 2000 electrophoresis device, Malvern Instruments Ltd.) at pH 4 (adjusted with the addition of  $10^{-4}$  N  $\text{HNO}_3$ ) and in a  $10^{-3}$  M  $\text{KNO}_3$  solution. Measurements were performed at  $25.0^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ , after the DOX solution and PCBA NP suspension had been mixed under mechanical stirring (200 rpm) for 24 hours at the same temperature. The experimental uncertainty of the measurements was less than 5%. The O'Brien and White theory was used to convert the electrophoretic mobility ( $ue$ ) data into zeta potential ( $\zeta$ ) values.<sup>20</sup>

UV–Vis absorption measurements (8500 UV–Vis Dinko spectrophotometer, Dinko, Spain) to determine DOX concentration in all the systems investigated were conducted at the maximum absorbance wavelength (481 nm), using quartz cells of 1 cm path length. Good linearity was observed at this wavelength, and the method was validated and verified for accuracy, precision, and linearity in all conditions tested. The reproducibility of the drug solutions' UV–Vis absorbance spectra was assured throughout the time period required for the experiments performed in this work by wrapping all glassware with aluminum foil to protect them against ambient light. DOX entrapment/adsorption measurements were carried out in triplicate by applying Beer's law to the UV–Vis absorbance of the supernatant solutions obtained by filtration (see above). For the method to be accurate, we considered the contribution to the absorbance of sources other than variations in drug concentration (mainly the presence of Pluronic® F-68 [Sigma-Aldrich] and PBCA degradation products in the supernatant solutions) by subtracting the absorbance of the supernatant produced under the same conditions but without DOX.<sup>21–23</sup>

DOX incorporation to the PBCA NPs was expressed in terms of drug entrapment efficiency (%) and drug loading (%). These parameters were calculated as follows:

$$\text{Drug entrapment efficiency (\%)} = \frac{\text{Mass of drug incorporated (mg)}}{\text{Initial drug added to the suspension (mg)}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Drug loading (\%)} = \frac{\text{Mass of drug incorporated (mg)}}{\text{Mass of PBCA NPs (mg)}} \times 100 \quad (2)$$

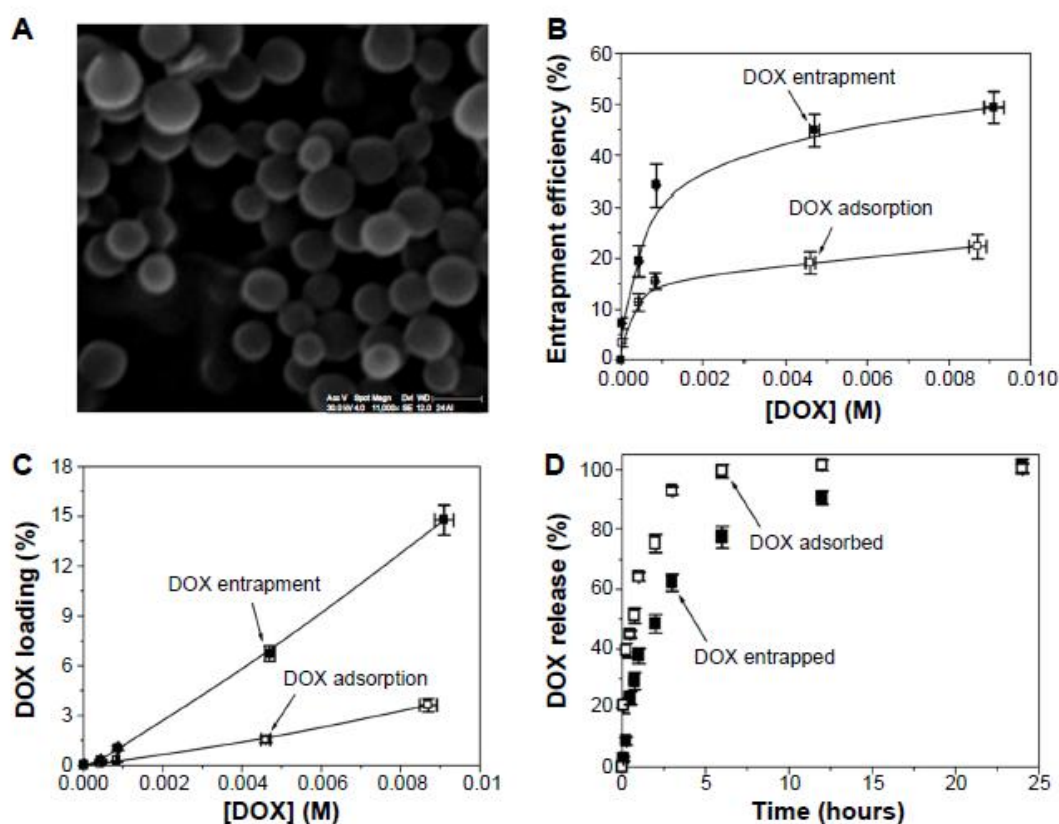
### ***In vitro release of doxorubicin from poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles***

The dialysis bag method was used in triplicate to subsequently determine the amount of DOX released from PBCA NPs after its incorporation. Concretely, this characterization was performed on the PBCA NPs with the highest drug entrapment efficiencies (Figure 1B), ie,  $\approx 22.3\%$  for the adsorption method and  $\approx 49.3\%$  for the entrapment technique. Phosphate buffered saline (PBS) (pH  $=7.4 \pm 0.1$ ) maintained at  $37.0^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$  was used as the release medium for all of the experiments. The dialysis bag (2,000 Da cutoff; Spectrum® Spectra/Por® 6 dialysis membrane tubing, Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, USA) retained the NPs and allowed the free DOX molecules to diffuse into the dissolution medium. About 2 mL of a drug-loaded PBCA NP suspension (containing 2 mg/mL of DOX) was poured into the bags (previously soaked in water for 12 h) with the two ends held by clamps. The bags were then placed in a conical flask containing 50 mL of the receiving phase (PBS, pH 7.4), which was stirred at 250 rpm. At predetermined times (0.08, 0.25, 0.50, 0.75, 1, 2, 3, 6, 12, and 24 hours), 3 mL samples of the receiving phase were withdrawn for UV–Vis analysis at 481 nm. An equal volume of PBS, maintained at the same temperature, was added to the release medium after sampling to ensure sink conditions.

### ***Cell culture***

The MCF-7 human breast cancer cell line (European Collection of Cell Culture) and E0771 mouse breast cancer cell line (isolated from an immunocompetent C57BL/6 mouse and provided by Robin Anderson from Peter MacCallum Cancer Center, East Melbourne, Australia) were used. Both estrogen receptor-positive cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 10 mM HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic

acid) buffer, then maintained in a monolayer culture at  $37.0^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  under a humidified atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$  in air.



**Figure 1** Doxorubicin-loaded PBCA NPs.

**Notes:** Scanning electron microscope picture of PBCA NPs (A). Scale bar: 150 nm. DOX entrapment efficiency (%) (B), and DOX loading (%) (C) values on the surface of (adsorption procedure, open symbols:  $\square$ ), and within (entrapment procedure, full symbols:  $\blacksquare$ ) PBCA NPs, as a function of the initial drug concentration (the lines are guides to the eye). Release of previously entrapped (full symbols:  $\blacksquare$ ) or adsorbed (open symbols:  $\square$ ) doxorubicin from PBCA NPs as a function of the incubation time in PBS, at  $\text{pH} = 7.4 \pm 0.1$  and  $37.0^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  (D).

**Abbreviations:** DOX, doxorubicin; PBCA NPs, poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles; PBS, phosphate buffered saline.

### Cytotoxicity assay

Cells were seeded into 24-well plates ( $10^4$  cells/well for MCF-7,  $1.5 \times 10^4$  cells/well for E0771) and incubated with increasing concentrations of free DOX (0.05–5.00  $\mu\text{M}$ ), DOX-loaded PBCA NPs (equal to 0.05–5.00  $\mu\text{M}$  of free DOX) and

blank PBCA NPs (ie, with no DOX loading, and at similar dilutions to drug-loaded NPs). Cytotoxic activity was assessed by determining the 50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) values obtained from the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide-based colorimetric assay (MTT assay). After 8, 24, and 48 hours of incubation, 20  $\mu$ L of an MTT solution (5 mg/mL of cell culture medium) was added to each well. After incubation for 4 hours at  $37^{\circ}C \pm 0.5^{\circ}C$ , the culture medium was removed, and the resultant formazan crystals were dissolved in 200  $\mu$ L of dimethyl sulfoxide (DMSO). The absorbance of the converted dye, which is proportional to the number of viable cells, was measured at 570 and 690 nm using a Titertek Multiskan<sup>TM</sup> colorimeter (Flow Laboratories, Irvine, UK). The percentage of surviving cells was expressed as relative growth rates (RGR, %) and was calculated as follows:

$$RGR (\%) = \frac{\text{absorbance of the sample}}{\text{absorbance of the negative control}} \times 100 \quad (3)$$

### ***Intracellular uptake of doxorubicin***

The intracellular distribution of free DOX and DOX derived from drug-loaded PBCA NPs was visualized by fluorescence microscopy. MCF-7 and E0771 cells were seeded into 8-well chamber slides (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) ( $5 \times 10^3$  cells/well) in 300  $\mu$ L of DMEM. According to Li et al<sup>25</sup> the cells were incubated with high doses of free DOX (10.0 and 43.1  $\mu$ M) and DOX-loaded PBCA NPs (equal to 10.0 and 43.1  $\mu$ M of free DOX) for different periods (from 1 to 24 h). A 100 nM solution of 4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI, (Invitrogen<sup>TM</sup>, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used for nuclear staining. The cells were then rinsed with PBS, mounted, and examined with fluorescent microscopy (Nikon Eclipse 50i microscope, Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA). DOX was excited at 570 nm and DAPI nuclear stains at 358 nm. In addition, FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) was used for the quantification of DOX incorporation by cells. Cells were seeded in 6-well plates ( $1.5 \times 10^5$  cells/well)

in 2 mL of DMEM. After short incubations with DOX and DOX-loaded PBCA NPs (for 0.5, 1, 1.5, 2, and 4 h), the cells were washed with PBS. They were then harvested with a solution of PBS-ethylene-diamine-tetraacetic acid (0.02%) (EDTA), transferred to universal screw cap tubes, centrifuged ( $600\times g$  for 5 min), and washed twice with PBS. FACScan analysis was used to obtain the mean value of fluorescence. The increase in mean fluorescence (IMF, %) was calculated as follows:

$$IMF (\%) = \frac{\text{mean fluorescence after treatment} - \text{basal mean fluorescence}}{\text{basal mean fluorescence}} \times 100 \quad (4)$$

### ***Transmission electron microscopy***

Parental MCF-7 cells (control) and MCF-7 cells treated with DOX-loaded PBCA NPs (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) at  $25.0^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$  for 1 hour. Postfixation was performed at  $25.0^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$  for 2 hours with 1% osmium tetroxide ( $\text{OsO}_4$ ) in cacodylate buffer (pH 7.2), and sections were then dehydrated in 100% ethanol before a final dehydration in propylene oxide. Samples were then embedded in Epon 812 resin. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate, and then analyzed by optical and transmission electronic microscopy (Hitachi H7000 transmission electron microscope, Tokyo, Japan).<sup>24</sup>

### ***Tumor induction and treatment***

Female C57BL/6 mice (Scientific Instrumentation Center, University of Granada) were used in the in vivo study. All mice (body weight: 25–30 g) were maintained in a laminar airflow cabinet placed in a room maintained at  $37.0^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$  and 40%–70% relative humidity, with a 12-hour light/dark cycle under specific pathogen-free conditions. The study was approved by the Ethics Committee of the School of Medicine (University of Granada) and performed according to its guidelines. Pilot experiments were previously conducted to



determine the number of malignant cells for subcutaneous injection. After that, tumors were induced by subcutaneous injection of  $5 \times 10^5$  E0771 cells into the left flanks of C57BL/6 mice. When the tumor was palpable, animals were randomly divided into four groups (n=10) corresponding to the treatments with saline solution (group I), free DOX solution (group II), blank PBCA NPs (with no DOX loading) (group III), and DOX-loaded PBCA NPs (group IV). The doses of DOX administered were 10 mg/kg of body mass in all of the formulations containing the antitumor drug. Each mouse was intravenously administered the formulation every 3 days up to a total number of 5 times. Weights and deaths were carefully recorded throughout the period, and the tumors' largest diameter a plus the second largest diameter b perpendicular to a was measured using a digital calliper. The tumor volume (V, mm<sup>3</sup>) was calculated as follows:

$$V \text{ (mm}^3\text{)} = \frac{a \cdot b^2 \cdot \pi}{6} \quad (5)$$

### ***Statistical analysis***

Statistical analysis was performed by using the Student's t-test (SPSS version 7.5, SPSS, Chicago, IL, USA). Data with  $P < 0.05$  and  $P < 0.001$  were considered significant and very significant, respectively. A Kaplan–Meier method was used to determine the probability of mice survival, and the log-rank test was used to compare the fraction of surviving mice between groups ( $\alpha = 0.05$ ).

## **Results**

### ***Particle geometry and surface electrical properties***

The synthesis of PBCA NPs following an emulsion/polymerization method allowed, in agreement with previous studies, the formation of highly stable spherical particles with a narrow colloidal size distribution (average diameter of  $135 \pm 20$  nm with a polydispersity index of 0.071, Figure 1A); as such, they are well



suited to parenteral administration.<sup>22,25</sup> DOX loading did not influence either the NP geometry or the quality of the nanoparticulate suspensions. Finally, PCS measurements after 1 month of storage at  $4.0^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  in water confirmed that the size of the particles did not change. In addition, there was no observation of the formation of bulky sediments or aggregates, NP aggregation or DOX precipitation, and/or release during this time period. Therefore, if the (nano-)preparations were not used directly once prepared, they were kept under these storage conditions until used. Finally, the electrokinetic characterization of the PBCA NPs ( $\approx 0.1\%$ , w/v aqueous suspension) ( $\zeta = -3.6\pm 0.2$  mV, at pH 4,  $25.0^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  and  $10^{-3}$  M  $\text{KNO}_3$ ) was in agreement with previous electrophoretic studies on PBCA NPs in which a negative surface charge was observed at pHs  $\geq 3$ .<sup>26</sup>

### ***Doxorubicin loading to poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles***

We first investigated the influence of the drug-loading procedure on the quantity of DOX incorporated by the PBCA NPs: drug entrapment within the PBCA (nano-)matrix, and DOX surface adsorption onto previously synthesized PBCA NPs (see above). Interestingly, compared with DOX adsorption onto the NP surfaces, both the entrapment efficiency (%) and the drug loading (%) were significantly enhanced when DOX was entrapped within the NP matrices, independent of the initial DOX concentration. For instance, when the initial drug concentration was 0.01 M, these parameters, respectively, increased from  $22.3\%\pm 2.4\%$  and  $3.6\%\pm 0.4\%$ , when DOX was adsorbed onto the NP surface, to  $49.3\%\pm 3.1\%$  and  $14.8\%\pm 0.9\%$ , when the drug was entrapped within the NP network (Figure 1B and C). Finally, drug concentration positively influenced DOX incorporation to the PBCA NPs, for both of the drug-loading procedures employed (entrapment and surface adsorption). In the case of the adsorption method, over the range of initial DOX concentrations from  $10^{-5}$  to  $10^{-2}$  M, the entrapment efficiency and drug loading values increased from  $3.4\%\pm 0.8\%$  and  $0.006\%\pm 0.001\%$  up to  $22.3\%\pm 2.4\%$  and  $3.6\%\pm 0.4\%$ , respectively. For the entrapment technique, the corresponding values rose from  $7.2\%\pm 1.1\%$  and  $0.022\%\pm 0.001\%$  to  $49.3\%\pm 3.1\%$

and  $14.8\% \pm 0.9\%$ , respectively, over the same initial DOX concentration range ( $10^{-5}$  to  $10^{-2}$  M). In any case, a tendency toward saturation at higher concentrations was apparent (Figure 1B).

### ***Doxorubicin release from poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles***

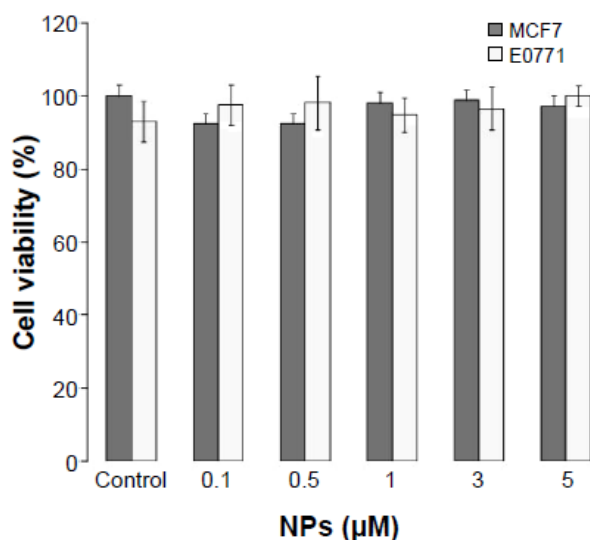
DOX release from PBCA NPs at pH 7.4 and  $37.0^{\circ}\text{C}$  showed a biphasic, sustained process that was characterized by an initial rapid, burst phase (up to  $\approx 37\%$  and  $\approx 64\%$  drug released in 1 hour for the cases of DOX entrapment within NPs and surface adsorption onto NPs, respectively), followed by a more sustained release of the remaining DOX molecules over a period of 23 hours for DOX entrapment and 5 hours for surface adsorption (Figure 1D). Taking our results into consideration, we decided to perform all in vitro and in vivo antitumor studies using the PBCA NPs that had the highest DOX entrapment efficiency (ie,  $\approx 49\%$ , Figure 1B) and that were characterized by a sustained drug release profile (Figure 1D): therefore, we used DOX-loaded NPs that were synthesized by the entrapment procedure using a fixed initial drug concentration of 0.01 M.

### ***Cytotoxicity of doxorubicin-loaded poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles***

Before the antitumor tests, the toxicity of blank PBCA NPs (with no DOX loading) was investigated in MCF-7 and E0771 cells. No significant differences were observed between the negative control and the cells exposed to increasing concentrations of PBCA NPs (Figure 2).

Thus, the lack of cytotoxicity of the PBCA NPs alone meant they could safely be used as drug carriers. On the other hand, the cytotoxicity of DOX-loaded PBCA NPs against MCF-7 breast carcinoma cells ( $\text{IC}_{50}$ :  $0.5 \mu\text{M}$ ) was significantly greater than that of free DOX ( $\text{IC}_{50}$ :  $2 \mu\text{M}$ ) ( $P < 0.001$ ) after 8 hours of incubation. This difference between the  $\text{IC}_{50}$  of DOX-loaded PBCA NPs and free DOX could still be observed after 48 hours of incubation (Figure 3A). In addition, the  $\text{IC}_{50}$  of DOX-loaded PBCA NPs in E0771 cells was significantly lower than the  $\text{IC}_{50}$  of the

free antitumor drug ( $P < 0.05$ ). DOX loaded within PBCA NPs yielded an  $IC_{50}$  ( $0.2 \mu\text{M}$ ) 15 times lower than that of free DOX ( $IC_{50}$ :  $3 \mu\text{M}$ ) after 8 hours of exposure and 21.7 times lower ( $0.06 \mu\text{M}$ ) after 48 hours of exposure (free DOX  $IC_{50}$ :  $1.3 \mu\text{M}$ ) (Figure 3B).



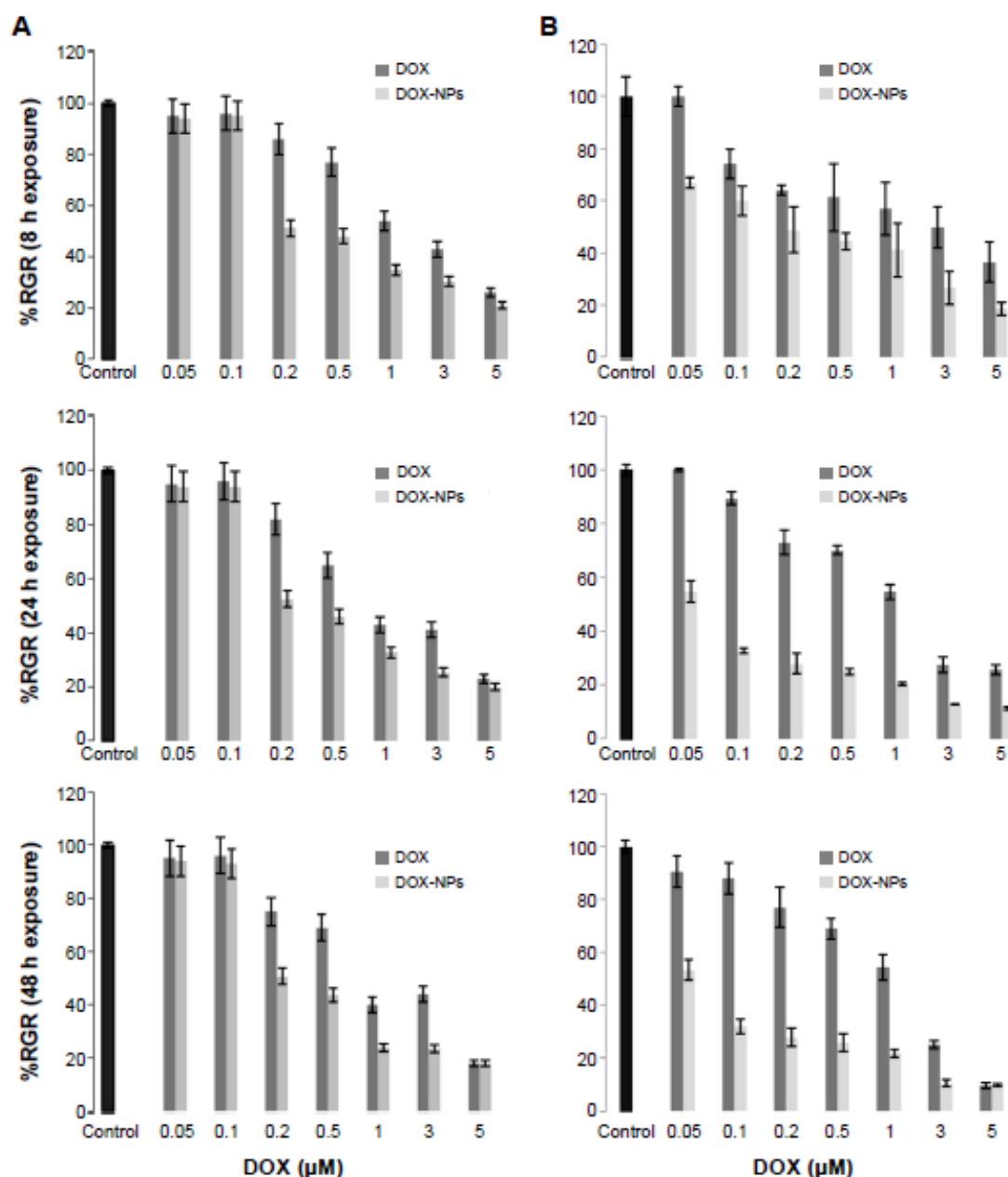
**Figure 2** In vitro cytotoxicity of PBCA NPs in MCF-7 and E0771 cell lines.

**Notes:** Growth of MCF-7 and E0771 cells was evaluated after 48 h of exposure to a wide range of PBCA NP concentrations ( $0.1$ – $5.0 \mu\text{M}$ ). Data represented as the mean value  $\pm$  SD of quadruplicate cultures.

**Abbreviations:** PBCA NPs, poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles; SD, standard deviation; h, hours; NPs, nanoparticles.

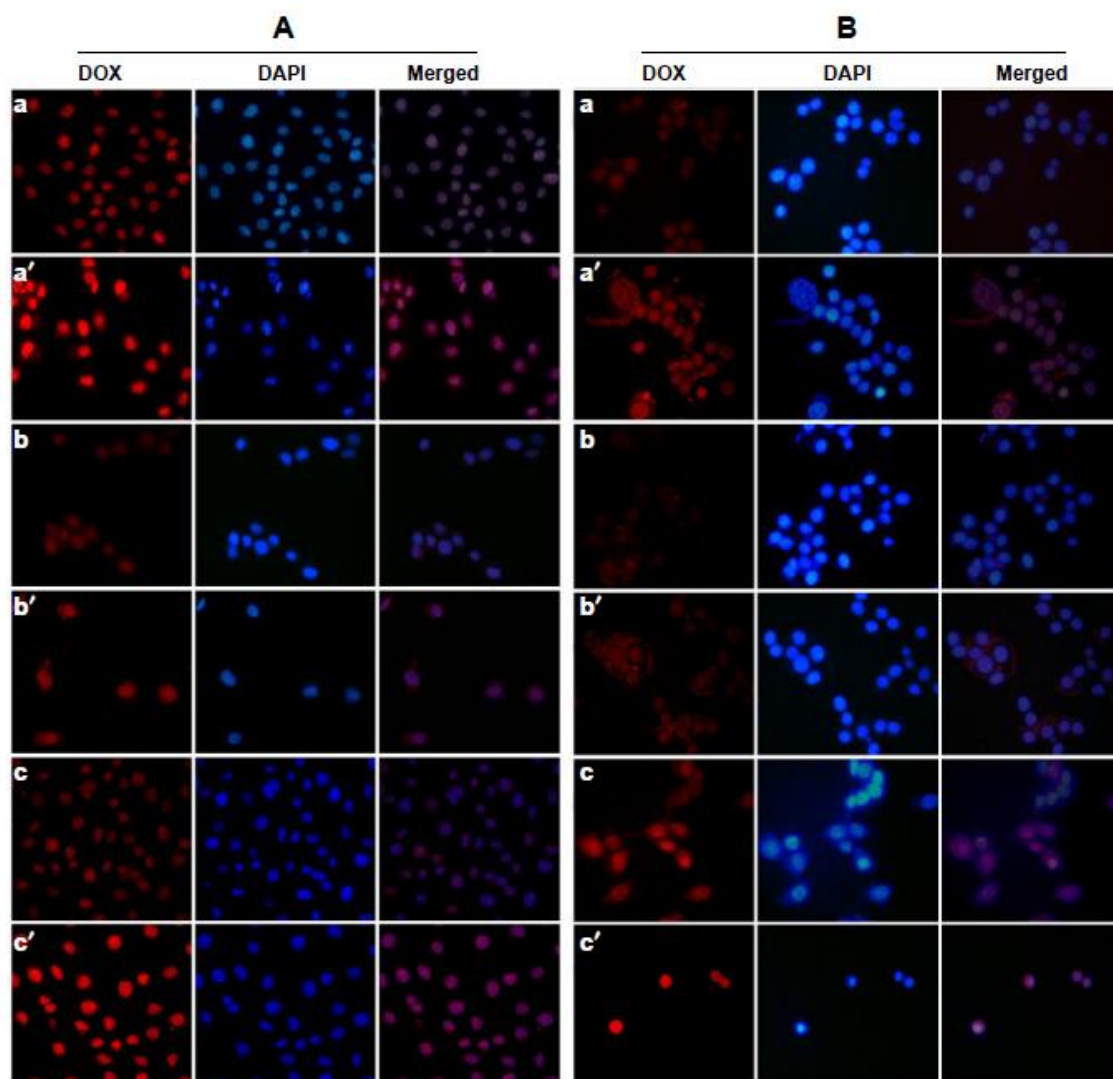
### ***Distribution of doxorubicin-loaded poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles***

MCF-7 and E0771 cell lines treated with DOX-loaded PBCA NPs and free DOX at different times and concentrations were visualized by fluorescence microscopy. At any given moment, DOX-loaded PBCA NPs induced a more intense fluorescence (in both cytoplasm and nucleus) than free DOX, suggesting a greater DOX uptake by malignant cells (incorporation into the nucleus) when drug molecules were loaded within/onto NPs (Figure 4). Both cell lines were characterized by a similar drug incorporation and intracellular drug localization.



**Figure 3** In vitro cytotoxicity of DOX-loaded PBCA NPs in MCF-7 (A) and E0771 (B) cells. Growth inhibition was evaluated after 8, 24, and 48 h exposure to DOX-loaded PBCA NPs in comparison with free DOX. The percentage of survival was determined by normalizing the absorbance of controls to 100%. Data represented as the mean value  $\pm$  SD of quadruplicate cultures.

**Abbreviations:** DOX, doxorubicin; PBCA NPs, poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles; DOX-NPs, DOX-loaded PBCA NPs; RGR, relative growth rates; SD, standard deviation; h, hours.



**Figure 4** Fluorescence microscopy analysis of the intracellular presence of DOX in MCF-7 (**A**) and E0771 (**B**) cells.

**Notes:** Fluorescence studies showed that the accumulation of intracellular DOX in cells treated with DOX-loaded PBCA NPs was always greater than intracellular DOX accumulation in cells treated with free DOX. The images are representative of treatment with the highest and lowest concentrations of free DOX (**a**, **b**, **c**) and DOX-loaded PBCA NPs (**a'**, **b'**, **c'**): **a** and **a'**, 43.1  $\mu\text{M}$  for 1 h; **b** and **b'**, 10  $\mu\text{M}$  for 1 h; **c** and **c'**, 10  $\mu\text{M}$  for 24 h. All images are at a 40 $\times$  magnification.

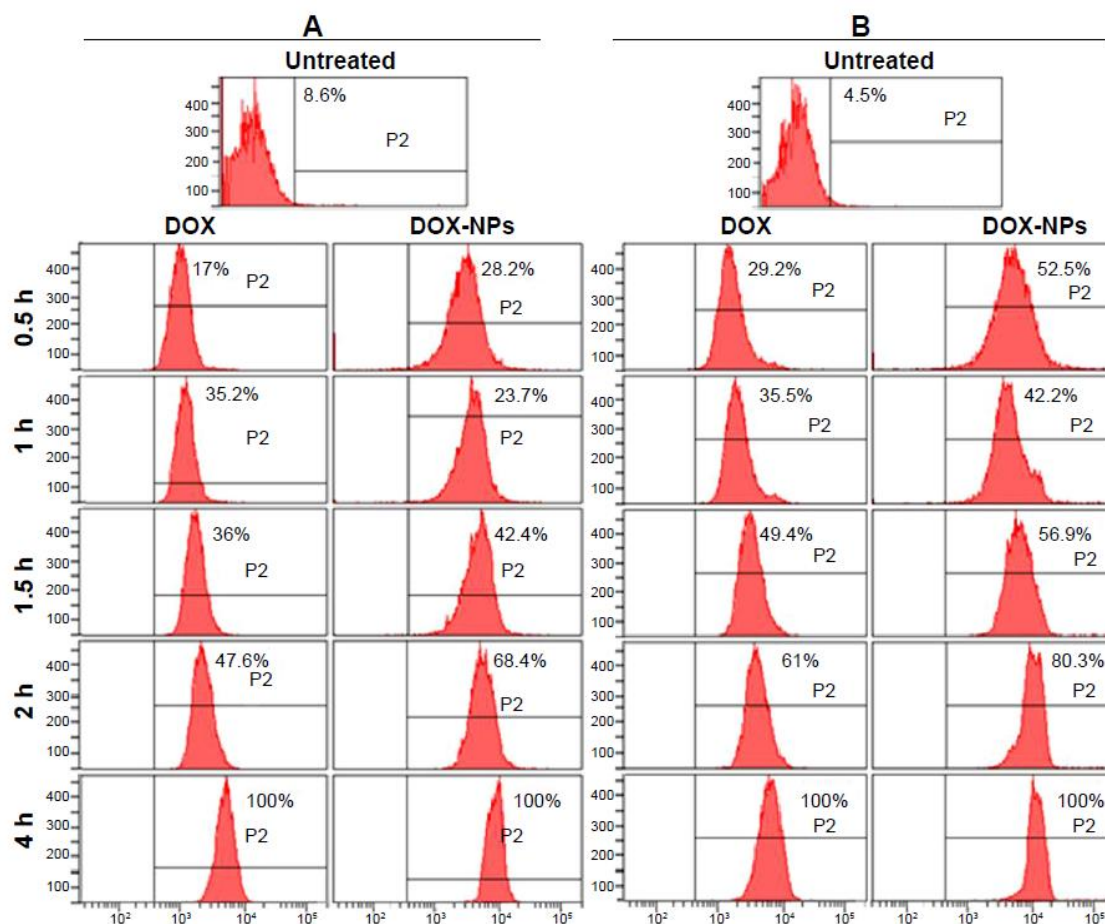
**Abbreviations:** DOX, doxorubicin; PBCA NPs, poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles; h, hours; DAPI, 2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride.

***FACSscan analysis of doxorubicin location inside cells***

To evaluate drug accumulation inside the malignant cells, we conducted a fluorocytometric analysis during the first hours of the treatment (Figure 5). When MCF-7 cells were incubated with high doses of DOX-loaded NPs for 0.5, 1, 1.5, 2, and 4 hours, relative increases in fluorescence were observed (51.9%, 42.7%, 50.6%, 33.1%, and 34.2%, respectively) in comparison with tumor cells treated with free DOX (Figure 5A). Qualitatively, similar results were obtained for E0771 cells when comparing DOX-loaded NPs and free DOX, where the relative increases in fluorescence after the same periods of exposure were 53.0%, 29.4%, 26.7%, 35.8%, and 15.5%, respectively (Figure 5B). This finding could be the consequence of a greater and more rapid DOX uptake when the drug is encapsulated within the PBCA NPs. As a result, a higher DOX concentration within the cell nucleus was maintained at all times.

***Ultrastructural changes in breast cancer cells treated with doxorubicin-loaded poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles***

MCF-7 cells were assessed using transmission electron microscopy to determine the nature of any ultrastructural changes. As shown in Figure 6, treatment with both free DOX and DOX-loaded PBCA NPs caused dramatic changes in the cell nucleus after 4 hours of exposure to the drug. However, only DOX-loaded PBCA NPs induced significant nuclear alterations even after just 1 hour of exposure. In addition, MCF-7 cells treated with DOX-loaded NPs showed higher levels of mitochondrial damage compared with cells treated with free DOX for the same period and at the same concentration. Finally, neither of the treatments induced significant differences in other cytoplasm structures.

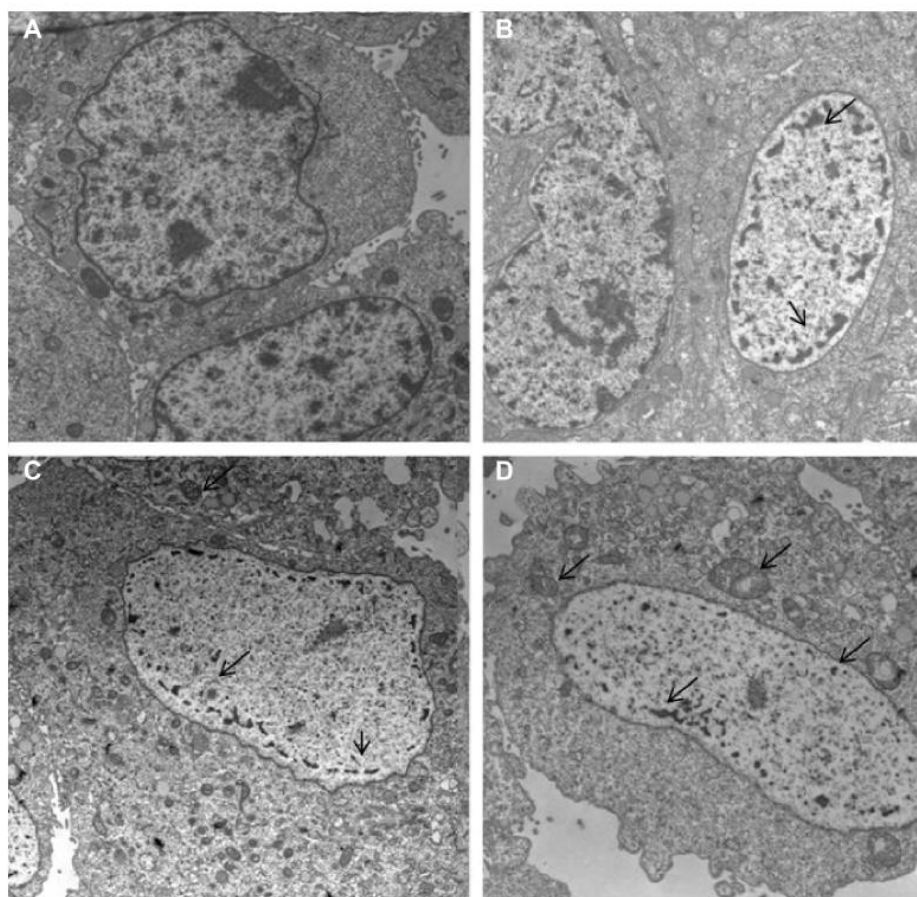


**Figure 5** Fluorocytometric analysis of the intracellular presence of DOX in MCF-7 (A) and E0771 (B) cells.

**Notes:** Representative image of the FACS can analysis and mean values of untreated cells and cells treated with free DOX and DOX-loaded PBCA NPs (DOX-NPs) at the highest concentration (43.1  $\mu\text{M}$ ) over a 4 h period.

**Abbreviations:** DOX, doxorubicin; PBCA NPs, poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles; h, hours.





**Figure 6** Ultrastructural analysis of MCF-7 cells.

**Notes:** MCF-7 parental cells showed a large nucleus and a light cytoplasmic complex containing well-preserved organelles including mitochondria (A). Treatment with free DOX (43.1  $\mu$ M for 1 hour) induced nuclear alteration (arrows) (B). However, exposure of MCF-7 to DOX-loaded PBCA NPs at the same concentration and for the same time period resulted in major damage to the nuclei and produced a large number of altered mitochondria with disrupted cristae (arrows) (C and D). All images are at a 2,000 $\times$  magnification.

**Abbreviations:** DOX, doxorubicin; PBCA NPs, poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles.

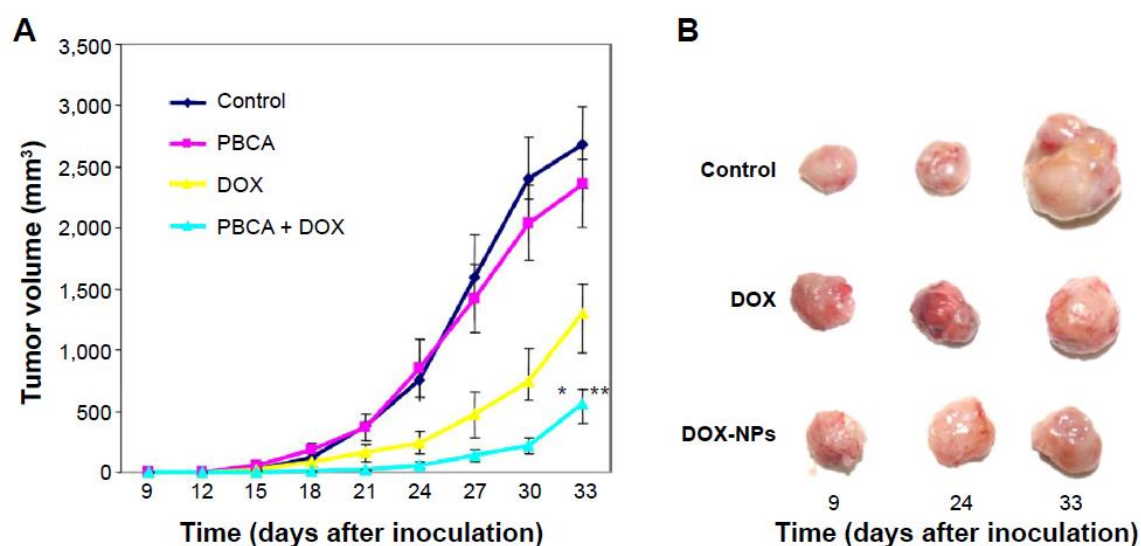
### ***In vivo breast cancer growth suppression and mice survival***

The potential of DOX-loaded PBCA NPs to improve in vivo tumor cell death rates was evaluated using subcutaneous E0117 tumor-bearing immunocompetent C57BL/6 mice. The intravenous administration of DOX-loaded NPs was able to induce a significant inhibition of tumor growth (Figure 7). In fact, tumor volumes of mice treated with DOX-loaded NPs were significantly smaller than those of control mice ( $P < 0.01$ ). At the end of the in vivo study (day 33), tumor



growth was inhibited by up to 40% in mice treated with DOX-loaded NPs compared with mice treated with free DOX. The intravenous injection of blank NPs did not influence the typical growth of untreated control tumors.

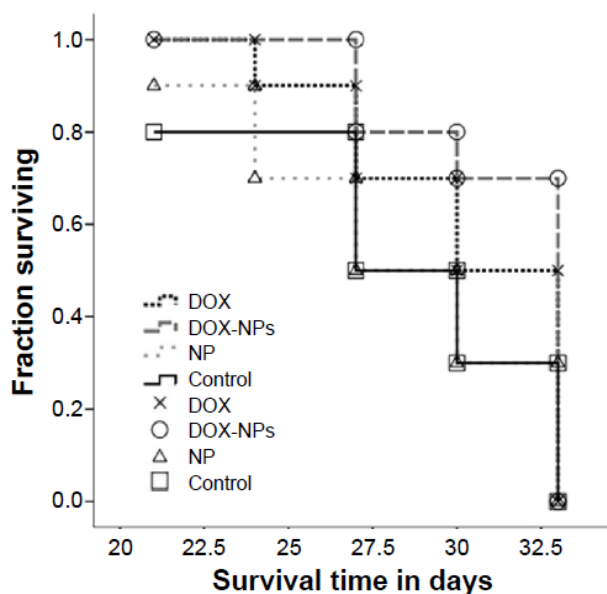
On the other hand, both treatments (free DOX and DOX-loaded NPs) permitted a greater survival in comparison with the control group and the blank NPs group. The Kaplan–Meier curve also showed a 0.2-fold increase in the fraction of surviving mice when treated with DOX-loaded NPs in comparison with mice treated with free DOX (Figure 8). However, this increase was not significant according to the log-rank test.



**Figure 7** Effect of DOX-loaded PBCA NPs on the growth of subcutaneous tumors induced by E0771 murine breast cancer cells in immunocompetent C57BL/6 mice.

**Notes:** (A) Tumor volume variation after treatments. The DOX-loaded PBCA NPs demonstrated a significant increase in tumor inhibition ( $*P < 0.01$ , compared with the control and blank NPs;  $**P < 0.05$ , compared with free DOX). Data represented as the mean  $\pm$  SE M ( $n=10$ ). (B) Representative gross appearance of tumors excised from mice that died during treatment with DOX and with DOX-loaded NPs after 9, 24, and 33 d plus tumors taken from untreated mice after the same time intervals.

**Abbreviations:** DOX, doxorubicin; PBCA NPs, poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles; SE M, standard error of the mean; DOX-NPs, DOX-loaded PBCA NPs; PBCA, poly(butylcyanoacrylate); NPs, nanoparticles.



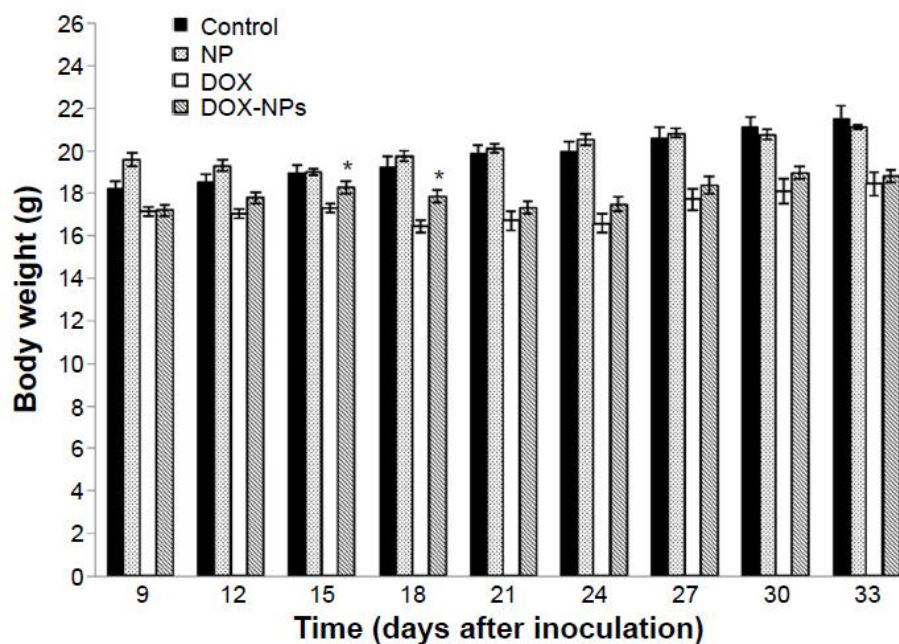
**Figure 8** Kaplan–Meier curves of mice bearing subcutaneous breast tumors.

**Notes:** Data were analyzed according to the mice survival in each group (n=10). Comparison between treatment groups was performed with the use of the log-rank test ( $P < 0.05$ ).

**Abbreviations:** DOX, doxorubicin; DOX-NPs, DOX-loaded PBCA NPs; NP, nanoparticle.

### *In vivo toxicity*

Body weight of the mice was monitored as a clinical sign of the *in vivo* toxicity of the treatment. According to Figure 9, mice treated with blank NPs showed neither increased mortality nor noticeable losses of body weight compared with the controls. In contrast, mice treated with free DOX and DOX-loaded PBCA NPs showed a significant loss in body weight compared with the controls ( $P < 0.001$ ). Interestingly, during the treatment administration period (15 days), the weight loss was statistically lower ( $P < 0.001$ ) in mice treated with DOX-loaded PBCA NPs than in those treated with free DOX, suggesting that NPs decreased drug toxicity. After withdrawing the treatment, both groups recovered their body weight, resulting in similar values at the end of the experiment (33 days).



**Figure 9** Evolution of body weight of immunocompetent C57BL/6 mice during and after treatment.

**Notes:** Weight of mice was measured every 3 d. During and after treatment, treatment with blank NPs did not induce significant weight losses compared with the controls. In contrast, treatment with free DOX and DOX-loaded PBCA NPs always induced a significant mouse body weight loss with respect to the controls ( $P < 0.001$ ). However, the loss induced by treatment with DOX-loaded PBCA NPs was significantly lower ( $*P < 0.001$ ) than the loss caused by free DOX. Data represented as the mean value  $\pm$  SD ( $n=10$ ).

**Abbreviations:** DOX, doxorubicin; PBCA NPs, poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles; d, days; SD, standard deviation; DOX-NPs, DOX-loaded PBCA NPs.

## Discussion

In the present study, we reported a DOX-loaded PBCA nanoparticulate system that demonstrated significantly more *in vitro* activity against breast cancer tumor cells than the free antitumor drug, doxorubicin, inducing a 40% relative decrease in *in vivo* tumor growth when administered intravenously. Furthermore, the polymeric nanocarrier was able to reduce systemic toxicity, at least throughout the duration of the treatment. These results suggest that PBCA NPs may improve the efficacy of DOX therapies against advanced breast cancers.

We have developed a reproducible synthesis procedure for the formulation of DOX-loaded PBCA NPs to target breast cancer cells. The synthesis methodology is based on the emulsion/polymerization of butylcyanoacrylate monomer in an aqueous solution.<sup>18,19</sup> The procedure afforded the synthesis of spherical, stable DOX-loaded NPs with a number average diameter <160 nm (Figure 1A). These relatively small particles are expected to facilitate the uptake and accumulation of DOX by and within malignant cells. In fact, it has been stated that drug carriers ranging from 100 to 200 nm in size enter cancer cells by receptor-mediated endocytosis.<sup>27</sup> The optimum synthesis conditions were taken as those that yielded the highest drug entrapment efficiencies and drug loading values (Figure 1B and C). In detail, the drug entrapment procedure yielded the best DOX loading values, as is generally the case when drug molecules are added to the cyanoacrylate monomer solution before NP formation. This is probably due to the difficulty experienced by the antitumor drug in breaking away from the growing polymeric (nano-)network once it is entrapped within it.<sup>19</sup> In addition, a strong interaction between DOX molecules and the growing PBCA network has previously been described during emulsion/polymerization synthesis, a consequence of hydrogen bond formation between the drug's ammonium groups and the PBCA's cyano groups.<sup>28</sup>

Despite the fact that an attractive electrostatic interaction may exist between the positively charged drug molecules and the negatively charged polymeric surface, DOX loading values (%) for the surface adsorption method can be considered relatively low (<4%) (Figure 1C).<sup>29,30</sup> In fact, the approximation of this hydrophilic chemotherapy agent from the aqueous phase to the hydrophobic NP surface is expected to be thermodynamically unfavorable (when considering the decimal logarithm of the partitioning coefficient at pH 5.8 in an n-octanol/water system [ $\log_{10}(\text{DOX}/\text{water}) = -0.45$ ]).<sup>26,31</sup>

Regarding the initial drug concentration, a positive effect on drug vehiculization was observed upon increasing [DOX] in the aqueous solution, as has been reported previously with other drugs.<sup>19,22</sup> We did not investigate the influence of either monomer or stabilizing agent concentrations on drug entrapment because no relevant effect had previously been reported.<sup>22,25,32,33</sup>

With respect to previously published investigations into the development of DOX-loaded poly(alkylcyanoacrylate) NPs, although it has been demonstrated that 80% of the drug used in DOX loading experiments can be associated with the NPs, the mean particle size of these nanoformulations (ie,  $270\pm 30$  nm) is greater than the one obtained when following the synthesis described in this contribution (ie,  $135\pm 20$  nm).<sup>8</sup> Thus, a more favorable biological fate of the targeted drug-delivery system can be expected for the case of the nanoformulation developed by our research group.

DOX release from PBCA NPs at pH 7.4 and 37°C exhibited a biphasic, sustained profile (Figure 1D), characteristic of this polymer family, which could be a consequence of NP disintegration via surface erosion, drug diffusion through the polymeric matrix, or both.<sup>19,22,34,35</sup> More specifically, the rapid drug release during the first phase could be due to the loss of DOX–molecules that are surface associated and/or poorly entrapped (only adsorbed to the surface pores). These molecules rapidly diffused into the incubation medium. On the contrary, DOX release during the slower second phase may correspond to the fraction of the drug that is embedded deeply within the PBCA (nano-)matrix and that must follow a longer diffusion path before release into the surrounding medium. Finally, the faster release of DOX that occurs when the drug is adsorbed onto the NP surface may well be due to the weak physisorption of the hydrophilic drug onto the hydrophobic PBCA surface.

In order to define the antitumor activity of DOX-loaded PBCA NPs, they were tested in human MCF-7 and mouse E0771 breast cancer cell lines. No toxicity has been reported for the PBCA NPs, thus indicating that they provide a safe method for transporting biomolecules within living systems, and that any cytotoxic effects were only due to the loaded drug molecules. Interestingly, DOX-loaded PBCA NPs induced a greater inhibition of cell proliferation than free DOX in both cell lines, and in only a very short exposure time (8 h). After 48 hours, DOX-loaded NPs induced a significant decrease of the IC<sub>50</sub> in MCF-7 and E0771 cells in comparison with free DOX. To date, no significant increase in the antitumor DOX activity using poly(alkylcyanoacrylate) NPs has been described. Previously, DOX-

loaded poly(isohexylcyanoacrylate) (PIHCA) NPs demonstrated some benefit in terms of cell cytotoxicity.<sup>36</sup> Recently, Wohlfart et al<sup>37,38</sup> reported a significant but lesser increase in DOX activity in 101/8 rat glioblastoma cells using DOX-loaded PIHCA NPs. Duan et al<sup>39</sup> also demonstrated a significant decrease in the IC<sub>50</sub> of DOX-loaded PBCA NPs in relation to free DOX, but only when the NPs were surface modified with folic acid. The same authors demonstrated a reduction in the viability of MCF-7 cells using DOX-cyanoacrylate, thanks to the down-regulation of P-glycoprotein and to the coadministration of curcumin.<sup>40</sup> Although the cytotoxicity of anthracyclines has been observed to increase when entrapped within PBCA NPs, the mechanism of modulation of this drug activity has not yet been determined. One possibility is the use of surfactants that can act upon resistant mechanisms or enhance the plasma membrane permeability.<sup>41,42</sup> In fact, it has been proposed that the presence of Pluronic® F-68 (Sigma-Aldrich) (a nonionic surfactant), which was used to synthesize the DOX-loaded PBCA NPs in the present study, may lead to an increased cytotoxicity.<sup>43,44</sup>

Fluorescence microscopy and flow cytometry analysis were employed in an attempt to explain the enhancement of DOX cytotoxicity when the drug was incorporated within/on the surface of PBCA NPs. A greater DOX concentration was observed within malignant cells compared with the use of free DOX, thus suggesting that the NPs can improve drug incorporation into the cells. In fact, different intracellular concentrations and locations (nucleus or cytoplasm) have been reported when DOX is loaded within/on the surface of the NPs compared with the concentrations attained when using free DOX this has been attributed to a simple diffusion or endocytosis process.<sup>45,46</sup> Free DOX and DOX-loaded NPs predominantly situated themselves within the nucleus of both MCF7 and E0771 cells. However, when the antitumor drug was loaded in NPs, DOX also accumulated in the cytoplasm after a short period of exposure. Reasons justifying the different DOX accumulation profiles inside malignant cells are lacking. Some authors have hypothesized that the presence of surfactants (eg, Pluronic® F-68, Sigma-Aldrich) could alter the membrane transport proteins, thus enhancing drug entry into tumor cells.<sup>43,44</sup> Whatever the reason, the higher DOX concentration



inside MCF-7 cells (when it is delivered via loaded NPs) could explain the significant mitochondrial damage and nuclear alterations observed through transmission electron microscopy. In fact, morphological and ultrastructural changes caused by DOX in H9C2 rat myoblast cells (chromatin clumping, swollen mitochondria, disruption of the nuclear membrane structure, and cytoplasm vacuolization) were directly associated with the drug concentration.<sup>47</sup> The actual mechanism(s) that results in the significantly higher cytotoxicity of DOX-loaded PBCA NPs against MCF-7 and E0771 cells compared with the cytotoxicity of free DOX is not clear. It is known that, whereas the free drug enters cells by simple diffusion, drug-loaded NPs may provide a different cell entry mechanism such as endocytosis, pinocytosis, or phagocytosis, which is still under discussion.<sup>48,49</sup> It has been suggested that drug-loaded NPs are too large to pass through both the plasma and nuclear membranes. Thus, the presence of the drug within the cell nucleus must occur only once it has been released from inside the NPs.<sup>50,51</sup> The significant decrease in DOX IC<sub>50</sub> values in our cell lines after treatment with DOX-loaded PBCA NPs could be explained by the greater degree of drug incorporation into the cell when the NP biodegrades in the endosome and releases the DOX before finally reaching the nucleus.<sup>51,52</sup>

On the other hand, when DOX-loaded PBCA NPs were administered to tumor-bearing mice, a significantly greater inhibition of tumor growth (40%) was obtained in comparison with free DOX. This observation represents a substantial improvement in drug activity against breast cancer tumors. Our results demonstrated a similar or greater breast cancer growth inhibition when compared with the literature.<sup>53–55</sup> In the latter case, for example, a triblock N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA) copolymer loaded with DOX molecules has demonstrated a 26-fold increase in the IC<sub>50</sub> of the drug against 4T1 mammary carcinoma cells, but a mere 21.4% tumor growth inhibition compared with the free drug.<sup>56</sup> The *in vivo* results reported here for DOX-loaded PBCA NPs can be directly related to the greater *in vitro* effect of DOX-loaded NPs. However, the use of NPs by itself could increase the concentration of drug inside the tumor tissue, where an enhanced permeability and retention (EPR) effect and a low lymphatic

macromolecular clearance exist.<sup>57</sup> Furthermore, one of our main findings was the lower toxicity induced by the DOX-loaded PBCA NP treatment in relation to treatment with free DOX. Following the work of Yang et al<sup>56</sup> who reduced DOX toxicity using a block copolymer DOX conjugate, we assessed the fluctuation of mice body weight to determine the toxicity of the *in vivo* treatment. Our results showed a similar weight evolution for both untreated mice and mice treated with blank NPs. In contrast, a 15-day treatment with DOX-loaded PBCA NPs resulted in the DOX causing a significant body weight loss in relation to the controls. Interestingly, this weight loss of body mass was statistically lower ( $P < 0.01$ ) with DOX-loaded PBCA NPs than free DOX, suggesting that loading DOX within/onto NPs decreased its toxicity. After withdrawing the treatment, body weight was recovered by both groups, being similar at the end of the experiment (33 days). In contrast, others' studies showed no significant differences in mice body weight between treatments with DOX-loaded PBCA NPs and those employing free DOX, although for the case in reference both treatments were assayed in intracranial gliomas.<sup>58</sup> However, despite the positive results obtained in terms of reducing tumor growth and drug toxicity, the treatment schedule described here was not enough to ensure a clear and significant modulation in mouse survival – probably related to the relatively short treatment period. Nevertheless, the increased antitumor activity of DOX against breast cancer cells when loaded within/onto PBCA NPs could be used to reduce the therapeutic dose of the drug as part of a strategy to limit its side effects.

Certainly, other nanosystems for DOX release such as lipid vesicles or liposomes with a high biodegradability and biocompatibility also offer advantages in breast cancer treatment.<sup>59</sup> Strategies that include targeting ligands on DOX-loaded lipid vesicles, which are accessible by tumor acidification, have allowed the release of drugs after NP endocytosis. This system increased the percentage of *in vitro* cell death by almost threefold.<sup>60</sup> In addition, in murine xenograft models, lipid vesicles with DOX-loaded pH-triggered anti-HER2/neu cells showed a greater reduction in tumor volume compared with FDA-approved DOX-loaded vesicles.<sup>61</sup> However, the clinical application of lipid vesicles or liposomes requires optimization in terms of



both size and surface to resolve some of their disadvantages, such as their rapid renal clearance, recognition by the reticuloendothelial system, or low penetration in tumors. By contrast, polymeric NPs similar to those used here have already demonstrated a homogeneous size, a greater ability to solubilize hydrophobic drugs, a sustained release of the drug plus highly stable and customizable physicochemical properties, which means they will be accepted for clinical use in the near future.<sup>62</sup> Further assays involving both NP types will be necessary to obtain a quantitative improvement in the response of breast cancer patients.

## **Conclusion**

We have reported the optimal preparation conditions required to synthesize DOX-loaded PBCA NPs suitable for parenteral administration. Compared with surface adsorption, DOX incorporation within the NP matrix during the polymerization process has led to greater drug loading values and a slower drug release profile. The preclinical *in vitro* results described here have demonstrated the efficacy of DOX-loaded NPs against human and mouse breast carcinoma cells, given the important reduction of the IC<sub>50</sub>. *In vivo* studies have shown that DOX-loaded NPs can induce a significant inhibition of tumor growth and that the use of PBCA NPs reduces DOX toxicity. These results suggest that PBCA NPs may be used to improve the efficacy of DOX therapies against advanced breast cancers. The greater antitumor activity of DOX-loaded PBCA NPs could be used to reduce the dose of DOX needed to obtain an adequate antitumor effect but with almost negligible toxicity.

## **Acknowledgments**

This investigation was funded by FEDER, Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I + D + I), Instituto de Salud Carlos III (FIS) through projects Nos PI11/01862 and PI11/02571, and by the Consejería de Salud de la Junta de Andalucía through project No PI-0338. The authors wish to express their gratitude to G Ortiz Ferron (CIC, University of Granada, Spain) for his skillful assistance with cytometry experiments.

## **Disclosure**

The authors report no conflicts of interest in this work.

## **References**

1. Redig AJ, McAllister SS. Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis. *J Intern Med.* 2013;274(2):113–126.
2. Morris PG, McArthur HL, Hudis CA. Therapeutic options for metastatic breast cancer. *Expert Opin Pharmacother.* 2009;10(6):967–981.
3. Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, et al. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem.* 2009;16(25):3267–3285.
4. Toldo S, Goehe RW, Lotrionte M, et al. Comparative cardiac toxicity of anthracyclines in vitro and in vivo in the mouse. *PLoS One.* 2013;8(3): 1–8.
5. Peetla C, Bhave R, Vijayaraghavalu S, Stine A, Kooijman E, Labhasetwar V. Drug resistance in breast cancer cells: biophysical characterization of and doxorubicin interactions with membrane lipids. *Mol Pharm.* 2010;7(6):2334–2348.

6. Tang SC. Strategies to decrease taxanes toxicities in the adjuvant treatment of early breast cancer. *Cancer Invest.* 2009;27(2):206–214.
7. Prados J, Melguizo C, Ortiz R, et al. Doxorubicin-loaded nanoparticles: new advances in breast cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 2012;12(9):1058–1070.
8. Gelperina SE, Khalansky AS, Skidan IN, et al. Toxicological studies of doxorubicin bound to polysorbate 80-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles in healthy rats and rats with intracranial glioblastoma. *Toxicol Lett.* 2002;126(2):131–141.
9. Vauthier C, Dubernet C, Fattal E, Pinto-Alphandary H, Couvreur P. Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55(4):519–548.
10. Merle P, Si-Ahmed S, Habersetzer F, et al. Phase 1 study of intra-arterial hepatic (IAH) delivery of doxorubicin-transdrug® (DT) for patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC). *J Clin Virol.* 2006; 24(18):179.
11. Mestieri LB, Saska S, Carrodeguas RG, Gaspar AM. Evaluation of n-butyl cyanoacrylate adhesive in rat subcutaneous tissue. *Dermatol Surg.* 2012;38(5):767–771.
12. Vauthier C, Dubernet C, Chauvierre C, Brigger I, Couvreur P. Drug delivery to resistant tumors: the potential of poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles. *J Control Release.* 2003;93(2):151–160.
13. Zhou Q, Sun X, Zeng L, Liu J, Zhang Z. A randomized multicenter phase II clinical trial of mitoxantrone-loaded nanoparticles in the treatment of 108 patients with unresected hepatocellular carcinoma. *Nanomedicine.* 2009;5(4):419–423.

14. Barraud L, Merle P, Soma E, et al. Increase of DOX sensitivity by doxorubicin-loading into NPs for hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *J Hepatol.* 2005;42(5):736–743.
15. Ambruosi A, Khalansky AS, Yamamoto H, Gelperina SE, Begley DJ, Kreuter J. Biodistribution of polysorbate 80-coated doxorubicin-loaded [14C]-poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles after intravenous administration to glioblastoma-bearing rats. *J Drug Target.* 2006;14(2): 97–105.
16. De Juan BS, Von Briesen H, Gelperina SE, Kreuter J. Cytotoxicity of doxorubicin bound to poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles in rat glioma cell lines using different assays. *J Drug Target.* 2006;14(9): 614–622.
17. Hekmatara T, Bernreuther C, Khalansky AS, et al. Efficient systemic therapy of rat glioblastoma by nanoparticle-bound doxorubicin is due to antiangiogenic effects. *Clin Neuropathol.* 2009;28(3):153–164.
18. Couvreur P, Kante B, Roland M, Guiot P, Bauduin P, Speiser P. Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties. *J Pharm Pharmacol.* 1979;31(5):331–332.
19. Arias JL, Reddy LH, Couvreur P. Polymeric nanoparticulate system augmented the anticancer therapeutic efficacy of gemcitabine. *J Drug Target.* 2009;17(8):586–598.
20. O'Brien RW, White LR. Electrophoretic mobility of a spherical colloidal particle. *J Chem Soc Faraday Trans.* 1978;2(74):1607–1626.
21. Sullivan CO, Birkinshaw C. In vitro degradation of insulin-loaded poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles. *Biomaterials.* 2004;25(18): 4375–4382.

22. Arias JL, Ruiz MA, López-Viota M, Delgado AV. Poly(alkylcyanoacrylate) colloidal particles as vehicles for antitumour drug delivery: a comparative study. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2008;62(1):64–70.
23. Li YL, Zhu L, Liu Z, et al. Reversibly stabilized multifunctional dextran nanoparticles efficiently deliver doxorubicin into the nuclei of cancer cells. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2009;48(52):9914–9918.
24. Prados J, Melguizo C, Rama AR, et al. Gef gene therapy enhances the therapeutic efficacy of doxorubicin to combat growth of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010;66(1):69–78.
25. Arias JL, Gallardo V, Ruiz MA, Delgado AV. Ftorafur loading and controlled release from poly(ethyl-2-cyanoacrylate) and poly(butylcyanoacrylate) nanospheres. *Int J Pharm*. 2007;337(1–2): 282–290.
26. Arias JL, Gallardo V, Linares-Molinero F, Delgado AV. Preparation and characterization of carbonyl iron/poly(butylcyanoacrylate) core/shell nanoparticles. *J Colloid Interface Sci*. 2006;299(2):599–607.
27. Decuzzi P, Pasqualini R, Arap W, Ferrari M. Intravascular delivery of particulate systems: does geometry really matter? *Pharm Res*. 2009; 26(1):235–243.
28. Poupaert JH, Couvreur P. A computationally derived structural model of doxorubicin interacting with oligomeric polyalkylcyanoacrylate in nanoparticles. *J Control Release*. 2003;92(1–2):19–26.
29. Yu MK, Jeong YY, Park J, et al. Drug-loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for combined cancer imaging and therapy in vivo. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2008;47(29):5362–5365.

30. Gaihre B, Khil MS, Lee DR, Kim HY. Gelatin-coated magnetic iron oxide nanoparticles as carrier system: drug loading and in vitro drug release study. *Int J Pharm.* 2009;365(1–2):180–189.
31. Formariz TP, Sarmiento VHV, Silva-Junior AA, Scarpa MV, Santilli CV, Oliveira AG. Doxorubicin biocompatible O/W microemulsion stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2006;51(1):54–61.
32. Llovet MI, Egea MA, Valero J, Alsina MA, García ML, Chauvet A. Methotrexate loaded nanoparticles: analysis of drug content and study of the matrix structure. *Drug Dev Ind Pharm.* 1995;21(15):1761–1771.
33. Arias JL, Martínez-Soler GI, López-Viota M, Ruiz MA. Formulation of chitosan NPs loaded with metronidazole for the treatment of infectious diseases. *Lett Drug Des Discov.* 2010;7(2):70–78.
34. Soma CE, Dubernet C, Bentolila D, Benita S, Couvreur P. Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of doxorubicin and cyclosporin A in polyalkylcyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials.* 2000;21(1):1–7.
35. Graf A, McDowell A, Rades T. Poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles for enhanced delivery of therapeutics—is there real potential? *Expert Opin Drug Deliv.* 2009;6(4):371–387.
36. Bennis S, Chapey C, Couvreur P, Robert J. Enhanced cytotoxicity of doxorubicin encapsulated in polyisohexylcyanoacrylate nanospheres against multidrug-resistant tumour cells in culture. *Eur J Cancer.* 1994;30(1):89–93.

37. Wohlfart S, Khalansky AS, Bernreuther C, et al. Treatment of glioblastoma with poly(isohexyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Int J Pharm.* 2011;415(1–2):244–251.
38. Wohlfart S, Khalansky AS, Gelperina S, Begley D, Kreuter J. Kinetics of transport of doxorubicin bound to nanoparticles across the blood–brain barrier. *J Control Release.* 2011;154(1):103–107.
39. Duan J, Liu M, Zhang Y, Zhao J, Pan Y, Yang X. Folate-decorated chitosan/doxorubicin poly(butyl)cyanoacrylate nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. *J Nanopart Res.* 2012;14(4):1–9.
40. Duan J, Mansour HM, Zhang Y, et al. Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of doxorubicin and curcumin in chitosan/poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Int J Pharm.* 2012;426(1–2):193–201.
41. Ambruosi A, Gelperina S, Khalansky A, Tanski S, Theisen A, Kreuter J. Influence of surfactants, polymer and doxorubicin loading on the anti-tumour effect of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles in a rat glioma model. *J Microencapsul.* 2006;23(5):582–592.
42. Li-Blatter X, Nervi P, Seelig A. Detergents as intrinsic P-glycoprotein substrates and inhibitors. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1788(10): 2335–2344.
43. Yordanov G, Skrobanska R, Evangelatov A. Entrapment of epirubicin in poly(butyl cyanoacrylate) colloidal nanospheres by nanoprecipitation: formulation development and in vitro studies on cancer cell lines. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2012;92:98–105.
44. Yordanov G, Evangelatov A, Skrobanska R. Epirubicin loaded to pre-polymerized poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: preparation and in vitro

evaluation in human lung adenocarcinoma cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013;107:115–123.

45. Upadhyay KK, Bhatt AN, Mishra AK, et al. The intracellular drug delivery and anti tumor activity of doxorubicin loaded poly( $\gamma$ -benzyl L-glutamate)-b-hyaluronanpolymersomes. *Biomaterials*. 2010;31(10):2882–2892.

46. Ren D, Kratz F, Wang SW. Protein nanocapsules containing doxorubicin as a pH-responsive delivery system. *Small*. 2011;7(8):1051–1060.

47. Sardão VA, Oliveira PJ, Holy J, Oliveira CR, Wallace KB. Morphological alterations induced by doxorubicin on H9c2 myoblasts: nuclear, mitochondrial, and cytoskeletal targets. *Cell Biol Toxicol*. 2009;25(3):227–243.

48. Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(17):2873–2896.

49. Ma N, Ma C, Li C, et al. Influence of nanoparticle shape, size, and surface functionalization on cellular uptake. *J Nanosci Nanotechnol*. 2013;13(10):6485–6498.

50. Sahay G, Alakhova DY, Kabanov AV. Endocytosis of nanomedicines. *J Control Release*. 2010;145(3):182–195.

51. Iversena TG, Skotlanda T, Sandvig K. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: present knowledge and need for future studies. *Nano Today*. 2011;6(2):176–185.

52. Arora HC, Jensen MP, Yuan Y, et al. Nanocarriers enhance Doxorubicin uptake in drug-resistant ovarian cancer cells. *Cancer Res*. 2012;72(3): 769–778.



53. Attia AB, Yang C, Tan JP, et al. The effect of kinetic stability on biodistribution and anti-tumor efficacy of drug-loaded biodegradable polymeric micelles. *Biomaterials*. 2013;34(12):3132–3140.
54. Pu Y, Chang S, Yuan H, Wang G, He B, Gu Z. The anti-tumor efficiency of poly(L-glutamic acid) dendrimers with polyhedral oligomeric silsesquioxane cores. *Biomaterials*. 2013;34(14):3658–3666.
55. Zou A, Chen Y, Huo M, et al. In vivo studies of octreotide-modified N-octyl-O, N-carboxymethyl chitosan micelles loaded with doxorubicin for tumor-targeted delivery. *J Pharm Sci*. 2013;102(1):126–135.
56. Yang Y, Pan D, Luo K, Li L, Gu Z. Biodegradable and amphiphilic block copolymer-doxorubicin conjugate as polymeric nanoscale drug delivery vehicle for breast cancer therapy. *Biomaterials*. 2013;34(33): 8430–8443.
57. Maeda H, Nakamura H, Fang J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(1):71–79.
58. Petri B, Bootz A, Khalansky A, et al. Chemotherapy of brain tumour using doxorubicin bound to surfactant-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: revisiting the role of surfactants. *J Control Release*. 2007; 117(1):51–58.
59. Biswas S, Dodwadkar NS, Deshpande PP, Parab S, Torchilin VP. Surface functionalization of doxorubicin-loaded liposomes with octa-arginine for enhanced anticancer activity. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013;84(3):517–525.
60. Karve S, Bandekar A, Ali MR, Sofou S. The pH-dependent association with cancer cells of tunable functionalized lipid vesicles with encapsulated doxorubicin for high cell-kill selectivity. *Biomaterials*. 2010;31(15):4409–4416.

61. Bandekar A, Karve S, Chang MY, Mu Q, Rotolo J, Sofou S. Antitumor efficacy following the intracellular and interstitial release of liposomal doxorubicin. *Biomaterials*. 2012;33(17):4345–4352.

62. Hu CM, Aryal S, Zhang L. Nanoparticle-assisted combination therapy for effective cancer treatment. *Ther Deliv*. 2010;1(2):321–334.

## Artículo 2

# Enhanced antitumoral activity of doxorubicin against lung cancer cells using biodegradable poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles

Consolación Melguizo<sup>1,2,\*</sup>, Laura Cabeza<sup>1,\*</sup>, Jose Prados<sup>1,2</sup>, Raúl Ortiz<sup>1,3</sup>, Octavio Caba<sup>1,3</sup>, Ana R Rama<sup>1,3</sup>, Ángel V Delgado<sup>4</sup>, José L Arias<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biopathology and Regenerative Medicine (IBIMER), Biomedical Research Center*

<sup>2</sup>*Biosanitary Institute of Granada (IBSGranada), SASUniversidad de Granada, Granada*

<sup>3</sup>*Department of Health Science, University of Jaén, Jaén*

<sup>4</sup>*Department of Applied Physics*

<sup>5</sup>*Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, University of Granada, Granada, Spain*

*\*These authors contributed equally to this work*

### Publicado en:

Drug Des Devel Ther. 2015 Dec 14; 9: 6433-6444.

Doi: 10.2147/DDDT.S92273

**Abstract**

Doxorubicin (Dox) is widely used for the combined chemotherapy of solid tumors. However, the use of these drug associations in lung cancer has low antitumor efficacy. To improve its efficacious delivery and activity in lung adenocarcinoma cells, we developed a biodegradable and noncytotoxic nanopatform based on biodegradable poly(butylcyanoacrylate) (PBCA). The reproducible formulation method was based on an anionic polymerization process of the PBCA monomer, with the antitumor drug being entrapped within the nanoparticle (NP) matrix during its formation. Improved drug-entrapment efficiencies and sustained (biphasic) drug-release properties were made possible by taking advantage of the synthesis conditions (drug, monomer, and surfactant-agent concentrations). Dox-loaded NPs significantly enhanced cellular uptake of the drug in the A549 and LL/2 lung cancer cell lines, leading to a significant improvement of the drug's antitumoral activity. In vivo studies demonstrated that Dox-loaded NPs clearly reduced tumor volumes and increased mouse-survival rates compared to the free drug. These results demonstrated that PBCA NPs may be used to optimize the antitumor activity of Dox, thus exhibiting a potential application in chemotherapy against lung adenocarcinoma.

**Keywords**

Lung cancer, cancer chemotherapy, PBCA, polymeric nanoparticles, drug carrier.

## Introduction

Lung cancer is the second-most commonly diagnosed cancer in both men and women, representing ~14% of all newly diagnosed cancers, the most frequent subtype being non-small-cell lung cancer (90%). Unfortunately, more than 70% of lung cancer patients have already developed locally advanced or metastatic disease (in the liver, brain, adrenals, kidneys, bones, and pleura, among other sites) by the time they are diagnosed, and less than 16% have a 5-year survival rate.<sup>1</sup> Although in these advanced stages, first-line chemotherapy treatment involves cisplatin and carboplatin, other associated chemotherapy drugs (paclitaxel, docetaxel, irinotecan, topotecan, and gemcitabine) are often used, with doxorubicin (Dox) being among the most effective.<sup>2</sup> Despite good patient-survival rates from these combination-chemotherapy treatments, drug resistance and drug-related toxicity severely limit clinical outcomes.<sup>3,4</sup> Therefore, strategies that decrease both drug toxicity and resistance may significantly improve lung cancer response to current drug associations. Interestingly, it has recently been demonstrated that the use of nanocarriers for Dox associations improves its antitumoral activity in lung cancer.<sup>5</sup>

More specifically, the antineoplastic drug Dox is a member of the family of antibiotic anthracyclines that exhibits a broad spectrum of antitumoral activity. It is used in the treatment of a large number of tumors because of its significant benefits. In fact, Dox can inhibit the signaling pathway of TGF- $\beta$ 1, the upregulation of which has been associated with the development of metastasis, in both lung adenocarcinoma and breast cancer.<sup>6-9</sup> Unfortunately, its clinical use is restricted due to problems, including 1) its poor target selectivity and rapid clearance from the body, 2) its severe (dose-limiting) toxicity (ie, myelosuppression, cardiotoxicity, and nephrotoxicity), and 3) resistance mechanisms developed by malignant cells (Dox is a substrate for multidrug-resistant proteins, inducing the inactivity of the drug, eg, P-glycoprotein is a membrane protein that acts as an ATP-dependent flux pump reducing Dox concentrations in tumor cells).<sup>10-12</sup> In this context, many nanocarriers (eg, solid polymer-lipid hybrids and chitosan-based nanoplateforms) have been proposed to overcome these challenges and maximize the clinical efficacy of

Dox.<sup>5,13</sup> Poly(alkylcyanoacrylate) nanoplatforms have demonstrated good vehiculization capabilities for antitumor drugs and the potential to optimize both in vitro and in vivo antitumoral effects.<sup>14–16</sup> For instance, surfactant-coated poly(butylcyanoacrylate) (PBCA) nanoparticles (NPs) loaded with epirubicin and etoposide have demonstrated greater cytotoxicity against A549 human lung adenocarcinoma cells.<sup>17,18</sup> Interestingly, it has been hypothesized that PBCA NPs could overcome the P-glycoprotein-related cellular mechanism of multidrug resistance.<sup>14</sup> This effect helps to enhance the activity of the drug against tumoral cells, and has also been described for other NPs, such as micelles, liposomes, solid lipid NPs, and dendrimers.<sup>19,20</sup> Finally, PBCA NPs may transport drugs across the blood–brain barrier to the brain.<sup>21</sup> These results support the idea that PBCA NPs are a good candidate for drug loading, including Dox against tumor cells.

For this study, we developed a reproducible synthesis method for preparing Dox-loaded PBCA NPs by modifying formulation conditions (drug, monomer, and surfactant-agent concentrations) in order to assure maximum drug-loading efficiencies and a sustained drug-release profile. We demonstrated that PBCA NPs do not exhibit any cytotoxicity on their own, and we were able to enhance, both in vitro and in vivo, the antitumoral effect of Dox against A549 and LL/2 lung cancer cells. We describe how the Dox-loaded NP system can significantly reduce the drug dose necessary to induce in vitro tumor-cell death and a more effective in vivo reduction in tumor volume than with the free drug. Therefore, our (nano)-formulation may be a candidate for minimizing the toxicity and improving the effectiveness of Dox in patients with advanced lung cancer.

## **Materials and methods**

### ***Materials***

All the chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Co (St Louis, MO, USA), with the exception of BCA (Henkel AG & Co KGaA, Düsseldorf, Germany) and Dox hydrochloride (Dr M Damas, San Cecilio Hospital, Granada, Spain).

### ***Cell lines***

The human lung carcinoma cell line A549 and the mouse Lewis lung carcinoma cell line LL/2 were obtained from the Scientific Instrumentation Center (University of Granada, Granada, Spain) and the American Type Culture Collection, respectively. They were maintained under culture conditions (37°C and a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and 1% of a mixture of antibiotics (10,000 U/mL penicillin and 10 mg/mL streptomycin).

### ***Preparation of poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles***

The polymeric NPs were synthesized by emulsion/polymerization of the BCA monomer as described previously, with significant modifications.<sup>22</sup> This involved 0.3 mL of an acetonic solution of the monomer (1%, w/v) being added dropwise to 3 mL of an aqueous solution containing 0.1 mN HCl and dextran 70 (0.5%, w/v) under mechanical stirring (3,000 rpm). Polymerization continued for 4 hours. Next, 3 µL of a 0.1 M NaOH solution was added to neutralize the medium, ensuring the total consumption of the monomer. Finally, acetone was removed from the NP dispersion through evaporation with a rotary evaporator (Rotavapor®, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland), and the NPs were cleaned by several centrifuge cycles (10 minutes at 10,000 rpm, Centrikon T-124 high-speed centrifuge; Kontron AG, Augsburg, Germany) until the conductivity of the supernatants was #10 µS/cm.

Dox entrapment was done by incorporating adequate quantities of the drug (up to 0.01 M) into the acetonic solution of the monomer, prior to starting the formulation procedure (as described earlier). All steps of the NP synthesis were kept unaltered. The effects on Dox entrapment of the dextran-70 concentration in the aqueous phase and BCA monomer in the organic solution were evaluated by varying these concentrations from 0 to 1% (w/v) and between 0.5 and 3% (w/v),

respectively. The production performance (yield, %) of each of the preparation conditions was determined:

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{Amount of NPs loaded with drug}}{\text{Sum of materials used in the synthesis of these NPs}} \times 100 \quad (1)$$

The nanoformulations were prepared under aseptic conditions in a sterile laminar flow hood, and care was taken to avoid environmental contamination of the samples during manufacture and prior to injection into animals.

### ***Particle size and surface electrical properties***

Mean diameters of the blank (Dox-unloaded) PBCA NPs and the Dox-loaded PBCA NPs were measured in sextuplicate at  $25.0^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  by photon correlation spectroscopy (Autosizer 4700 with the scattering angle set at  $60^{\circ}$ ; Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK). Dilutions of the aqueous NP dispersions ( $\sim 0.1\%$ , w/v) were made before the determinations. Particle size was also determined after 2 months of storage in water at  $4.0^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  to evaluate NP stability.

Surface electrical properties of both blank and drug-loaded NPs ( $\sim 0.1\%$ , w/v) were determined by electrophoresis at  $25.0^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  (Zetasizer 2000 electrophoresis device; Malvern Instruments). These measurements were made after the NPs had been in contact with water for 24 hours (at pH 5 and 1 mM KCl) under mechanical stirring (50 rpm) at the same temperature. The O'Brien and White theory was used to transform the electrophoretic mobility (ue) data into  $\zeta$ -potential values.<sup>23</sup> Such electrokinetic characterization was expected to contribute to elucidation of the type of Dox loading in the NPs: entrapment into the matrix, or adsorption onto the particle surface.



***Dox-loading and -release determinations***

Ultraviolet-visible (UV-vis) absorption analysis (8500 UV-vis spectrophotometer; Dinko Instruments, Barcelona, Spain) was performed in quadruplicate at 481 nm to determine Dox concentration in the NP samples, ie, supernatants obtained by filtration of aliquots of the NP dispersions through a membrane filter (pore size 0.1  $\mu\text{m}$ ). The supernatant produced under the conditions of drug-loading and -release experiments, but without the drug, was used as a blank to remove others sources of variation in determining Dox concentrations, ie, products of polymer degradation.<sup>24</sup> No Dox adsorption onto the filter membrane was detected spectrophotometrically. Reproducibility and good linearity, precision, and accuracy of the determinations were assured in all the conditions tested.

Drug-entrapment efficiency (%) and drug-loading (%) values were calculated:

$$\text{Drug-entrapment efficiency (\%)} = \frac{\text{Mass of drug incorporated (mg)}}{\text{Initial drug added to the medium (mg)}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Drug loading (\%)} = \frac{\text{Mass of drug incorporated in the NP matrix (mg)}}{\text{Mass of drug loaded polymeric NPs (mg)}} \times 100 \quad (3)$$

Dox-release experiments were based on the dialysis-bag method. The experiments were carried out in quadruplicate with the Dox-loaded PBCA NPs characterized by greater drug-entrapment efficiency ( $\sim 80\%$ , for those prepared with a 0.01 M drug concentration, 1% (w/v) monomer concentration, and 1% (w/v) dextran-70 concentration; Table 1). We used phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) or pH 5.0 maintained at  $37.0^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$  as the receiving phase. The bags were soaked in PBS for 12 hours, and then 1 mL of a Dox-loaded NP dispersion (4 mg/mL of drug) was added; the ends were closed with clamps. NPs were retained in

the dialysis bag (2,000 Da cutoff; Spectra/Por® 6 dialysis membrane tubing; Spectrum Laboratories Inc, Rancho Dominguez, CA, USA), whereas Dox was able to diffuse into the receiving medium. After that, the bags were brought into contact under stirring (200 rpm) with 0.05 L of the receiving phase (pH 7.4 or 5.0) in a conical flask over different time periods (0.25, 0.5, 0.75, 1, 3, 6, 9, 12, 18, and 24 hours). Then, 2 mL of the receiving medium were measured using UV-vis spectrophotometric analysis. The sample obtained was replaced into the release phase with an equal volume of release medium.

**Table 1** Dox-entrapment efficiency in poly(butylcyanoacrylate) NPs

Dox (M)	Butylcyanoacrylate (% w/v)	Dextran 70 (% w/v)	Size (nm)	Dox-entrapment efficiency (%)	Production performance (%)	ζ (mV)
0	1	0.5	73±12	–	96±3	–23±5
10 <sup>-4</sup>	1	0.5	68±15	44±3	95±2	–26±3
5×10 <sup>-4</sup>	1	0.5	74±11	57±4	96±1	–24±4
10 <sup>-3</sup>	1	0.5	77±12	66±3	96±3	–22±4
5×10 <sup>-3</sup>	1	0.5	83±14	74±4	97±1	–27±5
10 <sup>-2</sup>	1	0.5	78±13	79±3	95±2	–25±6
10 <sup>-2</sup>	1	0	Macroaggregates	3±1	2±1	–23±4
10 <sup>-2</sup>	1	1	81±15	77±3	97±2	–28±3
10 <sup>-2</sup>	0.5	0.5	76±13	79±4	95±2	–23±6
10 <sup>-2</sup>	2	0.5	77±14	78±4	97±1	–27±4
10 <sup>-2</sup>	3	0.5	82±12	77±2	96±2	–26±5

**Notes:** Effect of the formulation conditions (Dox, butylcyanoacrylate monomer, and dextran-70 concentrations) for drug entrapment on particle size, Dox-entrapment efficiency (%), production performance (yield, %), and ζ-potential (mV) values of the blank (Dox-unloaded) PBCA NPs and the Dox-loaded PBCA NPs synthesized after drug dissolution in the organic phase. Dox concentrations (M) incorporated into the acetonic solution of the monomer. Results expressed as mean ± SD of quadruplicate experiences.

**Abbreviations:** Dox, doxorubicin; NPs, nanoparticles; PBCA, poly(butylcyanoacrylate); SD, standard deviation.

### ***Proliferation assays with Dox and Dox-loaded PBCA NPs***

Cultured cells were detached with a trypsin–ethylenediami-netetraacetic acid (EDTA) solution (0.25%) and seeded into 24-well plates at a density of 15×10<sup>3</sup> A549 cells/well and 2×10<sup>4</sup> LL/2 cells/well. After incubation for 24 hours under culture conditions, the cells were treated with either free Dox (aqueous solution), blank (Dox-unloaded) PBCA NPs, or Dox-loaded PBCA NPs in increasing drug-

equivalent concentrations from 0.01 to 10  $\mu\text{M}$ . After an incubation time of 48 hours, a modified sulforhodamine B (SRB) protocol was followed.<sup>25</sup> The cells were washed three times with PBS, and 300  $\mu\text{L}$  of 10% trichloroacetic acid was used to fix the cells (20 minutes at 4°C). Then, the cells were washed three times with distilled water and left to dry before 300  $\mu\text{L}$  of SRB was added again. Incubation under mechanical stirring was continued for 20 minutes, and the excess SRB was removed by the addition of a 1% acetic acid solution. Then, the cells were left to dry. Finally, 200  $\mu\text{L}$  of Trizma<sup>®</sup> (10 mM, pH 10.5; Sigma-Aldrich) was used for dye resuspension. The optical density (OD) of SRB was measured at 492 nm (Titertek<sup>®</sup> Multiskan colorimeter; Flow Laboratories Ltd, Oldham, UK) and analyzed with Ascent software version 2.6 (Thermo Labsystems, Helsinki, Finland).

The percentage of relative proliferation (RP, %) was calculated:

$$\text{RP (\%)} = \frac{\text{OD of treated cells}}{\text{OD of untreated cells}} \times 100 \quad (4)$$

### ***FACScan flow cytometry and fluorescent microscopy***

Plates of six wells were seeded with either A549 cells or LL/2 cells ( $15 \times 10^4$  cells/well) in 2 mL of complete DMEM, and were maintained under culture conditions for 24 hours. Then, the cells were incubated over 0.5, 1, 1.5, 2, and 4 hours with free Dox (aqueous solution) or Dox-loaded PBCA NPs at a drug-equivalent concentration of 43.1  $\mu\text{M}$  (high dose) to observe the cellular internalization. The cells were detached with the trypsin–EDTA solution (0.25%). Data were collected using a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and analyzed using FACSDiva software (BD Biosciences). At these contact times, the cells were further observed under a DM IL LED fluorescence microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

In addition, the localization of the Dox-loaded NPs in the A549 and LL/2 cells was investigated. The cells were seeded in eight-well chamber slides (BD Biosciences) ( $5 \times 10^3$  cells/well). After incubation for 24 hours, the cells were

incubated for a further hour with either free Dox (aqueous solution) or Dox-loaded PBCA NPs at drug-equivalent concentrations of 10 and 43.1  $\mu\text{M}$  (high dose) to observe cellular internalization. Then, the cells were fixed with a 4% formaldehyde solution for 20 minutes and washed three times with PBS. After this, the samples were prepared with a mounting medium containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), prior to observation under the Leica DM IL LED fluorescence microscope.

### ***In vivo antitumoral activity***

This study was approved by the ethics committee of the University of Granada. Animals used in the *in vivo* study were manipulated in a temperature-controlled room at 22°C approximately with a 12 hour light/dark cycle. C57BL/6 female mice (n=40, weight 18–20 g, age 6 weeks; Charles River Laboratories Inc, Wilmington, MA, USA) were inoculated subcutaneously in the right hind flank with 200  $\mu\text{L}$  of PBS containing  $5 \times 10^5$  LL/2 cells. After 9 days, when tumors were palpable, the mice were divided into four groups and treated every 3 days (over 39 days) with a total of five doses (equivalent drug concentration of 10 mg/kg) of control (untreated mice), free Dox (aqueous solution), blank (Dox-unloaded) PBCA NPs, or Dox-loaded PBCA NPs. At the end of the experiment, all surviving animals were killed.

Prior to each injection, the mice were weighed and the tumor dimensions measured with a digital caliper. Tumor volume ( $V$ ,  $\text{mm}^3$ ) was then calculated:

$$V (\text{mm}^3) = \frac{a \cdot b^2 \cdot \pi}{6} \quad (5)$$

where  $a$  represents the longest length of the tumor and  $b$  is the longest line perpendicular to  $a$ .

### ***Statistical analysis***

Proliferation assays were performed in triplicate, and the data are expressed as means  $\pm$  standard deviation. Differences between groups were compared using Student's t-test, with a significance level of 0.05 ( $\alpha=0.05$ ). Mouse survival was determined by the Kaplan–Meier method, and the survival rates of the groups were compared using the log-rank test ( $\alpha=0.05$ ). Statistical analysis was carried out with SPSS version 15.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA).

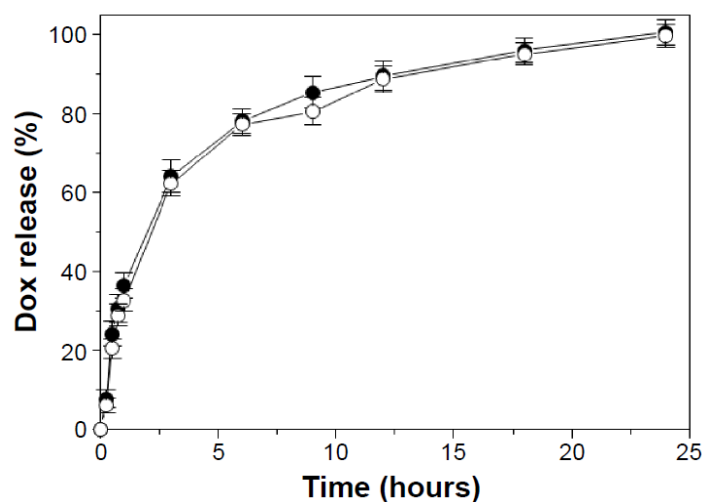
## **Results**

### ***Nanoparticle engineering***

Negatively charged and homogeneously sized Dox-loaded NPs (average diameter  $\sim$ 75 nm, polydispersity index 0.064,  $\zeta \sim$ -25 mV) (Table 1) were prepared by emulsion/polymerization.<sup>24,26,27</sup> The adequate stability of the NP aqueous dispersions was evaluated after 2 months of storage at  $4.0^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ : under these storage conditions, no aggregates or sediments were observed. In addition, the surface electrical properties ( $\zeta$ -values) remained unaltered.

It was found that higher Dox concentrations incorporated into the acetonic solution of the monomer resulted in more drug being loaded into the NP system (Table 1). For example, Dox-entrapment efficiency increased from  $44\%\pm 3\%$  to  $79\%\pm 3\%$  when the drug concentrations were raised from  $10^{-4}$  to 0.01 M. However, the use of dextran 70 (within the range of concentrations tested) only assured the formation of homogeneously sized Dox-loaded NPs, without assisting in drug-entrapment optimization (Table 1). In fact, the yield (%) of NP production (always  $\geq 93\%$  when dextran 70 was used) decreased to  $\leq 4\%$  in the absence of the surfactant agent. Likewise, the concentration of BCA monomer did not contribute to Dox-entrapment efficiency. Interestingly, the electrokinetic analysis of the NP systems highlighted the great similarity between the  $\zeta$ -values of the blank (drug-unloaded) and drug-loaded NPs (Table 1), thereby proving that from an

electrophoretic point of view, the blank and Dox-loaded NPs may be considered identical. It could therefore be concluded that Dox molecules were efficaciously entrapped into the polymeric matrix, rather than just adsorbed at the surface. Finally, drug release from PBCA NPs (pH 7.4, 37°C) started with a fast-release phase (~35% Dox release in 1 hour), followed by a sequential release phase that ended after 23 hours (Figure 1). Interestingly, no significant differences were observed when the Dox-release studies were accomplished at pH 5.0, which can be probably ascribed to the stability of these polymeric matrices in both acidic and neutral media.<sup>28,29</sup> In vitro and in vivo antitumor studies were performed using the PBCA particles with the greatest Dox-entrapment efficiency, ie, ~80% (0.01 M Dox concentration incorporated into the acetonic solution of the monomer, Table 1).

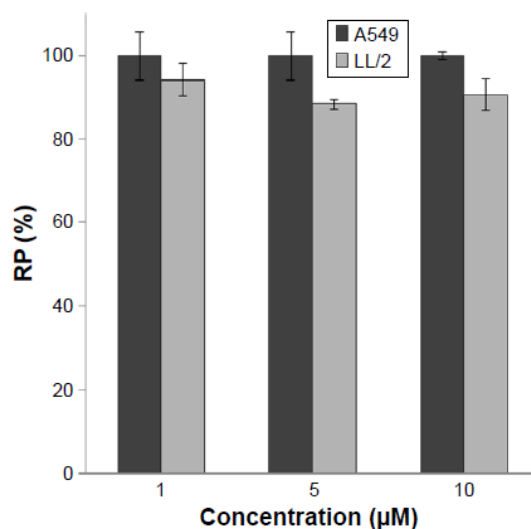


**Figure 1** Release of previously entrapped Dox from PBCA NPs as a function of the incubation time in PBS pH 7.4 (solid circles) and pH 5.0 (open circles) at 37°C.

**Abbreviations:** Dox, doxorubicin; PBCA, poly(butylcyanoacrylate); NPs, nanoparticles; PBS, phosphate-buffered saline.

### *In vitro cytotoxicity study*

Blank (Dox-unloaded) PBCA NPs were found to be noncytotoxic in A549 and LL/2 lung cancer cells at the concentrations tested (up to 10  $\mu$ M) and after 48 hours of NP–cell contact time (Figure 2).

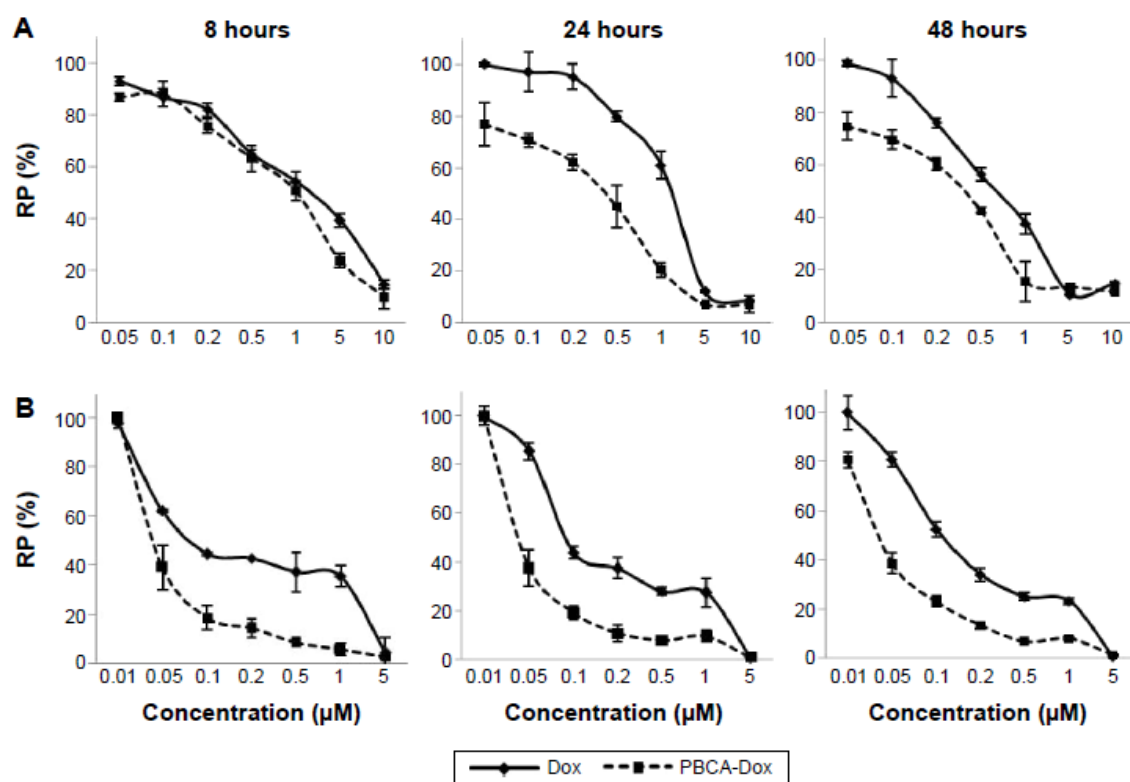


**Figure 2** In vitro cytotoxicity of PBCA NPs in lung cancer cells.

Notes: The growth of A549 and LL /2 cell lines was evaluated after exposure to a wide range (1–10 µM) of blank (Dox-unloaded) PBCA NPs over 48 hours. Data represent mean  $\pm$  SD of triplicate cultures.

**Abbreviations:** PBCA, poly(butylcyanoacrylate); NPs, nanoparticles; Dox, doxorubicin; RP, relative proliferation; SD, standard deviation.

On the other hand, Dox-loaded PBCA NPs induced a significant decrease in A549 and LL/2 cell proliferation compared to free Dox (aqueous solution) ( $P < 0.01$ ). Interestingly, the half-maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) was significantly decreased by the Dox-loaded polymeric nanoformulation in a time-dependent manner (Figure 3): differences between groups were observed after 8 and 24 hours, the most significant divergences being obtained after 48 hours of NP–cell contact. Specifically, Dox-loaded PBCA NPs showed a 2.4-fold reduction (from 0.71 to 0.3 µM) and nearly threefold reduction (from 0.11 to 0.04 µM) in the  $IC_{50}$  values of A-549 and LL/2 cell lines, respectively, in comparison to the free drug (Figure 3).



**Figure 3** In vitro cytotoxicity of Dox-loaded PBCA NPs in lung cancer cells.

Notes: Growth of A549 (A) and LL /2 (B) cell lines was evaluated after exposure to a wide range (0.01–10  $\mu\text{M}$ ) of Dox-loaded PBCA NPs for 8, 24, and 48 hours in comparison to free Dox treatment. Data represent mean  $\pm$  SD of triplicate cultures.

**Abbreviations:** Dox, doxorubicin; PBCA, poly(butylcyanoacrylate); NPs, nanoparticles; RP, relative proliferation; SD, standard deviation.

### ***Cell uptake and disposition of Dox-loaded PBCA NPs***

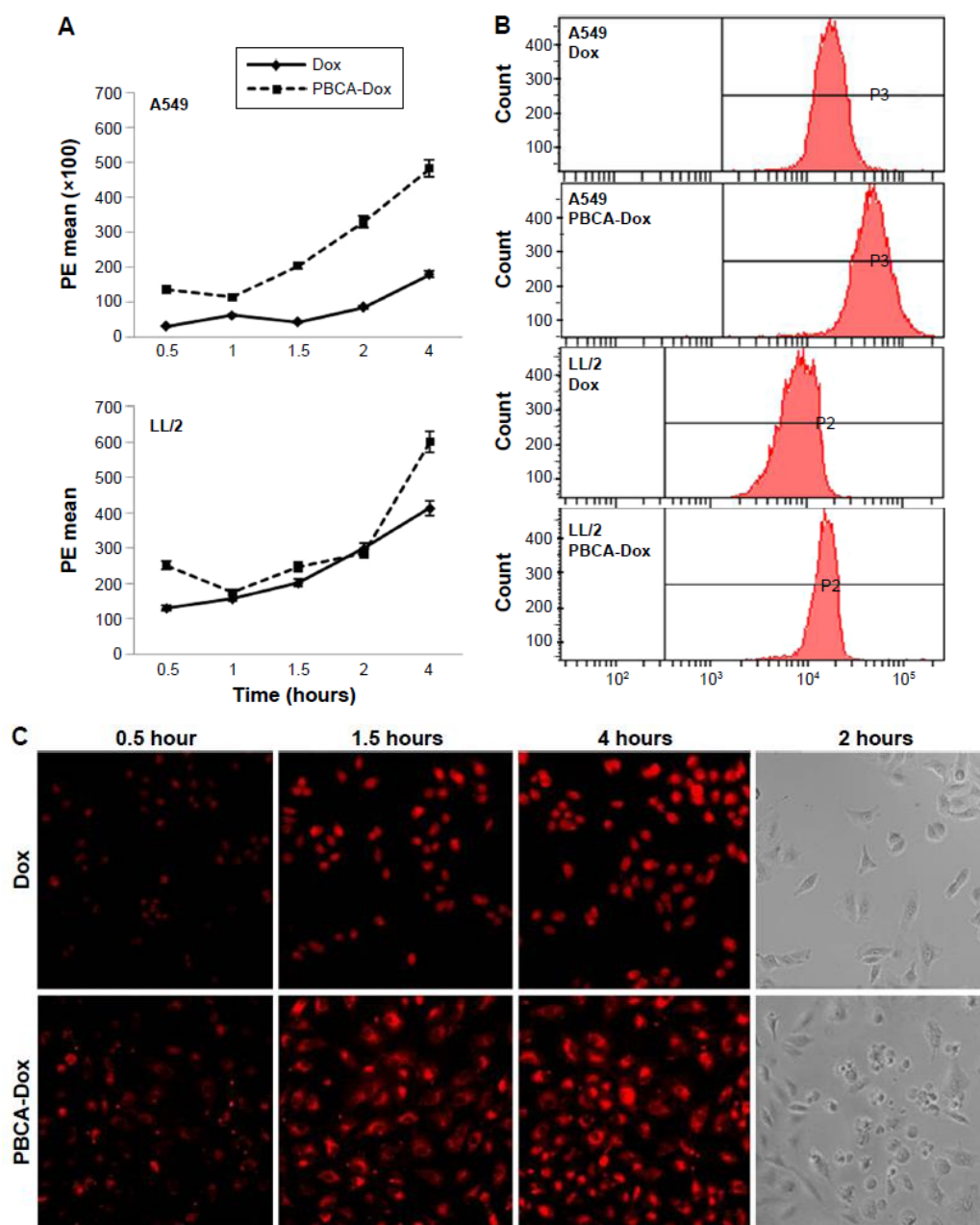
Fluorescence microscopy revealed that cells treated with Dox-loaded PBCA NPs displayed greater fluorescence intensities than free Dox at the exposure times investigated (0.5–2 hours) (Figure 4A). In addition, after 2 hours of NP–cell exposure, morphological changes (bubble-like bleb formation on cell surface typical of apoptotic cell death) were exclusively observed in the cells in contact with Dox-loaded PBCA NPs. The flow-cytometry assay confirmed that greater Dox uptake by A549 and LL/2 lung cancer cells was possible when it was entrapped into the PBCA NPs (Figure 4B and C). These images also highlight the significant and progressive increase in Dox uptake (when loaded into the NPs) by A549 cells, in



comparison with free Dox: 22.6%, 10.9%, 34.5%, 52.3%, and 64.8% after 0.5, 1, 1.5, 2, and 4 hours, respectively. Similar results were found with LL/2 cells. However, in this cell line, the NPs determined a 22.6% increase in Dox uptake compared to free Dox after 0.5 hours of contact. By contrast, a negligible increase in cell uptake was observed after 1, 1.5, and 2 hours (3.1%, -7.8%, and 2.3%, respectively). Finally, after 4 hours of NP–cell exposure, and in comparison to the free drug, Dox uptake by LL/2 cells increased by 32.1% when loaded into the PBCA NPs. These results were confirmed by fluorescence microscopy (Figure 5): increased fluorescence intensities were observed in cells treated with Dox-loaded PBCA NPs. Although drug accumulation at the cell nucleus was observed in the cells treated with either free Dox or Dox-loaded NPs, greater fluorescence intensities were shown in the cytoplasm of the cells treated with the Dox-loaded nanoformulation (particularly at the maximum drug-equivalent concentration).

### ***In vivo suppression of lung cancer tumor growth and mouse survival***

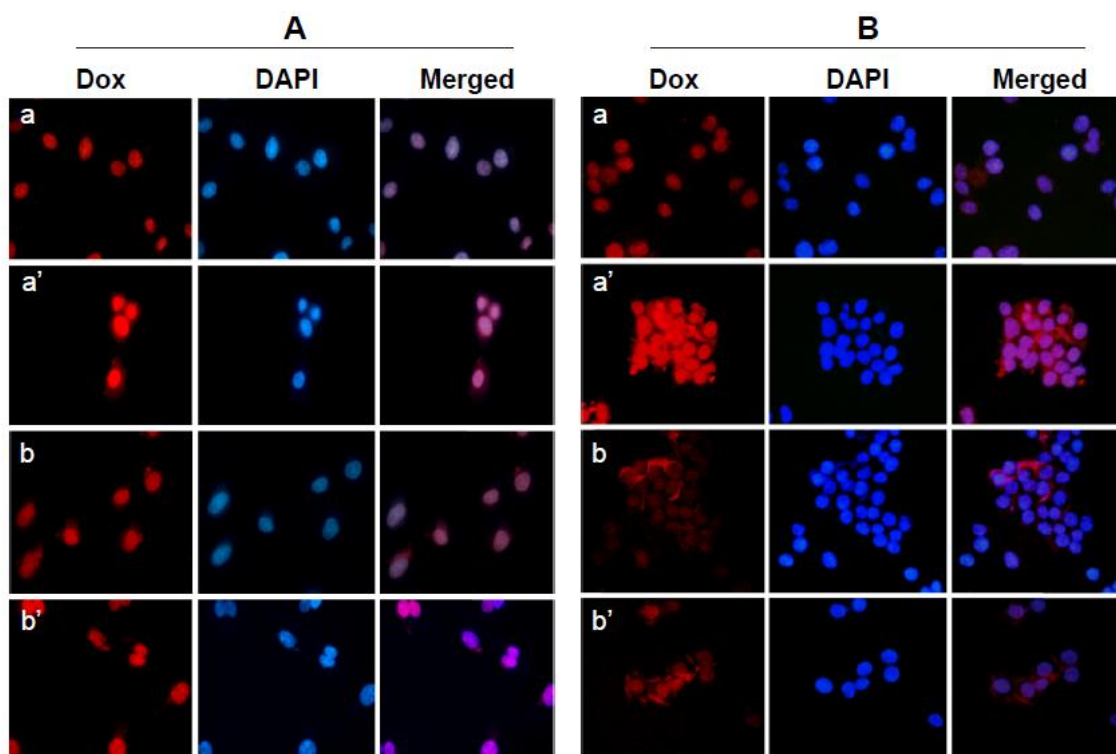
Blank (Dox-unloaded) PBCA NPs did not produce any significant change in tumor-volume progression compared to the control group (untreated mice) (Figure 6). In contrast, free Dox and Dox-loaded PBCA NPs significantly slowed tumor growth. In comparison to the controls, Dox-loaded PBCA NPs reduced mean tumor volume by 66% at the end of the experiment (39 days). This reduction was significantly greater (by ~28%) than that displayed by free Dox ( $P < 0.05$ ). However, these differences were not extrapolated to mouse survival (Figure 6B), since no significant differences were observed between the groups treated with free Dox and Dox-loaded NPs. However, important differences in terms of mouse survival ( $P < 0.05$ ) were found between these groups and the control groups. In addition, Dox entrapment within the NP matrix made it possible to reduce the drug's toxicity to mice at the end of the treatment ( $P < 0.05$ ), which was measured in terms of weight loss (Figure 7). No weight differences were found between untreated mice and mice treated with blank PBCA NPs (data not shown).



**Figure 4** Uptake of Dox-loaded PBCA NPs into lung cancer cells.

**Notes:** (A) Graphical representation of the presence of Dox-loaded PBCA NPs and free Dox in A549 and LL /2 after exposure (0.5–4 hours) at the highest concentration (43.1  $\mu\text{M}$ ). Data represent mean  $\pm$  SD of triplicate analysis. (B) Representative image of flow-cytometry analysis after exposure (4 hours) to Dox-loaded PBCA NPs and free Dox in A549 and LL /2. (C) Representative fluorescence images showing internalization of free Dox and Dox-loaded PBCA NPs in A549 cells for the highest concentration (43.1  $\mu\text{M}$ ) over various times (0.5–4 hours). Optical microscopy analysis showed different morphological changes after Dox-loaded PBCA NP treatment in comparison to free Dox exposure. Magnification 10 $\times$ .

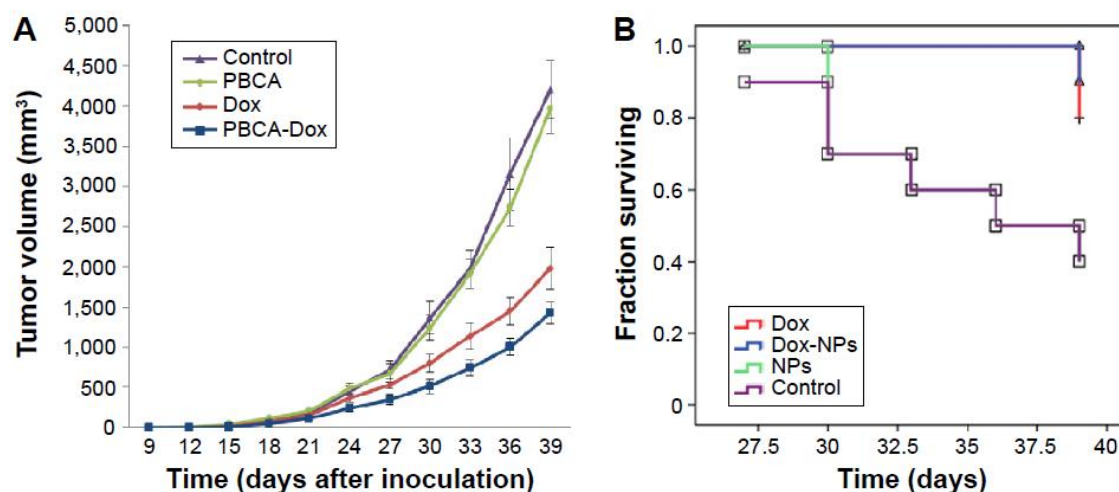
**Abbreviations:** PE, phycoerythrin; Dox, doxorubicin; PBCA, poly(butylcyanoacrylate); NPs, nanoparticles; SD, standard deviation.



**Figure 5** Intracellular location of free Dox and Dox-loaded PBCA NPs in A549 (A) and LL /2 (B) cell lines.

**Notes:** Cells were exposed for 1 hour to various treatments at the highest concentration of 43.1  $\mu\text{M}$  with free Dox and Dox-loaded PBCA NPs (a, a', respectively) and 10  $\mu\text{M}$  (b, b', respectively). The first column shows drug-fluorescence images, the second shows cell nuclei stained with DAPI, and the third presents the merged images of the two previous columns. Magnification 20 $\times$ .

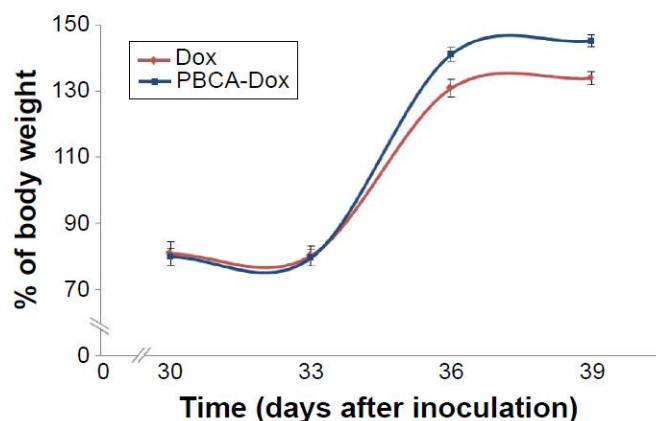
**Abbreviations:** Dox, doxorubicin; PBCA, poly(butylcyanoacrylate); NPs, nanoparticles; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole.



**Figure 6** Tumor-growth inhibition and mouse survival after Dox-loaded PBCA NP treatment.

**Notes:** (A) Graphical representation of tumor-volume progression after intravenous administration of Dox-loaded PBCA NPs, free Dox, and blank PBCA NPs (10 mg/kg) to C57BL/6 mice bearing subcutaneous tumors induced by LL /2 cells (39 days). Data represent mean  $\pm$  SE M (n=10). (B) Difference in mouse-survival rates after exposure to the same treatments. Data represent mean  $\pm$  SD (n=10). Comparison between treatment groups was performed with the log-rank test.

**Abbreviations:** Dox, doxorubicin; PBCA, poly(butylcyanoacrylate); NP, nanoparticle; SE M, standard error of mean; SD, standard deviation.



**Figure 7** Percentage of body-weight progression after Dox-loaded PBCA NP treatment with respect to untreated mice.

**Notes:** Weight (g) of C57BL/6 mice bearing subcutaneous tumors induced by LL /2 cells and treated with Dox-loaded PBCA NPs, free Dox, and blank PBCA NPs were measured every 3 days over 39 days. Percentage of mouse body weight loss induced by treatment with DOX-loaded PBCA NPs was lower than that caused by free DOX. The data is represented as the mean  $\pm$  SD (n=10).

**Abbreviations:** Dox, doxorubicin; PBCA, poly(butylcyanoacrylate); NP, nanoparticle; SD, standard deviation.

## Discussion

Nanoplatfroms as Dox-delivery systems are expected to overcome the dose-dependent therapeutic limitations of this antitumoral agent. This may be particularly interesting for managing malignancies where this drug is used as a first- or second-line treatment. In this context, we have developed an injectable two-phase drug-delivery system based on the biodegradable polymer PBCA for the sequential/controlled release of Dox. This system was previously engineered (by emulsion/polymerization of the cyanoacrylate monomer) for use against breast cancer cells, with promising results.<sup>22</sup> However, significant modifications to the NP-engineering process introduced in the present work resulted in better NP functionalities, ie, reduced mean particle size (from the previously published ~150 to ~75 nm in the present publication) and greater Dox-entrapment efficiencies (from ~50% as earlier reported to ~80% in this work). It is therefore possible to hypothesize much-improved in vitro and in vivo behavior: optimized NP uptake by malignant cells and Dox intracellular accumulation.<sup>30,31</sup> These differences may arise from the modification of the synthesis conditions: mechanical stirring during monomer polymerization was carried out at 3,000 rpm (in contrast to 1,200 rpm), and the surfactant agent previously employed in NP formulation (Pluronic F-68, 1%, w/v) was exchanged for dextran 70 (0.5%, w/v).<sup>22</sup> Moreover, the high drug-entrapment efficiency of our NPs allowed us to reach concentrations of Dox (similar to those presented in commercial preparations) that could have clinical application.

Dox incorporation into the PBCA nanomatrix may occur during NP formation, thanks to 1) the formation of hydrogen bonds between the drug's ammonium groups and the cyano groups of the PBCA NP, 2) the difficulty of drug molecules escaping from the growing polymeric network, and 3) the attractive interaction of the positively charged Dox molecules with the negative PBCA matrix.<sup>32-34</sup> The sustained drug-release profile the PBCA NPs (Figure 1) may have been the consequence of 1) rapid discharge of the Dox molecules on the surface of

the NPs (fast-release phase, ~35% Dox released in 1 hour) and 2) drug diffusion through the PBCA matrix (sequential second release phase ending after 23 hours).<sup>24,35</sup>

In vitro and in vivo activity of the nanoformulations against lung adenocarcinoma was investigated in A549 and LL/2 lung cancer cell lines. Blank (Dox-unloaded) PBCA NPs were found to be noncytotoxic in these cell lines, thus suggesting the adequate biocompatibility of the nanoformulations. These findings were confirmed in vivo. On the other hand, Dox-loaded NPs significantly reduced the IC<sub>50</sub> value of the drug in both A549 and LL/2 cells in a time-dependent manner. Similar results have been previously obtained by an epirubicin-loaded PBCA nanoformulation in A549 cells.<sup>18</sup> In addition, the PBCA NPs' capacity to increase drug cytotoxicity has recently been demonstrated using cisplatin (about three times as much cytotoxicity than free drug) against ovarian cancer cells.<sup>14</sup> This cytotoxic effect could be associated with greater Dox uptake by the malignant cells when the drug is incorporated into the NP matrix.

In order to clarify the positive role that NPs may play in Dox uptake in cells, a flow-cytometry assay was performed using the same drug concentrations and various NP–cell contact times. Enhanced cell uptake of Dox was observed when it was loaded into the PBCA NPs (32.1% and 64.8% more in LL/2 and A549 cells, respectively) in comparison with the free Dox (aqueous solution) at the longest exposure time. This illustrates the key role played by the NPs in Dox incorporation into malignant cells. Fluorescence-microscopy analysis further demonstrated the different dispositions of the drug inside the tumor cells: the free drug was found exclusively within the cell nucleus, while Dox was distributed in the nucleus and cytoplasm of the cancer cells when the drug was entrapped inside the PBCA NPs. Similar findings have been described for the A549 lung cancer-cell line.<sup>18</sup> The presence of Dox in the cytoplasm after delivery by the PBCA NPs could further maximize the drug toxicity through mitochondrial effects. In fact, Dox can interact in the respiratory chain complex I, increasing the oxidative stress generation of reactive oxygen species.<sup>36,37</sup> The reactive oxygen species-level increase then results in an alteration of the mitochondrial transmembrane potential, in an increase in the



mitochondrial permeability, and in a reduction of the ATP levels.<sup>36,38</sup> Furthermore, Dox may interfere in metabolic pathways, such as glycolysis,  $\beta$ -oxidation, and oxidative phosphorylation, and induces the peroxidation of cell membranes.<sup>36,39</sup>

Subsequent work further suggested that NPs probably enter cancer cells through endocytosis. In fact, endocytosis, pinocytosis, and phagocytosis have been proposed to be the most important mechanisms behind cell uptake.<sup>40</sup> They have been associated with the physical chemistry of the nanoformulations, ie, geometry and surface electrical charge.<sup>40,41</sup> For instance, although positively charged NPs can interact easily with the (negative) cell membrane, they have been described to interact strongly in vivo with the immune system. Therefore, negatively charged or neutral NPs have been suggested as being more suitable for clinical applications.<sup>42,43</sup> Geometrically, spherical shapes and nanosize particles (ie, gold NPs) have been described as positive characteristics for particle internalization by cancer cells.<sup>44</sup> In addition, poly(alkylcyanoacrylate) NPs may be responsible for overcoming the multidrug-resistance mechanism displayed by cancer cells, associated with P-glycoprotein. For example, it has been demonstrated that blank PBCA NPs can decrease P-glycoprotein function in a dose-dependent manner in A2780/T human ovarian-resistant cells and MCF-7/ADR human breast cancer cells.<sup>45,46</sup> Similar activity may be expected for the Dox-loaded nanoformulation described in this work, but this has not yet been investigated.

Few in vivo studies have explored the potential clinical use of Dox-loaded PBCA NPs. As an example, PBCA NPs can improve the intratumor accumulation of Dox in Dalton's lymphoma-bearing mice compared to the free drug.<sup>47</sup> PBCA nanoformulations may be further responsible for reduced Dox toxicity in the heart, kidneys, and lungs.<sup>48</sup> It has also been demonstrated that PBCA NPs can interact with alveolar macrophages, inducing increased secretion of Th1 cytokines (eg, IFN $\gamma$ , IL-2), which may be related to a secondary cytotoxic effect on H460 non-small-cell lung carcinoma cells.<sup>49</sup> In this work, the in vivo antitumoral activity of Dox-loaded PBCA NPs was analyzed in LL/2 lung carcinoma-bearing C57BL/6 mice. Compared to free Dox, there was significantly greater control over tumor-size progression in mice treated with the nanoformulation ( $P < 0.05$ ), as well as a

reduction in the drug-associated toxicity profile. These results confirmed the adequate toxicological profile previously reported for Dox-loaded PBCA NPs in comparison with the free drug.<sup>50,51</sup> The NP system may optimize in vivo Dox incorporation into tumor cells. In fact, it has been hypothesized that nanoformulations could enhance drug accumulation in the tumor interstitium (compared to healthy tissues), thanks to the enhanced permeability and retention effect.<sup>52</sup> As a consequence, the drug should display its cytotoxic effect almost entirely at the tumor site, thus keeping its severe side effects to a bare minimum.<sup>36,53</sup>

## **Conclusion**

This work was devoted to developing an alkylcyanoacrylate nanoformulation for improved delivery of Dox to lung cancer cells. To this end, optimal and reproducible preparation conditions have been established for obtaining an injectable two-phase Dox-delivery system. In vitro studies have demonstrated the versatility of the NP system for facilitating drug internalization by lung carcinoma cells, optimizing the cytotoxic effect. Furthermore, in vivo investigations have highlighted promising control over tumor-size progression and the associated side effects displayed by the nanoformulation. For these reasons, the Dox-loaded NP system may help improve the current role of Dox in the therapeutic management of lung cancer patients.

## **Acknowledgments**

This investigation was funded by FEDER, National Plan for Scientific Research, Development and Technological Innovation (I+D+I), Institute of Health Carlos III (FIS) through projects PI11/01862 and PI11/02571, and by the Andalusian Regional Ministry of Health through projects PI-0049 and P11-CTS-7649 (NP-synthesis experiences).



**Disclosure**

The authors report no conflicts of interest in this work.

**References**

1. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2013. Atlanta: American Cancer Society; 2013. Available from: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-036845.pdf>. Accessed November 14, 2015.
2. Grossi F, Gridelli C, Aita M, De Marinis F. Identifying an optimum treatment strategy for patients with advanced non-small cell lung cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008;67(1):16–26.
3. Otterson GA, Villalona-Calero MA, Hicks W, et al. Phase I/II study of inhaled doxorubicin combined with platinum-based therapy for advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2010;16(8):2466–2473.
4. Pilkington G, Boland A, Brown T, Oyee J, Bagust A, Dickson R. A systematic review of the clinical effectiveness of first-line chemotherapy for adult patients with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer. *Thorax*. 2015;70(4):359–367.
5. Wang Y, Zhang H, Hao J, Li B, Li M, Xiuwen W. Lung cancer combination therapy: co-delivery of paclitaxel and doxorubicin by nanostructured lipid carriers for synergistic effect. *Drug Deliv*. Epub 2015 Jun 24.
6. Wen G, Partridge MA, Li B, et al. TGFBI expression reduces in vitro and in vivo metastatic potential of lung and breast tumor cells. *Cancer Lett*. 2011;308(1):23–32.

7. Cai WK, Hu J, Li T, et al. Activation of histamine H4 receptors decreases epithelial-to-mesenchymal transition progress by inhibiting transforming growth factor- $\beta$ 1 signalling pathway in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer*. 2014;50(6):1195–1206.
8. Filyak Y, Filyak O, Souchelnytskyi S, Stoika R. Doxorubicin inhibits TGF- $\beta$  signaling in human lung carcinoma A549 cells. *Eur J Pharmacol*. 2008;590(1–3):67–73.
9. Panis C, Herrera AC, Victorino VJ, Aranome AMF, Cecchini R. Screening of circulating TGF- $\beta$  levels and its clinicopathological significance in human breast cancer. *Anticancer Res*. 2013;33(2):737–742.
10. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol*. 2013;65(2):157–170.
11. Callaghan R, Luk F, Bebawy M. Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein: time for a change of strategy? *Drug Metab Dispos*. 2014;42(4):623–631.
12. Yang X, Yi C, Luo N, Gong C. Nanomedicine to overcome cancer multidrug resistance. *Curr Drug Metab*. 2014;15(6):632–649.
13. Prados J, Melguizo C, Ortiz R, et al. Doxorubicin-loaded nanoparticles: new advances in breast cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem*. 2012;12(9):1058–1070.
14. Doun SK, Alavi SE, Esfahani MK, Shahmabadi HE, Alavi F, Hamzei S. Efficacy of cisplatin-loaded poly butyl cyanoacrylate nanoparticles on the ovarian cancer: an in vitro study. *Tumour Biol*. 2014;35(8):7491–7497.

15. Tan R, Niu M, Zhao J, Liu Y, Feng N. Preparation of vincristine sulfate-loaded poly (butylcyanoacrylate) nanoparticles modified with pluronic F127 and evaluation of their lymphatic tissue targeting. *J Drug Target*. 2014;22(6):509–517.
16. Yordanov G, Skrobanska R, Evangelatov A. Entrapment of epirubicin in poly(butyl cyanoacrylate) colloidal nanospheres by nanoprecipitation: formulation development and in vitro studies on cancer cell lines. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2012;92:98–105.
17. Yordanov G, Skrobanska R, Evangelatov A. Colloidal formulations of etoposide based on poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: preparation, physicochemical properties and cytotoxicity. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013;101:215–222.
18. Yordanov G, Evangelatov A, Skrobanska R. Epirubicin loaded to pre-polymerized poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: preparation and in vitro evaluation in human lung adenocarcinoma cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013;107:115–123.
19. Kapse-Mistry S, Govender T, Srivastava R, Yergeri M. Nanodrug delivery in reversing multidrug resistance in cancer cells. *Front Pharmacol*. 2014;5:159.
20. Miao J, Du YZ, Yuan H, Zhang XG, Hu FQ. Drug resistance reversal activity of anticancer drug loaded solid lipid nanoparticles in multi-drug resistant cancer cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013;110:74–80.
21. Kolter M, Ott M, Hauer C, Reimold I, Fricker G. Nanotoxicity of poly(n-butylcyano-acrylate) nanoparticles at the blood-brain barrier, in human whole blood and in vivo. *J Control Release*. 2015;197:165–179.

22. Cabeza L, Ortiz R, Arias JL, et al. Enhanced antitumor activity of doxorubicin in breast cancer through the use of poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:1291–1306.
23. O'Brien RW, White LR. Electrophoretic mobility of a spherical colloidal particle. *J Chem Soc Faraday Trans*. 1978;2(74):1607–1626.
24. Arias JL, Ruiz MA, López-Viota M, Delgado AV. Poly(alkylcyanoacrylate) colloidal particles as vehicles for antitumour drug delivery: a comparative study. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2008;62(1):64–70.
25. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst*. 1990;82(13):1107–1112.
26. Arias JL, Gallardo V, Linares-Molinero F, Delgado AV. Preparation and characterization of carbonyl iron/poly(butylcyanoacrylate) core/shell nanoparticles. *J Colloid Interface Sci*. 2006;299(2):599–607.
27. Arias JL, Gallardo V, Ruiz MA, Delgado AV. Ftorafur loading and controlled release from poly(ethyl-2-cyanoacrylate) and poly(butylcyanoacrylate) nanospheres. *Int J Pharm*. 2007;337(1–2):282–290.
28. Couvreur P. Polyalkylcyanoacrylates as colloidal drug carriers. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 1988;5(1):1–20.
29. Vauthier C, Dubernet C, Fattal E, Pinto-Alphandary H, Couvreur P. Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003;55(4):519–548.
30. Huang C, Zhang Y, Yuan H, Gao H, Zhang S. Role of nanoparticle geometry in endocytosis: laying down to stand up. *Nano Lett*. 2013;13(9):4546–4550.

31. Kettler K, Veltman K, van de Meent D, van Wezel A, Hendriks AJ. Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions, and cell type. *Environ Toxicol Chem.* 2014;33(3):481–492.
32. Poupaert JH, Couvreur P. A computationally derived structural model of doxorubicin interacting with oligomeric polyalkylcyanoacrylate in nanoparticles. *J Control Release.* 2003;92(1–2):19–26.
33. Yu MK, Jeong YY, Park J, et al. Drug-loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for combined cancer imaging and therapy in vivo. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2008;47(29):5362–5365.
34. Gaihre B, Khil MS, Lee DR, Kim HY. Gelatin-coated magnetic iron oxide nanoparticles as carrier system: drug loading and in vitro drug release study. *Int J Pharm.* 2009;365(1–2):180–189.
35. Graf A, McDowell A, Rades T. Poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles for enhanced delivery of therapeutics – is there real potential? *Expert Opin Drug Deliv.* 2009;6(4):371–387.
36. Carvalho FS, Burgeiro A, Garcia R, Moreno AJ, Carvalho RA, Oliveira PJ. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy. *Med Res Rev.* 2014;34(1):106–135.
37. Mordente A, Meucci E, Silvestrini A, Martorana GE, Giardina B. Anthracyclines and mitochondria. *Adv Exp Med Biol.* 2012;942:385–419.
38. Gharanei M, Hussain A, Janneh O, Maddock HL. Doxorubicin induced myocardial injury is exacerbated following ischaemic stress via opening of the mitochondrial permeability transition pore. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;268(2):149–156.

39. Stěrba M, Popelová O, Lenčo J, et al. Proteomic insights into chronic anthracycline cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;50(5):849–862.
40. Ma N, Ma C, Li C, et al. Influence of nanoparticle shape, size, and surface functionalization on cellular uptake. *J Nanosci Nanotechnol.* 2013;13(10):6485–6498.
41. Zhang Y, Xu D, Li W, Yu J, Chen Y. Effect of size, shape, and surface modification on cytotoxicity of gold nanoparticles to human HEp-2 and canine MDCK cells. *J Nanomater.* 2012;2012:375496.
42. Gratton SE, Ropp PA, Pohlhaus PD, et al. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(33):11613–11618.
43. He C, Hu Y, Yin L, Tang C, Yin C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials.* 2010;31(13):3657–3666.
44. Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WC. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett.* 2006;6(4):662–668.
45. Ren F, Chen R, Wang Y, Sun Y, Jiang Y, Li G. Paclitaxel-loaded poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticle delivery system to overcome multidrug resistance in ovarian cancer. *Pharm Res.* 2011;28(4):897–906.
46. Duan J, Mansour HM, Zhang Y, et al. Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of doxorubicin and curcumin in chitosan/poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Int J Pharm.* 2012;426(1–2):193–201.

47. Reddy LH, Sharma RK, Murthy RS. Enhanced tumour uptake of doxorubicin loaded poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles in mice bearing Dalton's lymphoma tumour. *J Drug Target*. 2004;12(7):443–451.
48. Shen L, Zhang Y, Shen H, et al. Liver targeting and the delayed drug release of the nanoparticles of adriamycin polybutylcyanoacrylate in mice. *Chin Med J (Engl)*. 2006;119(15):1287–1293.
49. Al-Hallak KM, Azarmi S, Anwar-Mohamed A, Roa WH, Löbenberg R. Secondary cytotoxicity mediated by alveolar macrophages: a contribution to the total efficacy of nanoparticles in lung cancer therapy? *Eur J Pharm Biopharm*. 2010;76(1):112–119.
50. Pereverzeva E, Treschalin I, Bodyagin D, et al. Influence of the formulation on the tolerance profile of nanoparticle-bound doxorubicin in healthy rats: focus on cardio- and testicular toxicity. *Int J Pharm*. 2007;337(1–2):346–356.
51. Pereverzeva E, Treschalin I, Bodyagin D, Maksimenko O, Kreuter J, Gelperina S. Intravenous tolerance of a nanoparticle-based formulation of doxorubicin in healthy rats. *Toxicol Lett*. 2008;178(1):9–19.
52. Wang M, Thanou M. Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacol Res*. 2010;62(2):90–99.
53. Jain RK, Stylianopoulos T. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;7(11):653–664.





### Artículo 3

## Improved antitumor activity and reduced toxicity of doxorubicin encapsulated in poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles in lung and breast cancer treatment:

### *An in vitro and in vivo study*

Laura Cabeza <sup>a,b,c,1</sup>, Raul Ortiz <sup>a,d,1</sup>, Jose Prados <sup>a,b,c,\*</sup>, Ángel V. Delgado <sup>e</sup>,  
Maria J. Martín-Villena <sup>f</sup>, Beatriz Clares <sup>d,f</sup>, Gloria Perazzoli <sup>a,b</sup>, Jose M. Entrena <sup>g</sup>,  
Consolación Melguizo <sup>a,b,c,2</sup>, Jose L. Arias <sup>a,b,f,2</sup>

<sup>a</sup> *Institute of Biopathology and Regenerative Medicine (IBIMER), Biomedical Research Centre (CIBM), University of Granada, 18100 Granada, Spain*

<sup>b</sup> *Biosanitary Institute of Granada (ibs.GRANADA), SAS-Universidad de Granada, Granada, Spain*

<sup>c</sup> *Department of Anatomy and Embryology, University of Granada, 18016 Granada, Spain*

<sup>d</sup> *Department of Health Science, University of Jaén, 23071 Jaén, Spain*

<sup>e</sup> *Department of Applied Physics, University of Granada, 18071 Granada, Spain*

<sup>f</sup> *Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, University of Granada, 18071 Granada, Spain*

<sup>g</sup> *Department of Pharmacology, Institute of Neuroscience, Biomedical Research Center (CIBM), University of Granada, 18100 Granada, Spain*

<sup>1</sup> *These authors contributed equality to this work.*

<sup>2</sup> *CM and JLA also contributed equally to this work.*

#### Publicado en:

Eur J Pharm Sci. 2017 Feb 17; 102: 24-34.

Doi: 10.1016/j.ejps.2017.02.026

**Abstract**

Poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) nanoparticles (NPs) offer many possibilities for drug transport because of their good physicochemical properties and biocompatibility. Doxorubicin-loaded PCL NPs have been synthesized to try to reduce the toxicity of doxorubicin (DOX) for healthy tissues and enhance its antitumor effect in two tumor models, breast and lung cancer, which have a high incidence in the global population. PCL NPs were synthesized using a modified nanoprecipitation solvent evaporation method. The *in vitro* toxicity of PCL NPs was evaluated in breast and lung cancer cell lines from both humans and mice, as was the inhibition of cell proliferation and cell uptake of DOX-loaded PCL NPs compared to free DOX. Breast and lung cancer xenografts were used to study the *in vivo* antitumor effect of DOX-loaded NPs. Moreover, healthy mice were used for *in vivo* toxicity studies including weight loss, blood toxicity and tissue damage. The results showed good biocompatibility of PCL NPs *in vitro*, as well as a significant increase in the cytotoxicity and cell uptake of the drug-loaded in PCL NPs, which induced almost a 98% decrease of the IC<sub>50</sub> (E0771 breast cancer cells). Likewise, DOX-loaded PCL NPs led to a greater reduction in tumor volume ( $\approx 36\%$ ) in studies with C57BL/6 mice compared to free DOX in both lung and breast tumor xenograft models. Nevertheless, no differences were found in terms of mouse weight. Only in the lung cancer model were significant differences in mice survival observed. In addition, DOX-loaded PCL NPs were able to reduce myocardial and blood toxicity in mice compared to free DOX. Our results showed that DOX-loaded PCL NPs were biocompatible, enhanced the antitumor effect of DOX and reduced its toxicity, suggesting that they may have an important potential application in lung and breast cancer treatments.

**Keywords**

Doxorubicin, poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles, lung cancer, breast cancer, mice xenografts, toxicity.

## 1. Introduction

Doxorubicin (DOX), an anthracycline antibiotic with antineoplastic effect, is used to treat many types of solid tumors and hematological diseases such as breast, lung and ovary cancers, sarcomas, leukemia, and Hodgkin's disease (Weiss, 1992). Doxorubicin is a DNA intercalating agent that causes DNA damage resulting in cell death. In addition, this drug increases the production of reactive oxygen species (ROS) in mitochondria (Doroshov, 1983; Govender et al., 2014; Tacar et al., 2013) and interacts with the enzyme topoisomerase 2 (Top2 $\alpha$ ), which is overexpressed in cells with a high proliferation rate, such as tumor cells (Vejpongsa and Yeh, 2014). Despite DOX having an important antitumor effect, its lack of specificity for the tumor tissue makes its use limited. In fact, one of the major limitations of this drug is the production of cardiotoxicity caused by mechanisms such as ROS production (Angsutararux et al., 2015). For these reasons, it is important to develop new drug administration pathways to enhance the antitumor effect and improve specificity for tumor tissues.

Nanoparticles (NPs) of poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) have been investigated as antitumor drug transport and delivery systems because of their size, biocompatibility, biodegradability and the possibility of modifying their surface properties increasing their multi-functionality (Dash and Konkimalla, 2012; Wei et al., 2009). In fact, many types of PCL-nanoformulations have been generated (micelles, hydrogels, scaffolds, fibers, films, and microspheres) (Dash and Konkimalla, 2012) loading numerous antitumor drugs with excellent results in both *in vitro* and *in vivo* cancer models (Liu et al., 2012). Recently, the capacity of PCL NPs to improve the antitumoral effect of classical drugs such as 5-fluorouracil, carboplatin or curcumin in colon cancer, glioblastoma and glioma, respectively, has been demonstrated (Karanam et al., 2015; Marslin et al., 2016; Ortiz et al., 2015). Concretely, DOX-loaded PCL and poly(ethylene glycol) (PEG) NPs and micelles showed a sustained drug release and great *in vitro* and *in vivo* antitumor activity compared to the free drug (Gou et al., 2009; Zhang et al., 2011). Moreover, micelles of monomethoxy PEG-PCL loaded with DOX showed better cell uptake in the

B16-F10 melanoma cell line in comparison to free DOX, as well as a greater suppression of tumor growth and survival of C57BL/6 mice bearing subcutaneous melanoma tumors (Zheng et al., 2011). In addition, as demonstrated by Cheng et al. (2012), PCL micelles were able to improve DOX release in response to a temperature increase (40 °C), increasing drug cytotoxicity. Doxorubicin loaded to copolymers of dextran- $\beta$ -PCL exhibited greater cytotoxicity (~15%) compared to free DOX in SH-SY5Y human neuroblastoma cell lines and a significant increase of cell internalization (Li et al., 2013). PCL and poly(N-vinylpyrrolidone) (PNVP) (PCL<sub>63</sub>-b-PNVP<sub>90</sub>) micelles loading DOX have recently been developed that enhanced growth inhibition in normal and resistant lymphoma cell lines from humans and mice in comparison with the free drug. Furthermore, these DOX-loaded nanocarriers did not alter the viability of normal blood cells such as monocytes, dendritic cells or lymphocytes (93.26%), in contrast to treatment with free DOX (60.87%) (Hira et al., 2014). Latterly, polymers containing PCL have been developed to release the drug under certain conditions to make it even more specific to the tumor tissue, such as photocleavable polymers, or involving the incorporation of cleavable disulfide linkages by the intracellular enzyme glutathione (Kumar et al., 2015; Lee et al., 2015).

In this context, the aim of our study was to use a formulation of PCL NPs for transporting DOX in order to potentially improve breast and lung cancer treatment. Cell proliferation assays with breast and lung cancer cell lines from both humans and mice, and cellular internalization studies using FACScan and fluorescent microscopy were performed. In addition, *in vivo* studies were carried out to look at the antitumor effect of DOX-loaded PCL NPs compared to free DOX, mice survival, and modulation of DOX toxicity. The results showed good biocompatibility of PCL NPs and a significant increase in DOX antitumor effect when drug was loaded to PCL NPs. No differences were found in the weight of mice when the free DOX and DOX-loaded PCL NP treatments were compared. Interestingly, a modulation of mice survival was observed with the use of DOX-loaded NPs. Finally, decreased DOX toxicity on blood and tissue was determined.

Thus, the use of DOX-loaded PCL NPs improves the drug's antitumor effect, something which could be applied in the treatment of breast and lung cancer.

## **2. Material and methods**

### ***2.1. Materials***

All chemicals were of analytical quality from Sigma-Aldrich Chemical Co. (Spain). Deionized and filtered water was used in all the experiments (Milli-Q Academic, Millipore, Molsheim, France).

### ***2.2. Formulation of DOX-loaded PCL NPs***

PCL NPs were prepared by a modified nanoprecipitation solvent evaporation procedure using a probe sonicator (Branson sonifier W450 Digital, Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA) (Cirpanli et al., 2011; Letchford et al., 2009). Concretely, 1 mL of a dichloromethane (DCM) polymeric solution (1%, w/v) was added drop-wise, under sonication (pulsed mode, with a cycle of 70%, to avoid foaming), to 5 mL of an aqueous solution containing Pluronic® F-68 (0.3%, w/v). Temperature control was assured by surrounding the sample vial with ice during the sonication process (1 h). Finally, the organic solvent was evaporated (Büchi Rotavapor® rotary evaporator, Büchi, Flawil, Switzerland), and the colloid was subjected to a cleaning process involving subsequent cycles of centrifugation (30 min at 9000 rpm, Centrikon T-124 high-speed centrifuge; Kontron, Paris, France) and re-dispersion in water, until the conductivity of the supernatant was <10  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

DOX entrapment into PCL NPs was based on the above described formulation methodology with an additional step aiming to optimize the drug loading efficacy: incorporation of a DCM polymeric solution containing adequate quantities of DOX (up to 0.01M) to the aqueous medium, or addition of the DCM polymeric solution to the aqueous phase containing increasing drug concentrations

(up to  $10^{-2}$ M). The objective was to clarify if greater drug entrapment (and loading) efficacies are possible when DOX molecules are included in direct contact with the polymer (dissolved in the organic phase to minimize drug escape to the aqueous phase). Additionally, the impact on DOX entrapment of the concentration of stabilizing agent (Pluronic® F-68) and polymer (PCL) was analyzed. To that aim, the concentration of PCL in the DCM solution and the concentration of Pluronic® F-68 in the aqueous medium were varied from 1 to 5% (w/v) and from 0 to 5% (w/v), respectively. All the formulations were prepared in sextuplicate.

### **2.3. Characterization methods**

Particle size (mean value  $\pm$  standard deviation) was determined in quadruplicate at room temperature by photon correlation spectroscopy (PCS, Malvern Autosizer® 4700, Malvern Instruments Ltd., UK), after suitable dilution of the aqueous NP dispersions ( $\approx 0.1\%$ , w/v). Stability of the colloids was investigated during three months of storage at  $4.0 \pm 0.5$  °C in water by measuring both the size and DOX loading. Finally, to confirm the size analysis, aqueous NP dispersions ( $\approx 0.1\%$ , w/v) were visualized by high resolution transmission electron microscopy (HRTEM, Stem Philips CM20 high resolution transmission electron microscope, Netherlands).

Surface electrical charge of both blank (DOX unloaded) and DOX-loaded NPs was investigated by electrokinetic determinations ( $\approx 0.1\%$ , w/v NP concentration in aqueous media) (Malvern Zetasizer® 2000 electrophoresis device, Malvern Instruments Ltd., UK), after 24 h of contact of NPs in water (pH  $\approx 6$ ) under mechanical stirring (50 rpm) at room temperature. Such electrophoretic characterization was expected to define the type of drug loading (adsorption onto the NP surface, or entrapment into the nanomatrix).

Ultraviolet-Visible (UV-Vis) absorbance measurements (8500 UV-Vis Dinko spectrophotometer, Dinko, Spain) were done in quadruplicate at the maximum absorbance wavelength (481 nm) to quantify drug concentration in all the formulations. Before determining the amount of DOX loaded to (or released from)

the PCL NPs, the UV–Vis spectrophotometric method of analysis was validated (and verified) by comparing the evaluation of drug concentration in 2 instances: a certain DOX quantity was dissolved in supernatants of NP syntheses (done in absence of drug), and the same amount was dissolved in equal amounts of water. Drug concentrations estimated (in the first case from the difference between the absorbance of DOX plus supernatant solution and that of the supernatant) were found to match within the experimental uncertainty. These tests were done in sextuplicate, and demonstrated the accuracy, precision, and linearity of the method, and the absence of molecular interactions.

DOX loading studies involved UV–Vis determinations of the drug remaining in the aqueous supernatant (being obtained upon centrifugation, 30 min at 9000 rpm, of the NP dispersion) which was deduced from the total amount of DOX in the aqueous NP dispersion. For the method to be accurate, the contribution to the absorbance of sources other than variations in drug concentration (e.g. Pluronic® F-68), by subtracting the absorbance of the supernatant produced in the same conditions but without the drug. DOX incorporation to the NPs was expressed in terms of drug loading (%) and drug entrapment efficiency (%):

$$\text{Drug loading (\%)} = \frac{\text{mass of drug incorporated in the NP matrix (mg)}}{\text{mass obtained of NPs loaded with drug (mg)}} \times 100$$

$$\text{Drug entrapment efficiency (\%)} = \frac{\text{mass of drug incorporated in the NP matrix (mg)}}{\text{mass of drug used in the experiment (mg)}} \times 100$$

Drug release experiments were performed in quadruplicate following the dialysis bag method, and using the nanoformulations that were investigated later *in vitro* and *in vivo* (PCL NPs with the greater DOX loading values, i.e.  $\approx 49\%$ , Table 1). The bags were soaked in water at room temperature during 12 h before use. The dialysis bag (cut-off of 2000 Da, Spectrum®Spectra/Por® 6 dialysis membrane tubing, USA) retained the particles but permitted the free drug to diffuse into the receiving phase (phosphate buffered saline, PBS, pH  $7.4 \pm 0.1$ , kept at  $37.0 \pm 0.5$  °C). Then, 1 mL of NP dispersion (containing 4 mg/mL of DOX) was poured into



the dialysis bag with the two ends fixed by clamps. The bag was then placed in a conical flask filled with 50 mL of PBS, and was stirred at 150 rpm. At different time intervals (0.5, 1, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 96, 120, and 144 h), 1 mL samples of the medium were withdrawn for UV–Vis spectrophotometric analysis (481 nm). An equal volume of the release medium, kept at the same temperature, was added after sampling to ensure the sink conditions.

**Table 1**

Influence of the preparation conditions (DOX, PCL, and Pluronic® F-68 concentrations) for drug absorption on particle size, drug entrapment efficiency (%), drug loading (%), and zeta potential ( $\zeta$ , mV) values of the blank (DOX unloaded) PCL NPs and the DOX-loaded PCL NPs formulated after drug dissolution in the organic phase. Size, entrapment efficiency, drug loading, and  $\zeta$  values of DOX-loaded PCL NPs obtained after drug dissolution in the aqueous media are given inside curve brackets.

[DOX] (M)	[PCL] (% w/v)	[Pluronic® F-68] (% w/v)	Size (nm)	DOX entrapment efficiency (%)	DOX loading (%)	$\zeta$ (mV)
0	1	0.3	73 ± 13	–	–	–14 ± 3
10 <sup>–5</sup>	1	0.3	77 ± 9 (79 ± 8)	36.4 ± 2.3 (26.1 ± 3.4)	0.019 ± 0.005 (0.014 ± 0.006)	–15 ± 1 (–16 ± 3)
10 <sup>–4</sup>	1	0.3	79 ± 6 (80 ± 7)	60.7 ± 3.7 (37.3 ± 3.1)	0.329 ± 0.063 (0.203 ± 0.044)	–15 ± 1 (–16 ± 3)
10 <sup>–3</sup>	1	0.3	70 ± 8 (73 ± 8)	82.1 ± 4.1 (53.3 ± 3.2)	4.462 ± 0.121 (2.908 ± 0.096)	–17 ± 2 (–14 ± 1)
10 <sup>–2</sup>	1	0.3	83 ± 7 (69 ± 8)	90.6 ± 3.6 (59.8 ± 4.1)	49.242 ± 3.091 (32.502 ± 3.976)	–15 ± 2 (–15 ± 3)
10 <sup>–2</sup>	1	0	Macroaggregates	–	–	–
10 <sup>–2</sup>	1	1	77 ± 9 (85 ± 4)	92.6 ± 4.1 (60.5 ± 3.8)	50.226 ± 3.578 (32.859 ± 3.321)	–16 ± 4 (–17 ± 3)
10 <sup>–2</sup>	1	3	67 ± 5 (87 ± 2)	86.1 ± 3.3 (55.2 ± 4.4)	46.796 ± 3.014 (30.002 ± 4.112)	–14 ± 3 (–15 ± 1)
10 <sup>–2</sup>	1	5	77 ± 8 (74 ± 6)	88.3 ± 4.2 (58.1 ± 3.3)	47.992 ± 3.629 (31.578 ± 3.016)	–14 ± 4 (–13 ± 4)
10 <sup>–2</sup>	3	0.3	75 ± 6 (73 ± 6)	89.8 ± 3.2 (58.7 ± 3.6)	16.269 ± 1.227 (10.635 ± 1.674)	–15 ± 1 (–13 ± 3)
10 <sup>–2</sup>	5	0.3	80 ± 9 (77 ± 6)	93.6 ± 2.9 (62.4 ± 1.5)	10.175 ± 1.016 (6.783 ± 0.962)	–16 ± 2 (–15 ± 3)

## 2.4. Cell culture

The human cell lines MCF-7 and A549 of breast and lung cancer respectively, were obtained from the European Collection of Cell Culture and the Scientific Instrumentation Center (University of Granada, Spain). The LL/2 mouse lung cancer cell line, were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC), and the E0771 mouse breast cancer cell line were kindly given by Robin Anderson from Peter MacCallum Cancer Center, (East Melbourne, Australia). Both mouse cell lines come from the immunocompetent mouse C57BL/6. In addition, a



rat cardiomyocyte cell line (H9C2) obtained from ATCC was used for toxicity assays. All cell lines were grown in monolayer in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich) with a supplementation of 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% of antibiotics (Penicillin-Streptomycin) (Sigma-Aldrich) and maintained at 37 °C in a humidified incubator with an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>.

### ***2.5. In vitro cytotoxicity of cell lines***

Cell proliferation was determined by a modified sulforhodamine B (SRB) assay as described previously (Melguizo et al., 2015). All the experiments were performed in triplicate. Cells lines were plated in 24-well plates at different cell densities:  $10 \times 10^3$ ,  $15 \times 10^3$ ,  $20 \times 10^3$ ,  $15 \times 10^3$  cells/well for MCF-7, A549, LL/2 and E0771, respectively. In addition, the non-tumor H9C2 rat embryonic cardiomyocyte cell line was plated at a density of  $8 \times 10^3$  cells/well. Twenty-four hours later, cells were treated with DOX, DOX-loaded PCL NPs and unloaded PCL NPs at concentrations ranged from 0.01 to 10  $\mu$ M at an incubation time of 48 h. The concentration of unloaded PCL NPs used was equivalent to the drug-loaded NPs. Untreated cells were used as a negative control. After the incubation time, cells were fixed with 10% trichloroacetic acid (TCA), stained with SRB, and the dye was resuspended with a 10 mM, pH 10.5 solution of Trizma and quantified at 492 nm with a Titertek Multiskan™ colorimeter (Flow Laboratories, Irvine, UK). The optical density (OD) of treated cells was compared with the OD of untreated cells (100% of viability) to determine the percentage of relative inhibition (%IR) produced by the treatments.

### ***2.6. Flow cytometry assay***

To study the rate of incorporation of drug-loaded to NPs compared to free drug, we subjected the cells to a flow cytometry (FACScan) assay. All the cell lines were plated in 6-well plates at a cell density of  $150 \times 10^3$  cells/well in 2 mL of DMEM. After 24 h, treatments at 25  $\mu$ g/mL of DOX and DOX-PCL NPs were

added to cells and incubated at 0.5, 1, 1.5, 2, and 4 h. After the incubation time, cells were detached by trypsinization, and the cell pellets were collected by centrifugation at 1500 rpm for 5 min and resuspended in 200  $\mu$ L of PBS solution. Flow cytometry analysis was carried out with a FACSCanto II flow cytometer (BD Bioscience, San Diego, CA, USA).

### **2.7. Fluorescent microscopy assay**

All cell lines were seeded in a volume of 300  $\mu$ L in chamber slides (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) of 8 wells at a cell density of  $5 \times 10^3$  cells/well. After 24 h in culture conditions, cells were exposed to the same dose of free DOX and DOX-loaded PLC NPs as in the cytometry assay (25  $\mu$ g/mL) at 45 min of incubation. After the incubation time, 200  $\mu$ L of 4% formaldehyde was added to cells for 20 min at room temperature. Then, cells were washed three times with PBS and the cell nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen <sup>TM</sup>). Drug intracellular location was observed under fluorescence microscopy using a Leica DM IL LED fluorescence microscope (Leica Microsystems S.L.U., Barcelona, Spain).

### **2.8. In vivo antitumoral activity of the DOX-loaded PCL NPs**

Two groups of forty female C57BL/6 mice (Charles River, Barcelona, Spain) were s.c. inoculated in the right hind flank with a half million of LL/2 or E0771 cells in a volume of 200  $\mu$ L of phosphate buffered saline (PBS) to induce s.c. lung and breast tumors, respectively. After nine days, each group of mice bearing tumors was divided randomly into groups of ten mice, and each was treated i.v. with DOX (10 mg/kg), DOX-loaded PCL NPs (with the equivalent drug concentration) and blank PCL NPs. Besides, there was one group of each type of cancer treated with saline solution as a negative control. The treatments were applied every three days for a total of five doses. Furthermore, every three days the weight of mice were monitored and also the tumor dimensions were measured with a digital caliper,

and the tumor volume was calculated with the formula  $V(\text{mm}^3) = (a \times b^2 \times \pi)/6$ , (being “a” the largest diameter of the tumor, and “b” the largest diameter perpendicular to “a”). The final point of the experiment when animals were sacrificed was the day 33 starting from the day of cells inoculation. The animal studies were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the University of Granada.

### **2.9. *In vivo* toxicity study of DOX-loaded PCL NPs**

To determine the *in vivo* toxicity of DOX-loaded NPs, 32 female C57BL/6 mice were divided randomly into four groups (n=8). Following the protocol of Zhu et al. (2015), single dose of DOX (10 mg/kg body) and DOX-loaded NPs (with the equivalent drug concentration) were injected i.v. into healthy mice. A group treated with blank PCL NPs and another untreated group (control) were also included in the study. Mouse body weight was determined every 48 h until the final point of the experiment (14 days from the treatment). Tissue (heart, liver and lung) and blood samples were obtained on the fourth day after treatments. Tissues from 3 mice of each group were fixed in a 4% paraformaldehyde (PFA) solution, embedded in paraffin, sectioned (5  $\mu\text{m}$ ) and finally stained with hematoxylin and eosin. The samples were observed in a Leica DM IL LED microscope (Leica Microsystems S.L.U., Barcelona, Spain). Blood was extracted from all the mice in 1.5 mL EDTA-coated Eppendorf tubes for the analysis of blood parameters (Mythic 22CT C2 Hematology Analyzer, Orphée SA, Switzerland). A portion of blood was gently mixed and centrifuged (15 min at 3.000 rpm a 4 °C) to obtain plasma which was then aspirated from the collection tubes and stored at  $-80$  °C. Three cardiovascular disease markers, MMP-9 (Matrix metalloproteinase 9), sVACM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) and CRP (C-reactive protein) were evaluated using Milliplex MAP Kits (Merck Millipore; Darmstadt, Germany). Optical density was determined using an automated immunoassay analyzer, the Luminex 200 TM (Millipore, Darmstadt, Germany).

## 2.10. Statistical analysis

All the results have been expressed as the mean  $\pm$  the standard deviation. Statistical analysis of the *in vitro* studies was carried out with the Student's t-test. For the *in vivo* studies, a one-way ANOVA with a Tukey's post-hoc test was used to evaluate the differences between groups in terms of tumor volume and toxicity. Mice survival *P* was calculated with the Kaplan-Meier method and then analyzed with the log-rank test. All the tests were performed with the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) v. 15.0 with a significance level of 0.05 ( $\alpha=0.05$ ).

## 3. Results

### 3.1. Characterization of the DOX-loaded PCL NPs

PCL NPs obtained using a modified nanoprecipitation solvent evaporation procedure were characterized by having an average diameter of  $<90$  nm and a spherical shape (Table 1, Fig. 1). The negative surface electrical charge of the NPs in water (Table 1) could be attributed to the dissociation, at pH 6, of free acrylic groups included in their chemical structure (Arias et al., 2010). No differences were observed in particle size and quality of the colloid when the NPs were loaded with different amounts of DOX (Table 1). Finally, the colloidal formulations were found to be stable during a three-month storage period at  $4.0 \pm 0.5$  °C: no appreciable change in particle size and surface electrical charge, no existence of aggregates/sediments, nor any DOX precipitation and/or release were detected.

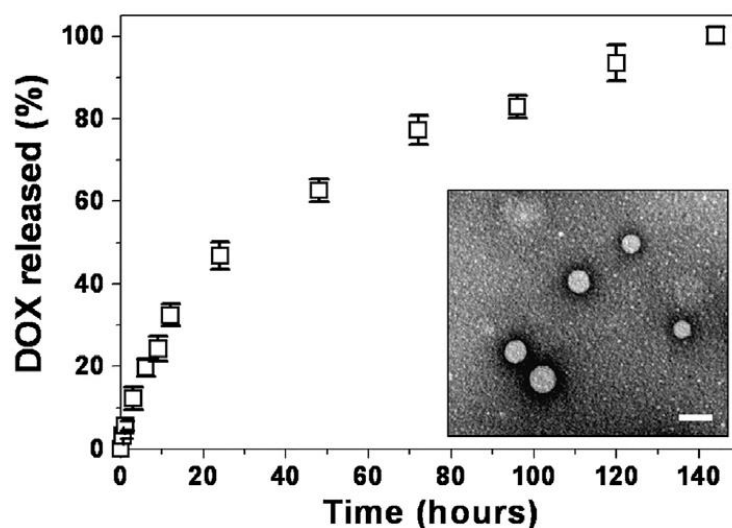
Investigation of DOX entrapment in the PCL NPs began by defining the influence of the initial phase (aqueous or organic) in which the drug was dissolved (see Section 2.2, Formulation of DOX-loaded PCL NPs). DOX entrapment efficiency (%) and DOX loading values (%) as a function of the drug concentration are compiled in Table 1. Both parameters were found to be significantly greater when DOX was added to the organic phase, whatever the initially fixed drug quantity. As an example, when the initial DOX concentration was  $10^{-2}$  M these

parameters rose from  $\approx 59.8\%$  and  $\approx 32.5\%$  (when the drug was in the aqueous phase) to  $\approx 90.6\%$  and  $\approx 49.2\%$  (when DOX was incorporated to the DCM solution), respectively. This could be a consequence of the difficulty experienced by the drug in escaping from the PCL nanomatrix when it is placed in deep contact with the polymer. Finally, there may be further attractive forces between the positively-charged drug molecules and the negatively-charged NPs, thus electrostatically favoring DOX incorporation to the NPs. Antiproliferative and *in vivo* tumor growth inhibition studies were performed using the NPs with the greatest DOX entrapment efficiencies, *i.e.*,  $\approx 90.6\%$ .

Table 1 reveals how drug concentration positively influenced the efficiency of DOX entrapment into the NPs. It can be further highlighted that the use of Pluronic® F-68 assured homogeneous distributions of DOX-loaded NPs, highly uniform and with reduced size, without significantly affecting DOX entrapment. Similarly, the quantity of polymer did not exhibit an important influence on DOX loading.

Great similarity was found between the electrokinetics ( $\zeta$  values) of blank NPs and DOX-loaded NPs (Table 1). In fact electrophoretically speaking they were indistinguishable. Given the extraordinary sensitivity of electrophoresis to tiny changes in colloidal surfaces, this technique was advantageously used to define the type of DOX incorporation to the NPs (surface adsorption vs. entrapment within the nanomatrix). Due to the fact that  $\zeta$  values did not change upon drug incorporation, it can be assumed that the DOX molecules were entrapped within the NP structure.

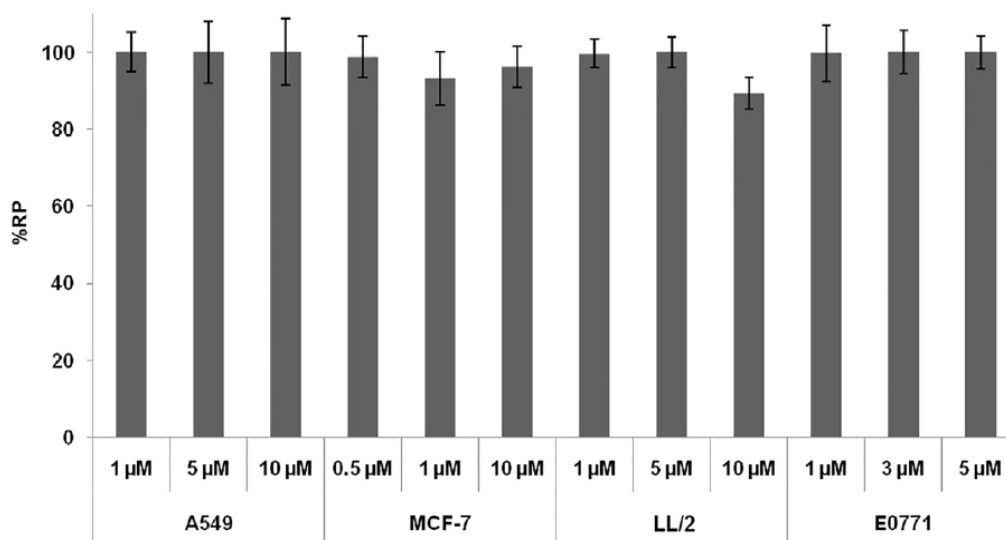
With regard to DOX release from the NPs, a biphasic process was observed at pH 7.4, characteristic of PCL nanomatrices (Pohlmann et al., 2013), where an initial rapid (burst) release phase (up to  $\approx 30\%$  in 12 h) was followed by a phase in which the remaining drug molecules were released in a more progressive way (over a period of 5.5 days) (Fig. 1). Thus, the majority of DOX may be located within the PCL matrix rather than adsorbed onto the particle surface.



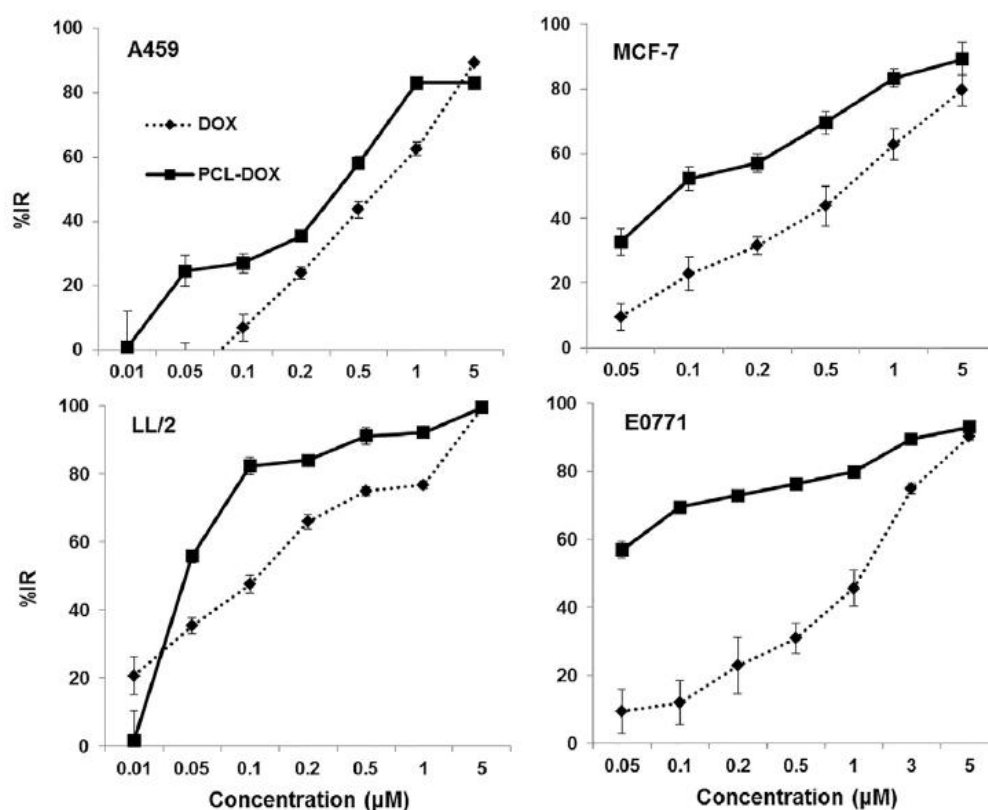
**Fig. 1.** DOX released (%) from PCL NPs as a function of the incubation time (h) in PBS (pH 7.4  $\pm$  0.1) at 37.0  $\pm$  0.5 °C. Data presented as mean value  $\pm$  standard deviation (S.D.) (n = 4). Inset: high-resolution transmission electron microphotograph of the NPs (bar length: 100 nm).

### 3.2. DOX-loaded PLC NPs cell toxicity

Blank PCL NPs showed no toxicity in any of the tested cell lines even at the highest concentrations. Only a slight decrease (10%) in the percentage of relative proliferation (% RP) was detected in the LL/2 cells when blank NPs were used at 10  $\mu$ M (Fig. 2). On the other hand, DOX-loaded NPs showed a significant increase in the inhibition of proliferation in all cell lines after 48 h of exposure in relation to the free drug ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3). This increased DOX cytotoxicity led to a significant reduction in the half-inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) which was 0.71, 0.7, 0.11 and 1.3  $\mu$ M for DOX and 0.31, 0.09, 0.04, and 0.02  $\mu$ M for DOX-PCL NPs in the A549, MCF-7, LL/2 and E0771 cell lines, respectively. The greatest decreases of the IC<sub>50</sub> values were detected in MCF-7 (87.1%) and E0771 (98.5%). In addition, a cytotoxic assay was performed with the non-tumor H9C2 rat embryonic cardiomyocyte cell line (Supplementary material; Fig. 1S).



**Fig. 2.** *In vitro* cytotoxicity of PCL NPs in lung and breast cancer cells. The growth of cell lines A549, MCF-7, LL2 and E0771 was evaluated after exposure to a wide range (0.5–10 μM) of blank PCL NPs over a 48 h period. The results are expressed as %RP. The data represents the mean value ± S.D. of triplicate cultures.

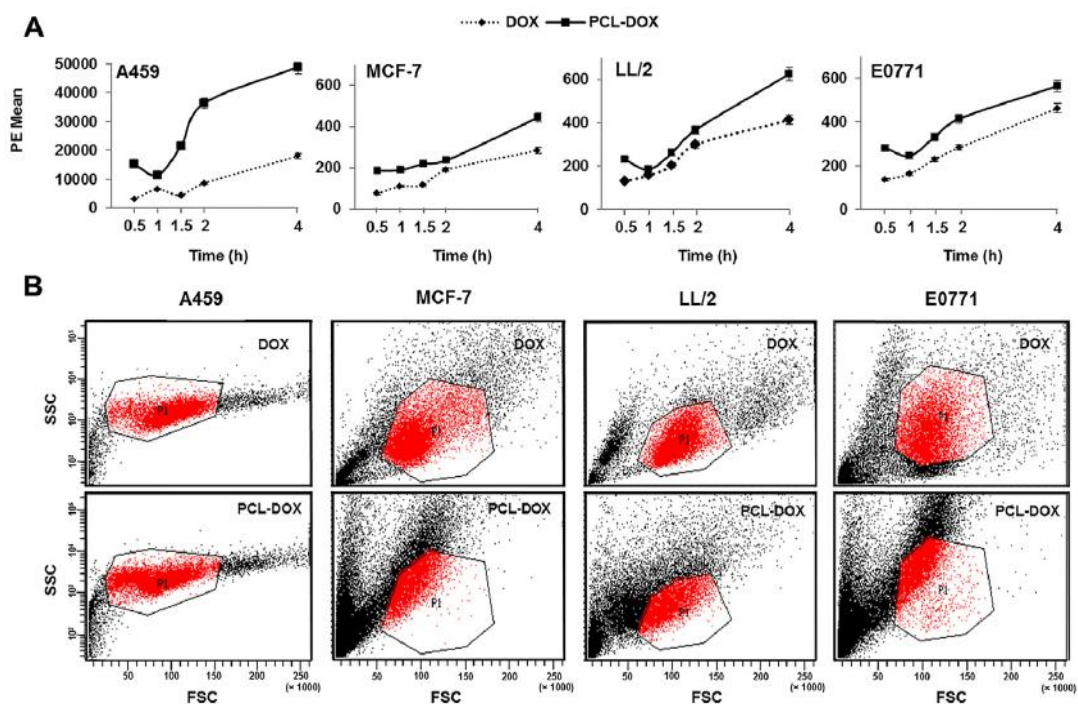


**Fig. 3.** *In vitro* cytotoxicity of DOX-loaded PCL NPs in lung and breast cancer cells. The growth of cell lines was evaluated after exposure to a wide range (0.01–5 μM) of DOX-loaded PCL NPs for 48 h, in comparison to free DOX treatment. The results are expressed as %IR. The data represents the mean value ± S.D. of triplicate cultures.



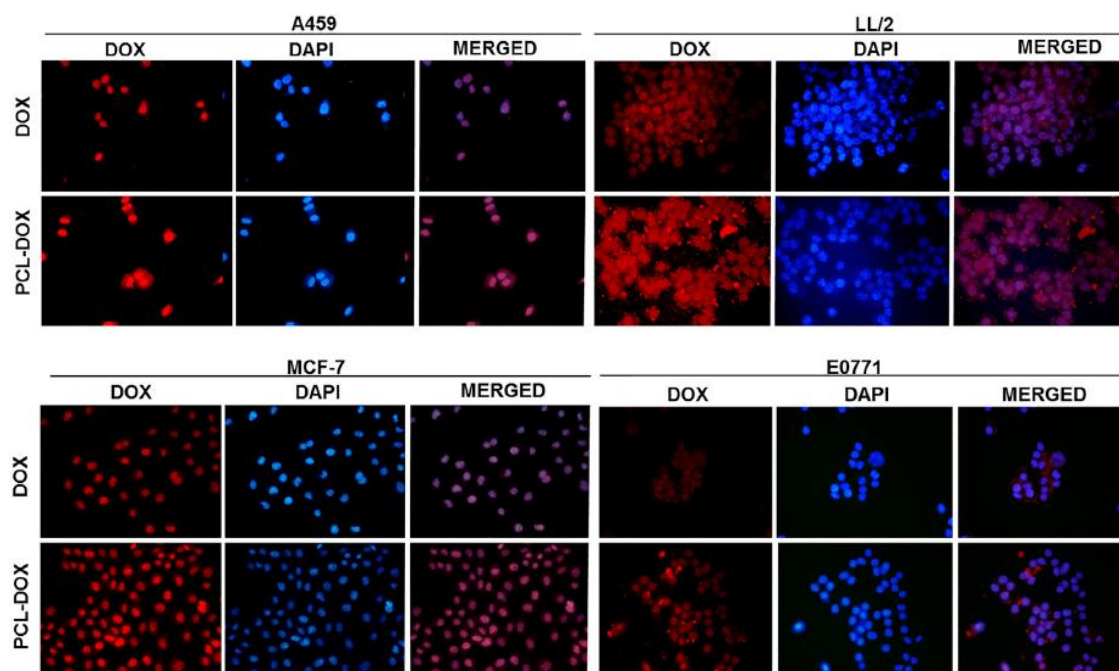
### 3.3. DOX-loaded PLC NPs cell internalization assays

Flow cytometry analysis showed that the time-dependent internalization of DOX significantly increased in all cell lines when the drug was loaded in PCL NPs in comparison to the free drug (Fig. 4). This increase was more evident from 2 h of exposure and was maintained until 4 h. At this time, the increase in drug internalization with DOX-loaded NPs was 63.2, 35.8, 18.1 and, 33.9% in the A549, MCF-7, E0771 and LL/2 cell lines, respectively compared to the free drug. These findings were supported by fluorescence microscopy analysis (Fig. 5) where the fluorescence intensity of all human and murine cells treated with DOX-loaded PCL NPs was significantly greater than those treated with free DOX. The intracellular location of the free DOX and drug-loaded NPs was similar (predominantly nuclear), although the presence of the drug in the cytoplasm also was detected after treatment with DOX-loaded PCL NPs.



**Fig. 4.** Uptake of DOX-loaded PCL NPs into lung and breast cancer cells. (A) Graphical representation of the presence of DOX-loaded PCL NPs and free DOX in lung and breast cancer cells after exposure (0.5, 1, 1.5, 2 and 4 h) at 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  drug concentration. (B) Representative image of flow cytometry analysis after exposure (4 h) to DOX-loaded PCL NPs and free DOX, in lung and breast cancer cells. The data represents the mean value  $\pm$  S.D. of triplicate analysis



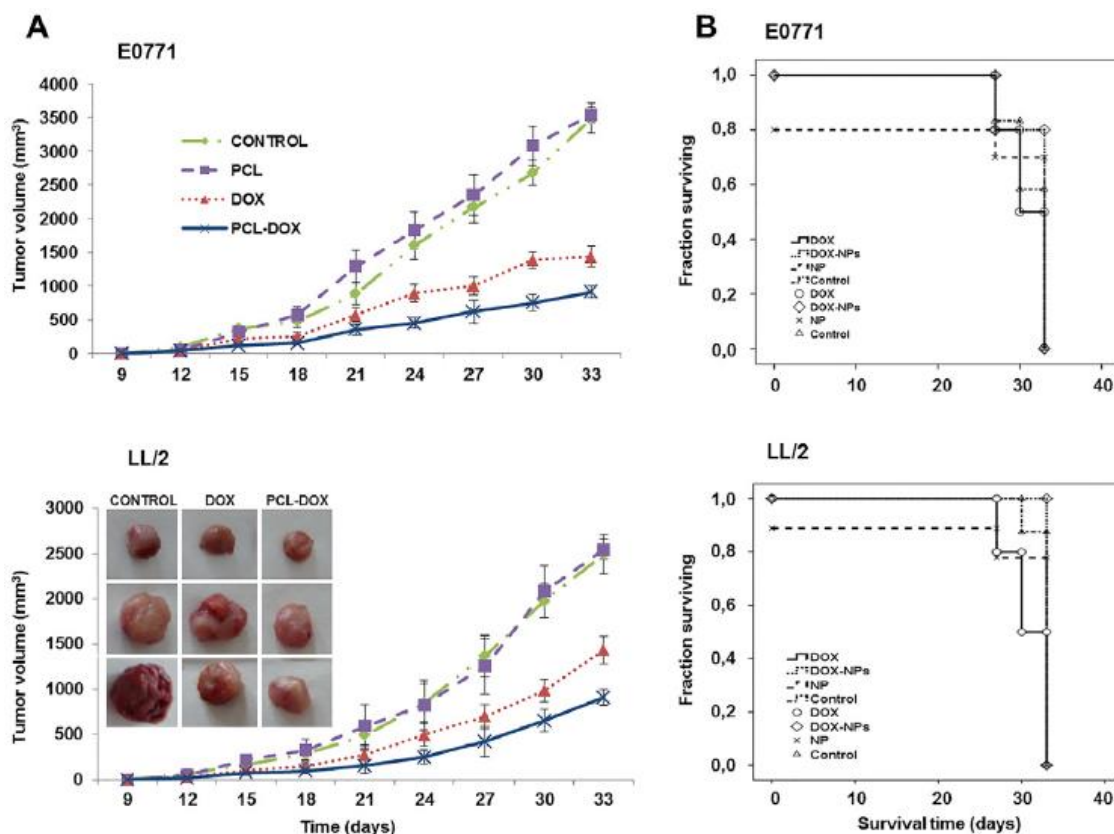


**Fig. 5.** Representative fluorescence images showing internalization of free DOX and DOX-loaded PCL NPs in lung and breast cancer cells after exposure to a concentration of 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 45 min. The columns show drug fluorescence images (DOX), cell nuclei stained with DAPI (DAPI), and merged images of the two previous columns (MERGED). Magnification 10 $\times$ .

### 3.4. DOX-loaded PLC NPs effect in breast and lung cancer xenografts

Fig. 6 shows the results obtained in the studies realized with the immunocompetent C57BL/6 mice bearing subcutaneous lung or breast tumors. No significant differences were found between the tumor volume of mice treated with blank PLC NPs and the negative control mice treated with saline solution in either mice tumor model. Conversely, mice treated with DOX-loaded PLC NPs showed a significantly higher decrease in tumor volume than that observed in mice treated with free DOX, in both mice tumor models ( $p < 0.05$ ). At the end point of the assay, the reduction in tumor volume in both breast and lung xenografts was similar ( $\approx 36\%$ ) (Fig. 6A). In addition, a significantly increased survival rate was detected in mice bearing lung tumors treated with DOX-PCL NPs compared with the free drug ( $p < 0.05$ ). However, these differences were not observed in mice with breast cancer (Fig. 6B). These results are reflected in the Kaplan-Meier curves, where the fraction surviving in mice bearing breast tumors is almost the same for DOX and DOX-

loaded PCL NP-treated mice (Fig. 6B). Finally, no significant differences in mice survival were found when performing the log-rank test between control and blank PCL treated mice in both tumor models.

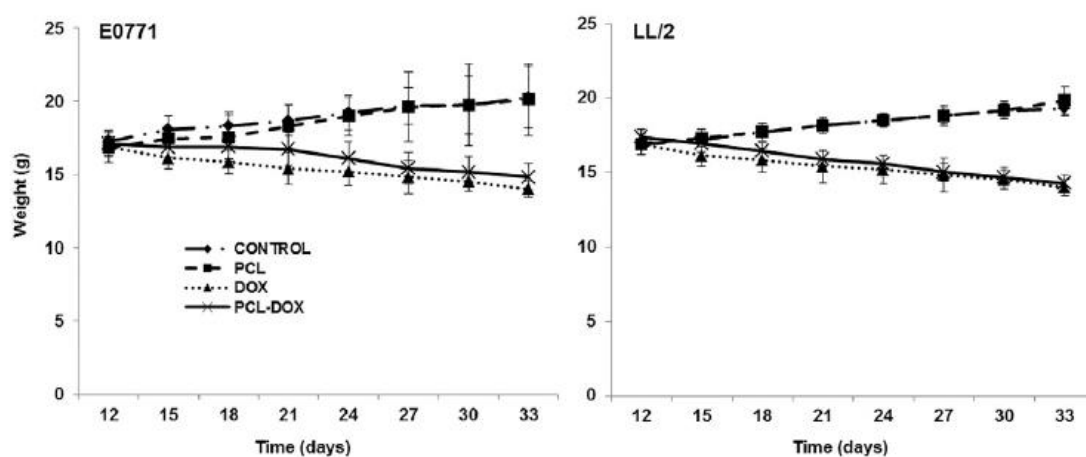


**Fig. 6.** Treatment of breast and lung cancer xenografts with DOX-loaded PCL NPs. (A) Graphical representation of the tumor volume progression (growth inhibition) after intravenous administration of DOX-loaded PCL NPs, free DOX and blank PCL NPs into C57BL/6 mice bearing subcutaneous tumors induced by the E0771 and LL/2 cell lines. Data are represented as the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 10$ ). Graphical representation of LL/2 including a representative image of the tumor volume progression after treatment. (B), Kaplan-Meier curves of mice survival rates after exposure to the same treatments. Data are represented as the mean value  $\pm$  S.D. ( $n = 10$ ). Comparison between treatment groups was performed with the log-rank test.

### 3.5. DOX-loaded PLC NPs *in vivo* toxicological study

Firstly, the weight of treated and non-treated mice was measured every three days throughout the 33 days of previous study to indicate any possible drug toxicity. As shown in Fig. 7, the negative control mice and PCL NP-treated mice showed a

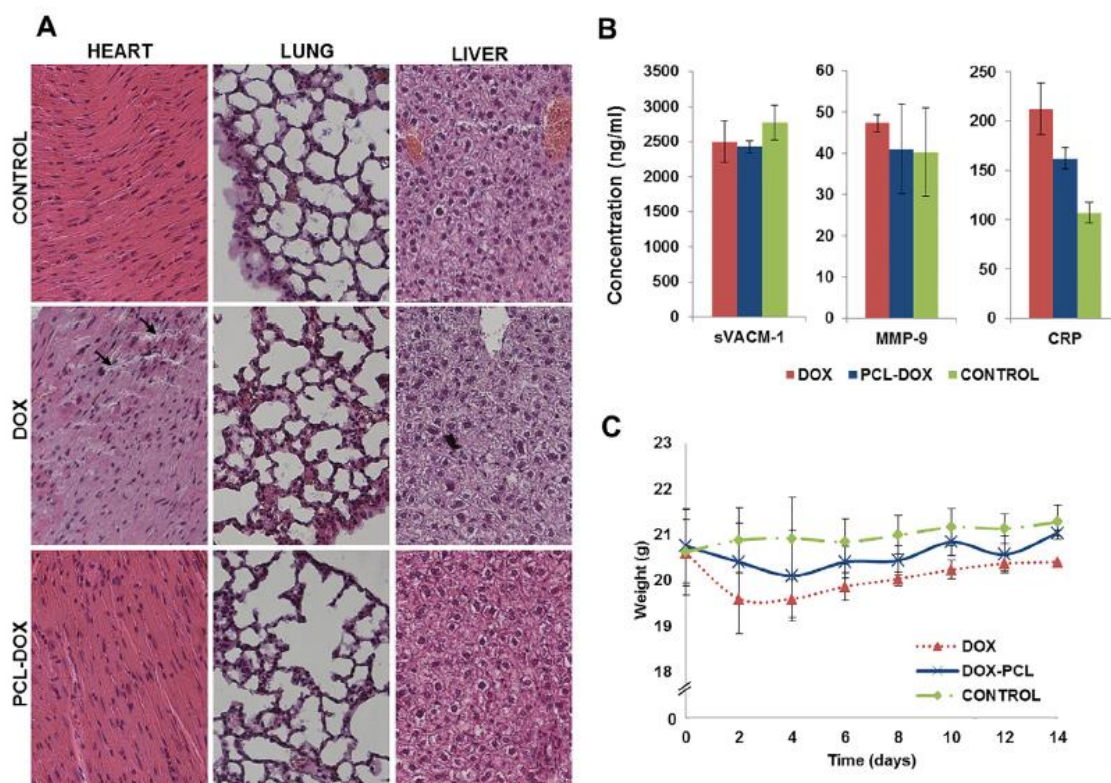
similar weight evolution indicating the biocompatibility and non-toxicity of the NPs. In addition, no significant differences were detected between mice treated with the free drug and drug-loaded NPs in either mice model.



**Fig. 7.** Body weight progression of mice with induced lung and breast tumors after DOX-loaded PCL NP treatment. Weight of mice treated with DOX-loaded PCL NPs, free DOX, and blank PCL NPs were measured until the final point of the experiment throughout a 33-day period. The data were represented as the mean value  $\pm$  S.D. (n=10).

Secondly, tissue and blood toxicity was evaluated. Histological analysis showed that the myocardial tissue of mice treated with free DOX showed some myofibrillar loss, a typical finding due to the cardiomyopathy induced by this drug. Interestingly, no myocardial alteration was observed in animals treated with DOX-loaded PCL NPs in comparison to the controls (Fig. 8A). Studies of other tissues (liver and lung) showed no relevant injuries, at least at this DOX concentration (Fig. 8A). In order to assess the possible myocardial injury, cardiovascular damage blood markers were analyzed. As shown in Fig. 8B, the blood level of CRP after free DOX treatment was significantly higher (49.7%) in comparison to the control ( $p < 0.05$ ). In contrast, no significant differences between DOX-loaded PCL NP-treated mice and untreated mice (control) were detected. Additionally, no significant differences were observed between groups, for the two others blood markers (MMP-9 and sVACM-1) quantified. Moreover, during the study of toxicity (14 days), no significant differences were found in the weight of mice treated with DOX-loaded PCL NPs and free DOX (Fig. 8C). The blank PCL NPs induced no

significant modifications in any of the tested tissues or blood markers, nor in weight of the mice (data not shown).



**Fig. 8.** *In vivo* DOX-loaded PCL NPs toxicity study in mice. C57BL/6 mice were treated with a single dose of free DOX and DOX-loaded PCL NPs (10 mg/kg). Untreated mice were the control group. (A) Tissue toxicity (heart, lung and liver) was analyzed using hematoxylin and eosin staining (Magnification 20 $\times$ ), revealing signs of cardiotoxicity (myofibrillar disruption) (arrows) when DOX was used. (B) Graphical representation of blood markers of cardiovascular damage showing elevated CRP levels when DOX was used. The data are represented as the mean value  $\pm$  S.D. (C) Body weight progression. The weight of mice was measured every two days from the day of drug inoculation until day 14. The data are represented as the mean value  $\pm$  S.D.

Finally, the blood analysis showed a significant decrease in the WBC value of the mice treated with free DOX. In contrast, the use of DOX loaded PCL NPs did not modify the WBC value compared with the blood used as a control. No statistically significant changes were detected in RBC or PLT values with the use of free DOX or DOX-loaded PCL NPs. A slight decrease in the MCV value was detected with the use of free DOX, DOX-loaded PCL NPs, and PCL NPs. In the



same way, slight modifications were observed in MHC, MPV and RDV with the use of these different treatments (Table 2).

**Table 2**

Analysis of blood parameters in mice treated with DOX, PCL-DOX and PCL NPs.

Blood parameters	CONTROL	DOX	PCL-DOX	PCL
WBC ( $10^3/\mu\text{L}$ )	6.38 $\pm$ 1.41	3.98 $\pm$ 0.44*	6.40 $\pm$ 1.71	4.49 $\pm$ 0.80
RBC ( $10^6/\mu\text{L}$ )	10.27 $\pm$ 0.47	9.28 $\pm$ 1.08	9.37 $\pm$ 0.62	8.16 $\pm$ 1.85
HGB (g/dL)	16.27 $\pm$ 0.80	15.03 $\pm$ 1.70	15.03 $\pm$ 1.03	13.26 $\pm$ 2.99
HCT (%)	47.75 $\pm$ 2.41	42.07 $\pm$ 4.99	42.67 $\pm$ 2.76	37.06 $\pm$ 8.58
RDW	14.08 $\pm$ 0.56	14.35 $\pm$ 0.32	14.85 $\pm$ 0.48*	14.69 $\pm$ 0.32
PLT ( $10^3/\mu\text{L}$ )	634.17 $\pm$ 80.76	817.33 $\pm$ 162.57	690.83 $\pm$ 57.86	615.5 $\pm$ 224.83
PCT (%)	0.37 $\pm$ 0.04	0.47 $\pm$ 0.10	0.41 $\pm$ 0.03	0.37 $\pm$ 0.13
PDW	21.13 $\pm$ 1.12	20.08 $\pm$ 3.21	22.42 $\pm$ 2.52	22.84 $\pm$ 3.16

WBC, white blood cells; RBC, total red blood cells; HGB, hemoglobin, HCT, hematocrit; RDW, red cell distribution width; PLT, total platelets; PCT, plateletcrit; PDW, platelet distribution width. The data represents the mean value  $\pm$  S.D. (n =8).

\*  $p < 0.05$  compared to control.

#### 4. Discussion

Breast and lung cancer are the two types of tumors with the highest incidence worldwide. Despite the advances in chemotherapy treatment, both types of tumors result in a large number of deaths (Ferlay et al., 2013). The main reason for the failure of current chemotherapy is related to its lack of specificity and the induction of high levels of toxicity that result in very debilitating side effects for patients. This fact makes it necessary to limit the drug dose that then is sometimes not enough to stop the progress of the disease (Blanco and Ferrari, 2014). Our study shows the beneficial properties of DOX-loaded PCL NPs in improving the antitumoral activity of the drug against breast and lung tumors. In particular, our NPs allowed a greater DOX encapsulation and a biphasic drug release, increased cellular internalization, and also achieved a clear decrease in the DOX IC<sub>50</sub> value *in vitro* and a decrease in tumor volume *in vivo*, supporting the potential of PCL NPs for anticancer agent delivery (Gou et al., 2011).

The synthesis of DOX-loaded PCL NPs was based on a modified nanoprecipitation solvent evaporation procedure (Cirpanli et al., 2011; Letchford et al., 2009) involving the use of a probe sonicator. This technique generated DOX-loaded NPs with an average size of <90 nm (Table 1), which could be sufficient to facilitate cellular uptake and hence produce a significant concentration of drug molecules within cancer cells (Decuzzi et al., 2009). The best preparation conditions were defined to be those assuring the greatest drug loading. DOX was assumed to be entrapped within the PCL matrix rather than just adsorbed onto the particle surface, given the similarities between the electrokinetics ( $\zeta$  values) of blank NPs and drug-loaded NPs (Table 1). The biphasic (and sustained) DOX release profile (depicted in Fig. 1) could be the consequence of an initial fast drug release (loss of poorly entrapped DOX molecules rapidly diffusing into PBS), followed by a slower second stage in which the drug fraction deeply embedded within the PCL structure underwent a longer diffusion path before release (Pohlmann et al., 2013).

*In vitro* results showed good biocompatibility of our PCL NPs in mouse and human tumor cell assays supporting previous data obtained in neuroblastoma (SH-SY5Y cells), prostate cancer (PC3, DU-145 and LNCaP cells), lung (A549 cells) and breast (MCF-7 cells) cancer, and even embryonic kidney cells (HEK-293) (Arunraj et al., 2013; Cheng et al., 2012; Guo et al., 2015; Li et al., 2013; Sanna et al., 2015). In addition, no PCL NPs showed toxicity when tested in the non-tumor cell line H9C2.

Interestingly, the use of PCL NPs to load DOX (DOX-loaded PCL NPs) produced a significant increase in the drug's antitumoral activity against all the cell lines tested compared to free DOX, reducing the DOX IC<sub>50</sub> value reducing the DOX IC<sub>50</sub> value between 2.3 and 2.75 fold for lung cancer and between 7.8 and 65 fold for breast cancer. By contrast, DOX-loaded PCL NPs did not increase DOX toxicity in the non-tumor cell line H9C2. Many authors have also reported an increment in the cytotoxic effects of several drugs in some cancers when carried by PCL NPs. In fact, celastrol-loaded PCL NPs increased drug activity by up to 40% against PC3 prostate carcinoma cells compared with free celastrol (Sanna et al., 2015), carboplatin was able to reduce IC<sub>50</sub> up to 3.06 times in the glioblastoma-

astrocytoma cell line U-87 MG when was carried by PCL NPs (Karanam et al., 2015) and some triblock copolymers that included PCL improved the anti-tumor activity of DOX in the B16F10 melanoma cells (Shi et al., 2014). Recently, Suksiriworapong et al. (2016) have showed a significant decrease in quercetin IC50 (up to 4.6) using quercetin-loaded copolymers of PCL-co-d- $\alpha$ -tocopheryl PEG 1000 succinate in the SK-BR-3 breast cancer cell line. Concretely, DOX-loaded PCL NPs improved the activity of DOX in lung and breast cancer in comparison to other nanoformulations. In fact, we showed a higher decrease in A-549 proliferation with PCL-DOX NPs than the one described by Arunraj et al. (2013) using DOX-loaded chitin-PCL composite nanogels. This NPs showed an IC50 1.6 fold higher than DOX, despite of their good cellular internalization. Mesoporous silica NPs loaded with DOX induced a smaller IC50 decrease than DOX-loaded PCL NPs in the same breast cancer cell line (MCF-7) (Gao et al., 2011). Furthermore, DOX-loaded PCL NPs induced higher cytotoxicity than calcium phosphate-reinforced polymer (Min et al., 2012) or Smac peptide-conjugated NPs (Li et al., 2015) in breast cancer cells. For example, the DOX IC50 decrease demonstrated by Li et al. (2015) in the MDA-MB-231 breast cancer cells (2.22 fold) was lower than the one induced by PCL-DOX NPs in MCF-7 and E0071 breast cancer cells (7.8 fold and 65 fold respectively). Recently, Eatemadi et al. (2016) also showed a DOX IC50 decrease using DOX-loaded PCL-polyethylene glycol NPs in both T47D (1.84 fold) and MCF7 (1.85 fold) breast cancer cell lines.

The transport of drugs, including DOX, towards the tumor cell may be facilitated by PCL NPs, resulting in increased antitumoral activity (Zheng et al., 2011). Karanam et al. (2015) showed a significant increase in the presence of the fluorochrome fluorescein isothiocyanate (FITC) in the U-87 MG cells when it was carried by PCL NPs (1 and 4 h of exposure). Fluorescence microscopy and FACScan analysis demonstrated that DOX-loaded PCL NPs penetrated efficiently into breast and lung cancer cells with a significant increase of drug uptake by the cell through time in comparison to free DOX. Recently, Suksiriworapong et al. (2016) showed that coumarin-6-loaded P (CL)-TPGS NPs were also able to increase NP cell uptake in SK-BR-3 cells through time (1, 2 and 4 h). The greater

antiproliferative effect of DOX-loaded NPs compared to free drug could be related to an increased cell uptake in tumor cells, due their endocytic pathway deregulation (Mellman and Yarden, 2013; Elkin et al., 2015). This fact could be the reason for the non-enhanced toxicity of DOX-loaded PCL NPs in the non-tumor H9C2 cells. Interestingly, although the intracellular localization of DOX (nucleus/cytoplasm) was similar after treatments with DOX-loaded NPs and free DOX, a greater presence of DOX in cytoplasm was detected with the use of the PCL NPs. These results support studies showing a higher cytoplasmic location of DOX when loaded in PCL NPs in comparison to free DOX, possibly due to the continuous release of DOX from the polymer (Cheng et al., 2012; Li et al., 2013). Other studies showed a cytoplasmic localization of the FITC-loaded copolymer using copolymers of PEG-PCL-polyethylenimine (PCIF) loaded with DOX and FITC in the 4T1 mouse breast cancer cell line while the intracellular location of DOX was predominantly nuclear (Guo et al., 2015). Recently, a preferential cytoplasmic localization around the nucleus was also observed with the use of coumarin-6-loaded PCL-PGS NPs (Suksiriworapong et al., 2016).

When DOX-loaded PCL NPs were administered to mice bearing subcutaneous tumors of breast and lung cancer, a significant volume reduction ( $\approx 36\%$ ) in both tumors was demonstrated in comparison to those treated with free DOX (Fig. 6A). This increased antitumoral activity of the drug was accompanied by a clear increase in the survival rate, but only in the case of mice bearing lung tumors. There are not many *in vivo* studies with similar PCL NPs, but Wang et al. (2013) showed more limited results using curcumin and DOX cotransported in the micelles of PEG-PCL NPs in C57BL/6 mice bearing subcutaneous tumors from the LL/2 cell line in comparison to the free drug. Similar tumor volume progression was observed with some DOX-loaded polymer-caged nanobins or DOX-loaded non-mineralized micelles in lung or breast cancer xenograft models induced with MDA-MB-231 cells (Lee et al., 2010; Min et al., 2012). Recently, lipidic nanoformulations, such as nanostructured lipid carriers and liposomes, also improved the DOX antitumor activity in a breast cancer *in vivo* model induced by the 4T1 cell line



(Fernandes et al., 2016). However, unlike DOX-loaded PCL NPs, none of these latter nanoformulations were assayed for cardiotoxicity or hematological toxicity.

In addition, PCL NPs may be improved by using magnetic nanoparticles, as recently shown by Tang et al. (2016) who obtained an increased DOX accumulation around the tumor tissues (murine hepatocarcinoma from the H22 cell line) using magnetic PCL-PEG micelles. Other drugs such as quercetin and genistein have shown improved *in vivo* antitumor activity thanks to the use of PCL NPs. Quercetin-loaded monomethoxy PEG-PCL and genistein-loaded TPGS-*b*-PCL NPs induced a greater reduction in the tumor volume of BALB/c mice bearing colon tumors from the CT26 and HeLa cell lines, respectively (Xu et al., 2015; Zhang et al., 2015). The treatment was well tolerated, not inducing major alterations in the weight of the mice.

Finally, the modulation of DOX toxicity through association with PCL NPs was analyzed in the mice. Administering a single dose of free DOX (10mg of DOX/kg body weight) induced some myocardium injury, supported by a significant increase in the CRP cardiovascular damage marker in serum. In addition, free DOX altered blood parameters in mice, inducing a significant decrease in the WBC value. Interestingly, the DOX-loaded PCL NP treatment neither modified the WBC value nor altered the tissue histology or cardiovascular damage blood markers (MMP-9, sVACM-1 and CRP) compared to the control mice. These blood markers are currently used to detect cardiovascular diseases (Chua et al., 2016; Ky et al., 2014; Okur et al., 2016) and it is known that they increase in blood when DOX is administered, particularly in the case of CRP (Ky et al., 2014). These results therefore suggest that DOX-loaded PCL NPs reduce the classical drug toxicity in myocardium, as well as blood toxicity. In fact, modulation of the DOX biodistribution caused by the use of a nanocarrier (PCL NP) may be correlated with changes in the accumulation of DOX in cardiac tissue (Chen et al., 2013, 2016; Tran et al., 2014; Xie et al., 2014). Neither free DOX nor DOX-loaded PCL NP treatments caused weight loss or other alterations in tissues, such as the lungs (pulmonary congestion) or liver (hepatocytes necrosis), probably due to the DOX dosage administered (Zhu et al., 2014). In this context, decreased DOX toxicity with

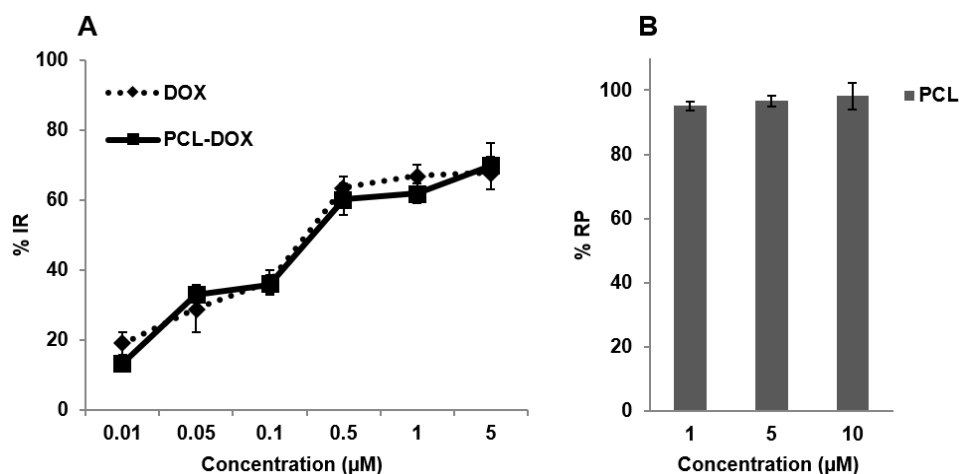
the use of PCL NPs as the carrier, has also been recently described by Sun et al. (2016), demonstrating less modulation of the WBC and MPV blood parameters in mice with melanoma with the use monomethoxy PEG-PCL DOX NPs in comparison to the free drug. Similar results were reported by Chen et al. (2016) when DOX and PTX-loaded PCL NPs were used to co-treat BALB/c nude mice bearing subcutaneous KBv tumors.

## 5. Conclusion

In conclusion, the *in vitro* analysis of DOX-loaded PCL NPs demonstrated a significant increase of DOX cytotoxicity in all lung and breast cancer cells tested, in comparison to free DOX, causing a decrease of up to 98% of the drug IC<sub>50</sub> (E0771 cell line). Biodegradable PCL nanocarriers showed good biocompatibility even at the highest concentrations. In addition, DOX-loaded PCL NPs increased drug internalization in both breast and lung tumor cells. An analysis of breast and lung cancer xenografts showed a greater reduction in tumor volume (up to 36%) when DOX-loaded PCL NPs were used in comparison to free DOX. Moreover, DOX-loaded PCL NPs were able to reduce DOX toxicity *in vivo* without causing myocardial injury or modulation of blood cell parameters. The results with the DOX-loaded PCL NP formulation suggest that it has significant potential for further translation into clinical applications.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2017.02.026>.

The following is the supplementary data related to this article.



**Fig. 1S.** *In vitro* cytotoxicity of non-tumor rat embryonic cardiomyocyte cell line H9C2 treated with DOX, PCL-DOX (A) and PCL NPs (B). The growth of the cell line was evaluated after exposure over a 48 h period to a wide range (0.01-10 µM) of the diverse treatments. The data represents the mean value  $\pm$  S.D. of triplicate cultures.

## Acknowledgements

Research leading to these results has received funding by the Consejería de Salud from Junta de Andalucía (Spain) through projects Project PI-0476-2016 and P11-CTS-7649 and by University of Granada project PP2015-13. The authors wish to express their gratitude to G. Ortiz Ferron (CIC, University of Granada, Spain) for his skillful assistance with cytometry experiments. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

## References

Angsutararux, P., Luanpitpong, S., Issaragrisil, S., 2015. Chemotherapy-induced cardiotoxicity: overview of the roles of oxidative stress. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2015:795602. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/795602>.

Arias, J.L., López-Viota, M., Sáez-Fernández, E., Ruiz, M.A., 2010. Formulation and physicochemical characterization of poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles loaded

with ftorafur and diclofenac sodium. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 75:204–208. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.08.032>.

Arunraj, T.R., Sanoj Rejinold, N., Ashwin Kumar, N., Jayakumar, R., 2013. Doxorubicin-chitin-poly(caprolactone) composite nanogel for drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* 62:35–43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.08.013>.

Blanco, E., Ferrari, M., 2014. Emerging nanotherapeutic strategies in breast cancer. *Breast (Edinb. Scotl.)* 23:10–18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.breast.2013.10.006>.

Chen, Y., Yang, W., Chang, B., Hu, H., Fang, X., Sha, X., 2013. In vivo distribution and antitumor activity of doxorubicin-loaded N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid coated mesoporous silica nanoparticles and safety evaluation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85:406–412. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.06.015>.

Chen, Y., Zhang, W., Huang, Y., Gao, F., Fang, X., 2016. In vivo biodistribution and antitumor efficacy evaluation of doxorubicin and paclitaxel-loaded pluronic micelles decorated with c(RGDyK) peptide. *PLoS One* 11, e0149952. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0149952>.

Cheng, Y., Hao, J., Lee, L.A., Biewer, M.C., Wang, Q., Stefan, M.C., 2012. Thermally controlled release of anticancer drug from self-assembled  $\gamma$ -substituted amphiphilic poly( $\epsilon$ -caprolactone) micellar nanoparticles. *Biomacromolecules* 13:2163–2173. <http://dx.doi.org/10.1021/bm300823y>.

Chua, S., Lee, F.-Y., Chiang, H.-J., Chen, K.-H., Lu, H.-I., Chen, Y.-T., Yang, C.-C., Lin, K.-C., Chen, Y.-L., Kao, G.-S., Chen, C.-H., Chang, H.-W., Yip, H.-K., 2016. The cardioprotective effect of melatonin and exendin-4 treatment in a rat model of cardiorenal syndrome. *J. Pineal Res.* 61:438–456. <http://dx.doi.org/10.1111/jpi.12357>.

Cirpanli, Y., Allard, E., Passirani, C., Bilensoy, E., Lemaire, L., Calış, S., Benoit, J.-P., 2011. Antitumoral activity of camptothecin-loaded nanoparticles in 9L rat glioma model. *Int. J. Pharm.* 403:201–206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.10.015>.

Dash, T.K., Konkimalla, V.B., 2012. Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: a review. *J. Control. Release* 158:15–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.064>.

Decuzzi, P., Pasqualini, R., Arap, W., Ferrari, M., 2009. Intravascular delivery of particulate systems: does geometry really matter? *Pharm. Res.* 26:235–243. <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-008-9697-x>.

Doroshov, J.H., 1983. Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Res.* 43, 460–472.

Eatemadi, A., Darabi, M., Afraidooni, L., Zarghami, N., Darace, H., Eskandari, L., Mellatyar, H., Akbarzadeh, A., 2016. Comparison, synthesis and evaluation of anticancer drug loaded polymeric nanoparticles on breast cancer cell lines. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 44:1008–1017. <http://dx.doi.org/10.3109/21691401.2015.100851>.

Elkin, S.R., Bendris, N., Reis, C.R., Zhou, Y., Xie, Y., Huffman, K.E., Minna, J.D., Schmid, S.L., 2015. A systematic analysis reveals heterogeneous changes in the endocytic activities of cancer cells. *Cancer Res.* 75:4640–4650. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472>.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F., 2013. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. International

Agency for Research on Cancer, Lyon, France <http://globocan.iarc.fr> (accessed on day/month/year accessed 11.11.15).

Fernandes, R.S., Silva, J.O., Monteiro, L.O., Leite, E.A., Cassali, G.D., Rubello, D., Cardoso, V.N., Ferreira, L.A., Oliveira, M.C., de Barros, A.L., 2016. Doxorubicin-loaded nanocarriers: a comparative study of liposome and nanostructured lipid carrier as alternatives for cancer therapy. *Biomed. Pharmacother.* 84:252–257. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.09.032>.

Gao, Y., Chen, Y., Ji, X., He, X., Yin, Q., Zhang, Z., Shi, J., Li, Y., 2011. Controlled intracellular release of doxorubicin in multidrug-resistant cancer cells by tuning the shell-pore sizes of mesoporous silica nanoparticles. *ACS Nano* 5:9788–9798. <http://dx.doi.org/10.1021/nn2033105>.

Gou, M., Zheng, X., Men, K., Zhang, J., Zheng, L., Wang, X., Luo, F., Zhao, Y., Zhao, X., Wei, Y., Qian, Z., 2009. Poly(epsilon-caprolactone)/poly(ethylene glycol)/poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles: preparation, characterization, and application in doxorubicin delivery. *J. Phys. Chem. B* 113:12928–12933. <http://dx.doi.org/10.1021/jp905781g>.

Gou, M., Wei, X., Men, K., Wang, B., Luo, F., Zhao, X., Wei, Y., Qian, Z., 2011. PCL/PEG copolymeric nanoparticles: potential nanoplatforms for anticancer agent delivery. *Curr. Drug Targets* 12, 1131–1150.

Govender, J., Loos, B., Marais, E., Engelbrecht, A.-M., 2014. Mitochondrial catastrophe during doxorubicin-induced cardiotoxicity: a review of the protective role of melatonin. *J. Pineal Res.* 57:367–380. <http://dx.doi.org/10.1111/jpi.12176>.

Guo, Q., Kuang, L., Cao, H., Li, W., Wei, J., 2015. Self-assembled mPEG-PCL-g-PEI micelles for multifunctional nanoprobe of doxorubicin delivery and magnetic

resonance imaging and optical imaging. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 136:687–693. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.10.013>.

Hira, S.K., Mishra, A.K., Ray, B., Manna, P.P., 2014. Targeted delivery of doxorubicin-loaded poly ( $\epsilon$ -caprolactone)-*b*-poly (N-vinylpyrrolidone) micelles enhances antitumor effect in lymphoma. *PLoS One* 9, e94309. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0094309>.

Karanam, V., Marslin, G., Krishnamoorthy, B., Chellan, V., Siram, K., Natarajan, T., Bhaskar, B., Franklin, G., 2015. Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles of carboplatin: preparation, characterization and in vitro cytotoxicity evaluation in U-87 MG cell lines. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 130:48–52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.04.005>.

Kumar, A., Lale, S.V., Mahajan, S., Choudhary, V., Koul, V., 2015. ROP and ATRP fabricated dual targeted redox sensitive polymersomes based on pPEGMA-PCL-ss-PCL-pPEGMA triblock copolymers for breast cancer therapeutics. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7: 9211–9227. <http://dx.doi.org/10.1021/acsami.5b01731>.

Ky, B., Putt, M., Sawaya, H., French, B., Januzzi, J.L., Sebag, I.A., Plana, J.C., Cohen, V., Banchs, J., Carver, J.R., Wiegers, S.E., Martin, R.P., Picard, M.H., Gerszten, R.E., Halpern, E.F., Passeri, J., Kuter, I., Scherrer-Crosbie, M., 2014. Early increases in multiple biomarkers predict subsequent cardiotoxicity in patients with breast cancer treated with doxorubicin, taxanes, and trastuzumab. *J. Am. Coll. Cardiol.* 63:809–816. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2013.10.061>.

Lee, S.M., Ahn, R.W., Chen, F., Fought, A.J., O'Halloran, T.V., Cryns, V.L., Nguyen, S.T., 2010. Biological evaluation of pH-responsive polymer-caged nanobins for breast cancer therapy. *ACS Nano* 4:4971–4978. <http://dx.doi.org/10.1021/nn100560p>.

Lee, R.-S., Li, Y.-C., Wang, S.-W., 2015. Synthesis and characterization of amphiphilic photocleavable polymers based on dextran and substituted- $\epsilon$ -caprolactone. *Carbohydr. Polym.* 117:201–210. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.062>.

Letchford, K., Liggins, R., Wasan, K.M., Burt, H., 2009. In vitro human plasma distribution of nanoparticulate paclitaxel is dependent on the physicochemical properties of poly(ethylene glycol)-block-poly(caprolactone) nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71:196–206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.08.003>.

Li, B., Wang, Q., Wang, X., Wang, C., Jiang, X., 2013. Preparation, drug release and cellular uptake of doxorubicin-loaded dextran-*b*-poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* 93:430–437. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.12.051>.

Li, M., Liu, P., Gao, G., Deng, J., Pan, Z., Wu, X., Xie, G., Yue, C., Cho, C.H., Ma, Y., Cai, L., 2015. Smac therapeutic peptide nanoparticles inducing apoptosis of cancer cells for combination chemotherapy with doxorubicin. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7:8005–8012. <http://dx.doi.org/10.1021/acsami.5b00329>.

Liu, Q., Li, R.-T., Qian, H.-Q., Yang, M., Zhu, Z.-S., Wu, W., Qian, X.-P., Yu, L.-X., Jiang, X.-Q., Liu, B.-R., 2012. Gelatinase-stimuli strategy enhances the tumor delivery and therapeutic efficacy of docetaxel-loaded poly(ethylene glycol)-poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* 7:281–295. <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S26697>.

Marslin, G., Sarmiento, B.F.C.C., Franklin, G., Martins, J.A.R., Silva, C.J.R., Gomes, A.F.C., Sárria, M.P., Coutinho, O.M.F.P., Dias, A.C.P., 2016. Curcumin encapsulated into methoxy poly(ethylene glycol) poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles increases cellular uptake and neuroprotective effect in glioma cells. *Planta Med.* <http://dx.doi.org/10.1055/s-0042-112030>.



Melguizo, C., Cabeza, L., Prados, J., Ortiz, R., Caba, O., Rama, A.R., Delgado, Á.V., Arias, J.L., 2015. Enhanced antitumoral activity of doxorubicin against lung cancer cells using biodegradable poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles. *Drug Des. Devel. Ther.* 9:6433–6444. <http://dx.doi.org/10.2147/DDDT.S92273>.

Mellman, I., Yarden, Y., 2013. Endocytosis and cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5:a016949. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a016949>.

Min, K.H., Lee, H.J., Kim, K., Kwon, I.C., Jeong, S.Y., Lee, S.C., 2012. The tumor accumulation and therapeutic efficacy of doxorubicin carried in calcium phosphate-reinforced polymer nanoparticles. *Biomaterials* 33:5788–5797. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.04.057>.

Okur, A., Karadeniz, C., Özhan Oktar, S., Pınarlı, F.G., Aral, A., Oğuz, A., 2016. Assessment of brachial artery reactivity, carotid intima-media thickness, and adhesion molecules in pediatric solid tumor patients treated with anthracyclines. *Pediatr. Hematol. Oncol.* 33:178–185. <http://dx.doi.org/10.3109/08880018.2016.1146375>.

Ortiz, R., Cabeza, L., Arias, J.L., Melguizo, C., Álvarez, P.J., Vélez, C., Clares, B., Áranega, A., Prados, J., 2015. Poly(butylcyanoacrylate) and poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles loaded with 5-fluorouracil increase the cytotoxic effect of the drug in experimental colon cancer. *AAPS J.* 17:918–929. <http://dx.doi.org/10.1208/s12248-015-9761-5>.

Pohlmann, A.R., Fonseca, F.N., Paese, K., Detoni, C.B., Coradini, K., Beck, R.C., Guterres, S.S., 2013. Poly( $\epsilon$ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 10:623–638. <http://dx.doi.org/10.1517/17425247.2013.769956>.

Sanna, V., Chamcheu, J.C., Pala, N., Mukhtar, H., Sechi, M., Siddiqui, I.A., 2015. Nanoencapsulation of natural triterpenoid celastrol for prostate cancer treatment. *Int. J. Nanomedicine* 10:6835–6846. <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S93752>.

Shi, S., Shi, K., Tan, L., Qu, Y., Shen, G., Chu, B., Zhang, S., Su, X., Li, X., Wei, Y., Qian, Z., 2014. The use of cationic MPEG-PCL-g-PEI micelles for co-delivery of Msurvivin T34A gene and doxorubicin. *Biomaterials* 35:4536–4547. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.02.010>.

Suksiriworapong, J., Phoca, K., Ngamsom, S., Sripha, K., Moongkarndi, P., Junyaprasert, V.B., 2016. Comparison of poly( $\epsilon$ -caprolactone) chain lengths of poly( $\epsilon$ -caprolactone)-*co-d*- $\alpha$ -tocopheryl-poly(ethylene glycol) 1000 succinate nanoparticles for enhancement of quercetin delivery to SKBR3 breast cancer cells. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 101:15–24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.01.008>.

Sun, C., Zhou, L., Gou, M., Shi, S., Li, T., Lang, J., 2016. Improved antitumor activity and reduced myocardial toxicity of doxorubicin encapsulated in MPEG-PCL nanoparticles. *Oncol. Rep.* 35:3600–3606. <http://dx.doi.org/10.3892/or.2016.4748>.

Tacar, O., Sriamornsak, P., Dass, C.R., 2013. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J. Pharm. Pharmacol.* 65:157–170. <http://dx.doi.org/10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x>.

Tang, Z., Zhang, L., Wang, Y., Li, D., Zhong, Z., Zhou, S., 2016. Redox-responsive star-shaped magnetic micelles with active-targeted and magnetic-guided functions for cancer therapy. *Acta Biomater.* 42:232–246. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2016.06.038>.

Tran, T.-H., Nguyen, C.T., Gonzalez-Fajardo, L., Hargrove, D., Song, D., Deshmukh, P., Mahajan, L., Ndaya, D., Lai, L., Kasi, R.M., Lu, X., 2014. Long circulating self-assembled nanoparticles from cholesterol-containing brush-like

block copolymers for improved drug delivery to tumors. *Biomacromolecules* 15:4363–4375. <http://dx.doi.org/10.1021/bm5013822>.

Vejpongsa, P., Yeh, E.T.H., 2014. Topoisomerase 2 $\beta$ : a promising molecular target for primary prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Clin. Pharmacol. Ther.* 95:45–52. <http://dx.doi.org/10.1038/clpt.2013.201>.

Wang, B.-L., Shen, Y., Zhang, Q., Li, Y., Luo, M., Liu, Z., Li, Y., Qian, Z., Gao, X., Shi, H., 2013. Codelivery of curcumin and doxorubicin by MPEG-PCL results in improved efficacy of systemically administered chemotherapy in mice with lung cancer. *Int. J. Nanomedicine* 8:3521–3531. <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S45250>.

Wei, X., Gong, C., Gou, M., Fu, S., Guo, Q., Shi, S., Luo, F., Guo, G., Qiu, L., Qian, Z., 2009. Biodegradable poly(epsilon-caprolactone)-poly(ethylene glycol) copolymers as drug delivery system. *Int. J. Pharm.* 381:1–18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.07.033>.

Weiss, R.B., 1992. The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Semin. Oncol.* 19, 670–686.

Xie, M., Xu, Y., Shen, H., Shen, S., Ge, Y., Xie, J., 2014. Negative-charge-functionalized mesoporous silica nanoparticles as drug vehicles targeting hepatocellular carcinoma. *Int. J. Pharm.* 474:223–231. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.08.027>.

Xu, G., Shi, H., Ren, L., Gou, H., Gong, D., Gao, X., Huang, N., 2015. Enhancing the anti-colon cancer activity of quercetin by self-assembled micelles. *Int. J. Nanomedicine* 10:2051–2063. <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S75550>.

Zhang, J., Men, K., Gu, Y., Wang, X., Gou, M., Guo, G., Luo, F., Qian, Z., 2011. Preparation of core cross-linked PCL-PEG-PCL micelles for doxorubicin delivery in vitro. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 11, 5054–5061.

Zhang, H., Liu, G., Zeng, X., Wu, Y., Yang, C., Mei, L., Wang, Z., Huang, L., 2015. Fabrication of genistein-loaded biodegradable TPGS-*b*-PCL nanoparticles for improved therapeutic effects in cervical cancer cells. *Int. J. Nanomedicine* 10:2461–2473. <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S78988>.

Zheng, L., Gou, M., Zhou, S., Yi, T., Zhong, Q., Li, Z., He, X., Chen, X., Zhou, L., Wei, Y., Qian, Z., Zhao, X., 2011. Antitumor activity of monomethoxy poly(ethylene glycol)-poly ( $\epsilon$ -caprolactone) micelle-encapsulated doxorubicin against mouse melanoma. *Oncol. Rep.* 25:1557–1564. <http://dx.doi.org/10.3892/or.2011.1243>.

Zhu, Q., Jia, L., Gao, Z., Wang, C., Jiang, H., Zhang, J., Dong, L., 2014. A tumor environment responsive doxorubicin-loaded nanoparticle for targeted cancer therapy. *Mol. Pharm.* 11:3269–3278. <http://dx.doi.org/10.1021/mp4007776>.

Zhu, Y., Sun, Y., Chen, Y., Liu, W., Jiang, J., Guan, W., Zhang, Z., Duan, Y., 2015. In vivo molecular MRI imaging of prostate cancer by targeting PSMA with polypeptide-labeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 16:9573–9587. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms16059573>.

## 3.2. Capítulo 2. Vehiculización de 5-fluorouracilo

### Artículo 4

#### **Poly(butylcyanoacrylate) and Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Nanoparticles Loaded with 5-Fluorouracil Increase the Cytotoxic Effect of the Drug in Experimental Colon Cancer**

Raúl Ortiz,<sup>1,2</sup> Laura Cabeza,<sup>2</sup> José L. Arias,<sup>2,3,4</sup> Consolación Melguizo,<sup>2,4</sup> Pablo J. Álvarez,<sup>4</sup> Celia Vélez,<sup>2,4</sup> Beatriz Clares,<sup>3</sup> Antonia Áranega,<sup>2,4</sup> and Jose Prados<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> *Department of Health Science, University of Jaén, 23071, Jaén, Spain.*

<sup>2</sup> *Institute of Biopathology and Regenerative Medicine (IBIMER), Department of Anatomy and Embryology, University of Granada, Avda. Conocimiento s/n, 18100, Granada, Spain.*

<sup>3</sup> *Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology,  
University of Granada, 18071, Granada, Spain.*

<sup>4</sup> *Biosanitary Institute of Granada (ibs. GRANADA),  
SAS-Universidad de Granada, Granada, Spain.*

*Raúl Ortiz and Laura Cabeza contributed equally to this work.*

#### **Publicado en:**

AAPS J. 2015 Jul; 17(4): 918-929.

Doi: 10.1208/s12248-015-9761-5

**Abstract**

The clinical use of 5-fluorouracil, one of the drugs of choice in colon cancer therapy, is limited by a nonuniform oral absorption, a short plasma half-life, and by the development of drug resistances by malignant cells. We hypothesized that the formulation of biodegradable nanocarriers for the efficient delivery of this antitumor drug may improve its therapeutic effect against advanced or recurrent colon cancer. Hence, we have engineered two 5-fluorouracil-loaded nanoparticulate systems based on the biodegradable polymers poly(butylcyanoacrylate) and poly( $\epsilon$ -caprolactone). Drug incorporation to the nanosystems was accomplished by entrapment (encapsulation/dispersion) within the polymeric network during nanoparticle synthesis, *i.e.*, by anionic polymerization of the monomer and interfacial polymer disposition, respectively. Main factors determining 5-fluorouracil incorporation within the polymeric nanomatrices were investigated. These nanocarriers were characterized by high drug entrapment efficiencies and sustained drug-release profiles. *In vitro* studies using human and murine colon cancer cell lines demonstrated that both types of nanocarriers significantly increased the antiproliferative effect of the encapsulated drug. In addition, both nanoformulations produced *in vivo* an intense tumor growth inhibition and increased the mice survival rate, being the greater tumor volume reduction obtained when using the poly( $\epsilon$ -caprolactone)-based formulation. These results suggest that these nanocarriers may improve the antitumor activity of 5-fluorouracil and could be used against advanced or recurrent colon cancer.

**Key words**

5-fluorouracil; colon cancer; poly(butylcyanoacrylate); poly( $\epsilon$ -caprolactone); polymeric nanoparticles.

## Introduction

Colon cancer is one of the three most frequently diagnosed cancers (1). This severe disease has an excellent prognosis if it is diagnosed at an early stage. However, 25% of colon cancer patients develop metastasis, thus requiring chemotherapy which is frequently based on 5-fluorouracil (5-FU), a first line antitumor molecule (2). Unfortunately, patients in an advanced stage usually have a poor response to chemotherapy with a 5-year survival rate of 10% (3).

5-FU can also be found in combined chemotherapy schedules, *e.g.*, associated to irinotecan (a combination of irinotecan with 5-FU and folinic acid (FOLFIRI)), oxiplatin (a combination of oxaliplatin, 5-FU, and folinic acid (FOLFOX)), or to new drug molecules, *e.g.*, epidermal growth factor receptor inhibitors and angiogenesis inhibitors. However, rapid metabolism, low accumulation into tumor tissues, systemic toxicity, and the development of resistances by malignant cells are frequently implicated in drug therapy failure (4–6). Thus, new therapeutic strategies are needed to overcome these limitations and to improve current colon cancer therapies.

In the context of cancer treatment, the use of nanoparticles (NPs; preferably <100 nm) as drug delivery systems can provide significant advantages over the use of free drug molecules. In fact, nanoparticulate systems can radically affect drug biodistribution, therefore increasing drug concentration and specificity toward malignant tissues. Additionally, NPs can prolong the plasma half-life of cytotoxic drugs while keeping to a (very) minimum the associated drug toxicity (7). Interestingly, these nanosystems have been further described to overcome drug resistances developed by tumor cells, thereby significantly increasing the drug accumulation within these cells (8). Furthermore, tumor-selective drug targeting can be possible by formulating nanocarriers appropriately surface functionalized with targeting molecules (9).

In the specific case of colon cancer, many types of polymeric NPs have been proposed to optimize drug therapy (10). Amongst them, poly(butylcyanoacrylate) (PBCA) and poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) NPs may be of significant interest given

their biodegradable and biocompatible character, coupled with their capacity to extend the plasma half-life of drug molecules while reducing their unspecific cytotoxicity (7,11,12). For instance, PCL NPs have been satisfactorily loaded with different drug molecules, *e.g.*, gemcitabine (13), doxorubicin (14), and ftorafur (15). Recently, 5-FU-loaded PCL NPs have been engineered as injectable anticancer implants (16), intraperitoneally administered against peritoneal carcinomatosis (17), and associated with suicide gene therapy against colon cancer (18). Regarding PBCA NPs, they have been loaded with curcumin (19), paclitaxel (20,21), and gemcitabine (22) for the efficient treatment of different types of cancer. In this line, poly(alkylcyanoacrylate) NPs adequately surface functionalized have been described to bypass the blood–brain barrier, thus demonstrating significant potential for the delivery of antitumor agent against brain malignancies (23–25). Furthermore, poly(alkylcyanoacrylates) can overcome drug resistances developed by cancer cells (26). Unfortunately, neither PCL nor PBCA nanoparticulate systems have been properly analyzed as potential tools in drug delivery against colon cancer.

In this study, we report the synthesis and characterization of two 5-FU-loaded biodegradable NPs based on PBCA and PCL and synthesized by anionic polymerization of the monomer and interfacial polymer disposition methodologies, respectively. Four colon cancer cell lines and a normal colon cell line were used to investigate the *in vitro* antiproliferative activity of both types of 5-FU-loaded NPs in comparison with the free drug. In addition, *in vivo* tumor growth inhibition, survival, and toxicity were evaluated in immunocompetent C57BL/6 mice.

## Materials and methods

### Materials

All chemicals were of analytical quality from Sigma-Aldrich Chemical Co. (Spain). Butylcyanoacrylate is a generous gift from Henkel Loctite (Ireland).



***Synthesis of 5-Fluorouracil Nanocarriers Based on Poly(butylcyanoacrylate) and Poly( $\epsilon$ -caprolactone)***

PBCA NPs were formulated by emulsion polymerization of the butylcyanoacrylate monomer in an aqueous solution (22). Briefly, 1 mL of an acetone solution of the monomer (10%, w/v) was added drop-wise, under mechanical stirring (10,000 rpm), to 10 mL of an aqueous solution containing  $10^{-4}$  N HNO<sub>3</sub> and the stabilizing agent dextran-70 (0.5%, w/v). After 6 h, polymerization was terminated by neutralization of the aqueous medium with sufficient amount of a KOH 0.1 M aqueous solution.

PCL NPs were synthesized by interfacial polymer disposition (18,27). In a few words, 5 mL of a dichloromethane solution of the polymer (2%, w/v) were incorporated drop-wise, under mechanical stirring (10,000 rpm), to 25 mL of an aqueous solution containing dextran-70 (0.5%, w/v). Mechanical stirring was continued for 3 h to assure the complete precipitation of the polymeric particles.

5-FU entrapment into PBCA and PCL NPs was based on the previously described preparation methodologies with the following additional steps: (i) preparing the aqueous medium with increasing concentrations of the anticancer drug (up to 0.01 M), and then adding drop-wise the organic solution of the monomer (or polymer in the case of PCL); or, alternatively, (ii) preparing the aqueous medium, followed by the drop-wise incorporation of an organic solution of the monomer (or polymer in the case of PCL) containing adequate quantities of 5-FU (up to 0.01 M). Both procedures aimed to optimize the drug-loading efficacy to the NPs; concretely, the influence of including 5-FU molecules in the organic phase (in direct contact with the polymer PCL or the monomer butylcyanoacrylate) or in the aqueous media was analyzed. The aim of this study was to clarify whether the inclusion of the active agent in the phase where the polymer/monomer is dissolved will minimize drug escape to the aqueous media, thus maximizing the drug-loading efficiencies. In fact, it is expected that drug incorporation into this organic phase will maximize the contact between the polymer PCL (or butylcyanoacrylate monomer) and the active agent, thus making possible greater 5-FU-loading (and

entrapment) efficiencies. Solvents used in this study were the ones employed in the best NP preparation conditions (acetone to dissolve the butylcyanoacrylate monomer and dichloromethane to dissolve PCL). 5-FU was found to be freely soluble in acetone (43 mg/mL) and in dichloromethane (52 mg/mL).

The influence of the concentration of stabilizing agent and monomer (or polymer in the case of PCL) on 5-FU entrapment was also investigated. To that aim, the amount of monomer (or polymer in the case of PCL) added to the organic (or aqueous) solution was varied from 0.1 to 1 g, and the concentration of stabilizing agent in the aqueous phase was varied between 0% and 3% (w/v). The production performance (yield, %) of all the formulation conditions was determined:

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{mass of nanoparticles loaded with drug (mg)}}{\text{mass of materials used in the synthesis of the nanoparticles (mg)}} \times 100 \quad (1)$$

Finally, in all cases, the final step of the preparation procedure involved the complete evaporation of the organic solvent (acetone in the case of PBCA or dichloromethane in the case of PCL) by using a BuchiRotavapor® rotary evaporator (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) (working at a prefixed temperature of 37°C) to obtain the whitish aqueous NP dispersion. The colloid was then subjected to a cleaning process involving subsequent cycles of centrifugation (25 min at 11,000 rpm; Centrikon T-124 high-speed centrifuge, Kontron, France) and re-dispersion in water, until the conductivity of the supernatant was <10 µS/cm.

The nanoformulations were prepared under aseptic conditions in a sterile laminar flow hood, and attention was paid to avoid the contamination of the samples by external environment during manufacture and prior to injection into animals. In brief, a direct path was maintained between the filter and the area inside the hood where the nanosystems were prepared. Waste and other items never entered the hood. Hands and arms were washed before compounding or re-entering the hood and were kept within the cleaned area of the hood. Spraying or squirting solutions onto the high efficiency particulate air (HEPA) filter was avoided. Outer pouches and wraps were removed at the edge of the work area. Before and after

preparing the nanoformulations, the work surface of the hood was thoroughly cleaned with alcohol.

### **Characterization Methods**

Mean particle diameter ( $\pm$ standard deviation) was determined in triplicate at  $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$  by photon correlation spectroscopy (PCS; Malvern Autosizer<sup>®</sup> 4700, Malvern Instruments Ltd., UK). The scattering angle was set at  $60^\circ$ , and the measurement was made after suitable dilution of the aqueous NP dispersions ( $\approx 0.1\%$ , w/v) with an aqueous solution containing dextran-70 (0.5%, w/v). The stability of the nanoformulations was evaluated by measuring both the size and 5-FU loading values after 3 months of storage at  $4.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$  in water.

In order to corroborate the size measurements, dilute aqueous NP dispersions ( $\approx 0.1\%$ , w/v) were observed by high-resolution transmission electron microscopy (HRTEM; set at 80 kV accelerating voltage; Stem Philips CM20 High-Resolution Transmission Electron Microscope, The Netherlands). Prior to observation, the dispersions were sonicated during 3 min, and drops were placed on copper grids with formvar film. The grids were then dried at  $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$  in a convection oven.

Ultraviolet (UV) absorbance measurements (8500 UV-vis Dinko Spectrophotometer, Dinko, Spain) were carried out in triplicate at the maximum absorbance wavelength (266 nm) to determine the 5-FU concentration in all the nanoformulations. To that aim, quartz cells of 1 cm path length were used. A good linearity between UV absorbance values and drug concentration up to 0.4 mM was observed. The molar absorbance coefficient ( $7300 \pm 100 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) used in these measurements was calculated from the leastsquare fitting of the data obtained in an UV absorbance/5-FU concentration calibration curve. The anticancer drug was found to be stable in pH 7.4 phosphate-buffered saline (PBS), and the validity of the molar absorption coefficient at 266 nm was verified by UV absorbance determinations at this pH.

Prior to the quantification of the amount of 5-FU loaded to (or released from) the polymeric NPs, the UV spectrophotometric method of analysis was validated and verified. Concretely, the method was validated by comparing the evaluation of drug concentration in two instances: a certain drug amount was dissolved in supernatants of NP syntheses (carried out in absence of 5-FU), and the same amount was dissolved in equal amounts of water. It was found that the drug concentrations estimated (in the first case from the difference between the absorbance of the drug plus supernatant solution and that of the supernatant) were identical to within the experimental uncertainty. These tests were done in sextuplicate and demonstrated the accuracy, precision, and linearity of the method and the absence of molecular interactions. In addition, the experimental uncertainty of the UV absorbance measurements was <5%.

Finally, the electrokinetic characteristics of both blank (drug-unloaded) and drug-loaded NPs were determined by electrophoresis measurements in water ( $\approx 0.1\%$  (w/v) NP concentration) at  $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$  (Malvern Zetasizer<sup>®</sup> 2000 Electrophoresis Device, Malvern Instruments Ltd., UK). These determinations were done after 24 h of contact of NPs in water (at pH 6 and 1 mM  $\text{KNO}_3$ ) under mechanical stirring (50 rpm) at this temperature. The experimental uncertainty of the measurements was <5%. The theory of O'Brien and White (28) was used to convert the electrophoretic mobility ( $u_e$ ) into zeta potential ( $\zeta$ ) values. Such electrokinetic characterization was expected to confirm the type of 5-FU loading (adsorption onto the particle surface or entrapment into the matrix).

### ***5-Fluorouracil Loading Studies***

Measurement of the amount of drug loaded to the NPs was done in triplicate by UV spectrophotometric determinations of the 5-FU remaining in the aqueous solution (being obtained upon filtration of the nanoparticulate dispersion through a membrane filter; pore size, 0.1  $\mu\text{m}$ ) which was deduced from the total amount of drug in the aqueous NP dispersion. 5-FU incorporation to the NPs was expressed in terms of drug entrapment efficiency (%) and drug loading (%):

$$\text{Drug entrapment efficiency (\%)} = \frac{\text{mass of drug incorporated in the NP matrix (mg)}}{\text{mass of drug used in the experiment (mg)}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Drug loading (\%)} = \frac{\text{mass of drug incorporated in the NP matrix (mg)}}{\text{mass obtained of NPs loaded with drug (mg)}} \times \quad (3)$$

For the method to be accurate, we considered the contribution to the absorbance of sources other than variations in 5-FU concentration (*e.g.*, the surfactant agent dextran-70), by subtracting the absorbance of the supernatant produced in the same conditions but without the anticancer drug.

### ***5-Fluorouracil In Vitro Release Studies***

5-FU release experiments were performed in triplicate following the dialysis bag method and using polymeric NPs with the greater drug-loading values, *i.e.*,  $\approx 9.6\%$  for PBCA NPs (Table I), and  $\approx 26.8\%$  for PCL NPs (Table II). These are the nanoformulations that were investigated *in vitro* and *in vivo*. The release medium was PBS (pH=7.4 $\pm$ 0.1) at 37.0 $\pm$ 0.5°C. Briefly, the bags were soaked in water at 25.0 $\pm$ 0.5°C during 10 h before use. The dialysis bag with a cut-off of 2000 Da (Spectrum® Spectra/Por® 6 Dialysis Membrane Tubing, USA) retained the NPs but permitted the free 5-FU to diffuse into the receiving phase (PBS, pH 7.4). Practically, 3 mL of 5-FU-loaded PBCA (or PCL) NP dispersion (containing 3 mg/mL of anticancer drug) were poured into the dialysis bag with the two ends fixed by clamps. The bag was then placed in a conical flask filled with 100 mL of the receiving phase and were stirred at 200 rpm. At different time intervals (0.5, 1, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 96, and 120 h), 2 mL samples of the medium were withdrawn for UV spectrophotometric analysis at 266 nm. An equal volume of the release medium, maintained at the same temperature, was added after sampling to ensure the sink conditions.

**Table I.** Effect of the Formulation Conditions (5-FU, Butylcyanoacrylate Monomer, and Dextran-70 Concentrations) for Drug Absorption on Particle Size, 5-FU Entrapment Efficiency (%), 5-FU Loading (%), and Zeta Potential ( $\zeta$ , mV) Values of the Blank (5-FU Unloaded) PBCA NPs and the 5-FU-Loaded PBCA NPs Synthesized After Drug Dissolution in the Organic Phase

5-FU (M)	Butylcyanoacrylate (% w/v)	Dextran-70 (% w/v)	Size (nm)	5-FU entrapment efficiency (%)	5-FU loading (%)	$\zeta$ (mV)
0	10	0.5	75±10	–	–	–25±4
10 <sup>-4</sup>	10	0.5	66±13 ( <i>75±10</i> )	43.5±4.2 ( <i>36.3±2.1</i> )	0.057±0.005 ( <i>0.047±0.003</i> )	–28±2 ( <i>–26±3</i> )
10 <sup>-3</sup>	10	0.5	87±10 ( <i>77±13</i> )	64.9±3.6 ( <i>52.7±2.2</i> )	0.84±0.05 ( <i>0.69±0.03</i> )	–25±5 ( <i>–24±2</i> )
10 <sup>-2</sup>	10	0.5	81±11 ( <i>78±15</i> )	73.8±3.4 ( <i>59.3±3.6</i> )	9.59±0.44 ( <i>7.71±0.47</i> )	–26±3 ( <i>–23±4</i> )
10 <sup>-2</sup>	10	0	Macroaggregates	3.1±1.3 ( <i>2.6±1.2</i> )	0.41±0.17 ( <i>0.34±0.16</i> )	–27±2 ( <i>–25±3</i> )
10 <sup>-2</sup>	10	1	74±15 ( <i>69±11</i> )	72.2±1.9 ( <i>58.7±4.8</i> )	9.39±0.25 ( <i>7.64±0.62</i> )	–29±6 ( <i>–27±4</i> )
10 <sup>-2</sup>	10	2	64±12 ( <i>84±13</i> )	75.4±3.9 ( <i>60.1±2.7</i> )	9.81±0.51 ( <i>7.82±0.35</i> )	–25±1 ( <i>–23±5</i> )
10 <sup>-2</sup>	10	3	68±10 ( <i>73±12</i> )	69.9±4.6 ( <i>56.7±5.1</i> )	9.09±0.59 ( <i>7.38±0.66</i> )	–26±2 ( <i>–27±1</i> )
10 <sup>-2</sup>	50	0.5	84±11 ( <i>76±10</i> )	71.4±2.8 ( <i>58.2±3.3</i> )	1.86±0.07 ( <i>1.51±0.08</i> )	–24±3 ( <i>–26±4</i> )
10 <sup>-2</sup>	100	0.5	82±13 ( <i>72±14</i> )	73.2±2.9 ( <i>59.8±4.6</i> )	0.95±0.04 ( <i>0.78±0.06</i> )	–28±3 ( <i>–25±2</i> )

Size, entrapment efficiency, and drug-loading values of 5-FU-loaded PBCA NPs obtained after drug dissolution in the aqueous media are set in italics

**Table II.** Effect of the Formulation Conditions (5-FU, PCL, and Dextran-70 Concentrations) for Drug Absorption on Particle Size, 5-FU Entrapment Efficiency (%), 5-FU Loading (%), and Zeta Potential ( $\zeta$ , mV) Values of the Blank (5-FU Unloaded) PCL NPs and the 5-FU-Loaded PCL NPs Synthesized After Drug Dissolution in the Organic Phase

5-FU (M)	PCL (% w/v)	Dextran-70 (% w/v)	Size (nm)	5-FU entrapment efficiency (%)	5-FU loading (%)	$\zeta$ (mV)
0	2	0.5	70±15	–	–	–17±2
10 <sup>-4</sup>	2	0.5	76±12 ( <i>77±15</i> )	55.2±4.6 ( <i>41.4±3.9</i> )	0.18±0.02 ( <i>0.14±0.01</i> )	–14±3 ( <i>–15±2</i> )
10 <sup>-3</sup>	2	0.5	67±14 ( <i>70±12</i> )	74.6±3.1 ( <i>59.2±3.4</i> )	2.43±0.11 ( <i>1.92±0.11</i> )	–14±4 ( <i>–16±3</i> )
10 <sup>-2</sup>	2	0.5	79±16 ( <i>65±15</i> )	82.4±4.2 ( <i>66.5±3.3</i> )	26.8±1.4 ( <i>21.6±1.1</i> )	–13±2 ( <i>–17±2</i> )
10 <sup>-2</sup>	2	0	Macroaggregates	3.7±1.2 ( <i>2.3±1.6</i> )	1.21±0.39 ( <i>0.75±0.52</i> )	–15±3 ( <i>–14±4</i> )
10 <sup>-2</sup>	2	1	73±12 ( <i>81±14</i> )	84.2±3.9 ( <i>67.2±2.8</i> )	27.4±1.3 ( <i>21.8±0.9</i> )	–12±3 ( <i>–12±2</i> )
10 <sup>-2</sup>	2	2	64±17 ( <i>84±12</i> )	80.3±3.2 ( <i>64.6±3.1</i> )	26.1±1.1 ( <i>21.1±1.1</i> )	–15±4 ( <i>–14±2</i> )
10 <sup>-2</sup>	2	3	74±19 ( <i>71±16</i> )	78.2±2.6 ( <i>61.3±4.2</i> )	25.4±0.8 ( <i>19.9±1.4</i> )	–16±3 ( <i>–15±3</i> )
10 <sup>-2</sup>	10	0.5	70±10 ( <i>68±13</i> )	81.6±3.7 ( <i>65.2±3.2</i> )	5.31±0.24 ( <i>4.24±0.21</i> )	–13±2 ( <i>–12±3</i> )
10 <sup>-2</sup>	20	0.5	75±15 ( <i>72±17</i> )	85.1±4.1 ( <i>69.4±2.8</i> )	2.77±0.13 ( <i>2.26±0.09</i> )	–15±1 ( <i>–16±2</i> )

Size, entrapment efficiency, and drug-loading values of 5-FU-loaded PCL NPs obtained after drug dissolution in the aqueous media are set in italics

### **Cell Culture**

Human colon cancer HT-29, T-84, and HCT-15 cell lines and the normal human colon CCD-18 cell line were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, USA). The mice colon cancer MC-38 cell line was kindly provided by Dr. J. Scholl (Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The cell lines were maintained in culture at 37°C (in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator) in a Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% heatinactivated fetal bovine serum (FBS) (Lonza, Walkersville, MD, USA) and 1% of an antibiotics mixture of penicillin (10,000 U/mL) and streptomycin (10 mg/mL).

### **Proliferation Studies**

Cells were seeded in 24-well plates ( $8 \times 10^3$  cells/well for T-84 and MC-38, and  $10 \times 10^3$  cells/well for HT-29, HCT-15, and CCD-18) in 300  $\mu$ L of supplemented DMEM. After 24 h, treatments with 5-FU-loaded PBCA NPs and 5-FU-loaded PCL NPs were administered at concentrations ranging from 0.01 to 20  $\mu$ M, depending on the cell line. Treatments with 5-FU, blank PBCA NPs, and blank PCL NPs under the same conditions were used as controls. Untreated cells were used as negative control. Cells were maintained in culture during 72 h, fixed with 300  $\mu$ L of trichloroacetic acid (TCA; 10%) for 20 min at 4°C, and stained with 300  $\mu$ L of sulforhodamine B (SRB; 0.4%) during 20 min. After three washes with acetic acid (1%), the dye was re-suspended in 10 mM and pH 10.5 Trizma<sup>®</sup>, and a colorimetric assay was performed at 492 nm (Titertekmultiscan Colorimeter, Flow, Irvine, CA, USA). The percentage of relative proliferation (RP; %) was calculated as follows:

$$RP (\%) = \frac{\text{absorbance of the sample}}{\text{absorbance of the negative control}} \times 100 \quad (4)$$



The percentage of relative inhibition (RI; % which was used to determine the half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>, value of the different treatments) was also calculated:

$$RI (\%) = 100 - RP (\%) \quad (5)$$

We make a nonlinear regression to determine the IC<sub>50</sub> value with the software GraphPad Prism v.6.01.

### ***In Vivo Study***

Immunocompetent C57BL/6 female mice (body weight, 25–30 g; Scientific Instrumentation Centre, University of Granada, Spain) were maintained in a laminar airflow cabinet located in a room maintained at 37.0±0.5°C and 40–70% of relative humidity, with a 12-h light/dark cycle, and under specific pathogen-free conditions. Work with animals was accomplished in accordance with institutional (Biomedical Investigation Ethic Committee, Virgen de las Nieves Hospital, Granada, Spain) and international standards (European Communities Council directive 86/609). Pilot experiments were previously conducted to determine the number of malignant cells for subcutaneous injection. Sixty mice were then inoculated by subcutaneous injection in the right hind flank with 5×10<sup>5</sup> MC-38 murine colon cancer cells per mouse dispersed in 200 µL of PBS. This colon adenocarcinoma cell line was obtained from C57BL/6 mice, and therefore it can be used to induce subcutaneous tumors in the same immunocompetent mice strain. When tumors grew to 40–60 mm<sup>3</sup>, mice were randomly divided into six groups (n=10) corresponding to the treatments with free 5-FU solution, blank PBCA NPs, blank PCL NPs, 5-FU-loaded PBCA NPs, and 5-FU-loaded PCL NPs. A group of untreated mice with subcutaneous tumor was used as negative control. 5-FU doses of 10 mg/kg of body mass were administered in all of the formulations containing the chemotherapy agent. Each mouse was intravenously injected



every 3 days, up to a total number of five administrations. At the same time, body mass of mice (to define the toxicity of the treatments) and mice deaths (survival analysis) were recorded, and tumor volumes ( $V$ ;  $\text{mm}^3$ ) were measured by using a digital caliper (29): measuring the largest diameter  $a$  of the tumor mass and the second largest diameter  $b$  perpendicular to  $a$ . The tumor volume was then calculated:

$$V (\text{mm}^3) = \frac{a \cdot b^2 \cdot \pi}{6} \quad (6)$$

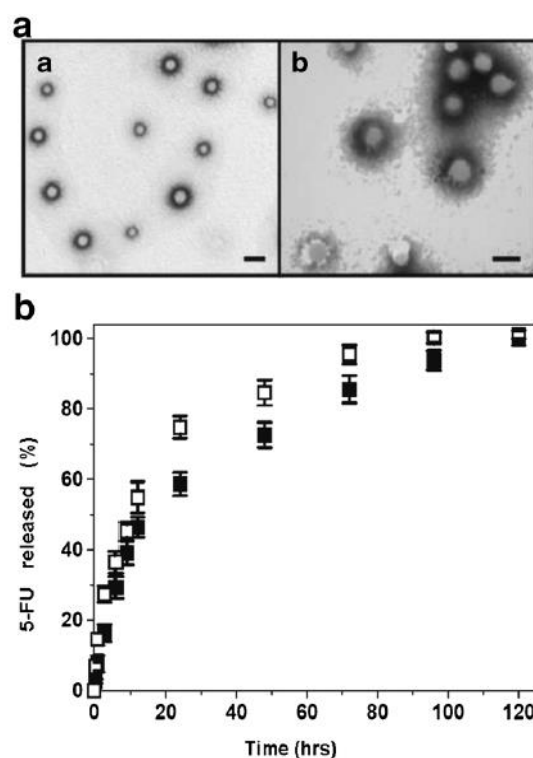
### **Statistical Analysis**

All the results were represented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Logarithmic regressions were used to determine the  $\text{IC}_{50}$  values (GraphPad Prism version 6.01, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Statistical analysis was performed by using the Student's  $t$  test (SPSS v.15, SPSS, Chicago, USA). The probability of mice survival was determined by the Kaplan–Meier method, and the logrank test was used to compare the fraction of the surviving mice between groups ( $\alpha=0.05$ ). Data with  $p < 0.05$  and  $p < 0.001$  were considered as significant and highly significant, respectively.

### **Results**

Particle Size, Surface Electrical Charge, and Stability PBCA NPs formulated by emulsion polymerization were characterized by a spherical shape and an average diameter under 100 nm (Table I; Fig. 1a). Similar results were obtained when PCL NPs were synthesized following an interfacial polymer disposition methodology (Table II; Fig. 1a). The surface electrical charge of PBCA NPs and PCL NPs was found to be negative in water (Tables I and II). This behavior can be associated to the degree of dissociation of the free acrylic groups (included in the chemical structure of the particles) under the experimental conditions (at pH 6 and 1 mM  $\text{KNO}_3$ ) (15,30). Neither particle

size nor the quality of the polymeric suspensions varied considerably when different drug quantities were loaded onto either type of polymeric particles (Tables I and II). Neither 5-FU precipitation and/or release, presence of bulky sediments/aggregates, particle aggregation, nor appreciable change in particle diameter and electrical surface charge were detected after 3 months of storage in water at  $4.0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ . Consequently, if the nanoformulations were not directly used after preparation, they were kept under these storage conditions until use.



**Fig. 1.** 5-Fluorouracil-loaded NPs. a High-resolution transmission electron micrograph of PBCA (a) and PCL (b) NPs. Bar lengths, 100 nm. b Release of entrapped 5-FU from PBCA NPs (open squares) and PCL NPs (filled squares) as a function of the incubation time in PBS (pH  $7.4\pm 0.1$ ) at  $37.0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ . Data represents the mean value $\pm$ SD of quadruplicate experiences

### ***5-Fluorouracil Entrapment into Poly(butylcyanoacrylate) and Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) Nanoparticles***

We began the investigation by analyzing the influence of the initial phase (aqueous or organic) in which 5-FU was dissolved on drug entrapment by the

NPs. In aqueous media, butylcyanoacrylate polymerizes and PCL precipitates, whereas in the organic phase both the butylcyanoacrylate monomer and PCL dissolve (see “MATERIALS AND METHODS”). Tables I and II show the amount of drug entrapped by PBCA and PCL NPs, respectively, as a function of the 5-FU concentration. Independent of the type of polymeric particle, both the 5-FU entrapment efficiency (%) and 5-FU-loading values (%) were significantly greater when the anticancer drug was added to the organic phase, whatever the initially fixed 5-FU concentration. For instance, in the case of PBCA NPs, when the initial drug concentration was 0.01 M these parameters rose from  $\approx 59.3\%$  and  $\approx 7.7\%$  (when 5-FU was dissolved to the aqueous media) to  $\approx 73.8\%$  and  $\approx 9.6\%$  (when 5-FU was incorporated within the organic phase), respectively. With respect to PCL NPs, when the initial drug concentration was 0.01 M, these parameters rose from  $\approx 66.5\%$  and  $\approx 21.6\%$  (when 5-FU was added to the aqueous media) to  $\approx 82.4\%$  and  $\approx 26.8\%$  (when 5-FU was dissolved in the organic phase), respectively. Such behavior is most likely a consequence of the difficulty experienced by 5-FU molecules in escaping from the polymeric matrices after they have been in deep contact with the butylcyanoacrylate monomer/ $\epsilon$ -caprolactone polymer. In addition, 5-FU loading to the NPs may be electrostatically favored: electrostatic attractive forces may exist between the positively charged drug molecules (generated by the protonation of the  $-\text{NH}$  group of the chemical structure) and the negatively charged NPs. Finally, the 5-FU concentration positively influenced the efficiency of drug entrapment into both types of polymeric NPs.

Regarding the influence of the surfactant on 5-FU entrapment by the polymeric NPs (Tables I and II), it was observed that the use of dextran-70 (within the concentration range tested) ensured the formation of homogeneous distributions of both 5-FU-loaded PBCA NPs and 5-FU-loaded PCL NPs, with reduced size and highly uniform, but without significantly influencing the drug entrapment efficiency and drug-loading values. Conversely, 5-FU entrapment was clearly lower in the absence of dextran-70. In fact, yields (%) of 5-FU-loaded PBCA NPs and 5-FU-loaded PCL NPs production were always  $>90\%$

in all the formulations prepared with dextran-70 but decreased to  $\leq 6\%$  in the absence of this surfactant. Similarly, butylcyanoacrylate monomer/ $\epsilon$ -caprolactone polymer concentrations did not significantly influence the entrapment of 5-FU within the corresponding NPs (Tables I and II).

Finally, results from the electrophoretic characterization of the NPs clearly highlighted the great similarity between the  $\zeta$  values of blank PBCA (and PCL) NPs and 5-FU-loaded PBCA (and PCL) NPs (Tables I and II): from an electrokinetic point of view, blank and drug-loaded NPs were indistinguishable. Therefore, and given the extreme sensitivity of electrophoresis to minute changes in the surface of nanosystems, this technique was satisfactorily utilized to estimate the type of drug incorporation to the NPs (drug surface adsorption vs. drug entrapment within the NP matrix). Given the fact that the  $\zeta$  values of the NPs did not change upon 5-FU incorporation, it could be assumed that the molecules of chemotherapy agent were very efficiently entrapped within both types of polymeric nanomatrices.

Antiproliferative and *in vivo* tumor growth inhibition studies were performed using the NPs with the greatest 5-FU entrapment efficiencies, *i.e.*,  $\approx 73.8\%$  for PBCA NPs (Table I) and  $\approx 82.4\%$  for PCL NPs (Table II).

### ***5-Fluorouracil Release from Poly(butylcyanoacrylate) and Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Nanoparticles***

5-FU release at pH7.4 from PBCA (and PCL) NPs showed a biphasic process, typical of these polymers (18,30–33). Such a sustained drug-release profile was characterized by an initial rapid (burst) 5-FU release phase (up to  $\approx 27\%$  and  $\approx 16\%$  in from PBCA NPs and PCL NPs in 3 h, respectively), with the remaining 5-FU molecules being released in a more sustained manner (over a period of 93 and 117 h from PBCA NPs and PCL NPs, respectively) (Fig. 1b). Consequently, it may be concluded that the majority of the drug molecules were entrapped within the polymeric network rather than adsorbed onto the particle surface.

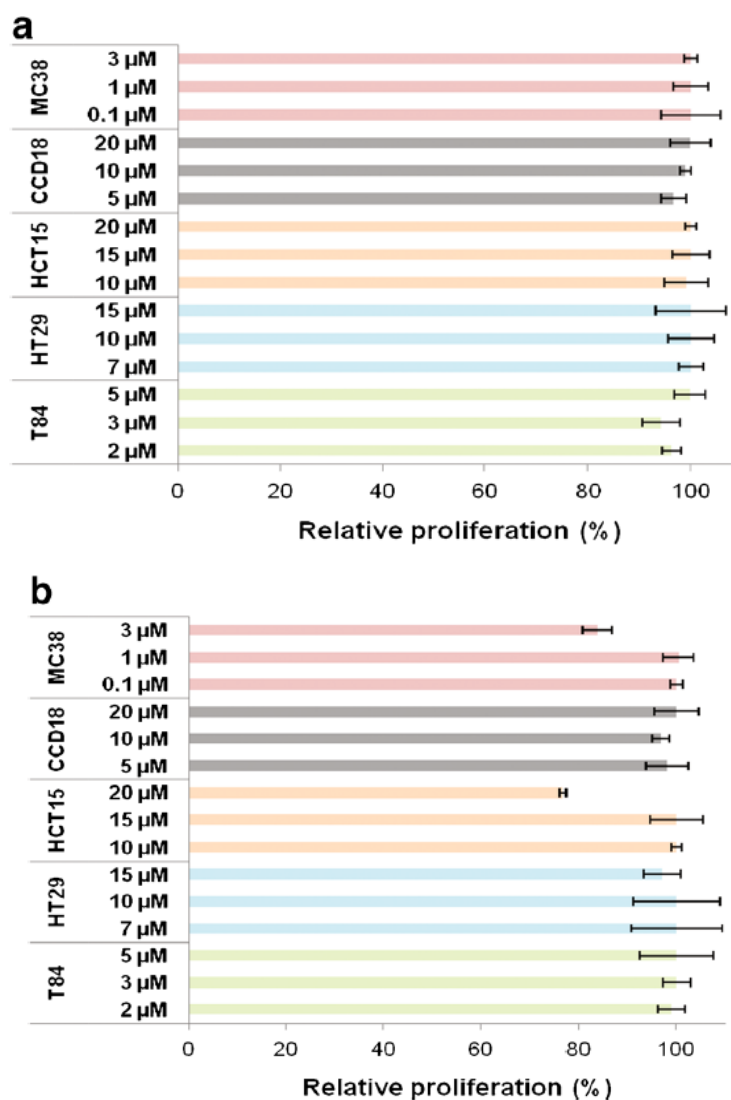
### ***In Vitro Cytotoxicity of Poly(butylcyanoacrylate) and Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Nanoparticles***

Before carrying out the *in vitro* tests on antitumor activity, the toxicity of blank PBCA NPs and blank PCL NPs was investigated *in vitro*. Both PBCA and PCL NPs proved to be nontoxic in T-84, HT-29, and CCD-18 cell lines at the different drug equivalent concentrations tested (Fig. 2). Only PCL NPs showed some toxicity at the greatest concentration in the MC-38 (3  $\mu$ M) and HCT-15 (20  $\mu$ M) cell lines, resulting in reductions of 16.3% and 23.2% in the relative proliferation values, respectively ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2). Therefore, it can be assumed that both polymeric nanosystems present an adequate biocompatibility and safety for drug delivery purposes.

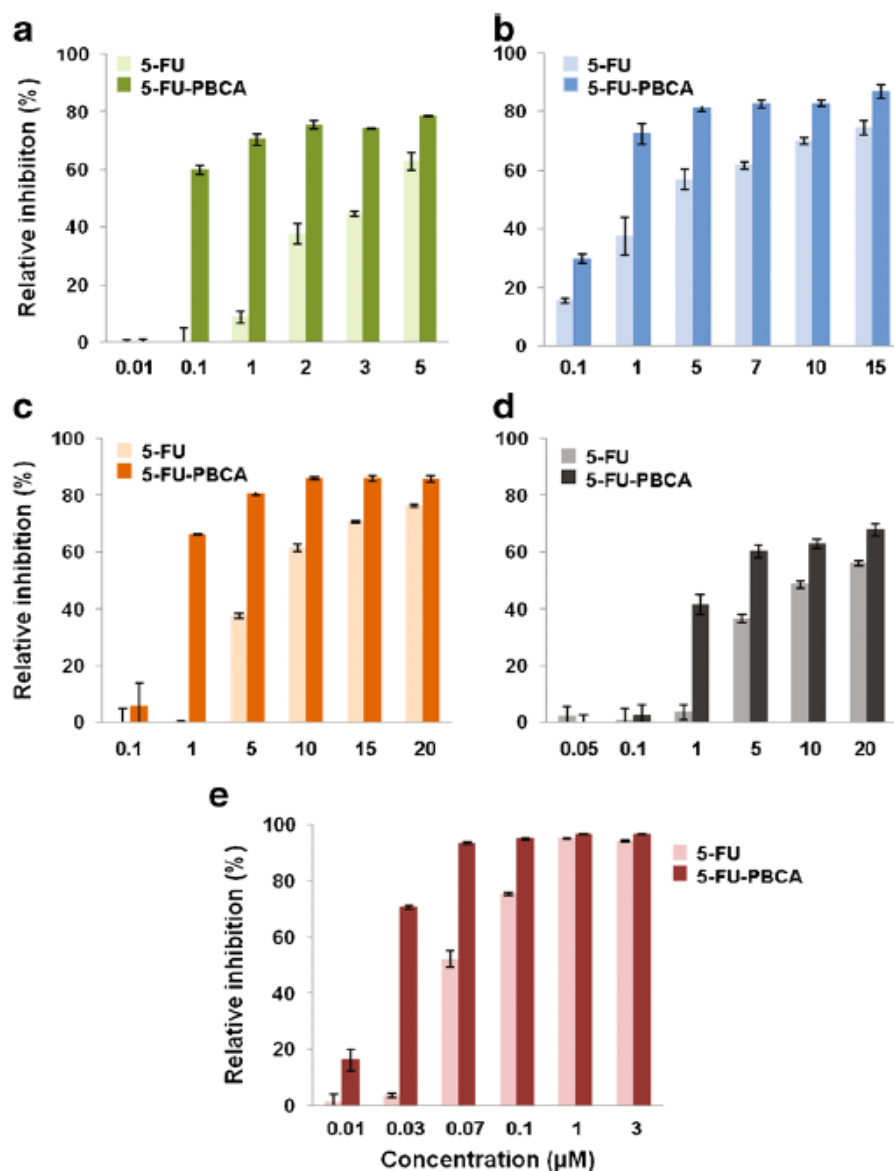
### ***Antiproliferative Effect of Poly(butylcyanoacrylate) and Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Nanoparticles Loaded with 5-Fluorouracil***

Figures 3 and 4, respectively, demonstrate that both 5-FU-loaded PBCA NPs and 5-FU-loaded PCL NPs can improve significantly the antiproliferative effect of the drug in comparison with free 5-FU. The  $IC_{50}$  values of free 5-FU in T-84, HT-29, HCT-15, and CCD-18 were found to be 3.60, 3.58, 7.59, and 11.91  $\mu$ M, respectively. In contrast, and after 72 h of exposure, 5-FU-loaded PBCA NPs exhibited a  $IC_{50}$  decrease which was particularly significant in T-84 colon cancer cells ( $IC_{50}$ , 0.085  $\mu$ M,  $\approx$ 42-fold decrease in the  $IC_{50}$  of free 5-FU; Fig. 3a), compared with HT-29 colon cancer cells ( $IC_{50}$ , 0.53  $\mu$ M,  $\approx$ 7-fold decrease in the  $IC_{50}$  of free 5-FU; Fig. 3b), HCT-15 colon cancer cells ( $IC_{50}$ , 0.76  $\mu$ M,  $\approx$ 10-fold decrease in the  $IC_{50}$  of free 5-FU; Fig. 3c), CCD-18 normal colon cells ( $IC_{50}$ , 2.8  $\mu$ M,  $\approx$ 4-fold decrease in the  $IC_{50}$  of free 5-FU; Fig. 3d), and MC-38 mouse colon cancer cells ( $IC_{50}$ , 0.068  $\mu$ M,  $\approx$ 3-fold decrease in the  $IC_{50}$  of free 5-FU; Fig. 3e). Similar results were obtained with 5-FU-loaded PCL NPs,  $IC_{50}$  of 0.08  $\mu$ M in T-84 cells ( $\approx$ 45-fold decrease in the  $IC_{50}$  of free 5-FU; Fig. 4a),  $IC_{50}$  of 0.76  $\mu$ M in HT-29 cells ( $\approx$ 5-fold decrease in the  $IC_{50}$  of free 5-

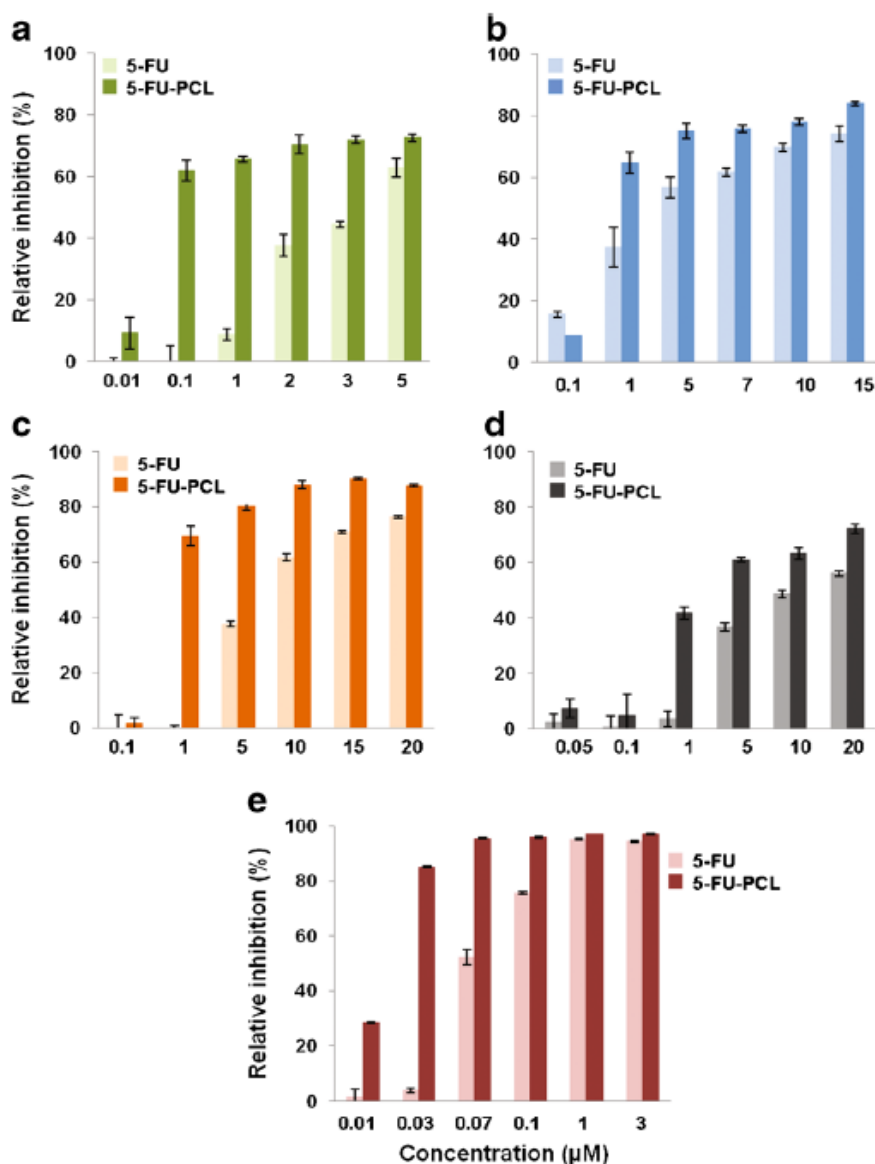
FU; Fig. 4b),  $IC_{50}$  of 0.74  $\mu\text{M}$  in HCT-15 cells ( $\approx 10$ -fold decrease in the  $IC_{50}$  of free 5-FU; Fig. 4c),  $IC_{50}$  of 2.7  $\mu\text{M}$  in CCD-18 cells ( $\approx 4.5$ -fold decrease in the  $IC_{50}$  of free 5-FU; Fig. 4d), and  $IC_{50}$  of 0.068  $\mu\text{M}$  in MC-38 cells ( $\approx 4$ -fold decrease in the  $IC_{50}$  of free 5-FU; Fig. 4e).



**Fig. 2.** *In vitro* cytotoxicity of PBCA (a) and PCL NPs (b) in colon cells. Growth of MC-38, CCD-18, HCT-15, HT-29, and T-84 cell lines was evaluated after 72 h of exposure to a wide range of NP concentrations (0.1–20  $\mu\text{M}$ ). Data represents the mean value  $\pm$ SD of quadruplicate cultures



**Fig. 3.** *In vitro* cytotoxicity of 5-FU-loaded PBCA NPs (5-FU-PBCA) in colon cells. Growth inhibition of T-84 (a), HT-29 (b), HCT-15 (c), CCD-18 (d), and MC-38 (e) was evaluated after 72 h and compared with that of free 5-FU. The survival rate was determined by normalizing the absorbance of controls to 100%. Data represents the mean value $\pm$ SD of quadruplicate cultures



**Fig. 4.** *In vitro* cytotoxicity of 5-FU-loaded PCL NPs (5-FU-PCL) in colon cells. Growth inhibition of T-84 (a), HT-29 (b), HCT-15 (c), CCD-18 (d), and MC-38 (e) was evaluated after 72 h and compared with that of free 5-FU. The survival rate was determined by normalizing the absorbance of controls to 100%. Data represents the mean value $\pm$ SD of quadruplicate cultures



### ***In Vivo Tumor Growth Inhibition with Poly(butylcyanoacrylate) and Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Nanoparticles Loaded with 5-Fluorouracil***

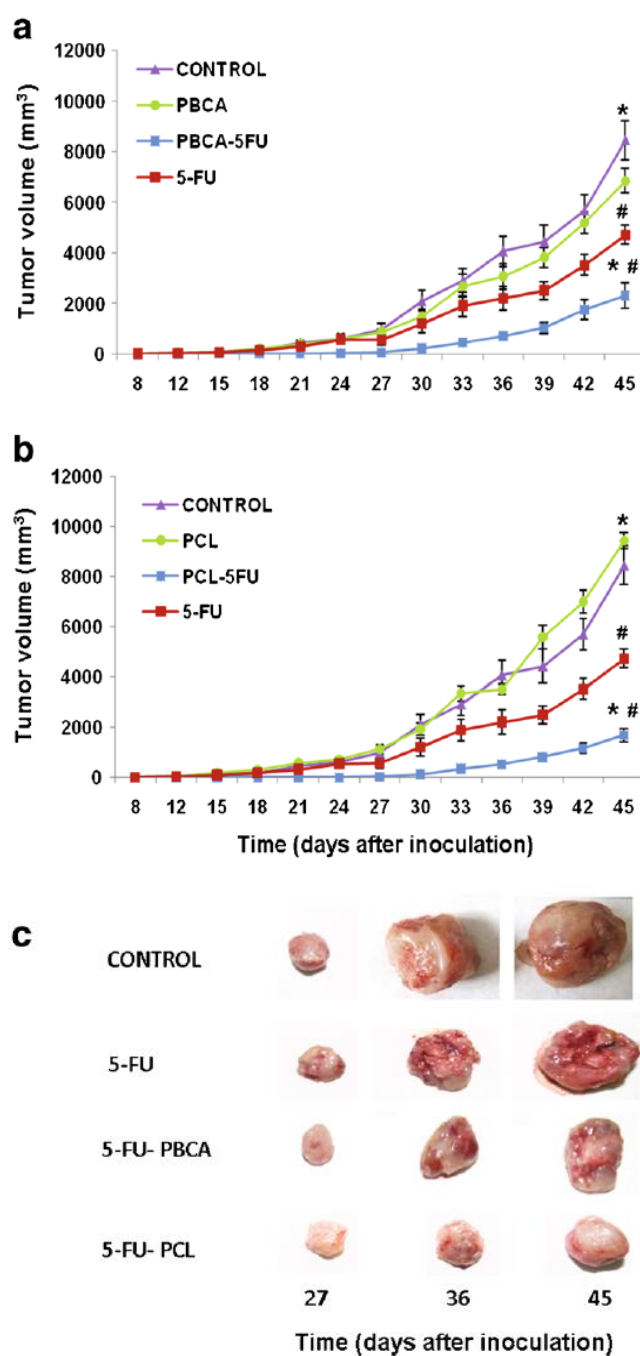
Figure 5 shows that both PBCA and PCL NPs loaded with 5-FU induced a significant reduction in tumor volumes after 45 days of treatment compared with free 5-FU ( $p < 0.05$ ), *i.e.*, a 51% (Fig. 5a) and a 64.5% (Fig. 5b) reduction, respectively. Comparing the two types of 5-FU-loaded NPs, treatment with PCL NPs caused a 13.5% greater reduction in tumor size than PBCA NPs ( $p < 0.05$ ). Finally, tumor evolution in mice treated with blank PBCA NPs and with blank PCL NPs was quite similar to the control group (untreated mice).

#### ***Survival Analysis***

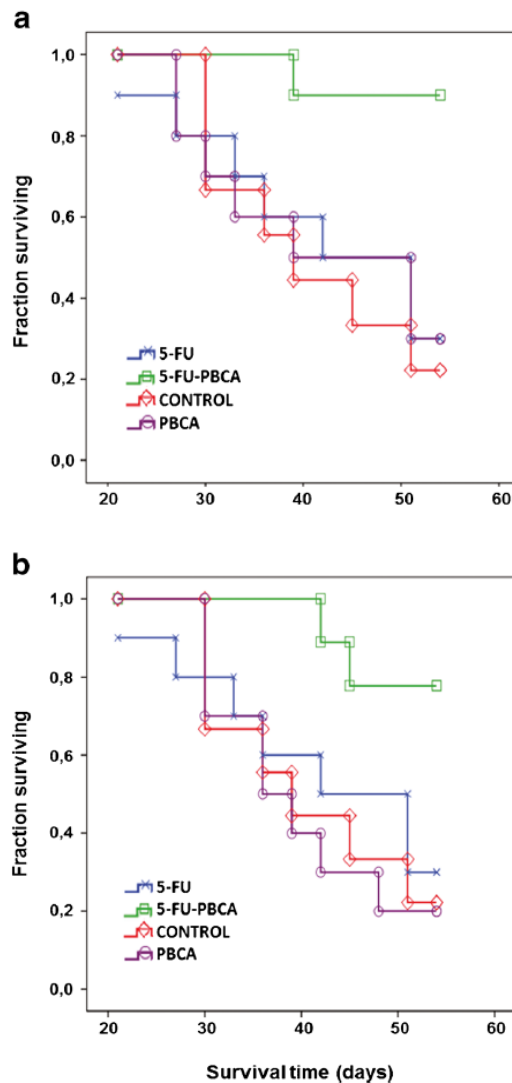
Despite the slight control over tumor volume evolution developed by free 5-FU (Fig. 5), it failed in increasing mice survival compared with the control group (Fig. 6). In contrast, 5-FU-loaded PBCA NPs (Fig. 6a) and 5-FU-loaded PCL NPs (Fig. 6b) significantly prolonged mice survival ( $p < 0.05$ ) in comparison with untreated mice and mice treated with free 5-FU. It may be the consequence of the great control over tumor growth displayed by both 5-FU-loaded nanosystems. Finally, no significant differences were observed between both 5-FU-loaded nanoformulations in terms of mice survival.

#### ***In Vivo Toxicity***

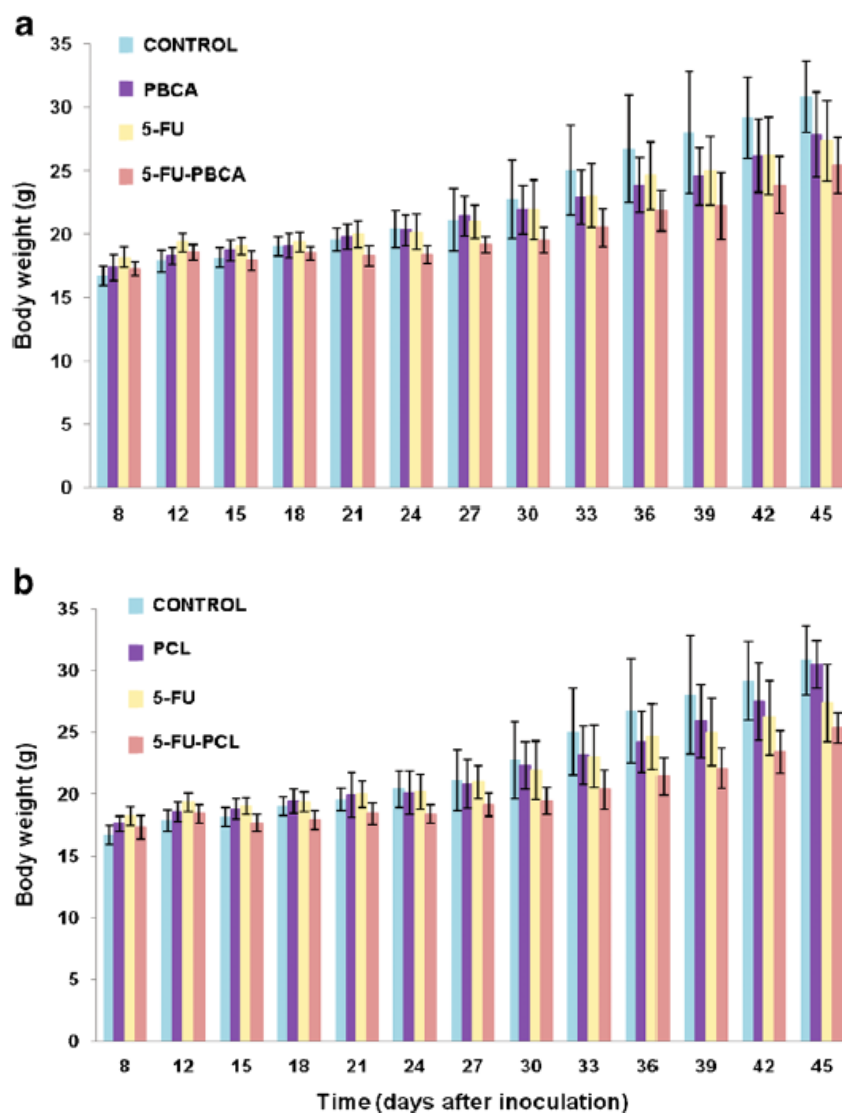
No loss of body mass was reported in mice treated with blank (5-FU unloaded) NPs in comparison with the control (untreated) group (Fig. 7). Regarding mice treated with either free 5-FU, 5-FU-loaded PBCA NPs, or 5-FU-loaded PCL NPs, a similar loss in body mass was observed compared with controls ( $p < 0.001$ ), suggesting that loading 5-FU within both polymeric NPs did not increase drug's toxicity (Fig. 7).



**Fig. 5.** Tumor growth inhibition induced by 5-FU-loaded PBCA NPs (5-FU-PBCA) (a) and 5-FU-loaded PCL NPs (5-FU-PCL) (b) and representative gross appearance of tumors excised from treated mice after 27, 36, and 45 days of treatment and from untreated mice at the same time intervals (c). Both types of 5-FU-loaded NPs exhibited significant tumor inhibition compared with the control (\* $p < 0.01$ ) and to free 5-FU (# $p < 0.05$ ). Data represents the mean value  $\pm$  standard error of the mean (SEM;  $n = 10$ )



**Fig. 6.** Survival curves calculated by the Kaplan Meier method. Data was analyzed according to mouse survival after treatment with 5-FU-loaded PBCA NPs (5-FU-PBCA) (a) and 5-FU-loaded PCL NPs (5-FU-PCL) (b). The fraction of surviving mice were compared between groups using the log-rank test ( $p < 0.05$ ). Both types of 5-FU-loaded NPs exhibited an increase in survival rates compared with the control and to free 5-FU ( $p < 0.05$ )



**Fig. 7.** Evolution of the body mass of immunocompetent C57BL/6 mice bearing subcutaneous MC38 tumors during, and after, treatment with 5-FU-loaded PBCA NPs (5-FU-PBCA) (a) and with 5-FU-loaded PCL NPs (5-FU-PCL) (b). The masses of the mice and the tumors were measured as described in “MATERIALS AND METHODS”. Treatment with blank NPs induced similar losses in body mass as those produced by the controls. Free 5-FU and both 5-FU-loaded NPs treatments induced similar loss in mouse body mass in relation to the controls ( $p < 0.001$ ). Data represents mean value  $\pm$  SD ( $n=10$ )

## Discussion

Current chemotherapy against colon cancer is not fully effective, especially during advanced stages of the disease (34). Antitumor drugs, including 5-FU, can often cause severe side effects and compromise the patients' quality of life. Therefore, it is necessary to develop new therapeutic strategies, including the use of drug-loaded nanoplateforms, to maximize the cytotoxicity (and specificity) of chemotherapy agents, while keeping drug aggression toward healthy tissues to a minimum (10). In this work, we present two nanoformulations that may contribute to the optimization of 5-FU-based colon cancer treatments.

Synthesis methodologies of 5-FU-loaded PBCA NPs and 5-FU-loaded PCL NPs were based on the emulsion polymerization of the butylcyanoacrylate monomer in an aqueous solution (22) and on the interfacial polymer disposition, respectively (18,27). Both methods generated biodegradable 5-FU-loaded particles with an average size  $\leq 100$  nm (Tables I and II), which could be deemed appropriate to facilitate their cellular uptake thus resulting in a considerable accumulation of drug molecules within malignant cells. In fact, particle diameters ranging from 100 to 200 nm have been associated with cell internalization by endocytosis, while larger particles can be internalized by phagocytosis (35).

Optimum preparation conditions were considered to be those that reported the greatest 5-FU entrapment efficiencies and 5-FU loading values (Tables I and II). Furthermore, given the similarities between the  $\zeta$  values of blank NPs and of the corresponding drug-loaded NPs (Tables I and II), it may be assumed that the 5-FU molecules were efficiently entrapped within the particle matrices rather than just adsorbed onto the surfaces. Finally, 5-FU release from PBCA and PCL NPs exhibited a biphasic (and sustained) profile (Fig. 1). The fast drug release during the first phase could be due to the loss of surface associated and/or poorly entrapped 5-FU molecules, which rapidly diffused into the release medium. 5-FU release during the slower second phase,

however, may correspond to the drug fraction deeply embedded within the polymeric nanomatrices, which may follow a longer diffusion path before being released into the surrounding medium. In the specific case of PBCA NPs, drug release could be the consequence of either particle disintegration due to surface erosion, drug diffusion through the polymeric matrix, or both (30,32). Whereas, with respect to PCL NPs, 5-FU release during this second phase could be due to drug diffusion through the polymeric matrix as opposed to polymer disintegration, which for PCL is a very slow process in an aqueous medium given its considerable hydrophobic character (18,31,33).

Comparison of data included in Tables I and II and in Fig. 1 can be used to check the great similarities between geometry (size and shape), drug-loading capabilities, and drug-release profiles of PBCA and PCL particles. In fact, statistical treatment of data helped us in establishing that the differences were not statistically significant. On the opposite, differences between the surface electrical charge of PBCA and PCL NPs were relevant (Tables I and II): PCL NPs were less negative, this postulating a reduced interaction with the reticuloendothelial system and, therefore, a more appropriate *in vivo* fate (for drug delivery purposes) compared with the PBCA NPs (*i.e.*, greater accumulation into the tumor site) (35). Finally, our research group has previously published information on the surface thermodynamics of both nanoformulations: they can be considered to be hydrophobic (15,36).

The association of 5-FU molecules with nanocarriers has yielded diverse results against colon cancer cell lines (37–40). For instance, Jain and Jain (41) demonstrated that chitosan NPs coupled to hyaluronic acid and loaded with 5-FU can moderately (2.6 times) increase the drug's cytotoxicity to HT-29 colon cancer cells. These results can be improved when this nanocarrier is surface functionalized with folate moieties (42). Nanocarriers based on copolymers such as poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate) and poly(ethylene glycol) can increase the plasma half-life of 5-FU, thus inducing a greater growth inhibition of LoVo colon cancer cells (43). Recently, Dutta et al. (39) reduced HT-29 cell viability using 5-FU in superparamagnetic iron oxides encapsulated pectin nanocarriers

and solid lipid NPs. However, neither of these nanostrategies against colon cancer have been validated *in vivo*. Our *in vitro* results demonstrated that 5-FU-loaded PCL NPs were able to decrease the  $IC_{50}$  of 5-FU and thus its antiproliferative effect. Particularly relevant were the results obtained against T-84 cells (*i.e.*,  $\approx 45$ -fold decrease in the  $IC_{50}$  of free 5-FU). In addition, PCL NPs did not induce any cell toxicity as previously reported by Kuo-Yung et al. (44). Very little data is available on the use of 5-FU-loaded PCL nanoparticulate systems against colon cancer cells. However, Ortiz et al. (18) demonstrated that PCL NPs can increase the antitumor effect of 5-FU against SW480 cells, and Zhang et al. (9) showed that PCL NPs surface functionalized with folate moieties can improve the activity of 5-FU against colon cancer cells. Furthermore, PCL NPs loaded with doxifluridine (a prodrug of 5-FU) have been reported to exhibit an important activity against HT-29 colon cancer cells (45). With respect to 5-FU-loaded PBCA NPs, they have been shown to be well tolerated in the case of superficial basal cell carcinoma (46).

In the present investigation, the *in vitro* antiproliferative effects of 5-FU-loaded PBCA NPs and 5-FU-loaded PCL NPs could be considered to be quiet similar (please check Figs. 3 and 4 and  $IC_{50}$  values reported above). In any case, both 5-FU-loaded nanosystems have provided a greater antiproliferative effect against colon cancer cells than previously developed 5-FU nanoformulations, *e.g.*, PLGA NPs which can decrease the  $IC_{50}$  of the drug in HT-29 cells only by a factor of 4 (47) or chitosan NPs which only yielded a 20% increase in the inhibition of SW480 colon cancer cell proliferation compared with the free drug (40). The reduction in RP (%) caused by the 5-FU-loaded PBCA and PCL NPs could be the consequence of a faster (and more intense) 5-FU internalization by malignant cells, therefore facilitating greater drug concentrations within the cancer cells. Furthermore, NP internalization within cancer cells depends not only on their hydrophilic/hydrophobic character and physical chemistry (*i.e.*, size and surface charge) but also on the endocytosis processes involved which can be considered to be more important in tumor cells (48,49).

To ensure the therapeutic potential of 5-FU-loaded PBCA and PCL NPs in colon cancer, we analyzed their behavior *in vivo*. It was observed that nanoparticulate systems induced a significant reduction in the tumor volume in comparison with the free drug (Fig. 5). Interestingly, tumor volumes were more efficiently reduced in mice treated with 5-FU-loaded PCL NPs (64%) than in those treated with 5-FU-loaded PBCA NPs (51%). Such 5-FU activity can be assumed to be more significant than the one recently reported for 5-FU-loaded chitosan NPs in an orthotropic mouse liver cancer model (50).

Although free 5-FU can reduce significantly the tumor volume (Fig. 5), it did not induce a significant difference in the survival rates compared with control mice (Fig. 6). This may be due to the low specificity of 5-FU as it affects not only tumor regions but also healthy tissues (*i.e.*, gastrointestinal tissues) (51). On the contrary, mice survival rate was significantly prolonged when using both 5-FU-loaded nanoformulations compared with controls (untreated, blank NPs, and free drug). The mechanism by which the 5-FU-loaded NPs increase drug activity is not fully understood, but their physicochemical properties, essentially their nanosize may be responsible for an increased accumulation/concentration into malignant tissues, thanks to the enhanced permeation and retention (EPR) effect (52). This phenomenon is based on the aberrant (“Bleaky”) structure of blood vessels irrigating tumor tissues (53), in which large gaps between endothelial cells and discontinuities in the basement membrane can be found, being responsible for the alteration of the normal diffusion of macromolecules across the endothelium. Furthermore, the clearance of macromolecules is limited by the reduced lymphatic circulation which is characteristic of tumor tissues (54). Future studies will be necessary to elucidate the mechanism by which both 5-FU-loaded PBCA NPs and 5-FU-loaded PCL NPs can increase the *in vivo* efficacy of 5-FU.

## Conclusions



A reproducible formulation methodology has been developed to obtain PBCA and PCL nanomatrices for the efficient delivery of 5-FU, on the basis of an emulsion polymerization procedure and on an interfacial polymer disposition method, respectively. Preclinical results demonstrate that both 5-FU-loaded NPs can significantly inhibit the proliferation of the human and mice colon cancer cell lines being tested. Greater tumor growth inhibition and mice survival rates were obtained when using these nanoparticulate systems compared with the free drug. Thus, these results suggest that PBCA and PCL nanoparticulate systems may open a promising possibility to optimize the delivery of 5-FU to malignant cells and, consequently, the chemotherapy of advanced or recurrent colon cancer.

### **Acknowledgments**

This investigation was funded by FEDER, Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+i), Instituto de Salud Carlos III (FIS): projects PI11/01862 and PI11/02571, and by the Consejería de Salud de la Junta de Andalucía: project PI-0049 and P11-CTS-7649 (NPs synthesis).

**Conflict of Interest** The authors declare that there are no conflicts of interest.

### **References**

1. Labianca R, Beretta GD, Kildani B, Milesi L, Merlin F, Mosconi S, et al. Colon cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2010;74:106–33.
2. Zhang N, Yin Y, Xu SJ, Chen WS. 5-Fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies. *Molecules*. 2008;13:1551–69.

3. Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009;360:1408–17.
4. Peters GJ, Backus HH, Freemantle S, van Triest B, Codacci-Pisanelli G, van der Wilt CL, et al. Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1587:194–205.
5. Guichard SM, Macpherson JS, Thurston DE, Jodrell DI. Influence of P-glycoprotein expression on in vitro cytotoxicity and in vivo antitumor activity of the novel pyrrolobenzodiazepine dimer SJG-136. *Eur J Cancer.* 2005;41:1811–8.
6. Song M, Zang W, Zhang B, Cao J, Yang G. GCS overexpression is associated with multidrug resistance of human HCT-8 colon cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2012;31:23.
7. Wang AZ, Langer R, Farokhzad OC. Nanoparticle delivery of cancer drugs. *Annu Rev Med.* 2012;63:185–8.
8. Patel NR, Pattni BS, Abouzeid AH, Torchilin VP. Nanopreparations to overcome multidrug resistance in cancer. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65:1748–62.
9. Zhang Y, Li J, Lang M, Tang X, Li L, Shen X. Folate functionalized nanoparticles for controlled 5-fluorouracil delivery. *J Colloid Interface Sci.* 2011;354:202–9.
10. Prados J, Melguizo C, Ortiz R, Perazzoli G, Cabeza L, Alvarez PJ, et al. Colon cancer therapy: recent developments in nanomedicine to improve the

efficacy of conventional chemotherapeutic drugs. *Anti Cancer Agents Med Chem.* 2013;13:1204–16.

11. Rahman Z, Kohli K, Khar RK, Ali M, Charoo NA, Shamsheer AA. Characterization of 5-fluorouracil microspheres for colonic delivery. *AAPS PharmSciTech.* 2006;7:47–53.

12. Singh R, Lillard Jr JW. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol.* 2009;86:215–23.

13. Stella B, Arpicco S, Rocco F, Marsaud V, Renoir JM, Cattel L, et al. Encapsulation of gemcitabine lipophilic derivatives into polycyanoacrylate nanospheres and nanocapsules. *Int J Pharm.* 2007;344:71–7.

14. Zhang J, Men K, Gu Y, Wang X, Gou M, Guo G, et al. Preparation of core cross-linked PCL-PEG-PCL micelles for doxorubicin delivery in vitro. *J Nanosci Nanotechnol.* 2011;11:5054–61.

15. Arias JL, López-Viota M, Sáez-Fernández E, Ruiz MA. Formulation and physicochemical characterization of poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles loaded with ftorafur and diclofenac sodium. *Colloids Surf B: Biointerfaces.* 2010;75:204–8.

16. Chen W, Wu Z, Yang H, Guo S, Li D, Cheng L. In vitro and in vivo evaluation of injectable implants for intratumoral delivery of 5-fluorouracil. *Pharm Dev Technol.* 2014;19:223–31.

17. Gong C, Wang C, Wang Y, Wu Q, Zhang D, Luo F, et al. Efficient inhibition of colorectal peritoneal carcinomatosis by drug loaded micelles in thermosensitive hydrogel composites. *Nanoscale.* 2012;4:3095–104.

18. Ortiz R, Prados J, Melguizo C, Arias JL, Ruiz MA, Alvarez PJ, et al. 5-Fluorouracil-loaded poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles combined with phage E gene therapy as a new strategy against colon cancer. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:95–107.
19. Duan J, Zhang Y, Han S, Chen Y, Li B, Liao M, et al. Synthesis and in vitro/in vivo anti-cancer evaluation of curcumin-loaded chitosan/poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Int J Pharm*. 2010;400:211–20.
20. He M, Zhao Z, Yin L, Tang C, Yin C. Hyaluronic acid coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles as anticancer drug carriers. *Int J Pharm*. 2009;373:165–73.
21. Ren F, Chen R, Wang Y, Sun Y, Jiang Y, Li G. Paclitaxel-loaded poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticle delivery system to overcome multidrug resistance in ovarian cancer. *Pharm Res*. 2011;28:897–906.
22. Arias JL, Reddy LH, Couvreur P. Polymeric nanoparticulate system augmented the anticancer therapeutic efficacy of gemcitabine. *J Drug Target*. 2009;17:586–98.
23. Kreuter J, Gelperina S. Use of nanoparticles for cerebral cancer. *Tumori*. 2008;94:271–7.
24. Wohlfart S, Khalansky AS, Bernreuther C, Michaelis M, Cinatl Jr J, Glatzel M, et al. Treatment of glioblastoma with poly(isohexyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Int J Pharm*. 2011;415:244–51.
25. Mulik RS, Mönkkönen J, Juvonen RO, Mahadik KR, Paradkar AR. ApoE3 mediated polymeric nanoparticles containing curcumin: apoptosis induced in

- vitro anticancer activity against neuroblastoma cells. *Int J Pharm.* 2012;437:29–41.
26. Vauthier C, Dubernet C, Chauvierre C, Brigger I, Couvreur P. Drug delivery to resistant tumors: the potential of poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles. *J Control Release.* 2003;93:151–60.
27. Sinha VR, Bansal K, Kaushik R, Kumria R, Trehan A. Polyepsilon-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *Int J Pharm.* 2004;278:1–23.
28. O'Brien RW, White LR. Electrophoretic mobility of a spherical colloidal particle. *J Chem Soc Faraday Trans.* 1978;74:1607–26.
29. Prados J, Melguizo C, Ortiz R, Boulaiz H, Carrillo E, Segura A, et al. Regression of established subcutaneous B16-F10 murine melanoma tumors after gef gene therapy associated with the mitochondrial apoptotic pathway. *Exp Dermatol.* 2010;19:363–71.
30. Arias JL, Ruiz MA, López-Viota M, Delgado AV. Poly(alkylcyanoacrylate) colloidal particles as vehicles for antitumour drug delivery. A comparative study. *Colloids Surf B: Biointerfaces.* 2008;62:64–70.
31. Gibaud S, Jabir Al Awwadi N, Ducki C, Astier A. Poly(epsiloncaprolactone) and Eudragit microparticles containing fludrocortisone acetate. *Int J Pharm.* 2004;269:491–508.
32. Graf A, McDowell A, Rades T. Poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles for enhanced delivery of therapeutics—is there real potential? *Expert Opin Drug Deliv.* 2009;6:371–87.

33. Pohlmann AR, Fonseca FN, Paese K, Detoni CB, Coradini K, Beck RC, et al. Poly( $\epsilon$ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2013;10:623–38.
34. Meyerhardt JA, Mayer RJ. Systemic therapy for colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2005;352:476–87.
35. Decuzzi P, Pasqualini R, Arap W, Ferrari M. Intravascular delivery of particulate systems: does geometry really matter? *Pharm Res.* 2009;26:235–43.
36. Arias JL, Gallardo V, Linares-Molinero F, Delgado AV. Preparation and characterization of carbonyl iron/poly(butylcyanoacrylate) core/shell nanoparticles. *J Colloid Interface Sci.* 2006;299:599–607.
37. Serpe L, Catalano MG, Cavalli R, Ugazio E, Bosco O, Canaparo R, et al. Cytotoxicity of anticancer drugs incorporated in solid lipid nanoparticles on HT-29 colorectal cancer cell line. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004;58:673–80.
38. Yassin AE, Anwer MK, Mowafy HA, El-Bagory IM, Bayomi MA, Alsarra IA. Optimization of 5-fluorouracil solid-lipid nanoparticles: a preliminary study to treat colon cancer. *Int J Med Sci.* 2010;7:398–408.
39. Dutta RK, Sahu S. Development of a novel probe sonication assisted enhanced loading of 5-FU in SPION encapsulated pectin nanocarriers for magnetic targeted drug delivery system. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012;82:58–65.
40. Cheng M, Xu H, Wang Y, Chen H, He B, Gao X, et al. Glycyrrhetic acid-modified chitosan nanoparticles enhanced the effect of 5-fluorouracil in murine liver cancer model via regulatory T-cells. *Drug Des Dev Ther.* 2013;7:1287–99.

41. Jain A, Jain SK. In vitro and cell uptake studies for targeting of ligand anchored nanoparticles for colon tumors. *Eur J Pharm Sci.* 2008;35:404–16.
42. Li P, Wang Y, Zeng F, Chen L, Peng Z, Kong LX. Synthesis and characterization of folate conjugated chitosan and cellular uptake of its nanoparticles in HT-29 cells. *Carbohydr Res.* 2011;346:801–6.
43. Li S, Wang A, Jiang W, Guan Z. Pharmacokinetic characteristics and anticancer effects of 5-fluorouracil loaded nanoparticles. *BMC Cancer.* 2008;8:103–12.
44. Kuo-Yung C, Yu-Der L. Ring-opening polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone initiated by the antitumor agent doxifluridine. *Acta Biomater.* 2009;5:1075–81.
45. Wang J, Peng CA. Anticancer effectiveness of polymeric drug nanocarriers on colorectal cancer cells. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2011;2011:3249–52.
46. Hadjikirova M, Troyanova P, Simeonova M. Nanoparticles as drug carrier system of 5-fluorouracil in local treatment of patients with superficial basal cell carcinoma. *J BUON.* 2005;10:517–21.
47. Wang Y, Li P, Chen L, Gao W, Zeng F, Kong LX. Targeted delivery of 5-fluorouracil to HT-29 cells using high efficient folic acid-conjugated nanoparticles. *Drug Deliv.* 2015;22:191–8.
48. Harush-Frenkel O, Altschuler Y, Benita S. Nanoparticle-cell interactions: drug delivery implications. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2008;25:485–544.
49. Mosesson Y, Mills GB, Yarden Y. Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008;8:835–50.

50. Cheng M, Chen H, Wang Y, Xu H, He B, Han J, et al. Optimized synthesis of glycyrrhetic acid-modified chitosan 5-fluorouracil nanoparticles and their characteristics. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:695–710.
51. Llorca C, Esquerdo G, Cervera JM, Briceño HC, Caldich JV, Del Pino J. 5-Fluorouracil-induced small bowel toxicity in a patient with colorectal cancer. *Clin Transl Oncol*. 2005;7:356–7.
52. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev*. 2001;53:283–318.
53. Baban DF, Seymour LW. Control of tumour vascular permeability. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998;34:109–19.
54. Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release*. 2000;65:271–84.



### 3.3. Capítulo 3. Vehiculización de paclitaxel

#### 3.3.1. Introducción

El PTX o Taxol<sup>®</sup>, es un fármaco utilizado en el tratamiento quimioterápico de un amplio número de tumores, entre los que se encuentra el cáncer de mama, uno de los más comunes en mujeres y cuya tasa de supervivencia no supera los tres años en caso de metástasis severa (Redig y McAllister, 2013). El mecanismo de acción del PTX se produce mediante su unión a los microtúbulos celulares, inhibiendo su despolimerización, estabilizando así el microtúbulo y produciendo un arresto del ciclo celular en la fase G<sub>2</sub>/M, que dará lugar a la apoptosis celular (Jordan y Wilson, 2004; Prota y cols., 2013).

El tratamiento del cáncer basado en la administración de PTX presenta dos problemas principales: (I) la falta de especificidad, al igual que otros muchos fármacos antitumorales. A pesar de que el PTX actúa principalmente sobre células con altas tasas de proliferación, también afecta a células con tasas proliferativas bajas, como por ejemplo las neuronas alterando sus axones lo que da lugar a efectos secundarios importantes como son reacciones de hipersensibilidad y dolor neuropático (Gornstein y Schwarz, 2014); (II) su poca solubilidad (< 0,1 µg/mL), lo que da lugar a efectos secundarios asociados a los solventes comerciales del PTX (Taxol<sup>®</sup>), lo que ha dado lugar al desarrollo de formulaciones alternativas de PTX (Nehate y cols., 2014). Muchos de los esfuerzos para mejorar el PTX se basan en el desarrollo de nuevas formulaciones que no contengan Cremophor<sup>®</sup> EL, que resulta muy tóxico dando lugar a efectos secundarios como son la hipersensibilidad e inmunoestimulación sistémica (Adams y cols., 1993; Weiszhar y cols., 2012).

Por estas dos razones fundamentalmente, es necesario encontrar nuevas estrategias para aumentar el efecto del PTX mediante: la eliminación de sus solventes tóxicos e incremento de la especificidad por las células tumorales. De esta manera, el efecto antitumoral podría verse incrementado y los efectos secundarios reducidos. En los últimos años se han desarrollado nuevas estrategias para el

tratamiento del cáncer de mama en el campo de la nanomedicina. Esta área está basada en el uso de nanomateriales para el transporte de fármacos, proteínas o ácidos nucleicos los cuales pueden dar lugar a un incremento de la especificidad por los tejidos tumorales y mejora de la solubilidad del fármaco sin necesidad de utilizar solventes tóxicos. Numerosas nanoformulaciones, incluyendo NPs poliméricas, liposomas, micelas y dendrímeros, han sido investigadas para mejorar la solubilidad acuosa del PTX y eliminar efectos secundarios indeseables. Estos sistemas nanométricos ofrecen numerosas ventajas, como su alto grado de internalización celular, el hecho de evitar ciertos mecanismos de resistencia a multidrogas (como aquellos mediados por P-GP) o la posible funcionalización de su superficie para realizar un direccionamiento activo (Nehate y cols., 2014; Tanaka y cols., 2009; Tharkar y cols., 2015; Wicki y cols., 2015). Además, debido a su pequeño tamaño y a sus propiedades físico-químicas, las NPs tienden a acumularse más en los tejidos tumorales que en los tejidos sanos debido al efecto EPR o direccionamiento pasivo, ya que los vasos sanguíneos de los tejidos tumorales son más permeables y fenestrados, y presentan un drenaje linfático deficiente (Maeda y cols., 2001, 2009; McGuire y Markman, 2003). Actualmente, se han desarrollado y aprobado por la FDA nuevos tratamientos para el cáncer de mama basados en la nanotecnología, tales como el Abraxane® y más recientemente el Genexol®-PM (micelas poliméricas con PTX) o el Lipusu® (liposomas con PTX) estos dos últimos en ensayo clínico en fases I y II (Barenholz, 2012; Yamamoto y cols., 2011).

Uno de los materiales más usados en nanomedicina es el polímero PLA, PGA o su copolímero PLGA. Estos polímeros son ideales en este campo ya que son biodegradables, biocompatibles, no tóxicos y han sido utilizados en aplicaciones biomédicas por más de dos décadas. Por esto, las NPs de PLGA son una de las nanoestructuras más adecuadas para la liberación de fármacos antitumorales tras su administración vía parenteral, proporcionando perfiles de liberación controlada y sostenida (Danhier y cols., 2012; Mundargi y cols., 2008; Sadat Tabatabaei Mirakabad y cols., 2014). Estas NPs, son internalizadas en las células mediante procesos de endocitosis mediada por clatrina y por pinocitosis. Una vez que las NPs son internalizadas, escapan rápidamente al citoplasma en unos diez minutos y

empiezan a liberar el fármaco de forma sostenida (Danhier y cols., 2012; Vasir y Labhasetwar, 2008).

Sin embargo, estas NPs también presentan ciertas limitaciones: (I) no son compuestos estables después de la preparación, lo que se está resolviendo mediante técnicas de liofilización, usando diferentes clases de lipoprotectores; (II) aunque se puede lograr una alta eficiencia de encapsulación para compuestos lipófilicos como el PTX, generalmente la carga de fármaco es baja ( $\approx 1\%$ ) lo que significa que es necesario administrar una gran cantidad de NPs para alcanzar dosis terapéuticas y (III) típicamente presentan una liberación inicial rápida del fármaco seguida por una liberación sostenida (liberación bifásica) probablemente causada por el fármaco adsorbido sobre la superficie de las NPs. Por lo tanto, con estos problemas de base es muy probable que una elevada concentración de fármaco no alcance el sitio del tumor (Danhier y cols., 2012; Sadat Tabatabaei Mirakabad y cols., 2014).

De este modo, el objetivo de esta parte de la tesis sería el desarrollo de NPs de PLGA con una alta carga de fármaco y libres de Cremophor® EL, para poder incrementar la especificidad del fármaco y su solubilidad en el tratamiento del cáncer de mama avanzado. Para este objetivo, las NPs de PLGA transportadoras de PTX se sintetizaron mediante el método de la nanoprecipitación y se caracterizaron extensivamente en sus propiedades físico-químicas (geometría, electrocinética y capacidad de vehiculización del PTX), por parte del Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Sevilla. Una vez seleccionadas las NPs más aptas, éstas se caracterizaron desde el punto de vista biológico: su compatibilidad sanguínea (hemólisis) y toxicidad *in vitro* en células tumorales y no tumorales del epitelio mamario. Una vez demostrada su biocompatibilidad, se procedió al estudio de la inhibición relativa del crecimiento celular producida por el PTX transportado en NPs de PLGA comparada con el PTX libre *in vitro* en líneas celulares tumorales y no tumorales. Por último, para comprobar la internalización celular, se realizaron ensayos cualitativos y cuantitativos. Finalmente, también se llevaron a cabo estudios de apoptosis y de análisis del ciclo celular.

### **3.3.2. Material y métodos**

#### ***3.3.2.1. Fármacos y reactivos***

El Resomer® RG 504H (PLGA 50:50, peso molecular, PM: 48,000 Da; viscosidad inherente: 0.53 dL/g) fue obtenido de Boehringer-Ingelheim (Alemania). Todos los demás productos químicos utilizados fueron de calidad analítica de la casa comercial Sigma-Aldrich (USA), excepto el PTX (Tocris Cookson Ltd., UK) y la trehalosa (VWR International Eurolab S.L., España). Los reactivos acetona, acetonitrilo, metanol, dimetilsulfóxido (DMSO) y ácido acético fueron del grado de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de Panreac Química (España). El agua utilizada en los experimentos fue desionizada y filtrada (Milli-Q Academic, Millipore, España).

El resto de productos químicos fueron obtenidos de Panreac Química (Barcelona, España). El medio de liberación (PBS, pH 7.4) se obtuvo de Biochemica AppliChem (Darmstadt, Alemania). El análisis por HPLC de fase inversa (RP-HPLC) se llevó a cabo en el sistema Hitachi LaChrom® Series (D-7000; Hitachi Ltd, Tokyo, Japón) equipado con un inyector automático L-7200, una interfase D-7000, una bomba cuaternaria (modelo L-7100) y un detector DAD UV-VIS (modelo L-7455). Las columnas Waters Corp Spherisorb ODS2 (10 µm, 4.6 mm × 250 mm; Milford, MA) mantenidas a 25.0°C ± 0.1°C (Elite LaChrom L-2350 column oven; Hitachi Ltd) fueron utilizadas en este análisis. La recolección de datos y los cálculos fueron realizados con el software HSM D-7000 LaChrom® (Hitachi, Ltd).

#### ***3.3.2.2. Síntesis de las nanopartículas de PLGA***

Las NPs de PLGA fueron sintetizadas mediante un protocolo modificado de nanoprecipitación (Fessi y cols, 1989). De forma esquemática, el PLGA fue co-

disuelto con Span<sup>®</sup> 60 en acetona obteniéndose así una concentración de polímero del 1.5 (p/v). Después, 5 mL de esta solución acetónica se añadieron gota a gota (5 mL/min) utilizando una bomba de jeringa (Harvard Apparatus Ltd., UK) y bajo agitación magnética a 15 mL de una solución acuosa de Pluronic<sup>®</sup> F-68 (0.5%, p/v). La acetona fue evaporada a temperatura ambiente durante 4 h y la suspensión de NPs se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 min a 4 °C (Eppendorf 504R centrifuge, Eppendorf AG, Alemania). Después de lavar dos veces las NPs, se resuspendieron en una solución de trehalosa al 5% (p/v) (crioprotector) y fueron liofilizadas (congeladas en nitrógeno líquido y liofilizadas:  $-80.0 \pm 0.5$  °C y 0.057 mbar; Cryodos freeze-drier, Telstar Industrial S.L., España) para obtener un polvo fino. La carga de PTX en las NPs de PLGA se realizó añadiendo una cantidad fija de fármaco en la solución orgánica de PLGA, obteniendo así concentraciones iniciales de fármaco de 5, 10 o 15% (p/p). De manera similar, para realizar los estudios de internalización celular se cargaron las NPs con el fluoróforo rojo nilo (NR) mediante la incorporación de 100 µL de una solución acetónica 10 mM a la solución orgánica de PLGA, siguiendo cuidadosamente los pasos descritos anteriormente en la preparación de NPs de PLGA. Todas las formulaciones fueron sintetizadas por triplicado (n =3).

### ***3.3.2.3. Métodos de caracterización***

El diámetro medio, la distribución del tamaño y el potencial Z (ZP) de las NPs, tanto blancas como cargadas con fármaco, se midió mediante espectroscopia de correlación de fotones (PCS) y anemometría láser Doppler utilizando un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). La caracterización morfológica de las partículas se realizó mediante análisis de imagen, utilizando para ello microscopía electrónica de barrido (SEM) en un equipo Philips XL30 (Philips, Alemania). Para esto, la dispersión de partículas se extendió en una gota sobre un soporte que se secó a temperatura ambiente y se recubrió con una delgada película de oro.

### 3.3.2.3.1. Condiciones cromatográficas

La introducción de nuevos métodos de HPLC para el control de calidad rutinario de preparaciones farmacéuticas proporciona la máxima información relevante mediante el análisis de los datos experimentales y comienza con el establecimiento de las condiciones óptimas de medición. Las condiciones cromatográficas fueron determinadas utilizando una columna C18 (Spherisorb® 5 µm ODS2, 4.6 × 250 mm Analytical Column; Waters Corp.). La fase móvil estaba formada por acetonitrilo:agua (55:45 v/v) y se mantuvo en una tasa de flujo de 1.000 mL/min, siendo filtrada a través de filtros de membrana de nitrocelulosa de 0.22 µm (Merck Milipore, Billerica, MA) y desgasificada al vacío antes de su uso. Por último, la longitud de la onda de detección UV fue de 227 nm y el volumen de inyección en el aparato de 10 µL.

### 3.3.2.3.2. Determinación de la incorporación de fármaco en las nanopartículas

Se utilizó la técnica del HPLC con el fin de determinar el contenido de fármaco en las NPs. Brevemente, las NPs liofilizadas (alrededor de 5 mg) se pesaron con precisión utilizando una balanza analítica de alta precisión (d=0.01 mg; Model CP 225D; Sartorius). Después, 1 mL de acetonitrilo se añadió y se mezcló con precisión utilizando un vortex para disolver las partículas en la fase orgánica. Seguidamente, 10 µL de la solución que fue previamente filtrada (Millex® GV syringe filter, 0.22 µm), se inyectó en el sistema de HPLC para la detección del PTX y su cuantificación. El contenido de fármaco se expresó como eficiencia de encapsulación (EE%) y capacidad de carga (DL%), utilizando para determinarlas las siguientes ecuaciones:

$$EE (\%) = \frac{\text{cantidad actual de PTX en nanopartículas}}{\text{cantidad teórica de PTX en nanopartículas}} \times 100$$

$$DL (\%) = \frac{\text{masa de PTX en nanopartículas}}{\text{masa de PTX}} \times 100$$

### 3.3.2.3.3. Liberación *in vitro* de PTX de las nanopartículas

Los experimentos de liberación de PTX se realizaron por triplicado utilizando las NPs de PLGA con unas concentraciones iniciales de fármaco del 5, 10 o 15% (p/p). Prácticamente 4 mg de las NPs liofilizadas se resuspendieron en 15 mL de medio de liberación (PBS, pH =  $7.4 \pm 0.1$ ) que contenía Tween<sup>®</sup> 80 al 0.1% (p/v) para asegurar el estado de baja concentración. El PBS se mantuvo a  $37.0 \pm 0.5$  °C en agitación mecánica (100 rpm, Unitronic OR horizontal shaker, Selecta S.A., España) durante todo el experimento de liberación. Se fueron retirando alícuotas (500 µL) a intervalos fijos de tiempo, las cuales fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 5 min (Eppendorf 504R centrifuge, Eppendorf AG, Alemania) y los sobrenadantes se pasaron a través de filtros de jeringa de 0.22 µm (Millex<sup>®</sup>-GV, Millipore, España). Finalmente, 10 µL de cada muestra fueron inyectados en el sistema de HPLC para evaluar la cantidad de PTX liberado en el PBS. El PTX liberado en cualquier tiempo fue determinado mediante una curva de calibración entre 47 a 750 µg/mL ( $r^2 = 0.9986$ ) [límite de detección (LOD) = 5.9 µg/mL; límite de cuantificación (LOQ) = 23.4 µg/mL]. Después del muestreo, se añadió un volumen igual de medio de liberación a la misma temperatura, para mantener el estado de baja concentración.

### 3.3.2.4. Cultivo celular

En este estudio se utilizaron diferentes líneas de cáncer de mama humanas: MCF-7, MDA-MB-231, SK-BR-3 y T47D, así como una línea celular no tumoral de epitelio mamario, la MCF-10A (todas estas líneas celulares se obtuvieron de la *European Collection of Cell Culture*, ECACC), y la línea de cáncer de mama E0771, que

proviene de la cepa de ratones inmunocompetentes C57BL/6 (proporcionada por el Dr. Anderson del Peter MacCallum Cancer Center, de East Melbourne, Australia). Las líneas celulares MCF-7, SK-BR-3 y E0771 fueron cultivadas en *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Sigma-Aldrich) y las MDA-MB-231 y T47D en *DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham* (Sigma-Aldrich). Ambos medios de cultivo fueron suplementados al 1% con una mezcla de los antibióticos penicilina (10.000 U/mL) y estreptomina (10 mg/mL) (Sigma-Aldrich) y al 10% con suero bovino fetal de Gibco (FBS) (Life Technologies). La línea MCF-10A se cultivó en *DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham* (Sigma-Aldrich) suplementado al 5% con suero de caballo (FHS), al 1% con antibióticos penicilina-estreptomina, al 0,002% con factor de crecimiento epidérmico (EGF), al 0,05% con hidrocortisona, al 0,01% con toxina colérica de *Vibrio cholerae* y al 0,1% con insulina proveniente de páncreas bovino (todos estos reactivos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich). Las líneas celulares fueron mantenidas en un incubador a  $37 \pm 0,5$  °C de temperatura en ambiente humidificado y con 5% de CO<sub>2</sub>.

### ***3.3.2.5. Ensayo de hemolisis***

Para realizar el ensayo de hemolisis se utilizó el protocolo modificado de Evans y colaboradores (2013). Para ello, se recolectaron 35 mL de sangre de un donante sano en tubos que contenían ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para evitar la coagulación sanguínea. La sangre se centrifugó a 500×g durante 5 min. Tras la centrifugación, el plasma fue aspirado y descartado y se añadió el mismo volumen retirado de plasma de una solución de cloruro sódico a 150 mM, para lavar los eritrocitos mediante la inversión del tubo. Después, se volvió a centrifugar el tubo a 500×g durante 5 min, repitiéndose de nuevo el lavado. Tras esto, el sobrenadante fue aspirado y en este caso se reemplazó por buffer fosfato salino (PBS) a pH de 7,4. Tras este paso, los eritrocitos fueron diluidos (1:50) y se observó la formación del pellet para descartar la lisis de los eritrocitos durante el procesamiento. Se añadieron 190 µL de los eritrocitos diluidos en pocillos de placas de 96 pocillos de



fondo cónico. A esos pocillos, se añadieron en un volumen de 10  $\mu\text{L}$  por pocillo concentraciones crecientes de la NP PLGA sin fármaco, para llegar a una concentración final en la mezcla de 10, 25, 50, 100, 250 y 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Los controles positivos fueron realizados añadiendo 10  $\mu\text{L}$  por pocillo de una solución de Triton X-100 al 20% y a los controles negativos se les añadieron 10  $\mu\text{L}$  por pocillo de PBS (pH 7,4). Tras 1 h de incubación a 37°C en agitación (15 rpm), se centrifugó la placa a 500 $\times$ g durante 5 min y tras la centrifugación, se transfirieron 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de cada pocillo a una placa de 96 pocillos de fondo plano. sobre la cual se procedió a analizar su absorbancia. La concentración de hemoglobina liberada por los eritrocitos lisados se midió a 492 nm con el lector de placas *Titertek multiscan* (Flow, Irvine, California). El ensayo fue realizado por triplicado y el porcentaje de hemólisis se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Hemólisis (\%)} = \frac{\text{abs. de la muestra} - \text{abs. del control negativo}}{\text{abs. del control positivo}} \times 100$$

Por último, además de la valoración anterior, los eritrocitos tratados con NPs de PLGA, fueron observados mediante microscopía óptica para observar posibles cambios en su morfología.

### ***3.3.2.6. Ensayos de proliferación celular***

Las líneas celulares se sembraron en placas de 24 pocillos a las densidades de  $1,5 \times 10^3$  para MCF-7 y E0771,  $13 \times 10^3$  para MDA-MB-231 y T47D y  $20 \times 10^3$  para MCF-10A y SK-BR-3 en 400  $\mu\text{L}$  de cada uno de sus respectivos medios de cultivo e incubadas durante 24 h. A continuación, las células fueron tratadas con PTX, NPs de PLGA cargadas con PTX (PTX-PLGA) y NPs de PLGA sin fármaco a concentraciones de fármaco en el medio, que iban desde 0,1 a 100 nM durante 4 días, con la renovación del medio de cultivo y de los tratamientos tras las 48 h iniciales. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el ensayo de la sulforrodamina B (SRB) para determinar el porcentaje de proliferación y toxicidad

celular. Para ello, las células se fijaron con 300  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) al 10% durante 20 min a 4°C. Tras tres lavados con agua destilada se dejaron secar toda la noche. Al día siguiente, fueron teñidas con 300  $\mu$ L del colorante SRB (0,4% en una solución al 1% de ácido acético) durante 20 min en agitación (15 rpm). Posteriormente, se lavaron tres veces con una solución al 1% de ácido acético y se dejaron secar toda la noche. Por último, el colorante SRB fue resuspendido en 200  $\mu$ L de una solución de Trizma® (10 mM, pH 10,5). La densidad óptica (DO) del colorante se midió con el lector de placas *Titertek multiscan* (Flow, Irvine, California) a 492 nm. El porcentaje de proliferación (Pf%) y el de citotoxicidad (Ct%) fueron calculados con las siguientes fórmulas:

$$Pf \% = \frac{DO \text{ muestra}}{DO \text{ control negativo}} \times 100$$

$$Ct \% = 100 - Pf \%$$

### ***3.3.2.7. Análisis del ciclo celular***

Se sembraron las líneas celulares a una densidad de  $1 \times 10^5$  células por pocillo en placas de 6 pocillos, en un volumen de 2 mL de medio de cultivo sin suero, para producir un arresto del ciclo celular y permitir que todas las células partieran de la misma fase del ciclo. Tras 24 h de incubación, se retiró el medio sin suero y se añadió medio suplementado a las células, que además fueron tratadas con la concentración de fármaco que inhibe el crecimiento del 50% de las células para cada tratamiento (IC<sub>50</sub>), dejándose actuar durante 48 h de incubación. El análisis del ciclo celular se llevó a cabo mediante citometría de flujo con una solución que contiene yoduro de propidio y RNasa (Immunostep, Salamanca, España). Las células fueron recogidas de las placas y fijadas con etanol al 70% durante 30 min a 4°C. A continuación, se centrifugaron (5000 rpm, 5 min) y el pellet se resuspendió e incubó en 500  $\mu$ L de la solución con yoduro de propidio y RNasa durante 15 min a

temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo de incubación, las células fueron analizadas con un citómetro FACScan (Becton Dickinson, San Jose, USA).

### **3.3.2.8. Ensayos de internalización celular**

#### **3.3.2.8.1. Citometría de flujo y microscopía de fluorescencia**

Se sembraron  $1 \times 10^5$  células por pocillo de la línea celular MCF-7 en placas de 6 pocillos en un volumen de 2 mL de medio de cultivo. Tras 24 h, las células se expusieron a una alta dosis ( $0.5 \mu\text{M}$ ) de NR solo y cargado en las NPs de PLGA (NR-PLGA) durante 0,5, 1, 2, 4 y 6 h de exposición. Transcurridos los tiempos de exposición las células fueron tripsinizadas y centrifugadas a 5000 rpm durante 5 min. Después de la centrifugación, se descartó el sobrenadante y tras dos lavados con PBS el pellet se resuspendió en 200  $\mu\text{L}$  de PBS. La intensidad de fluorescencia del NR se analizó mediante citometría de flujo en un citómetro FACScan (Becton Dickinson, San Jose, USA). De manera simultánea, las células fueron observadas a los mismos tiempos de exposición en el microscopio de fluorescencia Leica DM IL LED (Leica Microsystems S.L.U., Barcelona, Spain), para controlar la integridad celular.

#### **3.3.2.8.2. Microscopía confocal**

Para observar mediante técnicas de imagen la internalización celular de las NPs de PLGA cargadas con NR, se sembraron las células MCF-7 a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/pocillo en cubreobjetos estériles dispuestos en placas de 6 pocillos, en un volumen de 2 mL de medio de cultivo. Tras 24 h, estas células fueron tratadas con NR y NPs de PLGA cargadas con NR a una dosis de  $0.05 \mu\text{M}$  a diferentes tiempos de exposición (0,5, 1, 2 y 4 h). Posteriormente, las células se lavaron tres

veces con PBS y fueron fijadas en formaldehído al 4% durante 20 min, a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras esto, se realizaron de nuevo tres lavados con PBS, y por último los núcleos celulares fueron teñidos con Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) a 5 µg/mL durante 5 min a temperatura ambiente en oscuridad. Las células fueron observadas mediante un microscopio confocal Leica TCS-SP5 II.

### ***3.3.2.9. Tratamiento de esferoides tumorales multicelulares***

Los esferoides tumorales multicelulares (MTS) fueron generados utilizando un protocolo modificado, descrito previamente por Prados y cols., en el año 2010 (Prados y cols., 2010)). Para ello, se añadieron 50 µL de agar al 1% (p/v) a placas de 96 pocillos de fondo plano y se dejaron gelificar durante 30 min. Después, la línea celular MCF-7 fue sembrada en cada pocillo a una densidad de  $4 \times 10^3$  o  $25 \times 10^3$  células en 200 µL de medio de cultivo. Para producir la agregación celular y la consecuente formación del esferoide tumoral, se centrifugaron las placas a  $800 \times g$  durante 5 min y se dejaron incubando a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub> durante 3 días. Tras este tiempo de incubación cuando los MTS estaban formados, se trataron con PTX, PTX-PLGA y NPs de PLGA sin fármaco mediante el reemplazo del medio del cultivo, con el medio nuevo que contenía la cantidad suficiente de fármaco para llegar a las concentraciones de 9,13, 18,3, 36,5 y 100 nM en el medio, así como también se añadió en los MTS tratados con PLGA sin fármaco las concentraciones equivalentes a las NPs de PLGA usadas con el fármaco, renovando el tratamiento a las 48 h de exposición. El control negativo se realizó con MTS que no fueron tratados, así como pocillos con DMEM, pero sin células fueron usados como blanco. El experimento se realizó por octuplicado.

Cada dos días se tomaron imágenes de los MTS de  $4 \times 10^3$  células, hasta un tiempo final de 6 días utilizando un microscopio de contraste de fases para comparar los tamaños de los MTS entre tratamientos.

Los esferocitos de  $25 \times 10^3$  células, se utilizaron para comparar el porcentaje de proliferación de los MTS tratados respecto a los controles negativos utilizando el

Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japón). Brevemente, transcurrido el tiempo de exposición al fármaco (96 h) se añadió el reactivo del CCK-8 a los pocillos a una concentración final del 10% y las placas fueron incubadas durante 4°C a 37°C. Tras el tiempo de incubación, se midió la densidad óptica de los pocillos a 450 nm en un lector de placas Titertek multiscan (Flow, Irvine, California). El porcentaje de proliferación (Pf%) se calculó utilizando la fórmula del apartado “3.3.2.6. Ensayos de proliferación celular”.

### 3.3.3. Resultados

#### *3.3.3.1. Tamaño de partícula, carga eléctrica de superficie y almacenamiento*

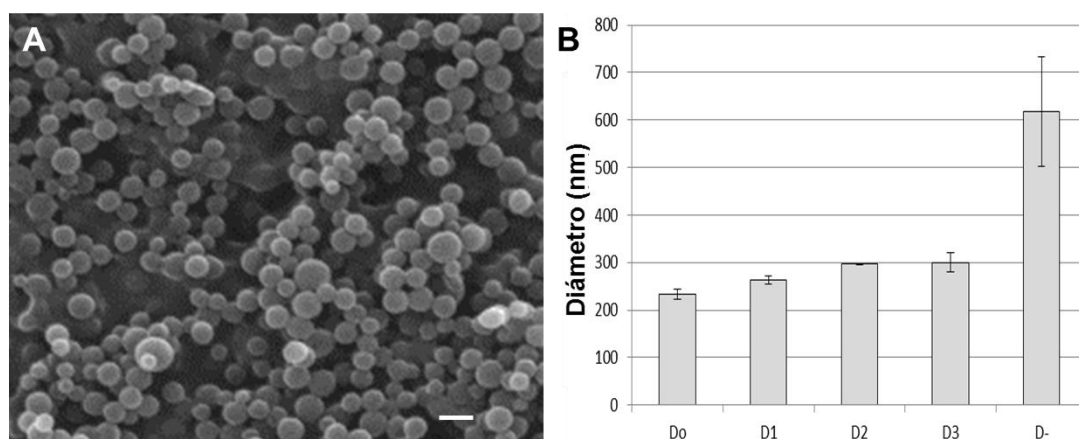
La síntesis de todas las nanoformulaciones de PLGA se basó en una metodología de nanoprecipitación (Fessi y cols., 1989). Se investigó la influencia de la cantidad inicial de PTX (5, 10 o 15% p/p) en el tamaño de la partícula y la carga eléctrica de superficie.

Las NPs de PTX-PLGA estaban caracterizadas por tener una forma esférica y un diámetro medio menor de 250 nm, con un coeficiente de variación (CV%) menor del 15% y un índice de polidispersión (PdI) por debajo de 0.3, lo que sugiere una distribución homogénea en cuanto al tamaño de las partículas (Tabla 1). La carga eléctrica de superficie (potencial zeta,  $\zeta$ ) de las NPs de PTX-PLGA fue negativo en agua y similar a la superficie negativa de las NPs poliméricas puras. (valor  $\zeta$  medio  $\approx$  -30 mV).

PTX (%p/p)	$D_{\text{mean}} \pm \text{SD}$ (nm)	CV (%)	PdI $\pm$ SD	$\zeta \pm \text{SD}$ (mV)
0	$201.6 \pm 2.4$	1.2	$0.2 \pm 0.0$	$-31.1 \pm 0.9$
5	$232.5 \pm 8.8$	3.8	$0.2 \pm 0.0$	$-28.0 \pm 0.9$
10	$243.2 \pm 37.2$	15.3	$0.3 \pm 0.1$	$-25.7 \pm 0.8$
15	$186.9 \pm 9.7$	5.2	$0.3 \pm 0.1$	$-24.8 \pm 0.8$

**Tabla 1.** Tamaño de partícula, distribución del tamaño y potencial z respecto a varias concentraciones iniciales de fármaco (SD: desviación estándar; CV: coeficiente de variación).

Ni el tamaño de partícula ni la calidad de las suspensiones poliméricas, variaban considerablemente cuando se cargaron diferentes cantidades de fármaco en las partículas poliméricas. No se observó presencia de sedimentos voluminosos / agregados o agregación de partículas (Figura 1A). La escasa estabilidad de las NPs de PLGA en un medio acuoso supone una limitación en el uso clínico de estas NPs. Con el fin de mejorar la estabilidad a largo plazo de estos nanosistemas coloidales, se utilizó trehalosa como crioprotector. Una concentración optimizada del 5% p/v de trehalosa se utilizó para almacenar las NPs a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para valorar la estabilidad de estos sistemas, las partículas se sometieron a varios ciclos de congelación-descongelación. Después de cada ciclo se midió la media de los diámetros de las partículas (Figura 1B).



**Figura 1.** PTX cargado en NPs de PLGA. Imágenes de SEM de NPs de PLGA (barra de escala: 1 μm) (A). Efecto del uso del crioprotector sobre la media del diámetro de las partículas tras varios ciclos de congelación-descongelación (B) (D0: diámetro inicial; D1: diámetro tras 1 ciclo; D2: diámetro tras 2 ciclos; D3: diámetro tras 3 ciclos; D-: diámetro sin crioprotector).

Como se puede observar en la Figura 1B, las partículas congeladas sin crioprotector mostraron un aumento importante de tamaño (hasta 600 nm,  $\approx$  165%) también en la distribución de tamaños. Cuando se utilizó trehalosa como crioprotector, las partículas sufrieron un ligero aumento del tamaño del 13% después del primer ciclo de congelación-descongelación. Después del tercer ciclo, el aumento fue de aproximadamente el 29%, dando como resultado un diámetro de 300 nm que es aceptable para una administración parenteral.

### ***3.3.3.2. Carga de PTX en las nanopartículas de PLGA***

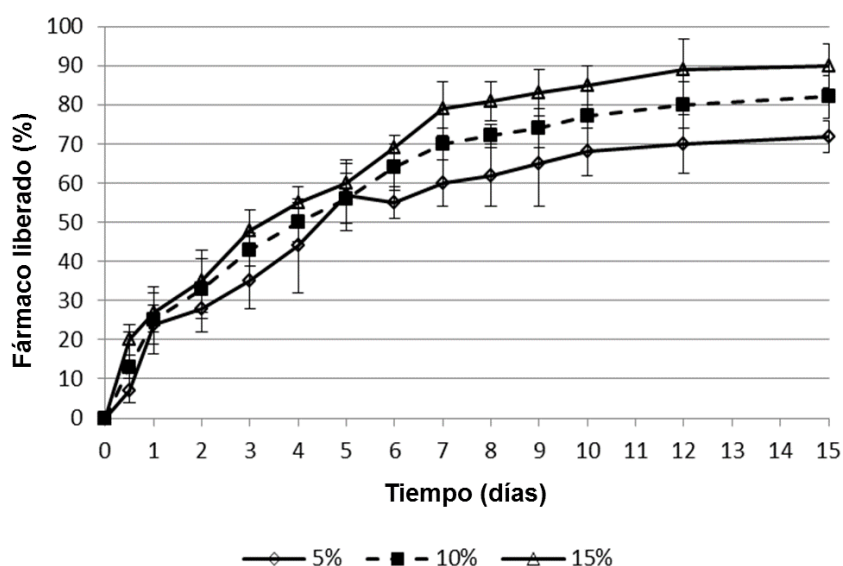
Los resultados obtenidos en la incorporación del PTX en la NP, demostraron que un aumento en la concentración de fármaco (2.25; 4.5; 6.75 mg) no dio lugar a una diferencia significativa en la eficiencia de encapsulación (EE%) cuando el peso del polímero se mantuvo constante (45 mg).

Debido a la naturaleza hidrofóbica del fármaco y el polímero se esperaba que las NPs de PLGA cargadas con PTX sintetizadas mediante nanoprecipitación fueran reproducibles con altos valores de EE (%). El porcentaje de EE fue superior al 85% en todos los casos. Los valores más altos de EE (%) fueron obtenidos para concentraciones de PTX del 5% p/p. La razón es que la gran cantidad de polímero redujo la pérdida de fármaco durante el proceso de fabricación y mostró un aumento más ligero de la encapsulación del fármaco, del 85 al 91%. Los valores de DL estaban en el intervalo de 5-13% p/p. Estos resultados demuestran que el tamaño de partícula y EE no se vieron afectados significativamente por la concentración de fármaco cuando otras variables de la formulación se mantienen constantes.

### ***3.3.3.3. Liberación de PTX de las nanopartículas de PLGA***

La liberación de fármaco *in vitro* se evaluó en una solución de PBS a pH 7,4 y una temperatura de 37°C. La liberación de PTX de las NPs de PLGA en tres

concentraciones diferentes, mostró un proceso bifásico típico de estos polímeros (Pridge y cols., 2009). Tal perfil de liberación sostenida del fármaco se caracterizó en todos los casos por una fase inicial de gran liberación de PTX (hasta  $\approx 25\%$  en 1 h), liberándose las moléculas restantes de PTX de una manera más sostenida durante un periodo de 15 días (Figura 2). NP con mayor carga de fármaco (10 y 15%) mostraron la misma tendencia con un patrón de liberación más rápido en el que alrededor del 90% del PTX fue liberado en 15 días para las NPs PTX-PLGA 15%. En consecuencia, este fenómeno muestra que el fármaco se dispersa uniformemente dentro de las partículas y sale de ellas principalmente por mecanismos de difusión.



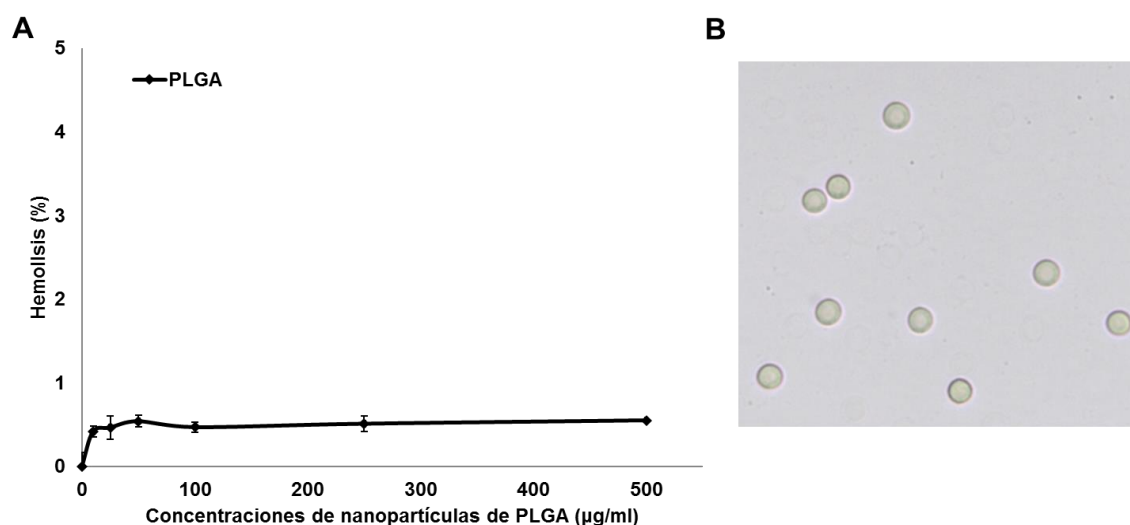
**Figura 2.** Cinética de liberación de PTX de las NPs de PLGA. Los ensayos *in vitro* fueron realizados con las NPs de PLGA con un contenido teórico de fármaco de 5, 10 y 15% p/p (PBS pH 7.4, 37°C con 0.1% v/v Tween®80) Media  $\pm$  SD (n=3).

### 3.3.3.4. Ensayo de hemolisis

La compatibilidad de las NPs de PLGA con los eritrocitos humanos se testó mediante un ensayo de hemolisis. La concentración de hemoglobina en la muestra se midió a 492 nm. Como se puede observar en la figura 3A, las NPs de PLGA no produjeron lisis en la membrana de los eritrocitos humanos en ninguna de las concentraciones de NP utilizadas, incluso en las concentraciones más altas. Todos



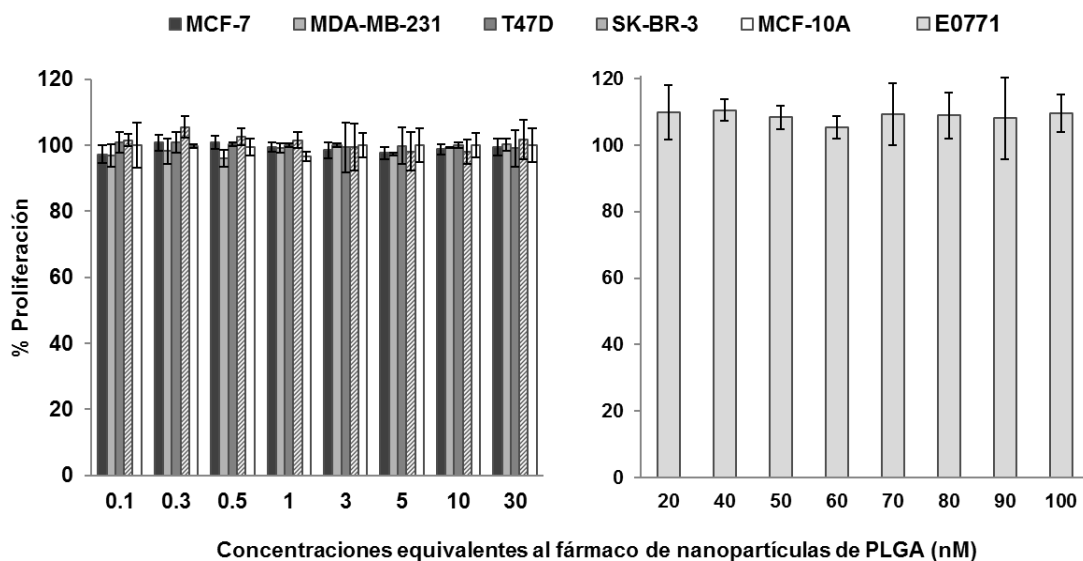
los porcentajes de hemólisis fueron menores del 1% y muy similares a los obtenidos en los controles negativos con PBS, en comparación al control positivo con Triton X-100 al 20%. Esto también puede observarse en imágenes de los eritrocitos tratados con PLGA obtenidas mediante microscopía óptica, donde se observan eritrocitos totalmente íntegros sin alteración de su morfología típica de disco bicóncavo (Figura 3B). Por lo tanto, las NPs de PLGA mostraron una excelente biocompatibilidad con los eritrocitos humanos.



**Figura 3.** Ensayo de hemólisis con las NPs de PLGA. Las NPs de PLGA sin fármaco fueron usadas a diferentes concentraciones para determinar su capacidad de hemólisis. Los resultados están expresados como el porcentaje de eritrocitos lisados frente a las concentraciones de PLGA usadas en (µg/ml) (A). Imagen de eritrocitos tratados con NPs de PLGA a 250 µg/ml (B). El ensayo fue realizado por triplicado.

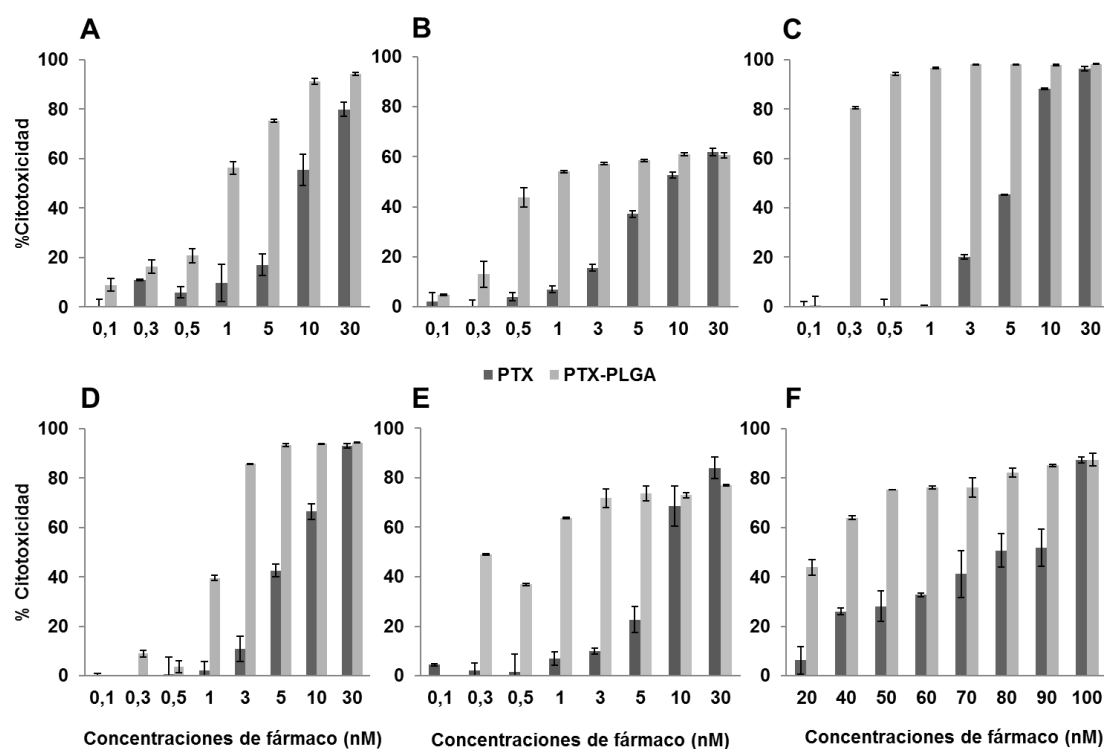
### 3.3.3.5. Ensayos de proliferación celular

Los resultados de los ensayos de proliferación celular indicaron que las NPs de PLGA sin fármaco no fueron tóxicas para ninguna de las líneas celulares testadas, ya sean tumorales (humanas y de ratón) como no tumorales, en la mayoría de las dosis testadas ( $p > 0,05$ ) (Figura 4). Tan solo en la línea celular E0771 aparecen diferencias con el control en la dosis más alta de 100 nM ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4.** Ensayo de toxicidad celular con NPs de PLGA. Las NPs de PLGA sin fármaco se testaron en todas las líneas celulares de mama (MCF-7, MDA-MB-231, T47D, SK-BR-3, MCF-10A, E0771) a diferentes concentraciones (0,1-100 nM) para determinar el porcentaje de proliferación celular. Las células se expusieron a las NPs durante 4 días con una renovación del medio y los tratamientos a las 48 h. Los datos han sido representados como la media  $\pm$  la desviación estándar de cultivos por triplicado.

Respecto a la toxicidad de las formulaciones con el fármaco, el PTX, tanto libre como transportado por las NPs de PLGA, mostró una respuesta dosis dependiente en todas las líneas celulares. Sin embargo, la citotoxicidad fue significativamente alta cuanto el PTX estaba cargado en las NPs de PLGA en comparación con el PTX libre ( $p < 0.05$ ) (Figura 5, Tabla 2). De hecho, el tratamiento con PTX cargado en las NPs de PLGA fue capaz de reducir la  $IC_{50}$  del fármaco 1,74 veces (desde 9,13 a 5,24 nM) en la línea celular MCF-7. Esta reducción de la  $IC_{50}$  del PTX, llegó a ser de 3,03 veces en la línea E0771. Sin embargo, también se observó reducción de la  $IC_{50}$  del fármaco en la línea celular no tumoral MCF-10A.



**Figura 5.** Ensayo de proliferación celular con NPs de PLGA cargadas con PTX. Las líneas celulares MCF-7 (A), MDA-MB-231(B), T47D (C), SK-BR-3 (D), MCF-10A (E) y E0771 (F), fueron tratadas con las NPs de PLGA cargadas con PTX y con el PTX libre. Los cultivos celulares sin tratamiento fueron usados como controles negativos. La proliferación celular se determinó mediante en ensayo de la SRB (ver sección de material y métodos). El porcentaje de citotoxicidad fue medido después de 4 días de incubación con los tratamientos en un rango de concentraciones (0,1 a 100 nM) con una renovación del medio y los tratamientos a las 48 h. Los datos han sido representados como la media  $\pm$  la desviación estándar de cultivos por triplicado.

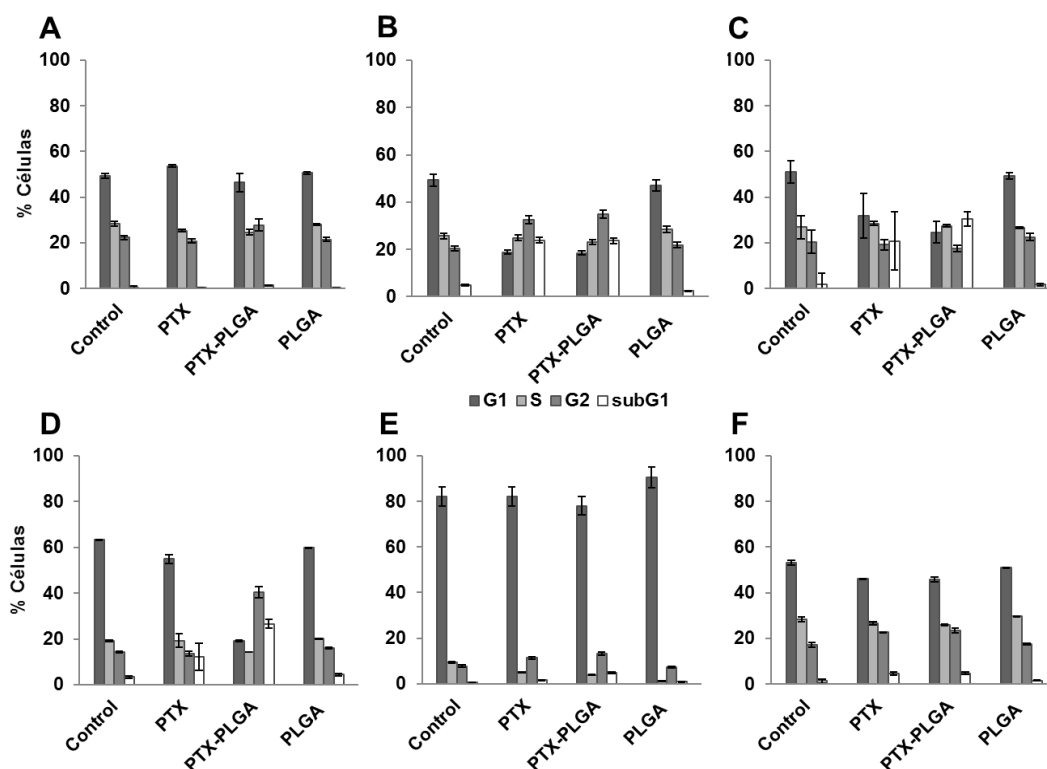
**Tabla 2.** IC<sub>50</sub> del PTX y PTX-PLGA en líneas celulares de mama de tejidos tumorales y no tumorales humanos y de ratón.

Línea celular	PTX IC <sub>50</sub> (nM)	PTX-PLGA IC <sub>50</sub> (nM)	*Veces que reduce la IC <sub>50</sub>
MCF-7	9,13	5,24	1,74
MDA-MB-231	20,08	15,36	1,31
T47D	5,6	3,96	1,41
SK-BR-3	6,7	4,94	1,36
MCF-10A	8	3,6	2,23
E0771	74,6	24,6	3,03

\* Veces que el PTX cargado en las NPs de PLGA reduce la IC<sub>50</sub> del PTX libre

### ***3.3.3.6. Análisis del ciclo celular***

El perfil del ciclo celular de las líneas tratadas con las NPs de PLGA cargadas con PTX se analizó para comprobar si la encapsulación del PTX mediante el uso de NPs puede modificar el patrón de ciclo celular en comparación con el tratamiento con el PTX libre. Los resultados muestran que el PTX transportado por NPs de PLGA induce un arresto en la fase G<sub>2</sub>/M, similar al que produce el tratamiento con PTX libre. Sin embargo, la línea SK-BR-3 tiene un alto porcentaje de células en la fase G<sub>2</sub>/M (26.7% más) con el tratamiento con las NPs PTX-PLGA en comparación con el PTX solo (Figura 6). Asimismo, la línea celular MCF-7 también mostró un pequeño incremento en este porcentaje de células después del tratamiento con las NPs de PTX-PLGA (7,05% más). Además, en las líneas celulares T47D y SK-BR-3 pudo observarse un ligero incremento del porcentaje de células que se encuentran en la fase subG<sub>1</sub> en comparación con el PTX libre (aumento del 9,74% y 14,3% respectivamente). Las células tratadas con PLGA sin fármaco, no mostraron diferencias en cuanto al patrón de ciclo celular en comparación con el control negativo de células sin tratamiento.

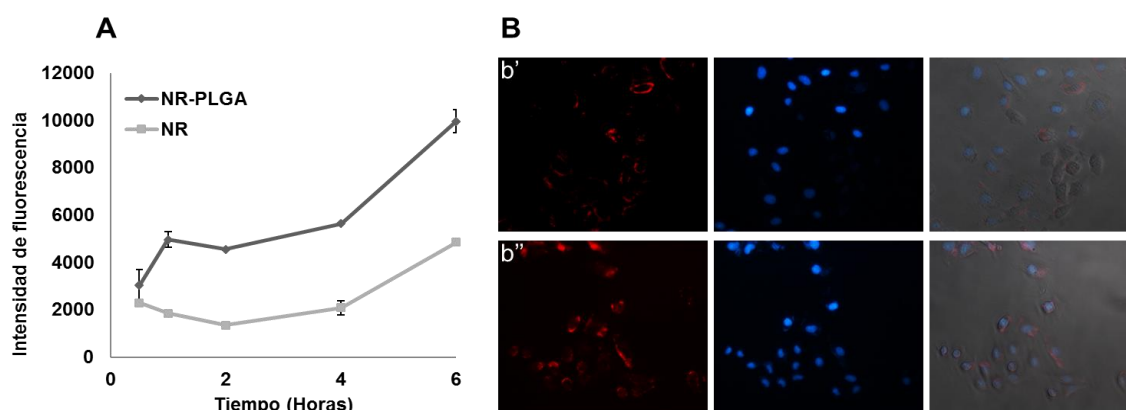


**Figura 6.** Análisis del ciclo celular en células tratadas con NPs PTX-PLGA. Las líneas celulares MCF-7 (A), MDA-MB-231(B), T47D (C), SK-BR-3 (D), MCF-10A (E), E0771 (F) fueron tratadas con PTX libre, PTX transportado por NPs de PLGA y NPs de PLGA sin fármaco a su respectiva dosis de IC<sub>50</sub> del PTX durante 48 h. Las células sin tratamiento fueron utilizadas como control negativo. Los resultados están expresados como el porcentaje de células marcadas en cada una de las fases del ciclo celular. Los datos han sido representados como la media  $\pm$  la desviación estándar de cultivos por triplicado.

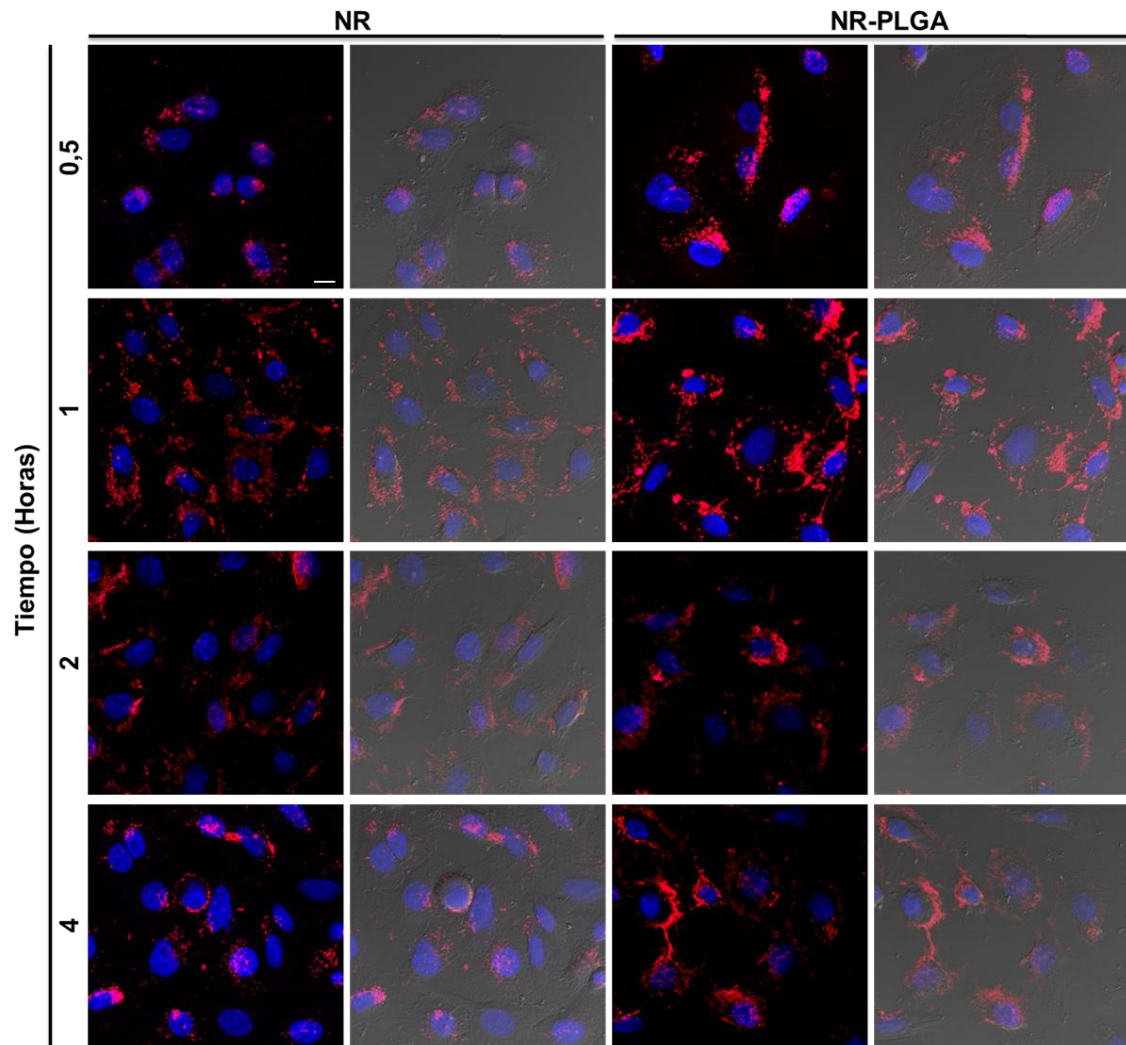
### 3.3.3.7. Ensayos de internalización celular

Las células fueron tratadas con NPs de PLGA cargadas con NR para comprobar si las NPs efectivamente son capaces de internalizar la molécula transportada en las células. Para este propósito, la internalización celular fue observada mediante citometría de flujo y microscopía, tanto de fluorescencia como confocal, comparando células tratadas con NR y NR transportado en NPs de PLGA. Los resultados de citometría de flujo mostraron que la internalización celular fue mayor en el caso del NR transportado por NPs de PLGA en comparación con el NR libre.

La internalización celular fue muy similar entre el NR y NR-PLGA en los tiempos de exposición iniciales (0,5h), pero la internalización de NR-PLGA aumenta respecto al NR a partir de la primera hora de exposición en la línea celular MCF-7 (Figura 7A) de manera notable. Concretamente, la internalización celular del NR-PLGA fue mayor que el NR en los siguientes porcentajes: 24,5, 62,5, 70,1, 63 y 51,3% para tiempos de exposición desde 0,5 a 4 horas respectivamente. Este aumento en la incorporación celular, también se ve reflejado en los resultados que obtuvimos mediante microscopía de fluorescencia, donde se puede observar mayor intensidad de fluorescencia en las imágenes de células tratadas con NR-PLGA en comparación con NR (Figura 7B). Por último, también se observó mediante microscopía confocal la incorporación de NR-PLGA en la línea MCF-7. Las imágenes muestran una mayor intensidad de fluorescencia con las células tratadas con NR-PLGA en todos los tiempos de exposición (Figura 8).



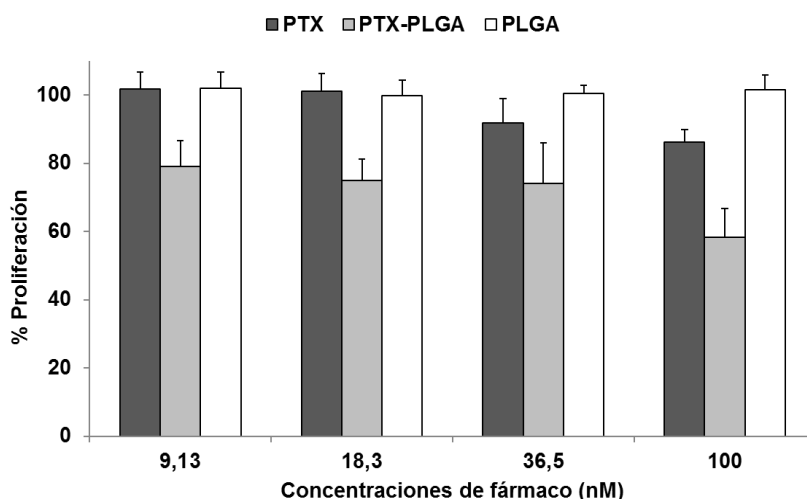
**Figura 7.** Internalización celular del NR transportado en NPs de PLGA. La internalización celular del NR fue determinada cuantitativamente mediante citometría de flujo en la línea celular MCF-7 tratada con NR y NPs de PLGA cargadas con NR ( $0,5 \mu\text{M}$ ) desde 0,5 a 6 h (A). Los ensayos fueron realizados en duplicado (media  $\pm$  desviación estándar). La internalización celular del NR fue determinada cualitativamente mediante microscopía de fluorescencia en la línea celular MCF-7 (B) tratada con NR libre (b') y NR cargado en las NPs de PLGA (b'') ( $0,05 \mu\text{M}$ ). Las imágenes mostradas en la figura fueron obtenidas a las 4 h de exposición al fármaco y a un aumento de  $20\times$ .



**Figura 8.** Imágenes de microscopía confocal de la línea celular MCF-7 tratada con NR cargado en NPs de PLGA. La línea celular MCF-7 se trató con NR cargado en NPs de PLGA y NR libre (0,05  $\mu\text{M}$ ) a diferentes tiempos de exposición (desde 0,5 a 4 h) y se tiñeron sus núcleos celulares con 5  $\mu\text{g/mL}$  de Hoechst 33258. La figura muestra imágenes superpuestas de los tratamientos a diferentes tiempos de exposición con NR o las NPs NR-PLGA y Hoechst 33258 (imágenes con fondo oscuro) y además con la superposición de imágenes tomadas en campo claro (imágenes con fondo gris) (barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ ).

### 3.3.3.8. Tratamiento de esferoides tumorales multicelulares

Para determinar la efectividad de las NPs de PTX-PLGA en un sistema que limita el acceso del fármaco a todas las células tumorales, generamos MTS a partir de la línea celular MCF-7. Los resultados mostraron que los MTS analizados mediante CCK-8 y que se trataron con las NPs PTX-PLGA mostraron una disminución significativa de la proliferación celular en comparación con los MTS tratados con PTX desde la primera dosis administrada ( $p < 0,05$ ). Por otra parte, los MTS tratados con las NPs blancas de PLGA no experimentaron cambios en su viabilidad, siendo ésta alrededor del 100% en todas las dosis ( $p > 0,05$ ) (Figura 9).

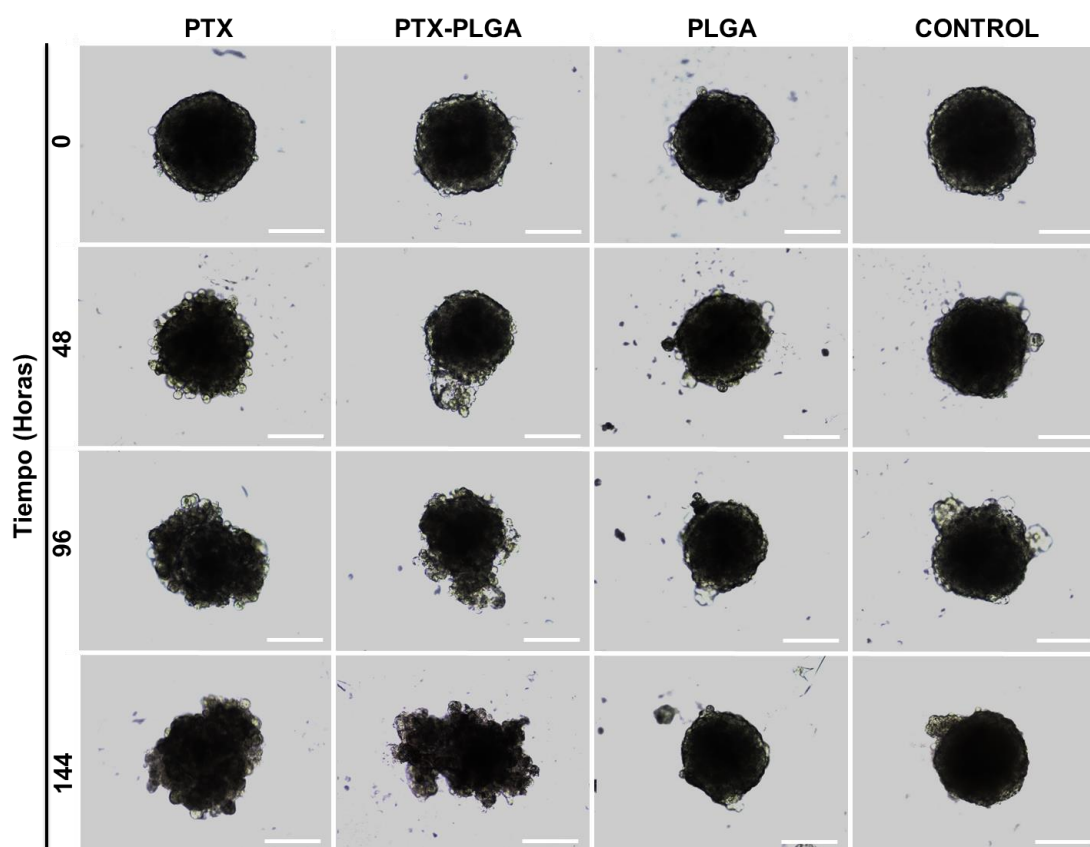


**Figura 9.** Ensayo de proliferación con CCK-8 de los MTS de la línea celular MCF-7, de MTS tratados con PTX, PTX-PLGA y PLGA tras 96 h de exposición a diferentes dosis. Los MTS que no fueron tratados se utilizaron como controles negativos. Los datos han sido representación como la media  $\pm$  la desviación estándar de MTS por octuplicado.

Sin embargo, en cuanto a la evolución del volumen de los MTS, a priori los MTS que presentan un volumen más reducido son los tratados con el fármaco libre, como podemos observar en la figura, siendo más pequeños, pero también más compactos (Figura 10). En cuanto a las imágenes de microscopía (Figura 11) tomadas de los MTS sometidos a los diferentes tratamientos, muestran diferencias en el tamaño y la compactación de las estructuras: los MTS tratados con PTX-



PLGA presentan una disgregación más temprana, mostrando una superficie más desorganizada que los MTS tratados con PTX libre, que tardan más en desorganizarse y muestran una superficie más compacta. Esta no reducción tan evidente del volumen en el caso de los MTS tratados con PTX-PLGA, podría deberse a su disgregación temprana tras recibir el tratamiento, mucho más rápida que en el caso de los MTS tratados con PTX y mostrando una superficie más desorganizada (Figura 11), pudiendo estar relacionada esta pérdida de integridad del MTS con el decrecimiento de la proliferación celular observada anteriormente mediante CCK-8.



**Figura 11.** Imágenes representativas de la evolución de los volúmenes de MTS de la línea celular MCF-7. En las imágenes pueden observarse MTS no tratados, tratados con PLGA, PTX y PTX transportado en las NPs de PLGA a una dosis de 36,5 nM y la concentración equivalente de NPs de PLGA sin fármaco (día 0, 2, 4 y 6 del experimento, desde la primera administración). El volumen de los MTS fue calculado midiendo su diámetro más largo y el más corto (ver la sección material y métodos) (barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ ; aumento 10 $\times$ ).



## **4. Discusión**

---



A pesar de los recientes avances en las posibilidades terapéuticas que poseemos para luchar contra el cáncer (cirugía, radioterapia y quimioterapia) y sus posibles combinaciones, existen limitaciones en su uso que hacen necesario el desarrollo de nuevas estrategias que mejoren los resultados actuales. En el caso concreto de la quimioterapia, las limitaciones son muy diversas y pueden estar relacionadas con la pobre solubilidad del agente para ser administrado y la necesidad de utilizar solventes tóxicos (*i.e.* PTX), una rápida metabolización y una corta vida media en el torrente sanguíneo que limitan la llegada de fármaco al tejido tumoral (*i.e.* 5-FU) o su actividad tóxica sobre células normales (*i.e.* DOX). A estas limitaciones, debemos sumar la pérdida de efectividad de algunos agentes quimioterapéuticos que, tras mejorar inicialmente la progresión de la enfermedad, dejan de ser efectivos por el desarrollo de resistencia (resistencia a múltiples fármacos o MDR).

En este contexto, la nanotecnología aplicada al transporte de fármacos antitumorales es una nueva herramienta que pretende superar estas limitaciones a través del diseño de nanoformulaciones específicas ya sea para solubilizarlos, protegerlos de su rápida eliminación y degradación, aumentar su especificidad frente a un determinado tipo de tejido, o evitar o bloquear los posibles mecanismos de resistencia que pudieran afectar su actividad. Además, estas nanoformulaciones permiten realizar terapia de asociación transportando varios fármacos a la vez, alcanzar estructuras protegidas por barreras especiales (*i.e.* barrera hematoencefálica), e incluso, monitorizar los tratamientos mediante técnicas de imagen. Nuestro trabajo de investigación aborda el desarrollo y análisis de diferentes tipos de nanoformulaciones (PBCA, PCL y PLGA) asociadas a fármacos antitumorales (DOX, 5-FU y PTX) con el objeto de mejorar su efectividad frente al cáncer de mama, pulmón y colon.

Hemos desarrollado estas nuevas formulaciones mediante protocolos de síntesis totalmente reproducibles basados en modificaciones de los métodos de emulsión/polimerización, disposición interfacial de polímeros y nanoprecipitación. En todos los casos, hemos conseguido sintetizar NPs biodegradables, con carga negativa en superficie, adecuadas para su administración intravenosa, con forma

esférica y con diámetros inferiores a 250 nm, facilitando así la acumulación e internalización de la molécula transportada en las células (Decuzzi y cols., 2009). Las NPs cuyas condiciones de síntesis presentaron los mejores perfiles de carga y liberación del fármaco fueron seleccionadas para realizar los ensayos en modelos de cáncer tanto *in vitro* como *in vivo*.

En relación a las NPs de DOX-PBCA, los mejores perfiles de carga de fármaco fueron obtenidos adicionando monómeros de cianoacrilato a la solución, justo antes de la formación de la NP, debido al establecimiento de puentes de hidrógeno entre el fármaco y el polímero en formación, a la dificultad del fármaco para escapar de la red polimérica y a la interacción entre la carga positiva del fármaco y la negativa de la matriz polimérica (Gaihre y cols., 2009; Poupaert y Couvreur, 2003, 2003; Yu y cols., 2008). Además, la NP fue optimizada reduciendo su tamaño y aumentando la eficiencia de encapsulación de DOX (del 50% al 80%) mediante la modificación de sus condiciones de síntesis entre las que se encontró el aumento de la velocidad de agitación durante la polimerización del monómero y el cambio de tensioactivo (Pluronic F-68 por dextrano 70).

En las NPs de PLGA, el uso de trehalosa (5% p/v) mejoró su estabilidad en medio acuoso, y esta estabilidad fue proporcional a la concentración de este crioprotector (Abdelwahed y cols., 2006), y facilitó su conservación en congelación. De hecho, tras varios ciclos de congelación/descongelación, estas NPs apenas sufrieron cambios de tamaño, a diferencia de las NPs sin trehalosa que llegaron a aumentar su tamaño hasta en un 165%. Este efecto protector de la trehalosa ha sido observado por otros autores que han destacado su efecto positivo como agente estabilizador en la congelación de partículas de PLGA (Fonte y cols., 2016a; 2016b; Holzer y cols., 2009). En relación al transporte de PTX, el aumento de la concentración de fármaco (2.25; 4.5; 6.75 mg) no alteró significativamente la eficiencia de encapsulación (EE%) cuando el peso del polímero se mantuvo constante (45 mg). En todos los casos se obtuvieron porcentajes de encapsulación superiores al 85%, siendo los valores más altos los obtenidos para concentraciones de PTX del 5% p/p. La existencia de una gran cantidad de polímero redujo significativamente la pérdida del PTX durante el proceso de síntesis, lo que

representa un importante avance para el uso de las NPs de PLGA que poseen como gran inconveniente el no poder encapsular grandes cantidades de fármaco (Danhier y cols., 2012).

Por último, las NPs estudiadas poseen en general, una liberación bifásica del fármaco con una fase de liberación rápida que puede corresponderse a la liberación del fármaco que queda adherido en la superficie y posteriormente una liberación mucho más lenta y sostenida del fármaco que está inmerso en la matriz del polímero ya por la desintegración de la NP, la difusión del fármaco a través de la matriz polimérica o ambas (Arias y cols., 2008; Danhier y cols., 2012; Gibaud y cols., 2004; Graf y cols., 2009; Kumari y cols., 2010; Ortiz y cols., 2012; Pohlmann y cols., 2013; Pridge y cols., 2009; Sadat Tabatabaei Mirakabad y cols., 2014).

#### **4.1. Las nanopartículas poliméricas de PBCA y PCL mejoran el efecto citotóxico *in vitro* de la DOX en cáncer de pulmón y mama**

Las NPs de PBCA y PLC vacías (sin fármaco) mostraron una excelente biocompatibilidad en los modelos *in vitro* de cáncer de mama y pulmón. De hecho, no fue observada ninguna toxicidad cuando se usaron en las líneas tumorales humanas MCF-7 y A549 y de ratón E0771 y LL2 derivadas de cáncer de mama y pulmón, respectivamente. Además, en el caso de las NPs de PCL, tampoco fue detectada toxicidad cuando se usaron cultivos de la línea no tumoral de cardiomiocito de rata H9C2. La biodegradabilidad y biocompatibilidad de las NPs es fundamental en la vehiculización de fármacos antitumorales ya que les permiten ser meros transportadores del fármaco, sin dar lugar a ningún efecto adverso y desapareciendo del organismo tras su degradación (Vert y cols., 1992; Woodruff y Hutmacher, 2010). Nuestros resultados indican que las nanoformulaciones generadas son un sistema seguro para el transporte de biomoléculas, que pueden ser usadas en experiencias *in vivo* y que el efecto citotóxico inducido es provocado sólo por las moléculas de fármaco transportadas.

Los estudios *in vitro* en los que se comparó el efecto citotóxico de la DOX en su forma libre y transportada por NPs de PBCA y PCL (DOX-PBCA o DOX-PCL) sobre las líneas tumorales anteriormente mencionadas, demostraron que las nanoformulaciones indujeron claramente una mayor inhibición de la proliferación celular. Esta inhibición pudo ser detectada en algunos tipos celulares, como MCF-7 y E0771, con tiempos de exposición muy cortos (tan sólo 8h). Estudios previos describen resultados similares utilizando NPs de PBCA con otros agentes antitumorales como epirubicina en la línea celular A549 (Yordanov y cols., 2013) o cisplatino en células tumorales de ovario (Doun y cols., 2014). No obstante, hasta la fecha no se ha descrito ningún incremento significativo en la actividad antitumoral de DOX asociada al uso de NP de poli(alquilcianoacrilato). Autores como Wohlfart y cols., (2011a; 2011b) han podido demostrar la mejora de la actividad antitumoral de la DOX transportada por NPs poli(isohexilcianoacrilato) (PIHCA) en células de glioblastoma de rata (101/8). En la línea de glioma C6 el uso de DOX-PBCA redujo la IC<sub>50</sub> del fármaco hasta 1,22 veces (Zhang y cols., 2016). Otros autores como Duan y cols., (2012b) también han conseguido observar una reducción significativa en la proliferación celular inducida por DOX cuando esta fue asociada a NPs de quitosán/PBCA pero sólo tras su funcionalizadas con ácido fólico.

En general, la citotoxicidad de las antraciclina aumenta cuando son vehiculizadas en NPs de PBCA. No obstante, en algunos casos, esta asociación (fármaco/NP-PBCA) puede suponer una limitación en el tratamiento al impedirse la liberación del agente antitumoral. Evangelatov y cols., (2016) describe este efecto usando NPs de PBCA que vehiculizan epirubicina y que mostraron un menor porcentaje de muerte celular en comparación con la epirubicina libre en células HeLa. El mecanismo por el cual un fármaco es más activo asociado a una NPs y los mecanismos de regulación de su actividad está aún por determinar. Una de las causas podría ser el uso de tensioactivos que ejerzan alguna acción sobre los mecanismos de resistencia a fármacos o aumenten la permeabilidad de la membrana plasmática (Ambruosi y cols., 2006; Li-Blatter y cols., 2009). De hecho, se ha propuesto que el uso de surfactantes no iónicos como el Pluronic® F-68 (utilizado



en nuestro trabajo de investigación para sintetizar varias nanoformulaciones) podría contribuir al aumento de la citotoxicidad (Yordanov y cols., 2012; 2013).

Por otra parte, las NPs de PCL asociadas a DOX fueron capaces de reducir la  $IC_{50}$  del fármaco entre 2,3 y 2,75 veces para células de cáncer de pulmón y entre 7,8 y 65 veces para células de cáncer de mama. Además, fue extremadamente interesante el hecho de que estas nanoformulaciones DOX-PCL no incrementaron la toxicidad del fármaco en células cardíacas (línea H9C2). Otros autores también han mostrado un mayor efecto antiproliferativo de diferentes fármacos antitumorales cuando son vehiculizados en NPs de PCL. Así, el celastrol asociado a PCL aumentó su actividad citotóxica hasta un 40% en la línea de carcinoma prostático PC3 en comparación con el fármaco libre (Sanna y cols., 2015). La quercetina cargada en un copolímero que contiene PCL disminuyó su  $IC_{50}$  hasta 4,6 veces en la línea de cáncer de mama SK-BR-3 (Suksiriworapong y cols., 2016) y el carboplatino hasta 3,06 veces en la línea de glioblastoma-astrocitoma U-87 MG (Karanam y cols., 2015). Además, NPs de PCL y PEG cargadas con DOX mostraron una reducción en la  $IC_{50}$  del fármaco de unas 1,84 veces en la línea celular T47D y de 1,85 veces en la línea celular MCF-7 (Eatemadi y cols., 2016).

Por otra parte, las NPs de PCL consiguieron mejorar la actividad citotóxica de la DOX en células de cáncer de mama y pulmón en comparación con otras nanoformulaciones. De hecho, hemos demostrado una notable mejora de la citotoxicidad de DOX-PCL frente a la línea A549 de cáncer de pulmón en comparación con la descrita por Arunraj y cols., (2013) quienes, utilizando nanogeles compuestos por quitina y PCL-DOX, aumentaron 1,6 veces la  $IC_{50}$  de la DOX. Nuestras NPs PCL-DOX también poseen mucho mayor efecto sobre células de cáncer de mama (MCF-7) que las NPs mesoporosas de sílice con DOX utilizadas por Gao y cols., (2011) o los polímeros de fosfato de calcio utilizados por Min y cols., (2012). Recientemente, NPs conjugadas con el péptido Smac han reducido la  $IC_{50}$  de la DOX 2,22 veces en la línea MDA-MB-231 (Li y cols., 2015), en contraste con las 7,8 o 65 veces que la redujeron las NPs de DOX-PCL en las líneas MCF-7 y E0771, respectivamente. Por último, se han mostrado reducciones de la  $IC_{50}$  de la

DOX vehiculizada en NPs de PCL-PEG de 1,84 y 1,85 veces en las líneas humanas de cáncer de mama T47D y MCF-7 (Eatemadi y cols., 2016).

La internalización de fármacos hacia las células tumorales puede ser facilitada mediante el uso de NPs poliméricas dando lugar a un incremento de su actividad antitumoral (Zheng y cols., 2011). Para determinar el papel que juegan las NPs de PBCA y PCL en la internalización del fármaco DOX en las células tumorales de mama y pulmón, se utilizaron citometría de flujo y microscopía de fluorescencia con varios tiempos de exposición a DOX y DOX-NPs. En todos los casos, se pudo observar una mayor intensidad de fluorescencia de DOX dentro de las células cuando estaba vehiculizada por las NPs de PBCA y PCL en comparación con la DOX libre. Esta fluorescencia se incrementó progresivamente con el tiempo de exposición, lo que sugiere que las NPs pueden mejorar la incorporación del fármaco dentro de las células. Mediante citometría de flujo y utilizando DOX-PBCA, hemos podido observar incrementos en la internalización de DOX de un 32,1% y 64,8% en células LL/2 y A549 en los tiempos más largos de exposición y en comparación con la DOX libre. Otros autores, como Karanam y cols., (2015) también han mostrado una mayor presencia del fluorocromo FITC en las células U-87 MG cuando fue transportado por NPs de PCL. De la misma forma, células HeLa tratadas con NPs de PBCA asociadas a epirubicina mostraron una mayor intensidad de fluorescencia en comparación con las células tratadas con epirubicina libre (Evangelatov y cols., 2016).

Por otra parte, el uso de NPs puede inducir cambios en la localización intracelular del fármaco. Así, las células tratadas con DOX libre presentaron una localización preferentemente nuclear en todas las líneas celulares. Por el contrario, el uso de DOX-PBCA y DOX-PCL provocó presencia de fármaco también en el citoplasma, sobre todo tras periodos cortos de exposición, lo que podría deberse a la continua liberación del mismo desde el polímero (Cheng y cols., 2012; Li y cols., 2013). Resultados similares han sido observados en la línea celular A549, lo que sugiere que las NPs facilitan la entrada del fármaco a las células pero que también dificultan su llegada inmediata al núcleo (Yordanov y cols., 2013a). Otros estudios han mostrado que, mientras que el FICT transportado por copolímeros de PEG-

PCL-polietilenimina y cargados con DOX se localizó en el citoplasma en la línea 4T1 de cáncer de mama de ratón, la localización de la DOX libre fue mayoritariamente nuclear (Guo y cols., 2015). Asimismo, ha podido ser observada una mayor concentración de cumarina en el citoplasma celular, con el uso de NPs de PCL modificadas con d-alfa-tocoferol polietilenglicol 1000 y asociadas a este agente y una mayor intensidad de fluorescencia en células tratadas con FITC vehiculizado en NPs de PCL (Karanam y cols., 2015; Suksiriworapong y cols., 2016). Además, el tratamiento con NPs de epirubicina-PBCA produjo una localización preferente de este fármaco en el citoplasma. Estos autores demostraron que la entrada de estas NPs cargadas de fármaco se produjo vía endocitosis y que esta diferente vía de entrada en comparación con el fármaco libre podría ser la causa de la diferente localización intracelular y de las diferencias en la intensidad de fluorescencia (Evangelatov y cols., 2016).

Algunos autores han sugerido que la presencia de tensioactivos en las NPs podría alterar las proteínas de transporte de membrana, aumentando así, la entrada del fármaco en las células (Yordanov y cols., 2012; 2013a). Sin embargo, otros autores atribuyen las diferencias de localización del fármaco a los diferentes mecanismos de entrada de la DOX en la célula, que puede ser por difusión simple para la DOX libre y por endocitosis, pinocitosis o fagocitosis para la DOX vehiculizada por NPs (Hillaireau y Couvreur, 2009; Upadhyay y cols., 2010; Ren y cols., 2011; Ma y cols., 2013; Evangelatov y cols., 2016). Así, se ha hipotetizado sobre la posibilidad de que el fármaco asociado a las NPs sea demasiado grande para atravesar la membrana plasmática y nuclear, siendo el fármaco nuclear resultado de una liberación previa desde las NPs (Sahay y cols., 2010; Iversena y cols., 2011). Por tanto, la DOX transportada en NPs, una vez dentro de la célula, podría ser liberada de la NP que se biodegrada en el endosoma, alcanzando finalmente el núcleo y ejerciendo su efecto citotóxico (Iversena y cols., 2011; Arora y cols., 2012).

La entrada de las NPs en las células puede estar influenciada por diversos factores físico-químicos de las propias NPs entre los que destacan su geometría o su carga de superficie (Zhang y cols., 2012b; Ma y cols., 2013). A pesar de que las NPs con carga positiva pueden interactuar mejor con las membranas celulares cargadas

negativamente y mejorar su internalización, se ha observado que éstas son detectadas más fácilmente *in vivo* por el sistema inmune. Por lo tanto, las NPs neutras o con carga negativa podrían ser más adecuadas para su aplicación clínica (Gratton y cols., 2008; He y cols., 2010). En cuanto a la geometría, la forma esférica se ha descrito como una de las más adecuadas para su internalización en las células tumorales (Chithrani y cols., 2006). Además, se ha planteado la hipótesis de que el aumento de la internalización celular de las NPs podría deberse a una mala regulación de la vía endocítica en las células tumorales (Mellman y Yarden, 2013; Elkin y cols., 2015). Esta podría ser una explicación para entender por qué no observamos una mayor citotoxicidad con DOX-PCL en relación a la DOX libre en la línea no tumoral H9C2.

Por otra parte, la demostrada mayor presencia de DOX dentro de las células tumorales cuando es transportada por NPs del tipo PBCA y PCL, podría explicar el aumento de citotoxicidad del fármaco tras los tratamientos de DOX-PBCA y DOX-PCL. Este hecho, ha podido observarse mediante MET en la línea MCF-7 tratada con DOX-PBCA, donde se produjo un mayor daño mitocondrial y alteraciones en el núcleo en comparación con el uso de DOX libre. Estas lesiones celulares parecen dependientes de la concentración intracelular de fármaco como se demostró en la línea H9C2 tratada con DOX (Sardão y cols., 2009). De hecho, la DOX puede interactuar con el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial aumentando el estrés oxidativo mediante la generación de ROS, alterando así el potencial transmembrana mitocondrial, aumentando la permeabilidad mitocondrial y reduciendo los niveles de ATP (Mordente y cols., 2012; Gharanei y cols., 2013; Carvalho y cols., 2014). Además, la DOX puede interferir en diversas vías metabólicas, como la glucólisis, la  $\beta$ -oxidación, fosfoliación oxidativa y la inducción de la peroxidación de las membranas celulares (Carvalho y cols., 2014; Stěrba y cols., 2011).

## 4.2. La DOX asociada a PBCA y PCL tiene un mayor efecto antitumoral en modelos *in vivo* de cáncer de mama y pulmón

Para determinar la actividad de las nuevas nanformulaciones de DOX *in vivo*, se realizaron experiencias utilizando la cepa de ratones inmunocompetentes C57BL/6 que fueron inoculados subcutáneamente con células tumorales E0771 de cáncer de mama y LL2 de cáncer de pulmón, ambas provenientes de la misma cepa de ratón. Durante y tras la administración de los tratamientos, se midió el volumen de los tumores, el peso de los ratones y se determinó su supervivencia. En el caso de las NPs de DOX-PCL también se analizó la toxicidad producida por el fármaco en tejidos y sangre de los ratones.

Las NPs de DOX-PBCA y DOX-PCL fueron capaces de reducir significativamente el volumen tumoral en comparación con el fármaco libre tanto en el modelo de cáncer de mama como en el de cáncer de pulmón. Así, pudimos demostrar que el tratamiento con DOX-PBCA inhibió un 40% más el volumen tumoral respecto al uso de DOX libre en ratones con tumores de mama. Estas mismas nanoformulaciones también produjeron una reducción significativa, aunque menor del volumen tumoral en el modelo de cáncer de pulmón. Las NPs de PCL cargadas con DOX, también disminuyeron significativamente el volumen tumoral en ambos modelos *in vivo*, siendo dicha reducción de aproximadamente un 36% en comparación el fármaco libre. Estos datos representan una mejora importante en la actividad del fármaco contra los tumores de mama y pulmón y respecto a otros resultados publicados (Attia y cols., 2013; Pu y cols., 2013; Zou y cols., 2013). Así, Yang et al. (2013) consiguió una reducción menor del volumen tumoral (21,4%) utilizando copolímeros de N-(2-hidroxipropil) metacrilamida (HPMA) cargados con DOX en comparación con los ratones tratados con DOX libre. Wang y cols., (2013), utilizando curcumina y DOX cotransportadas en micelas de PEG y NPs de PCL, también consiguió un resultado más limitado que el nuestro en ratones C57BL/6 con tumores subcutáneos inducidos con la línea LL2. Por el contrario, resultados similares a los nuestros han sido mostrados en modelos murinos con

xenoinjerto de cáncer de mama inducido con células MDA-MB-231, tratados con DOX vehiculizada en “nanobins” o en micelas no mineralizadas (Lee y cols., 2010; Min y cols., 2012). También, ciertas nanoformulaciones lipídicas fueron capaces de mejorar el efecto antitumoral de la DOX en modelos *in vivo* de cáncer de mama inducidos con la línea celular 4T1 (Fernandes y cols., 2016). Debido a que ninguna de las NPs estudiadas en este trabajo de investigación presenta funcionalización, podríamos atribuir el mayor efecto antitumoral observado, a la mayor acumulación en los tejidos tumorales del fármaco cuando es vehiculizado por las NPs lo que puede estar relacionado a su direccionamiento pasivo producido por el efecto EPR, aunque este aspecto no ha podido ser demostrado aún (Baban y Seymour, 1998; Maeda y cols., 2000, 2013; Moghimi y cols., 2001; Wang y Thanou, 2010).

Uno de los aspectos más importantes en el análisis de la actividad antitumoral de las nanoformulaciones *in vivo*, es la determinación de la toxicidad inducida, factor muchas veces limitante de su utilidad clínica. En nuestro estudio hemos podido demostrar que la DOX unida a las NPs no indujo en ningún caso una pérdida de peso de los ratones en relación a la DOX libre, siendo este hecho un indicador importante del no aumento de la toxicidad del tratamiento. Estos resultados son similares a los de otros autores que también utilizaron el peso de los ratones como un indicador de la toxicidad terapéutica (Petri y cols., 2007; Yang y cols., 2013). Así, basándonos en el trabajo de Yang y cols. (2013) quienes utilizaban DOX asociada a un copolímero en bloque, determinamos el cambio en el peso de los ratones durante el tratamiento con NPs DOX-PBCA en el modelo *in vivo* de cáncer de mama. Nuestros resultados mostraron una evolución similar del peso del grupo que no recibió tratamiento y del grupo tratado con NPs de PBCA sin fármaco. Sin embargo, durante los 15 días del tratamiento, los ratones tratados tanto con DOX como DOX-PBCA mostraron una significativa pérdida de peso en comparación con el grupo control. No obstante, fue muy relevante observar que dicha pérdida de peso fue significativamente menor con el uso de DOX-PBCA que con la DOX libre, lo que podría ser un indicio de que transportar el fármaco en estas NPs podría disminuir su toxicidad. Tras la finalización de la administración del tratamiento, los ratones recuperaron el peso, siendo éste al final de la experiencia (33

días) similar en ambos grupos. Otros estudios, si bien es cierto que realizados en otros tipos tumorales (gliomas intracraneales), no encontraron diferencias significativas en el peso de los ratones después del tratamiento con DOX y DOX-PBCA (Petri y cols., 2007).

Las NPs de DOX-PCL fueron sometidas a un estudio de toxicidad *in vivo* más amplio que incluyó la administración de una dosis única de DOX y de DOX-PCL de 10 mg/kg. Se pudo observar que a nivel tisular, la DOX libre produjo algunas lesiones en el tejido cardíaco acompañado de un aumento significativo en los niveles de CRP en suero. Además, la DOX libre alteró los parámetros sanguíneos de los ratones, reduciendo de forma significativa el valor WBC. Sin embargo, los ratones tratados con las NPs DOX-PCL no mostraron daño tisular ni modificación alguna de los valores WBC ni de los marcadores de daño cardiovascular (MMP-9, sVACM-1 y CRP) respecto a los valores control. Estos marcadores sanguíneos son comúnmente utilizados para detectar enfermedades cardiovasculares y se sabe que puede aumentar sus niveles en sangre, especialmente en el caso de CRP, cuando se administra DOX, (Chua y cols., 2016; Ky y cols., 2014; Okur y cols., 2016). Nuestros resultados sugieren que las NPs de PCL, no sólo aumentan la actividad antitumoral de la DOX, sino que son capaces de reducir su toxicidad cardíaca y sanguínea. Esto podría ser debido a un patrón de biodistribución diferente del fármaco cuando es transportado por NPs, haciendo que se acumule menos DOX en el tejido cardíaco (Chen y cols., 2013, 2016; Tran y cols., 2014; Xie y cols., 2014). Por otra parte, ninguno de los tratamientos experimentados produjo pérdida de peso o alteraciones en otros tejidos como los pulmones o el hígado, si bien es cierto que este hecho puede estar relacionado con la dosis de fármaco administrada (Zhu y cols., 2014). Otros autores como Sun y cols., (2016) también han mostrado una disminución de la toxicidad de la DOX transportada por NPs de monometoxi PEG-PCL en ratones con melanoma. De igual forma, Chen y cols., (2016) obtuvo resultados similares con DOX y PTX vehiculizados en NPs de PCL con las que se co-trataron ratones BALB/c “nude” que portaban tumores subcutáneos inducidos por la línea KBv.



Finalmente, y en cuanto a la supervivencia de los ratones, los resultados encontrados fueron diversos. Así, en el modelo de cáncer de mama tratado con las NPs DOX-PCL y DOX-PBCA, no se encontraron diferencias significativas de supervivencia respecto al fármaco libre, así como en el modelo de cáncer de pulmón con nanopartículas de DOX-PBCA. Estos resultados variables en lo que a supervivencia se refiere, podrían deberse a tiempos de tratamiento relativamente cortos para observar modulaciones en esta variable, aunque puedan permitir determinar diferencias en cuanto a volumen tumoral y toxicidad. No obstante, la posible aplicación de una pauta de nanoformulaciones con menores dosis de DOX, dada la mayor actividad antitumoral observada, podría disminuir la toxicidad sistémica del fármaco y por tanto, en lo que se refiere a la influencia de este factor en la mortalidad de los de ratones, mejorar su supervivencia.

### **4.3. Las nanopartículas de PBCA y PCL mejoran el efecto citotóxico del 5-FU en modelos *in vitro* de cáncer de colon**

Los estudios *in vitro* utilizando 5-FU transportado por las NPs de PBCA y PCL, demostraron que su efecto antiproliferativo fue mayor que el del 5-FU libre en todas las líneas celulares testadas (T84, HT29, HCT15, CCD18, MC38). Los resultados más relevantes fueron los obtenidos en la línea celular humana de cáncer de colon T84 donde se observó que la NP 5-FU-PCL fue capaz de reducir el valor de la  $IC_{50}$  del fármaco en unas 45 veces. Además, en la mayoría de las líneas testadas las NPs de PBCA y PCL por sí solas no fueron tóxicas como fue mostrado en estudios anteriores (Kuo-Yung C y Yu-Der, 2009; Hadjikirova y cols., 2005). Estos resultados demuestran, por tanto, un gran efecto citotóxico de nuestras nanoformulaciones sobre las líneas celulares usadas, en relación a otros estudios previos con otras nanopartículas transportadoras de 5-FU. Tal es el caso de NPs de PLGA que fueron capaces de disminuir la  $IC_{50}$  del 5-FU en la línea HT29 tan sólo 4 veces (Wang y cols., 2015) o NPs de quitosano que solo incrementaron la inhibición de la



proliferación de la línea SW480 en un 20% en comparación con el fármaco libre (Cheng y cols., 2013). Jain y Jain (2008) demostraron que las NPs de quitosano y ácido hialurónico cargadas con 5-FU incrementaron en 2,6 veces la toxicidad del fármaco frente a la línea HT29. Estos resultados fueron mejorados usando ácido fólico (Li y cols., 2011). En el caso de copolímeros de poly( $\gamma$ -bencil-L-glutamato) y PEG cargados con 5-FU, se observó un incremento de la inhibición del crecimiento celular en la línea de cáncer de colon LoVo así como un aumento de la vida media en plasma del 5-FU (Li y cols., 2008). Asimismo, se produjo una mayor reducción de la viabilidad celular en la línea HT29 mediante el uso del 5-FU vehiculizado en NPs lipídicas sólidas y en SPIONs transportadores de pectina (Dutta y Sahu, 2012). El estudio de Ortiz y cols., (2012) demostró que las NPs de PCL incrementaron el efecto antitumoral del 5-FU en la línea SW480, mientras que Zhang y cols., (2011) demostró que las NPs de PCL funcionalizadas con ácido fólico pueden incrementar el efecto citotóxico del 5-FU en las células de cáncer de colon. La doxifluridina (un profármaco del 5-FU) también ha sido cargado en NPs de PCL demostrando un importante efecto antiproliferativo en la línea celular HT29 (Wang y Peng, 2011). En cuando a las NPs de PBCA cargadas con 5-FU, han mostrado una buena tolerancia en el caso del carcinoma basocelular superficial (Hadjikirova y cols., 2005).

La gran reducción de la proliferación celular observada con los tratamientos con 5-FU-PBCA y 5-FU-PCL podría deberse a una internalización celular más rápida del fármaco cuando éste es transportado en NPs, aumentando así su concentración intracelular. Como comentamos previamente, dicha internalización depende no solo de las características físico-químicas de la NP, sino también del proceso que intervenga en su internalización celular como por ejemplo, la endocitosis (Harush-Frenkel y cols., 2008; Mosesson y cols., 2008).

Por otra parte, a pesar de la variedad de estudios *in vitro* que existen con NPs vehiculizadoras de 5-FU, son pocos los estudios *in vivo* que nos permitan conocer la efectividad de estos nanocompuestos para su posible uso clínico.

Para asegurar el potencial terapéutico de las NPs 5-FU-PBCA y 5-FU-PCL se analizó su comportamiento *in vivo* utilizando ratones con tumores de colon inducidos. Se pudo observar que en los ratones tratados con 5-FU-NPs se produjo una significativa reducción del volumen tumoral que fue mucho mayor que la observada con el fármaco libre. El tratamiento con las NPs de 5-FU-PCL produjo una mayor reducción tumoral (64%) que el tratamiento con NPs de 5-FU-PBCA (51%). En comparación con otros estudios, el efecto antitumoral del 5-FU fue mayor que el observado en NPs de quitosano cargadas con 5-FU en un modelo ortotópico de cáncer de hígado de ratón (Cheng y cols., 2014).

El análisis de la tasa de supervivencia demostró que, a pesar de la reducción del volumen tumoral producida por el 5-FU libre, dicha tasa no se modificó respecto a los ratones controles. Por el contrario, la supervivencia de los ratones fue significativamente mayor en aquellos que fueron tratados con 5-FU-PBCA y 5-FU-PCL en comparación con los ratones sin tratamiento y ratones tratados con NPs sin fármaco y 5-FU libre. Esto podría deberse a un aumento de la baja especificidad que posee el 5-FU, que es capaz de afectar no solo a las células tumorales, sino también a los tejidos sanos, aunque este aspecto no ha podido ser demostrado (Llorca y cols., 2005).

El mecanismo por el que el 5-FU cargado en las NPs puede incrementar su actividad antitumoral aún no está totalmente dilucidado. Sin embargo, sus características físico-químicas, especialmente su tamaño nanométrico, podría ser responsable de una mayor acumulación en los tejidos tumorales debido al efecto EPR (Moghimi y cols., 2001). Este fenómeno se basa en la inusual estructura de los vasos sanguíneos que irrigan los tejidos tumorales (Baban y Seymour, 1998) y que presentan grandes espacios entre las células endoteliales y discontinuidades en la membrana basal, lo que altera la normal difusión de macromoléculas a través del tejido endotelial. Además, en los tejidos tumorales el aclaramiento de macromoléculas es deficiente debido a su baja circulación linfática (Maeda y cols., 2000). Será necesario realizar más estudios *in vivo* para

entender mejor el mecanismo por el que las NPs de 5-FU-PBCA y 5-FU-PCL aumentan el efecto antitumoral del fármaco.

#### **4.4. Mejora del efecto antitumoral *in vitro* del PTX mediante el uso de nanopartículas poliméricas de PLGA**

El polímero de PLGA, un polímero con alta biocompatibilidad, biodegradabilidad e interesantes propiedades físico-químicas, está siendo ampliamente analizado como candidato para el transporte de diferentes tipos de fármacos antitumorales (Parveen y Sahoo, 2008), entre los que se encuentran los que poseen baja solubilidad. Uno de ellos, el PTX, es un potente citotóxico de amplio espectro que sin embargo debe ser disuelto en Cremophor® EL para su uso; un solvente tóxico para los pacientes que puede inducir graves efectos secundarios (anafilaxia) (Adams y cols., 1993; Weiszhar y cols., 2012). En nuestro trabajo de investigación hemos desarrollado NPs de PLGA para el transporte de PTX con el objetivo de incrementar su efecto antitumoral y evitar el uso de solventes tóxicos.

Las NPs de PLGA sintetizadas se caracterizaron por poseer una excelente biocompatibilidad en todas las líneas celulares testadas, así como con los eritrocitos humanos. La biocompatibilidad y biodegradabilidad de este polímero ha sido previamente demostrada habiéndose aprobado su uso en humanos por la FDA (Acharya y Sahoo, 2011; Lü y cols., 2009). Esta buena biocompatibilidad y biodegradabilidad se debe, entre otros motivos, a que la degradación del polímero da lugar a ácido láctico y ácido glicólico, que son dos metabolitos normalmente presentes en las células y fácilmente metabolizables en el ciclo de Krebs (Acharya y Sahoo, 2011; Danhier y cols., 2012; Kumari y cols., 2010).

Demostrada la biocompatibilidad de nuestros sistemas, se generaron nanoformulaciones de PTX-PLGA para analizar su efecto antiproliferativo *in vitro*. Las NPs de PLGA cargadas con PTX produjeron un incremento de la actividad antitumoral del PTX de hasta 1,74 veces en células de cáncer de mama (MCF-7), en comparación con el efecto citotóxico del fármaco libre. Esta mejora en la citotoxicidad del fármaco asociado a PLGA también ha sido observada por otros

autores como Vicari y cols., (2008) quienes obtuvieron alrededor de un 25% más de citotoxicidad con el uso de PTX-PLGA en la línea celular humana de cáncer de mama MDA-MB-231 a las 48 h de exposición. Parveen y Sahoo, (2011) también han demostrado que NPs de PLGA-PTX cubiertas con PEG y quitosano, provocan una significativa reducción del valor de la IC<sub>50</sub> del PTX en la línea celular MCF-7 (de 10,2 ng/mL con el PTX libre a 0,8 ng/mL PTX-PLGA) tras 5 días de tratamiento. Por otra parte, el tratamiento de la línea celular MCF-7 con un copolímero de PLGA y dextrano cargado con PTX también mostró una significativa reducción de la IC<sub>50</sub> del fármaco (unas 2,2 veces) tras 96 h de exposición. Además, este mismo tratamiento en la línea MCF-7/Adr (que presenta un fenotipo de resistencia a multidrogas) consiguió una reducción de la IC<sub>50</sub> de PTX mucho mayor (7,8 veces) en comparación con el taxol libre (Liu y cols., 2015). Dicha reducción, sin embargo, no estuvo relacionada con la expresión de P-GP, sino con el mecanismo de entrada de las NPs en la célula que fue capaz de salvar la actividad de la bomba de eflujo (Liu y cols., 2015; Sahay y cols., 2008) haciendo al fármaco “invisible” al mecanismo de resistencia. Por último, los estudios *in vitro* demostraron una actividad antiproliferativa similar del PTX-PLGA y PTX libre en relación a líneas celulares tumorales y no tumorales. Resultados similares a los nuestros han sido obtenidos por Zubris y colaboradores (2013), quienes observaron que tanto el tratamiento con PTX libre como el PTX cargado en NPs, presentaron una toxicidad similar en líneas celulares tumorales de mama y líneas no tumoral (*i.e.* MCF-10A), no existiendo diferencias de internalización celular. Sin embargo, estudios *in vivo* demuestran un gran efecto antitumoral de estas NPs-PTX en comparación con el PTX libre (Liu y cols., 2013). Por tanto, nuestros resultados con la línea no tumoral humana de mama, no son necesariamente limitantes para el uso de la NPs-PTX ya que existen muchos más factores implicados en el efecto citotóxico de un fármaco vehiculizado por una NP en un sistema biológico, como es el efecto EPR, por el cual las NPs tienden a acumularse más en los tejidos tumorales debido a la estructura diferente y más desorganizada de sus vasos sanguíneos (Maeda y cols., 2001, 2009; McGuire y Markman, 2003).

El análisis de la internalización de nuestras NPs en las células fue llevado a cabo mediante el uso de NPs transportadoras de NR, fluoróforo que permite monitorizar el recorrido de dichos nanocomplejos en el interior celular. Nuestros resultados demuestran que, incluso con tiempos cortos exposición, las células tratadas con NPs de NR-PLGA presentaron una mayor intensidad de fluorescencia que las tratadas NR libre, indicando que las NPs favorecen la internalización. Esta mayor eficiencia puede deberse a las propiedades físico-químicas de las NPs y a su mecanismo de entrada en las células (Danhier y cols., 2012; Kumari y cols., 2010; Vasir y Labhasetwar, 2008). Una carga de superficie positiva podría favorecer la interacción de las NPs con las membranas celulares y así su internalización, sin embargo, nuestros sistemas poseen carga negativa, pudiendo explicarse su mayor internalización por el propio mecanismo de entrada celular ya sea pinocitosis o endocitosis mediada por clatrina (Danhier y cols., 2012).

Por otra parte, la unión de PTX a las NPs de PTX, no modifico en ningún caso el mecanismo de acción del fármaco. Sabemos que el PTX produce un arresto en la fase G<sub>2</sub>/M del ciclo celular debido a una inhibición del proceso de polimerización-despolimerización de los microtúbulos provocando una disminución de la proliferación celular (Jordan y Wilson, 2004; Prota y cols., 2013). Los resultados obtenidos en nuestros estudios, muestran un perfil del ciclo celular similar en todas las líneas celulares tratadas durante 48 h con PTX libre, PTX-PLGA y NPs de PLGA vacías. Sólo la línea SK-BR-3, MCF-7 y T47D presentaron un incremento del porcentaje de células en las fases G<sub>2</sub>/M o subG<sub>1</sub>, comportamiento que también han demostrado otros autores (Cui y cols., 2016; Markeb y cols., 2016; Ruttala y cols., 2017; Xing y cols., 2016). Esta modificación no supuso alteración del mecanismo de acción del fármaco como tal, si no más bien una potenciación, ya que la parada de ciclo en la fase G<sub>2</sub>/M acaba provocando una entrada de las células en subG<sub>1</sub> (apoptosis).

Por último, los estudios *in vitro* fueron completados con el análisis del efecto del PTX-PLGA sobre modelos tridimensionales de células tumorales (esferocitos multicelulares o MTS) que permitieron una aproximación al comportamiento en modelos *in vivo*, ya que son sistemas que remedan el crecimiento de la masa tumoral.

Estos sistemas poseen una zona superficial más expuesta al fármaco generándose en el interior, como en el caso de los tumores primarios insertos en el tejido, un gradiente de oxígeno, nutrientes y catabolitos (Hirschhaeuser y cols., 2010; McMahon y cols., 2012). Monitorizando el volumen de los esferocitos y utilizando CCK-8 para determinar la citotoxicidad de los tratamientos (Guo y cols., 2015; Kadletz y cols., 2015, Zhang y cols., 2017), analizamos el efecto de PTX-PLGA sobre la viabilidad de los MTS generados de células MFC-7 en comparación con el efecto del PTX libre. Nuestros resultados demostraron una mayor desorganización de los esferocitos tratados con PTX-PLGA en comparación con los tratados con PTX que se presentaron más pequeños y compactos. Dicha desorganización pudo ser visualizada desde los primeros tiempos del tratamiento. Este fenómeno podría deberse a que las células de la superficie de los MTS son las primeras en captar los fármacos y por tanto sufrir apoptosis, que en este caso sería mayor en el caso de los MTS tratados con PTX-PLGA según pudimos demostrar por los análisis con CCK-8. La mayor muerte en las células de la periferia de los esferocitos podría expandir el espacio entre ellas haciendo posible la entrada del fármaco a zonas más interiores del MTS, con lo cual favorecería su difusión al interior de la estructura (Lu y cols., 2008). Lee y cols., (2014) utilizaron micropartículas multicapa constituidas por PLLA y PLGA cargadas con DOX y PTX, de manera independiente y también de manera conjunta. A diferencia de nuestros resultados, solo la co-administración de DOX y PTX dentro de las NPs de PLLA/PLGA junto con el Poli (1,6-bis(p-carboxifenoxi)hexano) (PCPH) consiguió una mejora en la reducción de la viabilidad de los esferocitos de MFC-7 en comparación con los fármacos libres, lo que representa un menor el efecto citotóxico que el descrito por nosotros y necesitando además de una terapia combinada con DOX para mejorar el efecto. Otros autores como Jiang y cols., (2013), han usado PTX cargado en NPs de carbonato de trimetileno para el tratamiento de esferocitos glioblastoma (línea de U87-MG) aunque con pobres resultados. Así, la modificación de volumen de los esferoides fue de un 87,2% con PTX libre y de un 74,3% para el PTX cargado en las NPs. Solo la introducción en la NP de un péptido para la administración selectiva de fármacos en tumores ricos en integrina desintegró el esferocito desde tiempos muy

cortos de exposición, lo cual podría ser una posible vía para mejorar la NP de PLGA.

En conclusión, numerosas NPs están siendo testadas para la mejora de los efectos de clásicos agentes antitumorales en el tratamiento del cáncer de mama y pulmón. Sus características físico químicas y los resultados de las experiencias *in vitro* e *in vivo*, son esenciales para el éxito de las nuevas estrategias de tratamiento. Muchas de ellas (*i.e.* vesículas lipídicas, liposomas, etc) muestran serias limitaciones derivadas de su rápida eliminación por los riñones, su contacto con el sistema reticuloendotelial o su poca capacidad para penetrar en los tejidos tumorales. Las NPs poliméricas desarrolladas y testadas en el presente trabajo de investigación han demostrado ser nanoformulaciones eficientes con un tamaño homogéneo, habilidad para solubilizar fármacos hidrofóbicos, liberación sostenida de los fármacos y por último, estables y potencialmente modificables en sus propiedades físico-químicas para adaptarlas a diferentes necesidades. Estas nuevas nanoformulaciones se presentan como un primer paso para mejorar los tratamientos quimioterapéuticos actuales, especialmente en aquellos pacientes que poseen tumores de mama y pulmón avanzados y, por tanto, con escasa respuesta al tratamiento actual y pobre pronóstico. Futuros ensayos serán necesarios para aportar nuevos datos de la utilidad real de estos nuevos nanofármacos y de su aplicabilidad en la práctica clínica para la mejora de la supervivencia de estos pacientes y de su calidad de vida.





## **5. Conclusiones**

---



En base a los resultados presentados, las conclusiones de este trabajo de investigación son las siguientes:

1- Se han sintetizado nuevas nanoformulaciones de PBCA y PCL asociadas a DOX y 5-FU y NPs de PLGA asociadas a PTX mediante protocolos de síntesis reproducibles basados en modificaciones de los métodos de emulsión/polimerización, disposición interfacial de polímeros y nanoprecipitación.

2- Las NPs sintetizadas y seleccionadas para los ensayos *in vitro* e *in vivo* fueron biodegradables, con carga negativa en superficie, de forma esférica, con diámetros inferiores a 250 nm y con una alta capacidad de carga y liberación del fármaco.

3- Las NPs de PBCA, PCL y PLGA vacías no fueron tóxicas en los sistemas *in vitro* e *in vivo* utilizados, mostrando una excelente biocompatibilidad.

4- Las nanoformulaciones de PBCA, PCL y PLGA asociadas a DOX, 5-FU y PTX disminuyeron significativamente la IC<sub>50</sub> de los fármacos antineoplásicos en las líneas tumorales testadas, tanto humanas como de ratón, en relación con los fármacos libres, indicando una potenciación de su efecto citotóxico.

5- Las NPs poliméricas de PBCA, PCL y PLGA, incrementaron la internalización celular del fluoróforo transportado, disminuyendo su tiempo de incorporación y aumentando su concentración intracelular, en comparación con su administración libre.

6- La DOX transportada por las NPs de PBCA y PCL mostró una localización intracelular tanto nuclear como citoplasmática, a diferencia de la DOX libre que presentó una localización predominantemente nuclear.

7- Las NPs de PBCA y PCL asociadas a DOX y 5-FU, indujeron una reducción del volumen tumoral de los tumores de mama, pulmón y colon inducidos en ratones C57BL/6 significativamente mayor que con el tratamiento con los fármacos libres.

8- Las NPs de PCL fueron capaces de reducir la toxicidad del fármaco DOX en ratones C57BL/6 tanto a nivel de parámetros sanguíneos, marcadores moleculares de daño cardiovascular y en lesión tisular cardíaca respecto a los ratones tratados con DOX libre.

9- La vehiculización de los fármacos DOX y 5-FU en las NPs de PBCA y PCL provocó en la mayoría de los casos una mejora en la tasa de supervivencia de los ratones en comparación con los tratados con fármacos libres a excepción del tratamiento de cáncer de mama con nanopartículas de DOX-PCL y DOX-PBCA y de cáncer de pulmón con nanopartículas de DOX-PBCA.

10- Las NPs PLGA, no modificaron el mecanismo de acción del fármaco PTX, presentando tanto las células tratadas con PTX como las tratadas con PTX asociado a PLGA, patrones similares de ciclo celular.

11- Los estudios de la actividad antiproliferativa de las NPs de PLGA asociadas a PTX en modelos *in vitro* basados en esferoides tumorales multicelulares (MTS) mostraron una disminución significativa de la proliferación celular en comparación con los MTS tratados con PTX libre.

## **6. Conclusions**

---



Based on the results exposed, the conclusions of this thesis are the following:

- 1- New nanoformulations of PBCA and PCL, carriers both of the antitumor drugs DOX and 5-FU and NPs of PLGA, carriers of the PTX drug have been synthesized by reproducible protocols based on the modified methods of emulsion/polymerization, interfacial polymer disposition and nanoprecipitation.
- 2- The synthesized and selected NPs to perform the *in vitro* and *in vivo* experiments were biodegradable, with negative charge on their surface, with spherical shape, with diameters of less than 250 nm and with high loading and drug release profiles.
- 3- Blank PBCA, PCL and PLGA NPs were non-toxic in the *in vitro* and *in vivo* models, showing an excellent biocompatibility.
- 4- Nanoformulations of PBCA, PCL and PLGA loaded with DOX, 5-FU and PTX significantly decreased the IC<sub>50</sub> of the antineoplastic drugs in the tumor cell lines tested from human and mouse, in relation with free drugs, showing a higher cytotoxic effect.
- 5- Polymeric NPs of PBCA, PCL and PLGA, increase the cellular uptake of the carried fluorophore, decreasing their incorporation time and increasing their intracellular concentration, compared to its free administration.
- 6- The DOX transported by PBCA and PCL NPs showed both nuclear and cytoplasmic intracellular localization, unlike free DOX which only showed a mainly nuclear localization.
- 7- PBCA and PCL NPs loaded with DOX and 5-FU, showed a greater reduction of the tumor volume of breast, lung and colon tumors induced in C57BL/6 mice, significantly higher compared to those treated with free drugs.

## *Conclusions*

8- PCL NPs were able to reduce the toxicity of the drug DOX in C57BL/6 mice in blood parameters, molecular markers of cardiovascular damage and in cardiac tissue injury compared to mice treated with free DOX.

9- The vehiculation of the drugs DOX and 5-FU in PBCA and PCL NPs, produces in most cases, an improvement in the survival rate of mice compared to those treated with free drugs, with the exception of the treatment of breast cancer with DOX-PCL and DOX-PBCA NPs and lung cancer with DOX-PBCA NPs.

10- PLGA NPs did not modify the mechanism of action of the drug PTX, since cells treated with PTX and PTX-PLGA showed similar patterns of cell cycle.

11- The antiproliferative studies with PTX-loaded PLGA NPs in *in vitro* models with multicellular tumor spheroids (MTS) showed a significant decrease of cell proliferation compared to the MTS treated with free PTX.



## **7. Bibliografía**

---



Abbasi, A.Z., Prasad, P., Cai, P., He, C., Foltz, W.D., Amini, M.A., Gordijo, C.R., Rauth, A.M., y Wu, X.Y. (2015). Manganese oxide and docetaxel co-loaded fluorescent polymer nanoparticles for dual modal imaging and chemotherapy of breast cancer. *J. Control. Release* 209, 186–196.

Acharya, S., Dilnawaz, F., y Sahoo, S.K. (2009). Targeted epidermal growth factor receptor nanoparticle bioconjugates for breast cancer therapy. *Biomaterials* 30, 5737–5750.

Acharya, S., y Sahoo, S.K. (2011). PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63, 170–183.

Adams, J.D., Flora, K.P., Goldspiel, B.R., Wilson, J.W., Arbuck, S.G., y Finley, R. (1993). Taxol: a history of pharmaceutical development and current pharmaceutical concerns. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 141–147.

Agra, Y., Pelayo, M., Sacristan, M., Sacristán, A., Serra, C., y Bonfill, X. (2003). Chemotherapy versus best supportive care for extensive small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD001990.

Aillon, K.L., Xie, Y., El-Gendy, N., Berkland, C.J., y Forrest, M.L. (2009). Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 457–466.

Akbarzadeh, A., Samiei, M., y Davaran, S. (2012). Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Res. Lett.* 7, 144.

Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S.W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., y Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res. Lett.* 8, 102.

Akhtar, M.J., Ahamed, M., Kumar, S., Siddiqui, H., Patil, G., Ashquin, M., y Ahmad, I. (2010). Nanotoxicity of pure silica mediated through oxidant generation rather than glutathione depletion in human lung epithelial cells. *Toxicology* 276, 95–102.

Alam, F., Naim, M., Aziz, M., y Yadav, N. (2015). Unique roles of nanotechnology in medicine and cancer-II. *Indian J. Cancer* 52, 1–9.

Allen, T.M. (2002). Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 2, 750–763.

Alvarado-Luna, G., y Morales-Espinosa, D. (2016). Treatment for small cell lung cancer, where are we now? -a review. *Transl. Lung Cancer Res.* 5, 26–38.

Ambruosi, A., Gelperina, S., Khalansky, A., Tanski, S., Theisen, A., y Kreuter, J. (2006). Influence of surfactants, polymer and doxorubicin loading on the anti-tumour effect of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles in a rat glioma model. *J. Microencapsul.* 23, 582–592.

American Cancer Society. What Is Cancer? (2015). Disponible de: <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/what-is-cancer.html>. Acceso el 30 de enero de 2017.

Anderson, J.M., y Shive, M.S. (1997). Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 28, 5–24.

Anitha, A., Deepa, N., Chennazhi, K.P., Lakshmanan, V.-K., y Jayakumar, R. (2014). Combinatorial anticancer effects of curcumin and 5-fluorouracil loaded thiolated

chitosan nanoparticles towards colon cancer treatment. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 2730–2743.

Appelbaum, J.S., LaRochelle, J.R., Smith, B.A., Balkin, D.M., Holub, J.M., y Schepartz, A. (2012). Arginine topology controls escape of minimally cationic proteins from early endosomes to the cytoplasm. *Chem. Biol.* 19, 819–830.

Arami, H., Khandhar, A., Liggitt, D., y Krishnan, K.M. (2015). In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* 44, 8576–8607.

Araya, T., Kasahara, K., Nishikawa, S., Kimura, H., Sone, T., Nagae, H., Ikehata, Y., Nagano, I., y Fujimura, M. (2013). Antitumor effects of inductive hyperthermia using magnetic ferucarbotran nanoparticles on human lung cancer xenografts in nude mice. *Onco Targets Ther.* 6, 237–242.

Arias, J.L., Ruiz, M.A.A., López-Viota, M., y Delgado, A.V. (2008). Poly(alkylcyanoacrylate) colloidal particles as vehicles for antitumour drug delivery: a comparative study. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 62, 64–70.

Arora, H.C., Jensen, M.P., Yuan, Y., Wu, A., Vogt, S., Paunesku, T., y Woloschak, G.E. (2012). Nanocarriers enhance Doxorubicin uptake in drug-resistant ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 72, 769–778.

Arunraj, T.R., Sanoj Rejinold, N., Ashwin Kumar, N., y Jayakumar, R. (2013). Doxorubicin-chitin-poly(caprolactone) composite nanogel for drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* 62, 35–43.

Astete, C.E., y Sabliov, C.M. (2006). Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 17, 247–289.

Attaluri, A., Kandala, S.K., Wabler, M., Zhou, H., Cornejo, C., Armour, M., Hedayati, M., Zhang, Y., DeWeese, T.L., Herman, C., y cols. (2015). Magnetic nanoparticle hyperthermia enhances radiation therapy: A study in mouse models of human prostate cancer. *Int. J. Hyperth.* 31, 359–374.

Attia, A.B., Yang, C., Tan, J.P., Gao, S., Williams, D.F., Hedrick, J.L., y Yang, Y.Y. (2013). The effect of kinetic stability on biodistribution and anti-tumor efficacy of drug-loaded biodegradable polymeric micelles. *Biomaterials.* 34, 3132–3140.

Awada, A., Bondarenko, I.N., Bonneterre, J., Nowara, E., Ferrero, J.M., Bakshi, A.V., Wilke, C., y Piccart, M. (2014). A randomized controlled phase II trial of a novel composition of paclitaxel embedded into neutral and cationic lipids targeting tumor endothelial cells in advanced triple-negative breast cancer (TNBC). *Ann. Oncol.* 25, 824–831.

Baban, D.F., y Seymour, L.W. (1998). Control of tumour vascular permeability. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 34, 109–119.

Baek, J.S., Kim, J.H., Park, J.S., y Cho, C.W. (2015). Modification of paclitaxel-loaded solid lipid nanoparticles with 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin enhances absorption and reduces nephrotoxicity associated with intravenous injection. *Int. J. Nanomedicine* 10, 5397–5405.

Bagherpour Doun, S.K., Alavi, S.E., Koochi Moftakhari Esfahani, M., Ebrahimi Shahmabadi, H., Alavi, F., y Hamzei, S. (2014). Efficacy of Cisplatin-loaded poly butyl cyanoacrylate nanoparticles on the ovarian cancer: an in vitro study. *Tumour Biol.* 35, 7491–7497.

Banerjee, S.S., y Chen, D.H. (2007). Magnetic nanoparticles grafted with cyclodextrin for hydrophobic drug delivery. *Chem. Mater.* 19, 6345–6349.

Barenholz, Y. (2012). Doxil®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J. Control. Release* 160, 117–134.

Basel, M.T., Balivada, S., Wang, H., Shrestha, T.B., Seo, G.M., Pyle, M., Abayaweera, G., Dani, R., Koper, O.B., Tamura, M., y cols. (2012). Cell-delivered magnetic nanoparticles caused hyperthermia-mediated increased survival in a murine pancreatic cancer model. *Int. J. Nanomedicine* 7, 297–306.

Bear, H.D., Anderson, S., Brown, A., Smith, R., Mamounas, E.P., Fisher, B., Margolese, R., Theoret, H., Soran, A., Wickerham, D.L., y cols. (2003). The effect on tumor response of adding sequential preoperative docetaxel to preoperative doxorubicin and cyclophosphamide: preliminary results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J. Clin. Oncol.* 21, 4165–4174.

Berg, S.L., Tolcher, A., O'Shaughnessy, J.A., Denicoff, A.M., Noone, M., Ognibene, F.P., Cowan, K.H., y Balis, F.M. (1995). Effect of R-verapamil on the pharmacokinetics of paclitaxel in women with breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 13, 2039–2042.

Bergmann-Leitner, E.S., y Abrams, S.I. (2001). Treatment of human colon carcinoma cell lines with anti-neoplastic agents enhances their lytic sensitivity to antigen-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Immunol. Immunother.* 50, 445–455.

Berrino, F. (2014). Life style prevention of cancer recurrence: the yin and the yang. *Cancer Treat. Res.* 159, 341–351.

Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N., y Farokhzad, O.C. (2014). Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 66, 2–25.

Bieber, T., Meissner, W., Kostin, S., Niemann, A., y Elsasser, H.P. (2002). Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes. *J. Control. Release* 82, 441–454.

Bittner, B., Ronneberger, B., Zange, R., Volland, C., Anderson, J.M., y Kissel, T. (1998). Bovine serum albumin loaded poly(lactide-co-glycolide) microspheres: The influence of polymer purity on particle characteristics. *J. Microencapsul.* 15, 495–514.

Borràs, E., Dotor, E., Arcusa, A., Gamundi, M.J., Hernan, I., de Sousa Dias, M., Mañé, B., Agúndez, J.A.G., Blanca, M., y Carballo, M. (2012). High-resolution melting analysis of the common c.1905+1G>A mutation causing dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and lethal 5-fluorouracil toxicity. *Front. Genet.* 3, 312.

Bozzuto, G., y Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *Int. J. Nanomedicine* 10, 975–999.

Brinton, L.A., Sherman, M.E., Carreon, J.D., y Anderson, W.F. (2008). Recent trends in breast cancer among younger women in the United States. *J. Natl. Cancer Inst.* 100, 1643–1648.

Butterworth, A.S., Higgins, J.P.T., y Pharoah, P. (2006). Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: a meta-analysis. *Eur. J. Cancer* 42, 216–227.

Byrne, J.D., Betancourt, T., y Brannon-Peppas, L. (2008). Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 1615–1626.



Carvalho, F.S., Burgeiro, A., Garcia, R., Moreno, A.J., Carvalho, R.A., y Oliveira, P.J. (2014). Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy. *Med. Res. Rev.* 34, 106–135.

Cabeza, L., Perazzoli, G., Oliver, J.A., Jiménez, C., Zafra, I., Prados, J., Melguizo, C., Arias, J.L., Ruiz, A., y Aránega, A. (2013). Nuevas estrategias en el tratamiento del cáncer de mama mediante nanoplataformas asociadas a Doxorubicina. *Encuentros en Neurociencias*, Vol 2, Ciber S.C. Granada, pp. 101–120.

Cabeza, L., Perazzoli, G., Ortiz, R., Caba, O., Álvarez, P.A., Melguizo, C., Prados, J., y Aránega, A. (2016). Nanomaterials and cancer therapy. *Nanotechnology and Drug Delivery*, Vol 2, CRC Press, pp. 228–256.

Cagel, M., Grotz, E., Bernabeu, E., Moretton, M.A., y Chiappetta, D.A. (2017). Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside. *Drug Discov. Today* 22, 270–281.

Canton, I., y Battaglia, G. (2012). Endocytosis at the nanoscale. *Chem. Soc. Rev.* 41, 2718–2739.

Cao, J.Q., Olson, R.A., y Tyldesley, S.K. (2013). Comparison of recurrence and survival rates after breast-conserving therapy and mastectomy in young women with breast cancer. *Curr. Oncol.* 20, e593-601.

Capranico, G., Tinelli, S., Austin, C.A., Fisher, M.L., y Zunino, F. (1992). Different patterns of gene expression of topoisomerase II isoforms in differentiated tissues during murine development. *Biochim. Biophys. Acta* 1132, 43–48.

Carreras, C.W., y Santi, D.V. (1995). The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 721–762.

Carvalho, F.S., Burgeiro, A., Garcia, R., Moreno, A.J., Carvalho, R.A., y Oliveira, P.J. (2014). Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy. *Med. Res. Rev.* 34, 106–135.

Casale, F., Canaparo, R., Serpe, L., Muntoni, E., Pepa, C.D., Costa, M., Mairone, L., Zara, G.P., Fornari, G., y Eandi, M. (2004). Plasma concentrations of 5-fluorouracil and its metabolites in colon cancer patients. *Pharmacol. Res.* 50, 173–179.

Casimiro, C. (2002). Etiopathogenic factors in colorectal cancer. Genetic and clinical features (first of 2 parts). *Nutr. Hosp.* 17, 63–71.

Chan, A.T., y Giovannucci, E.L. (2010). Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology* 138, 2029–2043.

Chan, S., Davidson, N., Juozaityte, E., Erdkamp, F., Pluzanska, A., Azarnia, N., y Lee, L.W. (2004). Phase III trial of liposomal doxorubicin and cyclophosphamide compared with epirubicin and cyclophosphamide as first-line therapy for metastatic breast cancer. *Ann. Oncol.* 15, 1527–1534.

Chang, S.C., y Yang, W.C.V. (2016). Hyperglycemia, tumorigenesis, and chronic inflammation. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 108, 146–153.

Charlot, M., Béatrix, O., Chateau, F., Dubuisson, J., Golfier, F., Valette, P.J., y Réty, F. (2013). Pathologies of the male breast. *Diagn. Interv. Imaging* 94, 26–37.

Cheang, M.C., Chia, S.K., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., Watson, M., Davies, S., Bernard, P.S., Parker, J.S., y cols. (2009). Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 101, 736–750.

Chen, C., Cai, G., Zhang, H., Jiang, H., y Wang, L. (2010). Chitosan-poly(epsilon-caprolactone)-poly(ethylene glycol) graft copolymers: Synthesis, self-assembly, and drug release behavior. *J. Biomed. Mater. Res. A* 96, 116–124.

Chen, H.H., Huang, W.C., Chiang, W.H., Liu, T.I., Shen, M.Y., Hsu, Y.H., Lin, S.C., y Chiu, H.C. (2015). pH-Responsive therapeutic solid lipid nanoparticles for reducing P-glycoprotein-mediated drug efflux of multidrug resistant cancer cells. *Int. J. Nanomedicine* 10, 5035–5048.

Chen, Y., Tang, Y., Guo, C., Wang, J., Boral, D., y Nie, D. (2012). Nuclear receptors in the multidrug resistance through the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters. *Biochem. Pharmacol.* 83, 1112–1126.

Chen, Y., Yang, W., Chang, B., Hu, H., Fang, X., y Sha, X. (2013). In vivo distribution and antitumor activity of doxorubicin-loaded N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid coated mesoporous silica nanoparticles and safety evaluation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85, 406–412.

Chen, Y., Zhang, W., Huang, Y., Gao, F., y Fang, X. (2016). In vivo biodistribution and anti-tumor efficacy evaluation of doxorubicin and paclitaxel-loaded pluronic micelles decorated with c(RGDyK) peptide. *PloS One* 11, e0149952.

Cheng, M., Xu, H., Wang, Y., Chen, H., He, B., Gao, X., Li, Y., Han, J., y Zhang, Z. (2013). Glycyrrhetic acid-modified chitosan nanoparticles enhanced the effect of 5-fluorouracil in murine liver cancer model via regulatory T-cells. *Drug Des. Dev. Ther.* 7, 1287–1299.

Cheng, M., Chen, H., Wang, Y., Xu, H., He, B., Han, J., y Zhang, Z. (2014). Optimized synthesis of glycyrrhetic acid-modified chitosan 5-fluorouracil nanoparticles and their characteristics. *Int. J. Nanomedicine.* 9, 695–710.

Cheng, Y., Hao, J., Lee, L.A., Biewer, M.C., Wang, Q., y Stefan, M.C. (2012). Thermally controlled release of anticancer drug from self-assembled  $\gamma$ -substituted amphiphilic poly( $\epsilon$ -caprolactone) micellar nanoparticles. *Biomacromolecules* 13, 2163–2173.

Chithrani, B.D., Ghazani, A.A., y Chan, W.C. (2006). Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano. Lett.* 6, 662–668.

Cho, H.J., Yoon, H.Y., Koo, H., Ko, S.H., Shim, J.S., Lee, J.H., Kim, K., Kwon, I.C., y Kim, D.D. (2011). Self-assembled nanoparticles based on hyaluronic acid-ceramide (HA-CE) and Pluronic® for tumor-targeted delivery of docetaxel. *Biomaterials* 32, 7181–7190.

Choi, H.S., Liu, W., Misra, P., Tanaka, E., Zimmer, J.P., Itty Ipe, B., Bawendi, M.G., y Frangioni, J.V. (2007). Renal clearance of quantum dots. *Nat. Biotechnol.* 25, 1165–1170.

Choudhuri, S., y Klaassen, C.D. (2006). Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *Int. J. Toxicol.* 25, 231–259.

Chua, S., Lee, F.-Y., Chiang, H.-J., Chen, K.-H., Lu, H.-I., Chen, Y.-T., Yang, C.-C., Lin, K.-C., Chen, Y.-L., Kao, G.-S., y cols. (2016). The cardioprotective effect of melatonin and exendin-4 treatment in a rat model of cardiorenal syndrome. *J. Pineal Res.* 61, 438–456.

Chung, C.W., Chung, K.D., Jeong, Y.I., y Kang, D.H. (2013). 5-aminolevulinic acid-incorporated nanoparticles of methoxy poly(ethylene glycol)-chitosan copolymer for photodynamic therapy. *Int. J. Nanomedicine* 8, 809–819.

Clinicaltrials. Disponible de: <https://www.clinicaltrials.gov/>. Acceso el 5 de marzo de 2017.

Colditz, G.A., Kaphingst, K.A., Hankinson, S.E., y Rosner, B. (2012). Family history and risk of breast cancer: nurses' health study. *Breast Cancer Res. Treat.* 133, 1097–1104.

Colditz, G.A., Bohlke, K., y Berkey, C.S. (2014). Breast cancer risk accumulation starts early – Prevention must also. *Breast Cancer Res. Treat.* 145, 567–579.

Cole, S.P.C. (2014). Multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1), a “multitasking” ATP-binding cassette (ABC) transporter. *J. Biol. Chem.* 289, 30880–30888.

Comis, R.L., Friedland, D.M., y Good, B.C. (1998). Small-cell lung cancer: a perspective on the past and a preview of the future. *Oncol. Williston Park* 12, 44–50.

Compton, C.C., y Greene, F.L. (2004). The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond. *CA. Cancer J. Clin.* 54, 295–308.

Couvreur, P., Kante, B., Roland, M., Guiot, P., Bauduin, P., y Speiser, P. (1979). Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties. *J. Pharm. Pharmacol.* 31, 331–332.

Cui, Y., Zhang, M., Zeng, F., Jin, H., Xu, Q., y Huang, Y. (2016). Dual-targeting magnetic PLGA nanoparticles for codelivery of paclitaxel and curcumin for brain tumor therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8, 32159–32169.

Curtis, J., Greenberg, M., Kester, J., Phillips, S., y Krieger, G. (2006). Nanotechnology and nanotoxicology: a primer for clinicians. *Toxicol. Rev.* 25, 245–260.

Damgaard, O.E., Jensen, M.-B., Kroman, N., y Tvedskov, T.F. (2013). Quantifying the number of lymph nodes identified in one-stage versus two-stage axillary dissection in breast cancer. *Breast* 22, 44–46.

Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J.M., Coco, R., Le Breton, A., y Pr eat, V. (2012). PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *J. Controlled Release* 161, 505–522.

Darby, S., Hill, D., Auvinen, A., Barros-Dios, J.M., Baysson, H., Bochicchio, F., Deo, H., Falk, R., Forastiere, F., Hakama, M., y cols. (2005). Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ.* 330, 223.

Dash, T.K., y Konkimalla, V.B. (2012). Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *J. Control. Release* 158, 15–33.

Davis, P.J., Incerpi, S., Lin, H.-Y., Tang, H.-Y., Sudha, T., y Mousa, S.A. (2015). Thyroid hormone and P-glycoprotein in tumor cells. *BioMed Res. Int.* 2015, 168427.

Decuzzi, P., Pasqualini, R., Arap, W., y Ferrari, M. (2009). Intravascular delivery of particulate systems: does geometry really matter? *Pharm. Res.* 26, 235–243.

Dinarvand, R., Sepehri, N., Manoochehri, S., Rouhani, H., y Atyabi, F. (2011). Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *Int. J. Nanomedicine* 6, 877–895.

Doello, K., Cabeza, L., Ortiz, R., Arias, J.L., Melguizo, C., y Prados, J. (2015). Nanopartículas magnéticas en el diagnóstico y tratamiento del cáncer. *Actual. Médica* 100, 139–144.

Doroshov, J.H. (1983). Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Res.* 43, 460–472.

Doun, S.K., Alavi, S.E., Esfahani, M.K., Shahmabadi, H.E., Alavi, F., y Hamzei, S. (2014). Efficacy of cisplatin-loaded poly butyl cyanoacrylate nanoparticles on the ovarian cancer: an in vitro study. *Tumour Biol.* 35, 7491–7497.

Duan, X., y Li, Y. (2013). Physicochemical characteristics of nanoparticles affect circulation, biodistribution, cellular internalization, and trafficking. *Small* 9, 1521–1532.

Duan, J., Mansour, H.M., Zhang, Y., Deng, X., Chen, Y., Wang, J., Pan, Y., y Zhao, J. (2012a). Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of doxorubicin and curcumin in chitosan/poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 426, 193–201.

Duan, J., Liu, M., Zhang, Y., Zhao, J., Pan, Y., y Yang, X. (2012b). Folate-decorated chitosan/doxorubicin poly(butyl)cyanoacrylate nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. *J. Nanoparticle Res.* 14, 1–9.

Dutta, R.K., y Sahu, S. (2012). Development of a novel probe sonication assisted enhanced loading of 5-FU in SPION encapsulated pectin nanocarriers for magnetic targeted drug delivery system. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 82, 58–65.

Eatemadi, A., Darabi, M., Afraidooni, L., Zarghami, N., Daraee, H., Eskandari, L., Mellatyar, H., y Akbarzadeh, A. (2016). Comparison, synthesis and evaluation of

anticancer drug-loaded polymeric nanoparticles on breast cancer cell lines. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* 44, 1008–1017.

Ebrahimi Shahmabadi, H., Movahedi, F., Koohi Moftakhari Esfahani, M., Alavi, S.E., Eslamifar, A., Mohammadi Anaraki, G., y Akbarzadeh, A. (2014). Efficacy of Cisplatin-loaded polybutyl cyanoacrylate nanoparticles on the glioblastoma. *Tumour Biol.* 35, 4799–4806.

Edge, S., Byrd, D.R., Compton C.C., Fritz A.G., Greene F.L., y Trotti, A. (2010). *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, NY: Springer.

Eheman, C.R., Shaw, K.M., Ryerson, A.B., Miller, J.W., Ajani, U.A., y White, M.C. (2009). The changing incidence of in situ and invasive ductal and lobular breast carcinomas: United States, 1999-2004. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 18, 1763–1769.

El-Bolkainy, T.N., Sakr, M.A., Nouh, A.A., y El-Din, N.H. (2006). A comparative study of rectal and colonic carcinoma: demographic, pathologic and TNM staging analysis. *J. Egypt. Natl. Canc. Inst.* 18, 258–263.

Elkin, S.R., Bendris, N., Reis, C.R., Zhou, Y., Xie, Y., Huffman, K.E., Minna, J.D., y Schmid, S.L. (2015). A systematic analysis reveals heterogeneous changes in the endocytic activities of cancer cells. *Cancer Res.* 75, 4640–4650.

Estella-Hermoso de Mendoza, A., Campanero, M.A., Mollinedo, F., y Blanco-Prieto, M.J. (2009). Lipid nanomedicines for anticancer drug therapy. *J. Biomed. Nanotechnol.* 5, 323–343.

Etheridge, M.L., Campbell, S.A., Erdman, A.G., Haynes, C.L., Wolf, S.M., y McCullough, J. (2013). The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine* 9, 1–14.



Evangelatov, A., Skrobanska, R., Mladenov, N., Petkova, M., Yordanov, G., y Pankov, R. (2016). Epirubicin loading in poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles manifests via altered intracellular localization and cellular response in cervical carcinoma (HeLa) cells. *Drug Deliv.* 23, 2235–2244.

Evans, B.C., Nelson, C.E., Yu, S.S., Beavers, K.R., Kim, A.J., Li, H., Nelson, H.M., Giorgio, T.D., y Duvall, C.L. (2013). Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. *J. Vis. Exp.* e50166.

Fanciullino, R., y Ciccolini, J. (2009). Liposome-encapsulated anticancer drugs: still waiting for the magic bullet? *Curr. Med. Chem.* 16, 4361–4371.

Fang, J., Qin, H., Nakamura, H., Tsukigawa, K., Shin, T., y Maeda, H. (2012). Carbon monoxide, generated by heme oxygenase-1, mediates the enhanced permeability and retention effect in solid tumors. *Cancer Sci.* 103, 535–541.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., y Bray, F. (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France. Disponible de: <http://globocan.iarc.fr>. Acceso el 30 de enero de 2017.

Fernandes, R.S., Silva, J.O., Monteiro, L.O., Leite, E.A., Cassali, G.D., Rubello, D., Cardoso, V.N., Ferreira, L.A., Oliveira, M.C., y de Barros, A.L. (2016). Doxorubicin-loaded nanocarriers: a comparative study of liposome and nanostructured lipid carrier as alternatives for cancer therapy. *Biomed. Pharmacother.* 84, 252–257.

Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.P., Ammoury, N., y Benita, S. (1989). Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* 55, R1–R4.

Filyak, Y., Filyak, O., Souchelnytskyi, S., y Stoika, R. (2008). Doxorubicin inhibits TGF-beta signaling in human lung carcinoma A549 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 590, 67–73.

Finn, J.P., Nguyen, K.L., Han, F., Zhou, Z., Salusky, I., Ayad, I., y Hu, P. (2016). Cardiovascular MRI with ferumoxytol. *Clin. Radiol.* 71, 796–806.

Florence, A.T. (2012). “Targeting” nanoparticles: the constraints of physical laws and physical barriers. *J. Control. Release* 164, 115–124.

Fodale, V., Pierobon, M., Liotta, L., y Petricoin, E. (2011). Mechanism of cell adaptation: when and how do cancer cells develop chemoresistance? *Cancer J.* 17, 89–95.

Fonte, P., Andrade, F., Azevedo, C., Pinto, J., Seabra, V., van de Weert, M., Reis, S., y Sarmiento, B. (2016a). Effect of the freezing step in the stability and bioactivity of protein-loaded PLGA nanoparticles upon lyophilization. *Pharm Res.* 33, 2777-2793.

Fonte, P., Lino, P.R., Seabra, V., Almeida, A.J., Reis, S., y Sarmiento, B. (2016b). Annealing as a tool for the optimization of lyophilization and ensuring of the stability of protein-loaded PLGA nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 503, 163-173.

Frampton, J.E. (2010). Mifamurtide: a review of its use in the treatment of osteosarcoma. *Paediatr. Drugs* 12, 141–153.

Fu, P.P., Xia, Q., Hwang, H.-M., Ray, P.C., y Yu, H. (2014). Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species. *J. Food Drug Anal.* 22, 64–75.

Fuchs, C.S., Giovannucci, E.L., Colditz, G.A., Hunter, D.J., Speizer, F.E., y Willett, W.C. (1994). A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 331, 1669–1674.

Funhoff, A.M., van Nostrum, C.F., Koning, G.A., Schuurmans-Nieuwenbroek, N.M.E., Crommelin, D.J.A., y Hennink, W.E. (2004). Endosomal escape of polymeric gene delivery complexes is not always enhanced by polymers buffering at low pH. *Biomacromolecules* 5, 32–39.

Gaihre, B., Khil, M.S., Lee, D.R., y Kim, H.Y. (2009). Gelatin-coated magnetic iron oxide nanoparticles as carrier system: drug loading and in vitro drug release study. *Int. J. Pharm.* 365, 180–189.

Gan, C.W., y Feng, S.S. (2010). Transferrin-conjugated nanoparticles of poly(lactide)-D-alpha-tocopheryl polyethylene glycol succinate diblock copolymer for targeted drug delivery across the blood-brain barrier. *Biomaterials* 31, 7748–7757.

Gao, S., Xu, Y., Asghar, S., Chen, M., Zou, L., Eltayeb, S., Huo, M., Ping, Q., y Xiao, Y. (2015). Polybutylcyanoacrylate nanocarriers as promising targeted drug delivery systems. *J. Drug Target.* 23, 481–496.

Gao, Y., Chen, Y., Ji, X., He, X., Yin, Q., Zhang, Z., Shi, J., y Li, Y. (2011). Controlled intracellular release of doxorubicin in multidrug-resistant cancer cells by tuning the shell-pore sizes of mesoporous silica nanoparticles. *ACS Nano.* 5, 9788–9798.

Gao, Y., Zuo, J., Bou-Chacra, N., Pinto, T. de J.A., Clas, S.-D., Walker, R.B., y Löbenberg, R. (2013). In vitro release kinetics of antituberculosis drugs from nanoparticles assessed using a modified dissolution apparatus. *BioMed Res. Int.* 2013, 136590.

Gharanei, M., Hussain, A., Janneh, O., y Maddock, H.L. (2013). Doxorubicin induced myocardial injury is exacerbated following ischaemic stress via opening of the mitochondrial permeability transition pore. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 268, 149–156.

Ghigo, A., Li, M., y Hirsch, E. (2016). New signal transduction paradigms in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 1916–1925.

Ghiringhelli, F., y Apetoh, L. (2015). Enhancing the anticancer effects of 5-fluorouracil: current challenges and future perspectives. *Biomed. J.* 38, 111–116.

Gibaud, S., Jabir Al Awwadi, N., Ducki, C., y Astier, A. (2004). Poly(epsilon-caprolactone) and Eudragit microparticles containing fludrocortisone acetate. *Int. J. Pharm.* 269, 491–508.

Gilaberte, Y., Serra-Guillén, C., Heras, D.L., Elena, M., Ruiz-Rodríguez, R., Fernández-Lorente, M., Benvenuto-Andrade, C., González-Rodríguez, S., y Guillén-Barona, C. (2006). Terapia fotodinámica en dermatología. *Actas Dermo-Sifiliográficas* 97, 83–102.

Gill, P.S., Wernz, J., Scadden, D.T., Cohen, P., Mukwaya, G.M., von Roenn, J.H., Jacobs, M., Kempin, S., Silverberg, I., Gonzales, G., y cols. (1996). Randomized phase III trial of liposomal daunorubicin versus doxorubicin, bleomycin, and vincristine in AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J. Clin. Oncol.* 14, 2353–2364.

Gökbuget, N., Hartog, C.-M., Bassan, R., Derigs, H.-G., Dombret, H., Greil, R., Hernández-Rivas, J.-M., Huguet, F., Intermesoli, T., Jourdan, E., y cols. (2011). Liposomal cytarabine is effective and tolerable in the treatment of central nervous system relapse of acute lymphoblastic leukemia and very aggressive lymphoma. *Haematologica* 96, 238–244.

Goodwin, P.J., Phillips, K.A., West, D.W., Ennis, M., Hopper, J.L., John, E.M., O'Malley, F.P., Milne, R.L., Andrulis, I.L., Friedlander, M.L., y cols. (2012). Breast cancer prognosis in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: an International Prospective Breast Cancer Family Registry population-based cohort study. *J. Clin. Oncol.* 30, 19–26.

Gornstein, E., y Schwarz, T.L. (2014). The paradox of paclitaxel neurotoxicity: Mechanisms and unanswered questions. *Neuropharmacology* 76 Pt A, 175–183.

Gou, M., Wei, X., Men, K., Wang, B., Luo, F., Zhao, X., Wei, Y., y Qian, Z. (2011). PCL/PEG copolymeric nanoparticles: potential nanoplatforms for anticancer agent delivery. *Curr. Drug Targets* 12, 1131–1150.

Govender, J., Loos, B., Marais, E., y Engelbrecht, A.M. (2014). Mitochondrial catastrophe during doxorubicin-induced cardiotoxicity: a review of the protective role of melatonin. *J. Pineal Res.* 57, 367–380.

Graf, A., McDowell, A., y Rades, T. (2009). Poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles for enhanced delivery of therapeutics - is there real potential? *Expert Opin. Drug Deliv.* 6, 371–387.

Gratton, S.E., Ropp, P.A., Pohlhaus, P.D., Luft, J.C., Madden, V.J., Napier, M.E., y DeSimone, J.M. (2008). The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 105, 11613–11618.

Gray, J., Mao, J.T., Szabo, E., Kelley, M., Kurie, J., Bepler, G., y American College of Chest Physicians (2007). Lung cancer chemoprevention: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd Edition). *Chest* 132, 56S–68S.

Greenberg, P.A., Hortobagyi, G.N., Smith, T.L., Ziegler, L.D., Frye, D.K., y Buzdar, A.U. (1996). Long-term follow-up of patients with complete remission following combination chemotherapy for metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 14, 2197–2205.

Grossi, F., Gridelli, C., Aita, M., y De Marinis, F. (2008). Identifying an optimum treatment strategy for patients with advanced non-small cell lung cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 67, 16–26.

Guiu, S., Michiels, S., André, F., Cortes, J., Denkert, C., Di Leo, A., Hennessy, B.T., Sorlie, T., Sotiriou, C., Turner, N, y cols. (2012). Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. *Ann. Oncol.* 23, 2997–3006.

Guo, Q., Kuang, L., Cao, H., Li, W., y Wei, J. (2015). Self-assembled mPEG-PCL-g-PEI micelles for multifunctional nanoprobes of doxorubicin delivery and magnetic resonance imaging and optical imaging. *Colloids. Surf. B. Biointerfaces.* 136, 687–693.

Guo, Y., Liu, Q., Yang, Y., Guo, X., Lian, R., Li, S., Wang, C., Zhang, S., y Chen, J. (2015), The effects of ROCK inhibitor Y-27632 on injectable spheroids of bovine corneal endothelial cells. *Cell Reprogram.* 17, 77–87.

Hadjidemetriou, M., Al-Ahmady, Z., Mazza, M., Collins, R.F., Dawson, K., y Kostarelos, K. (2015). In vivo biomolecule corona around blood-circulating, clinically used and antibody-targeted lipid bilayer nanoscale vesicles. *ACS Nano* 9, 8142–8156.

Hadjikirova, M., Troyanova, P., y Simeonova, M. (2005). Nanoparticles as drug carrier system of 5-fluorouracil in local treatment of patients with superficial basal cell carcinoma. *J. BUON*. 10, 517–521.

Hakkarainen, M., y Albertsson, A.C. (2002). Heterogeneous biodegradation of polycaprolactone - Low molecular weight products and surface changes. *Macromol. Chem. Phys.* 203, 1357–1363.

Hans, M.L., y Lowman, A.M. (2002). Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 6, 319–327.

Harper, P., y Marx, G.M. (2002). Combined modality treatments in early non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 38, S23-25.

Harush-Frenkel, O., Altschuler, Y., y Benita, S. (2008). Nanoparticle-cell interactions: drug delivery implications. *Crit, Rev, Ther, Drug, Carrier, Syst.* 25, 485–544.

He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C., y Yin, C. (2010). Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*. 31, 3657–3666.

Heath, T.D. (1988). Liposome dependent drugs. *Liposomes Drug Carr. Trends Prog.* 709–718.

Heidelberger, C., Chaudhuri, N.K., Danneberg, P., Mooren, D., Griesbach, L., Duschinsky, R., Schnitzer, R.J., Plevin, E., y Scheiner, J. (1957). Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature* 179, 663–666.

Hervault, A., y Thanh, N.T.K. (2014). Magnetic nanoparticle-based therapeutic agents for thermo-chemotherapy treatment of cancer. *Nanoscale* 6, 11553–11573.

Hillaireau, H., y Couvreur, P. (2009). Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 2873–2896.

Hirschhaeuser, F., Menne, H., Dittfeld, C., West, J., Mueller-Klieser, W., y Kunz-Schughart, L.A. (2010). Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J. Biotechnol.* 148, 3–15.

Hoffmann, D., Hoffmann, I., y El-Bayoumy, K (2001). The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 767–790.

Holliday, D.L., y Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.* 13, 215.

Holzer, M., Vogel, V., Mäntele, W., Schwartz, D., Haase, W., y Langer, K. (2009). Physico-chemical characterisation of PLGA nanoparticles after freeze-drying and storage. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72, 428-437.

Hu, C.M.J., Aryal, S., y Zhang, L. (2010). Nanoparticle-assisted combination therapies for effective cancer treatment. *Ther. Deliv.* 1, 323–334.

Hu, Y., Meng, L., Niu, L., y Lu, Q. (2013). Highly cross-linked and biocompatible polyphosphazene-coated superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for magnetic resonance imaging. *Langmuir* 29, 9156–9163.

Ichikawa, Y., Ghanefar, M., Bayeva, M., Wu, R., Khechaduri, A., Naga Prasad, S.V., Mutharasan, R.K., Naik, T.J., y Ardehali, H. (2014). Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. *J. Clin. Invest.* 124, 617–630.



Instituto Nacional del Cancer (NIH). Cáncer colorrectal - Versión para profesionales de salud. (2017a). Disponible de: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/colorrectal/pro>. Acceso el 8 de febrero de 2017.

Instituto Nacional del Cancer (NIH). Cáncer de seno (mama) - Versión para profesionales de salud. (2017b). Disponible de: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno/pro>. Acceso el 8 de febrero de 2017.

Iversen, T.G., Skotland, T., y Sandvig, K. (2011). Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. *Nano Today* 6, 176–185.

Jabir, N.R., Tabrez, S., Ashraf, G.M., Shakil, S., Damanhour, G.A., y Kamal, M.A. (2012). Nanotechnology-based approaches in anticancer research. *Int. J. Nanomedicine* 7, 4391–4408.

Jain, A., y Jain, S.K. (2008). In vitro and cell uptake studies for targeting of ligand anchored nanoparticles for colon tumors. *Eur. J. Pharm. Sci.* 35, 404–416.

Jain, R.K. (2001). Delivery of molecular medicine to solid tumors: lessons from in vivo imaging of gene expression and function. *J. Control. Release* 74, 7–25.

Jain, R.K., y Stylianopoulos, T. (2010). Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 7, 653–664.

Jeong, Y.I., Jin, S.G., Kim, I.Y., Pei, J., Wen, M., Jung, T.Y., Moon, K.S., y Jung, S. (2010). Doxorubicin-incorporated nanoparticles composed of poly(ethylene glycol)-grafted carboxymethyl chitosan and antitumor activity against glioma cells in vitro. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 79, 149–155.

Jevtic, M., Velicki, R., Popovic, M., Cemerlic-Adjic, N., Babovic, S.S., y Velicki, L. (2010). Dietary influence on breast cancer. *J. BUON*. 15, 455–461.

Jiang, H.L., Jin, J.F., Hu, Y.Q., y Zhu, K.J. (2004). Improvement of protein loading and modulation of protein release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres by complexation of proteins with polyanions. *J. Microencapsul.* 21, 615–624.

Jiang, X., Sha, X., Xin, H., Xu, X., Gu, J., Xia, W., Chen, S., Xie, Y., Chen, L., Chen, Y., y cols. (2013). Integrin-facilitated transcytosis for enhanced penetration of advanced gliomas by poly(trimethylene carbonate)-based nanoparticles encapsulating paclitaxel. *Biomaterials* 34, 2969–2979.

Johnston, P.G., Lenz, H.J., Leichman, C.G., Danenberg, K.D., Allegra, C.J., Danenberg, P.V., y Leichman, L. (1995). Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Res.* 55, 1407–1412.

Jones, R.A., Cheung, C.Y., Black, F.E., Zia, J.K., Stayton, P.S., Hoffman, A.S., y Wilson, M.R. (2003). Poly(2-alkylacrylic acid) polymers deliver molecules to the cytosol by pH-sensitive disruption of endosomal vesicles. *Biochem. J.* 372, 65–75.

Jordan, M.A., y Wilson, L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* 4, 253–265.

Jung, K.-H., Lee, J.H., Park, J.W., Quach, C.H.T., Moon, S.-H., Cho, Y.S., y Lee, K.-H. (2015). Resveratrol-loaded polymeric nanoparticles suppress glucose metabolism and tumor growth in vitro and in vivo. *Int. J. Pharm.* 478, 251–257.

Kadletz, L., Heiduschka, G., Domayer, J., Schmid, R., Enzenhofer, E., y Thurnher, D. (2015). Evaluation of spheroid head and neck squamous cell

carcinoma cell models in comparison to monolayer cultures. *Oncol. Lett.* 10, 1281–1286.

Kaluzova, M., Bouras, A., Machaidze, R., y Hadjipanayis, C.G. (2015). Targeted therapy of glioblastoma stem-like cells and tumor non-stem cells using cetuximab-conjugated iron-oxide nanoparticles. *Oncotarget* 6, 8788–8806.

Kamaly, N., Xiao, Z., Valencia, P.M., Radovic-Moreno, A.F., y Farokhzad, O.C. (2012). Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chem. Soc. Rev.* 41, 2971–3010.

Kanamala, M., Wilson, W.R., Yang, M., Palmer, B.D., y Wu, Z. (2016). Mechanisms and biomaterials in pH-responsive tumour targeted drug delivery: A review. *Biomaterials* 85, 152–167.

Kankeu, C., Clarke, K., Passante, E., y Huber, H.J. (2017). Doxorubicin-induced chronic dilated cardiomyopathy-the apoptosis hypothesis revisited. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 95, 239–248.

Karanam, V., Marslin, G., Krishnamoorthy, B., Chellan, V., Siram, K., Natarajan, T., Bhaskar, B., y Franklin, G. (2015). Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles of carboplatin: Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity evaluation in U-87 MG cell lines. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 130, 48–52.

Kaviani, A., Sodagari, N., Sheikhabaei, S., Eslami, V., Hafezi-Nejad, N., Safavi, A., Noparast, M., y Fitoussi, A. (2013). From radical mastectomy to breast-conserving therapy and oncoplastic breast surgery: a narrative review comparing oncological result, cosmetic outcome, quality of life, and health economy. *ISRN Oncol.* 2013, 742462.

Kelly, C., Bhuva, N., Harrison, M., Buckley, A., y Saunders, M. (2013). Use of raltitrexed as an alternative to 5-fluorouracil and capecitabine in cancer patients with cardiac history. *Eur. J. Cancer* 49, 2303–2310.

Kenzaoui, B.H., Vilà, M.R., Miquel, J.M., Cengelli, F., y Juillerat-Jeanneret, L. (2012). Evaluation of uptake and transport of cationic and anionic ultrasmall iron oxide nanoparticles by human colon cells. *Int. J. Nanomedicine* 7, 1275–1286.

Kettler, K., Veltman, K., van de Meent, D., van Wezel, A., y Hendriks, A.J. (2014). Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions, and cell type. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 481–492.

Kirkham, M., y Parton, R.G. (2005). Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim. Biophys. Acta* 1745, 273–286.

Kirpotin, D.B., Drummond, D.C., Shao, Y., Shalaby, M.R., Hong, K., Nielsen, U.B., Marks, J.D., Benz, C.C., y Park, J.W. (2006). Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. *Cancer Res.* 66, 6732–6740.

Kolitz-Domb, M., Grinberg, I., Corem-Salkmon, E., y Margel, S. (2014). Engineering of near infrared fluorescent proteinoid-poly(L-lactic acid) particles for in vivo colon cancer detection. *J. Nanobiotechnology* 12, 30.

Kumari, A., Yadav, S.K., y Yadav, S.C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 75, 1–18.

Kuo-Yung, C., y Yu-Der, L. (2009). Ring-opening polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone initiated by the antitumor agent doxifluridine. *Acta Biomater.* 5, 1075–1081.

Ky, B., Putt, M., Sawaya, H., French, B., Januzzi, J.L., Sebag, I.A., Plana, J.C., Cohen, V., Banchs, J., Carver, J.R., y cols. (2014). Early increases in multiple biomarkers predict subsequent cardiotoxicity in patients with breast cancer treated with doxorubicin, taxanes, and trastuzumab. *J. Am. Coll. Cardiol.* 63, 809–816.

Lababede, O., Meziane, M., y Rice, T. (2011). Seventh edition of the cancer staging manual and stage grouping of lung cancer: quick reference chart and diagrams. *Chest.* 139, 183–189.

Laloo, F., y Evans, D.G. (2012). Familial Breast Cancer. *Clin. Genet.* 82, 105–114.

Lanone, S., y Boczkowski, J. (2006). Biomedical applications and potential health risks of nanomaterials: molecular mechanisms. *Curr. Mol. Med.* 6, 651–663.

Lee, S.M., Ahn, R.W., Chen, F., Fought, A.J., O'Halloran, T.V., Cryns, V.L., y Nguyen, S.T. (2010). Biological evaluation of pH-responsive polymer-caged nanobins for breast cancer therapy. *ACS Nano.* 4, 4971–4978.

Lee, W.L., Guo, W.M., Ho, V.H., Saha, A., Chong, H.C., Tan, N.S., Widjaja, E., Tan, E.Y., y Loo, S.C. (2014). Inhibition of 3-D tumor spheroids by timed-released hydrophilic and hydrophobic drugs from multilayered polymeric microparticles. *Small.* 10, 3986–3996.

Leonessa, F., y Clarke, R. (2003). ATP binding cassette transporters and drug resistance in breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 10, 43–73.

Li, B., Wang, Q., Wang, X., Wang, C., y Jiang, X. (2013). Preparation, drug release and cellular uptake of doxorubicin-loaded dextran-b-poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* 93, 430–437.

Li, M., Liu, P., Gao, G., Deng, J., Pan, Z., Wu, X., Xie, G., Yue, C., Cho, C.H., Ma, Y., y Cai, L. (2015). Smac therapeutic peptide nanoparticles inducing apoptosis of cancer cells for combination chemotherapy with doxorubicin. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 7, 8005–8012.

Li, P., Wang, Y., Zeng, F., Chen, L., Peng, Z., y Kong, L.X. (2011). Synthesis and characterization of folate conjugated chitosan and cellular uptake of its nanoparticles in HT-29 cells. *Carbohydr. Res.* 346, 801–806.

Li, S., Wang, A., Jiang, W., y Guan, Z. (2008). Pharmacokinetic characteristics and anticancer effects of 5-fluorouracil loaded nanoparticles. *BMC Cancer.* 8, 103–112.

Li, W., Nicol, F., y Szoka, F.C. (2004). GALA: a designed synthetic pH-responsive amphipathic peptide with applications in drug and gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 967–985.

Liang, J., y Shang, Y. (2013). Estrogen and cancer. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 225–240.

Liang, W., y Lam, J.K.W. (2012). Endosomal escape pathways for non-viral nucleic acid delivery systems. *Acta Biomater.* 7, 1580–1587.

Li-Blatter, X., Nervi, P., y Seelig, A. (2009). Detergents as intrinsic P-glycoprotein substrates and inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta.* 1788, 2335–2344.

Liu, P., Situ, J.Q., Li, W.S., Shan, C.L., You, J., Yuan, H., Hu, F.Q., y Du, Y.Z. (2015). High tolerated paclitaxel nano-formulation delivered by poly (lactic-co-glycolic acid)-g-dextran micelles to efficient cancer therapy. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 11, 855–866.

Liu, R., Gilmore, D.M., Zubris, K.A.V., Xu, X., Catalano, P.J., Padera, R.F., Grinstaff, M.W., y Colson, Y.L. (2013). Prevention of nodal metastases in breast cancer following the lymphatic migration of paclitaxel-loaded expansile nanoparticles. *Biomaterials* 34, 1810–1819.

Lizarraga, I.M., Sugg, S.L., Weigel, R.J., y Scott-Conner, C.E.H. (2013). Review of risk factors for the development of contralateral breast cancer. *Am. J. Surg.* 206, 704–708.

Llorca, C., Esquerdo, G., Cervera, J.M., Briceño, H.C., Calduch, J.V., y Del Pino, J. (2005). 5-Fluorouracil-induced small bowel toxicity in a patient with colorectal cancer. *Clin. Transl. Oncol.* 7, 356–357.

López Sobella, M., Criado Illana, M.T., Esteban Herrera, B., y López Arranz, M.C. (2008). Toxicidad grave por 5-fluorouracilo asociada a deficiencia de dihidropirimidina deshidrogenasa. *Farm. Hosp.* 54–56.

Lü, J.-M., Wang, X., Marin-Muller, C., Wang, H., Lin, P.H., Yao, Q., y Chen, C. (2009). Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 9, 325–341.

Lu, M., Cohen, M.H., Rieves, D., y Pazdur, R. (2010). FDA report: Ferumoxytol for intravenous iron therapy in adult patients with chronic kidney disease. *Am. J. Hematol.* 85, 315–319.

Lu, Z., Tsai, M., Lu, D., Wang, J., Wientjes, M.G., y Au, J.L. (2008). Tumor-penetrating microparticles for intraperitoneal therapy of ovarian cancer. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 327, 673–682.

Ma, N., Ma, C., Li, C., Wang, T., Tang, Y., Wang, H., Moul, X., Chen, Z., y Hel, N. (2013). Influence of nanoparticle shape, size, and surface functionalization on cellular uptake. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 13, 6485–6498.

Ma, P., Luo, Q., Chen, J., Gan, Y., Du, J., Ding, S., Xi, Z., y Yang, X. (2012). Intraperitoneal injection of magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-nanoparticle induces hepatic and renal tissue injury via oxidative stress in mice. *Int. J. Nanomedicine* 7, 4809–4818.

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

Maeda, H., Sawa, T., y Konno, T. (2001). Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS. *J. Control. Release* 74, 47–61.

Maeda, H., Fang, J., Inutsuka, T., y Kitamoto, Y. (2003). Vascular permeability enhancement in solid tumor: various factors, mechanisms involved and its implications. *Int. Immunopharmacol.* 3, 319–328.

Maeda, H., Bharate, G.Y., y Daruwalla, J. (2009). Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71, 409–419.

Maeda, H. (2012). Macromolecular therapeutics in cancer treatment: the EPR effect and beyond. *J. Control. Release* 164, 138–144.

Maeda, H., Nakamura, H., y Fang, J. (2013). The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 71–79.



Maeda, H., Tsukigawa, K., y Fang, J. (2016). A retrospective 30 years after discovery of the enhanced permeability and retention effect of solid tumors: next-generation chemotherapeutics and photodynamic therapy--problems, solutions, and prospects. *Microcirc.* 23, 173–182.

Maeng, J.H., Lee, D.H., Jung, K.H., Bae, Y.H., Park, I.S., Jeong, S., Jeon, Y.S., Shim, C.K., Kim, W., Kim, J., y cols. (2010). Multifunctional doxorubicin loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for chemotherapy and magnetic resonance imaging in liver cancer. *Biomaterials* 31, 4995–5006.

Mahapatro, A., y Singh, D.K. (2011). Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *J. Nanobiotechnology* 9, 55.

Makki, J. (2015). Diversity of breast carcinoma: histological subtypes and clinical relevance. *Clin. Med. Insights Pathol.* 8, 23–31.

Mamot, C., Ritschard, R., Wicki, A., Stehle, G., Dieterle, T., Bubendorf, L., Hilker, C., Deuster, S., Herrmann, R., y Rochlitz, C. (2012). Tolerability, safety, pharmacokinetics, and efficacy of doxorubicin-loaded anti-EGFR immunoliposomes in advanced solid tumours: a phase 1 dose-escalation study. *Lancet Oncol.* 13, 1234–1241.

Mao, Q., y Unadkat, J.D. (2015). Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport--an update. *AAPS J.* 17, 65–82.

Markeb, A.A., El-Maali, N.A., Sayed, D.M., Osama, A., Abdel-Malek, M.A.Y., Zaki, A.H., Elwanis, M.E.A., y Driscoll, J.J. (2016). Synthesis, structural characterization, and preclinical efficacy of a novel paclitaxel-loaded alginate nanoparticle for breast cancer treatment. *Int. J. Breast Cancer* 2016, 7549372.

Marley, A.R., y Nan, H. (2016). Epidemiology of colorectal cancer. *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.* 7, 105–114.

Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., y Rodríguez Yoldi, M.J. (2017). Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 18, E197.

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

Matsumura, Y., Gotoh, M., Muro, K., Yamada, Y., Shirao, K., Shimada, Y., Okuwa, M., Matsumoto, S., Miyata, Y., Ohkura, H., y cols. (2004). Phase I and pharmacokinetic study of MCC-465, a doxorubicin (DXR) encapsulated in PEG immunoliposome, in patients with metastatic stomach cancer. *Ann. Oncol.* 15, 517–525.

McGuire, W.P., y Markman, M. (2003). Primary ovarian cancer chemotherapy: current standards of care. *Br. J. Cancer* 89, S3-8.

McMahon, K.M., Volpato, M., Chi, H.Y., Musiwaro, P., Poterlowicz, K., Peng, Y., Scally, A.J., Patterson, L.H., Phillips, R.M., y Sutton, C.W. (2012). Characterization of changes in the proteome in different regions of 3D multicell tumor spheroids. *J. Proteome Res.* 11, 2863–2875.

Mellman, I., y Yarden, Y. (2013). Endocytosis and cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a016949.

Meng, Z., Lv, Q., Lu, J., Yao, H., Lv, X., Jiang, F., Lu, A., y Zhang, G. (2016). Prodrug strategies for paclitaxel. *Int. J. Mol. Sci.* 17.

Michaud, L.B. (1997). Methods for preventing reactions secondary to Cremophor EL. *Ann. Pharmacother.* 31, 1402–1404.

Micke, P., Faldum, A., Metz, T., Beeh, K.-M., Bittinger, F., Hengstler, J.G., y Buhl, R. (2002). Staging small cell lung cancer: Veterans Administration Lung Study Group versus International Association for the Study of Lung Cancer--what limits limited disease? *Lung Cancer Amst. Neth.* 37, 271–276.

Miele, E., Spinelli, G.P., Miele, E., Tomao, F., y Tomao, S. (2009). Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane ABI-007) in the treatment of breast cancer. *Int. J. Nanomedicine* 4, 99–105.

Milane, L., Duan, Z., y Amiji, M. (2011). Therapeutic efficacy and safety of paclitaxel/lonidamine loaded EGFR-targeted nanoparticles for the treatment of multi-drug resistant cancer. *PloS One* 6, e24075.

Min, K.H., Lee, H.J., Kim, K., Kwon, I.C., Jeong, S.Y., y Lee, S.C. (2012). The tumor accumulation and therapeutic efficacy of doxorubicin carried in calcium phosphate-reinforced polymer nanoparticles. *Biomaterials.* 33, 5788–5797.

Moertel, C.G., Fleming, T.R., Macdonald, J.S., Haller, D.G., Laurie, J.A., Tangen, C.M., Ungerleider, J.S., Emerson, W.A., Tormey, D.C., y Glick, J.H. (1995). Intergroup study of fluorouracil plus levamisole as adjuvant therapy for stage II/Dukes' B2 colon cancer. *J. Clin. Oncol.* 13, 2936–2943.

Moghimi, S.M., Hunter, A.C., y Murray, J.C. (2001). Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol. Rev.* 53, 283–318.

Mok, H., Bae, K.H., Ahn, C.H., y Park, T.G. (2009). PEGylated and MMP-2 specifically dePEGylated quantum dots: comparative evaluation of cellular uptake. *Langmuir* 25, 1645–1650.

Mordente, A., Meucci, E., Silvestrini, A., Martorana, G.E., y Giardina, B. (2012). Anthracyclines and mitochondria. *Adv. Exp. Med. Biol.* 942, 385–419.

Mosesson, Y., Mills, G.B., y Yarden, Y. (2008). Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8, 835–850.

Mulik, R.S., Mönkkönen, J., Juvonen, R.O., Mahadik, K.R., y Paradkar, A.R. (2012). ApoE3 mediated polymeric nanoparticles containing curcumin: apoptosis induced in vitro anticancer activity against neuroblastoma cells. *Int. J. Pharm.* 437, 29–41.

Müller, R.H., Rühl, D., Runge, S., Schulze-Forster, K., y Mehnert, W. (1997). Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles as a function of the lipid matrix and the surfactant. *Pharm. Res.* 14, 458–462.

Müller, R.H., Dingler, A., Schneppe, T., y Gohla, S. (2000). Large scale production of solid lipid nanoparticles (SLN™) and nanosuspensions (DissoCubes™). *Handb. Pharm. Control. Release Technol.* 359–376.

Mundargi, R.C., Babu, V.R., Rangaswamy, V., Patel, P., y Aminabhavi, T.M. (2008). Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J. Controlled Release* 125, 193–209.

Murthy, R.S.R. (1997). Biodegradable polymers. In *Controlled and Novel Drug Delivery*. New Delhi: CBS Publisher, pp. 27–51.

Nakamura, H., Fang, J., Jun, F., y Maeda, H. (2015). Development of next-generation macromolecular drugs based on the EPR effect: challenges and pitfalls. *Expert Opin. Drug Deliv.* 12, 53–64.

National Cancer Institute (NIH). FDA-approved drugs. (2017c). Disponible de: <https://dtp.cancer.gov/timeline/flash/FDA.htm>. Acceso el 13 de febrero de 2017.

Nehate, C., Jain, S., Saneja, A., Khare, V., Alam, N., Dubey, R.D., y Gupta, P.N. (2014). Paclitaxel formulations: challenges and novel delivery options. *Curr. Drug Deliv.* 11, 666–686.

O'Brien, S., Schiller, G., Lister, J., Damon, L., Goldberg, S., Aulitzky, W., Ben-Yehuda, D., Stock, W., Coutre, S., Douer, D., y cols. (2013). High-dose vincristine sulfate liposome injection for advanced, relapsed, and refractory adult Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 31, 676–683.

Okur, A., Karadeniz, C., Özhan Oktar, S., Pınarlı, F.G., Aral, A., y Oğuz, A. (2016). Assessment of brachial artery reactivity, carotid intima-media thickness, and adhesion molecules in pediatric solid tumor patients treated with anthracyclines. *Pediatr. Hematol. Oncol.* 33, 178–185.

Ortiz, R., Prados, J., Melguizo, C., Arias, J.L., Ruiz, M.A., Álvarez, P.J., Caba, O., Luque, R., Segura, A., y Aránega, A. (2012). 5-Fluorouracil-loaded poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles combined with phage E gene therapy as a new strategy against colon cancer. *Int. J. Nanomedicine* 7, 95–107.

Ortiz, R., Cabeza, L., Leiva, M.C., Jiménez-López, J., Melguizo, C., y Prados, J. (2017). Nanomedical platform for drug delivery in cancer. *Curr. Org. Chem.* 21, 1–24.

O'Sullivan, C., y Birkinshaw, C. (2002). Hydrolysis of poly (n-butylcyanoacrylate) nanoparticles using esterase. *Polym. Degrad. Stab.* 78, 7–15.

Panis, C., Herrera, A.C., Victorino, V.J., Aranome, A.M.F., y Cecchini, R. (2013). Screening of circulating TGF- $\beta$  levels and its clinicopathological significance in human breast cancer. *Anticancer Res.* 33, 737–742.

Pantos, A., Tsogas, I., y Paleos, C.M. (2008). Guanidinium group: a versatile moiety inducing transport and multicompartimentalization in complementary membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 811–823.

Paranjpe, M., y Müller-Goymann, C.C. (2014). Nanoparticle-mediated pulmonary drug delivery: a review. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 5852–5873.

Parise, C.A., y Caggiano, V. (2014). Breast cancer survival defined by the ER/PR/HER2 subtypes and a surrogate classification according to tumor grade and immunohistochemical biomarkers. *J. Cancer Epidemiol.* 2014, 469251.

Parveen, S., y Sahoo, S.K. (2008). Polymeric nanoparticles for cancer therapy. *J. Drug Target.* 16, 108–123.

Parveen, S., y Sahoo, S.K. (2011). Long circulating chitosan/PEG blended PLGA nanoparticle for tumor drug delivery. *Eur. J. Pharmacol.* 670, 372–383.

Pridge, E.M., Alexix, F., Langer, R.S., y Farohkzad, O.C. (2009). Biodegradable, targeted, polymeric nanoparticle drug delivery formulation for cancer therapy. Chapter 12. *Methods in Bioengineering: Nanoscale Bioengineering and Nanomedicine.* Boston: Artech House.

Péan, J.M., Boury, F., Venier-Julienne, M.C., Menei, P., Proust, J.E., y Benoit, J.P. (1999). Why does PEG 400 co-encapsulation improve NGF stability and release from PLGA biodegradable microspheres? *Pharm. Res.* 8, 1294–1299.

Pereverzeva, E., Treschalin, I., Bodyagin, D., Maksimenko, O., Kreuter, J., y Gelperina, S. (2008). Intravenous tolerance of a nanoparticle-based formulation of doxorubicin in healthy rats. *Toxicol. Lett.* 178, 9–19.

Peters, G.J., Backus, H.H.J., Freemantle, S., van Triest, B., Codacci-Pisanelli, G., van der Wilt, C.L., Smid, K., Lunec, J., Calvert, A.H., Marsh, S., y cols. (2002). Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1587, 194–205.

Petri, B., Bootz, A., Khalansky, A., Hekmatara, T., Müller, R., Uhl, R., Kreuter, J., y Gelperina, S. (2007). Chemotherapy of brain tumour using doxorubicin bound to surfactant-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: revisiting the role of surfactants. *J. Control. Release* 117, 51–58.

Pinsky, P.F. (2006). Racial and ethnic differences in lung cancer incidence: how much is explained by differences in smoking patterns? (United States). *Cancer Causes Control* 17, 1017–1024.

Pitt, G.C. (1990). Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) and its co-polymers. In *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems*. New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker, pp. 71–120.

Pohlmann, A.R., Fonseca, F.N., Paese, K., Detoni, C.B., Coradini, K., Beck, R.C., y Guterres, S.S. (2013). Poly( $\epsilon$ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 10, 623–638.

Poupaert, J.H., y Couvreur, P. (2003). A computationally derived structural model of doxorubicin interacting with oligomeric polyalkylcyanoacrylate in nanoparticles. *J. Control. Release* 92, 19–26.

Prados, J., Melguizo, C., Rama, A.R., Ortiz, R., Segura, A., Boulaiz, H., Vélez, C., Caba, O., Ramos, J.L., y Aránega, A. (2010). Gef gene therapy enhances the therapeutic efficacy of doxorubicin to combat growth of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 66, 69–78.

Prados, J., Melguizo, C., Ortiz, R., Perazzoli, G., Cabeza, L., Alvarez, P.J., Rodríguez-Serrano, F., y Aránega, A. (2013). Colon cancer therapy: recent developments in nanomedicine to improve the efficacy of conventional chemotherapeutic drugs. *Anticancer Agents Med. Chem.* 13, 1204–1216.

Prota, A.E., Bargsten, K., Zurwerra, D., Field, J.J., Díaz, J.F., Altmann, K.-H., y Steinmetz, M.O. (2013). Molecular mechanism of action of microtubule-stabilizing anticancer agents. *Science* 339, 587–590.

Pu, Y., Chang, S., Yuan, H., Wang, G., He, B., y Gu, Z. (2013). The anti-tumor efficiency of poly(L-glutamic acid) dendrimers with polyhedral oligomeric silsesquioxane cores. *Biomaterials.* 34, 3658–3666.

Rahimi, M., Wadajkar, A., Subramanian, K., Yousef, M., Cui, W., Hsieh, J.T., y Nguyen, K.T. (2010). In vitro evaluation of novel polymer-coated magnetic nanoparticles for controlled drug delivery. *Nanomedicine* 6, 672–680.

Rahman, A.M., Yusuf, S.W., y Ewer, M.S. (2007). Anthracycline-induced cardiotoxicity and the cardiac-sparing effect of liposomal formulation. *Int. J. Nanomedicine* 2, 567–583.

Ransohoff, D.F., y Lang, C.A. (1991). Screening for colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 325, 37–41.



Rao, W., Deng, Z.S., y Liu, J. (2010). A review of hyperthermia combined with radiotherapy/chemotherapy on malignant tumors. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 38, 101–116.

Redig, A.J., y McAllister, S.S. (2013). Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis. *J. Intern. Med.* 274, 113–126.

Ren, D., Kratz, F., y Wang, S.W. (2011). Protein nanocapsules containing doxorubicin as a pH-responsive delivery system. *Small.* 7, 1051–1060.

Ren, F., Chen, R., Wang, Y., Sun, Y., Jiang, Y., y Li, G. (2011). Paclitaxel-loaded poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticle delivery system to overcome multidrug resistance in ovarian cancer. *Pharm. Res.* 28, 897–906.

Ribeiro, R.A., Wanderley, C.W.S., Wong, D.V.T., Mota, J.M.S.C., Leite, C.A.V.G., Souza, M.H.L.P., Cunha, F.Q., y Lima-Júnior, R.C.P. (2016). Irinotecan- and 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis: insights into pathogenesis and therapeutic perspectives. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 78, 881–893.

Rojas, J., Pinto-Alphandary, H., Leo, E., Pecquet, S., Couvreur, P., Gulik, A., y Fattal, E. (1999). A polysorbate-based non-ionic surfactant can modulate loading and release of beta-lactoglobulin entrapped in multiphase poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *Pharm. Res.* 16, 255–260.

Rostami, E., Kashanian, S., Azandaryani, A.H., Faramarzi, H., Dolatabadi, J.E.N., y Omidfar, K. (2014). Drug targeting using solid lipid nanoparticles. *Chem. Phys. Lipids* 181, 56–61.

Rowinsky, E.K. (1997). The Development and Clinical Utility of the Taxane Class of Antimicrotubule Chemotherapy Agents. *Annu. Rev. Med.* 48, 353–374.

Rutman, R.J., Cantarow, A., y Paschkis, K.E. (1954). Studies in 2-acetylaminofluorene carcinogenesis. III. The utilization of uracil-2-C14 by preneoplastic rat liver and rat hepatoma. *Cancer Res.* 14, 119–123.

Ruttala, H.B., Ramasamy, T., Poudal, B.K., Choi, Y., Choi, J.Y., Kim, J., Kwang Ku, S., Choi, H.-G., Soon Yong, C., y Oh Kim, J. (2017). Molecularly targeted co-delivery of a histone deacetylase inhibitor and paclitaxel by lipid-protein hybrid nanoparticles for synergistic combinational chemotherapy. *Oncotarget* 8, 14925–14940.

Rycaj, K., y Tang, D.G. (2015). Cell-of-origin of cancer versus cancer stem cells: assays and interpretations. *Cancer Res.* 75, 4003–4011.

Saclarides, T.J., Szeluga, D., y Staren, E.D. (1994). Neuroendocrine cancers of the colon and rectum. Results of a ten-year experience. *Dis. Colon Rectum* 37, 635–642.

Sadat Tabatabaei Mirakabad, F., Nejati-Koshki, K., Akbarzadeh, A., Yamchi, M.R., Milani, M., Zarghami, N., Zeighamian, V., Rahimzadeh, A., Alimohammadi, S., Hanifehpour, Y., y cols. (2014). PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 15, 517–535.

Saha, R.N., Vasanthakumar, S., Bende, G., y Snehalatha, M. (2010). Nanoparticulate drug delivery systems for cancer chemotherapy. *Mol. Membr. Biol.* 27, 215–231.

Sahay, G., Batrakova, E.V., y Kabanov, A.V. (2008). Different internalization pathways of polymeric micelles and unimers and their effects on vesicular transport. *Bioconjug. Chem.* 19, 2023–2029.

Sahay, G., Alakhova, D.Y., y Kabanov, A.V. (2010). Endocytosis of nanomedicines. *J. Control. Release* 145, 182–195.

Sahoo, S.K., y Labhasetwar, V. (2003). Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discov. Today* 8, 1112–1120.

Sahoo, S.K., Parveen, S., y Panda, J.J. (2007). The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine* 3, 20–31.

Sajid, M., Ilyas, M., Basheer, C., Tariq, M., Daud, M., Baig, N., y Shehzad, F. (2015). Impact of nanoparticles on human and environment: review of toxicity factors, exposures, control strategies, and future prospects. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 4122–4143.

Salvatorelli, E., Menna, P., Cascegna, S., Liberi, G., Calafiore, A.M., Gianni, L., y Minotti, G. (2006). Paclitaxel and docetaxel stimulation of doxorubicinol formation in the human heart: implications for cardiotoxicity of doxorubicin-taxane chemotherapies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318, 424–433.

Sanna, V., Chamcheu, J.C., Pala, N., Mukhtar, H., Sechi, M., y Siddiqui, I.A. (2015). Nanoencapsulation of natural triterpenoid celastrol for prostate cancer treatment. *Int. J. Nanomedicine.* 10, 6835–6846.

Sardão, V.A., Oliveira, P.J., Holy, J., Oliveira, C.R., y Wallace, K.B. (2009). Morphological alterations induced by doxorubicin on H9c2 myoblasts: nuclear, mitochondrial, and cytoskeletal targets. *Cell. Biol. Toxicol.* 25, 227–243.

Scagliotti, G. v., De Marinis, F., Rinaldi, M., Crinò, L., Gridelli, C., Ricci, S., Matano, E., Boni, C., Marangolo, M., Failla, G., y cols. (2002). Phase III randomized trial comparing three platinum-based doublets in advanced non–small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 20, 4285–4291.

Scheinberg, D.A., Villa, C.H., Escorcia, F.E., y McDevitt, M.R. (2010). Conscripts of the infinite armada: systemic cancer therapy using nanomaterials. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 7, 266–276.

Scherer, D., Robinson, J.R., y Kreuter, J. (1994). Influence of enzymes on the stability of polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 101, 165–168.

Schipper, M.L., Iyer, G., Koh, A.L., Cheng, Z., Ebenstein, Y., Aharoni, A., Keren, S., Bentolila, L.A., Li, J., Rao, J., y cols. (2009). Particle size, surface coating, and PEGylation influence the biodistribution of quantum dots in living mice. *Small* *Weinh. Bergstr. Ger.* 5, 126–134.

Schuch, G. (2005). EndoTAG-1. *MediGene. Curr. Opin. Investig. Drugs* 6, 1259–1265.

Schwartz, A.G., y Cote, M.L. (2016). Epidemiology of Lung Cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 893, 21–41.

Schwendener, R.A. (2007). Liposomes in biology and medicine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 620, 117–128.

Selby, L.I., Cortez-Jugo, C.M., Such, G.K., y Johnston, A.P.R. (2017). Nanoescapology: progress toward understanding the endosomal escape of polymeric nanoparticles. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* [Epub ahead of print].

Senzer, N., Nemunaitis, J., Nemunaitis, D., Bedell, C., Edelman, G., Barve, M., Nunan, R., Pirollo, K.F., Rait, A., y Chang, E.H. (2013). Phase I study of a systemically delivered p53 nanoparticle in advanced solid tumors. *Mol. Ther.* 21, 1096–1103.

Shabestari Khiabani, S., Farshbaf, M., Akbarzadeh, A., y Davaran, S. (2017). Magnetic nanoparticles: preparation methods, applications in cancer diagnosis and cancer therapy. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* 45, 6–17.

Shi, J., Kantoff, P.W., Wooster, R., y Farokhzad, O.C. (2017). Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Cancer* 17, 20–37.

Sholl, L.M., Barletta, J.A., y Hornick, J.L. (2017). Radiation-associated neoplasia: clinical, pathological and genomic correlates. *Histopathology* 70, 70–80.

Singletery, K.W., y Gapstur, S.M. (2001). Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. *JAMA* 286, 2143–2151.

Sinha, V.R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R., y Trehan, A. (2004). Poly- $\epsilon$ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *Int. J. Pharm.* 278, 1–23.

Sitzler, P.J., Seow-Choen, F., Ho, Y.H., y Leong, A.P. (1997). Lymph node involvement and tumor depth in rectal cancers: an analysis of 805 patients. *Dis. Colon Rectum* 40, 1472–1476.

Slingerland, M., Guchelaar, H.-J., y Gelderblom, H. (2012). Liposomal drug formulations in cancer therapy: 15 years along the road. *Drug Discov. Today* 17, 160–166.

Smejkalova, D., K. Nesporova, y cols. (2014). Selective in vitro anticancer effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticles loaded in hyaluronan polymeric micelles. *Biomacromolecules* 15, 4012–4020.

Smith, L.E., Denissenko, M.F., Bennett, W.P., Li, H., Amin, S., Tang, M., y Pfeifer, G.P. (2000). Targeting of lung cancer mutational hotspots by polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 803–811.

Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Las cifras del cáncer en España. (2016). Disponible de: [http://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/LAS\\_CIFRAS\\_DEL\\_CANCER\\_EN\\_ESP\\_2016.pdf](http://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/LAS_CIFRAS_DEL_CANCER_EN_ESP_2016.pdf). Acceso el 30 de enero de 2017.

Song, C.X., Labhasetwar, V., Murphy, H., Qu, X., Humphrey, W.R., Shebuski, R.J., and Levy, R.J. (1997). Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery. *J. Controlled Release* 43, 197–212.

Song, M., Zang, W., Zhang, B., Cao, J., y Yang, G. (2012). GCS overexpression is associated with multidrug resistance of human HCT-8 colon cancer cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 31, 23.

Song, W., Tang, Z., Lei, T., Wen, X., Wang, G., Zhang, D., Deng, M., Tang, X., y Chen, X. (2016). Stable loading and delivery of disulfiram with mPEG-PLGA/PCL mixed nanoparticles for tumor therapy. *Nanomedicine* 12, 377–386.

Sorrentino, M.F., Kim, J., Foderaro, A.E., y Truesdell, A.G. (2012). 5-fluorouracil induced cardiotoxicity: review of the literature. *Cardiol. J.* 19, 453–458.

Sparreboom, A., van Tellingen, O., Nooijen, W.J., y Beijnen, J.H. (1996). Nonlinear pharmacokinetics of paclitaxel in mice results from the pharmaceutical vehicle Cremophor EL. *Cancer Res.* 56, 2112–2115.

Stěrba, M., Popelová, O., Lenčo, J., Fučíková, A., Brčáková, E., Mazurová, Y., Jirkovský, E., Simůnek, T., Adamcová, M., Mičuda, S., y cols. (2011). Proteomic insights into chronic anthracycline cardiotoxicity. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 50, 849–862.

Stoehr, L.C., Gonzalez, E., Stampfl, A., Casals, E., Duschl, A., Puentes, V., y Oostingh, G.J. (2011). Shape matters: effects of silver nanospheres and wires on human alveolar epithelial cells. *Part. Fibre Toxicol.* 8, 36.

Su, Z., Xing, L., Chen, Y., Xu, Y., Yang, F., Zhang, C., Ping, Q., y Xiao, Y. (2014). Lactoferrin-modified poly(ethylene glycol)-grafted BSA nanoparticles as a dual-targeting carrier for treating brain gliomas. *Mol. Pharm.* 11, 1823–1834.

Subik, K., Lee, J.F., Baxter, L., Strzepak, T., Costello, D., Crowley, P., Xing, L., Hung, M.C., Bonfiglio, T., Hicks, D.G., y cols. (2010). The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer (Auckl).* 4, 35–41.

Suh, W.H., Suslick, K.S., Stucky, G.D., y Suh, Y.-H. (2009). Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. *Prog. Neurobiol.* 87, 133–170.

Suksiriworapong, J., Phoca, K., Ngamsom, S., Sripha, K., Moongkarndi, P., y Junyaprasert, V.B. (2016). Comparison of poly( $\epsilon$ -caprolactone) chain lengths of poly( $\epsilon$ -caprolactone)-co-d- $\alpha$ -tocopheryl-poly(ethylene glycol) 1000 succinate nanoparticles for enhancement of quercetin delivery to SKBR3 breast cancer cells. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 101, 15–24.

Sullivan, C.O., y Birkinshaw, C. (2004). In vitro degradation of insulin-loaded poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles. *Biomaterials* 25, 4375–4382.

Sullivan, J.P., Minna, J.D., y Shay, J.W. (2010). Evidence for self-renewing lung cancer stem cells and their implications in tumor initiation, progression, and targeted therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 29, 61–72.

Sun, C., Zhou, L., Gou, M., Shi, S., Li, T., y Lang, J. (2016). Improved antitumor activity and reduced myocardial toxicity of doxorubicin encapsulated in MPEG-PCL nanoparticles. *Oncol. Rep.* 35, 3600–3606.

Surapaneni, M.S., Das, S.K., y Das, N.G. (2012). Designing paclitaxel drug delivery systems aimed at improved patient outcomes: current status and challenges. *ISRN Pharmacol.* 2012.

Tacar, O., Sriamornsak, P., y Dass, C.R. (2013). Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J. Pharm. Pharmacol.* 65, 157–170.

Tanaka, T., Decuzzi, P., Cristofanilli, M., Sakamoto, J.H., Tasciotti, E., Robertson, F.M., y Ferrari, M. (2009). Nanotechnology for breast cancer therapy. *Biomed. Microdevices* 11, 49–63.

Tang, R., Kim, C.S., Solfiell, D.J., Rana, S., Mout, R., Velázquez-Delgado, E.M., Chompoosor, A., Jeong, Y., Yan, B., Zhu, Z.-J., y cols. (2013). Direct delivery of functional proteins and enzymes to the cytosol using nanoparticle-stabilized nanocapsules. *ACS Nano* 7, 6667–6673.

Tang, Z., Zhang, L., Wang, Y., Li, D., Zhong, Z., y Zhou, S. (2016). Redox-responsive star-shaped magnetic micelles with active-targeted and magnetic-guided functions for cancer therapy. *Acta Biomater.* 42, 232–246.

Tarantola, M., Pietuch, A., Schneider, D., Rother, J., Sunnick, E., Rosman, C., Pierrat, S., Sönnichsen, C., Wegener, J., y Janshoff, A. (2011). Toxicity of gold-



nanoparticles: synergistic effects of shape and surface functionalization on micromotility of epithelial cells. *Nanotoxicology* 5, 254–268.

Tavassoli, F.A., y Devilee P. (2003). Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. International Agency for Research on Cancer. Disponible de: <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb4/>. Acceso el 8 de febrero de 2017.

Tharkar, P., Madani, A.U., Lasham, A., Shelling, A.N., y Al-Kassas, R. (2015). Nanoparticulate carriers: an emerging tool for breast cancer therapy. *J. Drug Target.* 23, 97–108.

Thorn, C.F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T.E., y Altman, R.B. (2011). Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet. Genomics* 21, 440–446.

Thorson, A.G., Knezetic, J.A., y Lynch, H.T. (1999). A century of progress in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). *Dis. Colon Rectum* 42, 1–9.

Tiefenauer, L.X., Kuehne, G., y Andres, R.Y. (1993). Antibody-magnetite nanoparticles: In vitro characterization of a potential tumor-specific contrast agent for magnetic resonance imaging. *Bioconjug. Chem.* 4, 347–352.

Tomcin, S., Baier, G., Landfester, K., y Mailänder, V. (2014). Pharmacokinetics on a microscale: visualizing Cy5-labeled oligonucleotide release from poly(n-butylcyanoacrylate) nanocapsules in cells. *Int. J. Nanomedicine* 9, 5471–5489.

Tong, R., y Kohane, D.S. (2016). New strategies in cancer nanomedicine. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 56, 41–57.

Tran, T.-H., Nguyen, C.T., Gonzalez-Fajardo, L., Hargrove, D., Song, D., Deshmukh, P., Mahajan, L., Ndaya, D., Lai, L., Kasi, R.M., y cols. (2014). Long circulating self-assembled nanoparticles from cholesterol-containing brush-like block copolymers for improved drug delivery to tumors. *Biomacromolecules* 15, 4363–4375.

Truong, N.P., Whittaker, M.R., Mak, C.W., y Davis, T.P. (2015). The importance of nanoparticle shape in cancer drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 12, 129–142.

Upadhyay, K.K., Bhatt, A.N., Mishra, A.K., Dwarakanath, B.S., Jain, S., Schatz, C., Le Meins, J.F., Farooque, A., Chandraiah, G., Jain, A.K., y cols. (2010). The intracellular drug delivery and anti tumor activity of doxorubicin loaded poly( $\gamma$ -benzyl L-glutamate)-b-hyaluronan polymersomes. *Biomaterials*. 31, 2882–2892.

Valdiglesias, V., Fernández-Bertólez, N., Kiliç, G., Costa, C., Costa, S., Fraga, S., Bessa, M.J., Pásaro, E., Teixeira, J.P., y Laffon, B. (2016). Are iron oxide nanoparticles safe? Current knowledge and future perspectives. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 38, 53–63.

Van Natta, F.J., Hill, J.W., y Carruthers, W.H. (1934). Polymerization and ring formation,  $\epsilon$ -caprolactone and its polymers. *J Am Chem Soc* 56, 455–459.

Vasir, J.K., y Labhasetwar, V. (2007). Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 718–728.

Vasir, J.K., y Labhasetwar, V. (2008). Quantification of the force of nanoparticle-cell membrane interactions and its influence on intracellular trafficking of nanoparticles. *Biomaterials* 29, 4244–4252.

Vega-Villa, K.R., Takemoto, J.K., Yáñez, J.A., Remsberg, C.M., Forrest, M.L., y Davies, N.M. (2008). Clinical toxicities of nanocarrier systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 929–938.

Vejpongsa, P., y Yeh, E.T.H. (2014). Topoisomerase 2 $\beta$ : a promising molecular target for primary prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Clin. Pharmacol. Ther.* 95, 45–52.

Verma, A., y Stellacci, F. (2010). Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small Weinh. Bergstr. Ger.* 6, 12–21.

Verschraegen, C.F., Gilbert, B.E., Huaringa, A.J., Newman, R., Harris, N., Leyva, F.J., Keus, L., Campbell, K., Nelson-Taylor, T., y Knight, V. (2000). Feasibility, phase I, and pharmacological study of aerosolized liposomal 9-nitro-20(S)-camptothecin in patients with advanced malignancies in the lungs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 922, 352–354.

Vert, M., Li, S.M., Spenlehauer, G., y Guerin, P. (1992). Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 3, 432–446.

Vicari, L., Musumeci, T., Giannone, I., Adamo, L., Conticello, C., De Maria, R., Pignatello, R., Puglisi, G., y Gulisano, M. (2008). Paclitaxel loading in PLGA nanospheres affected the in vitro drug cell accumulation and antiproliferative activity. *BMC Cancer* 8, 212.

©Vidal Vademecum. (2017). PACLITAXEL ACCORD Concentrado para sol. para perfusión 6 mg/ml. Disponible de: [http://www.vademecum.es/medicamento-paclitaxel+accord\\_38460](http://www.vademecum.es/medicamento-paclitaxel+accord_38460). Acceso el 14 de febrero de 2017.

Vila, A., Sánchez, A., Tobío, M., Calvo, P., y Alonso, M.J. (2002). Design of biodegradable particles for protein delivery. *J. Controlled Release* 78, 15–24.

Visvader, J.E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature* 469, 314–322.

Vivek, R., Thangam, R., NipunBabu, V., Rejeeth, C., Sivasubramanian, S., Gunasekaran, P., Muthuchelian, K., y Kannan, S. (2014). Multifunctional HER2-antibody conjugated polymeric nanocarrier-based drug delivery system for multi-drug-resistant breast cancer therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6, 6469–6480.

Von Hoff, D.D., Mita, M.M., Ramanathan, R.K., Weiss, G.J., Mita, A.C., LoRusso, P.M., Burris, H.A., Hart, L.L., Low, S.C., Parsons, D.M., y cols. (2016). Phase I study of PSMA-targeted docetaxel-containing nanoparticle BIND-014 in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.* 22, 3157–3163.

Vriens, B.E.P.J., Aarts, M.J.B., de Vries, B., van Gastel, S.M., Wals, J., Smilde, T.J., van Warmerdam, L.J.C., de Boer, M., van Spronsen, D.J., Borm, G.F., y cols. (2013). Doxorubicin/cyclophosphamide with concurrent versus sequential docetaxel as neoadjuvant treatment in patients with breast cancer. *Eur. J. Cancer* 49, 3102–3110.

Wang, B.-L., Shen, Y., Zhang, Q., Li, Y., Luo, M., Liu, Z., Li, Y., Qian, Z., Gao, X., y Shi, H. (2013). Codelivery of curcumin and doxorubicin by MPEG-PCL results in improved efficacy of systemically administered chemotherapy in mice with lung cancer. *Int. J. Nanomedicine.* 8, 3521–3531.

Wang, J., y Peng, C.A. (2011). Anticancer effectiveness of polymeric drug nanocarriers on colorectal cancer cells. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* 2011, 3249–3252.

Wang, M., y Thanou, M. (2010). Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacol. Res.* 62, 90–99.

Wang, X., Wang, Y., Chen, Z.G., y Shin, D.M. (2009). Advances of cancer therapy by nanotechnology. *Cancer Res. Treat.* 41, 1–11.

Wang, Y., Aker, W.G., Hwang, H., Yedjou, C.G., Yu, H., y Tchounwou, P.B. (2011). A study of the mechanism of in vitro cytotoxicity of metal oxide nanoparticles using catfish primary hepatocytes and human HepG2 cells. *Sci. Total Environ.* 409, 4753–4762.

Wang, Y., Li, P., Chen, L., Gao, W., Zeng, F., y Kong, L.X. (2015). Targeted delivery of 5-fluorouracil to HT-29 cells using high efficient folic acid-conjugated nanoparticles. *Drug Deliv.* 22, 191–198.

Wang, Y.X.J. (2011). Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application. *Quant. Imaging Med. Surg.* 1, 35–40.

Wani, M.C., Taylor, H.L., Wall, M.E., Coggon, P., y McPhail, A.T. (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* 93, 2325–2327.

Weaver, B.A. (2014). How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol. Biol. Cell* 25, 2677–2681.

Weinberg, W.C., Frazier-Jessen, M.R., Wu, W.J., Weir, A., Hartsough, M., Keegan, P., y Fuchs, C. (2005). Development and regulation of monoclonal antibody products: challenges and opportunities. *Cancer Metastasis Rev.* 24, 569–584.

Weiss, R.B., Donehower, R.C., Wiernik, P.H., Ohnuma, T., Gralla, R.J., Trump, D.L., Baker, J.R., Van Echo, D.A., Von Hoff, D.D., y Leyland-Jones, B. (1990). Hypersensitivity reactions from taxol. *J. Clin. Oncol.* 8, 1263–1268.

Weiss, R.B. (1992). The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Semin. Oncol.* 19, 670–686.

Weiszhar, Z., Czucz, J., Révész, C., Rosivall, L., Szebeni, J., y Rozsnyay, Z. (2012). Complement activation by polyethoxylated pharmaceutical surfactants: Cremophor-EL, Tween-80 and Tween-20. *Eur. J. Pharm. Sci.* 45, 492–498.

Wesołowska, O. (2011). Interaction of phenothiazines, stilbenes and flavonoids with multidrug resistance-associated transporters, P-glycoprotein and MRP1. *Acta Biochim. Pol.* 58, 433–448.

Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian, V., y Huwyler, J. (2015). Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. *J. Controlled Release* 200, 138–157.

Winnik, F.M., y Maysinger, D. (2013). Quantum dot cytotoxicity and ways to reduce it. *Acc. Chem. Res.* 46, 672–680.

Wohlfart, S., Khalansky, A.S., Bernreuther, C., Michaelis, M., Cinatl, J. Jr., Glatzel, M., y Kreuter, J. (2011a). Treatment of glioblastoma with poly(isohexyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 415, 244–251.

Wohlfart, S., Khalansky, A.S., Gelperina, S., Begley, D., y Kreuter, J. (2011b). Kinetics of transport of doxorubicin bound to nanoparticles across the blood–brain barrier. *J. Control. Release.* 154, 103–107.

Wohlhueter, R.M., McIvor, R.S., y Plagemann, P.G. (1980). Facilitated transport of uracil and 5-fluorouracil, and permeation of orotic acid into cultured mammalian cells. *J. Cell. Physiol.* 104, 309–319.

Wong, H.L., Bendayan, R., Rauth, A.M., Li, Y., y Wu, X.Y. (2007). Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 491–504.

Woodruff, M.A., y Hutmacher, D.W. (2010). The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. *Prog. Polym. Sci.* 35, 1217–1256.

Woodward, S.C., Brewer, P.S., Moatamed, F., Schindler, A., y Pitt, C.G. (1985). The intracellular degradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone). *J. Biomed. Mater. Res.* 19, 437–444.

Wu, J., Akaike, T., Hayashida, K., Okamoto, T., Okuyama, A., y Maeda, H. (2001). Enhanced vascular permeability in solid tumor involving peroxynitrite and matrix metalloproteinases. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* 92, 439–451.

Xiao, K., Li, Y., Luo, J., Lee, J.S., Xiao, W., Gonik, A.M., Agarwal, R.G., y Lam, K.S. (2011). The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholeic acid based micellar nanoparticles. *Biomaterials* 32, 3435–3446.

Xie, M., Xu, Y., Shen, H., Shen, S., Ge, Y., y Xie, J. (2014). Negative-charge-functionalized mesoporous silica nanoparticles as drug vehicles targeting hepatocellular carcinoma. *Int. J. Pharm.* 474, 223–231.

Xing, L., Shi, Q., Zheng, K., Shen, M., Ma, J., Li, F., Liu, Y., Lin, L., Tu, W., Duan, Y., y cols. (2016). Ultrasound-mediated microbubble destruction (UMMD) facilitates the delivery of CA19-9 targeted and paclitaxel loaded mPEG-PLGA-PLL nanoparticles in pancreatic cancer. *Theranostics* 6, 1573–1587.

Xu, N., Gu, J., Zhu, Y., Wen, H., Ren, Q., y Chen, J. (2011). Efficacy of intravenous amphotericin B-polybutylcyanoacrylate nanoparticles against cryptococcal meningitis in mice. *Int. J. Nanomedicine* 6, 905–913.

Xu, Z.R., Wang, W.F., Liang, X.-F., Liu, Z.H., Liu, Y., Lin, L., y Zhu, X. (2015). Protective effects of poly (butyl) cyanoacrylate nanoparticles containing vasoactive intestinal peptide against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in vitro. *J. Mol. Neurosci.* 55, 854–864.

Yadav, S., van Vlerken, L.E., Little, S.R., y Amiji, M.M. (2009). Evaluations of combination MDR-1 gene silencing and paclitaxel administration in biodegradable polymeric nanoparticle formulations to overcome multidrug resistance in cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 63, 711–722.

Yamamoto, Y., Kawano, I., y Iwase, H. (2011). Nab-paclitaxel for the treatment of breast cancer: efficacy, safety, and approval. *OncoTargets Ther.* 4, 123–136.

Yang, S.T., Luo, J., Zhou, Q., y Wang, H. (2012). Pharmacokinetics, metabolism and toxicity of carbon nanotubes for biomedical purposes. *Theranostics* 2, 271–282.

Yang, Y., Pan, D., Luo, K., Li, L., y Gu, Z. (2013). Biodegradable and amphiphilic block copolymer-doxorubicin conjugate as polymeric nanoscale drug delivery vehicle for breast cancer therapy. *Biomaterials* 34, 8430–8443.

Yin, Y., Zeng, K., Wu, M., Ding, Y., Zhao, M., y Chen, Q. (2014). The levels of Ki-67 positive are positively associated with lymph node metastasis in invasive ductal breast cancer. *Cell Biochem. Biophys.* 70, 1145–1151.

Yordanov, G., Skrobanska, R., y Evangelatov, A. (2012). Entrapment of epirubicin in poly(butyl cyanoacrylate) colloidal nanospheres by nanoprecipitation: formulation development and in vitro studies on cancer cell lines. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 92, 98–105.



Yordanov, G., Evangelatov, A., y Skrobanska, R. (2013a). Epirubicin loaded to pre-polymerized poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: preparation and in vitro evaluation in human lung adenocarcinoma cells. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 107, 115–123.

Yordanov, G., Evangelatov, A., y Skrobanska, R. (2013b). Epirubicin loaded to pre-polymerized poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: preparation and in vitro evaluation in human lung adenocarcinoma cells. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 107, 115–123.

Yu, M.K., Jeong, Y.Y., Park, J., Park, S., Kim, J.W., Min, J.J., Kim, K., y Jon, S. (2008). Drug-loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for combined cancer imaging and therapy in vivo. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 47, 5362–5365.

Zelen, M. (1973). Keynote address on biostatistics and data retrieval. *Cancer Chemother. Rep. [3]* 4, 31–42.

Zelphati, O., y Szoka, F.C. (1996). Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 11493–11498.

Zhang, C., Zhao, L., Dong, Y., Zhang, X., Lin, J., y Chen, Z. (2010). Folate-mediated poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyoctanoate) nanoparticles for targeting drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 76, 10–16.

Zhang, N., Yin, Y., Xu, S.-J., y Chen, W.-S. (2008). 5-Fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies. *Mol. Basel Switz.* 13, 1551–1569.

Zhang, S., Liu, X., Bawa-Khalfe, T., Lu, L.-S., Lyu, Y.L., Liu, L.F., y Yeh, E.T.H. (2012a). Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat. Med.* 18, 1639–1642.

Zhang, Y., Li, J., Lang, M., Tang, X., Li, L., y Shen, X. (2011). Folate functionalized nanoparticles for controlled 5-fluorouracil delivery. *J. Colloid. Interface. Sci.* 354, 202–209.

Zhang, Y., Xu, D., Li, W., Yu, J., y Chen, Y. (2012). Effect of size, shape, and surface modification on cytotoxicity of gold nanoparticles to human HEp-2 and canine MDCK cells. *J. Nanomater.* 2012, e375496.

Zhang, Y., Yu, J., Zhang, L., Cai, J., Cai, D., y Lv, C. (2016). Enhanced anti-tumor effects of doxorubicin on glioma by entrapping in polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Tumour Biol.* 37, 2703–2708.

Zhang, Y., Wen, Y.L., Ma, J.W., Ye, J.C., Wang, X., Huang, J.X., Meng, C.Y., Xu, X.Z., Wang, S.X., y Zhong, X.Y. (2017). Tetrandrine inhibits glioma stem-like cells by repressing  $\beta$ -catenin expression. *Int. J. Oncol.* 50, 101–110.

Zhao, Q., Han, B., Wang, Z., Gao, C., Peng, C., y Shen, J. (2007). Hollow chitosan-alginate multilayer microcapsules as drug delivery vehicle: doxorubicin loading and in vitro and in vivo studies. *Nanomedicine* 3, 63–74.

Zheng, L., Gou, M., Zhou, S., Yi, T., Zhong, Q., Li, Z., He, X., Chen, X., Zhou, L., Wei, Y., Qian, Z., y Zhao, X. (2011). Antitumor activity of monomethoxy poly(ethylene glycol)-poly( $\epsilon$ -caprolactone) micelle-encapsulated doxorubicin against mouse melanoma. *Oncol. Rep.* 25, 1557–1564.

Zhong, Y., Meng, F., Deng, C., y Zhong, Z. (2014). Ligand-directed active tumor-targeting polymeric nanoparticles for cancer chemotherapy. *Biomacromolecules* 15, 1955–1969.

Zhu, G., Mallery, S.R., y Schwendeman, S.P. (2000). Stabilization of proteins encapsulated in injectable poly (lactide- co-glycolide). *Nat. Biotechnol.* 18, 52–57.

Zhu, Q., Jia, L., Gao, Z., Wang, C., Jiang, H., Zhang, J., y Dong, L. (2014). A tumor environment responsive doxorubicin-loaded nanoparticle for targeted cancer therapy. *Mol. Pharm.* 11, 3269–3278.

Zou, A., Chen, Y., Huo, M., Wang, J., Zhang, Y., Zhou, J., y Zhang, Q. (2013). In vivo studies of octreotide-modified N-octyl-O, N-carboxymethyl chitosan micelles loaded with doxorubicin for tumor-targeted delivery. *J. Pharm. Sci.* 102, 126–135.

Zubris, K.A.V., Liu, R., Colby, A., Schulz, M.D., Colson, Y.L., y Grinstaff, M.W. (2013). In vitro activity of Paclitaxel-loaded polymeric expansile nanoparticles in breast cancer cells. *Biomacromolecules* 14, 2074–2082.



# **Anexo 1. Publicaciones**