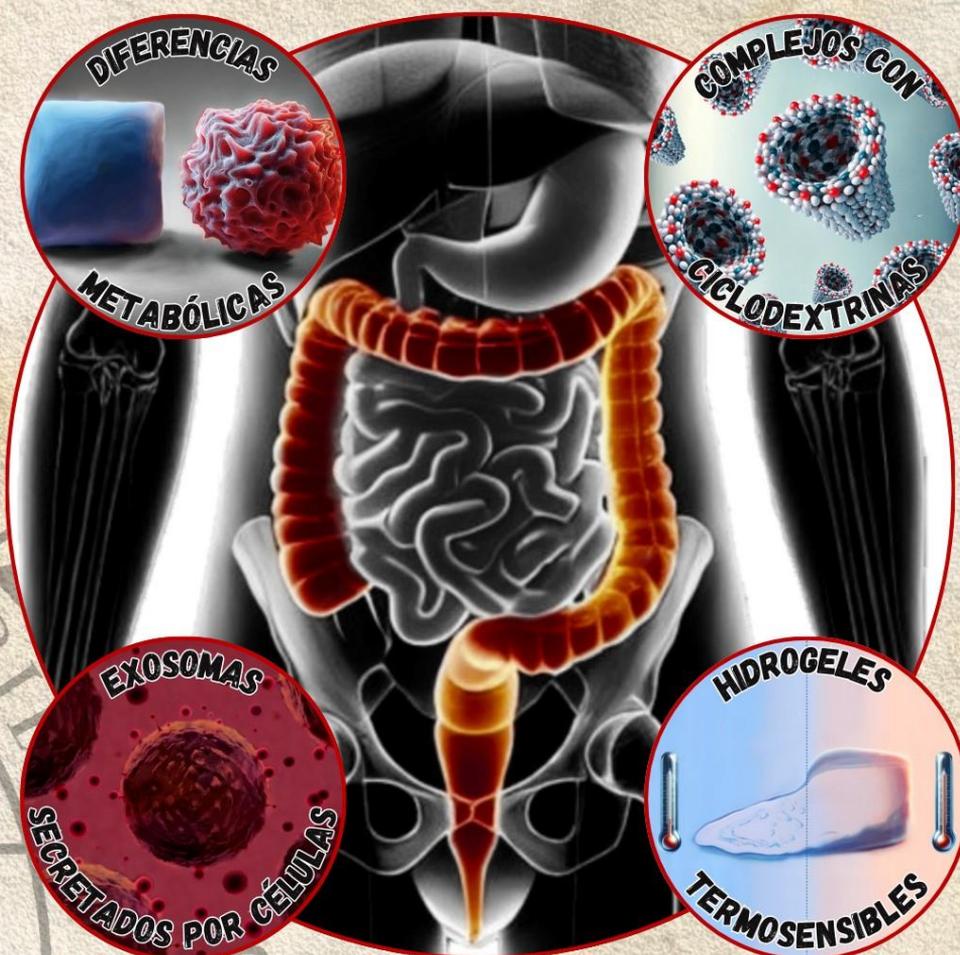




TESIS DOCTORAL

DESARROLLO DE SISTEMAS
INTELIGENTES PARA TRATAMIENTOS
CONTRA EL CÁNCER COLORRECTAL



INMACVLADA DE DIOS PÉREZ



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS OF INTERNATIONAL EXCELLENCE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**DESARROLLO DE SISTEMAS
INTELIGENTES PARA TRATAMIENTOS
CONTRA EL CÁNCER COLORRECTAL**

Memoria para optar al grado de Doctor en Ingeniería Química,
dentro del programa de doctorado Ciencia y Tecnología Químicas,
por la Universidad de Salamanca

Trabajo presentado por:

Inmaculada de Dios Pérez

Salamanca, 2024



VNiVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

La Dra. Dña. Eva Martín del Valle, Catedrática del área de Ingeniería Química de la Universidad de Salamanca, y el Dr. D. Álvaro González Garcinuño, Profesor Permanente Laboral, también adscrito al Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Salamanca,

Certifican:

Que la presente memoria, titulada “Desarrollo de sistemas inteligentes para tratamientos contra el cáncer colorrectal”, presentada por Inmaculada de Dios Pérez para optar al grado de Doctor en Ciencia y Tecnología Químicas por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección en el grupo de investigación Aplicaciones Biomédicas de Ingeniería Química del organismo citado.

Considerando que esta tesis reúne los requisitos científicos necesarios, autorizan su depósito y defensa. Para que así conste, firman el presente informe, en Salamanca a 30 de enero de 2024.

Dña. Eva Martín del Valle

D. Álvaro González Garcinuño

A ti, papá, y a ti, padrino;
ojalá estuvierais aquí.

Y a quienes hemos perdido seres queridos
por culpa de esta lacra llamada cáncer,
contra la que luchamos día tras día.

Agradecimientos

Estas líneas están dedicadas a todas las personas que me han acompañado en esta etapa de mi vida. Una etapa llena de altibajos, ya que a pesar del desafío y de los numerosos contratiempos, ha habido muchísimos momentos llenos de alegría.

En primer lugar, quiero expresar mi gratitud a mi directora, Eva Martín del Valle, por confiar en mí y darme la oportunidad de llevar a cabo esta tesis. Y, por supuesto, agradecer a Álvaro González Garcinuño su constante ayuda, primero como compañero de laboratorio, y después como codirector. Gracias ambos por vuestros consejos y vuestro apoyo.

Agradezco sinceramente el buen ambiente del que he podido disfrutar estos años en el laboratorio, eso ha facilitado considerablemente el trabajo. Tanto a esas personas que continúan en la facultad, como a quienes estuvieron de paso, simplemente puedo decir: GRACIAS. Gracias por las horas compartidas dentro y fuera de la facultad, desde las salidas de *kinito* hasta las visitas a *Tyson*. Del mismo modo, debo agradecer la hospitalidad del grupo de *Biosciences* de la Universidad de Aston, especialmente a Patricia, por acogerme, y Dave, por la ayuda cada vez que no encontraba algo en el laboratorio. Me sentí una más en *Lab fun*, sobre todo cuando por fin sacamos tiempo para divertirnos en *The Gosta Green*. Gracias a quienes, de alguna manera, habéis contribuido a que siempre recuerde con una sonrisa esos meses en Birmingham, y en Reino Unido en general.

Un agradecimiento especial a todos esos grupos de amistad que tengo, porque a pesar de mi cabecita loca y mi falta de tiempo, me siguen queriendo, y sé que se alegran de ver finalizada esta tesis casi tanto como yo. A mi gente de *Aldearrubia*, especialmente a mis chicas de *Rupurupay*, porque a veces la familia podía esperar. A mi *gemelier* y ese grupo festivalero, porque esa es mi gente. A esos que saben perfectamente qué hacer para liarme, mis *lobitos*. A *Venancieros* y ese grupo de mil

planes, porque continuar con esas casas rurales o viajando hasta el fin del mundo. A los días locos con las *ovacionadas*. A mis chicos *marujas*, que siguen sin creer que esta tesis haya llegado a su fin. A quienes prometí irles visitar a Valencia, León, Asturias... aseguro que este año cumpliré esa promesa. A mis *domingueros*, porque me dais la vida cada vez que llega junio. Y a toda la gente de *INNOVA*, porque no hay nada como tener a tu lado personas que están en tu misma situación, gracias por vuestro ánimo, por la orientación y por las noches de karaoke.

Finalmente, mi más sincero agradecimiento a toda mi familia, el mejor regalo que me dejó mi padre. Gracias por esos lunes de aguas, al día de todos los santos, a los días de navidad y a poner cualquier excusa para vernos y disfrutar como solo los *largos* y los *peales* saben. Especialmente a la ayuda incondicional de mi madre, a las largas conversaciones con mi hermana Raquel, a la motivación de mi hermano Antonio y a las risas con mi "hermano" mayor, Santi. Y, por supuesto, que quiero dar mil gracias al amor de mis *sobris*, los besos de David, los abrazos de Emma y las sonrisas de Maddi. Porque sin mi *Ohana* no soy nada.

*La curiosidad es la chispa
que enciende la llama
del descubrimiento*

Marie Curie

Índice General

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	XIV
ÍNDICE DE ECUACIONES	XVI
RESUMEN	XVII
SUMMARY	XXIII
CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN. CÁNCER Y NANOMEDICINA.....	1
1. El cáncer, conceptos y epidemiología	3
2. Características del cáncer	6
2.1. Características habilitadoras	7
<i>Inestabilidad y mutación del genoma.....</i>	<i>7</i>
<i>Inflamación promotora de tumores</i>	<i>8</i>
<i>Reprogramación epigenética no mutacional</i>	<i>8</i>
<i>Microbiomas polimórficos.....</i>	<i>9</i>
2.2. Capacidades adquiridas	10
<i>Mantenimiento de la señal proliferativa</i>	<i>10</i>
<i>Evasión de los supresores de crecimiento.....</i>	<i>11</i>
<i>Resistencia a la apoptosis o muerte celular programada.....</i>	<i>11</i>
<i>Habilidad de replicación ilimitada</i>	<i>12</i>
<i>Inducción o acceso de vasculatura</i>	<i>13</i>
<i>Activación de la invasión de los tejidos y metástasis</i>	<i>13</i>
<i>Reprogramación del metabolismo energético</i>	<i>14</i>
<i>Evadir la destrucción inmune.....</i>	<i>15</i>
<i>Desbloqueo de la plasticidad fenotípica.....</i>	<i>16</i>
<i>Células senescentes</i>	<i>16</i>
3. Cáncer colorrectal.....	17
4. Tratamientos actuales en la lucha contra el cáncer colorrectal	19

4.1. Cirugía.....	21
4.2. Quimioterapia	22
4.3. Radioterapia	23
4.4. Inmunoterapia.....	24
4.5. Terapia dirigida	24
4.6. Tratamientos aprobados para tratar el cáncer colorrectal.....	25
5. Sistemas de liberación controlada y nanotecnología	27
5.1. Nanomedicina y cáncer	28
5.2. Los sistemas nanométricos	30
5.3. Direccionamiento pasivo o activo	33
5.4. Sistemas inteligentes	36
5.4.1. Estímulos endógenos	36
5.4.2. Estímulos exógenos.....	38
6. Las ciclodextrinas	39
6.1. Estructuras de las ciclodextrinas	39
6.2. Formación de los complejos con ciclodextrinas.....	40
6.3. Las ciclodextrinas en tratamientos anticancerígenos.....	43
7. Exosomas como vehículos de fármacos.....	44
7.1. Exosomas como vectores de terapia.....	46
7.2. Exosomas y su papel en terapias anticancerígenas.....	47
8. Hidrogeles	50
8.1. Hidrogeles como DDS.....	51
8.2. Hidrogeles para simulación de tumores	53
9. Consideraciones finales	55
CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS	57
1. Primera estrategia: Actuación sinérgica sobre diferentes rutas del metabolismo de las células cancerígenas	60

2. Segunda estrategia: Mejora de la dirección de los compuestos mediante su encapsulación en exosomas	60
3. Tercera estrategia: Desarrollo de una terapia local	61
CAPÍTULO 3 - FORMACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON CICLODEXTRINAS.....	63
1. Introducción	65
1.1. Pregnenolona.....	67
1.2. Farnesol	70
1.3. Ciclodextrinas	74
2. Los complejos de inclusión	75
2.1. Caracterización de los complejos CD-fármaco	76
2.1.1. <i>Resonancia Magnética Nuclear</i>	76
2.1.2. <i>Espectrofotometría UV-vis</i>	77
2.2. Cuantificación de la concentración de fármacos	78
2.2.1. <i>Control de SBE-β-CD</i>	78
2.2.2. <i>Cuantificación de pregnenolona</i>	80
2.2.3. <i>Cuantificación farnesol</i>	82
2.3. Condiciones óptimas para la formación de complejos	85
2.3.1. <i>Efecto del tiempo en la formación de complejos</i>	86
2.3.2. <i>Efecto de la temperatura en la formación de complejos</i>	86
2.4. Estudios de estabilidad	88
2.5. Conclusión de la formación de complejos.....	90
3. Validación como tratamientos anticancerígenos.....	91
3.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo	91
3.2. Determinación de la viabilidad celular.....	91
3.3. Análisis de los resultados de viabilidad	92
3.3.1. <i>IC₅₀ de SBE-β-CD tras 48 horas de tratamiento</i>	94
3.3.2. <i>IC₅₀ de P5 y SBE-β-CD – P5 tras 48 horas de tratamiento</i>	96

3.3.3. *IC₅₀ de FOH y SBE-β-CD – FOH tras 48 horas de tratamiento*

99

3.4. Validación del efecto terapéutico de FOH	103	
3.5. Viabilidad celular en función del isómero de FOH	104	
3.6. Efecto PC de FOH sobre la viabilidad celular.....	105	
3.7. Efecto del FOH en el ciclo celular	108	
3.8. Validación de la selectividad del farnesol en un cocultivo	110	
4. Conclusiones	112	
5. Artículos publicados relacionados con este capítulo	114	
CAPÍTULO 4 - USO DE EXOSOMAS PARA TRATAMIENTOS		
TERAPÉUTICOS EN EL CÁNCER COLORRECTAL		129
1. Introducción	131	
1.1. Nanotecnología en el desarrollo de nuevas terapias oncológicas	131	
1.2. Los exosomas como vehículos de fármacos	133	
1.3. Uso de Paclitaxel para evitar la reprogramación metabólica	137	
2. Aislamiento y caracterización de exosomas	138	
2.1. Producción de exosomas y su aislamiento del medio	139	
2.1.1. <i>Precipitación basada en polímeros</i>	<i>139</i>	
2.1.2. <i>Aislamiento por ultracentrifugación</i>	<i>140</i>	
2.2. Caracterización de exosomas	140	
2.2.1. <i>Análisis de concentración proteica</i>	<i>141</i>	
2.2.2. <i>Análisis de inmunotransferencia</i>	<i>142</i>	
2.2.3. <i>Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)</i>	<i>145</i>	
2.2.4. <i>Análisis de Tamaño y Potencial Zeta</i>	<i>146</i>	
2.2.5. <i>Estudio de estabilidad</i>	<i>147</i>	
3. Carga de fármacos en exosomas	148	
3.1. Métodos de carga.....	148	
3.2. Cuantificación de carga.....	149	

4. Validación de exosomas como sistemas de administración de fármacos mediante ensayos de toxicidad <i>in vitro</i>	152
4.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo.	152
4.2. Ensayo de viabilidad mediante MTT	153
4.3. Viabilidad celular utilizando exosomas como sistemas de administración de fármacos.....	154
4.4. Comparación de ciclodextrinas o exosomas como sistemas de administración de fármacos.....	156
5. Conclusiones	158
6. Artículos publicados relacionados con este capítulo	160
CAPÍTULO 5 - SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES CON FARNESOL PARA TRATAMIENTO ONCOLÓGICO LOCALIZADO	171
1. Introducción	173
1.1. Pluronic F-127.....	176
1.2. Goma Gellan.....	178
2. Síntesis y caracterización reológica de los hidrogeles.....	179
2.1. Hidrogeles con PF-127	181
2.2. Hidrogeles con GG	186
2.2.1. Reología GG sin PF-127	186
2.2.2. Reología GG con 20% PF-127.....	189
2.2.3. Consideraciones finales sobre el uso de GG	191
2.3. Hidrogeles cargados con fármacos	192
3. Experimentos de degradación del gel y liberación de fármacos	200
3.1. Metodología de la degradación de geles	200
3.1.1. Resultados de la degradación de geles.....	202
3.2. Metodología de la liberación <i>in vitro</i> de FOH.....	208
3.2.1. Cuantificación de fármacos.....	210
3.2.2. Resultados de la liberación de fármacos	211

4. Conclusiones	212
5. Artículos publicados relacionados con este capítulo	213
CAPÍTULO 6 - CONCLUSIONES GENERALES	225
1. Conclusiones generales.....	227
2. General conclusions	232
ANEXO I - HIDROGELES PARA SIMULACIÓN DE TUMORES	237
ANEXO II - PRODUCTOS Y EQUIPOS	249
Productos.....	251
Equipos.....	253
ANEXO III - GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA	255
ANEXO IV - REFERENCIAS	263

Índice de figuras

Figura 1.1 Tasas de incidencia y mortalidad de los cánceres más comunes en 2020 en todo el mundo. Fuente: elaboración propia a partir de los datos publicados por GCO	4
Figura 1.2 Tendencia en la incidencia y mortalidad por cáncer en los próximos años estimado por GCO. Fuente: elaboración propia a partir de los datos publicados por GCO	4
Figura 1.3 Casos de cáncer diagnosticados en España en 2022 (fuente de datos SEOM) Fuente: elaboración propia [4]	5
Figura 1.4 Las características del cáncer (adaptado de Hanahan 2022) [7]	7
Figura 1.5 Inestabilidad genómica en las células tumorales. Fuente: elaboración propia.....	8
Figura 1.6 Inflamación en el ambiente tumoral. Fuente: elaboración propia	8
Figura 1.7 Reprogramación epigenética. Fuente: elaboración propia.....	9
Figura 1.8 Principales áreas donde se encuentra la microbiota humana. Fuente: elaboración propia	9
Figura 1.9 Célula cancerígena en estado proliferativo. Fuente: elaboración propia	10
Figura 1.10 Ciclo celular. Fuente: elaboración propia	11
Figura 1.11 Diferencia entre la respuesta de una célula normal y una cancerígena a un daño en el ADN. Fuente: elaboración propia	12
Figura 1.12 Diferencia en el acortamiento de los telómeros tras la proliferación celular en una línea normal y otra cancerígena. Fuente: elaboración propia	12

Figura 1.13 Angiogénesis en el tumor. Fuente: elaboración propia	13
Figura 1.14 Representación gráfica de la metástasis. Fuente: elaboración propia	14
Figura 1.15 Metabolismo de la glucosa en células normales (izquierda) y los cambios que impulsan el efecto Warburg (derecha). Adaptado de Burns et al. [20]	15
Figura 1.16 Defensa de las células cancerígenas frente la acción del sistema inmune. Fuente: elaboración propia.....	15
Figura 1.17 Defensa de las células cancerígenas frente la acción del sistema inmune. Fuente: elaboración propia.....	16
Figura 1.18 Representación de célula senescente con las proteínas que secreta. Fuente: elaboración propia.....	17
Figura 1.19 Estadios y desarrollo del cáncer colorrectal (CCR). Fuente: elaboración propia.....	20
Figura 1.20 Tratamientos actuales en la lucha contra el cáncer Fuente: elaboración propia.....	25
Figura 1.21 Escala nanométrica con ejemplos de sistemas nanométricos. Fuente: Elaboración propia.....	30
Figura 1.22 Características de los nanosistemas. Adaptado de Sun et al. [83]....	31
Figura 1.23 Esquema que representa el direccionamiento pasivo y activo en el tratamiento del cáncer. Fuente: Elaboración propia.....	34
Figura 1.24 Diferencia en la formación de vasos sanguíneos en un tejido normal y uno tumoral. Adaptada de Zhang et al. [84]	35

Figura 1.25 Estructuras químicas de las tres ciclodextrinas principales (de izquierda a derecha α -CD, β -CD y γ -CD). Adaptado de Wüpper et al. [91].....	40
Figura 1.26 Formación de complejos de inclusión de las ciclodextrinas con sustancias hidrofóbicas. Fuente: elaboración propia.....	41
Figura 1.27 Proceso de biogénesis de los exosomas. Fuente: Adaptado de Zhou et al. [113].....	46
Figura 1.28 Ventajas de los hidrogeles. Fuente: elaboración propia	50
Figura 1.29 Tipos de cultivos celulares	53
Figura 3.1 Causas y efectos del metabolismo anómalo de las células cancerígenas. Fuente: Adaptado de Cairns et al. [43].....	65
Figura 3.2 Mecanismos de actuación del farnesol y la pregnenolona para impedir la proliferación celular. Fuente: elaboración propia.....	67
Figura 3.3 Biosíntesis de las hormonas gonadales. Fuente: elaboración propia. .	68
Figura 3.4 Efecto de la pregnenolona en la proliferación celular, inhibiendo la acción de la enzima G6PD en la ruta de las Pentosas Fosfato. Fuente: elaboración propia.....	68
Figura 3.5 Formación de farnesol en la vía de biosíntesis del colesterol. Fuente: elaboración propia	70
Figura 3.6 Vías de señalización de los diferentes mecanismos de acción antitumoral del FOH. Fuente: elaboración propia.....	71
Figura 3.7 Biosíntesis de la fosfatidilcolina por la vía Kennedy. Fuente: elaboración propia.	71

Figura 3.8 Representación de las estructuras químicas de los isómeros de farnesol (2E, 6E – farnesol; 2E, 6Z – farnesol; 2Z, 6E – farnesol; 2Z, 6Z – farnesol). Fuente: Elaboración propia.....	74
Figura 3.9 Espectro de RMN-H de SBE- β -CD en D ₂ O.	79
Figura 3.10 Espectro de absorbancia en UV-vis de SBE- β -CD en PBS (derecha) 79	
Figura 3.11 Espectro de RMN-H del complejo SBE- β -CD – P5 en D ₂ O.....	80
Figura 3.12 Espectros de absorbancia de P5 en etanol y del complejo SBE- β -CD – P5 (izquierda) y curva de calibrado de P5 en etanol puro a 284 nm (derecha) ...	81
Figura 3.13 Espectro RMN del complejo con mezcla de isómeros FOH	82
Figura 3.14 Espectros UV-Vis diluciones seriadas de la mezcla de isómeros FOH libre en etanol y SBE- β -CD – FOH en PBS, junto con la curva de calibrado de FOH en etanol.	83
Figura 3.15 Espectro RMN del complejo con el isómero E, E - FOH	84
Figura 3.16 Espectros UV-Vis diluciones seriadas de E, E - FOH libre en etanol y SBE- β -CD – E, E - FOH en PBS, junto con la curva de calibrado de E, E - FOH en etanol.....	85
Figura 3.17 Porcentaje de fármaco (P5 o FOH) que se solubiliza en las muestras con SBE- β -CD en PBS a diferentes tiempos durante 120 horas.	86
Figura 3.18 Espectros de RMN-H tras formar el complejo SBE- β -CD – P5 a diferentes temperaturas.	87
Figura 3.19 Espectros de RMN-H tras formar el complejo SBE- β -CD – FOH a diferentes temperaturas	87
Figura 3.20 Espectros superpuestos de RMN-H de la muestra SBE- β -CD en D ₂ O realizados durante 2 meses.....	89

Figura 3.21 Espectros superpuestos de RMN-H de la muestra SBE- β -CD – P5 en D ₂ O realizados durante 2 meses.....	89
Figura 3.22 Espectros superpuestos de RMN-H de la muestra SBE- β -CD – FOH en D ₂ O realizados durante 2 meses.	90
Figura 3.23 Resultados experimentales de la viabilidad de las células tras tratarlas con SBE- β -CD durante 48 horas en diferentes concentraciones (puntos) y curvas de ajuste calculadas con gPROMS.	94
Figura 3.24 IC ₅₀ de cada una de las líneas tras tratarlas 48 h con SBE- β -CD	95
Figura 3.25 Resultados experimentales de la viabilidad de las células tras tratar con P5 o SBE- β -CD – P5 durante 48 h en diferentes concentraciones (puntos) y curvas de ajuste calculadas con gPROMS.....	96
Figura 3.26 IC ₅₀ de cada una de las líneas tras tratarlas 48 h con P5, SBE- β -CD – P5 y SBE- β -CD	97
Figura 3.27 (A) Fotografía de las muestras de P5 en función del solvente (de izquierda a derecha) en DMSO con una concentración 30 mM de P5, dilución 1:10 en agua sin filtrar y dilución 1:10 en agua filtrada. (B) Espectro de absorción de la dilución 1:10 de P5-DMSO en agua y una dilución 1:10 de DMSO en agua, utilizando como blanco agua.....	98
Figura 3.28 Resultados experimentales de la viabilidad de las células tras tratarlas con FOH durante 48 horas en diferentes concentraciones (puntos) y curvas de ajuste calculadas con gPROMS.....	100
Figura 3.29 Resultados experimentales de la viabilidad de las células tras tratarlas con SBE- β -CD – FOH durante 48 horas en diferentes concentraciones (puntos) y curvas de ajuste calculadas con gPROMS.....	101

Figura 3.30 Representación gráfica de la estimación de IC50 de cada una de las líneas tras tratarlas 48 h para FOH (columnas rayadas verticalmente), CD (columnas rayadas horizontalmente) y el complejo (columnas rellenas) en cuatro líneas celulares de cáncer (azul-fibroblasto, naranja-colorrectal, rosa-mama, verde- hígado).	102
Figura 3.31 Resultados de viabilidad celular de cada línea celular tratada con SBE- β -CD, FOH o SBE- β -CD – FOH durante 24 h (columna llena) y 48 h (columna rallada).....	103
Figura 3.32 Resultados de viabilidad celular de cada línea celular tratada con los diferentes isómeros de FOH en forma libre y en forma de complejo, durante 24 h (columna llena) y 48 h (columna rallada)	104
Figura 3.33 Resultados de viabilidad celular para cada línea celular tratada durante 24 (A) y 48 horas (B) en ausencia (columnas llenas) o presencia (columnas punteadas) de PC.	106
Figura 3.34 Efecto del farnesol (FOH) y de la fosfatidilcolina (PC) en la proliferación celular	107
Figura 3.35 Porcentaje de células en fase G0/G1 después del tratamiento de fibroblastos y células de cáncer colorrectal durante 24 y 48 h; a diferentes concentraciones: (A) FOH 150 μ M y SBE- β -CD 300 μ M; (B) FOH 300 μ M y SBE- β -CD 600 μ M.	109
Figura 3.36 Diferencia en el porcentaje de células en fase G0/G1 respecto al control.	109
Figura 4.1 Acción del sistema inmune contra las nanopartículas. Fuente: elaboración propia.	133
Figura 4.2 Estructura y composición del exosoma. Figura de Jan et al. [193]	134

Figura 4.3 Técnicas de carga de fármacos en los exosomas. Fuente: elaboración propia..... 135

Figura 4.4 Métodos de carga de exosomas aislados. Fuente: elaboración propia. 136

Figura 4.5 Mecanismos de actuación del farnesol y el Paclitaxel para impedir la proliferación celular. Fuente: elaboración propia. 137

Figura 4.6 Esquema del proceso de aislamiento de exosomas a partir de cultivos celulares mediante 2 métodos: precipitación basada en polímeros y ultracentrifugación. Fuente: elaboración propia..... 139

Figura 4.7 A) Curva de calibrado de Albúmina Sérica Bovina (BSA). B) Cálculo de la concentración proteica en las muestras tras el aislamiento por precipitación basada en polímeros (kit) o por ultracentrifugación (UC), desde el medio de cultivo sin células o con las líneas celulares HS-5 o HCT-116..... 141

Figura 4.8 Análisis de transferencia Western para determinar la presencia de marcadores de proteínas exosomales CD9 (28 kDa), HSP70 (50-70 kDa), CD63 (53 kDa) y CD81 (26 kDa). Los exosomas fueron aislados de las muestras del cultivo de HCT-116, del cultivo de HS-5 y del medio de control, mediante dos métodos de aislamiento: kit ExoQuick-TC® ULTRA (Control kit, Exo^{HCT-116}_{kit}, Exo^{HS-5}_{kit}) o ultracentrifugación (Control_{UC}, Exo^{HCT-116}_{UC}, Exo^{HS-5}_{UC}). 144

Figura 4.9 Imágenes TEM de exosomas aislados por ultracentrifugación de HCT-116 (1) o HS-5 (2) 145

Figura 4.10 Caracterización del tamaño de los exosomas aislados mediante ultracentrifugación de líneas celulares HS-5 y HCT-116 mediante DLS. 146

Figura 4.11 Imágenes TEM de exosomas aislados tras ser almacenados durante 6 meses en ultracongelación. 148

Figura 4.12 Curva de calibrado del FOH en metanol y de PTX en DMSO	150
Figura 4.13 Cuantificación de la concentración de los fármacos (FOH y PTX) después de la incorporación en muestras de exosomas de líneas celulares HS-5 (azul) o HCT-116 (naranja) utilizando 4 métodos de carga diferentes: incubación, congelación-descongelación, sonicación y extrusión.	151
Figura 4.14 Imágenes TEM de los exosomas aislados a partir del cultivo celular de HCT-116, tras cargarlos con FOH por extrusión.....	152
Figura 4.15 Viabilidad de los fibroblastos normales (HS-5) determinada por ensayo MTT, tras 24 o 48 horas de tratamiento con exosomas derivados de estas líneas (Exo ^{HS-5} o Exo ^{HCT-116}) sin cargar o cargados con los fármacos (PTX o FOH), o con el fármaco libre disuelto en DMSO. Los datos se normalizaron con respecto al control no tratado.....	154
Figura 4.16 Viabilidad de las células cancerígenas de colon (HCT-116) determinada por ensayo MTT, tras 24 o 48 horas de tratamiento con exosomas derivados de estas líneas (Exo ^{HS-5} o Exo ^{HCT-116}) sin cargar o cargados con los fármacos (PTX o FOH), o con el fármaco libre disuelto en DMSO. Los datos se normalizaron con respecto al control no tratado.	154
Figura 4.17 Viabilidad de los fibroblastos normales (HS-5) determinada por ensayo MTT, tras 24 o 48 horas de tratamiento con SBE- β -CD o exosomas derivados de estas líneas Exo ^{HS-5} o Exo ^{HCT-116} sin cargar y cargados con FOH, o con el fármaco disuelto en DMSO. Los datos se normalizaron con respecto al control no tratado.....	157
Figura 4.18 Viabilidad de las células cancerígenas de colon (HCT-116) determinada por ensayo MTT, tras 24 o 48 horas de tratamiento con SBE- β -CD o exosomas derivados de estas líneas Exo ^{HS-5} o Exo ^{HCT-116} sin cargar y cargados con	

FOH, o con el fármaco disuelto en DMSO. Los datos se normalizaron con respecto al control no tratado.....	157
Figura 5.1 Efecto de la temperatura en la estructura de una disolución de poloxámero. Fuente: elaboración propia	176
Figura 5.2 Estructura de Pluronic F-127. Fuente: elaboración propia	177
Figura 5.3 Estructura de Goma Gellan Baja en Acilo. Fuente: elaboración propia	178
Figura 5.4 Efecto de la temperatura en la estructura de una disolución de Goma Gellan. Fuente: elaboración propia	179
Figura 5.5 Barrido de temperatura en las soluciones de PF-127 a diferentes concentraciones (15 %, 20 %, 25 % y 30 % w/v) en PBS.	181
Figura 5.6 Barrido de frecuencia a 37 °C en las soluciones de PF-127 a diferentes concentraciones (15 %, 20 %, 25 % y 30 % w/v) en PBS.	183
Figura 5.7 Comportamiento reológico a 37 °C y a 10 °C de soluciones de PF-127 a diferentes concentraciones (15 %, 20 %, 25 % y 30 %).	184
Figura 5.8 Fotografías de las muestras de PF-127 al 15 % y al 20 % en PBS a tiempo 0 h y tras incubación a 37 °C durante 1 hora o 24 horas.	185
Figura 5.9 Barrido de temperatura en las soluciones de GG a diferentes concentraciones (0.125 %, 0.25 %, 0.50 % y 1 % w/v) en PBS.....	187
Figura 5.10 Barrido de frecuencia a 37 °C en las soluciones de GG a diferentes concentraciones (0.125 %, 0.25 %, 0.50 % y 1 % w/v) en PBS.....	188
Figura 5.11 Comportamiento reológico a 37 °C y a 10 °C de soluciones de GG a diferentes concentraciones (0.125 %, 0.25 %, 0.50 % y 1 %).	188

Figura 5.12 Barrido de temperatura en las soluciones de PF-127 al 20 % y GG a diferentes concentraciones (0.125 %, 0.25 %, 0.50 % y 1 % w/v) en PBS.	189
Figura 5.13 Barrido de frecuencia a 37 °C en las soluciones de PF-127 al 20% y GG a diferentes concentraciones (0.125 %, 0.25 %, 0.50 % y 1 % w/v) en PBS.	190
Figura 5.14 Comportamiento reológico a 37 °C y a 10 °C de soluciones de PF-127 al 20 % y GG a diferentes concentraciones (0.125 %, 0.25 %, 0.50 % y 1 %).	191
Figura 5.15 Proceso de síntesis de los hidrogeles con 0.5 % de GG, 20 % de PF-127 y farnesol en diferentes formulaciones y concentraciones. Fuente: elaboración propia.....	192
Figura 5.16 Efecto de temperatura en los hidrogeles de PF-127 al 20 % y GG al 0.50 %, a los que se adicionó un 10 % v/v de diferentes soluciones: FOH a concentraciones variables, y PBS como control.	193
Figura 5.17 Hidrogeles de PF-127 al 20 % y GG al 0.50 %, a los que se adicionó un 10 % v/v de diferentes soluciones: CD, CDF o FOH a concentraciones variables, y PBS como control (temperatura ambiente).....	194
Figura 5.18 Efecto de temperatura en los hidrogeles de PF-127 al 20 % y GG al 0.50 %, a los que se adicionó un 10 % v/v de CDF 40-20 mM y 8-4 mM, con los controles de CD y PBS.	195
Figura 5.19 Efecto de la presencia d CD en las soluciones de 20 % PF-127 y 0.5 % GG. Fuente: elaboración propia	195
Figura 5.20 Barrido de frecuencia de hidrogeles de PF-127 al 20 % y GG al 0.50 %, a los que se adicionó un 10 % v/v de diferentes soluciones: FOH a concentraciones variables, y PBS como control.	196

Figura 5.21 Barrido de frecuencia de hidrogeles de PF-127 al 20 % y GG al 0.50 %, a los que se adicionó un 10 % v/v de CDF 40-20 mM y 8-4 mM, con los controles de CD y PBS.	197
Figura 5.22 Comportamiento reológico de soluciones con PF-127 al 20 %, GG al 0.50 % y FOH a diferentes concentraciones a 37 °C y 10 °C.	198
Figura 5.23 Comportamiento reológico de soluciones con PF-127 al 20%, GG al 0,50% a los que se adicionó un 10% v/v de CDF 40-20 mM y 8-4 mM, con los controles de CD y PBS.	199
Figura 5.24 Sistema de degradación de los geles. Fuente: elaboración propia ..	200
Figura 5.25. Resultados de la degradación experimental de hidrogeles de PF-127 al 20 % con concentraciones variables de GG	202
Figura 5.26. Ajuste tras la estimación de parámetros de la degradación de los hidrogeles de PF-127 al 20 % con concentraciones variables de GG.	203
Figura 5.27. Resultados de la degradación experimental de hidrogeles de PF-127 al 20 % con GG al 0.5 % que contienen PBS como control; FOH, CD o CDF en diferentes concentraciones.	204
Figura 5.28. Ajuste tras la estimación de parámetros de la degradación de los hidrogeles de PF-127 al 20 % con GG al 0.5 % que contienen (A) FOH libre en diferentes concentraciones o (B) PBS como control y CD o CDF en diferentes concentraciones	205
Figura 5.29. Variación de K' en función de G' o de la viscosidad.	207
Figura 5.30 Modelo 3D del dispositivo: (a) vista isométrica; (b) vista superior. Fuente: elaboración propia.	208
Figura 5.31 Sistema de liberación. Fuente: elaboración propia.	210
Figura 5.32 Concentración de FOH durante el ensayo de liberación.	211

Figura 6.1 Principales estrategias desarrolladas en esta tesis para mejorar los actuales tratamientos del Cáncer colorrectal.....	227
Figure 6.2 Main strategies developed in this thesis to enhance existing treatments for colorectal cancer.	232
Figura A. I. 1 Placas de hidrogeles de 20% PF-127 y 0.5% GG en DMEM ⁺ tras ser incubados 72 horas con diferentes líneas.....	240
Figura A. I. 2 Barrido de frecuencia a 37 °C en las soluciones de 20% PF-127 y 0.5% GG en DMEM ⁺ tras ser incubados 72 horas con diferentes líneas.....	240
Figura A. I. 3 Comportamiento reológico a 37 °C de las soluciones de 20% PF-127 y 0.5% GG en DMEM ⁺ tras ser incubados 72 horas con diferentes líneas celulares.....	241
Figura A. I. 4 Placa de geles con células HCT-116 con los diferentes tratamientos.....	242
Figura A. I. 5 Placa de geles con células HCT-116 con los diferentes tratamientos tras incubar a 4 °C durante 2 horas.....	242
Figura A. I. 6 Muestras de hidrogeles con células tras centrifugar: a la derecha sin adicionar nada y a la izquierda adicionando agua.....	243
Figura A. I. 7 Geles solubilizados en diferentes disolventes para la recuperación de células. De izquierda a derecha: DMEM ⁺ , agua, PBS, etanol, tripsina y nada (control).	243
Figura A. I. 8 Imágenes de microscopia de los hidrogeles con células cancerígenas HCT-116 teñidas de rojo.....	244
Figura A. I. 9 Imágenes de microscopia de los hidrogeles con células normales HS-5 teñidas de verde.	244

Figura A. I. 10 Imágenes de microscopia de los hidrogeles con células cancerígenas HCT-116 tras añadir Yoduro de propidio. Capturas tomadas con diferentes fuentes de luz: blanca (B) y roja (R), y su combinación (C)..... 245

Figura A. I. 11 Imágenes de microscopia de los hidrogeles con células normales HS-5 teñidas de verde, a las que se les ha añadido DAPI. Capturas tomadas con diferentes fuentes de luz: blanca (B), verde (V) y azul (A), y su combinación (C).
..... 246

Figura A. I. 12 Hidrogeles con células normales HS-5 teñidas de verde cancerígenas HCT-116 teñidas de rojo y con reactivo MTT. 247

Índice de tablas

Tabla 1.1 Factores de riesgo y contribuyentes del CCR.....	18
Tabla 1.2 Fármacos genéricos aprobados por la FDA como tratamientos para combatir el cáncer colorrectal.....	26
Tabla 1.3 Combinación de fármacos para combatir el cáncer colorrectal aprobados por la FDA.....	27
Tabla 1.4 Sistemas nanométricos.....	33
Tabla 1.5 Propiedades fisicoquímicas de las tres principales ciclodextrinas [89]	39
Tabla 1.6 Ejemplos de complejos ciclodextrina con fármacos anticancerígenos [97].....	43
Tabla 1.7 Clasificación de las vesículas extracelulares y sus características [109 – 110].....	45
Tabla 1.8 Ejemplos de terapias anticancerígenas con exosomas en estudio	49
Tabla 1.9 Ejemplos del módulo de Young de diferentes líneas celulares.....	54
Tabla 3.1 Artículos que han realizado estudios in vitro de farnesol como anticancerígeno.....	72
Tabla 3.2 Valores de los picos característicos de P5 y FOH en los espectros RMN de los complejos a diferentes temperaturas.....	88
Tabla 3.3 Estimación de parámetros y valores de significación estadística al ajustar los datos a la curva dosis-respuesta de SBE- β -CD.....	95
Tabla 3.4 Estimación de parámetros y valores de significación estadística al ajustar los datos a la curva dosis-respuesta de P5 y SBE- β -CD – P5.....	97

Tabla 3.5 Estimación de parámetros y valores de significación estadística al ajustar los datos a la curva dosis-respuesta de FOH.....	100
Tabla 3.6 Estimación de parámetros y valores de significación estadística al ajustar los datos a la curva dosis-respuesta de SBE- β -CD – FOH.....	101
Tabla 3.7 Imágenes obtenidas por microscopia confocal del cocultivo de las células cancerígenas de colon (teñidas de rojo) o normales (teñidas de verde) después de incubarse durante 24 y 48 horas con cada tratamiento	111
Tabla 5.1 LDDS aprobados por la FDA en tratamientos anticancerígenos	174
Tabla 5.2 Resumen de valores de CST de las soluciones de PF-127 a diferentes concentraciones (15 %, 20 %, 25 % y 30 % w/v) en PBS, junto con los valores de G' y G'' a dicha temperatura.....	182
Tabla 5.3 Resumen de valores de temperatura a la que se estabilizan las soluciones de PF-127 a diferentes concentraciones (15 %, 20 %, 25 % y 30 % w/v) en PBS, junto con los valores de G' y G'' a dicha temperatura.	182
Tabla 5.4 Resumen de valores de CST, G' y G'' de las soluciones de GG a diferentes concentraciones (0.125 %, 0.25 %, 0.50 % y 1 % w/v) en PBS.....	187
Tabla 5.5 Resumen de valores de CST, G' y G'' a 37 °C de las soluciones de PF-127 al 20 % y GG a diferentes concentraciones (0.125 %, 0.25 %, 0.50 % y 1 % w/v) en PBS.	190
Tabla 5.6 Valores de estimación por Excel Solver.....	206

Índice de ecuaciones

Ecuación 1. Cálculo de la constante de equilibrio entre ciclodextrinas y moléculas huésped	42
Ecuación 2. Determinación de la concentración de fármaco por la integración de las señales de H-RMN	77
Ecuación 3. Determinación de la concentración de P5 por la integración de las señales de H-RMN	81
Ecuación 4 Cálculo de la relación de proporción FOH-CD para la mezcla de isómeros.....	83
Ecuación 5 Cálculo de la relación de proporción FOH-CD para el isómero E, E-FOH.....	84
Ecuación 6 Calculo de la viabilidad celular a partir de la absorbancia media de los pocillos correspondientes a cada tratamiento en los ensayos MTT	92
Ecuación 7 Expresión diferencial que describe la variación de la viabilidad celular en función de la dosis de fármaco administrada	93
Ecuación 8 Cálculo de la viabilidad celular	153
Ecuación 9. Cálculo del porcentaje de pérdida de masa.....	200
Ecuación 10. Cálculo del parámetro P	201
Ecuación 11. Cálculo de las cadenas liberadas para GG.....	201
Ecuación 12. Cálculo de las cadenas liberadas para PF-127	201
Ecuación 13. Calculo de la desviación absoluta promedio (AAD).....	201

Resumen

El cáncer colorrectal (CCR) es uno de los diferentes tipos de enfermedades que engloba el concepto de *cáncer*, ocupando el tercer lugar en incidencia a nivel mundial y es el segundo en mortalidad. La detección temprana es crucial para la supervivencia, y el tratamiento varía desde la cirugía en etapas tempranas hasta opciones más complejas en etapas avanzadas. A pesar de los avances, la investigación es esencial para reducir los efectos secundarios de los tratamientos y optimizar su selectividad, mejorando así la calidad de vida de los pacientes.

La baja biodisponibilidad y falta de especificidad de los medicamentos antineoplásicos convencionales han llevado al interés creciente en el uso de nanomedicina en quimioterapia. Por ello, se han desarrollado sistemas de administración de fármacos que mejoran la biodistribución, actividad terapéutica y selectividad de los tratamientos.

El objetivo central de esta tesis ha sido mejorar la eficacia de las terapias existentes y reducir los efectos secundarios, aprovechando las diferencias metabólicas entre células normales y cancerígenas. Con este fin, se llevaron a cabo tres estrategias.

La **primera estrategia** desarrollada se enfocó en inhibir la proliferación celular al actuar simultáneamente sobre dos rutas metabólicas de las células cancerígenas. Para lo cual se utilizaron dos compuestos: pregnenolona (P5) y farnesol (FOH). P5 impide que las células tengan la energía necesaria para proliferar al inhibir la acción de la enzima G6PD en la ruta pentosa fosfato (PPP), mientras que, FOH impide la formación de membranas en las nuevas células inhibiendo la síntesis de fosfatidilcolina. Sin embargo, como ocurre con muchos de los fármacos anticancerígenos, estos compuestos tienen carácter hidrofóbico. Por lo que, se propuso el uso de ciclodextrinas (CD), oligosacáridos de alta

solubilidad y estructura cónica hidrófoba, capaces de formar complejos de inclusión con moléculas huésped y mejorar las propiedades fisicoquímicas y farmacológicas de dichos compuestos.

En primer lugar, se caracterizó la formación de los complejos de inclusión formados entre las moléculas de FOH y P5 con una ciclodextrina, SBE- β -CD. Las razones para usar esta CD es que tiene una elevada solubilidad acuosa y la ventaja de estar aprobada por la FDA. Los resultados de caracterización revelaron que la temperatura afectaba significativamente el proceso de complejación y que era instantáneo, obteniendo complejos con una estabilidad mínima de 2 meses.

A continuación, se evaluó la toxicidad *in vitro* de P5 y FOH, tanto en su forma libre como en complejo (SBE- β -CD – P5 y SBE- β -CD – FOH), determinándose en cada caso, la concentración necesaria para inhibir un 50 % la proliferación celular (IC_{50}). Dicho estudio evidenció que, en el caso de SBE- β -CD, las concentraciones superiores a 1 mM eran desfavorables para la viabilidad celular, señalando la necesidad de trabajar con niveles inferiores, para que la ciclodextrina no afecte a la proliferación celular. Respecto a la pregnenolona (P5), se presentaron ciertos problemas, como la necesidad de concentraciones elevadas de SBE- β -CD – P5 para alcanzar la IC_{50} o la precipitación de P5 cuando se utilizaba en su forma libre. Por estas razones se descartó la pregnenolona como posible tratamiento anticancerígeno y se suspendió su investigación. Por el contrario, los resultados obtenidos con el farnesol, tanto en su forma libre como en el complejo con SBE- β -CD, mostraron una IC_{50} prometedora, destacando mayor selectividad en la viabilidad de las líneas cancerígenas de colon, hígado y mama, en comparación con los fibroblastos normales.

Los análisis del ciclo celular revelaron que el mecanismo de acción de FOH consistía en inhibir la síntesis de fosfatidilcolina (PC), este hecho se corroboró con ensayos de viabilidad celular. A su vez, la visualización microscópica destacó

cambios morfológicos, como pérdida de adherencia y reducción celular, confirmando la eficacia del tratamiento.

La investigación de esta estrategia finalizó con la validación *in vitro* de la eficacia terapéutica de SBE- β -CD – FOH, mediante ensayos con cocultivos. Los resultados demostraron su capacidad para reducir significativamente la viabilidad en líneas cancerígenas de colon e hígado, preservando la viabilidad en células normales. Además, se exploró la posibilidad de reducir costos al verificar que la toxicidad de farnesol no dependía significativamente del tipo de isómero utilizado.

En conjunto, los resultados sugieren que los complejos de inclusión con FOH tienen un potencial terapéutico significativo en líneas cancerígenas. Sin embargo, con el propósito de dirigir de forma más específica los fármacos hacia las células cancerígenas, se llevó a cabo una **segunda estrategia** basada en encapsular los compuestos en exosomas.

En primer lugar, se aislaron los exosomas utilizando diferentes métodos y se caracterizaron. Inicialmente se utilizó el producto comercial *ExoQuick-TC[®] ULTRA* para aislar exosomas, pero las muestras presentaban interferencias en la cuantificación y determinación de proteínas, lo que llevó a descartar este método. En contraste, el método de ultracentrifugación resultó efectivo, permitiendo el aislamiento de exosomas cuya forma esferoide se confirmó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Además, el análisis de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) reveló que tenían diámetros inferiores a 200 nm. Y el ensayo de Western Blot (WB) confirmó la presencia de proteínas CD9 y HSP-70 confirmando que se trataba de exosomas.

Posteriormente, los exosomas fueron cargados con los compuestos hidrófobos utilizando diversas técnicas. No obstante, debido al descarte de P5, se decidió trabajar con un compuesto ampliamente estudiado, Paclitaxel (PTX). La

cuantificación de fármacos reveló que la extrusión era el método más eficaz, ya que se alcanzaban concentraciones de FOH y PTX más altas. Con estos exosomas se realizó una evaluación de la toxicidad *in vitro* y los resultados indicaron que los exosomas sin carga no afectaban significativamente a la viabilidad celular después de 48 horas, mientras que la viabilidad se redujo con los exosomas cargados con FOH y PTX. Los exosomas procedentes de la línea cancerígena cargados con FOH redujeron en mayor medida la viabilidad celular que los procedentes de la línea normal. Además, se produjo el mismo efecto con los cargados con PTX, aunque en este caso la reducción de la viabilidad fue mucho mayor.

Al comparar estos resultados con los de SBE- β -CD – FOH, se observó que los exosomas redujeron la viabilidad de las células cancerosas de manera similar, pero afectando en menor medida a las células normales. Por lo que los exosomas, se presentan como una estrategia prometedora para el transporte selectivo en el tratamiento del cáncer colorrectal. Los resultados obtenidos sugieren que los exosomas pueden ofrecer ventajas significativas en términos de selectividad y eficacia en comparación con otras formas de administración de fármacos.

Para finalizar esta tesis, se buscó mejorar el tratamiento local de CCR, llevándose a cabo una **tercera estrategia** que implica el desarrollo de una terapia local con hidrogeles termosensibles cargados con FOH.

En una primera etapa, se determinó la composición óptima de hidrogeles compuestos por Pluronic F-127 (PF-127) y Goma Gellan (GG), a través de pruebas reológicas y evaluación de la degradación del gel. Se concluyó que la concentración óptima de PF-127 para obtener geles termosensibles estables era del 20 % w/v. Esta concentración permitió trabajar con soluciones líquidas a temperaturas inferiores a la ambiente y garantizó la formación de geles estables una vez alcanzada la temperatura de gelificación. La adición de GG al gel

favoreció la formación de interacciones poliméricas, resultando en un aumento del módulo de almacenamiento, la viscosidad y la velocidad de degradación. GG demostró ser eficaz para controlar la sensibilidad a la temperatura, y una concentración del 0.50 % w/v duplicó la velocidad de degradación sin afectar significativamente la temperatura de gelificación.

Posteriormente, se estudió el impacto de añadir FOH, tanto como fármaco libre o en forma de complejo de inclusión, en la reología y degradación del gel, utilizando geles con un 20 % de FP-127 y 0.5 % de GG. La principal conclusión fue que concentraciones elevadas de FOH libre afectaban negativamente la reología del gel debido a la formación de una emulsión. Por otro lado, la presencia de ciclodextrina (CD) producía una disminución del módulo de almacenamiento y la viscosidad, pero una prolongación del tiempo de degradación, esto se debe a que las cadenas hidrófobas de PF-127 formaban un complejo con la CD.

Finalmente, se llevó a cabo un estudio de la cinética de liberación de FOH, permitiendo prever los parámetros que controlan la transferencia de materia tanto en el interior como en el exterior del hidrogel. Los estudios de liberación del fármaco indicaron que era sostenida y proporcional a la degradación del gel. Sin embargo, aunque la liberación de FOH libre resultó en concentraciones superiores a su solubilidad, se recomendaba el uso del complejo para lograr una solubilidad total del fármaco liberado con el fin de que pueda internalizar en las células.

Estos resultados respaldan la posibilidad de emplear dicho hidrogel como sistemas de liberación controlada para el tratamiento oncológico localizado. Además, se destaca el potencial de estos hidrogel para ser utilizados en la simulación de tumores como se detalla en el Anexo I.

Los resultados obtenidos de las tres estrategias presentaron avances significativos en la mejora del tratamiento del CCR. La estrategia de utilizar farnesol en forma de complejo con la ciclodextrina demostró eficacia terapéutica,

los exosomas cargados con FOH y PTX exhibieron prometedores niveles de selectividad y los hidrogeles termosensibles ofrecen una terapia local controlada con liberación sostenida de FOH. Estos enfoques, basados en la nanotecnología y la terapia local, abren nuevas perspectivas para optimizar los tratamientos actuales contra el CCR. Todos estos estudios establecen una sólida base para futuras investigaciones, como el desarrollo de hidrogeles que permitan la liberación de exosomas cargados con farnesol y Paclitaxel, de tal forma que actúen únicamente contra células cancerígenas. Además, se podrían perfeccionar los hidrogeles, con el fin de que tengan una doble acción: liberación local de fármacos y regeneración del tejido dañado.

Summary

Colorectal cancer (CRC) is one of the types of diseases that includes the concept of *cancer*, ranking third globally in incidence and second in mortality. Early detection is crucial for survival, the treatment varies from surgery in early stages to more complex options in advanced stages. Despite advances, research is essential to reduce the side effects of treatments and optimize their selectivity, thereby improving the quality of life for patients.

The low bioavailability and lack of specificity of conventional antineoplastics have led to increasing interest in the use of nanomedicine in chemotherapy. For this reason, drug delivery systems (DDS) have been developed to enhance drug biodistribution, therapeutic activity, and treatment selectivity.

The thesis aims has been to improve the effectiveness of current therapies and minimize side effects, taking advantage of the metabolic distinctions between normal and cancer cells. Three strategies were employed to achieve this goal.

The **first strategy** focused on inhibiting cellular proliferation by simultaneously acting on different metabolic pathways of cancer cells. For this purpose, two compounds were used: pregnenolone (P5) and farnesol (FOH). P5 prevents cells from having the necessary energy to proliferate by inhibiting the action of the G6PD enzyme in the pentose phosphate pathway (PPP), while FOH prevents the formation of membranes in the new cells by inhibiting the synthesis of phosphatidylcholine. However, similar to many anticancer drugs, these compounds are hydrophobic. Therefore, the use of cyclodextrins (CD) was proposed. CD are oligosaccharides with high solubility and a hydrophobic conical structure, capable of forming inclusion complexes with guest molecules, thus improving their physicochemical and pharmacological properties.

Firstly, the inclusion complex was characterized using SBE- β -CD and FOH/P5 molecules. SBE- β -CD was selected because it is an FDA-approved cyclodextrin and it has high aqueous solubility. Characterization results revealed that temperature significantly affected the complexation process, which was instantaneous, producing complexes with a minimum stability of 2 months.

Next, the *in vitro* toxicity of P5 and FOH, both in their free form and in complex (SBE- β -CD – P5 and SBE- β -CD – FOH), was evaluated, determining the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) in each case. The study revealed that concentrations of SBE- β -CD above 1 mM affected adversely at cell viability, emphasizing the need to work with lower levels. Regarding pregnenolone (P5), certain issues arose, such as the need for elevated concentrations of SBE- β -CD – P5 to achieve IC₅₀ or the precipitation of P5 when used in its free form. For these reasons, pregnenolone was ruled out as a potential anticancer treatment, and its investigation was suspended. In contrast, results with farnesol, both in its free form and in complex with SBE- β -CD, showed a promising IC₅₀, highlighting greater selectivity in the viability of colon, liver, and breast cancer cell lines compared to normal fibroblasts.

Cell cycle analysis revealed that the mechanism of action of FOH consisted of inhibiting the synthesis of phosphatidylcholine (PC), supported by cell viability assays. Microscopic visualization highlighted morphological changes, such as loss of adherence and cell reduction, confirming the effectiveness of the treatment.

This strategy culminated with the *in vitro* validation of the therapeutic efficacy of SBE- β -CD – FOH, through co-culture assays. The results demonstrated its ability to significantly reduce viability in colon and liver cancer cell lines while preserving viability in normal cells. Furthermore, cost reduction possibilities were explored by confirming that farnesol toxicity did not significantly depend on the type of isomer used.

Overall, the results suggest that inclusion complexes with FOH have significant therapeutic potential in cancer cell lines. However, with the aim of more specifically targeting drugs to cancer cells, a **second strategy** was implemented, involving encapsulating compounds in exosomes.

Initially, exosomes were isolated using different methods and characterized. The initial attempt to use the commercial product *ExoQuick-TC® ULTRA* to isolate exosomes presented interferences in protein determination, leading to the dismissal of this method. In contrast, the ultracentrifugation method was effective, allowing the isolation of exosomes with a spheroid shape confirmed by transmission electron microscopy (TEM). Additionally, Dynamic Light Scattering (DLS) analysis revealed diameters below 200 nm. Western Blot (WB) assays confirmed the presence of CD9 and HSP-70 proteins, confirming their identity as exosomes.

Subsequently, the exosomes were loaded with hydrophobic compounds using various techniques. However, due to the discarding of P5, it was decided to work with a widely studied compound, Paclitaxel (PTX). Drug quantification revealed that extrusion was the most effective method, achieving the highest concentrations. *In vitro* toxicity assessment with these exosomes indicated that unloaded exosomes did not significantly affect cell viability after 48 hours, while viability decreased with exosomes loaded with FOH and PTX. Exosomes from the cancer cell line loaded with FOH reduced cell viability to a greater extent than those from the normal cell line. Additionally, the same effect occurred with those loaded with PTX, although the reduction in viability was much greater.

Comparing the results with SBE- β -CD – FOH, it was observed that exosomes reduced cancer cell viability similarly, with a lesser impact on normal cells. Therefore, exosomes emerge as a promising strategy for selective transport in colorectal cancer treatment. The results suggest that exosomes may offer

significant advantages in terms of selectivity and efficacy compared to other drug administration forms.

To conclude this thesis, a **third strategy** was implemented to improve local CRC treatment, involving the development of a local therapy with thermosensitive hydrogels loaded with FOH.

In the first stage, the optimal composition of hydrogel, using Pluronic F-127 (PF-127) and Gellan Gum (GG), was determined through rheological tests and evaluation of gel degradation. The optimal concentration of PF-127 for obtaining stable thermosensitive gels was identified as 20%. This concentration allowed working with liquid solutions at temperatures below room temperature and ensured the formation of stable gels once the gelation temperature was reached. The addition of GG to the gel favoured the formation of polymeric interactions, resulting in an increase in storage modulus, viscosity, and degradation rate. GG proved effective in controlling temperature sensitivity, and a concentration of 0.50% doubled the degradation rate without significantly affecting the gelation temperature.

Subsequently, the impact of adding farnesol on the rheology and degradation of the gel was studied. Using gels with 20% FP-127 and 0.5% GG, the impact of incorporating farnesol into the gel, both as a free drug and in the form of an inclusion complex, was studied. The main conclusion was that high concentrations of free FOH negatively affected the gel rheology due to the formation of an emulsion. On the other hand, the presence of cyclodextrin (CD) resulted in a decrease in storage modulus and viscosity but an extension of the degradation time because the hydrophobic chains of PF-127 formed a complex with CD.

Finally, a study of the release kinetics of farnesol was conducted, allowing the anticipation of parameters controlling material transfer both inside and outside the hydrogel. Drug administration studies indicated sustained release proportional to gel degradation. However, although the release of free FOH resulted in concentrations exceeding its solubility, the use of the complex was recommended to achieve complete solubility of the released drug, allowing it to be internalized into cells.

These results confirm the viability of hydrogels as controlled release systems for localized oncological treatment. Additionally, the potential of these hydrogels for simultaneous use in tissue regeneration is highlighted, as detailed in Anexo I. These findings establish a solid foundation for future research and clinical applications.

The results obtained from the three strategies presented significant advances in improving CRC treatment. The strategy of using farnesol in complex form with cyclodextrin demonstrated therapeutic efficacy, loaded exosomes exhibited promising levels of selectivity, and thermosensitive hydrogels offer controlled local therapy with sustained release of farnesol. These approaches, based on nanotechnology and local therapy, present new perspectives for optimizing current CRC treatments. All these studies establish a solid foundation for future research, such as the development of hydrogels that allow the release of exosomes loaded with farnesol and Paclitaxel, acting only against cancer cells. Additionally, hydrogels could be refined to have a dual action: local drug release and regeneration of damaged tissue.

Capítulo 1

-

INTRODUCCIÓN.

CÁNCER Y NANOMEDICINA.

1. El *cáncer*, conceptos y epidemiología

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), *cáncer* es un término que engloba a un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo [1; 2]. Son diferentes entre sí a nivel genético, tanto entre pacientes como entre las células que lo componen, así como entre las diferentes regiones y áreas en las que pueden desarrollarse. Por tanto, aunque son enfermedades independientes, con sus causas, evolución y tratamientos específicos, hay algo que todas tienen en común: se caracterizan por una multiplicación descontrolada de células anormales que crecen más allá de sus límites habituales. En un organismo sano, las células que forman los tejidos se renuevan periódicamente, pero de forma regular y controlada. Esa hiperproliferación celular suele dar lugar a agregados celulares que formarán un tejido displásico (tumor o neoplasia), que puede resultar benigno o canceroso. Aunque en algunos casos no llegan a formar una masa, como en el caso de la leucemia [2].

El proceso por el cual una célula sana se transforma en cancerosa se denomina *carcinogénesis*, un proceso complejo inducido por una serie de carcinógenos que conduce al desarrollo de diversos tipos de cáncer por mutaciones en el ácido desoxirribonucleico (ADN). Estas modificaciones en el material genético pueden estar causadas por (i) factores genéticos, (ii) mutaciones al azar o (iii) estímulos externos. Estos cambios hacen que las células puedan dividirse más rápidamente, generando clones que conservarán dichas mutaciones y, a su vez, generarán nuevos subclones de forma sucesiva, hasta generar clones neoplásicos capaces de evitar el reconocimiento del sistema inmune [3].

Debido a la gravedad de la enfermedad, el cáncer se considera una de las preocupaciones sociales y económicas del sistema público de salud a nivel mundial. Según el Observatorio Global del Cáncer (GCO) de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), el cáncer fue la principal

causa de muerte en el mundo en 2020, con casi 10 millones de defunciones y 18 millones de nuevos casos. En la Figura 1.1 se muestra la incidencia y mortalidad de los tipos de cáncer más comunes en ese año, siendo los tres tipos más frecuentemente diagnosticados: mama (2.3 millones), pulmón (2.2 millones) y colorrectal (1.9 millones). No obstante, el de pulmón es al que más muertes se le atribuyen (1.8 millones), seguido del colorrectal (0.9 millones).

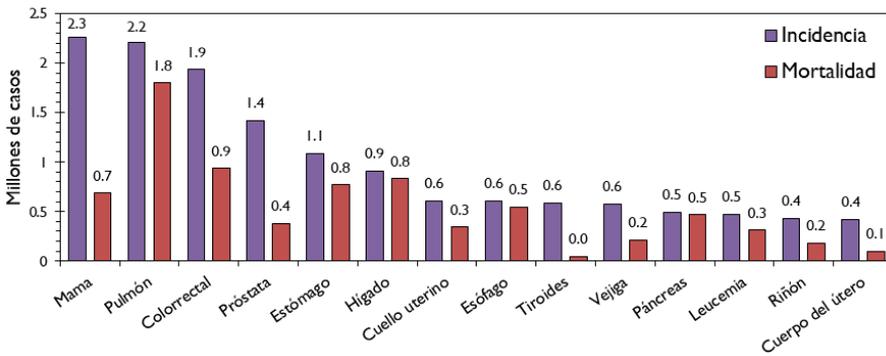


Figura 1.1 Tasas de incidencia y mortalidad de los cánceres más comunes en 2020 en todo el mundo. Fuente: elaboración propia a partir de los datos publicados por GCO

Además, la previsión de incidencia y mortalidad estimadas por GCO, señalan que la situación empeorará, aumentando en un 150% estas cifras en los próximos 20 años (en la Figura 1.2 se muestra la evolución del cáncer a nivel mundial hasta ahora y el pronóstico hasta 2040).

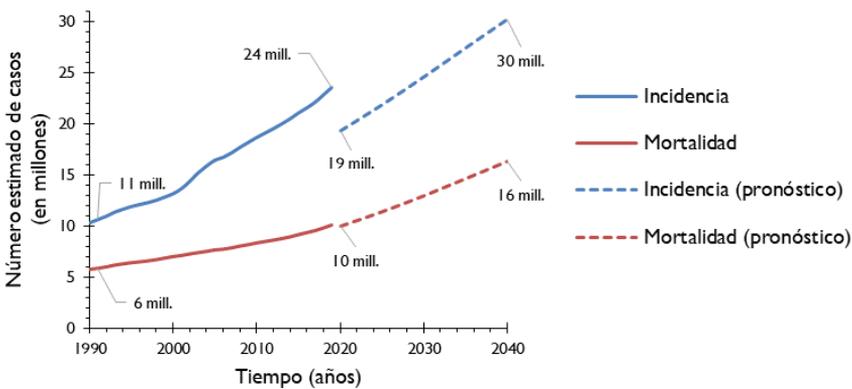


Figura 1.2 Tendencia en la incidencia y mortalidad por cáncer en los próximos años estimado por GCO. Fuente: elaboración propia a partir de los datos publicados por GCO

La situación a nivel nacional es similar, desde hace décadas la incidencia y la mortalidad por cáncer siguen en aumento. Según los últimos datos proporcionados por la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) en colaboración con la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN), en 2022 se diagnosticaron 280 mil casos en España, suponiendo entre los cinco más frecuentes (colorrectal, mama, pulmón, próstata y vejiga) el 50% de los casos, como se representa en la Figura 1.3 [4].

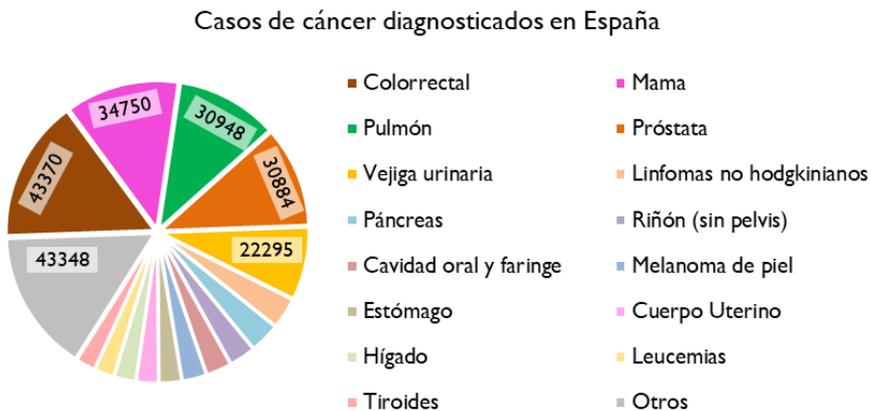


Figura 1.3 Casos de cáncer diagnosticados en España en 2022 (fuente de datos SEOM) Fuente: elaboración propia [4]

Se prevé que la incidencia en España aumente en 2040 hasta alcanzar los 341 mil casos diagnosticados por año, y la mortalidad supere los 160 mil fallecimientos. Según el INE en 2022 los tumores causaron 112741 defunciones, siendo la segunda causa de muerte en España (22.8%), sólo por detrás de las enfermedades del sistema circulatorio, que ocasionaron la muerte de casi 120 mil personas (24.3%) [4].

Los datos de incidencia se pueden relacionar directamente con la tasa de envejecimiento de la población, puesto que es un factor de riesgo fundamental en el desarrollo de cáncer, aunque también a factores externos como son la contaminación, la obesidad, el sedentarismo y el consumo de tabaco y alcohol. A pesar de todo esto, hay un dato esperanzador, en España y en los países de

nuestro entorno, la supervivencia de los pacientes con cáncer se ha duplicado en los últimos 40 años, y se cree que continuará aumentando en los próximos años. Es decir, aunque la mortalidad está aumentando, no lo hace al mismo ritmo que la incidencia. Esto se debe, principalmente, a que los programas de detección precoz incrementan el número de diagnósticos, pero a su vez permiten comenzar antes los tratamientos, haciendo que sean más eficaces. Lo que, junto a los avances terapéuticos y algunos cambios de hábitos, favorecen que aumente el número de personas que sobreviven a esta enfermedad, y permiten mejorar su calidad de vida [4].

2. Características del cáncer

Los tumores son tejidos altamente complejos y heterogéneos, ya que están formados por las células cancerosas (parénquima) y por el microambiente que las rodea (estroma) [2]. En el estroma se encuentran los vasos sanguíneos y la matriz extracelular (EMC), lo que proporciona un soporte para el crecimiento tumoral, y diferentes tipos de células (endoteliales, pericitos, fibroblastos, adipocitos, mesenquimales asociadas al carcinoma, inflamatorias y del sistema inmune) [5].

Hanahan y Weinberg señalaron que las células cancerosas adquieren ventajas de crecimiento debido a cambio genéticos, lo que permite que se conviertan en tumores malignos. Inicialmente, propusieron que todos los genotipos de cáncer surgían de seis alteraciones en la fisiología celular [6], pero con el tiempo se han identificado hasta catorce características esenciales del cáncer (Figura 1.4), que se dividen en cuatro *características habilitadoras* y diez *capacidades funcionales*.

Las *características habilitadoras* resultan de las modificaciones sufridas durante la carcinogénesis, y activan los mecanismos moleculares y celulares que permiten que las células cancerosas desarrollen las diez *capacidades funcionales*, las cuales les permiten sobrevivir, proliferar y diseminarse [7].

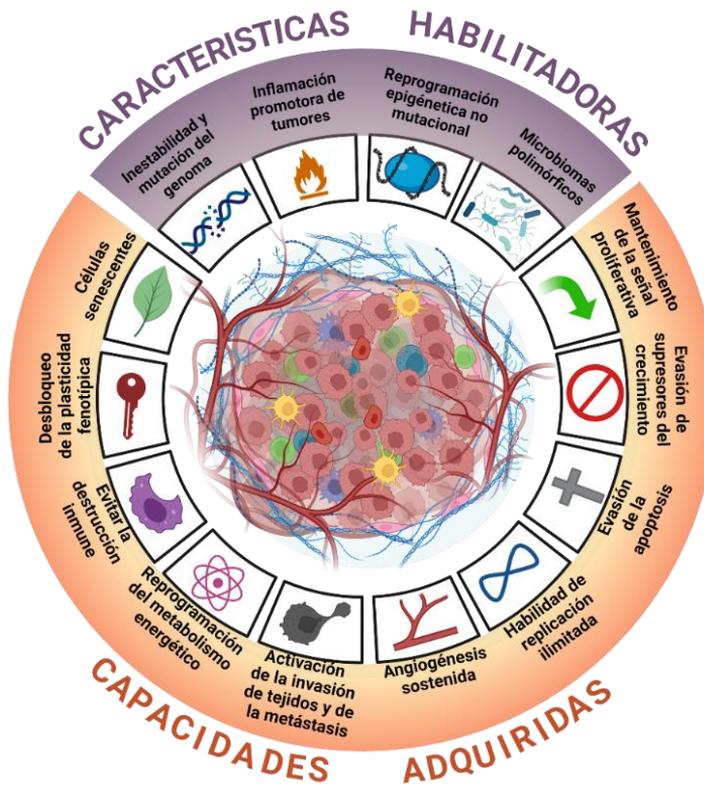


Figura 1.4 Las características del cáncer (adaptado de Hanahan 2022) [7]

2.1. Características habilitadoras



Inestabilidad y mutación del genoma

Durante la carcinogénesis, las mutaciones en el ADN provocan una inestabilidad y una alteración en el genoma, lo cual se representa en la Figura 1.5. Generalmente esta modificación se puede deber a dos causas: (i) la sobreexpresión de los oncogenes, que hacen que las células crezcan fuera de control, o (ii) el incorrecto funcionamiento de los genes supresores de tumores, los cuales controlan la división celular, la reparación del ADN e informan a las células cuándo deben morir. Estos defectos en el mantenimiento y en la reparación del genoma proporcionan ventajas a las células cancerígenas, siendo fundamental para orquestar la mayoría de las capacidades adquiridas [5; 8 – 9].

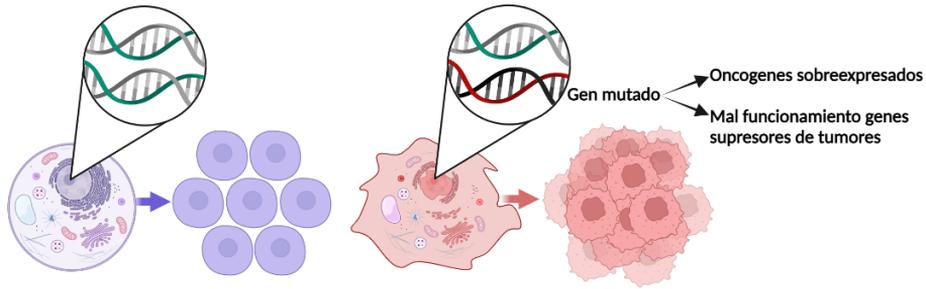


Figura 1.5 Inestabilidad genómica en las células tumorales. Fuente: elaboración propia

 **Inflamación promotora de tumores**

La inflamación, que en un principio se asociaba con el intento del sistema inmune de erradicar los tumores, en realidad puede favorecer el desarrollo de capacidades adquiridas en las células cancerosas. Esto se logra a través de la liberación de moléculas bioactivas en el microambiente tumoral, como factores de crecimiento, citoquinas, quimiocinas y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, tal como se muestra en la Figura 1.6 [5; 10].

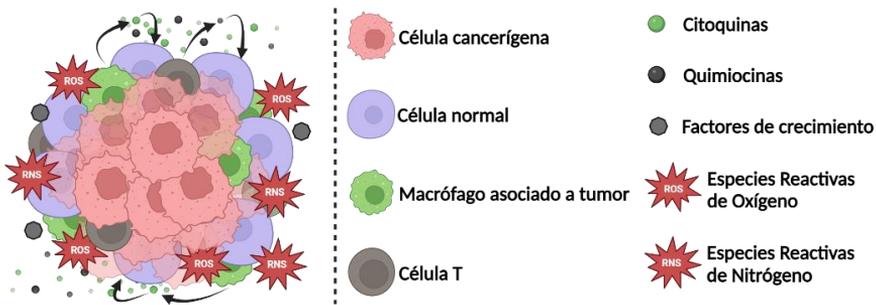


Figura 1.6 Inflamación en el ambiente tumoral. Fuente: elaboración propia

 **Reprogramación epigénética no mutacional**

Se ha comprobado que las células cancerígenas reprograman su metabolismo por la inestabilidad del genoma y la mutación. Sin embargo, es importante destacar que los genes esenciales en los tumores también pueden estar sujetos a mecanismos corruptos independientes a esa característica habilitadora. Ya sea por las propiedades físicas del microambiente tumoral o a la heterogeneidad intratumoral [7; 11].

En la Figura 1.7 se representa de manera gráfica esta reprogramación epigenética y los tres reguladores epigenéticos posibles: enzimas que añaden una modificación (escritores) o la eliminan (borradores) de la histona, o proteínas que se unen a esas modificaciones alterando la actividad genética (lectores).

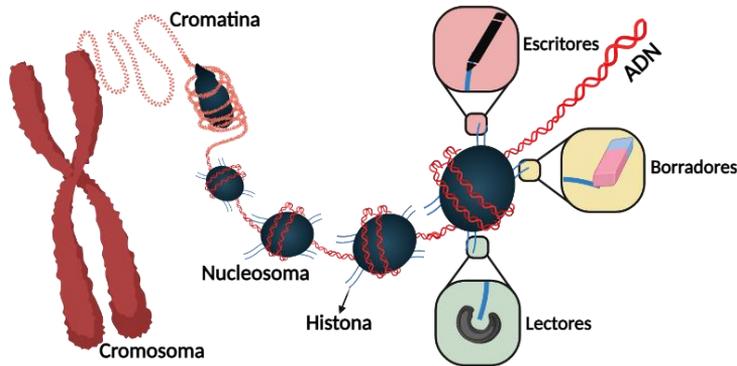


Figura 1.7 Reprogramación epigenética. Fuente: elaboración propia

Microbiomas polimórficos

Un factor menos explorado, pero cada vez más relevante, es la influencia de la microbiota humana, microorganismos que se asocian simbióticamente con ciertos tejidos del cuerpo humano, enumerados en la Figura 1.8.

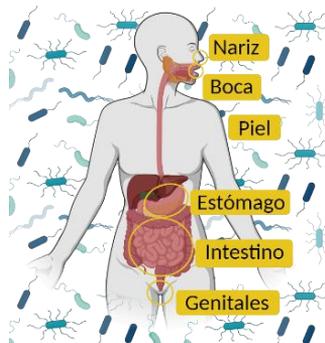


Figura 1.8 Principales áreas donde se encuentra la microbiota humana. Fuente: elaboración propia

Estos ecosistemas formados por microbiomas tienen un gran impacto en la salud, afectando a la modulación del sistema inmunitario. Esto puede provocar una inflamación que promueva el tumor o permitir que la célula cancerígena escape de la destrucción inmune [7; 12].

2.2. Capacidades adquiridas

Mantenimiento de la señal proliferativa

Mientras que las células normales requieren señales de crecimiento para pasar del estado inactivo al proliferativo, las cancerosas desregulan estas señales. Pudiendo llegar a ser autosuficientes mediante tres estrategias, representadas en la Figura 1.9 [6; 9]:

- i. *Modificación de las señales de crecimiento extracelular:* las células sobreexpresan o mutan los receptores de superficie celular, interpretando las señales de manera inapropiada o activando cascadas de señalización en ausencia de señales.
- ii. *Alteración de los transductores transcelulares:* las proteínas encargadas de transmitir las señales desde la superficie celular hacia el interior de la célula amplifican o desvían dichas señales, permitiéndoles mantenerse en estado proliferativo.
- iii. *Manipulación de los circuitos intracelulares que traducen dichas señales:* las células cancerígenas modifican genes y proteínas dentro de la célula para favorecer la activación de vías de señalización que promueven la proliferación celular.

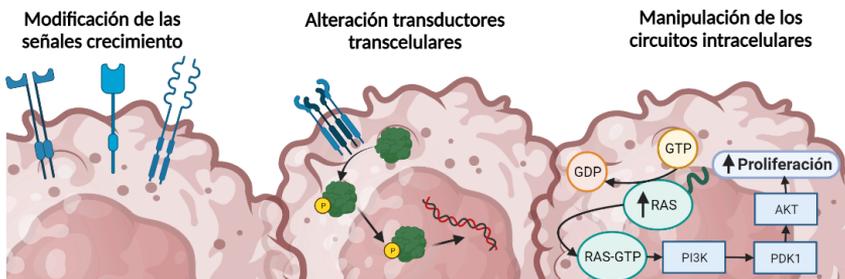


Figura 1.9 Célula cancerígena en estado proliferativo. Fuente: elaboración propia

Esta capacidad hace que las células cancerígenas sean capaces de estimular tanto su propio crecimiento, como el de las células vecinas [6; 9].

⊗ *Evasión de los supresores de crecimiento*

Con el fin de prevenir la proliferación celular incontrolada, el organismo dispone de mecanismos de control que inhiben el crecimiento celular. Estas señales de inhibición actúan obligando a las células a entrar en la fase G₀ del ciclo celular (esquematizado en la Figura 1.10), donde permanecen inactivas u obligándolas a ingresar en estados postmitóticos que inducen la diferenciación celular [6; 13 – 14].

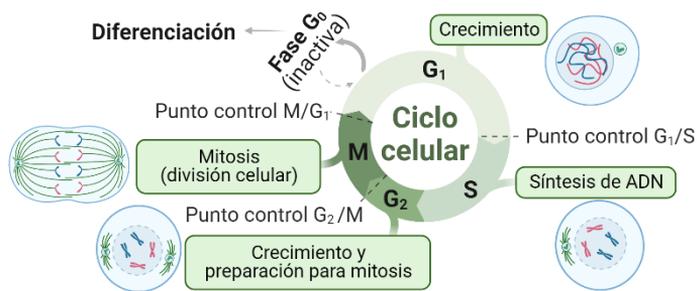


Figura 1.10 Ciclo celular. Fuente: elaboración propia

Los genes supresores de tumores codifican dos proteínas clave en este proceso: RB y P53. A nivel molecular, la proteína de la retinoblastoma (RB) juega un papel central en la mediación de estas señales antiproliferativas. Para evadir estas señales y permitir la proliferación descontrolada, las células cancerosas suelen desactivar la acción de la proteína RB mediante la fosforilación. Esto interrumpe la función de RB y permite que las células continúen dividiéndose sin restricciones [6; 13 – 14].

⊕ *Resistencia a la apoptosis o muerte celular programada*

Las células adquieren la capacidad de resistencia a la apoptosis afectando tanto a los sensores, que determinan si una célula debe morir o no, como a los efectores, que son receptores de superficie encargados de la muerte celular. Aunque las células cancerosas pueden adquirir esta resistencia a través de una variedad de estrategias, la más común, es la pérdida de un regulador

proapoptótico a través de la mutación del gen supresor de tumores P53, evitando su acción, como se indica en la Figura 1.11 [6; 15].

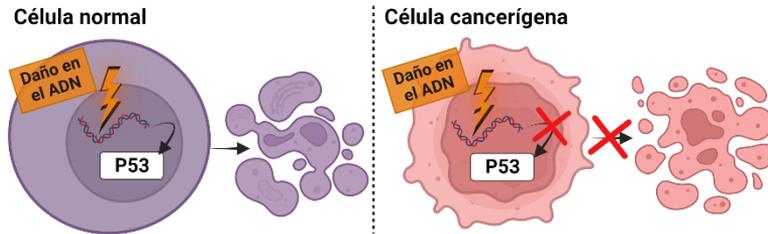


Figura 1.11 Diferencia entre la respuesta de una célula normal y una cancerígena a un daño en el ADN. Fuente: elaboración propia

Habilidad de replicación ilimitada

En cada ciclo celular los extremos de los cromosomas, conocidos como telómeros, se acortan de forma progresiva, ya que las ADN polimerasas no son capaces de replicar por completo los extremos durante la fase S. Esto provoca que tras cierto número de replications las células pasen a un estado de crisis, caracterizado por resultar en muerte celular.

Sin embargo, las células cancerígenas en la mayoría de los casos logran una replicación aumentada, comúnmente denominada “ilimitada”. En la mayoría de los casos, este fenómeno ocurre, por la sobreexpresión de la enzima telomerasa, que ralentiza el proceso de degradación de los telómeros, permitiendo así que las células se dividan sin entrar en crisis, como se muestra en la Figura 1.12. Aunque, en ocasiones también se logra a través de un proceso de recombinación homóloga conocido como ALT (alargamiento alternativo de telómeros) [6; 16].

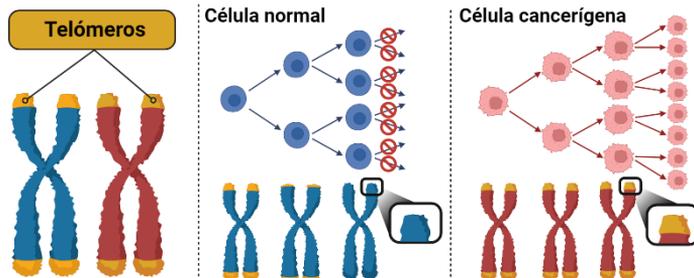


Figura 1.12 Diferencia en el acortamiento de los telómeros tras la proliferación celular en una línea normal y otra cancerígena. Fuente: elaboración propia

Inducción o acceso de vasculatura

Todos los tejidos necesitan sustento en forma de nutrientes y oxígeno, así como la capacidad de evacuar sus desechos. Para ello se utilizan los vasos sanguíneos de menor tamaño (capilares), y para que los tejidos funcionen adecuadamente, las células deben estar ubicadas a una distancia de menos de 100 μm de un vaso sanguíneo. Durante el proceso de desarrollo de los órganos, denominado *organogénesis*, esa cercanía está asegurada. Una vez formado el tejido, el proceso de *angiogénesis* (formación de nuevos vasos) se regula por factores solubles y sus receptores presentes en la superficie de las células endoteliales, como integrinas y moléculas de adhesión.

Las células normales pueden perder su capacidad de promover la angiogénesis como una forma de controlar su crecimiento y evitar una expansión descontrolada. Sin embargo, las células cancerosas tienen la capacidad de sobreexpresar ciertos activadores angiogénicos, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), lo que les permite promover la formación de nuevos vasos sanguíneos, como se representa en la Figura 1.12, y asegurar su suministro de nutrientes y oxígeno [5 – 6 ; 17].

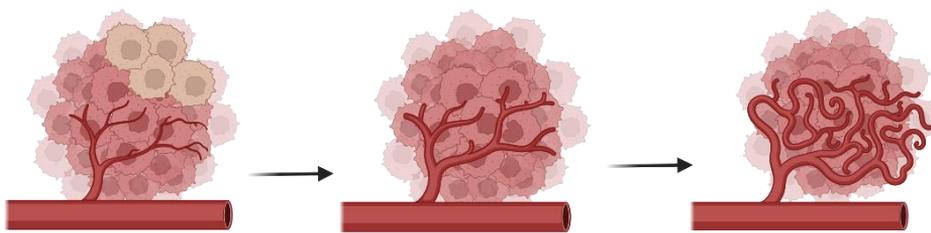


Figura 1.13 Angiogénesis en el tumor. Fuente: elaboración propia

Activación de la invasión de los tejidos y metástasis

Las células tumorales primarias tienen la capacidad de generar células que pueden desplazarse e invadir tejidos adyacentes o distantes, donde son capaces

de generar nuevas colonias. Este proceso se denomina metástasis y es la causa del 90% de las muertes relacionadas con el cáncer.

La *metástasis* se produce debido a alteraciones en las proteínas responsables de la unión celular, tanto entre las propias células como con la matriz extracelular. Las proteínas más afectadas por estas alteraciones son las moléculas de adhesión célula-célula (CAM), las integrinas y las proteasas (Figura 1.14). Entre las CAM, la E-Cadherina es una de las más investigadas, y se ha observado que suele perder su función en la mayoría de los cánceres epiteliales [6; 18].

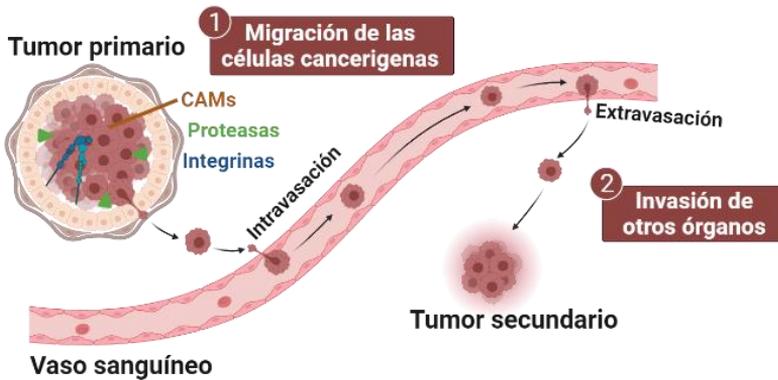


Figura 1.14 Representación gráfica de la metástasis. Fuente: elaboración propia

Reprogramación del metabolismo energético

Warburg observó que las células cancerosas tienen tendencia a llevar a cabo la *glucólisis*, en lugar de la *fosforilación oxidativa mitocondrial*, incluso en presencia de oxígeno, dando lugar a la *glucólisis aeróbica* (“*efecto Warburg*”). Este tipo de metabolismo es menos eficiente en términos de producción de energía (se produce menos ATP) en comparación con la fosforilación oxidativa, pero tiene un beneficio crucial para las células cancerosas: permite que los productos intermedios de la glucólisis se desvíen hacia vías biosintéticas, lo que a su vez facilita la creación de macromoléculas y orgánulos para favorecer la rápida proliferación celular [5; 19 – 20]. En la Figura 1.15 se observa la diferencia de este proceso en una célula normal o una cancerígena.

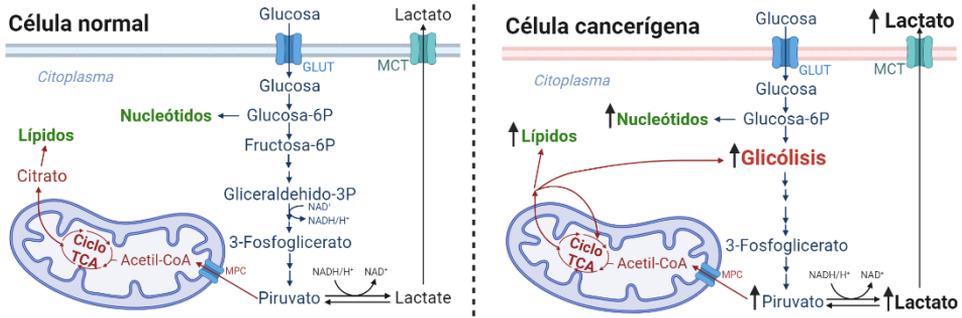


Figura 1.15 Metabolismo de la glucosa en células normales (izquierda) y los cambios que impulsan el efecto Warburg (derecha). Adaptado de Burns et al. [20]

Además, investigaciones posteriores revelaron que algunos tumores contienen dos subpoblaciones de células cancerosas que funcionan en simbiosis. Las células ubicadas en regiones de baja concentración de oxígeno, conocidas como *hipóxicas*, necesitan glucosa y secretan lactato, el cual es aprovechado por otras células que se encuentran en zonas con mayor concentración de oxígeno, para obtener energía y sintetizar componentes celulares [5; 21].

Evadir la destrucción inmune

El sistema inmunológico desempeña un papel clave en la detección y eliminación de agentes extraños. Sin embargo, las células cancerosas desarrollan estrategias para eludir o inhibir la respuesta inmune, tal como se representa en la Figura 1.16.

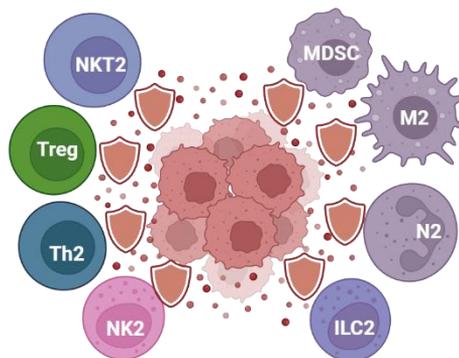


Figura 1.16 Defensa de las células cancerígenas frente la acción del sistema inmune. Fuente: elaboración propia.

Esto incluye la disminución de la expresión de antígenos y la modulación de moléculas estimuladoras e inhibitoras. Además, las células cancerosas pueden crear un entorno inmunosupresor dentro del tumor, complicando la efectividad de la respuesta inmunológica y permitiendo la evasión de la destrucción inmune [5; 22].

Desbloqueo de la plasticidad fenotípica

Tras la etapa de proliferación, la célula entra en un estado inactivo y da lugar a la diferenciación, que implica un cambio en sus características y su especialización. Este proceso se conoce como *plasticidad fenotípica*, donde las células adquieren un fenotipo específico. Sin embargo, las células cancerosas originadas a partir de células madre pueden evitar este proceso de diferenciación de tres maneras distintas: (i) *desdiferenciación*, en la cual la célula revierte su curso y vuelve a estados similares a los de la célula progenitora; (ii) *diferenciación bloqueada*, donde la célula detiene el proceso; y (iii) *transdiferenciación*, en la que la célula adquiere rasgos específicos de otro tejido al de la célula madre original. Estos procesos se muestran en la Figura 1.17 [7; 23].

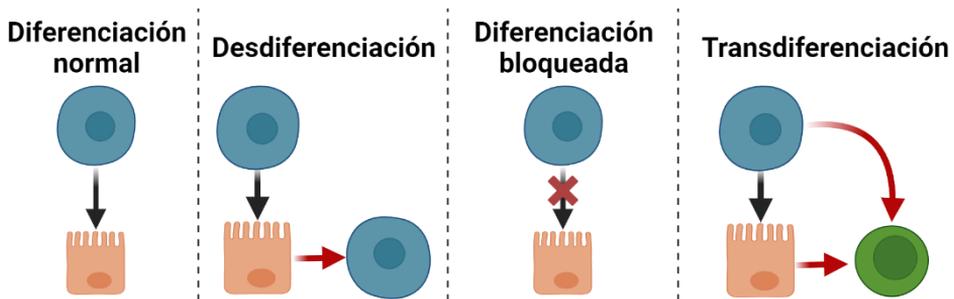


Figura 1.17 Defensa de las células cancerígenas frente la acción del sistema inmune. Fuente: elaboración propia.

Células senescentes

La senescencia es el estado irreversible de detención proliferativa, es decir, el ciclo de división celular se detiene, se producen cambios en la morfología y el

metabolismo celular, y se activa el fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP) que implica la liberación de ciertas proteínas dependiendo del tipo de célula senescente. Estas células son capaces de promover el tumor, contribuyendo a la señalización proliferativa a través de esas proteínas liberadas por el SASP, esto es lo que se representa en la Figura 1.18 [7; 24].

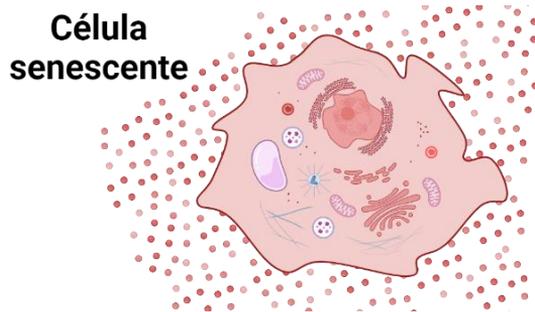


Figura 1.18 Representación de célula senescente con las proteínas que secreta. Fuente: elaboración propia.

En resumen, las características y capacidades adquiridas por las células cancerosas constituyen elementos clave en su desarrollo. Estos mecanismos de adaptación permiten a las células cancerosas sobrevivir y proliferar en un entorno desafiante. Comprender en profundidad estas características es esencial para desarrollar estrategias terapéuticas efectivas que aborden la complejidad de esta enfermedad.

3. Cáncer colorrectal

Tras explorar en detalle las características fundamentales que definen a las células cancerígenas, es preciso aplicar este conocimiento a un contexto específico, como es el caso del cáncer colorrectal (CCR), el cual unifica los de colon y recto. El CCR supone un gran problema de salud, puesto que, como ya se mencionó en el apartado 1, es el segundo tipo de cáncer más mortal a nivel mundial y el tercer tipo con mayor incidencia, siendo el más diagnosticado en España [25].

Solo un pequeño porcentaje de los casos de CCR resultan de mutaciones constitucionales, es decir, son de carácter hereditario. Mientras que la mayoría de las veces (más del 90% de los pacientes) son mutaciones esporádicas, que pueden ocurrir a través de tres vías genéticas/epigenéticas principales: (i) la *inestabilidad cromosómica (CIN)* que se caracteriza por una alteración en el número o estructura de los cromosomas dependientes de APC/ β -catenina; (ii) *neoplasia serrada o del fenotipo del metilador de la isla CpG (CIMP)*, en la que los pólipos aserrados sésiles progresan a CCR; y, finalmente, (iii) *la inestabilidad de microsatélites (MSI)*, en la que los CCR son el resultado de la hipermetilación del gen MLH1 MMR [26; 27].

Los CRC tienen una de las cargas mutacionales más altas entre todas las neoplasias y se pueden dividir entre hipermutados y no hipermutados, que respectivamente suponen un 16% y un 84% de los casos de CCR [25; 27 – 28].

El desarrollo de CCR esporádico está relacionado con una serie de factores de riesgo que no pueden modificarse, como son los factores hereditarios, y otros que sí se pueden cambiar, en función del estilo de vida (factores ambientales). Todos ellos se desarrollan en la Tabla 1.1 [25].

Tabla 1.1 Factores de riesgo y contribuyentes del CCR

Factores hereditarios y antecedentes médicos	Síndromes hereditarios de cáncer colorrectal
	Antecedentes familiares positivos
	Tener más de 50 años
	Ser hombre
	Ser de raza negra
Factores ambientales	Inactividad física
	Tabaquismo
	Consumo de alcohol
	Gran consumo de carne roja o procesada
	Desequilibrio de la microbiota
Otros factores de riesgo	Grasa corporal y obesidad
	Diabetes tipo 2
	Enfermedad inflamatoria intestinal

Así como existen factores de riesgo para sufrir CCR, también existen factores que previenen la enfermedad o favorecen el proceso de curación: realizar actividad física; incorporar fibra dietética en la alimentación a través de alimentos como granos integrales, frutas, verduras y cereales; tener buenos niveles de vitaminas, especialmente las vitaminas C y D; no fumar ni beber alcohol; no comer carne roja; utilizar antiinflamatorios como la aspirina; y considerar la terapia de reemplazo hormonal. En el caso concreto de un buen proceso de curación, resulta crucial un diagnóstico temprano, por lo que es necesario hacer ensayos de detección de CCR en personas con alto riesgo [25].

4. Tratamientos actuales en la lucha contra el cáncer colorrectal

Hay numerosas formas de combatir el CCR, aunque es habitual combinar tratamientos con el fin de obtener un efecto sinérgico, intentando minimizar el daño a los tejidos sanos y actuando de forma más eficaz contra las células cancerígenas. Actualmente la supervivencia y las opciones terapéuticas para combatir el cáncer dependen del diagnóstico. En el caso de CCR la detección precoz es muy necesaria, ya que el desarrollo de pólipo a carcinoma suele tardar más de 10 años [29 – 33]. Por eso, cuanto antes se detecte el CCR, es menos probable que el paciente muera, así que lo más importante es determinar el estadio tumoral (Figura 1.19) [34], que puede ser: **Estadio 0** (Carcinoma *in situ*), se observan células anormales que pueden volverse cancerosas o no, en la mucosa de la pared del colon; **Estadio I**, se ha formado una masa tumoral en la pared del colon, empieza en la mucosa y alcanza la submucosa; **Estadio II**, el tumor crece de volumen y se disemina hasta la serosa, pudiendo alcanzar los órganos cercanos o el peritoneo visceral; **Estadio III**, el cáncer ha alcanzado uno o más ganglios linfáticos; o **Estadio IV**, el cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo (metástasis) [25; 35 – 36].

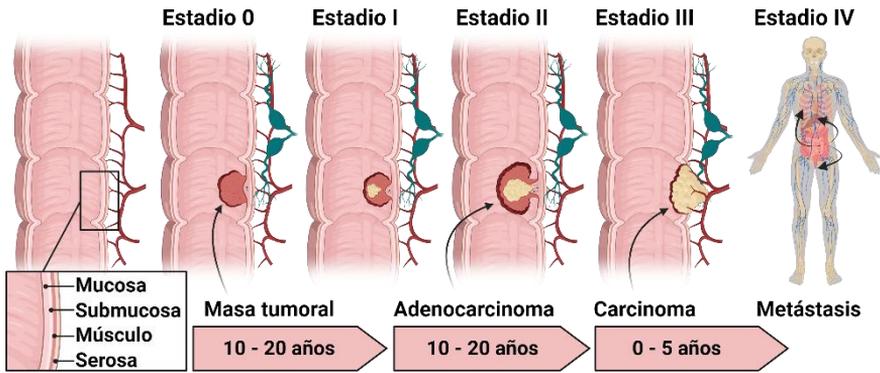


Figura 1.19 Estadios y desarrollo del cáncer colorrectal (CCR). Fuente: elaboración propia.

Así pues, la supervivencia a los cinco años desde el diagnóstico es de más del 75 % en los casos de estadio I, menor del 30% si se trata del estadio II o del III, pero inferior del 10 % cuando existe metástasis (Estadio IV). Por ello es importante un buen diagnóstico, algo que ha mejorado notablemente con el tiempo [37]. Sin embargo, solo el 40 % de los casos de CCR se detectan en las primeras etapas [32; 38]. Al principio se realizaban operaciones exploratorias, mientras que ahora se utilizan equipos que permiten una exploración menos invasiva. Los métodos de detección más empleados son los exámenes endoscópicos del intestino grueso (en particular, la sigmoidoscopia flexible y la colonoscopia) y las pruebas de heces, como la de sangre oculta en heces. Aunque se ha sugerido la cápsula endoscópica, las tomografías computarizadas y otras pruebas basadas en heces (p. ej., basadas en ADN), así como análisis de sangre u orina, para la detección. No obstante, la aceptación de estos métodos ha sido pequeña debido a las dudas sobre su rendimiento diagnóstico, su alto costo y algunos efectos secundarios [39].

Los tratamientos habituales en estadios tempranos (0, I y II) es la cirugía, reseccionando el tumor y, en caso necesario, parte de los órganos, mientras que en estadio III se suele combinar la cirugía con quimioterapia adyuvante. En estadio IV o en el caso de *cáncer recidivante* (cáncer que reaparece) hay varios tratamientos posibles dependiendo del estado de los pacientes, por lo general, el enfoque más común para tratar el cáncer es la extirpación del tumor y parte de

los órganos afectados, seguido de tratamiento con quimioterapia adyuvante. Además, se pueden explorar diferentes opciones para reducir el tumor o recurrir a terapias paliativas (radioterapia, quimioterapia, criocirugía o ablación por radiofrecuencia); finalmente se pueden buscar enfoques más específicos, como terapias dirigidas, inmunoterapia o incluso la participación en ensayos clínicos para abordar de manera más precisa la enfermedad [25; 37].

A continuación, se explicarán de forma más detallada cada uno de los posibles tratamientos.

4.1. Cirugía

La cirugía consiste en la extirpación del cáncer mediante una operación. Es el tratamiento más antiguo, ya que hay registros que datan del 1600 a.C. en Egipto [4], pero esta técnica conllevaba un riesgo extremo hasta que se descubrieron la anestesia (1846) y la asepsia (1867) [40]. Hoy en día, es el método más común para todos los estadios de cáncer y el más eficaz en el caso de tumores localizados.

Si el cáncer es un pólipo se realiza una escisión local, es decir, se extrae el tumor sin afectar al órgano. Si el cáncer es más grande se hace una *resección* de colon (se extirpa el tumor y parte del tejido sano que lo rodea) tras la cual se puede hacer una *anastomosis*, cosiendo los extremos sanos, o una *colostomía*, se crea una abertura por fuera del cuerpo para eliminar el material de desecho porque no se pueden coser los extremos.

Es habitual que, antes o después de la cirugía, los pacientes reciban quimioterapia o radioterapia con el fin de reducir el tumor o destruir restos de células cancerosas. Esto se conoce como *terapia adyuvante*. Además, en casos de escisión local se pueden utilizar métodos menos invasivos como utilizar cámaras de video en miniatura y endoscopia para eliminar los tumores a través de tubos, o congelar el tejido anormal con nitrógeno líquido (*criocirugía/crioterapia*).

4.2. Quimioterapia

A principios de 1900, Paul Ehrlich definió la quimioterapia como el uso de químicos para tratar enfermedades. En el caso de su uso como terapia contra el cáncer, se utilizan medicamentos diseñados para combatir las células cancerígenas, ya sea impidiendo su multiplicación o destruyéndolas [41]. Esta forma de tratamiento puede llevarse a cabo por vía oral, intravenosa o intramuscular, en cualquier caso, los medicamentos alcanzarán el torrente sanguíneo y se distribuirán por todo el organismo (administración sistémica). En ocasiones, los medicamentos se aplican directamente en cavidades corporales específicas o en órganos concretos, con el fin de que ejerzan su acción de manera más localizada, afectando sobre todo a las células cancerosas en esa área.

En función de la etapa de desarrollo del cáncer, se deberá seleccionar los quimioterapéuticos a utilizar. En la etapa inicial es preferible el uso de fármacos citostáticos (antiproliferativos o inhibidores de enzimas), mientras que en la etapa avanzada de la enfermedad se prefieren fármacos citotóxicos con diferentes modos de acción. El problema de los citotóxicos es que tienen una elevada toxicidad por lo que se suelen administrar en dosis bajas. Aun así, debido a su acción no selectiva provocan graves efectos secundarios, lo que repercute en la calidad de vida del paciente, y con frecuencia obliga a disminuir la dosis. Esto puede reducir la eficacia del tratamiento y dar lugar a resistencia a medicamentos y/o a la reaparición del cáncer. Por otro lado, los citostáticos suelen tener una alta acción selectiva, pero no son muy efectivos para matar las células tumorales y su uso prolongado puede ser perjudicial. Por lo tanto, el desafío actual es encontrar un medicamento contra el cáncer más seguro, selectivo y efectivo [41 – 42].

La búsqueda de dichos tratamientos ha llevado a explorar las características particulares de las células cancerosas. Como se detalla en la sección 2 de este capítulo, estas células modifican su metabolismo para satisfacer las necesidades

energéticas y biosintéticas de su crecimiento descontrolado, un fenómeno conocido como *reprogramación metabólica* [5; 19 – 20]. Este proceso conlleva un aumento significativo en la síntesis de macromoléculas, un incremento sustancial en la producción de energía y una alteración en el equilibrio redox [5 – 7; 43].

La capacidad de adaptación y modificación metabólica de las células cancerosas se asocia con la resistencia a los medicamentos, un desafío importante en la quimioterapia convencional. Una estrategia común para contrarrestar esta resistencia implica combinar dos compuestos que actúen de manera sinérgica en rutas metabólicas clave, interfiriendo así con las adaptaciones de las células cancerosas [5 – 7; 43].

4.3. Radioterapia

A principios del siglo XX, se descubrió que la radiación podía destruir células cancerosas. Este hallazgo dio lugar al desarrollo de la *radioterapia*, un tipo de terapia que daña el ADN celular mediante el empleo de radiación ionizante, rayos X o partículas cargadas. Actualmente, la radioterapia se clasifica según su forma de administración en terapia externa o interna [44].

En la *radioterapia externa*, se utiliza una máquina llamada acelerador lineal, la cual emite haces de radiación desde el exterior del cuerpo hacia la zona afectada por el cáncer. Este enfoque permite una administración precisa y controlada de la radiación para dirigirla de forma específica, minimizando el daño a los tejidos adyacentes [45]. Por otro lado, la *radioterapia interna*, conlleva el uso de sustancias radiactivas, que se insertan directamente en el tumor, o en su proximidad, mediante el empleo de agujas, semillas, alambres o catéteres [45].

Sin embargo, como sucede con la quimioterapia, la radiación no discrimina entre células normales y cancerígenas, destruyendo a ambos tipos por igual [41].

4.4. Inmunoterapia

La inmunoterapia es un tipo de terapia biológica que se basa en aprovechar el propio sistema inmunitario del paciente para combatir al cáncer. Para ello, se utilizan sustancias que estimulan el sistema inmune del organismo, como son los anticuerpos monoclonales, las vacunas o las células T. En la actualidad, los tratamientos de inmunoterapia funcionan bloqueando las proteínas de control inmunológico, que normalmente actúan para evitar una respuesta inmunológica demasiado intensa e impidiendo que las células T ataquen las células cancerosas. Al bloquear estas proteínas de control, las células T pueden dirigirse y eliminar las células cancerosas [46].

En el caso del cáncer colorrectal metastásico, existen dos tipos de terapia habituales, una de ellas inhibe a la proteína CTLA-4, mientras que la otra actúa contra PD-1. Estas proteínas se encuentran en la superficie de las células T, y de forma natural interactúan con proteínas presentes en las células cancerosas, CTLA-4 se une a B7 y PD-1 a PD-L1. Estas uniones inhiben la capacidad del sistema inmunológico para activar las células T y atacar a las células cancerosas. Al bloquear estas interacciones, se reestablece la capacidad del sistema inmunológico para combatir a las células de CCR [46 – 47].

4.5. Terapia dirigida

Con el fin de mejorar la selectividad de los tratamientos previamente mencionados, se ha desarrollado la idea de terapia dirigida, basada en el uso de compuestos que identifican las células cancerígenas, impidiendo su crecimiento y eliminándolas. Esto se consigue al desarrollar sustancias que interfieran con moléculas específicas involucradas en el crecimiento, la progresión y la propagación del cáncer, y que de este modo actúen como dianas moleculares. Por lo general, es un tratamiento que causa menos daño a las células normales que la

quimioterapia o la radioterapia. Sin embargo, tienen algunas limitaciones, ya que los fármacos son difíciles de desarrollar y las células cancerosas pueden volverse resistentes a ellas [48 – 49].

Actualmente los tipos de terapia dirigida que se usan en el tratamiento del cáncer de colon son inhibidores de la angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos), inhibidores de proteínas cinasas (necesarias para la división celular), o anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos son proteínas del sistema inmunitario que se adhieren a dianas específicas destruyendo las células cancerosas y se usan como tratamientos, tanto solos como combinados con medicamentos o toxinas con los que actúan sinérgicamente contra el cáncer. Hay diferentes tipos de terapia con estos anticuerpos, aunque los más habituales son los inhibidores de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que impiden que las células cancerígenas formen nuevos vasos sanguíneos, y los del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que evitan que las células cancerosas crezcan y se multipliquen [48 – 49].

4.6. Tratamientos aprobados para tratar el cáncer colorrectal

Después de exponer los enfoques terapéuticos utilizados en la lucha contra el cáncer colorrectal (resumidos en la Figura 1.20), es fundamental dirigir la atención hacia tratamientos que ya han sido aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para tratar el cáncer de colon y el de recto.

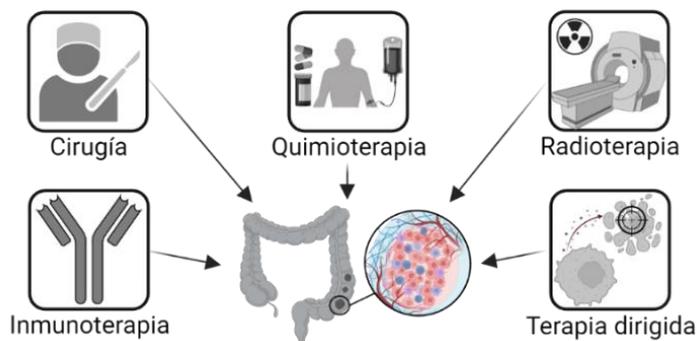


Figura 1.20 Tratamientos actuales en la lucha contra el cáncer Fuente: elaboración propia.

En la Tabla 1.2 se describen los fármacos genéricos aprobados por la FDA [50].

Tabla 1.2 Fármacos genéricos aprobados por la FDA como tratamientos para combatir el cáncer colorrectal

Fármacos	Descripción
<i>Bevacizumab</i>	Anticuerpo monoclonal humanizado anti-VEGF [51]
<i>Ramucirumab</i>	Anticuerpo monoclonal humano anti-VEGFR-2 [52]
<i>Cetuximab</i>	Anticuerpo monoclonal quimérico de ratón-humano anti-EGFR [53]
<i>Panitumumab</i>	Anticuerpo totalmente humano anti-EGFR/HER-1 [54]
<i>Ipilimumab</i>	Anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 [55]
<i>Nivolumab y Pembrolizumab</i>	Anticuerpos monoclonales anti-PD-1 [56 – 57]
<i>Fluorouracilo</i>	Anti-metabolito antineoplásico que inhibe la función de RNA [58]
<i>Capecitabina</i>	Profármaco que se transforma en <i>5-fluorouracilo</i> tras su administración [59]
<i>Clorhidrato de Irinotecán</i>	Fármaco derivado de la <i>camptotecina</i> cuyo objetivo es la topoisomerasa I [60]
<i>Leucovorina</i>	Derivado del Ácido fólico que se combina con <i>fluorouracilo</i> para aumentar su eficacia [61]
<i>Oxaliplatino</i>	Derivado del platino con un ligando transportador de DACH. El efecto toxico del platino es bloquear la replicación y transcripción del ADN [62]
<i>Regorafenib</i>	Inhibidor multiquinasa que mejora la eficacia de los anti-PD1 [63]
<i>Clorhidrato de tipiracilo</i>	Inhibidor de la timidina fosforilasa, aumentando la exposición sistémica de <i>trifluridina</i> [64]
<i>Trifluridina</i>	Inhibidor metabólico nucleósido a base de timidina que impide la proliferación celular [64]
<i>Tucatinib</i>	Inhibidor quinasa de HER2 [65]
<i>Ziv-Aflibercept</i>	Proteína humanizada que inhibe VEGF [66]

Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, el uso sinérgico de medicamentos es muy habitual, por eso, en la Tabla 1.3 también se describen la composición de tratamientos combinados aprobados por la FDA.

Tabla 1.3 Combinación de fármacos para combatir el cáncer colorrectal aprobados por la FDA

Nombre del tratamiento	Combinación de fármacos
CAPOX	Capecitabine y oxaliplatin [67]
FOLFOX	Fluorouracil, leucovorin, y oxaliplatin [67]
FOLFIRI	5-fluorouracil, leucovorin e irinotecan [67]
FOLFIRI-BEVACIZUMAB	FOLFIRI y bevacizumab [67]
FOLFIRI-CETUXIMAB	FOLFIRI y cetuximab [66]
FU-LV	5-Fluorouracil y Leucovorin [61]
XELIRI	Capecitabine e Irinotecan Hydrochloride [68]
XELOX	Capecitabine y oxaliplatin [68]

Estas estrategias terapéuticas, son el resultado de una búsqueda constante para combatir el cáncer colorrectal de forma más eficaz. Sin embargo, es necesario continuar con la investigación, con el objetivo de actuar de una forma más selectiva contra las células cancerígenas. Así se reducirían los efectos secundarios, contribuyendo a mejorar la calidad de vida de los pacientes.

5. Sistemas de liberación controlada y nanotecnología

A pesar de las mejoras que suponen los agentes dirigidos, la mayoría de los fármacos no tienen una elevada especificidad que les haga actuar únicamente contra las células tumorales, es decir, no son suficientemente eficaces para eliminar por completo todas las células cancerígenas en las dosis permitidas. Además, es habitual que la solubilidad de estos fármacos no sea muy elevada. Por ello en las últimas décadas, el estudio de los sistemas de administración de fármacos (DDS) han sido imprescindibles. El objetivo de estos sistemas se centra en aumentar la solubilidad de compuestos, así como conseguir una liberación lenta y prolongada de los agentes antitumorales, direccionándolos hacia las células cancerígenas. Además, se busca permitir la encapsulación de agentes antitumorales que actúen de forma sinérgica y dirigirlos al tumor, para que sea una entrega específica. Todo esto permite reducir el número de administraciones

y minimizar los posibles efectos secundarios [69]. Esta tecnología comenzó con la formulación de Spansule® en 1952, unas capsulas que permitían la liberación de un fármaco durante 12 horas tras su administración oral [70].

En este contexto, la *nanotecnología* ha servido para mejorar la eficacia y especificidad de los DDS, permitiendo reducir los efectos secundarios y la frecuencia de administración de tratamientos oncológicos, marcando un avance significativo en la lucha contra el cáncer. *Nanno* es un prefijo griego que significa enano y se asocia con diversos términos. En primer lugar, *nanómetro* (nm) es una medida de longitud que equivale a 10^{-9} metros. Teniendo en cuenta esta definición, la Comisión Europea define los *nanomateriales* como estructuras compuestas por al menos un 50 % de partículas con tamaños entre 1 y 100 nm en algunas de sus dimensiones. La ciencia que estudia los procesos que ocurren en los nanomateriales y moléculas se denomina *nanociencia*. Y finalmente, Taniguchi definió la *nanotecnología* (en 1974) como el procesamiento, separación y manipulación de los materiales átomo por átomo. Sin embargo, actualmente se suele utilizar la definición que aportó Feynman en 1959: “*manipulación de materiales de tamaño nanométrico en aplicaciones prácticas*”. La nanotecnología es un área interdisciplinaria, pudiendo aplicarse en campos como electrónica, informática, medio ambiente, cosmética, telecomunicaciones, biología... En medicina tiene un interés tan importante que ha derivado en una nueva disciplina denominada *nanomedicina* [71].

5.1. Nanomedicina y cáncer

En las últimas décadas, la nanomedicina ha revolucionado el diagnóstico y el tratamiento oncológico, de tal manera que en la base de datos PubMed aparecen más de 45 mil artículos publicados en los últimos 24 años. Y es que esta disciplina ha permitido el diseño de nuevos sistemas de diagnóstico que posibilitan una detección precoz en los primeros estadios del cáncer, así como la monitorización

y visualización más específica de los tejidos y áreas tumorales. Además, se puede utilizar para eliminar células cancerosas antes de la formación de neoplasias (teragnóstico), suponiendo una gran mejora frente las terapias convencionales, ya que permite el diseño de nuevos tratamientos más eficaces con menores efectos secundarios y capaces de evitar la generación de resistencias [2; 72].

A nivel general, los sistemas de tamaño nanométrico pueden albergar desde fármacos hasta genes, por lo que se han estudiado considerablemente como transportadores de agentes anticancerígenos. Los objetivos de estos sistemas son: (i) potenciar la solubilidad de los fármacos hidrofóbicos y proteger la carga útil de la inactivación temprana o la biodegradación; (ii) mejorar propiedades físico-químicas de los fármacos, permitiendo la interacción con biomoléculas; (iii) prolongar el tiempo de circulación de la carga; (iv) proporcionar concentraciones de fármaco más elevadas; (v) generar sistemas multifuncionales que transporten más de un agente terapéutico de forma simultánea, consiguiendo un efecto sinérgico; (vi) mejorar el comportamiento ADME (Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción); (vii) evitar la resistencia de fármacos múltiple; (viii) potenciar la actividad terapéutica al dirigirlos de forma activa hacia el tumor, reduciendo los efectos secundarios de los fármacos [73 – 75].

Son numerosos los sistemas nanoparticulados aprobados por la Administración Federal de Medicamentos de EE. UU. (FDA) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) para utilizarlos como transportadores de fármacos antitumorales. Los principales nanotransportadores utilizados en los tratamientos anticancerígenos se sintetizan utilizando diversos materiales, como polímeros, lípidos y compuestos organometálicos. Algunos de esos sistemas nanoparticulados aprobados y utilizados habitualmente en clínica son [73 – 75]: Doxil® (liposomas de doxorubicina), Abraxane® (nab-paclitaxel), Onivyde® (liposomas de irinotecán) y Marqibo® (liposoma de sulfato de vincristina).

A fecha de hoy no hay ningún sistema nanoparticulado utilizado únicamente para tratamientos contra el cáncer colorrectal aprobado por la FDA o la EMA [76], aunque ciertos estudios sugieren la posibilidad de utilizar Onivyde® [73; 77] y Marqibo® [37; 75].

5.2. Los sistemas nanométricos

Los nanosistemas presentan una gran superficie específica y válida para cargar en su interior o adherir en su superficie diversos compuestos, y al ser de menor tamaño que las células humanas, pueden interactuar con biomoléculas del interior y de la superficie de las células [78] (ver Figura 1.21).

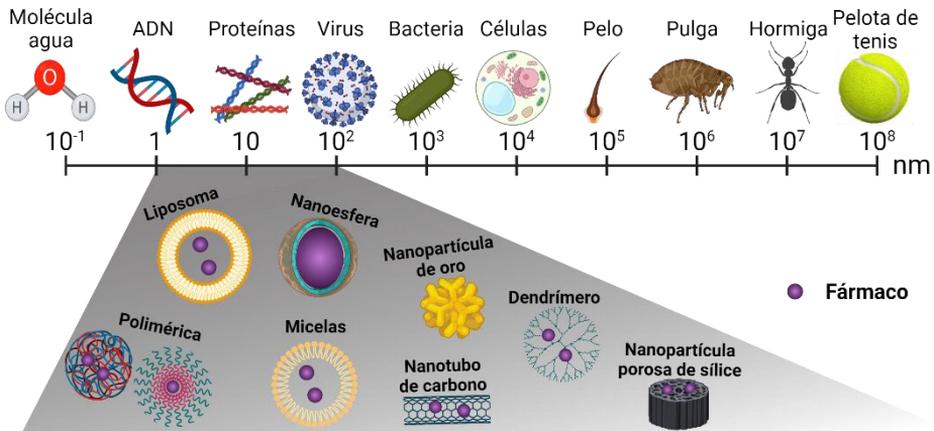


Figura 1.21 Escala nanométrica con ejemplos de sistemas nanométricos. Fuente: Elaboración propia.

Debido a la alta relación superficie/volumen (S/V) que aumenta el número de átomos expuestos en la superficie de los nanomateriales, exhiben propiedades únicas, diferentes a las que presentan sus análogos macroscópicos. Asimismo, pequeños cambios en el tamaño o en la forma pueden significar una modificación importante en sus propiedades. Además, al aumentar la relación S/V pueden superar los mecanismos de resistencia celular y no celular, mejorando la selectividad del fármaco hacia las células cancerosas y reduciendo la toxicidad hacia los tejidos normales [79 – 80].

Los sistemas de tamaño nanométrico presentan propiedades y estructuras que no presentan los fármacos o medicamentos contra el cáncer tradicionales, además aprovechan su capacidad para enlazar ligandos dirigidos a tumores [80 – 81].

Como se muestra en la Figura 1.22, los nanosistemas utilizados para la administración de fármacos se pueden fabricar con diferentes materiales, consiguiendo sistemas de diversas formas y tamaños (siempre en escala nanométrica). Además, hay que tener en cuenta cómo es su superficie y el hecho de que permiten la adición de compuestos para dirigir los tratamientos [82 – 83].

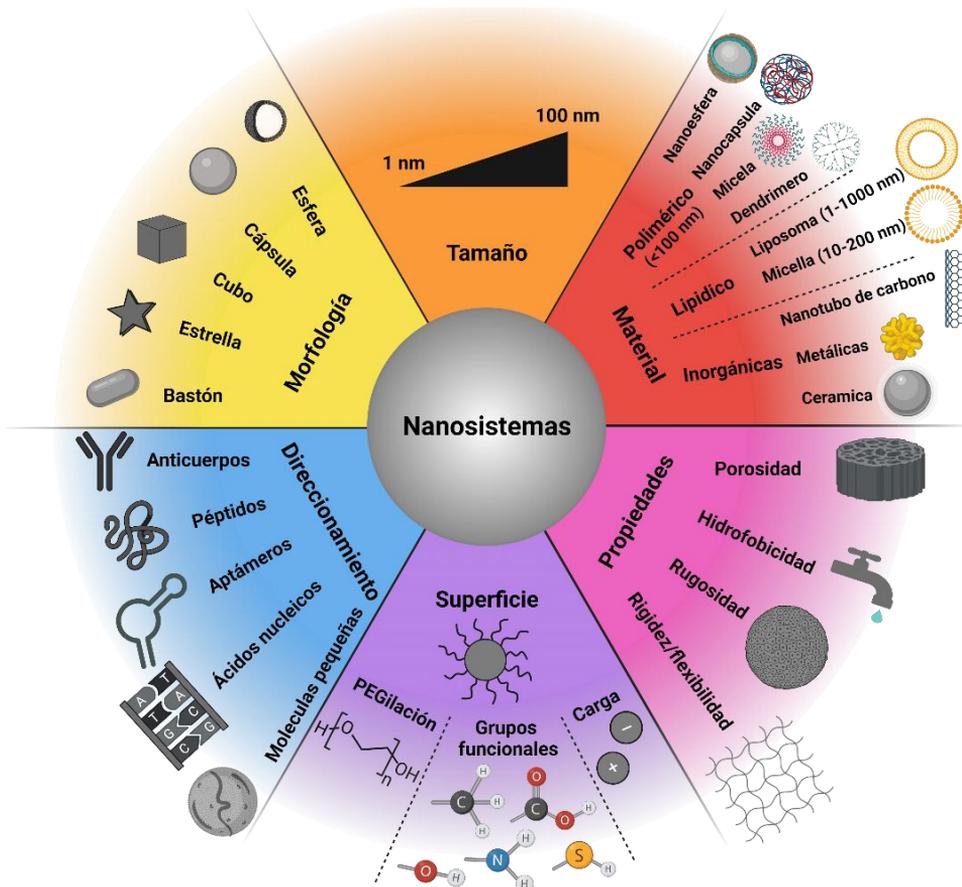


Figura 1.22 Características de los nanosistemas. Adaptado de Sun et al. [83]

Cuando los nanosistemas se administran por vía intravenosa, el sistema inmunológico puede reconocerlos y eliminarlos. Para evitarlo es habitual manipular sus características superficiales. Ya que, evitando la adsorción de componentes de la sangre en la superficie de las nanopartículas, especialmente de las proteínas (opsonización), se puede impedir la fagocitosis [80].

En este contexto, la *hidrofobicidad* o *hidrofilia* de la superficie de los nanosistemas influirá en el perfil de biodistribución y eficacia terapéutica del fármaco. Puesto que los nanosistemas con superficies más *hidrofóbicas* son capaces de adsorber proteínas en su superficie, desencadenando la acción del sistema de fagocitos mononucleares (SFM). Esto conduce a que el sistema sea dirigido a órganos ricos en SFM, como el hígado, el bazo, los pulmones y la médula ósea. Por otro lado, las nanopartículas que tienen superficies *hidrofílicas* tienen la capacidad de limitar la unión de proteínas plasmáticas debido a las fuerzas de repulsión estérica, evitando así el proceso de opsonización. Esto implica una reducción de captura por parte del SFM y un aumento del tiempo de circulación en el torrente sanguíneo. Para modificar la hidrofobicidad de la superficie, es habitual el uso de copolímeros en bloque que incorporan segmentos hidrofílicos en su estructura, como el recubrimiento con PEG [80 – 81; 83].

De igual modo, es necesario controlar las cargas superficiales. Lo ideal para que sean estables es un potencial zeta superior a 30 mV (en valor absoluto), ya que las fuerzas de repulsión que se originan evitan que las partículas se agreguen; y que no haya un exceso de cargas positivas para evitar la opsonización y eliminación de estas [83]. Al mismo tiempo, los nanosistemas pueden funcionalizarse con ligandos, incluidas moléculas pequeñas, cadenas de ADN o ARN, péptidos, aptámeros o anticuerpos.

De forma general, las ventajas y desventajas de cada uno de los sistemas nanométricos (Tabla 1.4) dependen del material del que están compuestos.

Tabla 1.4 Sistemas nanométricos

Material	Ventajas	Desventajas
Polimérico	<ul style="list-style-type: none"> – Capaz de solubilizar compuestos hidrofóbicos – Biocompatible – Control preciso de las características de las partículas – Fácil modificación de la superficie 	<ul style="list-style-type: none"> – Especificidad indirecta – No todos son biodegradables – Posibilidad de agregación y toxicidad – Dendrímeros: proceso costoso y largo, de carácter hemolítico
Lipídico	<ul style="list-style-type: none"> – Transporta moléculas hidrófobas e hidrófilas – Formulación simple – Biocompatible y alta biodisponibilidad – Mejor farmacocinética y farmacodinámica 	<ul style="list-style-type: none"> – Alto coste – Baja especificidad – Baja eficiencia de encapsulación – Eliminación a través de la acción del sistema retículo endotelial
Inorgánicas	<ul style="list-style-type: none"> – Especificidad – Propiedades ópticas y electromagnéticas únicas 	<ul style="list-style-type: none"> – Baja capacidad de carga – Limitaciones de toxicidad y solubilidad

Uno de los aspectos cruciales en la eficiencia y funcionalidad de los sistemas nanométricos es el direccionamiento preciso de sus componentes. Aquí es donde entra en juego el concepto de direccionamiento, que puede clasificarse en dos categorías fundamentales: pasivo y activo.

5.3. Direccionamiento pasivo o activo

Cuando un nanomaterial se administra intravenosamente, debe superar una primera barrera que consiste en la adsorción de proteínas plasmáticas en la superficie, lo que favorece su reconocimiento por parte del SFM y, por tanto, su eliminación del sistema circulatorio, acumulándose en tejidos como hígado y bazo, favoreciendo su eliminación y aclaramiento renal. Este fenómeno no es deseado, y se plantean alternativas para evitarlo, como la modificación de la superficie de los sistemas nanoparticulados o el uso de compuestos que se encuentren de forma natural en el cuerpo humano [80 – 81; 83]

En caso de superar las barreras extracelulares y alcanzar el tejido tumoral, los nanosistemas deben acumularse e interactuar con las células tumorales para liberar su contenido y realizar su función antitumoral [81]. Por lo que el tamaño, forma y carga de los nanosistemas son parámetros clave que se relacionan directamente con el tiempo en circulación de la sangre, su difusividad por los vasos sanguíneos, las interacciones con la matriz tumoral y el grado de reconocimiento por el SFM.

Para optimizar la eficacia y selectividad de los nanosistemas hay que decidir entre un direccionamiento activo o uno pasivo, como se muestra en la Figura 1.23.

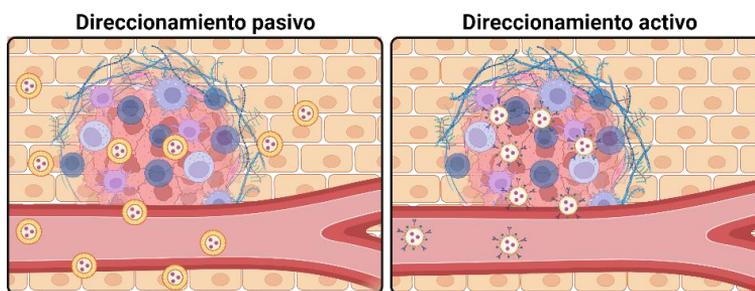


Figura 1.23 Esquema que representa el direccionamiento pasivo y activo en el tratamiento del cáncer. Fuente: Elaboración propia

El **direccionamiento pasivo** aprovecha las particularidades del crecimiento tumoral para liberar el fármaco. Como ya se explicó al definir las características del cáncer, el tumor es capaz de aumentar la vascularización que hay en su entorno para favorecer su propio desarrollo. Sin embargo, esta angiogénesis se produce tan rápidamente que los nuevos vasos formados son irregulares, carecen de membrana basal y muestran un epitelio discontinuo, con huecos que pueden ser desde 100 nm hasta 1 μ m dependiendo del tipo de tumor. Además, en los tejidos normales el fluido extracelular es drenado constantemente a los vasos linfáticos, mientras que en los tumores la función linfática es defectuosa. La combinación de estos dos factores produce lo que se denomina *Permeabilidad y Retención Aumentada* (EPR), un efecto que observaron Matsumura y Maeda a mediados de 1980, y consiste en que toda molécula mayor de 4 nm se acumula en el intersticio del tumor, mientras que las moléculas menores son capaces de entrar

al tumor, pero pueden volver a salir, difundiéndose a lo largo del torrente sanguíneo [81]. Este efecto se ve favorecido por la elevada presión de la microvasculatura tumoral, la cual ayuda a la extravasación de los fármacos. Por otro lado, la presión del líquido intersticial (IFP) es más elevada en la periferia del tumor que en la región central, lo que provoca la salida del fluido intersticial, impidiendo que el fármaco alcance el centro del tumor [81]. Por lo tanto, como se muestra en la Figura 1.24, el efecto EPR facilita la distribución pasiva de los nanosistemas y facilita su distribución gracias a factores como la vasculatura anormal, la temperatura, el pH, la carga superficial de las células tumorales [84].

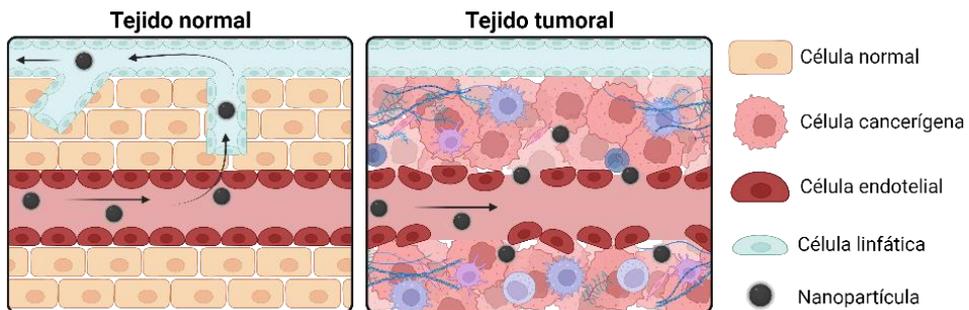


Figura 1.24 Diferencia en la formación de vasos sanguíneos en un tejido normal y uno tumoral. Adaptada de Zhang et al. [84]

Los sistemas nanoparticulados pueden optimizar el proceso de extravasación si cumplen con ciertos criterios: deben tener (i) un tamaño entre 70 y 200 nm, debe ser menor de 400 nm para poder extravasar a través de las fenestraciones tumorales y mayor de 30 nm para evitar la filtración renal; (ii) una carga neutra o aniónica, para evitar la eliminación renal; y (iii) una forma alargada, ya que se ha demostrado que formas esféricas dificultan la extravasación y se difunden más profundamente en las masas tumorales. No obstante, la entrega pasiva se ve limitada por el tumor a tratar y por la posible resistencia a múltiples fármacos (MDR) si los nanosistemas se acumulan durante largos periodos de tiempo.

El problema del mecanismo pasivo radica en la insuficiente acumulación de nanosistemas para lograr una acción terapéutica eficaz, ya que menos del 0.7 % se acumulan en los tumores. Por ello, se han diseñado mecanismos para **dirigir**

activamente los nanosistemas hacía las células cancerosas, funcionalizándolos con agentes dirigidos (genes, anticuerpos, polímeros, aptámeros, pequeñas moléculas o polisacáridos). Permitiendo el reconocimiento y la unión específica a la membrana de las células diana (*terapia dirigida*).

Las ventajas que presenta esta terapia son: (i) habilidad de penetrar en células o tejidos vivos, (ii) capacidad de atravesar los capilares más estrechos, (iii) mejora de la solubilidad de las sustancias anticancerígenas, (iv) ofrecen una liberación controlada, (v) reducción en la cantidad de dosis requerida, y (vi) mayor especificidad, resultando en una menor citotoxicidad para las células sanas.

5.4. Sistemas inteligentes

Los sistemas nanoportadores inteligentes son capaces de liberar su carga útil únicamente en los tejidos tumorales, al someterse a unos estímulos, que pueden ser endógenos o exógenos. En los primeros, la señal proviene del organismo, mientras que en los segundos es una señal extracorporal [85].

5.4.1. Estímulos endógenos

Como se menciona en el apartado 2, las células cancerígenas tienen unas capacidades adquiridas, que las diferencian de las células normales. Una de esas capacidades es la reprogramación del metabolismo energético, esto significa que las células tumorales realizan una glucólisis aeróbica. Este efecto, denominado efecto Warburg implica una mayor concentración de ácido láctico, que, junto con la hipoxia y el flujo sanguíneo deficiente, provoca que se acumulen iones de hidrógeno en el intersticio del tumor [7]. Por tanto, el ambiente tumoral está acidificado, su pH está entre 5.6 y 6.8, mientras que en condiciones normales el pH es de 7.4, aproximadamente. Hay que tener en cuenta, que incluso en tejidos sanos hay diferentes valores de pH dentro de la célula, ya que el lisosoma presenta un pH de 5 y en el citosol de 7.2. Además, otro efecto de esta glucólisis es el aumento de la temperatura en el tejido, desde los 37 °C hasta los 40–42 °C [85–86].

Por otro lado, debido a su hipermetabolismo, las células cancerígenas exhiben niveles aumentados de ROS, y ante este estrés oxidativo, las células se protegen a sí mismas aumentando los niveles de glutatión sulfhidrilo (GSH). Estos niveles son 4 veces más altos que en las células normales y mil veces mayor que en el torrente sanguíneo [85; 87].

Finalmente, en el entorno tumoral extracelular hay algunas enzimas que se sobreexpresan, tales como *metaloproteinasas*, *proteasas*, *fosfolipasas* y *glucosidasas*. Esta sobreexpresión enzimática desempeña un papel fundamental en la dinámica del entorno tumoral, contribuyendo a procesos clave como la invasión tisular, la angiogénesis y la remodelación de la matriz extracelular [85]. Sin embargo, es esencial destacar que, a pesar de estas sobreexpresiones en el entorno extracelular, las concentraciones enzimáticas dentro de las células cancerosas y normales pueden ser comparables. Este hecho resalta la complejidad de diseñar sistemas nanoportadores que respondan de manera específica al entorno tumoral extracelular sin afectar negativamente a las células sanas [85; 87].

En este sentido, los DDS pueden responder a diversos estímulos endógenos si son sensibles a diferentes condiciones ambientales y biológicas [85]:

- ↳ **Variaciones de pH**, esta sensibilidad se puede lograr mediante la incorporación de grupos químicos ionizables de ácidos débiles o básicos (como aminas, ácido fosfórico, grupos carboxilo, entre otros) en los DDS.
- ↳ **Cambios de temperatura**, para esta estrategia suelen utilizarse liposomas, o agregarse compuestos sensibles a la temperatura.
- ↳ **Reacciones redox**, por ejemplo, el GSH es capaz de degradar los enlaces disulfuros, por lo que es común utilizar estos enlaces en la formación de nuevos sistemas nanométricos.
- ↳ **Modificaciones enzimáticas**, mediante la creación de sistemas que sean sensibles a la acción biocatalítica, utilizando liposomas.

5.4.2. Estímulos exógenos

Los estímulos exógenos más utilizados son los campos magnéticos y eléctricos, la irradiación de luz y los ultrasonidos [85].

Es posible aplicar campos magnéticos o eléctricos extracorpóreos para acumular DDS en los tumores, después de la inyección de nanoportadores. Para dotar de sensibilidad magnética a los DDS, se emplean materiales como sílice, polímeros u óxido de hierro superparamagnético Fe_3O_4 (SPION); mientras que, para lograr que sean sensibles a la corriente eléctrica, es necesario incorporar polímeros electroactivos [85; 88].

La irradiación de luz más común es la ultravioleta (UV), para lo que se suelen añadir espiropiranos y acábensenos a los nanosistemas. Sin embargo, tienen como limitaciones: una mala penetración en los tejidos y efectos nocivos en los tejidos normales. Por esta razón, el enfoque está cambiando hacia el desarrollo de DDS sensibles a la luz visible o del infrarrojo cercano (NIR) [85; 88].

El estímulo de ultrasonido está aún en desarrollo, ya que no requiere procedimientos invasivos, permite una penetración profunda y no es ionizante [85; 88].

Tras abordar la problemática del CCR junto con sus tratamientos actuales, y de proporcionar una visión de la actualidad de los DDS, resulta fundamental explorar nuevas perspectivas y avances en el diseño de sistema de administración de medicamentos. En este sentido, la atención se centrará en tres sistemas prometedores que serán objeto de estudio en el desarrollo de esta tesis doctoral: **ciclodextrinas**, **exosomas** e **hidrogeles**. Para ello, se comenzará con una explicación detallada de estos sistemas, continuando con la exposición del estado de arte de cada uno de ellos, focalizándolo especialmente a su aplicación como tratamiento anticancerígeno.

6. Las ciclodextrinas

En 1891, Villers, un farmacéutico y químico francés, descubrió las ciclodextrinas (CD), un grupo de oligosacáridos cíclicos compuestos por monómeros de glucosa (de α -D-glucopiranososa) unidos por enlaces α (1-4) que forman un anillo.

Las CD son sustancias cristalinas, homogéneas y no higroscópicas, que se producen a partir de la degradación del almidón, o derivados del mismo y existen 3 tipos: α -, β - o γ -, cada una de las cuales tiene, respectivamente, seis, siete y ocho subunidades de glucosa. En la Tabla 1.5 se muestran las propiedades fisicoquímicas de las 3 principales ciclodextrinas [89].

Tabla 1.5 Propiedades fisicoquímicas de las tres principales ciclodextrinas [89]

Propiedad	α -CD	β -CD	γ -CD	
Nombre químico	Ciclohexa-amilosa	Ciclohepta-amilosa	Cicloocta-amilosa	
Número de glucosas	6	7	8	
Formula química	C ₃₆ H ₆₀ O ₃₀	C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅	C ₄₈ H ₈₀ O ₄₀	
Peso molecular (g/mol)	972	1135	1297	
Solubilidad en agua a 25 °C (g/100 mL)	14.5	1.85	23.2	
Dimensiones aprox. (nm)	Altura	0.78	0.78	
	Diámetro interno	0.47 – 0.53	0.60 – 0.65	0.75 – 0.83
	Diámetro externo	1.46	1.52	1.75
Volumen de la cavidad interna (nm ³)	0.174	0.262	0.427	

6.1. Estructuras de las ciclodextrinas

Debido a la disposición esférica que forman las unidades de glucosa, las CD adoptan la forma de un cono truncado. Su pared exterior es hidrofílica, debido a la presencia de grupos hidroxilo, mientras que su pared interior, menos hidrófila, forma una cavidad hueca con afinidad apolar. Esto se debe a que los grupos

hidroxilos (OH) están en los bordes de la cavidad, cuyo interior está formado por los átomos de oxígeno y de hidrógeno anoméricos de los carbonos [90].

La existencia de esta cavidad ha impulsado la investigación de las CD tanto por la bioactividad inherente de las CD vacías, que poseen beneficios potenciales para la salud, como por sus propiedades de complejación, puesto que las CD son solubles en disolventes acuosos y tienen la capacidad de albergar moléculas huésped de carácter hidrófobo.

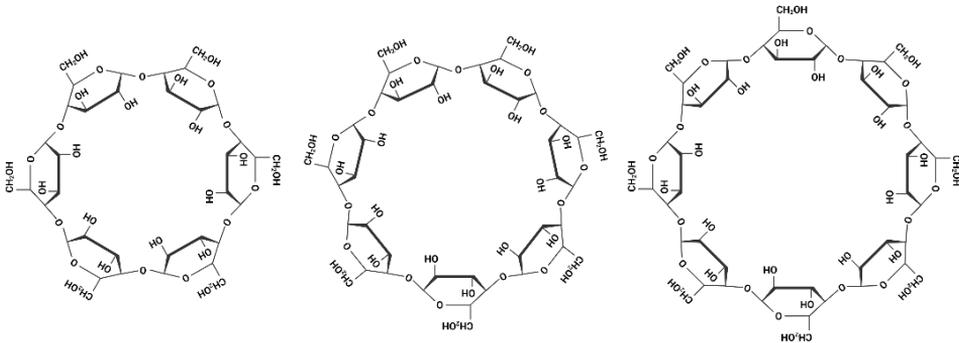


Figura 1.25 Estructuras químicas de las tres ciclodextrinas principales (de izquierda a derecha α -CD, β -CD y γ -CD). Adaptado de Wüpper et al. [91]

6.2. Formación de los complejos con ciclodextrinas

Uno de los principales desafíos en el tratamiento quimioterapéutico es la baja solubilidad acuosa de los fármacos contra el cáncer, ya que se estima que el 40% de los medicamentos aprobados, y entre el 70% y el 90% de los que están en desarrollo, tienen baja solubilidad, baja permeabilidad, metabolismo rápido y una baja tolerancia y seguridad a la hora de ser eliminado del cuerpo [92]. El problema es que para lograr la respuesta farmacológica deseada y actuar en el sitio de acción (biodisponible) en la concentración requerida, los medicamentos deben estar solubilizados en la circulación sistémica [93].

Una de las posibles soluciones es utilizar agentes solubilizantes. Sin embargo, dichos agentes suelen provocar efectos secundarios graves [93]. Dado que los tres CD principales son “generalmente reconocidos como seguros” (GRAS) por la

FDA de EE. UU. como aditivo alimentario, otra solución es el uso de ciclodextrinas [91; 94].

Las ciclodextrinas tienen la capacidad de formar complejos con sustancias hidrófobas, mejorando las propiedades fisicoquímicas de dichas sustancias y, por lo tanto, sus parámetros ADME. A su vez, este proceso optimiza sus propiedades farmacológicas e incrementa la precisión en la orientación de diferentes tipos de nuevos tratamientos contra el cáncer. En otras palabras, la formación de complejos con los fármacos mejora significativamente sus propiedades fisicoquímicas, farmacodinámicas y farmacocinéticas [91; 94].

La capacidad de una CD para formar un complejo de inclusión con una molécula depende de los factores estéricos (tamaño y grupos funcionales de la molécula) y termodinámicos (interacción termodinámica entre la ciclodextrina, la molécula y el solvente). Y en función de todo ello, el ratio de la ciclodextrina con la sustancia (CD:SUST) será diferente, como se esquematiza en la Figura 1.26.

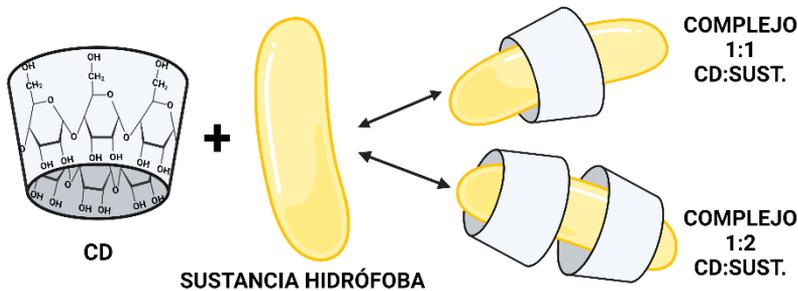


Figura 1.26 Formación de complejos de inclusión de las ciclodextrinas con sustancias hidrofóbicas. Fuente: elaboración propia

La constante de equilibrio (K) es una medida del grado en que una reacción química alcanza el equilibrio. En el contexto de las ciclodextrinas, la constante de equilibrio se usa para describir la formación y estabilidad de los complejos de inclusión entre las ciclodextrinas y las moléculas que albergan. La relación entre las concentraciones del complejo de inclusión (CDMH), las ciclodextrinas no complejadas (CD) y las moléculas huésped (MH), se expresa a través de esta

constante, ofreciendo una descripción cuantitativa del equilibrio de la reacción. Y se puede expresar matemáticamente como [95]:

$$K = \frac{[]_{CDMH}}{[]_{CD} \cdot []_{MH}}$$

Ecuación 1. Cálculo de la constante de equilibrio entre ciclodextrinas y moléculas huésped

La constante de equilibrio es específica de una molécula huésped particular y del tipo de ciclodextrina. Su valor depende de factores como el tamaño, la forma y la polaridad de la molécula, así como del tipo y tamaño de la ciclodextrina. También puede verse influenciado por la temperatura y otras condiciones ambientales [95].

Esta constante se puede determinar mediante la solubilidad acuosa, la reactividad química, la absorbancia molar, propiedades ópticas como la dispersión de rotación óptica, medidas de solubilidad de fases, cambios químicos de resonancia magnética nuclear, de métodos pH-métricos, titulación calorimétrica, depresión de punto de congelación o tiempos de retención cromatográfica en cromatografía líquida [95].

Una K baja indica una complejación débil, mientras que una K alta indica una mayor afinidad entre la ciclodextrina y la molécula huésped, lo que sugiere una complejación más fuerte. La constante de equilibrio proporciona información sobre la termodinámica y la estabilidad de la formación del complejo de inclusión y, a menudo, se usa para evaluar y comparar la eficiencia de las ciclodextrinas como moléculas huésped en diversas aplicaciones [95].

La unión de moléculas dentro de la ciclodextrina no es fija ni permanente, sino que es un equilibrio dinámico. La fuerza de esta unión depende de qué tan bien se ajuste en las moléculas y de las interacciones locales específicas entre los átomos de la superficie a la hora de ser formados, ya sea en solución o en estado cristalino, a través de ajustes conformacionales. Las interacciones dentro de la

cavidad son débiles, dado que se trata de fuerzas no covalentes (fuerza de Van der Waals, enlaces de hidrógeno y fuerzas hidrofóbicas). Además, en los extremos hidrófilos de las CD pueden darse interacciones electrostáticas, formando enlaces de hidrógeno con los grupos hidroxilo en ambos lados de la molécula huésped, mejorando aún más sus propiedades [95].

La estabilidad de un complejo de ciclodextrina, en términos de termodinámica, se puede evaluar mediante parámetros termodinámicos como el cambio de energía libre de Gibbs (ΔG), el cambio de entalpía (ΔH) y el cambio de entropía (ΔS). Estos parámetros proporcionan información sobre la energía y la espontaneidad del proceso de complejación. A la hora de llevar a cabo la reacción de inclusión, el agua es el disolvente más utilizado para realizar la complejación. Ya que, cuanto más soluble sea la ciclodextrina en el solvente, más moléculas estarán disponibles para la complejación [89].

6.3. Las ciclodextrinas en tratamientos anticancerígenos

Por todo ello, las ciclodextrinas pueden ser usadas en diversas áreas, como, por ejemplo, la industria alimentaria, industria textil o producción de cosméticos y fármacos. En concreto, en el campo de la oncología, se ha investigado el uso de ciclodextrinas para mejorar la administración de fármacos anticancerígenos, como los ejemplos que se muestran en la Tabla 1.6 [96; 97].

Tabla 1.6 Ejemplos de complejos ciclodextrina con fármacos anticancerígenos [97]

<i>Fármaco</i>	<i>Ciclodextrina</i>	<i>Ref.</i>
<i>Escutelarina</i>	α , β , γ y HP- β	[98]
<i>Anhidrolicorina</i>	β , γ y HP- β	[99]
<i>Epotilona A</i>	β , γ y HP- β	[100]
<i>Rapamicina</i>	β , HP- β y Metil- β	[101]
<i>Amodiaquina</i>	β	[102]
<i>Doxorrubicina</i>	β y γ	[103]
<i>Curcumina</i>	β	[104]
<i>Paclitaxel</i>	β	[105]

En resumen, aunque los resultados *in vitro* son prometedores, aún se requiere más investigación, ya que no se han superado las fases de prueba para utilizarlos en clínica como tratamientos anticancerígenos.

7. Exosomas como vehículos de fármacos

Como se menciona en el punto 5, la nanotecnología se está empleando para mejorar la actividad terapéutica de los fármacos y los nanosistemas son una plataforma prometedora para ello. Sin embargo, Wilhelm *et al.* descubrieron que solo el 0.7 % de los nanosistemas administrados por vía intravenosa llegaba a un tumor sólido [106]. Hay tres puntos clave a considerar para la biodistribución de los nanosistemas: (i) hemólisis, (ii) trombogenicidad y (iii) activación del complemento. Cuando las partículas se administran por vía parenteral e ingresan al torrente sanguíneo, son capaces de atraer biomoléculas presentes en los fluidos biológicos, lo que provoca la formación de una corona de proteínas que llama la atención del sistema inmune.

Para preservar la integridad de los nanosistemas en el entorno biológico, asegurando una buena circulación en la sangre y su entrega al sitio de destino, es fundamental que no sean tóxicos para los componentes de las células sanguíneas y que sean "invisibles" para las células inmunitarias que pueden eliminarlos de la circulación. En este contexto, se está investigando el uso de algunos compuestos que ya están presentes en el cuerpo humano como nanosistemas [107 – 108].

Prácticamente todas las células humanas son capaces de secretar diversos tipos de vesículas extracelulares (EV), los cuales están formados por una bicapa lipídica y son liberadas de los compartimentos endosómicos o desprendidas de la superficie celular. Hay diferentes tipos de EV y sus características se describen en la Tabla 1.7 [109 – 110].

Tabla 1.7 Clasificación de las vesículas extracelulares y sus características [109 – 110]

	Exosomas	Micro vesículas	Cuerpos apoptóticos
Origen	Cuerpos multivesiculares	Membrana plasmática	Muerte celular por apoptosis
Tamaño	< 200 nm	200 nm - 1 µm	1 – 5 µm
Velocidad de sedimentación	1 · 10 ⁵ g	1 · 10 ⁴ g	1.2 · 10 ³ g
Morfología	Forma redonda	Forma irregular y heterogénea	Heterogénea
Composición proteica	Tetraspaninas, Alix t TSG101	Integrinas, selectinas y CD40	Histonas
Composición lipídica	Colesterol, ceramida, esfingomiolina, PA, PC, PS, PE y PI *	PC	Indeterminado

* Ácido fosfatídico (PA), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilinositoles (PI)

Los exosomas son particularmente importantes porque circulan en los biofluidos y son utilizados por las células para comunicarse, pudiendo albergar en su interior diversas moléculas (lípidos, proteínas, ADN, ARNm, ARN no codificante y metabolitos). Estos compuestos fueron descritos por Trams *et al.* en 1981 como vesículas procedentes de la exfoliación de la membrana plasmática celular capaces de fusionarse con otras células, liberando su contenido al espacio extracelular. Esta fusión se produce preferentemente en condiciones ácidas, lo que implica que las células tumorales pueden tener una mejor captación que las normales [108; 111 – 112].

Aunque no se conoce la composición completa de los exosomas, se sabe que toda su estructura depende de la célula de la que proceden, ya que su formación se inicia con una invaginación de la propia membrana (Figura 1.27). Lo que dará lugar a un endosoma temprano, que madurará formando un endosoma tardío. Finalmente, la agrupación de endosomas constituirá cuerpos multivesiculares

(MVBs) que se transportan a la periferia de la célula para fusionarse con la membrana plasmática y liberar todo su contenido al exterior [108; 113].

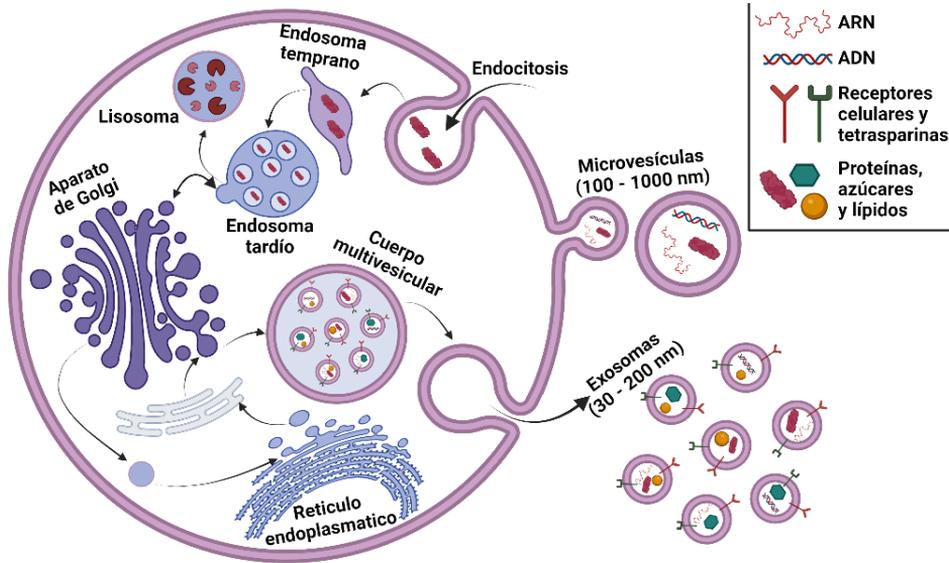


Figura 1.27 Proceso de biogénesis de los exosomas. Fuente: Adaptado de Zhou et al. [113]

Tras la liberación de exosomas por la célula donante, estos viajan por el torrente sanguíneo hasta el destino final, el cual está determinado por moléculas de superficie (tetrasparinas, integrinas, proteoglicanos y lectinas) [114]. La principal función de los exosomas es servir como vectores naturales de moléculas de señalización, pudiendo modificar el metabolismo y las funciones de la célula diana a través de la información que transporta [115].

7.1. Exosomas como vectores de terapia

Los exosomas se encuentran presentes en todos los fluidos biológicos (sangre, orina, leche materna, saliva, semen o bilis) y aunque no se especifica el propósito por el cual las células secretan exosomas, se sabe que las células los utilizan, entre otras cosas, como una forma de comunicación intercelular, transportando información desde la célula de origen a la célula receptora. Además, se ha comprobado que los exosomas tienen atracción por células homotípicas de las que

son secretadas y son capaces de atravesar las barreras biológicas, como la hematoencefálica y la membrana plasmática. Estas características hacen que los exosomas sean vehículos ideales para moléculas terapéuticas y diagnósticas, permitiendo el transporte selectivo de sustancias hacia ciertas células localizadas en áreas del organismo de difícil acceso, como al sistema nervioso central y, en particular, al cerebro [116].

La importancia de los exosomas se resume en 8 puntos clave: (i) están naturalmente presentes en los fluidos corporales; (ii) poseen un tamaño pequeño y una carga ligeramente negativa en la superficie; (iii) mantienen buena estabilidad en condiciones fisiológicas; (iv) presentan baja inmunogenicidad y toxicidad; (v) pueden transportar moléculas gracias a su estructura, ya que tienen un citosol acuoso rodeado por una membrana lipídica, similar al de las células; (vi) tienen la capacidad de entregar su contenido a las células diana de forma selectiva y específica gracias a las proteínas y lípidos presentes en su membrana, que actúan como huella digital; (vii) cuentan con una capacidad intrínseca para atravesar barreras biológicas, incluyendo la barrera hematoencefálica y el tracto gastrointestinal; y (viii) pueden almacenarse y conservarse durante largos periodos de tiempo [111 – 112; 117].

En resumen, la capacidad versátil de los exosomas como portadores naturales de moléculas los posiciona con un potencial significativo en la investigación y avance de tratamientos para diversas enfermedades, incluyendo el cáncer.

7.2. Exosomas y su papel en terapias anticancerígenas

Los exosomas desempeñan un papel importante en la regulación del microambiente tumoral y en la progresión de la enfermedad. Pero su influencia se extiende, también, a la proliferación, migración e invasión de las células

cancerosas, así como en la promoción de la angiogénesis y la supresión del sistema inmunológico.

Un aspecto destacado, es su capacidad para contribuir a la resistencia a los tratamientos convencionales del cáncer, como la quimioterapia y la radioterapia, mediante la transferencia de moléculas que promueven la supervivencia y la resistencia de las células tumorales. Dado su capacidad para circular por el torrente sanguíneo y alcanzar diferentes órganos y tejidos, se han explorado los exosomas como vehículos de entrega de fármacos para el tratamiento del cáncer.

Los exosomas modificados pueden ser cargados selectivamente con fármacos anticancerígenos y dirigidos a las células tumorales específicas, lo que podría mejorar la eficacia terapéutica y reducir los efectos secundarios asociados con los tratamientos convencionales. En la Tabla 1.8 se muestran algunos ejemplos de exosomas utilizados en terapias anticancerígenas, indicando la fuente de la que proceden dichos exosomas, el tipo de estudio que se ha llevado a cabo con ellos, la terapia que se investigó (exosomas libres o cargados con fármacos), el tumor en el que se ha estudiado y sus principales resultados [118].

No obstante, la implementación de exosomas como vehículos terapéuticos presenta desafíos, como la falta de métodos estandarizados para el aislamiento y la carga eficiente de fármacos, así como el desconocimiento sobre su interacción con el sistema inmunológico y sus efectos en la progresión tumoral. Superar estos obstáculos requerirá una investigación exhaustiva para optimizar los procesos de aislamiento y carga, así como comprender mejor su biología y diseñar enfoques que minimicen los riesgos potenciales. A pesar de los desafíos, el potencial terapéutico de los exosomas ofrece una alternativa para lograr tratamientos más específicos y efectivos en la lucha contra el cáncer.

Tabla 1.8 Ejemplos de terapias anticancerígenas con exosomas en estudio

Fuente	Estudio	Terapia	Tumor	Resultados del estudio	Ref.
Macrófagos (RAW 264.7)	<i>In Vivo</i>	PTX/DOX	Pulmón	Los exosomas cargados se acumulaban en células cancerosas	[119]
Derivados de la ascitis (AEX)	Ensayo clínico	GM-CSF	Colorrectal	El tratamiento fue seguro, no tóxico, tolerable e indujo una respuesta inmune antitumoral específica para el tumor	[120]
Células dendríticas (DC-Exo)	Ensayo clínico	MHC péptidos Clase II	Melanoma	Se logró una producción de exosomas a gran escala, y su administración resultó segura y bien tolerada	[121]
Células dendríticas (DC-Exo)	Ensayo clínico	MAGE (antígenos tumorales)	Pulmón	Terapia bien tolerada, enfermedad estable a largo plazo y activación de efectores inmunitarios	[122]
Células dendríticas (DC-Exo)	<i>In Vivo</i>	IL-4 + GM-CSF	Mama	Erradicación/supresión del crecimiento de tumores preestablecidos de manera dependiente de células T	[123]
Células dendríticas (DC-Exo)	<i>In Vivo</i>	MHC Clase I	Melanoma	MHC Clase I restringió la expansión y diferenciación de células T CD8+	[124]
Células dendríticas (DC-Exo)	<i>In Vivo</i>	CpG	Melanoma	La combinación de exosomas y TLR 3+9 desencadenó respuestas eficientes de células T CD8+ restringidas por MHC	[125]
Células dendríticas (DC-Exo)	<i>In Vivo</i>	DC-Exo	Melanoma	DC-Exo promovió la proliferación y activación de células NK, lo que resultó en efectos antimetastásicos	[126]
Células dendríticas (DC-Exo)	<i>In Vitro</i>	DC-Exo	Mama	La incorporación de exosomas aumentó la capacidad de activar las células T para una respuesta más eficaz	[127]
Células endoteliales cerebrales	<i>In Vivo</i>	Rodamina 123, PTX, DOX	Cerebral	La administración de exosomas permitió que DOX y PTX cruzaran la BBB, causando toxicidad para las células cancerígenas	[128]

8. Hidrogeles

Los hidrogeles son estructuras 3D en red, formadas por polímeros hidrofílicos capaces de retener una gran cantidad de agua y sus propiedades son similares a las de la matriz extracelular de los tejidos vivos [129 – 131]. Dependiendo del tipo de entrecruzamiento, se clasifican en entrecruzamiento químico o físico, siendo el segundo método más biocompatible, ya que el proceso químico puede dejar residuos que generan problemas de compatibilidad [129; 132]. Además, según sus propiedades físicas pueden ser geles convencionales, preformados o inteligentes, los cuales responden a disparadores externos cambiando su estructura de solución a gel bajo condiciones fisiológicas. Esta característica permite agregar el compuesto terapéutico a un hidrogel líquido, que se inyectará y luego se solidificará en el sitio de aplicación y liberará el fármaco con el tiempo [132 – 134].

Estos materiales fueron aplicados biológicamente por primera vez por Wichterle y Lim en 1960 y, en las últimas décadas, han ganado una gran popularidad en el campo de la medicina. Esta popularidad se puede atribuir a seis propiedades ventajosas que se enumeran en la Figura 1.28 [134].



Figura 1.28 Ventajas de los hidrogeles. Fuente: elaboración propia

Todas esas características de los hidrogeles los consolidan como elementos prometedores en el desarrollo de terapias para combatir diversas enfermedades.

8.1. Hidrogeles como DDS

Como se ha mencionado a lo largo del capítulo, los tratamientos actuales para combatir el cáncer no están siendo lo suficientemente eficaces. La cirugía es el principal método para eliminar los tumores sólidos y ha mejorado notablemente a lo largo de los años. Sin embargo, es habitual que tras la operación queden células madre o tumorales residuales en los márgenes quirúrgicos. Este hecho aumenta el riesgo de recurrencia y metástasis del cáncer, por lo que se asocia con una supervivencia general deficiente. Con el fin de reducir esas recaídas, o en caso de tumores irresecables, se recurre a terapias adyuvantes, aunque suelen ser agresivas y poco eficaces [129].

Para minimizar esos inconvenientes, se están desarrollando DDS locales capaces de liberar altas concentraciones de fármacos directamente en el tumor. Una gran ventaja de estos sistemas es que pueden comenzar a actuar tras la operación quirúrgica, mientras que el resto de los tratamientos suelen comenzar semanas después, facilitando que las células residuales puedan proliferar [129].

Estos sistemas están disponibles en diferentes formas físicas [129; 133 – 134] y, por ahora, el implante local de mayor éxito es Gliadel®, una oblea biodegradable cargada de carmustina que fue aprobada por la FDA en 1996 [132]. A pesar de que existen ejemplos de estos sistemas en tratamientos anticancerígenos con buenos resultados en ensayos clínicos, la mayoría de ellos no son completamente biodegradables, requiriendo cirugía para retirarlos después del tratamiento [129; 133 – 134].

Desde un punto de vista fisicoquímico, los hidrogeles están atrayendo la atención de las investigaciones, ya que son los más interesantes porque son semejantes a tejidos y matrices extracelulares [132].

Los hidrogeles inteligentes son una excelente opción para usar como sistemas de administración local después de la resección del tumor, ya que permiten una aplicación uniforme que se adapta a la forma irregular de la cavidad posquirúrgica, con mínima invasividad y un proceso de gelificación leve, lo que permite una liberación y degradación prolongadas. Presentan numerosas ventajas para su uso como sistemas de liberación controlada para prevenir la regeneración tumoral: (i) aplicación sencilla y mínimamente invasiva, (ii) buena adaptabilidad a superficies irregulares, (iii) fácil incorporación del fármaco al sistema, (iv) aplicación controlada y liberación sostenida del fármaco en el tejido diana, (v) mayor eficacia del fármaco, (vi) reducción de la frecuencia de dosificación y toxicidad del fármaco, (vii) protección del fármaco frente a cambios en las condiciones ambientales, (viii) mayor biodisponibilidad y tiempo de residencia del fármaco, y (ix) no inducen una respuesta inmunitaria [131 – 132; 134].

Los hidrogeles inteligentes que responden a la temperatura, conocidos como *termosensibles*, resultan interesantes debido a que su proceso de gelificación se puede realizar en condiciones homogéneas a las del cuerpo humano [129; 132]. Existen numerosos estudios de geles termosensibles para tratamientos anticancerígenos: Li *et al.* prepararon un hidrogel a base de poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) cargado con 5-fluororacilo [135], mientras que Liu *et al.* prepararon también un hidrogel a base de PNIPAM pero lo cargaron con doxorubicina [136]; Soo Gil *et al.* cargaron poli(etilenglicol)–poli(β -aminoéster uretano) (PEG-PAEU) con cisplatino para su liberación [137]; Han *et al.* Desarrollaron geles termosensibles autorreparables con quitosano (CS) reticulado con polietilenglicol funcionalizado con dialdehído (DF-PEG) y β -glicerofosfato (GP), capaz de liberar doxorubicina; y Wu *et al.* prepararon micelas poliméricas con cisplatino y las cargaron con Paclitaxel [138]. En todos estos estudios se obtuvieron resultados interesantes en cuanto a la temperatura de liberación y gelificación. Sin embargo, todos ellos tienen las mismas limitaciones en común: el

proceso de preparación del gel era largo, ya que había que utilizar muchos compuestos orgánicos y disolventes (como tetrahidrofurano, éter dietílico o 2-propanol), así como procesos de purificación de diálisis, evaporación y liofilización.

8.2. Hidrogeles para simulación de tumores

Otro potencial de los hidrogeles es su aplicación en la simulación de tumores, con el fin de proporcionar entornos *in vitro* que mimeticen las complejidades físicas y químicas de los tejidos tumorales. Ya que para combatir el cáncer es necesario mejorar los métodos de detección y los tratamientos utilizados en la clínica, así como mejorar los ensayos previos para estudiar nuevos fármacos. Este enfoque innovador busca avanzar en la comprensión de las interacciones entre fármacos y tumores.

En la evaluación de la toxicidad de los tratamientos, el primer paso es estudiar su efecto en cultivos celulares. Existen diferentes formas de realizar un cultivo en función del fin que se pretende, los más habituales son los bidimensionales (2D) y los esferoides tridimensionales (3D), que a su vez pueden contener una sola línea (monocultivo) o mezcla de líneas (cocultivo) [139]. Estos tipos de cultivos se representan en la Figura 1.29.

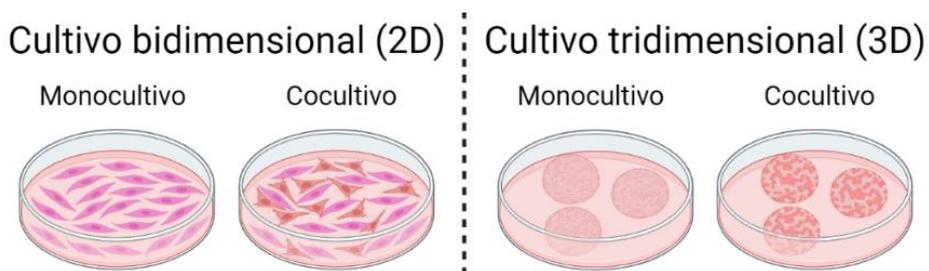


Figura 1.29 Tipos de cultivos celulares

Los modelos 2D son más simples, no obstante, los tridimensionales ofrecen una representación más precisa del microambiente tumoral, especialmente cuando se trata de una combinación de líneas celulares [139].

Para trabajar con cultivos 3D hay que tomar decisiones cruciales sobre la configuración de la estructura, asegurando que las células reproduzcan fielmente las características del tumor. En primer lugar, es necesario estudiar los diferentes parámetros que deben cumplir dichas estructuras, ya que, al igual que las células cancerígenas muestran diferencias en el metabolismo y en las vías de señalización, respecto a las células normales, también poseen diferentes propiedades físicas. Tal es el caso de la elasticidad celular, la cual indica la capacidad de la célula para deformarse en respuesta a la tensión externa. Las células cancerígenas han demostrado ser más elásticas que las células normales, lo que se corresponde con un *módulo de Young (E)* más bajo. Sin embargo, el grado de alteración en la elasticidad celular difiere según el tipo de célula cancerosa, como estudiaron Fu-Shi Quan *et al.* Por ello, en la Tabla 1.9 se muestran algunos ejemplos [140 – 146].

Tabla 1.9 Ejemplos del módulo de Young de diferentes líneas celulares

Línea celular	Tipo de línea	Módulo de Young (kPa)	
Colón	HCT-116	Cancerígena	2 – 3.5
	HCT-116	Cancerígena	6.3 – 7.1
	HT-29	Cancerígena	0.3 ± 0.1
	HT-29	Cancerígena	4
Hígado	HepG2	Cancerígena	0.19 – 0.95
Mama	184A	Normal	2.26 ± 0.56
	MCF-10A	Normal	0.2 – 0.9
	T47D	Cancerígena	1.20 ± 0.28
	MCF-7	Cancerígena	1.24 ± 0.46
	MCF-7	Cancerígena	0.1 – 0.8

En conclusión, el desarrollo de hidrogeles para simulación de tumores en cultivos tridimensionales implica estudios reológicos que determinen las

propiedades mecánicas de estos hidrogeles, con el fin de garantizar la fidelidad del modelo a las características de células cancerosas.

9. Consideraciones finales

En este primer capítulo, se han descrito los conceptos fundamentales del cáncer, para entender la importancia de su estudio. Se ha abordado de forma específica el cáncer colorrectal, explicando las estrategias actuales utilizadas en la batalla contra esta enfermedad. Para ello era necesario hablar de la nanomedicina y los avances que ha supuesto en la oncología. Y finalmente, se ha centrado la atención en el estudio de tres sistemas prometedores: ciclodextrinas, exosomas e hidrogeles, que serán los abordados, como diferentes estrategias terapéuticas, a lo largo de esta tesis doctoral.

Capítulo 2

-

OBJETIVOS

El principal objetivo de esta tesis es desarrollar y validar diferentes estrategias terapéuticas para **mejorar el tratamiento actual del Cáncer Colorrectal, con el propósito de reducir los efectos secundarios de las terapias actuales y aumentar su eficacia.**

Para ello, se pretende aprovechar las diferencias en el fenotipo metabólico de células normales y cancerígenas, ya que este se ve alterado por el microambiente tumoral y las características específicas de las células cancerígenas. De este modo se plantea una **primera estrategia** que propone utilizar compuestos que actúen de forma sinérgica sobre diferentes rutas metabólicas inhibiendo la proliferación de células cancerígenas:

- ↳ **Pregnenolona (P5)**: es capaz de inhibir la acción de la enzima G6PD en la ruta pentosa fosfato (PPP), impidiendo la generación de energía necesaria para que las células cancerígenas proliferen.
- ↳ **Farnesol (FOH)**: inhibe la síntesis de fosfatidilcolina, impidiendo la formación de membranas en las nuevas células cancerígenas durante la proliferación celular.

Sin embargo, estos compuestos son hidrófobos. Para superar este desafío, se plantea mejorar la solubilidad de P5 y FOH mediante el uso de ciclodextrinas.

Con el fin de mejorar la selectividad de estos fármacos, se propone una **segunda estrategia** que consiste en mejorar la dirección de los compuestos mediante su encapsulación en exosomas.

Finalmente, se llevará a cabo una **tercera estrategia** para facilitar la administración directa de los fármacos en el tumor, a través del desarrollo de un hidrogel termosensible que sirva como terapia local.

A continuación, se presente un breve resumen de dichas estrategias, las cuales se basan en el estado del arte comentado en el capítulo anterior.

1. Primera estrategia: Actuación sinérgica sobre diferentes rutas del metabolismo de las células cancerígenas

Durante esta primera estrategia se corroborará el efecto del farnesol (FOH) y la pregnenolona (P5) como agentes inhibitorios en la proliferación de las células cancerígenas de colon. Sin embargo, debido a la hidrofobicidad de estos compuestos y con el fin de evitar el uso de disolventes orgánicos, se van a desarrollar complejos de inclusión basados en ciclodextrinas (CD) que contengan FOH o P5. Para conseguir esto, se ha desarrollado el siguiente procedimiento experimental:

- 1.1. Desarrollar y caracterizar los complejos CD – FOH y CD – P5.
- 1.2. Evaluar la toxicidad de cada uno de los compuestos mediante ensayos celulares (*in vitro*), tanto en su forma libre como en complejo con la ciclodextrina.
- 1.3. Determinar el mecanismo de acción de los compuestos, estudiando su efecto en el ciclo celular.
- 1.4. Estudiar la selectividad de los compuestos mediante ensayos *in vitro* utilizando co-cultivos.

2. Segunda estrategia: Mejora de la dirección de los compuestos mediante su encapsulación en exosomas

Buscando mejorar la selectividad, y no solo la solubilidad de sustancias hidrófobas se ha propuesto el uso de exosomas como vehículo de fármacos. Esta estrategia implica los siguientes ensayos:

- 2.1. Seleccionar el método óptimo para asilar los exosomas procedentes de diferentes cultivos celulares. Esto se llevará a cabo mediante la caracterización de los exosomas aislados por diferentes métodos.

- 2.2. Incorporar en los exosomas los compuestos Farnesol (FOH) y Pregnenolona (P5) mediante diferentes técnicas. Se compararán los diferentes resultados de encapsulación, con el fin de optimizar el proceso para conseguir una carga controlable y reproducible de los compuestos dentro de los exosomas.
- 2.3. Estudiar la toxicidad *in vitro* de los exosomas cargados con FOH y P5 mediante ensayos celulares.

3. Tercera estrategia: Desarrollo de una terapia local

Con el fin de administrar los compuestos anticancerígenos, P5 y FOH, directamente en el tumor, evitando su dispersión en el cuerpo humano, y por tanto, minimizando su acción sobre las células normales, se propone el uso de una terapia local. En este sentido una potencial aplicación es el uso de hidrogeles termosensibles que estén cargados con dichos compuestos, facilitando su liberación directa en el entorno microtumoral. Para lograrlo, se realizaron los siguientes estudios:

- 3.1. Determinar la composición idónea del hidrogel mediante pruebas reológicas con diferentes concentraciones de Pluronic F-127 (PF-127) y Goma Gellan (GG), de forma individual y combinados. El objetivo es que permita la incorporación de los fármacos en estado líquido y tenga las propiedades viscoelásticas adecuadas al estar en contacto con el cuerpo humano.
- 3.2. Investigar la biodegradabilidad de los diferentes geles formados, en función de su composición.
- 3.3. Cargar los hidrogeles con P5 y FOH, tanto en su forma libre y como en el complejo con la CD, para ello se estudiará cómo afecta su adición a la reología y a la degradación.

- 3.4. Estudiar y modelizar la cinética de liberación del P5 y FOH, para predecir los parámetros que controlan la transferencia de materia en el hidrogel.

En resumen, estas estrategias se fundamentan en el estado del arte presentado en el capítulo anterior, y buscan superar los desafíos actuales en la terapia del CCR, ofreciendo enfoques novedosos y más efectivos para mejorar los tratamientos contra esta enfermedad.

Capítulo 3

-

**FORMACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y
VALIDACIÓN DE COMPLEJOS DE
INCLUSIÓN CON CICLODEXTRINAS**

1. Introducción

Como se ha mencionado en el capítulo 1, el cáncer es una de las principales preocupaciones sociales y económicas. El principal tratamiento para el CCR es la cirugía, pudiendo ser necesario combinarla con terapia adyuvante, en cuyo caso es habitual la quimioterapia intravenosa [36]. Sin embargo, una de las características distintivas de las células cancerígenas es su capacidad para llevar a cabo una reprogramación metabólica. Como se indica en la Figura 3.1, este metabolismo anómalo de las células viene dado por alteraciones genéticas y epigenéticas, así como por el microambiente tumoral. Como resultado se da un aumento en la biosíntesis de macromoléculas, un aumento de la energía y una alteración en el balance redox [5 – 7; 43].

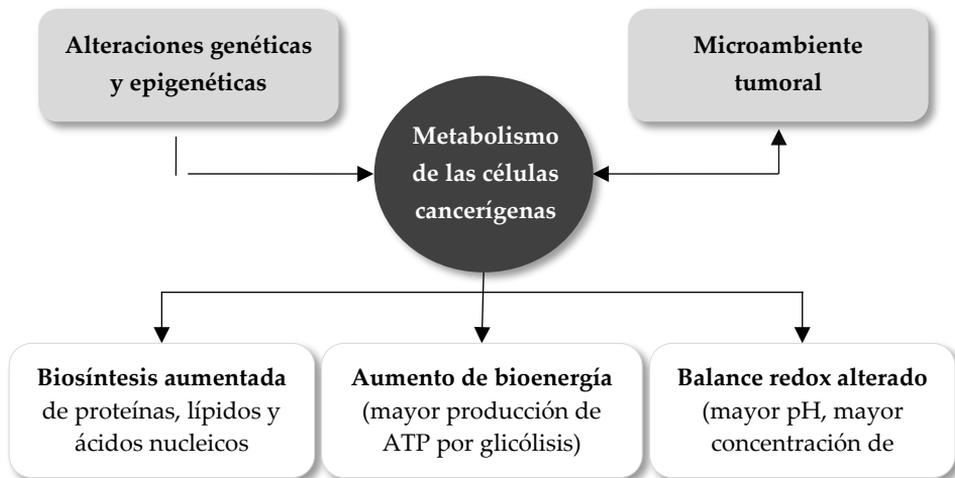


Figura 3.1 Causas y efectos del metabolismo anómalo de las células cancerígenas. Fuente: Adaptado de Cairns et al. [43]

Como resultado, las células muestran una proliferación celular más rápida, lo que puede desencadenar una resistencia a los medicamentos utilizados en la quimioterapia, tras un período de exposición. Una estrategia para afrontar esta resistencia es el uso de dos o más fármacos que actúen sinérgicamente reduciendo la viabilidad celular de formas diferentes al mismo tiempo [5 – 7].

En quimioterapia, lo más común en este tratamiento es utilizar *citotóxicos*, pero dada su acción no selectiva, tiene como principal problema los numerosos efectos secundarios [36]. Esto ha provocado un aumento del uso de *citostáticos* con acción selectiva, sin embargo, estos conllevan otros problemas, ya que suelen ser menos efectivos y requieren tratamientos más prolongados. Así pues, el desafío actual es encontrar un medicamento contra el cáncer más seguro, selectivo y efectivo [42].

En la búsqueda de fármacos, la investigación sobre esteroides está en auge, debido a sus múltiples propiedades farmacológicas, así como a su estructura molecular que les permite atravesar membranas celulares, uniéndose a los receptores nucleares y de membrana [42]. Estos compuestos son capaces de provocar una amplia respuesta biológica, lo que ha incitado a utilizar diferentes tipos de esteroides como agentes anticancerígenos. En concreto, se ha investigado la pregnenolona (P5) como agente citostático, un esteroide que se encuentra de forma natural en el organismo del ser humano. Esto se debe a su capacidad para inhibir la acción de la enzima G6PD, evitando así que las células proliferen por la ruta Pentosa Fosfato (PPP) [42; 147 – 151].

Por otro lado, ha habido un creciente interés en unos productos naturales derivados del mevalonato, denominados isoprenoides. Estos compuestos son esenciales para numerosas funciones celulares, como: la señalización celular, la síntesis de lípidos y proteínas, el mantenimiento de la integridad de la membrana, la proliferación celular, la detención del ciclo celular y la apoptosis. Esto permite que se puedan emplear en múltiples tratamientos usándose como antifúngicos, antibacterianos, antivirales, antitumorales, antiparasitarios, hipoglucemiantes, antiinflamatorios y analgésicos. Además, algunos autores han indicado que los isoprenoides con grupos hidroxilo poseen mayor actividad anticancerígena en comparación a sus homólogos con grupos hidrocarbonados. Por ello, numerosos estudios proponen inducir la apoptosis en células cancerígenas deteniendo su

ciclo celular en las fases G0 o G1 utilizando farnesol (FOH). Este isoprenoide contiene un grupo hidroxilo e inhibe la síntesis de fosfolípidos [152 – 155].

Con el objetivo de evitar la resistencia a medicamentos en el tratamiento contra el cáncer colorrectal, se propone bloquear de forma simultánea dos rutas metabólicas, utilizando P5 y FOH. Este enfoque, esquematizado en la Figura 3.2, busca impedir la proliferación de las células cancerosas al bloquear la síntesis de fosfolípidos y de nucleótidos.



Figura 3.2 Mecanismos de actuación del farnesol y la pregnenolona para impedir la proliferación celular. Fuente: elaboración propia.

A continuación, se describirá la acción de los compuestos, detallando el estado actual de la investigación sobre P5 y FOH.

1.1. Pregnenolona

La pregnenolona (P5) es un esteroide, cuya estructura química es lipófila y por ello es capaz de cruzar rápidamente la barrera hematoencefálica [147; 150]. Se trata del primer esteroide en la biosíntesis de hormonas y neuroesteroides, tras la rotura de la cadena lateral del colesterol. En función de la fase en la que se encuentre, P5 seguirá la vía Δ^4 en la que se sintetiza la progesterona y los andrógenos (fase lútea), o la vía Δ^5 en la que se sintetizan la testosterona o estrógenos (fase folicular) [42; 147 – 148].

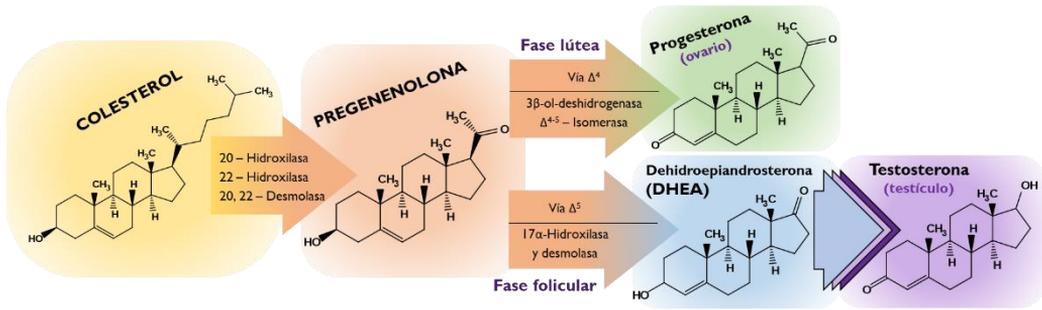


Figura 3.3 Biosíntesis de las hormonas gonadales. Fuente: elaboración propia.

Hay diversos estudios que han demostrado que P5 se puede utilizar como agente anticancerígeno en ensayos *in vitro* e *in vivo* (en mamíferos). La acción de este compuesto se explica en la Figura 3.4. La pregnenolona, en concentraciones de 10^{-6} M, es capaz de inhibir la acción de la enzima *glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa* (G6PD) en la vía pentosa fosfato (PPP) [156; 157].

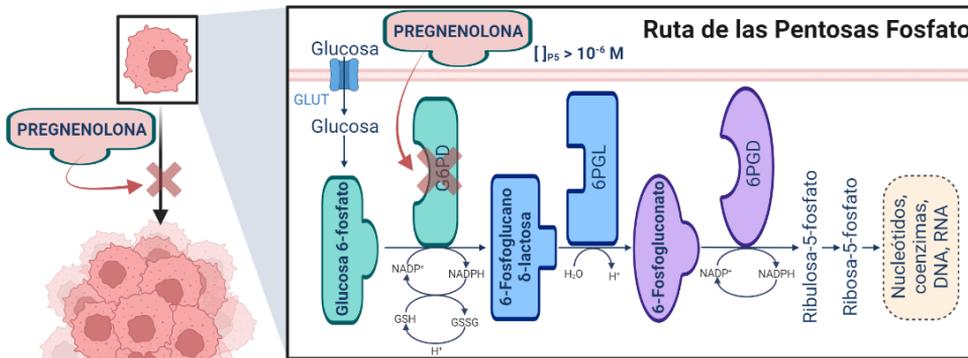


Figura 3.4 Efecto de la pregnenolona en la proliferación celular, inhibiendo la acción de la enzima G6PD en la ruta de las Pentosas Fosfato. Fuente: elaboración propia

La vía PPP es crucial en la proliferación de células cancerígenas, porque, como se mencionó en el capítulo 1, las células cancerosas realizan la glucólisis aeróbica a pesar de estar en condiciones aeróbicas, y aunque inicialmente, se creía que esto era una evidencia del daño respiratorio, en realidad refleja una reprogramación metabólica [20; 42]. Las células cancerígenas aumentan la actividad de la enzima G6PD, de esta forma consiguen producir mayores cantidades de fuentes de

carbono, permitiendo la síntesis de moléculas necesarias en el desarrollo celular, lo que desencadena un rápido crecimiento celular [158].

No hay evidencia clara de una asociación negativa entre la deficiencia de G6PD y la incidencia de cáncer, sin embargo, hay numerosas investigaciones sobre la epidemiología de esta enzima y enfermedades asociadas. En los últimos años, diferentes autores han descubierto una relación entre su actividad enzimática, la proliferación celular y el cáncer. Por lo que se cree, que una inhibición de G6PD podría bloquear la proliferación de células cancerígenas, impidiendo el crecimiento de tumores [159].

Existen numerosas investigaciones que han evaluado el impacto de la pregnenolona en la viabilidad celular a través de ensayos de MTT, obteniendo resultados significativos. Yoshida *et al.* demostraron que inhibía el crecimiento celular y que los resultados dependían de la concentración de P5, así como del tiempo del tratamiento; en este caso la viabilidad de las células cancerígenas fue del 30 % tras un tratamiento de 72 h con 100 μM de P5 [149]. Del mismo modo, Xiao *et al.* determinaron que P5 no afectaba a la viabilidad de las células de glioma en una concentración inferior a 12.5 μM , mientras que concentraciones entre 25 y 100 μM , hacían que se redujese entre el 40 y el 60% [150]. Además, Grigoryev *et al.* determinaron que la IC_{50} de P5 en las células de carcinoma hepático (HepG2) tras 48 horas era 28.97 μM , pero que no afectaba a la viabilidad de las células cancerígenas de mama (MDA-MB-231) [160]. Por el contrario, en dosis dentro de las concentraciones fisiológicas, P5 es capaz de estimular el crecimiento de las células tumorales LNCaP, la única línea celular de cáncer de próstata positiva al receptor de andrógenos, en cuyo caso es recomendable un tratamiento con nuevos inhibidores de la síntesis de andrógenos [160].

1.2. Farnesol

El farnesol (FOH) es un isoprenoide no esterol que se extrajo originalmente del árbol de *Acacia Farnese* en 1900, aunque el FOH también se genera endógenamente en las células de los mamíferos por la desfosforilación enzimática del *Pirofosfato de farnesilo (FPP)*, un catabolito de la vía de biosíntesis del colesterol, como se ve en la Figura 3.5.

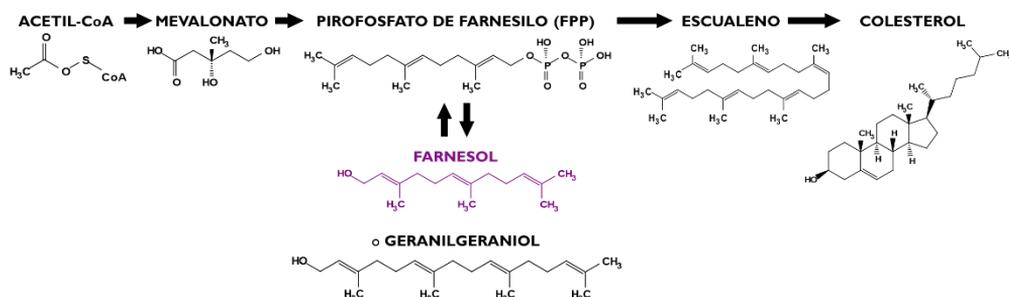


Figura 3.5 Formación de farnesol en la vía de biosíntesis del colesterol. Fuente: elaboración propia

Este compuesto se presenta en la naturaleza como un líquido incoloro, y actualmente se utiliza en la industria del perfume para enfatizar olores de los perfumes florales [152; 153; 154]. Dado que los terpenos poseen actividad anticancerígena, se está estudiando como posible agente para inhibir la proliferación celular [155].

El primer artículo en el que FOH mostró toxicidad selectiva fue publicado por Adany *et al.* en 1994 [161]. Según los autores, las células tumorales son generalmente más sensibles a la inhibición del crecimiento inducida por farnesol que las células normales. Después de 48 horas de tratamiento con FOH 10 μM , la viabilidad de las líneas celulares neoplásicas se redujo hasta en un 10 %, y cuando la dosis era 45 μM , todas las células tumorales sufrieron apoptosis [155; 161; 162].

Otros artículos han estudiado el mecanismo de acción antitumoral de FOH, sugiriendo que pueden darse por diferentes vías de señalización, tal como se muestra en la Figura 3.6 [152; 163; 164].



Figura 3.6 Vías de señalización de los diferentes mecanismos de acción antitumoral del FOH. Fuente: elaboración propia

Aunque se desconoce la influencia de estos mecanismos en la apoptosis de las células de mamíferos, varios estudios han afirmado que FOH actúa en la vía Kennedy (representada en la Figura 3.7), inhibiendo la actividad de fosfolina citidilil transferasa (CTP), lo que impide la biosíntesis de la fosfatidilcolina (PC). La PC representa el 50 % de los fosfolípidos que forman las membranas en las células de los mamíferos. La rápida proliferación de células cancerosas requiere una formación acelerada de la membrana celular, por lo que, al no permitir la formación de PC, el FOH impide que las células formen membranas celulares, y esto detiene la proliferación celular.

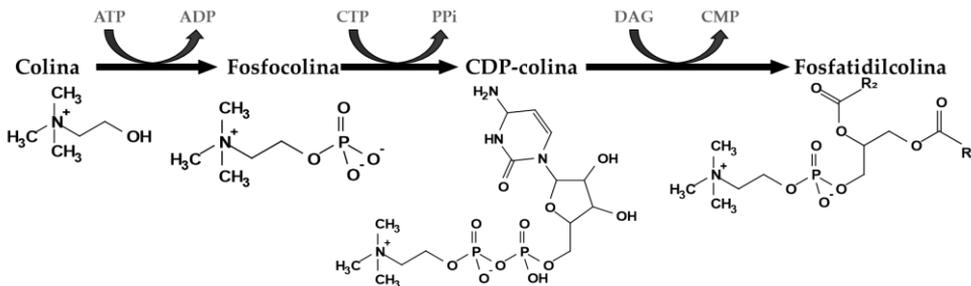


Figura 3.7 Biosíntesis de la fosfatidilcolina por la vía Kennedy. Fuente: elaboración propia.

Por otro lado, Voziyan *et al.* estudiaron el efecto de tratar con 20 μM FOH células leucémicas (CEM-C1), y concluyeron que cuando se agrega FOH, CTP se transloca rápidamente a la envoltura nuclear, lo que da como resultado la proliferación del retículo nucleoplásmico y un aumento transitorio en la actividad de CTP. Posteriormente, CTP se exporta desde el núcleo al citoplasma, interrumpiendo la síntesis de PC [165].

Hay numerosos estudios *in vitro* en los que se ha utilizado farnesol como agente anticancerígeno. A continuación, se muestra la Tabla 3.1 en la que se resumen los resultados publicados en algunos trabajos donde se utiliza farnesol. En la segunda columna aparece descrito si se utilizó una mezcla de isómeros (FOH), un isómero en concreto, o es información que no se ha reportado (N/S). Además, cuando se dispone de la información, se detalla el rango de concentraciones usado.

Tabla 3.1 Artículos que han realizado estudios *in vitro* de farnesol como anticancerígeno

Resultados de los ensayos <i>in vitro</i>	FOH utilizado	Ref.
Inhibe la proliferación de células tumorales humanas de melanoma B16, de próstata, colon, de pulmón y de leucemia.	FOH	[166]
Inhibe el crecimiento del cáncer de páncreas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> en hámsteres sin afectar a sus niveles de colesterol.	N/S	[167]
Detiene el ciclo celular (G0 / G1) en células de adenocarcinoma pancreático humano.	FOH [] = 30 ~ 90 μM	[168]
Impide la proliferación de las células de adenocarcinoma de pulmón al inhibir la síntesis de fosfatidilcolina.	N/S	[169]
Activa MEK1/2, provocando apoptosis en las células de carcinoma de pulmón humano debido a la respuesta de estrés del retículo endoplasmático.	<i>E, E</i> – FOH [] = 100 ~ 300 μM	[170]
Induce apoptosis de células leucémicas, pero no afecta a linfocitos T primarios humanos o monocitos aislados de sangre periférica.	<i>E, E</i> – FOH [] = 30 ~ 75 μM	[155]

Continuación Tabla 3.1 Artículos que han realizado estudios *in vitro* de farnesol como anticancerígeno

Resultados de los ensayos <i>in vitro</i>	FOH utilizado	Ref.
Activa la vía intrínseca de la apoptosis y la cascada ATF4-ATF3-CHOP de estrés del retículo endoplasmático en células leucemia linfoblástica T humana (Molt4).	<i>E, E</i> – FOH	[171]
Tiene efectos quimiopreventivos durante las fases de inicio y promoción de la hepatocarcinogénesis química <i>in vivo</i> (en rata).	<i>E, E</i> – FOH	[172]
Inhibe la señalización del receptor de la hormona tiroidea (THR) en células de cáncer de mama humano.	<i>E, E</i> – FOH [] = 10 ~ 30 μM	[173]
Reduciendo la proliferación y promueve la apoptosis de las células de carcinoma escamoso oral humano (OSCC), mediante la activación de caspasas, la inhibición de la proteína survivina y reduciendo la regulación del metabolismo celular.	FOH [] = 10 ~ 60 μM	[174]
Inhibe el crecimiento celular e induce la apoptosis a los meningiomas.	FOH [] = 0.4 ~ 2 μM	[175]
Inhibe el crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto de mieloma múltiple en ratones <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> mediante la modulación de la vía de señalización STAT3.	<i>E, E</i> – FOH [] = 50 ~ 100 μM	[176]
Inhibe el crecimiento celular en la línea de cáncer de próstata dependientes e independientes de andrógenos por ibandronato, mediante la inhibición de la farnesil-IPP-sintasa.	FOH [] = 50 ~ 100 μM	[177]
Aumenta la actividad de p53 inhibiendo la síntesis de proteínas por la ruta PI3k/Akt, provocando la apoptosis de las células de carcinoma de próstata DU145.	FOH [] = 10 ~ 100 μM	[178]
Inhibe la proliferación de las células de cáncer cervical HeLa, debido a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y la vía de señalización PI3K / Akt.	N/S	[179]

Un inconveniente es, que en muchos de los estudios mencionados anteriormente no se aporta información sobre cuál fue el tipo de isómero de farnesol utilizado, pero en algunos estudios si mencionan si se trata del *E, E* - FOH (*trans, trans – farnesol*) o de una mezcla de isómeros [167; 179; 180]. Este hecho es importante, porque se ha demostrado que *E, E*-FOH desestabiliza la activación transcripcional de los elementos de respuesta al receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR) conocidos como *PPAR response elements*

(PPRE), mientras que el isómero *cis, cis* - farnesol (*Z, Z* - FOH) puede permanecer inactivo [164; 181]. Sin embargo, el principal problema para usar *E, E* - FOH es su elevado coste, comparado con el precio comercial de la mezcla de isómeros, pudiendo llegar a ser el precio de este isómero, 5 veces el de la mezcla. Por tanto, la aplicación de estos isómeros puros aumentaría el coste del tratamiento y limitaría sus usos clínicos [173; 180]. Las diferencias en las estructuras química de los isómeros se presentan la Figura 3.8.

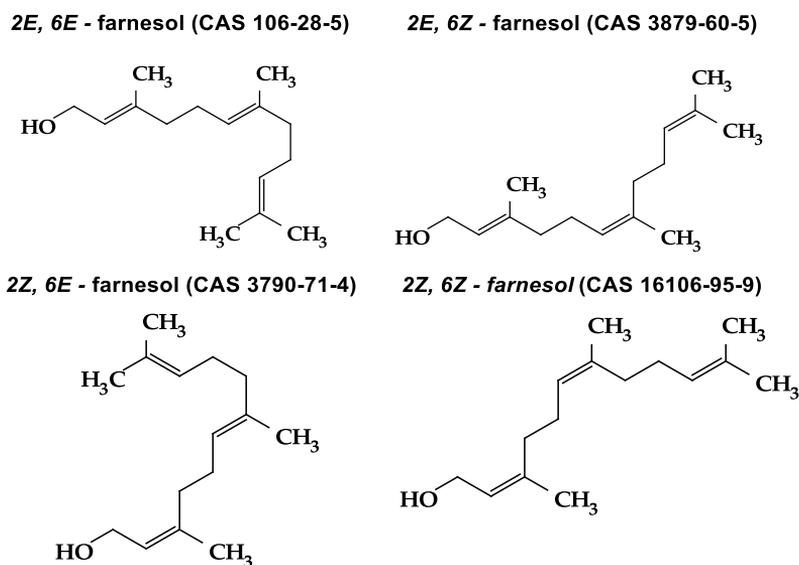


Figura 3.8 Representación de las estructuras químicas de los isómeros de farnesol (2E, 6E - farnesol; 2E, 6Z - farnesol; 2Z, 6E - farnesol; 2Z, 6Z - farnesol). Fuente: Elaboración propia.

1.3. Ciclodextrinas

El principal problema tanto de la pregnenolona como del farnesol es su baja solubilidad en disolventes acuosos, en el caso de P5 es de 7.1 µg/mL (22 µM) [182; 183], y es de 1.7 µg/mL para el FOH (7.65 µM) [154]. Los compuestos hidrofóbicos necesitan solventes orgánicos cuando se utilizan, puesto que la solubilidad máxima en ellos es mil veces mayor, por ejemplo, en DMSO es 10 mM para P5 y 45 mM para FOH [150]. Sin embargo, estos disolventes tienen una aplicación clínica limitada debido a su toxicidad por encima de ciertas concentraciones.

Debido a estos inconvenientes, es habitual utilizar ciclodextrinas (CD). Como se menciona en la introducción (capítulo 1) de esta tesis, las CD son oligómeros, sintetizados a partir de la unión de monómeros de glucosa, cuya estructura forma una cavidad, capaz de albergar moléculas hidrófobas, formando complejos de inclusión. Además, estudios recientes han demostrado los beneficios de la formación de complejos con ciclodextrinas de diversos compuestos, ya que son capaces de mejorar sus propiedades farmacológicas [94].

Para llevar a cabo este estudio se decidió utilizar sulfobutileter- β -ciclodextrina (SBE- β -CD), derivada de β -CD, es polianiónica y está funcionalizada con grupos sulfobutilo. Su fórmula es $C_{42}H_{70-n}O_{35}(C_4H_8O_3SNa)_n$, cuyo grado de sustitución (n) es de 6.4, por lo que su peso molecular es 2147.48 g/mol. La importancia de SBE- β -CD radica en que esta aprobada por la FDA y tiene una elevada solubilidad en disolventes acuosos (500 mg/mL) en comparación con β -CD (18.5 mg/mL).

2. Los complejos de inclusión

Gracias a su estructura, las CD tienen la capacidad de albergar compuestos o “huéspedes” hidrófobos en su cavidad, formando un complejo que mejorará las propiedades fisicoquímicas, farmacodinámicas y farmacocinéticas de dichas sustancias [94]. La preparación de complejos de inclusión con CD se ha descrito en bibliografía, y se puede llevar a cabo mediante 3 métodos [94; 105; 184 – 185]:

- (i) *Mezcla mecánica*: esta técnica se basa en la mezcla de los compuestos en un mortero, seguido de una molienda conjunta.
- (ii) *Complejación de pasta*: implica una mezcla física gradual de ambos compuestos, a la que se le adiciona agua de forma progresiva.
- (iii) *Complejación por agitación*: consiste en la mezcla de los compuestos en una disolución, con la posibilidad de adicionarse ambos en forma de partículas en suspensión o previamente disueltos, uno en disolvente acuoso y otro en

disolvente orgánico. La principal desventaja de utilizar dos disolventes es que, al mezclarlos, puede provocar la precipitación de los compuestos.

Observando que, en la mayoría de los estudios, los mejores resultados se obtenían con la *complejación por agitación*, se siguió el protocolo de Silva *et al.*: primero, se disolvió SBE- β -CD en solución salina tamponada con fosfato (PBS) para realizar todos los ensayos, o con agua deuterada (D₂O) para llevar a cabo la resonancia magnética nuclear (RMN); después se añadió directamente el fármaco (sin predisolverlo) en exceso, utilizando una proporción molar inicial de CD:SUST (CD:sustancia) de 1:1 y se mantuvo en agitación magnética; finalmente, se retiró el fármaco no solubilizado mediante centrifugación o filtración [94; 184 – 187]. Tanto el D₂O como el PBS son disolventes acuosos, ideales para la SBE- β -CD, mientras que los fármacos no se disuelven bien en ellos [94; 105; 184 – 185; 188].

2.1. Caracterización de los complejos CD-fármaco

Una vez formado el complejo, se realizaron diferentes análisis para caracterizarlo. Primero, se determinó la concentración de fármaco solubilizado mediante Resonancia magnética Nuclear (RMN), y después, se corroboraron los resultados obtenidos con espectrofotometría UV-Vis.

2.1.1. Resonancia Magnética Nuclear

La resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN-H) permite identificar y caracterizar compuestos químicos, determinar la conectividad de los átomos de hidrógeno en una molécula, y, proporcionar información sobre la simetría y la disposición tridimensional de los átomos en una sustancia. En este estudio, los espectros de RMN se registraron con un espectrofotómetro Bruker Avance Neo 400 MHz DRX con criosonda BBO a 400 MHz para ¹H y 100 MHz para ¹³C del Servicio de Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad de Salamanca.

Los espectros se analizaron con MestReNova v6.0.5475 (Mestrelab Research SL). Las proporciones molares de CD:SUST se calcularon mediante la integración directa de las señales apropiadas del espectro RMN.

Los desplazamientos químicos de protones (δ) se registraron en partes por millón (ppm), cuyas señales eran relativas al pico residual del solvente como estándar interno del solvente (D_2O) y tetrametilsilano. Las constantes de acoplamiento se han expresado en hercios (Hz).

Se prepararon soluciones de la ciclodextrina en D_2O con cada fármaco en exceso y, tras eliminar el fármaco no solubilizado, se realizaron los espectros RMN de hidrógenos (H-RMN) por triplicado. Calculándose la concentración de cada fármaco como se describe en la Ecuación 2.

$$[]_{fármaco} = \frac{\frac{\delta_{fármaco}}{MW_H \cdot n_H}}{\frac{\delta_{SBE-\beta-CD}}{MW_H \cdot n_H}} \cdot []_{SBE-\beta-CD}$$

Ecuación 2. Determinación de la concentración de fármaco por la integración de las señales de H-RMN

La Ecuación 2 sirve para calcular la concentración de fármaco ($[]_{fármaco}$) a partir de una concentración de ciclodextrina determinada ($[]_{SBE-\beta-CD}$). Para ello se debe identificar los picos del espectro RMN-H que corresponden a cada compuesto. Después de seleccionar los picos, es necesario determinar el número de moles de hidrógeno al que hace referencia dicho pico (n_H), y con el peso molecular del hidrógeno (MW_H), calcular la cantidad total de hidrógeno correspondiente a ese pico. Este valor se vincula directamente con el resultado de la integral del área de cada pico, tanto el correspondiente a la ciclodextrina ($\delta_{SBE-\beta-CD}$), como al del fármaco ($\delta_{fármaco}$).

2.1.2. Espectrofotometría UV-vis

Para corroborar los resultados previos, se realizaron ensayos mediante espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro UV-1800 de Shimadzu Scientific

Instruments. Esta técnica es utilizada habitualmente en la cuantificación de concentración de fármacos, debido a su amplia versatilidad, sensibilidad y precisión en la medición.

El procedimiento experimental comenzó disolviendo SBE- β -CD en PBS, después se añadió a la disolución P5 o FOH en exceso. Posteriormente, se retiró lo que no se había solubilizado y se realizaron los espectros de absorción. Se realizaron 3 mediciones por muestra, a una velocidad de medición rápida, en un rango de 900 – 190 nm con un intervalo de 2 nm. Finalmente, los resultados se analizaron con el Software UVProbe.

2.2. Cuantificación de la concentración de fármacos

Para el desarrollo terapéutico con los complejos de ciclodextrina, es esencial cuantificar de forma precisa la cantidad de fármacos que hay en los complejos. En este contexto, se determinó la concentración de P5 y FOH, utilizando técnicas como Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y espectrofotometría UV-vis.

2.2.1. Control de SBE- β -CD

Para comenzar, se realizaron los controles de SBE- β -CD. Primero, se realizó un espectro por RMN-H, para establecer qué señales correspondían a la ciclodextrina libre y, de este modo poder saber en los ensayos posteriores que picos se refieren a los otros compuestos (P5 y FOH). Dicho espectro se muestra en la Figura 3.9.

Después, con otra muestra de SBE- β -CD se realizó un espectro de absorbancia a diferentes longitudes de onda mediante espectrofotometría UV-vis, el cual se utilizó como referencia para establecer la línea base. De este modo se aseguraba que las señales que se detectaban en los ensayos con los complejos correspondían específicamente a los fármacos (Figura 3.10).

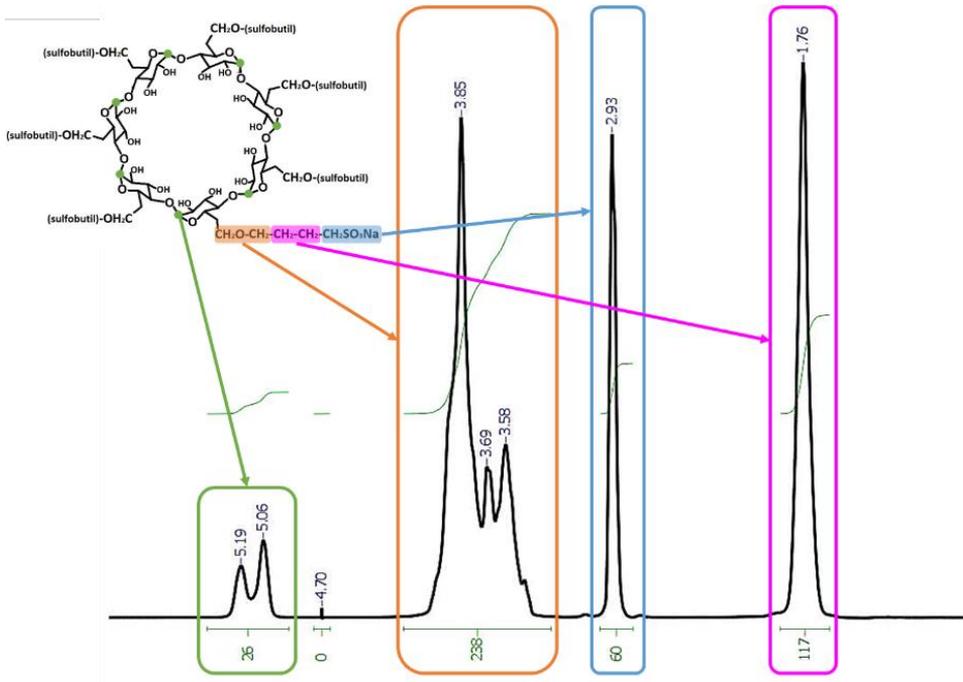


Figura 3.9 Espectro de RMN-H de SBE-β-CD en D₂O.

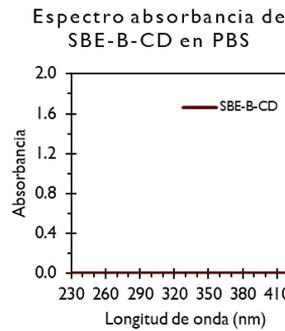


Figura 3.10 Espectro de absorbancia en UV-vis de SBE-β-CD en PBS (derecha)

En el espectro RMN-H mostrado en la Figura 3.9 se representan los picos de los hidrógenos de la ciclodextrina, mientras que, como era de esperar, en el espectro de UV-vis (Figura 3.10) se muestra como esta ciclodextrina no absorbe a ninguna longitud de onda. A continuación, se muestran los resultados obtenidos tras realizar estos ensayos con los complejos de ciclodextrina con cada fármaco.

2.2.2. Cuantificación de pregnenolona

En primer lugar, se calculó la concentración de pregnenolona tras la formación del complejo SBE- β -CD - P5. Los espectros obtenidos mediante RMN-H se presentan en la Figura 3.11, junto con los valores de los picos y sus integrales, utilizados para calcular la concentración de P5.

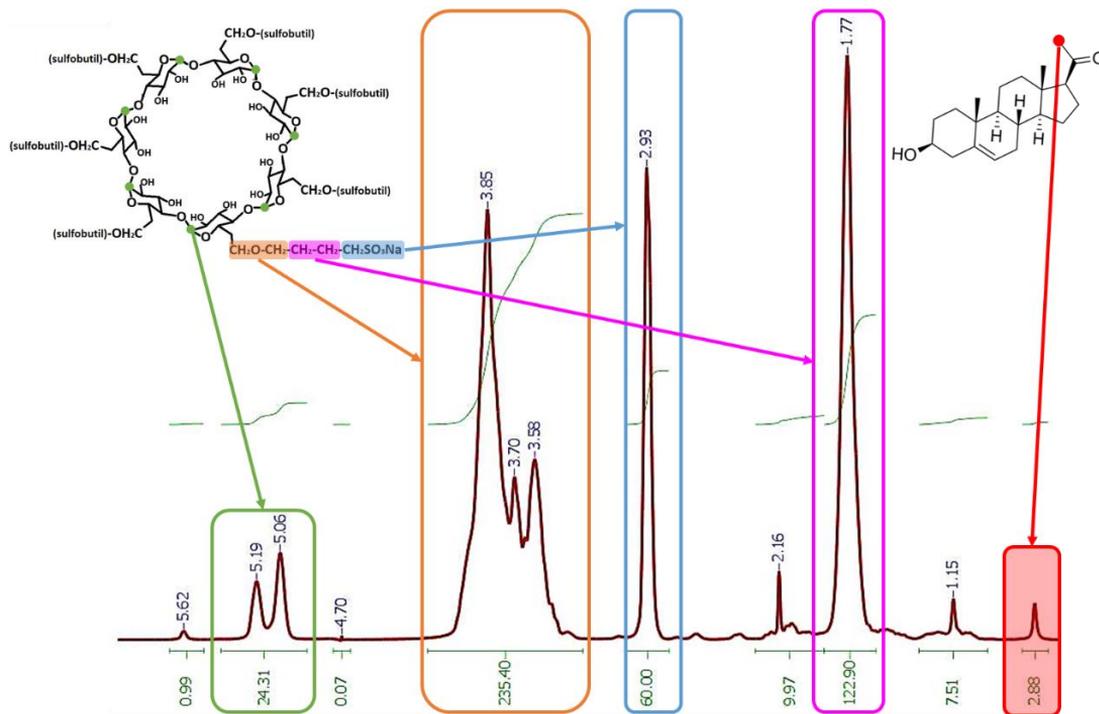


Figura 3.11 Espectro de RMN-H del complejo SBE- β -CD - P5 en D₂O.

En el espectro mediante RMN-H de la Figura 3.11, se puede observar la presencia de nuevos picos relacionados con la pregnenolona, lo que confirma la formación del complejo SBE- β -CD - P5. Se seleccionaron los picos que eran claramente distinguibles del resto: el pico a 2.93 ppm corresponde con el grupo CH₂SO₃Na de la SBE- β -CD, mientras que el pico a 0.68 ppm representa al carbono señalado con un punto rojo en la estructura de P5. Con las integrales de esas señales, y sabiendo que la concentración de la ciclodextrina utilizada era 100 mM, se determinó la concentración de P5 como se indica en la Ecuación 3, obteniéndose

un valor de aproximadamente 20 mM, es decir por cada mol de P5 había 5 moles de SBE-β-CD.

$$[\]_{P5} = \frac{\frac{\delta_{P5}}{MW_{P5}}}{\frac{\delta_{SBE-\beta-CD}}{MW_{SBE-\beta-CD}}} \cdot [\]_{SBE-\beta-CD} = \frac{\frac{2.88}{3H}}{\frac{60.00}{6.4 \cdot 2H}} \cdot 100 \text{ mM} = \frac{0.96 \text{ mol P5}}{4.69 \text{ mol CD}} \cdot 100 \text{ mM} \approx 20 \text{ mM}$$

Ecuación 3. Determinación de la concentración de P5 por la integración de las señales de H-RMN

A continuación, se preparó el complejo SBE-β-CD – P5 utilizando una concentración de ciclodextrina de 32 mM en PBS y se añadió P5, después se filtró y se realizó el espectro de absorbancia. A su vez, se disolvieron 32 mM de P5 en etanol puro y se realizaron diluciones seriadas para analizar sus espectros de absorbancia. Con estos espectros, mostrados en la Figura 3.12 A, se determinó que el pico máximo de absorbancia se encontraba a 284 nm, permitiendo realizar la curva de calibrado de pregnenolona a esa longitud de onda, como se muestra en la Figura 3.12 B.

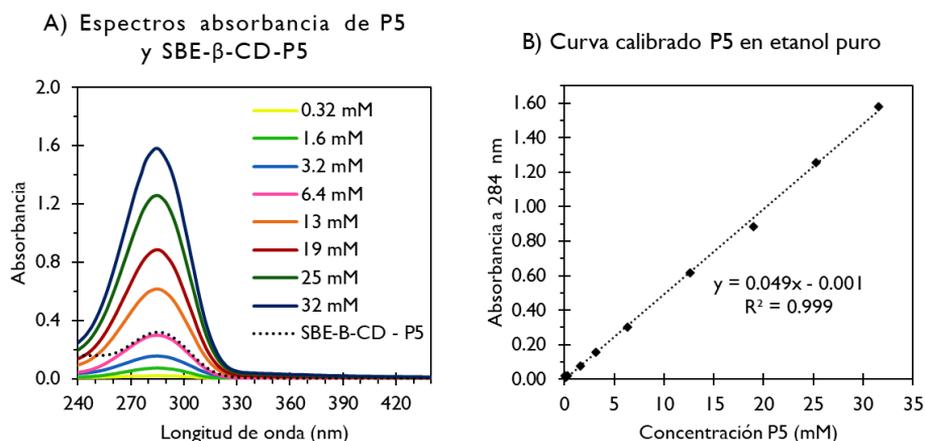


Figura 3.12 Espectros de absorbancia de P5 en etanol y del complejo SBE-β-CD – P5 (izquierda) y curva de calibrado de P5 en etanol puro a 284 nm (derecha)

En la Figura 3.12 se observa que el espectro de absorbancia del complejo es similar al de P5 en una concentración de 6.4 mM. Sabiendo que el valor de absorbancia a 284 nm fue de 0.320 y con la curva de calibrado mostrada en dicha

figura. Se determinó que en la muestra había una concentración de 6.55 mM de P5, lo que significaba que por cada 5 moles de SBE- β -CD había 1 mol de P5. Es decir, se corroboraban los resultados obtenidos por RMN-H.

2.2.3. Cuantificación farnesol

Para finalizar, se cuantificó la cantidad de farnesol en el complejo. Sin embargo, como se mencionó en la introducción de este capítulo, era preciso comprobar si había diferencias al utilizar la mezcla de isómeros (FOH) o el isómero *trans*, *trans* – farnesol (*E, E* - FOH).

De este modo, se comenzó preparando el complejo usando la mezcla de isómeros de farnesol (SBE- β -CD – FOH), disolviendo 100 mM de la ciclodextrina en D₂O y añadiendo FOH en exceso. Después, se realizó el espectro RMN-H presentado en la Figura 3.13.

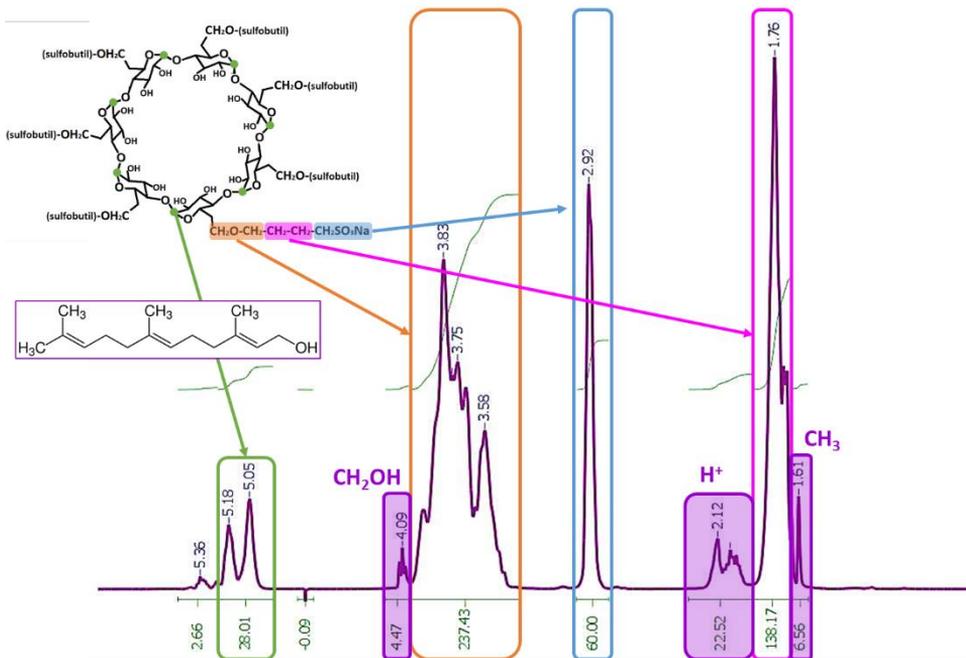


Figura 3.13 Espectro RMN del complejo con mezcla de isómeros FOH

De igual manera que ocurriría con el espectro del complejo SBE-β-CD – P5, en la Figura 3.13 se observa la presencia de picos no asociados a la ciclodextrina, lo que indica la presencia de farnesol. Estos picos, resaltados en morado, presentan un solapamiento significativo debido a las disposiciones de los isómeros *cis* y *trans*, sin embargo, la composición exacta de la mezcla no está determinada. Finalmente, se seleccionó la integral correspondiente a la señal entre 1.7 y 2.2 ppm, puesto que eran los únicos que no interferían con las señales de SBE-β-CD y se calculó la concentración de FOH tal como se establece en la Ecuación 4.

$$[\text{FOH}] = \frac{\frac{\delta_{\text{FOH}}}{\text{MW}_{\text{FOH}}}}{\frac{\delta_{\text{SBE-}\beta\text{-CD}}}{\text{MW}_{\text{SBE-}\beta\text{-CD}}}} \cdot [\text{SBE-}\beta\text{-CD}] = \frac{\frac{22.52}{10 \text{ H}}}{\frac{60.0}{6.56 \cdot 2 \text{ H}}} \cdot 100 \text{ mM} = \frac{2.25 \text{ mol FOH}}{4.57 \text{ mol CD}} \cdot 100 \text{ mM} \approx 49 \text{ mM}$$

Ecuación 4 Cálculo de la relación de proporción FOH-CD para la mezcla de isómeros

Los resultados indicaron que por cada 100 mM de CD había 49 mM de FOH, lo que equivale a que hay 2 moles de CD por cada mol de FOH. Para comprobar este resultado, se preparó nuevamente el complejo SBE-β-CD – FOH, disolviendo 100 mM de la CD en PBS, y añadiendo FOH en exceso. Simultáneamente, se prepararon diluciones seriadas de FOH en etanol. Los espectros de absorbancia de las diluciones y del complejo se muestran en la Figura 3.14 A. No obstante, al no observarse un pico claro de absorbancia máxima en ellos, se decidió realizar la curva de calibrado a una longitud de onda de 284 nm (Figura 3.14 B).

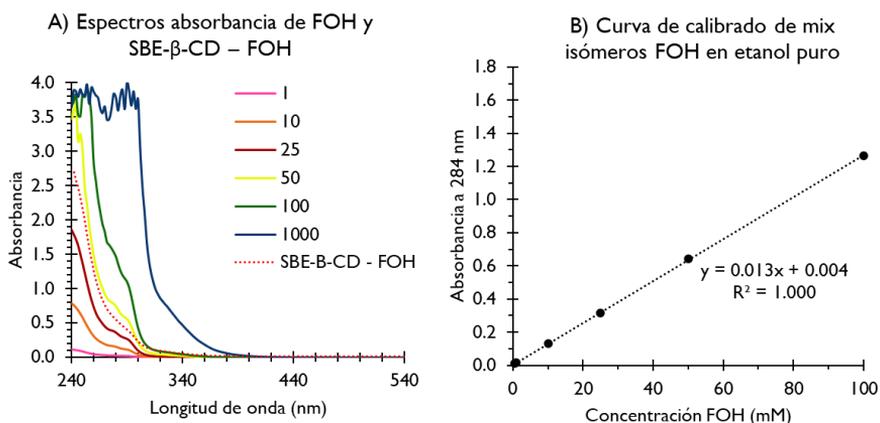


Figura 3.14 Espectros UV-Vis diluciones seriadas de la mezcla de isómeros FOH libre en etanol y SBE-β-CD – FOH en PBS, junto con la curva de calibrado de FOH en etanol.

La absorbancia de SBE-β-CD – FOH a 284 nm fue 0.615, por lo que teniendo en cuenta la curva de calibrado obtenida en la Figura 3.14 la concentración de FOH era 47 mM. Esto corroboraba los resultados obtenidos por RMN, por cada 1 mol de FOH en la muestra hay, aproximadamente, 2 moles de SBE-β-CD.

A continuación, se preparó el complejo utilizando el isómero *trans, trans* y se llevaron a cabo nuevamente estos ensayos. De tal forma que en la Figura 3.15 se muestra el espectro RMN-H del complejo SBE-β-CD – *E, E*-FOH.

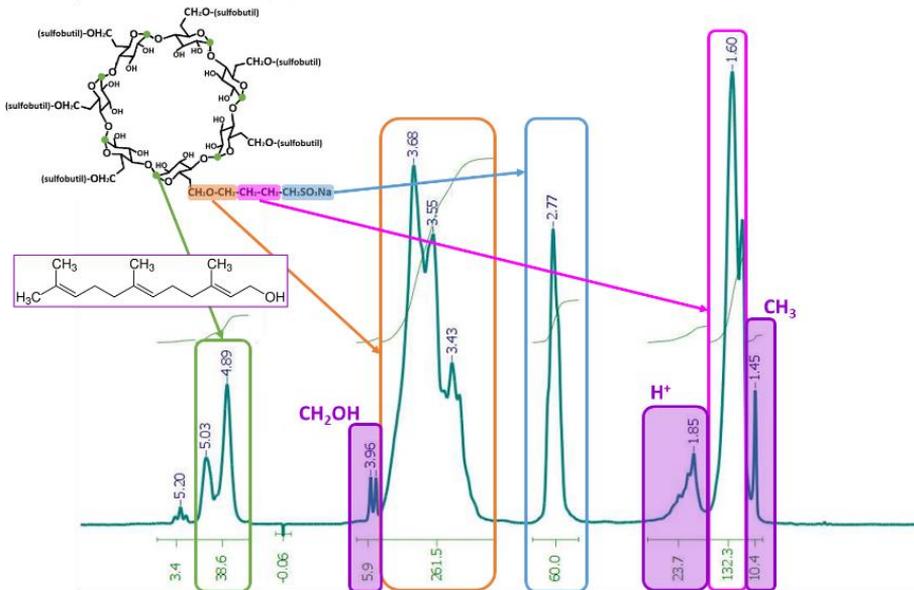


Figura 3.15 Espectro RMN del complejo con el isómero *E, E*-FOH

El espectro de la Figura 3.15 muestra picos que se asemejan a los de la Figura 3.13, es decir los espectros del complejo ciclodextrina-farnesol son similares. La diferencia radica en que, en el caso de utilizar el isómero *trans, trans*, parece que los picos están más definidos. En cualquier caso, se escogió la misma señal para integrar y calcular la concentración de *E, E*-FOH como se indica en la Ecuación 5.

$$[]_{E,E-FOH} = \frac{\delta_{E,E-FOH}}{\delta_{SBE-\beta-CD}} \cdot []_{SBE-\beta-CD} = \frac{\frac{22,5}{10\ H}}{\frac{60,0}{6,4 \cdot 2\ H}} \cdot 100\ mM = \frac{2,25\ mol\ FOH}{4,69\ mol\ CD} \cdot 100\ mM \approx 50\ mM$$

Ecuación 5 Cálculo de la relación de proporción FOH-CD para el isómero *E, E*-FOH

Se obtuvo el mismo resultado que en el caso del complejo SBE- β -CD – FOH. A continuación, se repitieron los ensayos de espectrofotometría UV-vis. Para lo cual se prepararon diluciones seriadas de *E,E*-FOH en etanol y el complejo en PBS con una concentración de 100 mM de ciclodextrina. Los espectros se muestran en la Figura 3.16 A, e igual que ocurría antes, no hay un pico de absorbancia claro, por lo que la curva de calibrado se volvió a realizar a 284 nm (Figura 3.16 B).

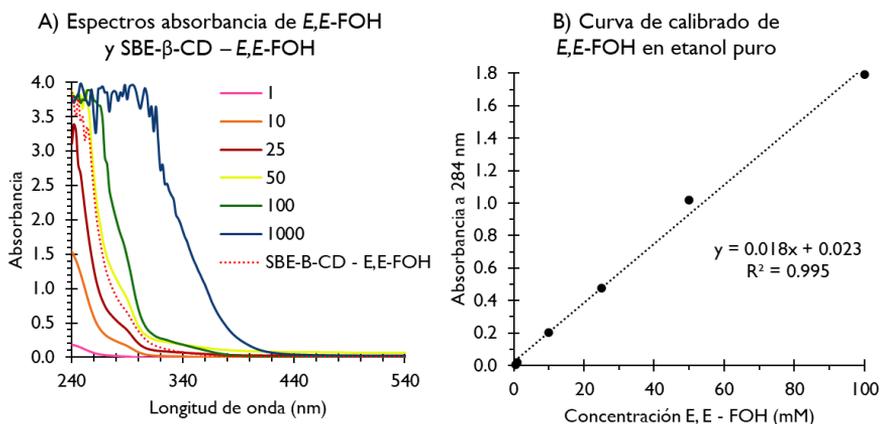


Figura 3.16 Espectros UV-Vis diluciones seriadas de *E, E* - FOH libre en etanol y SBE- β -CD – *E, E* - FOH en PBS, junto con la curva de calibrado de *E, E* - FOH en etanol

Los espectros de absorbancia mostrados en la Figura 3.16 eran similares a los de la mezcla de isómeros. Y la absorbancia de SBE- β -CD – *E, E* - FOH a 284 nm fue de 1.034, correspondiéndose con una concentración de *E, E* - FOH de 56 mM. Es decir, se vuelve a obtener que por cada mol de farnesol hay dos de ciclodextrina. Por lo tanto, en cuanto a lo que se refiere a la formación del complejo, no importaba el isómero con el que se trabajase, ya que se unieron a la ciclodextrina del mismo modo.

2.3. Condiciones óptimas para la formación de complejos

En este punto, se procedió a analizar las variables críticas que podrían incidir en la formación eficiente del complejo SBE- β -CD – P5. Centrando la atención específicamente en dos parámetros clave: el tiempo de reacción y la temperatura del sistema. Este análisis busca identificar las condiciones óptimas que maximizan

la formación del complejo, es decir, conseguir que se solubilice la mayor cantidad de fármaco posible. El propósito de este estudio es mejorar la eficacia de formación y la reproducibilidad del proceso.

2.3.1. Efecto del tiempo en la formación de complejos

En primer lugar, se determinó el tiempo de equilibrio que tardaba la ciclodextrina en alcanzar un equilibrio con los fármacos, es decir, el tiempo que se requería para que P5 y FOH formasen el complejo con CD. Para ello, se disolvió SBE- β -CD en PBS, y se añadió P5 o FOH en exceso. Se mantuvo en agitación a temperatura ambiente, recogiendo muestras a diferentes tiempos. Tras separar el exceso de fármaco no solubilizado, se midió la absorbancia del sobrenadante a 284 nm, para cuantificar con las curvas de calibrado obtenidas en el apartado anterior, los resultados se muestran en la Figura 3.17.

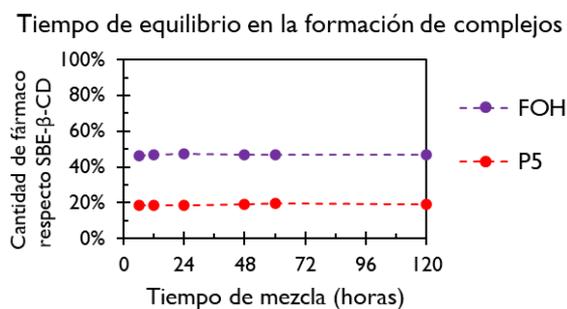


Figura 3.17 Porcentaje de fármaco (P5 o FOH) que se solubiliza en las muestras con SBE- β -CD en PBS a diferentes tiempos durante 120 horas.

Observamos que el porcentaje de fármaco en cada caso se mantuvo constante, siendo del 20 % para P5 y 50 % para FOH. Esto lleva a la conclusión de que la formación del complejo es instantánea.

2.3.2. Efecto de la temperatura en la formación de complejos

A continuación, se estudió la influencia de la temperatura en la formación del complejo. Para ello se disolvió 100 mM SBE- β -CD en D₂O y P5 o FOH en exceso. La variación de temperatura se llevó a cabo ajustando las condiciones

experimentales en el espectrómetro de RMN, en un rango de 25 a 65 °C con incrementos de 10 °C. Los espectros de SBE-β-CD – P5 se muestran en la Figura 3.18 y los de SBE-β-CD – FOH en la Figura 3.19.

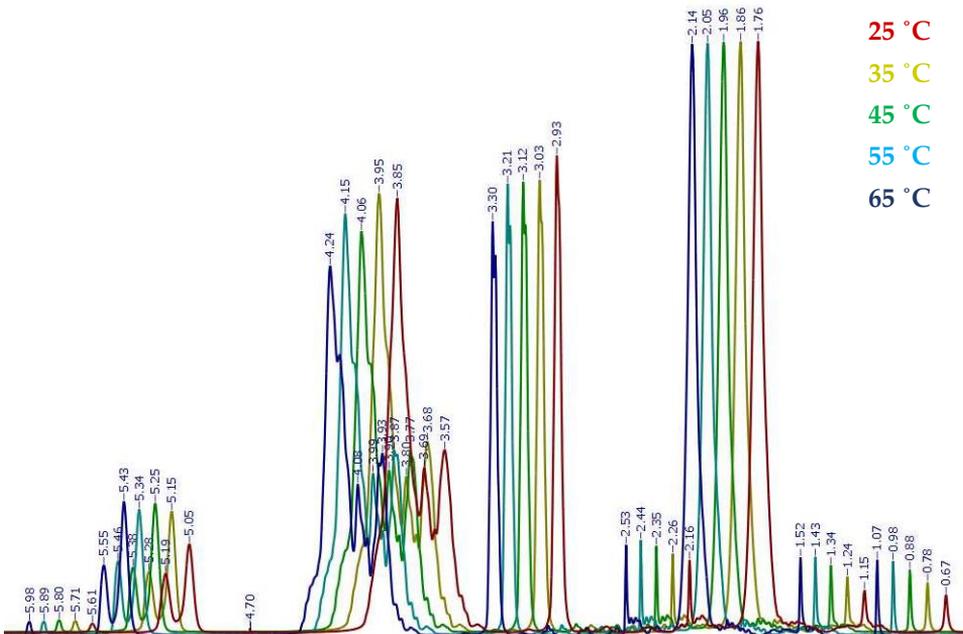


Figura 3.18 Espectros de RMN-H tras formar el complejo SBE-β-CD – P5 a diferentes temperaturas.

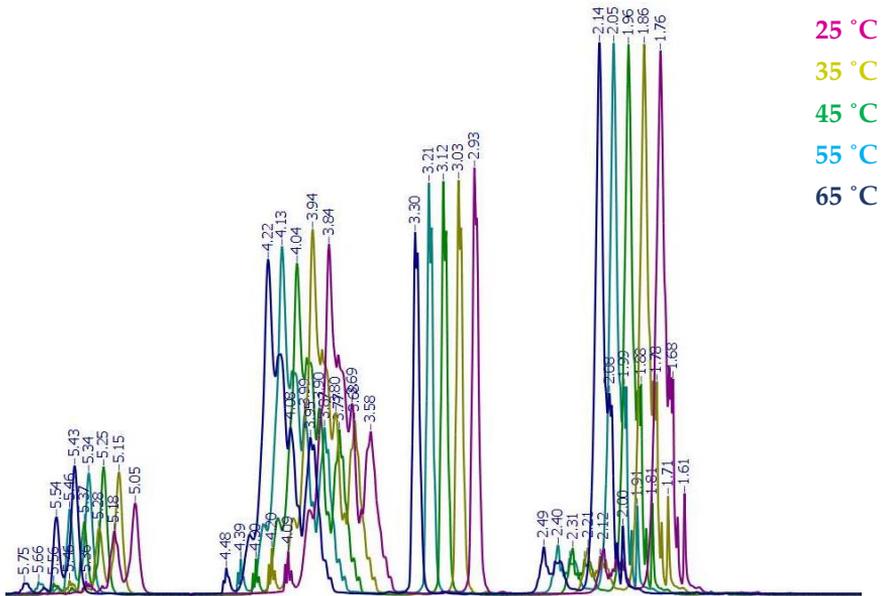


Figura 3.19 Espectros de RMN-H tras formar el complejo SBE-β-CD – FOH a diferentes temperaturas

Los espectros presentados en la Figura 3.18 y en la Figura 3.19 muestran variaciones con la temperatura, pero en realidad, lo que sucede es que, con el aumento de la temperatura, todos los picos se desplazan ligeramente hacia la izquierda. Para determinar si hay una diferencia real, hay que observar los valores de las integrales cuyos picos se establecieron para calcular las constantes en los apartados anteriores (pico a 0.68 ppm para P5, y para FOH entre 1.7 y 2.2 ppm) que se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Valores de los picos característicos de P5 y FOH en los espectros RMN de los complejos a diferentes temperaturas

	Temperatura del sistema (°C)				
	25	35	45	55	65
P5	2.9	3.1	3.2	3.3	3.6
FOH	22.5	22.8	22.8	22.8	23.4

Los valores de la Tabla 3.2 corresponden a unas concentraciones de P5 que van desde 20 mM a 25 mM, y a unas concentraciones de FOH que varían de 49 mM a 51 mM. Es decir, aunque las concentraciones de los fármacos aumentan, lo hacen muy levemente, lo que sugiere que la temperatura no afecta de un modo significativo a la formación del complejo. Esto plantea la viabilidad de trabajar a temperatura ambiente.

2.4. Estudios de estabilidad

Una vez formados los complejos, se requería determinar la estabilidad de los mismos, dado que es el parámetro que indicará la optimización del almacenamiento, y proporcionará información sobre la conservación de la eficacia terapéutica para la seguridad del paciente. Para este ensayo, se prepararon los complejos en tubos para RMN, y se mantuvieron a temperatura ambiente durante dos meses, realizando espectros de RMN-H de forma periódica. Los espectros obtenidos a lo largo del tiempo se muestran a continuación: en la Figura 3.20 los de la ciclodextrina SBE- β -CD, en la Figura 3.21 los del complejo SBE- β -CD – P5 y en la Figura 3.22 los de SBE- β -CD – FOH.

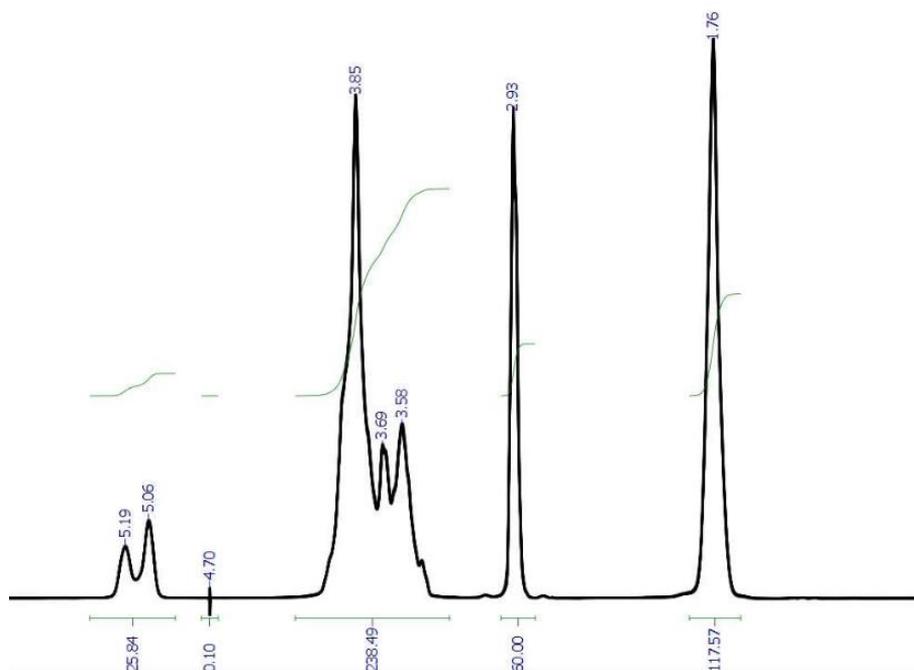


Figura 3.20 Espectros superpuestos de RMN-H de la muestra SBE- β -CD en D₂O realizados durante 2 meses.

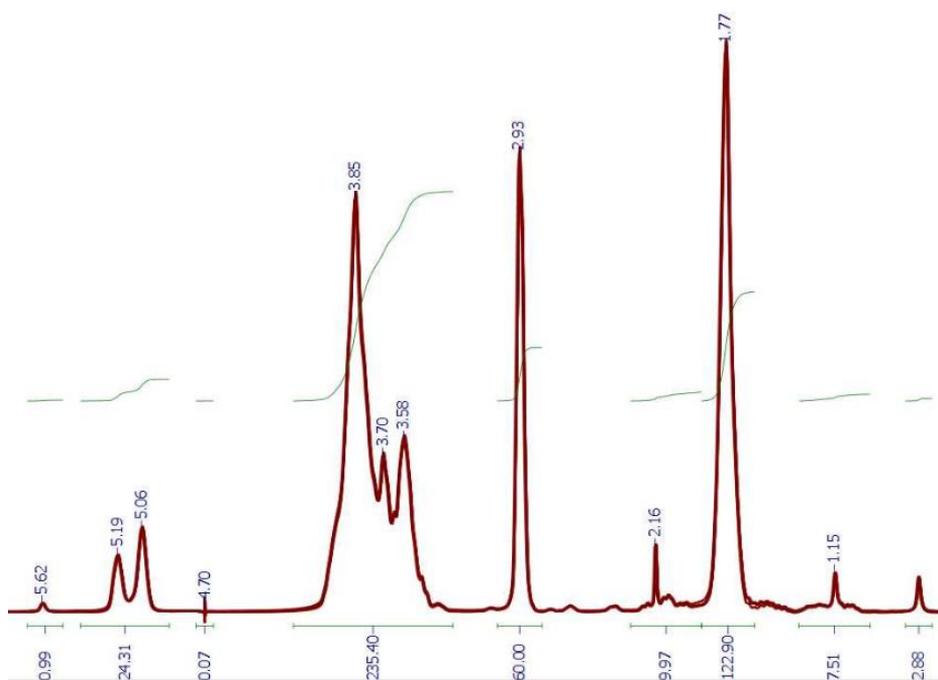


Figura 3.21 Espectros superpuestos de RMN-H de la muestra SBE- β -CD – P5 en D₂O realizados durante 2 meses.

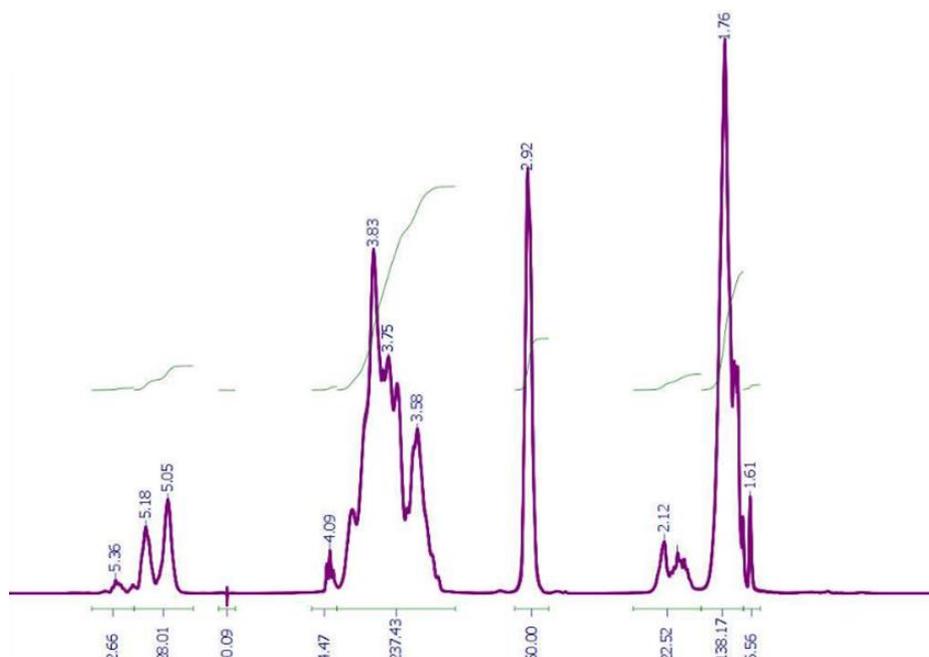


Figura 3.22 Espectros superpuestos de RMN-H de la muestra SBE- β -CD – FOH en D₂O realizados durante 2 meses.

Los espectros mostrados en las Figuras 3.20, 3.21 y 3.22 corresponden a las diferentes muestras a lo largo del tiempo. Los espectros de cada muestra se presentan superpuestos, y se puede observar que no cambian nada, lo que sugiere que tanto la ciclodextrina libre como los complejos de SBE- β -CD – FOH y de SBE- β -CD – P5 son estables durante, al menos, 2 meses.

2.5. Conclusión de la formación de complejos

Teniendo en cuenta los resultados anteriormente descritos puede concluirse que la unión de ambos complejos se dio de forma instantánea y la temperatura no afectaba de forma significativa a la tasa de inclusión, siendo el ratio CD:SUST de 1:2 en el caso de SBE- β -CD – FOH y 1:5 en el de SBE- β -CD – P5. Además, las muestras demostraron ser estables a temperatura ambiente durante 2 meses.

3. Validación como tratamientos anticancerígenos

Una vez formados los complejos, se debía corroborar que eran capaces de inhibir la proliferación celular. Para evaluar un agente anticancerígeno es fundamental determinar su citotoxicidad con pruebas *in vitro*, por lo que se evaluó la toxicidad del farnesol y de la pregnenolona en sus formas libres disolviendo en DMSO (FOH y P5), y en forma de complejo de inclusión con la ciclodextrina en PBS (SBE- β -CD – FOH y SBE- β -CD – P5).

3.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo

Para llevar a cabo los estudios *in vitro*, se seleccionaron cuatro líneas celulares (una normal y tres tumorales): fibroblasto normal HS-5 (ATCC® CRL11882™), carcinoma colorrectal HCT-116 (ATCC® CCL247™), carcinoma hepatocelular HepG2 (ATCC® HB8065™), carcinoma de mama BT-474 (ATCC® HTB20™). Todas ellas se obtuvieron de la American Tissue Collection.

Las células se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 1 % de penicilina-estreptomicina (P-S) y 10 % de suero fetal bovino (FBS), al que nos referiremos como DMEM⁺. Se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂, con una confluencia del 70 - 90%, y se subcultivaron utilizando tripsina al 0.05 % EDTA 1x.

3.2. Determinación de la viabilidad celular

Con el fin de determinar la toxicidad de los compuestos, las células se sembraron por cuadruplicado en placas de 24 pocillos a una concentración inicial de 16000 células por pocillo. Tras 24 horas en una incubadora humidificada con CO₂ al 5% se retiró el medio de los pocillos, y se añadió nuevo medio con los tratamientos de estudio. En todas las pruebas, las placas incluían control del medio (pocillo sin células), para comprobar que no había contaminación, y control

celular (medio sin tratamiento) como valor de viabilidad del 100 %. Finalmente, se cuantificaba la viabilidad celular mediante ensayos MTT, después de 24 y 48 horas de tratamiento.

El ensayo MTT es un ensayo colorimétrico que se utiliza para determinar la citotoxicidad de ciertos fármacos (midiendo la viabilidad celular). Consiste en añadir al medio celular bromuro de azul de tiazolilo tetrazolio disuelto en PBS (5 mg/ml), en una concentración de 20 µl/pocillo e incubar a 37 °C durante 1 h. En ese tiempo, las células vivas reaccionan con el compuesto produciendo cristales violetas de formazán. Después, se elimina el medio y se añade 0.5 mL de DMSO para disolver los cristales, formando una disolución morada, cuya absorbancia es proporcional a la cantidad de células vivas que hay tras cada tratamiento. La absorbancia se midió con luz ultravioleta ($\lambda = 550 \text{ nm}$) mediante un lector de microplacas EZ Read 2000 (Biochrom) y la viabilidad celular (Vc) se calculó como se indica en la Ecuación 6:

$$Vc (\%) = \frac{ABS_{de\ cada\ pozo} - ABS_{promedio\ de\ los\ pozos\ de\ control\ medio}}{ABS_{promedio\ de\ los\ pozos\ control\ celular} - ABS_{promedio\ de\ los\ pozos\ de\ control\ medio}}$$

Ecuación 6 Calculo de la viabilidad celular a partir de la absorbancia media de los pocillos correspondientes a cada tratamiento en los ensayos MTT

Una vez obtenidos los datos de viabilidad celular se realizó un análisis estadístico utilizando Statgraphics Centurion XVI Versión 16.1.03 (StatPoint Technologies). Este procedimiento consiste en un análisis de varianza unidireccional para la absorbancia a 550 nm del ensayo MTT. La prueba F en la tabla ANOVA determina si hay diferencias significativas entre tratamientos con un intervalo de confianza del 95% ($p < 0.05$).

3.3. Análisis de los resultados de viabilidad

El primer paso en la validación fue determinar la Concentración Inhibitoria (IC₅₀) media de los diferentes compuestos (SBE-β-CD, P5 y FOH), de forma libre

y en forma de complejos. Es decir, determinar la concentración que se necesita de cada tratamiento para inhibir la proliferación celular en un 50 % comparando con el control sin tratar. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular variando la concentración de los compuestos. Con los resultados se realizó una estimación de los parámetros, obteniendo un modelo estadístico de la respuesta de las líneas celulares a cada tratamiento.

Esta IC_{50} se calculó en gPROMS 6.0 (PSE), mediante una estimación hessiana de parámetros (IC_{50} y OI), tal como se indica en la Ecuación 7, utilizando un ordenador Intel Core I3 de 3.70 GHz y 4 GB de RAM.

$$\frac{dy}{dD} = \frac{-100 \cdot OI \cdot \left(\frac{D}{IC_{50}}\right)^{OI}}{D \cdot \left(\left(\frac{D}{IC_{50}}\right)^{m+1}\right)^2}$$

Ecuación 7 Expresión diferencial que describe la variación de la viabilidad celular en función de la dosis de fármaco administrada

La Ecuación 7 relaciona la variación de la viabilidad celular media en porcentaje (dy) frente a la dosis administrada (D), con OI (orden de la inhibición) y la IC_{50} (dosis a la que el proceso de inhibición alcanza el 50 % de las células). Siendo estos dos últimos, los parámetros ajustables.

Todas las simulaciones se llevaron a cabo considerando los resultados de viabilidad celular a las 48 h. Se seleccionó el modelo de varianza constante y se fijó el sensor para la estimación de parámetros en función de la variable de viabilidad (y) en un rango entre 0.05 y 0.10. Se establecieron condiciones de contorno para cada parámetro: IC_{50} podía tomar valores de 10 μ M a 2000 μ M y OI valores de 0.1 a 10. Para el análisis estadístico, la bondad de ajuste se realizó comparando el valor ponderado de los residuales (WR) con el valor de chi-cuadrado (X^2) y un intervalo de confianza del 95%, y la prueba de falta de ajuste se realizó comparando el *valor F* con el *F crítico*. Ya que, la exactitud de un

modelo generalmente se considera precisa si el valor de WR es menor que X^2 y el valor F es menor que F crítico.

Los resultados de IC_{50} sirvieron como referencia para saber cuál era la concentración a la que se debía trabajar al realizar los ensayos *in vitro*. De este modo, el siguiente paso fue comparar la eficacia entre los fármacos libres y en forma de complejo de inclusión.

3.3.1. IC_{50} de SBE- β -CD tras 48 horas de tratamiento

En primer lugar, se estudió el efecto de la ciclodextrina en la viabilidad celular, puesto que todo compuesto puede ser tóxico a partir de una concentración dada, utilizando concentraciones de la ciclodextrina en DMEM+ desde 0 a 1.5 mM. Los resultados de viabilidad de cada línea celular tras 48 horas de tratamiento se muestran en la Figura 3.23, junto con la curva de ajuste estimada con gPROMS, cuyos parámetros están descritos en la Tabla 3.3.

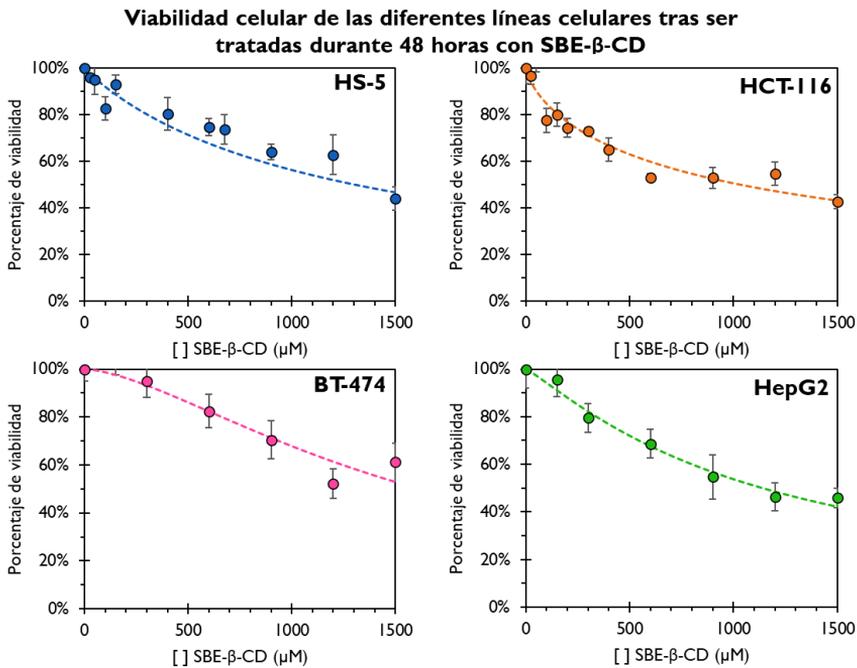


Figura 3.23 Resultados experimentales de la viabilidad de las células tras tratarlas con SBE- β -CD durante 48 horas en diferentes concentraciones (puntos) y curvas de ajuste calculadas con gPROMS.

Tabla 3.3 Estimación de parámetros y valores de significación estadística al ajustar los datos a la curva dosis-respuesta de SBE-β-CD

		Fibroblastos (HS-5)	Colorrectal (HCT-116)	Mama (BT-474)	Hígado (HepG2)
Parámetro	IC ₅₀ (μM)	1191	1039	1605	1215
estimado	OI	1	0.9	1.6	1.3
Bondad	WR	9	9	7.1	7
del ajuste	χ ²	12.6	12.6	9.5	9.5
Falta de	valor F	0.5	0.5	0.8	0.8
ajuste	F crítico	3.4	3.4	4.1	4.1
Iteraciones de PNL		28	31	19	23
Tiempo de CPU (s)		0.6	1.1	0.6	0.9
Varianza (%)		2.7	3.7	5.5	3.2

PNL: programación no lineal.

Observando los resultados de la Tabla 3.3 se puede concluir que las estimaciones han superado ambas pruebas (bondad y falta de ajuste). Los valores de IC₅₀ de SBE-β-CD difieren entre una línea celular y otra, siendo la concentración de ciclodextrina de 1039 μM, 1215 μM y 1605 μM, para las líneas cancerígenas de colón, hígado y mama, respectivamente; y de 1191 μM para la línea de fibroblastos normales (Figura 3.24).

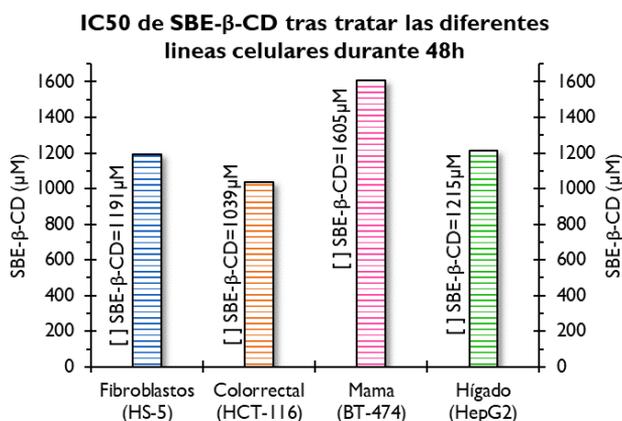


Figura 3.24 IC₅₀ de cada una de las líneas tras tratarlas 48 h con SBE-β-CD

De los resultados obtenidos en la Figura 3.24, se concluye que una concentración mayor de 1 mM de SBE-β-CD reduce la viabilidad por debajo del 50% en todos los casos. Por lo que para que ciclodextrina no afecte de forma significativa a las células se debe trabajar con concentraciones inferiores a 1 mM.

3.3.2. IC_{50} de P5 y SBE- β -CD – P5 tras 48 horas de tratamiento

De la misma forma, se realizó el mismo ensayo con pregnenolona, tanto en forma libre (en DMSO) como en forma de complejo (SBE- β -CD – P5). No obstante, dado que el objetivo de esta tesis es mejorar el tratamiento actual del Cáncer Colorrectal, lo que interesa es ver si el efecto de los fármacos estudiados es diferente en la línea cancerígena de colón y la línea de fibroblastos normales, por lo que inicialmente se estudiaron únicamente esas líneas celulares.

En este caso, las concentraciones de P5 libre que se estudiaron fueron desde 0 a 400 μ M, y desde 0 a 100 μ M en forma de complejo, lo que equivalía a unas concentraciones de SBE- β -CD entre 0 y 500 μ M. Los resultados de viabilidad de cada línea celular tras 48 horas de tratamiento se muestran en la Figura 3.25, junto con la curva de ajuste estimadas con gPROMS, cuyos parámetros y valores de significación estadística están descritos en la Tabla 3.4.

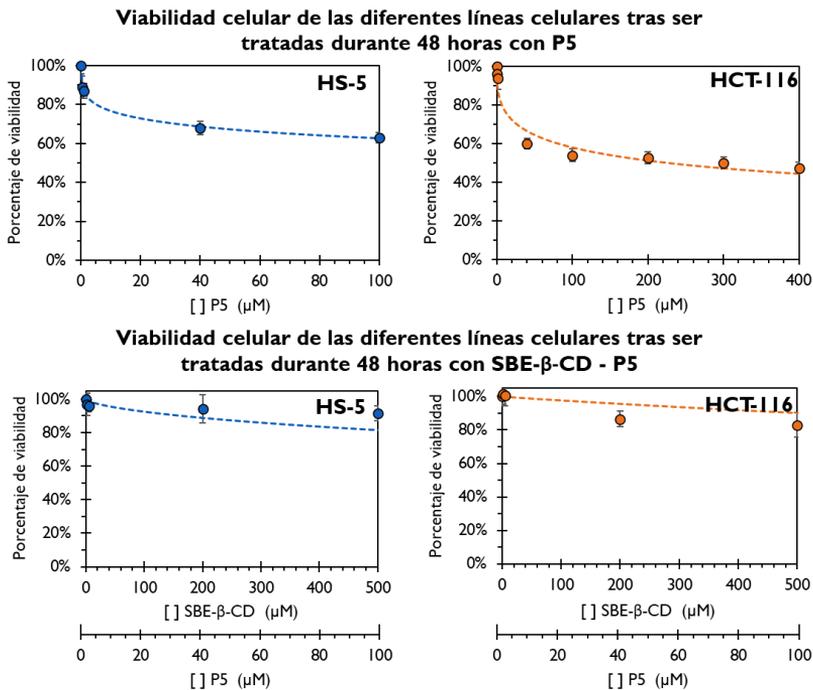


Figura 3.25 Resultados experimentales de la viabilidad de las células tras tratar con P5 o SBE- β -CD – P5 durante 48 h en diferentes concentraciones (puntos) y curvas de ajuste calculadas con gPROMS.

Tabla 3.4 Estimación de parámetros y valores de significación estadística al ajustar los datos a la curva dosis-respuesta de P5 y SBE-β-CD – P5

		P5		SBE-β-CD – P5	
		Fibroblastos (HS-5)	Colorrectal (HCT-116)	Fibroblastos (HS-5)	Colorrectal (HCT-116)
Parámetro estimado	IC₅₀ (μM)	603	227	1012 - 5060	1016 - 5081
	OI	0.3	0.4	1.0	0.6
Bondad del ajuste	WR	8.0	8.0	6.0	6.0
	χ²	11.1	11.1	7.8	7.8
Falta de ajuste	valor F	0.6	0.6	1.0	1.0
	F crítico	3.7	3.7	4.8	4.8
Iteraciones de PNL		32	34	19	9
Tiempo de CPU (s)		0.8	1.2	0.5	0.3
Varianza (%)		1.4	3.7	2.2	1.6

Centrando la atención en los resultados de bondad y falta de ajuste, recogidos en la Tabla 3.4, se puede concluir que las estimaciones han superado ambas pruebas. Los resultados de IC₅₀ tras un tratamiento de 48 horas variaron en función de la línea celular: en el caso de los fibroblastos sanos era de 603 μM para P5 libre y 1012 μM para P5 en forma de complejo, lo que equivalía a 5060 μM de SBE-β-CD, y en el caso de la línea cancerígena de colon era de 227 μM para P5 libre y 1016 μM para P5 en forma de complejo, lo que equivalía a 5081 μM de SBE-β-CD. En la Figura 3.26 se representan los valores de IC₅₀ correspondientes a SBE-β-CD, P5 libre o con el complejo SBE-β-CD - P5 .

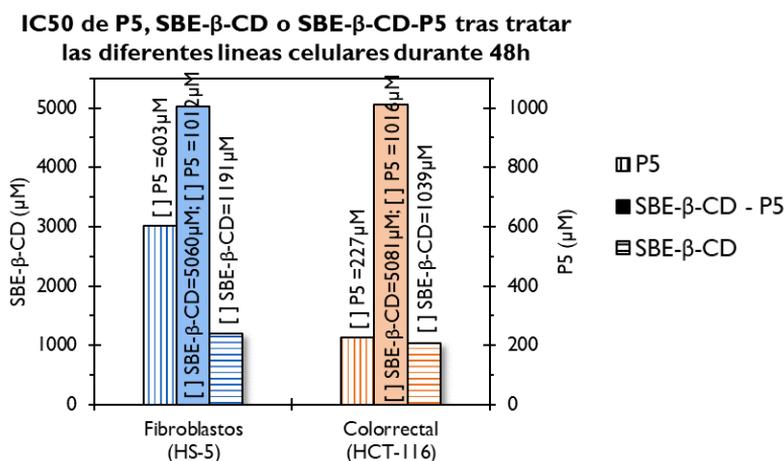


Figura 3.26 IC50 de cada una de las líneas tras tratarlas 48 h con P5, SBE-β-CD – P5 y SBE-β-CD

Según los resultados mostrados en la Figura 3.26 las concentraciones necesarias de SBE- β -CD para reducir la viabilidad hasta el 50 % cuando se trabaja con el complejo eran superiores a la IC₅₀ de la ciclodextrina. Además, era más efectivo trabajar con la P5 en forma libre. Sin embargo, se puso de manifiesto un problema al repetir los ensayos MTT, dado que la pregnenolona precipitaba al añadirla en el medio celular. Para corroborar esta afirmación, se realizó una sencilla prueba: se preparó una disolución de P5 en DMSO ($[P_5] = 30 \text{ mM}$), igual que la utilizada en los ensayos MTT; posteriormente, se hizo una dilución 1:10 en agua ($[P_5] = 3 \text{ mM}$); finalmente se filtró muestra y se hizo un espectro de absorbancia.

En la Figura 3.27 A se muestran las fotografías de la disolución de P5 en DMSO ($[P_5] = 30 \text{ mM}$), y la de esa misma muestra tras hacer una dilución 1:10 en agua antes y después de filtrar. Y en la Figura 3.27 B el espectro de DMSO diluido y de la muestra diluida y filtrada para comparar ambos.

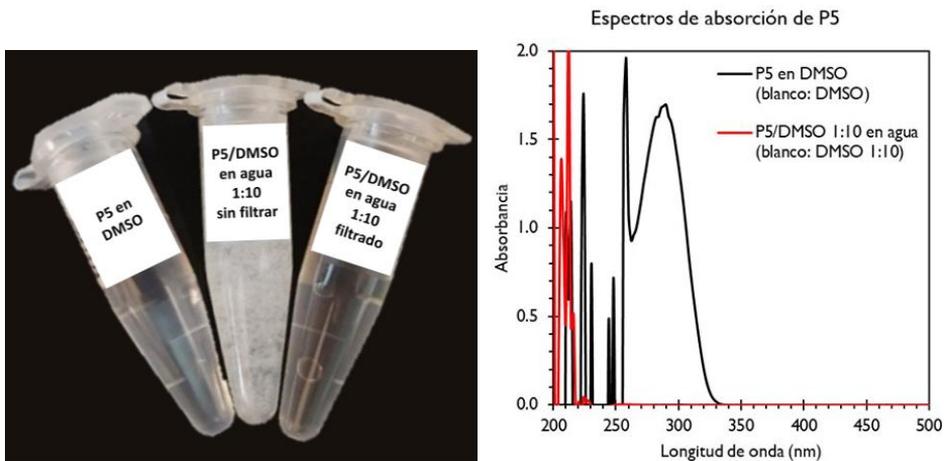


Figura 3.27 (A) Fotografía de las muestras de P5 en función del solvente (de izquierda a derecha) en DMSO con una concentración 30 mM de P5, dilución 1:10 en agua sin filtrar y dilución 1:10 en agua filtrada. (B) Espectro de absorción de la dilución 1:10 de P5-DMSO en agua y una dilución 1:10 de DMSO en agua, utilizando como blanco agua

En la fotografía de la Figura 3.27 se aprecia claramente la precipitación de P5 y en los espectros, la absorbancia se debe a la presencia de DMSO, pero no se ve el pico característico de P5, y, por tanto, esto corrobora que ha precipitado.

A la vista de que P5 libre impedía la proliferación celular debido a que precipitaba al añadirlo al medio celular, esto hace que no sea posible saber la concentración exacta del compuesto en los ensayos de viabilidad, ni su forma de actuación al evitar la proliferación celular. A su vez, se deduce que no se podría utilizar en su forma libre para la administración *in vivo*. Ya que esto indica que no tendría una buena biodistribución en el cuerpo humano, lo que impediría que alcanzara las células objetivo para llevar a cabo su acción, y aunque llegase no podría ser absorbido por las células. Por otro lado, en el caso de utilizar el complejo, se necesitaría una elevada cantidad de compuestos. Por estas razones, se tomó la decisión de no continuar trabajando con la pregnenolona.

3.3.3. IC_{50} de FOH y SBE- β -CD – FOH tras 48 horas de tratamiento

Se evaluó la IC_{50} del último compuesto, farnesol, tanto en forma libre (predisolviendo en DMSO) como en forma de complejo (SBE- β -CD – FOH). Las concentraciones estudiadas para FOH libre fueron desde 0 a 500 μ M, mientras que para la forma en complejo variaron de 0 a 750 μ M, lo que se corresponde con una concentración de SBE- β -CD de 0 a 1500 μ M. Los resultados de viabilidad de cada línea celular tras 48 horas de tratamiento se muestran en la Figura 3.28 (FOH) y la Figura 3.29 (SBE- β -CD – FOH) junto con las curvas de ajuste obtenidas con el programa gPROMS. Los parámetros y valores de significación estadística están descritos en la Tabla 3.5 (FOH) y la Tabla 3.6 (SBE- β -CD – FOH).

Viabilidad celular de las diferentes líneas celulares tras ser tratadas durante 48 horas con FOH

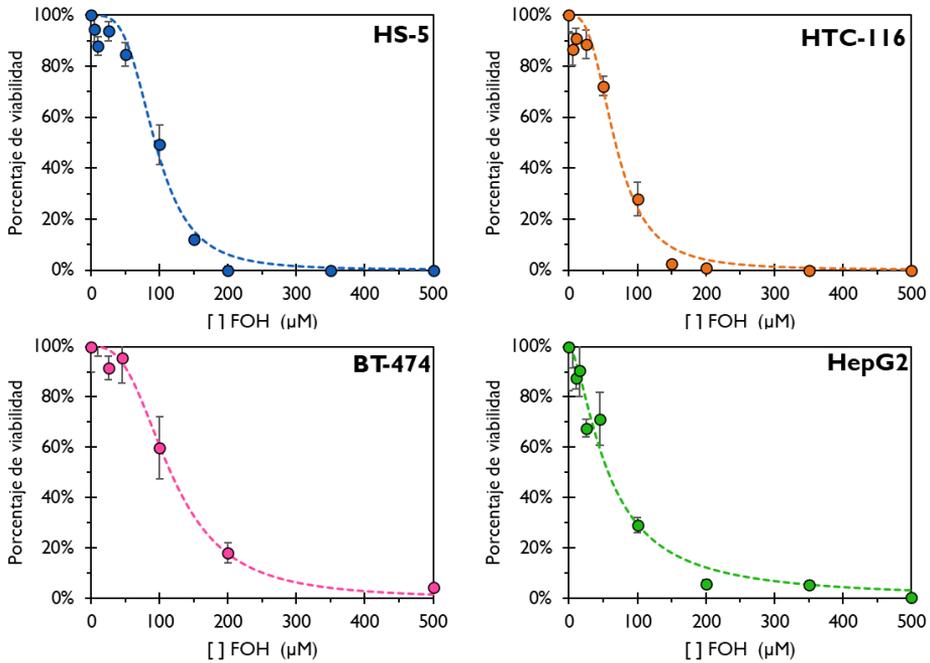


Figura 3.28 Resultados experimentales de la viabilidad de las células tras tratarlas con FOH durante 48 horas en diferentes concentraciones (puntos) y curvas de ajuste calculadas con gPROMS.

Tabla 3.5 Estimación de parámetros y valores de significación estadística al ajustar los datos a la curva dosis-respuesta de FOH

		Fibroblastos (HS-5)	Colorrectal (HCT-116)	Mama (BT-474)	Hígado (HepG2)
Parámetro estimado	IC₅₀ (μM)	113	71	101	62
	n	6.7	2.7	6	2.9
Bondad del ajuste	WR	10	9	7	7
	χ²	14.1	12.6	11.1	9.5
Falta de ajuste	valor F	0.4	0.5	0.4	0.8
	F crítico	3.1	3.4	4	4.1
Iteraciones de PNL		15	38	12	13
Tiempo de CPU (s)		0.4	1.5	0.4	0.4
Varianza (%)		8.6	6.4	10.	4.1

Viabilidad celular de las diferentes líneas celulares tras ser tratadas durante 48 horas con SBE-β-CD - FOH

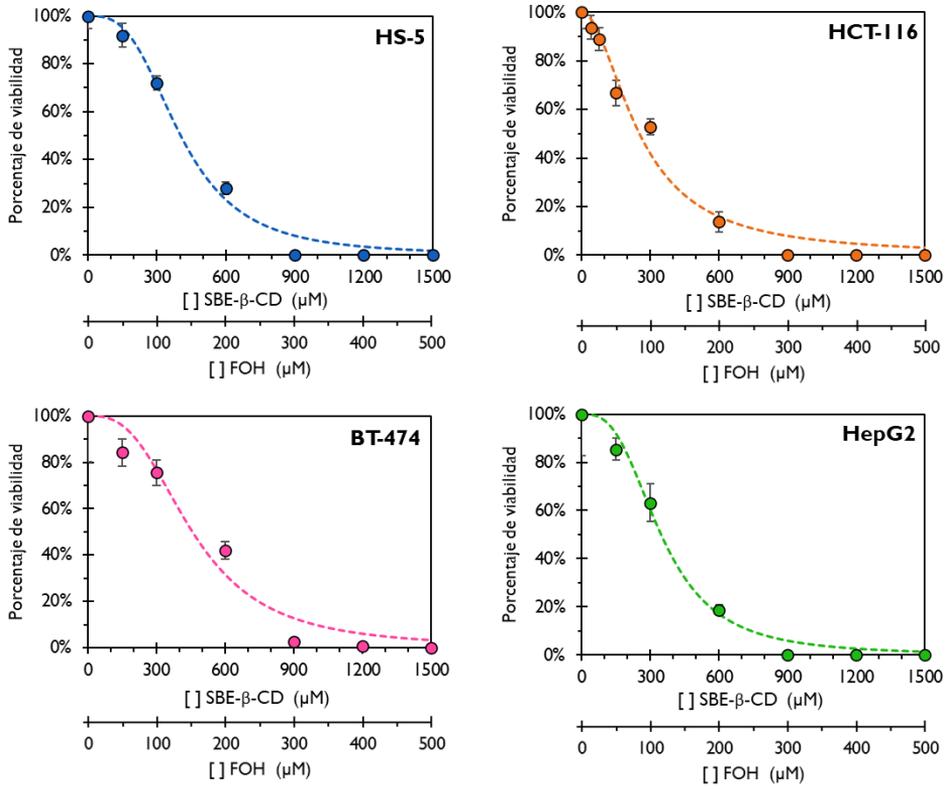


Figura 3.29 Resultados experimentales de la viabilidad de las células tras tratarlas con SBE-β-CD – FOH durante 48 horas en diferentes concentraciones (puntos) y curvas de ajuste calculadas con gPROMS.

Tabla 3.6 Estimación de parámetros y valores de significación estadística al ajustar los datos a la curva dosis-respuesta de SBE-β-CD – FOH

		Fibroblastos (HS-5)	Colorrectal (HCT-116)	Mama (BT-474)	Hígado (HepG2)
Parámetro estimado	IC₅₀ (μM)	408 - 204	254 - 127	486 - 243	304 - 152
	n	3.2	1.9	4.2	2.7
Bondad del ajuste	WR	7	9	7	7
	χ²	9.5	12.6	9.5	9.5
Falta de ajuste	valor F	0.8	0.8	0.8	0.8
	F crítico	4.1	4.1	4.1	4.1
Iteraciones de NLP		16	14	23	52
Tiempo de CPU (s)		0.7	0.4	1	2.8
Varianza (%)		4.0	5.6	2.0	2.8

Al igual que con los compuestos anteriores, las estimaciones han superado las pruebas de bondad y falta de ajuste. Comparando los resultados de IC₅₀ de FOH, después de un tratamiento de 48 horas, se observa que los valores difieren entre las distintas líneas celulares. En las líneas cancerígenas de colón y de hígado, las IC₅₀ de FOH fueron de 71 μM y 62 μM, respectivamente; mientras que fue de 101 μM para la de mama y de 113 μM para la línea de fibroblastos normales.

En el caso de los complejos, se requieren concentraciones más altas de FOH para reducir de forma equivalente la viabilidad. Así pues, la IC₅₀ del complejo para las línea cancerígena de colón supone una concentración de FOH de 127 μM ([]_{SBE-β-CD} = 254 μM), de 152 μM ([]_{SBE-β-CD} = 304 μM) para la de hígado, de 243 μM ([]_{SBE-β-CD} = 486 μM) para la de mama y de 204 μM ([]_{SBE-β-CD} = 408 μM) para la línea de fibroblastos normales. Estos resultados se resumen en la Figura 3.30.

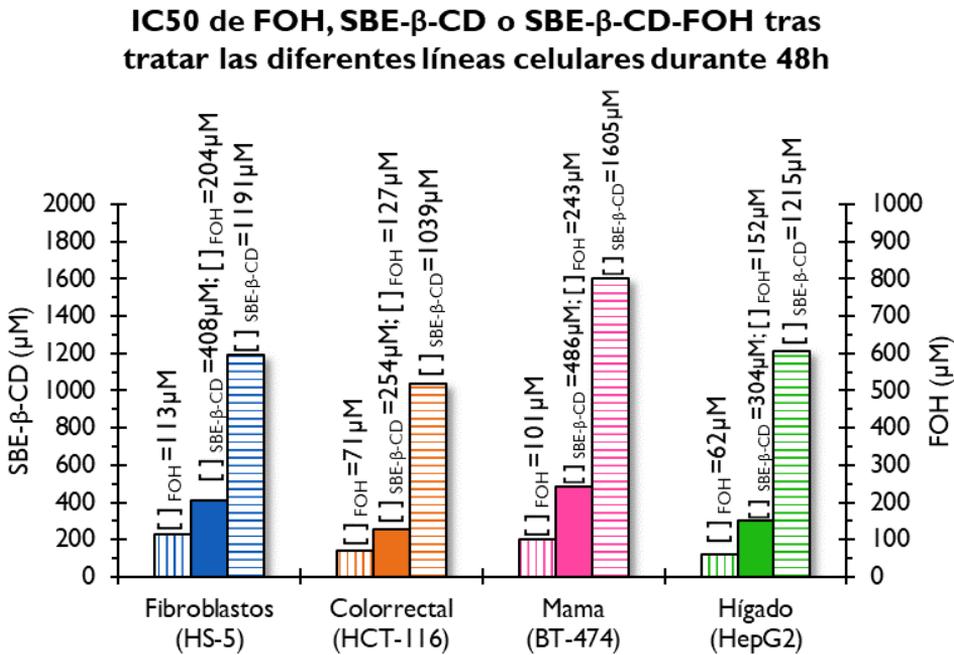


Figura 3.30 Representación gráfica de la estimación de IC₅₀ de cada una de las líneas tras tratarlas 48 h para FOH (columnas rayadas verticalmente), CD (columnas rayadas horizontalmente) y el complejo (columnas rellenas) en cuatro líneas celulares de cáncer (azul-fibroblasto, naranja-colorrectal, rosa-mama, verde-hígado).

Observando los resultados representados en la Figura 3.30, se concluye que el valor de IC₅₀ de la SBE-β-CD libre fue considerablemente mayor que la del complejo. Por lo tanto, la toxicidad de la ciclodextrina se consideró despreciable para las dosis a utilizar. Por otro lado, la inclusión de FOH en SBE-β-CD duplicó el valor de IC₅₀ del farnesol. Se observa una diferencia significativa entre las líneas celulares cancerígenas de hígado y colorrectal en comparación con la cancerígena de mama y los fibroblastos normales. Esta diferencia podría constituir una ventaja terapéutica para el tratamiento de estos tipos de cáncer, ya que implica que la inclusión es selectiva hacia ciertas células cancerosas.

3.4. Validación del efecto terapéutico de FOH

Para evaluar la eficacia del farnesol, se debía validar el efecto terapéutico del FOH libre y del complejo SBE-β-CD – FOH, así como demostrar que SBE-β-CD no afectaba a la proliferación celular. Teniendo en cuenta los valores de IC₅₀ de FOH obtenidos en el apartado anterior se decidió trabajar con unas concentraciones finales de 150 μM de FOH y 300 μM SBE-β-CD. Los resultados de viabilidad de los ensayos MTT realizados se muestran en la Figura 3.31.

Viabilidad celular tras tratar las células con SBE-β-CD, FOH y SBE-β-CD - FOH

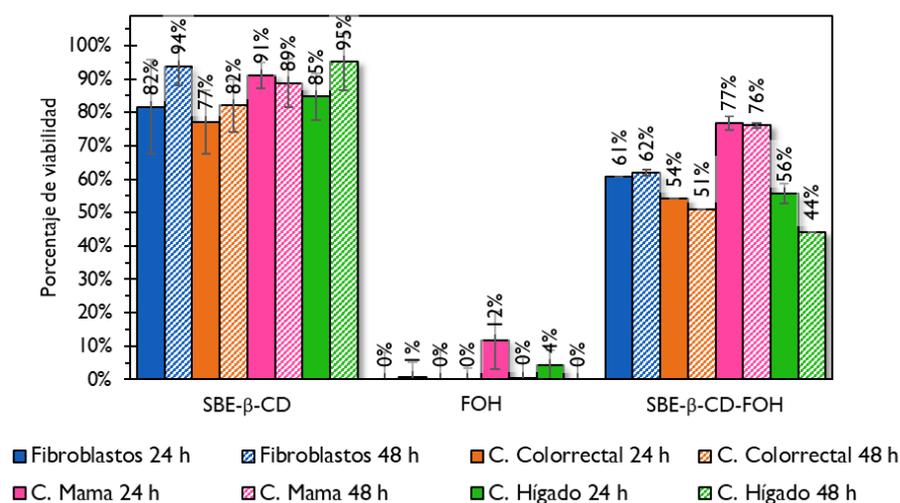


Figura 3.31 Resultados de viabilidad celular de cada línea celular tratada con SBE-β-CD, FOH o SBE-β-CD – FOH durante 24 h (columna llena) y 48 h (columna rallada)

Como se observa en la Figura 3.31, la ciclodextrina no afecta de forma significativa a la viabilidad celular en una concentración de 300 μM , el farnesol libre (150 μM) indujo la muerte de todas las células, mientras que los complejos mostraron una reducción en la viabilidad celular que variaba en función de la línea utilizada. La viabilidad después del tratamiento con SBE- β -CD – FOH durante 48 horas se mantuvo en torno al 50 % para las células cancerígenas de colon e hígado, y cercana al 60 % en la línea de fibroblastos normales y, solo se redujo hasta el 80 % en la línea cancerígena de mama.

3.5. Viabilidad celular en función del isómero de FOH

Como se mencionó en la introducción, los estudios previos citados en la literatura se basaban únicamente en el uso de un isómero de farnesol (*E*, *E*-FOH). Sin embargo, era necesario estudiar si una mezcla de isómeros ofrecía resultados similares a los del isómero *E*, *E*-FOH purificado, ya fuese en su forma libre o en complejo con SBE- β -CD. Con este propósito, se repitió el experimento anterior utilizando el isómero *E*, *E*-FOH, y se compararon los resultados de la viabilidad, como se muestra en la Figura 3.32.

Viabilidad celular tras tratar las células con los diferentes isómeros de FOH

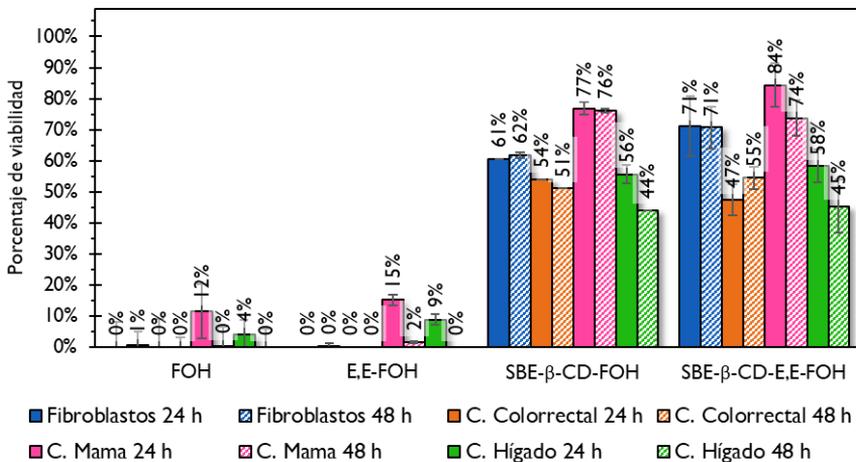


Figura 3.32 Resultados de viabilidad celular de cada línea celular tratada con los diferentes isómeros de FOH en forma libre y en forma de complejo, durante 24 h (columna llena) y 48 h (columna rallada)

En la Figura 3.32 se presenta una comparación detallada de los resultados obtenidos con ambos isómeros, y no se evidencian diferencias sustanciales entre los diversos tipos de FOH.

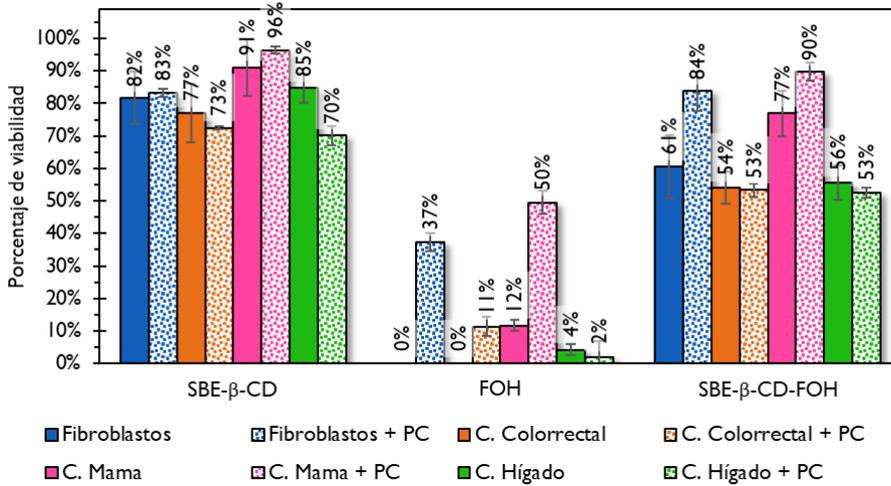
En el caso de los compuestos en su forma libre, provocan la muerte celular de en todas las líneas tras 48 horas de tratamiento a esa concentración. Mientras que, en el caso de los complejos, la viabilidad celular se reduce en mayor medida en el caso de las líneas de cáncer de hígado (44 % ~ 45 %) y colorrectal (51 % ~ 55 %), en cambio afectan mínimamente a la línea de cáncer de mama (76 % ~ 74 %); y en lo que respecta a la línea de fibroblastos normales, la viabilidad se reduce hasta el 62 % y 71 %.

Estos resultados sugieren que la mezcla de isómeros podría ser empleada, en lugar de limitarse al uso exclusivo de *E*, *E*-FOH. Y dado el elevado precio del isómero, se reduciría el coste asociado a un posible tratamiento.

3.6. Efecto PC de FOH sobre la viabilidad celular

Finalmente, como se mencionó en la introducción, uno de los mecanismos de acción del FOH implica reducir la síntesis de fosfatidilcolina (PC), disminuyendo la formación de membranas celulares y, por tanto, la proliferación celular. Dado que las células normales tienen una tasa de crecimiento más lenta y, en consecuencia, una menor necesidad de crear nuevos componentes de membrana, se espera que el efecto de FOH sea menor. Para verificar esta afirmación, se determinó la viabilidad celular al tratar con FOH libre o con el complejo SBE- β -CD – FOH en ausencia y presencia de PC, adicionada de forma exógena, utilizando la misma concentración que FOH (150 μ M), los resultados de este ensayo se muestran en las gráficas de la Figura 3.33.

A) Viabilidad celular tras tratar las células con SBE-β-CD, FOH y SBE-β-CD - FOH con/sin fosfatidilcolina (PC) durante 24 h



B) Viabilidad celular tras tratar las células con SBE-β-CD, FOH y SBE-β-CD - FOH con/sin fosfatidilcolina (PC) durante 48 h

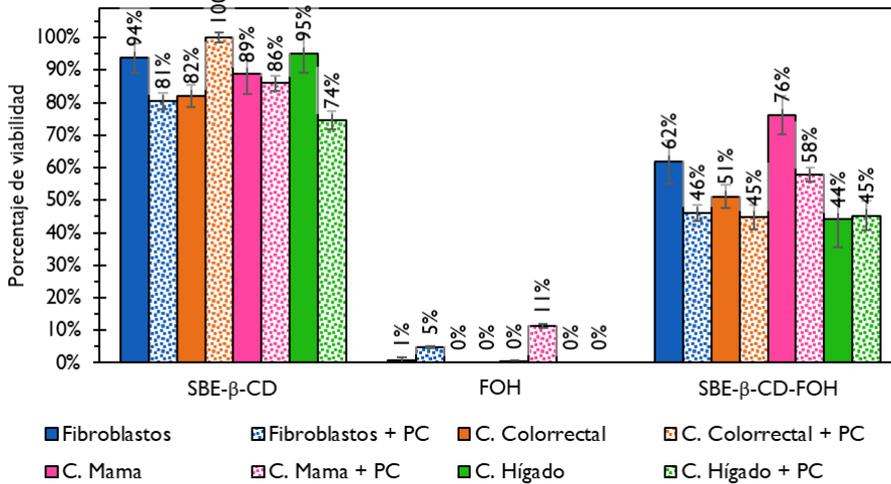


Figura 3.33 Resultados de viabilidad celular para cada línea celular tratada durante 24 (A) y 48 horas (B) en ausencia (columnas llenas) o presencia (columnas punteadas) de PC.

Analizando los resultados de la Figura 3.33, se concluye que la presencia de PC en el medio no influye en los resultados de viabilidad cuando se trata ciclodextrina durante 24 o 48 horas. Sin embargo, hay diferencias en los valores de viabilidad obtenidos tras tratar con FOH en forma libre o de complejo durante

24 y las 48 horas, puesto que, en el caso de 24 horas, los valores de viabilidad de todas las líneas eran mayores si había presencia de PC en el medio. No obstante, este efecto parece desaparecer a las 48 horas, donde la viabilidad celular de todas las líneas tratadas con FOH es casi nula, y se obtienen valores similares tras tratar con el complejo SBE- β -CD – FOH, siendo del 62 % y 46% en el caso de la línea de fibroblastos normales, y en lo que respecta a las cancerígenas: 51% y 45% en c. colorrectal, 76 % y 58 % en c. mama, y, 44 % y 45 % en c. hígado.

Una posible interpretación de este fenómeno podría relacionarse con el agotamiento de la PC disponible en el medio como se indica en la Figura 3.34.

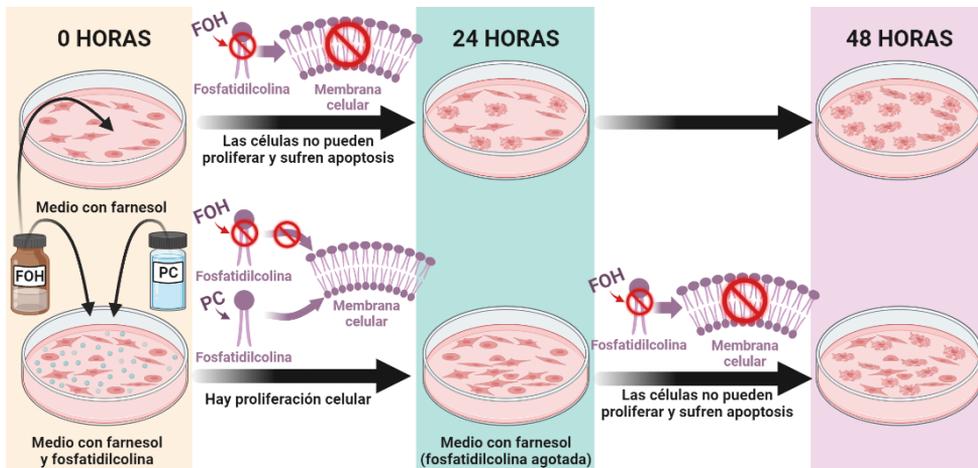


Figura 3.34 Efecto del farnesol (FOH) y de la fosfatidilcolina (PC) en la proliferación celular

En la Figura 3.34 se muestra como en las primeras 24 horas las células del medio que contiene farnesol no proliferan llegando a sufrir apoptosis. Mientras que las células cultivadas con un medio que contiene farnesol y fosfatidilcolina crecen en las primeras 24 horas, pero tras ese tiempo han consumido por completo toda la PC adicionada y tras otras 24 horas no hay proliferación celular y pueden sufrir apoptosis. Estos resultados sugieren que FOH es capaz de inhibir la acción de la CPD-colina impidiendo la síntesis de PC, con un notable efecto sobre la

proliferación de células tumorales. Además, la cantidad de PC presente en el medio podría controlar la reversibilidad del tratamiento.

3.7. Efecto del FOH en el ciclo celular

Una vez comprobado el efecto de PC en la viabilidad celular, se hizo un análisis de citometría de flujo con el fin de corroborar la hipótesis de que FOH actúa como un inductor de la detención del ciclo celular, provocando la apoptosis.

Para ello, se sembraron células de fibroblastos (HS-5) y cáncer colorrectal (HCT-116) en placas de 6 pocillos a una densidad de $2 \cdot 10^5$ células/pocillo, se incubaron durante 24 horas y, posteriormente, se trataron con SBE- β -CD, FOH y SBE- β -CD – FOH. Después de 24 y 48 horas de tratamiento las células se recogieron y se lavaron con PBS 1x. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 1 ml de solución de marcado de ADN, que contenía yoduro de propidio (CYT-PIR-25, Cytognos), y se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 minutos. Finalmente, el contenido de ADN de las células teñidas se analizó utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton-Dickinson) y el software Cell Quest.

Hay que tener en cuenta que, al utilizar placas de 6 pocillos en lugar de 24 pocillos, se necesitaba una concentración celular mayor que en las pruebas de viabilidad, por lo que había que probar diferentes concentraciones de los compuestos. Ya que para ver diferencias en el ciclo celular había que utilizar una dosis óptima, tal que redujese la viabilidad celular sin provocar la apoptosis total, por ello se utilizaron dos concentraciones para los complejos: 150 μ M y 300 μ M de FOH, lo que implicaba concentraciones de SBE- β -CD de 300 μ M y 600 μ M.

La Figura 3.35 A muestra los resultados de la citometría para células HS-5 y HCT-116 tratadas con la concentración de 150 μ M FOH y la Figura 3.35 B muestra el efecto en las mismas líneas con doble concentración de FOH (300 μ M). El uso

de estas dos concentraciones diferentes permitió identificar los efectos del complejo y el fármaco de forma libre en la detención del ciclo celular.

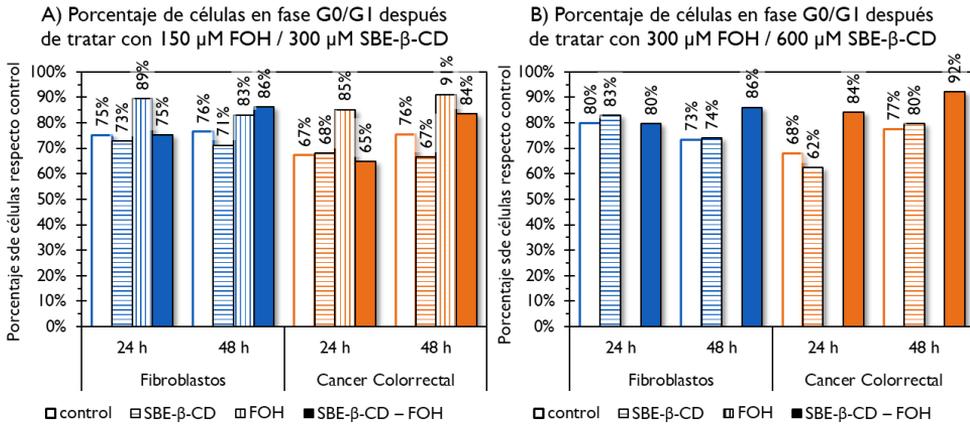


Figura 3.35 Porcentaje de células en fase G0/G1 después del tratamiento de fibroblastos y células de cáncer colorrectal durante 24 y 48 h; a diferentes concentraciones: (A) FOH 150 μ M y SBE- β -CD 300 μ M; (B) FOH 300 μ M y SBE- β -CD 600 μ M.

Como se observa en ambas gráficas de la Figura 3.35, SBE- β -CD no afectó la detención del ciclo celular, mientras que FOH provocó un aumento sustancial en la población G1/G0 debido a la activación de los mecanismos de detención del ciclo celular. Para una mejor comprensión, las diferencias porcentuales se calcularon y resumieron en la Figura 3.36.

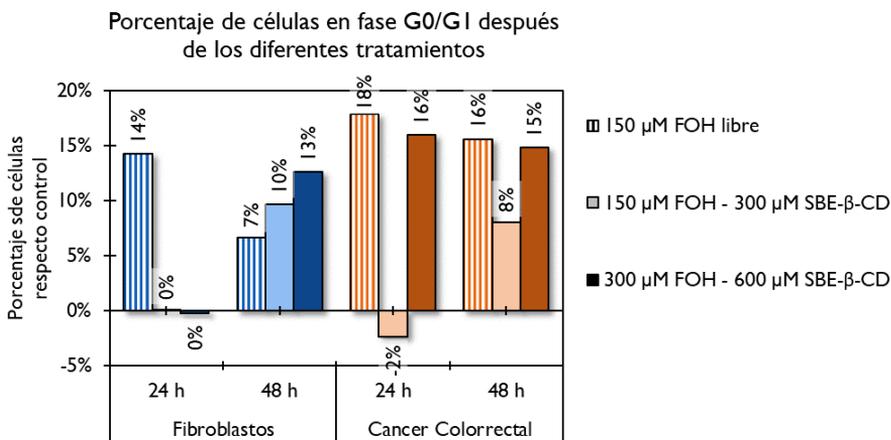


Figura 3.36 Diferencia en el porcentaje de células en fase G0/G1 respecto al control.

A la vista de los resultados mostrados en la Figura 3.36, todas las células fueron destruidas cuando estaban en presencia de FOH libre a 300 μM , mientras que una concentración de FOH a 150 μM aumentó el porcentaje de células en fase G0/G1 en ambas líneas celulares a las 24 h, aunque fue mayor en el caso de las células de cáncer colorrectal. Por otro lado, el complejo con una concentración de FOH de 150 μM no mostró efectos, con solo un ligero aumento a las 48 h. Sin embargo, cuando se usó FOH a 300 μM , el complejo aumentó el porcentaje de células de cáncer de colon en un 16 % después de 24 horas. A las 48 horas se mantuvo este aumento porcentual, mientras que las células normales aumentaron un 23 %.

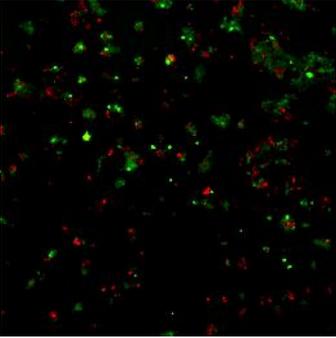
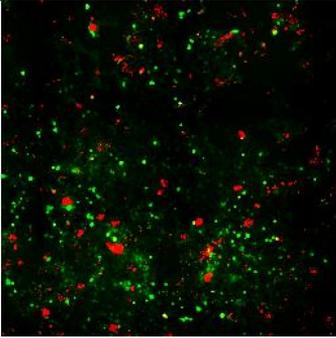
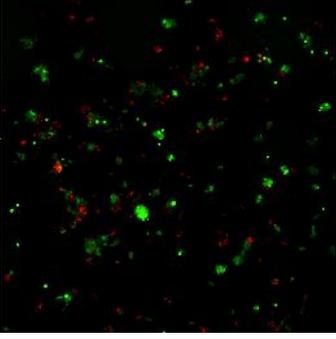
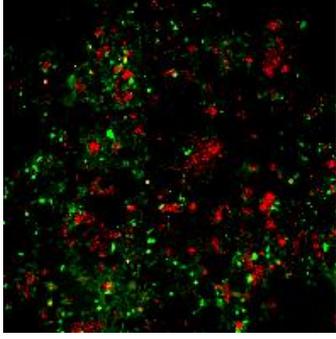
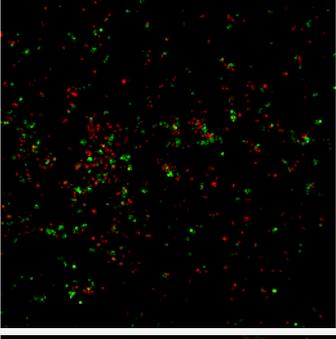
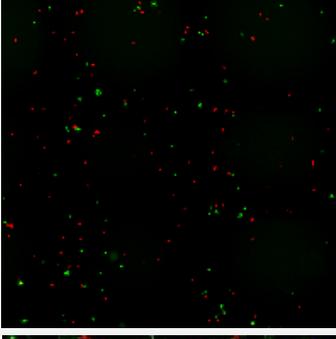
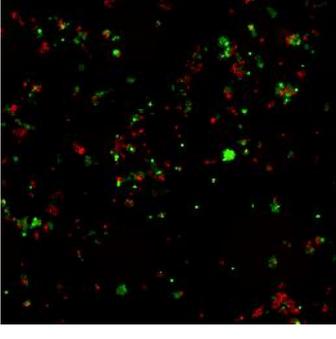
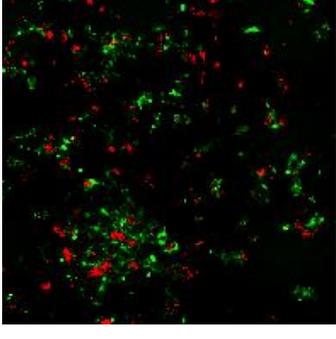
3.8. Validación de la selectividad del farnesol en un cocultivo

Con el fin de comprobar la especificidad del complejo SBE- β -CD - FOH, se estudió el efecto en la proliferación celular cuando coexisten en el mismo espacio las células cancerígenas de colon (HCT-116) y los fibroblastos sanos (HS-5). Para lo cual, se realizó un cultivo con ambas líneas celulares (cocultivo) [139].

Este ensayo consistió en marcar las células normales con un fluorocromo verde (Cell tracker TM Green CMFDA Dye, InvitrogenTM) y las cancerígenas con uno rojo (Cell tracker TM Red CMTPX Dye, InvitrogenTM). Después se cultivaron juntas en placas μ -Dish 35 mm de fondo plano de vidrio alto (Ibidi), en una densidad de $5 \cdot 10^4$ células de cada línea por placa (en total había $1 \cdot 10^5$ células por placa y 2 mL de medio). Se incubaron durante 24 horas, después se cambió el medio por otro con los tratamientos a estudiar (800 μM SBE- β -CD y 400 μM FOH, por separado y en forma de complejo), finalmente se tomaron imágenes por microscopía confocal [189; 190; 191].

En la Tabla 3.7 se muestran las imágenes de confocal después de tratar las células durante 24 y 48 horas.

Tabla 3.7 Imágenes obtenidas por microscopia confocal del cocultivo de las células cancerígenas de colon (teñidas de rojo) o normales (teñidas de verde) después de incubarse durante 24 y 48 horas con cada tratamiento

	24 HORAS DE TRATAMIENTO	48 HORAS DE TRATAMIENTO
CONTROL CELULAR		
SBE-β-CD (800 μM)		
FOH (400 μM)		
SBE-β-CD – FOH (800 μM / 400 μM)		

En las fotografías de la Tabla 3.7, se observa no hay diferencia en el crecimiento de células normales (verdes) y cancerígenas de colon (rojas) de la muestra control y la tratada con SBE- β -CD, ni a las 24 horas ni a las 48 horas. También, al tratar con farnesol libre durante 24 horas todas células pierden adherencia, lo que impide el crecimiento celular, además muestran una morfología más redondeada y pequeña, esto indica que están sufriendo un daño por la presencia de FOH, lo que acaba en apoptosis celular, como se puede ver en las imágenes tras 48 horas de tratamiento. Finalmente, en las células que se trataron con SBE- β -CD – FOH se veía menor cantidad de células cancerígenas de colón que en los fibroblastos normales a las 24 horas, pero este efecto era más notable tras 48 horas de tratamiento. Todo esto sugiere que sí hay una cierta selectividad.

4. Conclusiones

En primer lugar, los resultados de la caracterización de los complejos indicaron que la temperatura no influía significativamente sobre el proceso ni la cinética de complejación. Además, este proceso era instantáneo, obteniéndose que por cada 2 moles de SBE- β -CD se solubilizaba 1 mol de FOH, y por cada 5 moles de SBE- β -CD lo hacía 1 mol de P5. Conjuntamente, las muestras demostraron ser estables durante, al menos, 2 meses.

A continuación, se estudió la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) de cada uno de los compuestos en su forma libre y en forma de complejo. En el caso de SBE- β -CD era superior a 1 mM para todas las líneas celulares, por lo que se recomienda trabajar con concentraciones inferiores para evitar efectos significativos en la viabilidad celular.

Respecto a la pregnenolona, la IC_{50} tras 48 horas de tratamiento era de 227 μ M en la línea de cáncer colorrectal y 603 μ M para los fibroblastos normales, el problema era que SBE- β -CD – P5 requería unas concentraciones muy elevadas,

superiores a 1 mM de P5, lo que equivalía a 5 mM de la ciclodextrina. Al mismo tiempo, se observó que P5 libre precipitaba, por lo que no se podía saber la concentración exacta del compuesto en los ensayos de viabilidad, ni su forma de actuación al evitar la proliferación celular. Debido a estos problemas se decidió no seguir trabajando con P5.

Los resultados con el farnesol fueron prometedores, en su forma libre la IC₅₀ era de 62 μ M y 71 μ M para las líneas cancerígenas de colon e hígado, mientras que era de 101 μ M y 113 μ M para la cancerígena de mama y los fibroblastos normales. Esta selectividad se repetía en el caso de SBE- β -CD – FOH, ya que la IC₅₀ era de 254 μ M y 304 μ M de FOH para las líneas cancerígenas de colon e hígado, mientras que era de 304 μ M y 408 μ M de FOH para la cancerígena de mama y los fibroblastos normales.

Posteriormente, se validó el efecto terapéutico del complejo de farnesol utilizando una concentración de 150 μ M de FOH y 300 μ M de SBE- β -CD. Corroborando que tanto la línea cancerígena de colon como la de hígado reducían su viabilidad en un 50 %, mientras que la línea de cáncer de mama y los fibroblastos sanos mantenían su viabilidad en un 77 % y 62 % respecto al control. Mientras que en todas las líneas tratadas con FOH libre la viabilidad se redujo hasta el 0 %.

Seguidamente, se estudió si la toxicidad del farnesol dependía del tipo de isómeros utilizado, concluyendo que se obtenían resultados similares con el *mix* de isómeros que, con el isómero *trans, trans*. Este hecho supone una reducción de futuros costes en el caso de un posible tratamiento.

Para comprobar si la acción de FOH se debía a la inhibición de la síntesis de fosfatidilcolina (PC), se realizaron ensayos MTT añadiendo PC al medio celular y se demostró que la viabilidad se reducía en menor medida en su presencia. De este modo se corrobora que la inhibición de la CPD-colina es una de las vías de

acción de la FOH, algo que también se comprobó al estudiar el ciclo celular. Los resultados mostraron que el tratamiento con FOH, tanto en forma libre como de complejo aumentaba el porcentaje de células en fase G0/G1.

Finalmente, se obtuvieron imágenes por microscopia, en las que se advertía una reducción en la cantidad de células cuando se trataba con SBE- β -CD – FOH o FOH, especialmente tras 48 horas. En el caso del farnesol libre las células habían perdido la adherencia y tenían una morfología más redondeada, y en el caso del complejo se veían menos células rojas (cancerígenas de colón) que verdes (fibroblastos normales).

Por todo ello, se puede concluir que FOH es una alternativa prometedora como agente citostático en tratamientos contra el cáncer, especialmente en el caso del cáncer colorrectal. Esto abre la posibilidad de continuar investigando este compuesto, con el fin de poder llevar a cabo ensayos clínicos.

5. Artículos publicados relacionados con este capítulo

↪ de Dios-Pérez, I., González-Garcinuño, Á., & Martín del Valle, E. M. (2022).

An Approach to Minimize Tumour Proliferation by Reducing the Formation of Components for Cell Membrane.

Molecules, 27(9), 2735. <https://doi.org/10.3390/molecules27092735>

Article

An Approach to Minimize Tumour Proliferation by Reducing the Formation of Components for Cell Membrane

 Inmaculada de Dios-Pérez, Álvaro González-Garcinuño  and Eva María Martín del Valle * 

Department of Chemical Engineering, University of Salamanca, 37008 Salamanca, Spain; inmadedip@usal.es (I.D.D.-P.); alvaro_gonzalez@usal.es (Á.G.-G.)

* Correspondence: emvalle@usal.es; Tel.: +34-923-29-44-79

Abstract: Isoprenoids are natural compounds essential for a great number of cellular functions. One of them is farnesol (FOH), which can reduce cell proliferation, but its low solubility in aqueous solvents limits its possible clinical use as a pharmacological tool. One alternative is the use of cyclodextrins (CDs) which house hydrophobic molecules forming inclusion complexes. To assess FOH potential application in anticancer treatments, Sulfobutylated β -cyclodextrin Sodium Salt (SBE- β -CD) was selected, due to it has high solubility, approbation by the FDA, and numerous studies that ensure its safety to be administered parenterally or orally without nephrotoxicity associated. The therapeutic action of farnesol and complex were studied in different carcinoma cells, compared with a normal cell line. Farnesol showed selectivity, affecting the viability of colon and liver cancer cells more than in breast cancer cells and fibroblasts. All cells suffered apoptosis after being treated with 150 μ M of free FOH, but the complex reduced their cell viability between 50 and 75%. Similar results were obtained for both types of isomers, and the addition of phosphatidylcholine reverses this effect. Finally, cell cycle analysis corroborates the action of FOH as inducer of a G0/G1 phase; when the cells were treated using the complex form, this viability was reduced, reaching 50% in the case of colon and liver, 60% in fibroblasts, and only 75% in breast cancer.

Keywords: farnesol; phosphatidylcholine; phosphocholine cytidyltransferase; cyclodextrins; sulfobutylated β -cyclodextrin



Citation: de Dios-Pérez, I.;

 González-Garcinuño, Á.; Martín del Valle, E.M. An Approach to Minimize Tumour Proliferation by Reducing the Formation of Components for Cell Membrane. *Molecules* **2022**, *27*, 2735. <https://doi.org/10.3390/molecules27092735>

Academic Editor: Christian Mayer

Received: 17 March 2022

Accepted: 22 April 2022

Published: 24 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Cancer is considered one of the main social and economic concerns of the public health systems. It is currently the second most common cause of human mortality in the world after cardiovascular diseases. In 2020, cancer was responsible for approximately 10 million deaths worldwide [1]. Cytotoxic drugs are the most widely used cancer treatment, but their action is not selective, causing serious side effects. For this reason, the development of new treatments (with selective action) using cytostatic drugs is being studied. The main drawback of using cytostatic drugs is that they are less effective than traditional cytotoxic drugs, requiring longer treatments. However, prolonged use of cytostatics can have adverse effects [2].

Isoprenoids are natural compounds produced from a common precursor, mevalonate (a diagram of the isoprenoid pathway is summarized in Figure 1A). All isoprenoids are essential for numerous cellular functions, including cell signalling, lipid and protein synthesis, maintenance of membrane integrity, cell proliferation, cell cycle arrest, and apoptosis [3]. During recent years, there has been a growing interest in their potential clinical applications due to their multiple purposes in different treatments, including antifungal, antibacterial, antiviral, antitumour, antiparasitic, hypoglycaemic, anti-inflammatory, and analgesic use [4–6]. Moreover, some authors have identified that isoprenoids with hydroxy groups possess more anticancer activity than the corresponding compounds with hydrocarbon groups [7,8]. Different authors have suggested the possibility of using farnesol (FOH),

an isoprenoid with a hydroxy group, as an inducer of G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis in a variety of carcinoma cell types. These studies indicate that FOH can reduce cell proliferation, with half maximal inhibitory concentration (IC50) ranging from 25 to 250 μM [3,5,9–12].

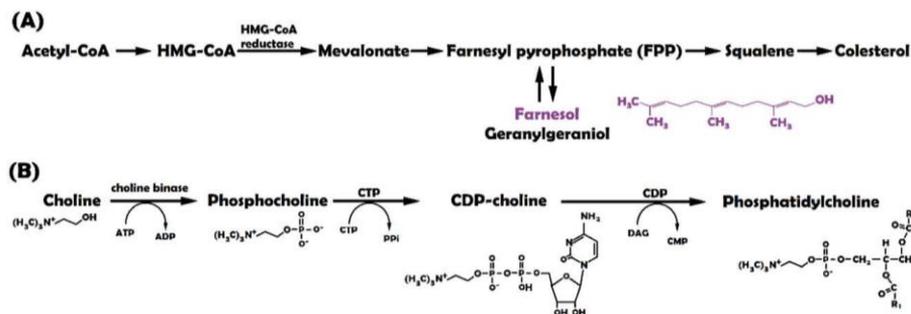


Figure 1. (A) Farnesol formation in mevalonate pathway [5]; (B) Phosphatidylcholine formation.

The first paper in which FOH showed selective toxicity was published by Adany et al. in 1994 [13]. According to the authors, tumour cells are generally more sensitive to farnesol-induced growth inhibition than normal cells. After 48 h of treatment using 10 μM FOH, the viability of neoplastic cell lines reduced up to 10%, and when the dosage reached 45 μM , all tumour cells suffered apoptosis [10,13,14]. Other articles have studied the mechanism of action of FOH, suggesting that it depends on different signalling pathways [4–6].

One of the most studied signalling pathways is related to cell membrane formation. The rapid proliferation of cancer cells requires an accelerated cell membrane formation. Several studies report that exogenous FOH modulates subcellular localization and activity of phosphocholine cytidylyltransferase (CTP), a rate-limiting enzyme in the cytidine diphosphate-choline (CDP-choline) pathway (Figure 1B). CTP participates in the biosynthesis of phosphatidylcholine (PC), which is one of the major membrane lipids (accounting for 50% of the total phospholipids in mammalian cells) and a precursor of lipid second messengers [15–19]. In this way, Voziyan et al. [20] studied the effect of 20 μM FOH on leukemic cells (CEM-C1). When FOH is added, CTP rapidly translocates to the nuclear envelope (NE) resulting in nucleoplasmic reticulum proliferation and a transient increase in CTP activity. CTP is subsequently exported from the nucleus to the cytoplasm, disrupting PC synthesis. In addition, the activation of caspases during farnesol-induced apoptosis results in CTP cleavage [5].

Other effects that have been reported for farnesol activity in tumour cells include: reduction in HMG-CoA reductase [21,22]; activation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) [4,9]; translocation of protein kinase C (PKC) from membrane fraction to cytosol [14]; inhibition of Janus-like kinase (JAK1 and JAK2) and induction of proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src (c-Src kinases) activation by the inhibition of a constitutive signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) [23]; an increase in the expression of the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitors p21 Cip1 and p27 Kip1, and a reduction in levels of cyclin A, cyclin B1, and protein Cdk2 [5,12]; and, finally, activation of caspases 3, 6, 7, and 9 [4,11,24].

Further FOH effects have been observed, but their influence on mammalian cell apoptosis is unknown. For example, FOH increases the levels of reactive oxygen species (ROS), activates the nuclear farnesoid X receptor (FXR), inhibits thyroid hormone receptor beta (THR β) mediated transcriptional activation, and inhibits Ca²⁺ signalling by blocking the plasma membrane channels [5,25]. In addition, FOH may inhibit cholesterol biosynthesis,

causing a reduction in the proliferation of tumour cells, as they require increased levels of cholesterol [9].

One drawback of the previously mentioned studies is the lack of information concerning the FOH isomers used (the chemical structure of FOH isomers is shown in Supplementary Material S1, Figure S1). Some studies do not mention which isomers have been used [21,26–28], while others only use trans-trans isomers (*E,E*-FOH) [25,29,30]. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) are nuclear receptors with multiple cellular functions. *E,E*-FOH has been reported to destabilize the transcriptional activation of PPAR-response elements (PPRE), while *Z,Z* isomers remain inactive [5,8]. However, *E,E*-FOH is five times more expensive than the mix of isomers. Thus, the application of these pure isomers would increase the cost of treatment and limit its clinical uses [21,30].

Although FOH acts as an anticancer agent, its low solubility in aqueous solvents (7.65×10^{-6} M in water) [31] narrows its possible clinical applications. Most isoprenoids are hydrophobic compounds, so organic solvents such as ethanol or dimethyl sulfoxide (DMSO) are needed when using them. However, these solvents have limited clinical application due to their toxicity above certain concentrations. A standard alternative to this drawback is the use of cyclodextrins (CD), oligomers composed of linked glucose monomers (glucopyranose).

The cyclic structure of CD consists of (α -1,4)-linked α -D-glucopyranose units and contains a lipophilic central cavity with the ability of housing hydrophobic molecules and forming inclusion complexes (the structural representation of SBE- β -CD is shown in Supplementary Material S1, Figure S2).

Recent studies have shown the benefits of the complexation of cyclodextrins and isoprenoids, which significantly improve the physicochemical, pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of drugs. For example, the use of a complex produced by hosting Aphidicolin (APH) in β -CD was analysed as a cancer treatment [32]. Cabral Silva et al. [33] use a β -CD and FOH inclusion complex to improve the physicochemical and pharmacological properties of FOH. However, the authors only determined which complexation method was more effective to reduce orofacial pain using an animal model, and the effects of the complex on cancer cells was not studied. Moreover, natural cyclodextrins, particularly β -cyclodextrin, have low aqueous solubility [34], limiting their applications. Therefore, to assess the potential application of FOH in anticancer treatments, Sulfobutylated β -cyclodextrin Sodium Salt (SBE- β -CD) was selected as a cyclodextrin because of its high solubility. In addition, SBE- β -CD has the approval of the Food and Drug Administration (FDA), facilitating potential future commercialization.

SBE- β -CD is a polyanionic cyclodextrin derived from β -CD that is functionalized with a sodium sulfonate salt separated from the lipophilic cavity by a butyl ether spacer group. This cyclodextrin is commercialized as captisol. Due to its structural advantages, it has higher interaction and solubility levels than other cyclodextrins. Furthermore, numerous preclinical and clinical studies assure SBE- β -CD is safe when administered parenterally or orally if used in safe concentration ranges already well-described in the literature, and it does not have the nephrotoxicity associated with traditional beta-cyclodextrins [32,34].

According to the previously mentioned facts, the main objective of this paper is the design and validation of a CD-FOH complex that acts on CDP-choline, reducing membrane formation selectively in cancer cells and, consequently, contributing to the suppression of tumour proliferation.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents

Farnesol 95% (FOH), *E,E*-Farnesol 96% (*E,E*-FOH), deuterium oxide (D₂O), Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, L- α -phosphatidylcholine 99% and Ribonuclease A were purchased from Sigma-Aldrich (Barcelona, Spain) and Sulfobutylated β -cyclodextrin Sodium Salt (SBE- β CD) was purchased on Cyclolab (CY-2041.2).

Phosphate Buffer Saline solution (pH 7.5) was prepared using 136.9 mM Sodium chloride (Sigma), 2068 mM Potassium chloride (Sigma), 10 mM Disodium hydrogen phosphate (Sigma) and 1 mM Potassium dihydrogen phosphate (Sigma). DNA labelling solution was obtained by Cytognos (CYT-PIR-25).

2.2. Inclusion Complex Formation

The inclusion complex consisted of a 1:1 molar proportion mixture of FOH and SBE- β -CD at a final concentration of 100 mM, using two types of solvents: D₂O for further characterization by nuclear magnetic resonance (NMR); and phosphate-buffered saline (PBS) to carry out *in vitro* tests.

2.2.1. Optimal Time for Complex Formation

The slurry method was followed to study the time required for complex formation [33]. CD and FOH were dissolved in 5 mL of PBS, both at a concentration of 100 mM, continuously stirring at room temperature for 48 h. Samples were taken from the medium at different times, frozen at -20°C in a conventional freezer and lyophilized with a LyoQuest -55 freeze dryer (Telstar, Tarragona, Spain). The lyophilized powder was suspended in D₂O to characterize the degree of complexation through NMR (as described in Section 2.2.4).

2.2.2. Temperature Effect on Complex Formation

The influence of temperature on complex formation was studied by dissolving CD and FOH in 0.5 mL of D₂O, at a concentration of 100 mM for both components. The effect of temperature was analysed by modifying the experimental conditions in the NMR spectrometer, from 25 to 65 $^{\circ}\text{C}$ with an interval of 10 $^{\circ}\text{C}$.

2.2.3. Stability Studies

Once the complex had been formed, the stability of the complex had to be determined. To this end, the tube containing the complex was kept at room temperature for one month, being periodically checked by NMR to quantify the release of FOH from the complex.

2.2.4. NMR

The NMR spectra were recorded using two different devices: a Bruker WEP-200-SY spectrophotometer at 200 MHz for ¹H from the Organic Chemistry Department of the University of Salamanca and a Bruker Avance Neo 400 MHz DRX with BBO cryoprobe spectrophotometer at 400 MHz for ¹H and 100 MHz for ¹³C from the Nuclear Magnetic Resonance Service of the University of Salamanca.

The proton chemical shifts (δ) were reported in parts per million (ppm), and the signals relative to the solvent residual peak as an internal standard of the solvent (D₂O—4.79 ppm) and tetramethylsilane (TMS 0.0 ppm). Coupling constants (J) have been expressed in hertz (Hz) and the following abbreviations have been used to explain multiplicities: s (singlet), d (doublet), t (triplet), c (quartet), q (quintuplet), dd (double doublet), dt (double triplet), and m (multiplet).

Spectra were analysed with MestReNova v6.0.5475 (Mestrelab Research S.L.). The FOH/SBE- β -CD molar ratios were calculated by direct NMR integration of their appropriate signals. The concentration of SBE- β -CD was constant at 0.1 mM and FOH concentration was calculated according to Equation (1):

$$[\text{FOH}] = \frac{\delta_{\text{FOH}}}{\delta_{\text{SBE-}\beta\text{-CD}}} \cdot \frac{MW_{\text{H}} \cdot n_{\text{H}}}{MW_{\text{H}} \cdot n_{\text{H}}} \cdot [\text{SBE-}\beta\text{-CD}] \quad (1)$$

2.2.5. UV Spectrophotometry

Spectrophotometry was carried out to corroborate the NMR results. Absorbance spectrums were performed on a Shimadzu UV-1800 spectrophotometer. The scan was performed for 3 repetitions at a fast measurement speed in a range of 900–190 nm with

a pitch of 2 nm. Finally, they were analysed with UVProbe Software (2.42, Shimadzu Scientific Instruments, Tokyo, Japan).

2.3. Validation of Inclusion Complex by In Vitro Tests

2.3.1. Cell Lines and Culture Conditions

To analyse the effects of the CD-FOH complex, four cell lines were used for in vitro studies (three tumour cells and a normal one): fibroblast normal HS5 (ATCC[®] CRL11882[™]), colorectal carcinoma HCT-116 (ATCC[®] CCL247[™]), hepatocellular carcinoma HepG2 (ATCC[®] HB8065[™]), breast carcinoma BT-474 (ATCC[®] HTB20[™]). The cell lines were obtained from the American Tissue Collection (Manassas, VA, USA).

All cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with 10% fetal bovine serum (DMEM+) (Gibco) and 1% penicillin-streptomycin (Corning). They were maintained at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. At 70–90% confluence, the cells were sub-cultured using 0.05% trypsin/EDTA 1 × (Gibco).

2.3.2. In Vitro Tests

To evaluate an anticancer agent, it is essential to determine its cytotoxicity with in vitro tests. Farnesol toxicity was evaluated in its free form (FOH in DMSO) and in the complex form (with SBE-β-CD in PBS).

The first step involved the calculation of the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of each treatment. Stock solutions of FOH at 50 mM were prepared and added to DMEM+, reaching final FOH concentrations between 0 and 750 μM, which implies a final DMSO concentration between 0 and 1.5% (vol). Cell viability was calculated as indicated below (Section 2.3.3). In order to perform a comparative trial of the treatments, the optimal dose was chosen following the same procedure as for the IC₅₀ test.

Given the price difference in FOH isomers, an analysis was carried out to observe if they presented any variation in cytotoxicity levels. Results of the mix of isomers were compared (under the optimal conditions determined in Section 2.2) with the use of single *E,E*-FOH (in free or complex form) to determine if the racemic mixture presented any difference in the therapeutic effect of FOH.

Finally, as mentioned in the introduction, one of the FOH mechanisms of action involves the inhibition of the CDP-choline enzyme. This inhibition reduces PC synthesis, decreasing cell membrane formation and, therefore, cell proliferation. Since normal cells have a slower growth rate and a correspondingly reduced need to create new membrane components, FOH is expected to affect them less [3]. To verify this statement, another in vitro culture was carried out by supplementing the cell medium using PC and monitoring the cell growth in the presence of FOH (free or complex) at the same concentration of PC.

2.3.3. Cell Viability

An MTT assay was performed in cells in exponential growth to measure cell viability. The cells were plated by quadruplicate in flat-bottomed 24-well plates (Falcon) at an initial concentration of 16,000 cells per well. Plates were incubated for 24 h in a 5% CO₂ humidified incubator, and cell viability was tested by incubating cells with different treatments dissolved in DMEM+. In all tests, plates included medium control and cell control.

The MTT assay is a colorimetric assay to determine the cytotoxicity of certain drugs (measuring cell viability). Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide dissolved in PBS at 5 mg/mL was added to the cells (20 μL/well), reacting with living cells and producing violet formazan crystals. After incubation at 37 °C for 1 h, the DMEM+ medium was removed, and the crystals were dissolved by adding 0.5 mL DMSO. Absorbance was measured using ultraviolet light (λ = 550 nm) by means of an EZ Read 2000 Microplate Reader (Biochrom). Cell viability was calculated as indicated in Equation (2) [30].

$$\begin{aligned} & \text{cell viability (\%)} \\ &= \frac{\text{average OD wells} - \text{average OD wells medium control}}{\text{average OD control wells} - \text{average OD wells medium control}} \end{aligned} \quad (2)$$

2.3.4. Cell Cycle Analysis

Flow cytometry analysis was carried out in order to corroborate the hypothesis sustaining that FOH acts as an inducer of cell cycle arrest, causing apoptosis [3,12,23].

Fibroblast (HS-5) and colorectal cancer (HCT-116) cells were seeded onto 6-well plates at a density of 2×10^5 cells/well and stabilized by incubating them for 24 h at 37 °C. After treatment using FOH for 24 h and 48 h, the cells were collected and washed with $1 \times$ PBS. Cell pellets were resuspended in 1 mL of DNA labelling solution, which contained propidium iodine (CYT-PIR-25, Cytognos, Santa Marta de Tormes, Spain), and stained for 30 min at room temperature in the dark. The DNA contents of the stained cells were analysed using Cell Quest Software with a FACScan Calibur flow cytometry (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

In this experiment, 6-well plates were used instead of the 24-well ones, therefore needing a higher cell concentration than in the viability tests. Two different FOH concentrations were tested since the optimal dose had to reduce cell viability but not cause total apoptosis (150 µM for free FOH and 300 µM for FOH in its complex form with cyclodextrin).

2.4. Statistical Analysis and Parameters Estimation

The data analysis was performed using Statgraphics Centurion XVI Version 16.1.03 (StatPoint Technologies, Inc. 1982–2010, Warrenton, VA, USA). This procedure performed a one-way analysis of variance (ANOVA) for absorbance at 550 nm (MTT assay). The F-test in the ANOVA table determined if there were significant differences between the means. Differences were considered significant with a confidence interval of 95% ($p < 0.05$).

The data from the previously described IC50 tests were used to model the response of cell lines to FOH treatment. IC50 was calculated by parameter estimation (Hessian) of Equation (3), which expresses the variation of cell viability in percentage (y) according to the dose administered (D):

$$\frac{dy}{dD} = \frac{-100 \cdot n \cdot \left(\frac{D}{IC_{50}}\right)^n}{D \left[\left(\frac{D}{IC_{50}}\right)^n + 1\right]^2} \quad (3)$$

where n is the order of the inhibition and the IC50 expresses the dose at which the inhibition process reaches 50% of the cells. All the simulations were carried out by considering the cell viability results at 48 h.

The equation was implemented in gPROMS 6.0 (PSE) and a Hessian estimation was carried out by parameter estimation (n and IC50 are estimated). The constant variance model was selected and the sensor for parameter estimation was fixed as a function of the viability variable (y) in a range between 0.005 and 0.10.

Boundary conditions were set for each parameter: IC50 could take values from 10 µM to 2000 µM and n could take values from 0.1 to 10. For statistical analysis, the goodness of fit was performed by comparing the value of weighted residuals (WR) with the chi-square value (χ^2) and a confidence interval of 95%. On the other hand, the lack of fit test was performed by comparing the F-value with F-critical. The accuracy of a model is generally considered precise if the value of WR is less than χ^2 and the F-value is lower than F-critical.

Parameter estimation was performed in a personal computer Intel Core I3 3.70 GHz and 4 GB RAM.

3. Results and Discussion

The results section begins with a description of complex formation, followed by the results of in vitro tests. Firstly, the dose-response results are shown, both for the free form drug and the complex. Secondly, once the IC50 had been established, a comparative test of

the free form drug and the complex at the same concentration is described. Finally, the last two assays compare pure FOH and a mixture of isomers, as well as how the addition of PC would reverse the action of FOH.

3.1. Complex Formation (SBE- β -CD-FOH and SBE- β -CD-E,E-FOH)

Firstly, the complex formation was studied following the methodology described in Section 2.2. The amount of FOH included in SBE- β -CD cyclodextrin was determined by NMR, comparing the complex spectrum and SBE- β -CD spectrum (Figure 2). One single peak was identified for FOH at 4.35–4.75 ppm. As this peak did not overlap with the signal of SBE- β -CD, it could be used for quantifying the yield of complexation. The established CD concentration for this experiment (100 mM) presented another single peak at 5.4 (without interferences).

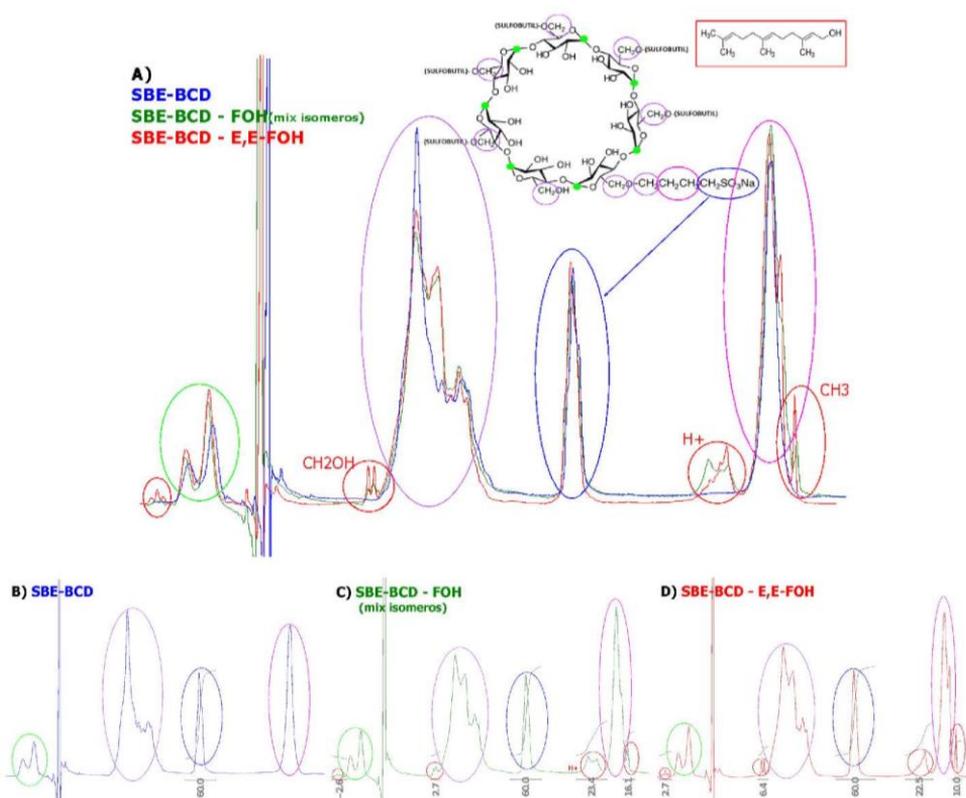


Figure 2. NMR Spectra of SBE- β -CD (B), complex with FOH isomer mixture (C), complex E,E-FOH (D), and its comparative (A).

By comparing the integral value for both peaks, it was possible to estimate the amount of FOH included in the well (the calculation of proportion ratio FOH-CD is shown in Supplementary Material Equation (S3)). The results indicated that there were 2 moles of CD for each mole of FOH. Based on this numerical result, a conformation of the inclusion

complex could be proposed. Figure 3 indicates a possible structure of the inclusion complex based on the results of stoichiometry (2:1).



Figure 3. Formation cyclodextrin—drug inclusion complexes [35].

In terms of complex stability, no significant differences were found in the spectra of the samples collected at different times for one month. Moreover, temperature does not affect the inclusion rate and the complexation process can be considered instantaneous. (The series of NMR spectra are presented in Supplementary Material S1 Figures S4 and S5).

The spectrum of the sample can be compared with the spectra of serial dilutions of the different types of FOH dissolved in ethanol (Supplementary Material S1, Figure S6). In this way, the amount of FOH obtained is consistent with the results from the NMR.

Size and zeta potential were analysed by DLS (Supplementary Material S1, Figure S7); it is possible to observe that results offer a particle size around 1–2 nm, which is the size reported in literature for cyclodextrins; however, this is the detection limit of DLS technique, and therefore the results are not conclusive.

3.2. Therapeutic Effect (In Vitro Tests)

3.2.1. Dose-Response Modelling

According to the Materials and Method sections, parameters of the dose-response model were predicted by Hessian estimation using gPROMS software. Table 1 showed the results of the parameters estimated (IC₅₀ and n) for the four cell lines studied (fibroblasts, colorectal, breast, and liver). Moreover, the table presents the values of statistical analysis (variance value, goodness of fit and lack of fit test) as well as some data related to execution (the number of non-linear iterations and the CPU time required). Likewise, a graphical representation of IC₅₀ is presented in Figure 4.

Table 1. Parameter estimation for fitting the data to dose-response curve.

Cell Line	Treatment	IC ₅₀ (uM)	n	Weighted Residuals	X2	F-Value	F-Critical	NLP Iterations	CPU Time (s)	Variance (%)
LIVER (HepG2)	CD	1215	1.3	7	9.5	0.8	4.1	23	0.9	3.20
	FOH-CD	152	2.7	7	9.5	0.8	4.1	52	2.8	2.80
	FOH	62	2.9	7	9.5	0.8	4.1	13	0.4	4.10
BREAST (BT-474)	CD	1605	1.6	7.1	9.5	0.8	4.1	19	0.6	5.50
	FOH-CD	243	4.2	7	9.5	0.8	4.1	23	1.0	2.00
	FOH	101	6	7	11.1	0.4	4	12	0.4	10.0
COLORECTAL (HCT-116)	CD	1039	0.9	9	12.6	0.5	3.4	31	1.1	3.70
	FOH-CD	127	1.9	9	12.6	0.8	4.1	14	0.4	5.60
	FOH	71	2.7	9	12.6	0.5	3.4	38	1.5	6.40
FIBROBLAST (HS-5)	CD	1191	1	9	12.6	0.5	3.4	28	0.6	2.70
	FOH-CD	204	3.2	7	9.5	0.8	4.1	16	0.7	4.00
	FOH	113	6.7	10	14.1	0.4	3.1	15	0.4	8.60

n: parameter from IC₅₀ model, X2: chi-squared value, NLP: nonlinear programming.

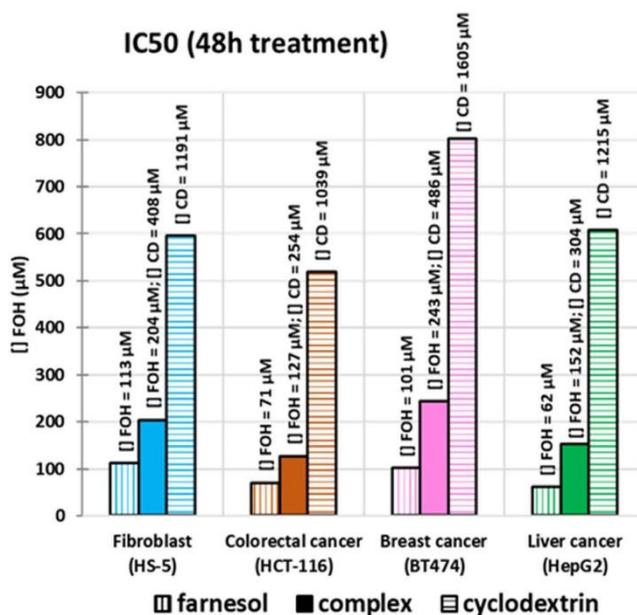


Figure 4. Graphical representation of IC50 estimation for FOH (vertically hatched columns), CD (horizontally hatched columns), and the complex (filled columns) in four cancer cell lines (blue—fibroblast, orange—colorectal, pink—breast, green—liver).

According to Table 1, IC50 for CD is considerably higher than the one for FOH and the complex. Therefore, the toxicity of CD can be considered negligible for the doses to be used. In general, the inclusion of FOH in CD doubled the IC50. There is a significant difference between two cancer cell lines (liver and colorectal) and normal cell lines (fibroblasts). This difference can be an advantage for treatment, as it implies that the inclusion is selective towards cancer cells without damaging normal ones.

All the estimations have passed both tests (goodness of fit and lack of fit), with an average of 24 iterations. Most of them had a CPU time of less than 1 s, and a variance average of 4.9% (with only one simulation on the 10% limit).

The curve fitting graphs are presented in the Supplementary Material S2 (S8). The results from IC50 were used for the design of the next experiments to validate the therapeutic effect.

3.2.2. FOH Effects on Cell Viability

Based on the results predicted by the Hessian estimation previous described, a comparative test of the treatments (free FOH and SBE-β-CD—FOH complex) was carried out with a final FOH concentration of 150 μM. Figure 5 shows cell viability results for each of the cell lines treated using CD and FOH separately, and in the complex form after comparing the average absorbance with their respective control at each time.

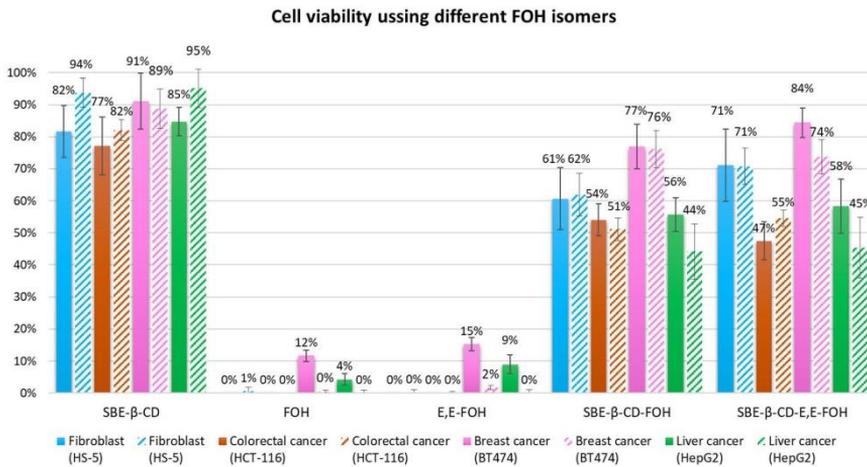


Figure 5. Cell viability results of each cell line treated for 24 h (filled columns) and 48 h (hatched columns).

The difference between absorbances is better appreciated after 48 h, making the results more reliable (Figure 5). At this time, CD control did not show a significant decrease in viability, except in the case of the liver line, in which it only reduced up to 80%. The complexes showed less reduction in cell viability than the free form. Viability of colon and liver cells remained at 50%, while free FOH reduced it up to 31–36% respectively. In the case of the breast line, there was a smaller difference between the free form and the complex, where the viability was 85% and 74%, respectively. The best results were obtained by the normal cell line, since free FOH reduced its viability up to 61%, and the complex had a lower inhibition, keeping it above 80%.

3.2.3. FOH Isomers Effect on Cell Viability

As it was mentioned in the introduction, the previous studies in literature have only used one type of FOH isomer (*E,E*-FOH). However, due to its high price, it was necessary to study if a mix of isomers offered the same result as the purified isomer (*E,E*-FOH). According to Figure 5, there are no significant differences between the different types of FOH (neither the free form nor the complex). Hence, it is not necessary to use *E,E*-FOH. This would reduce the cost of a potential treatment with this isoprenoid, as its price is 10% of the one for trans-trans isomer.

3.2.4. PC Effect of FOH on Cell Viability

Finally, in order to corroborate the mechanism used by FOH to reduce cell proliferation (by inhibiting the CDP-choline enzyme), another *in vitro* culture test was carried out. For this test, 150 μM of phosphatidylcholine (PC) was added to the cell medium following the protocol described in Section 2.3.3. Figure 6 shows the results of this experiment, indicating that controls were not significantly altered by the presence of PC, except in the case of the breast line, where an increased proliferation was observed. Cell viability in cells treated using FOH is increased in the presence of PC at 24 h, but this effect disappears at 48 h (it is shown in Supplementary Material S3, Figures S9 and S10).

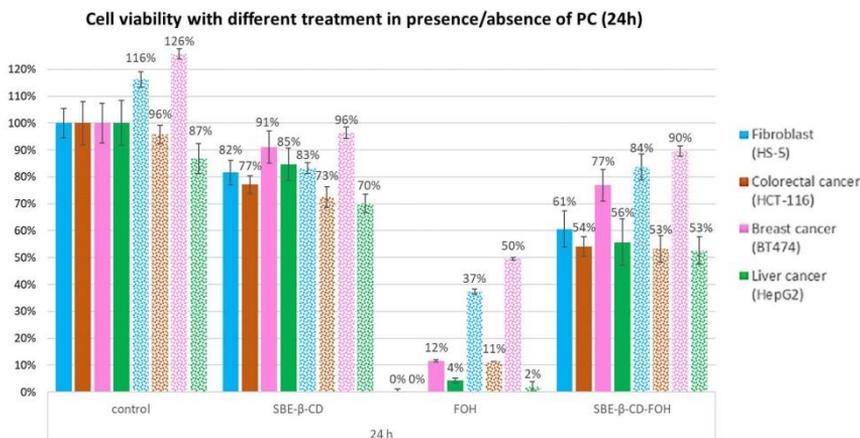


Figure 6. Cell viability results for each cell line treated for 24 h in absence (filled columns) or presence (dotted columns) of PC.

A possible explanation for this phenomenon could be that cells may have consumed all the available PC in the medium. These results indicate that the inhibition of CPD-choline is one of the main FOH pathways of action, having a remarkable effect on tumour cell proliferation. In addition, the amount of PC available in the medium would control the reversibility of the treatment.

3.3. Cell Cycle Analysis

To determine the effect FOH has on the cell cycle, propidium iodide-stained cells were analysed using flow cytometry as described in Section 2.3.4. Figure 7A shows the results of cytometry for HS5 and HCT116 cells treated with 150 μM FOH and Figure 7B shows the effect in the same lines with double FOH concentration (300 μM). The use of these two different concentrations allowed us to identify the effects of the complex and the free form drug in cell cycle arrest.

In both cases, CD at this concentration did not affect cell cycle arrest, whereas FOH caused a substantial increase in the G1/G0 population due to the activation of cell cycle arrest mechanisms. For a better understanding, the percentage differences were calculated and summarized in Figure 7C.

The original graphics was obtained using Infinicyt programme, and they are shown in Supplementary Material S5, Figure S11.

Free FOH at 300 μM destroyed all cells, and FOH at 150 μM increased the percentage of cells in G0/G1 phase in both cell lines after 24 h, although it was higher in the case of colorectal cancer cells. The complex with an FOH concentration at 150 μM showed no effects, with just a slight increase after 48 h. However, when using FOH at 300 μM, the complex increased the percentage of colon cancer cells by 16% after 24 h. After 48 h, this percentage increase was maintained, while normal cells increased by 23%.

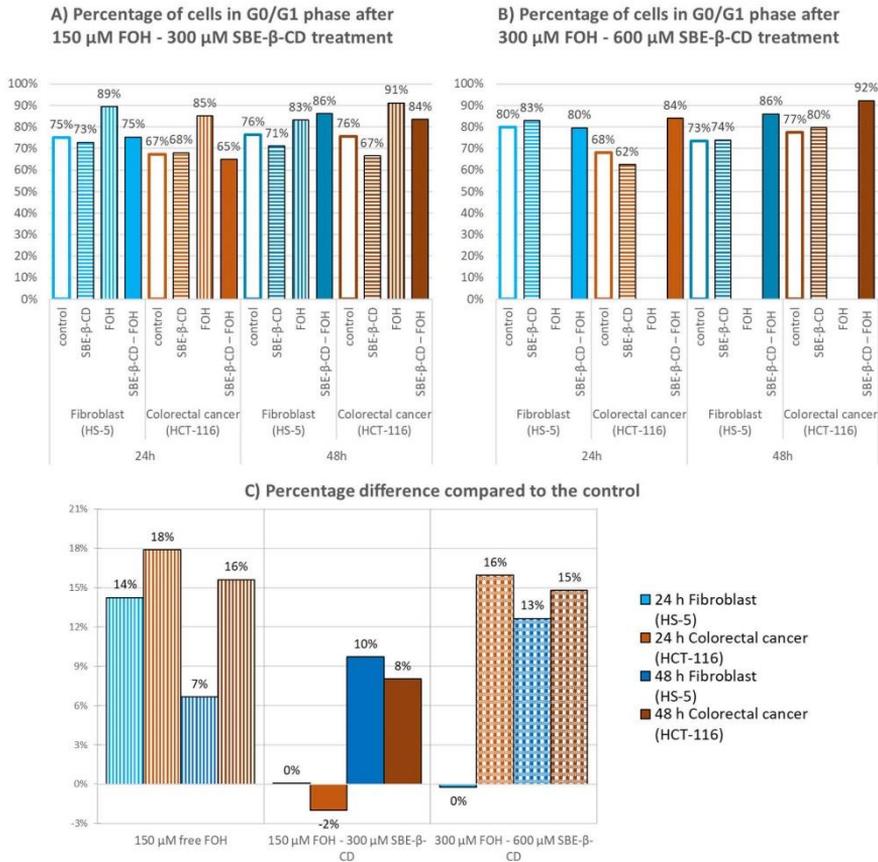


Figure 7. Percentage of cells in G0/G1 phase after treatment of fibroblast and colorectal cancer cells for 24 and 48 h; (A) Concentration of treatments is FOH 150 µM and SBE-β-CD 300 µM; (B) Concentration of treatments is FOH 300 µM and SBE-β-CD 600 µM. (C) Difference in the percentage of cells in G0/G1 phase compared to the control.

4. Conclusions

According to the tests performed, temperature had no effects on the complexation process or complexation kinetics. The obtained results presented no difference, and the complexation process was instantaneous, obtaining a solution containing 1 mole of FOH for every 2 moles of CD.

Regarding cell viability assays, FOH was selective, and it affected the viability of colon and liver cancer cells more than breast cancer cells and fibroblasts. The IC50 values obtained for free FOH were 71, 62, 101, and 113 µM, while the concentrations obtained for the inclusion complex were 127, 152, 243, and 204 µM. When the free form of FOH at 150 µM was used, the cell viability was reduced up to 0%. However, cell viability was reduced when the cells were treated using the complex form, reaching 50% in the case of colon and liver, 60% in fibroblasts, and only 75% in breast cancer.

In addition, both types of isomers obtained the same results, which indicates a potential reduction in the cost of future cancer treatments.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules27092735/s1>, Figure S1: Chemical structure of FOH isomers; Figure S2: Cyclodextrin structure; Figure S3: Calculation of proportion ration FOH-CD; Figure S4: Series of NMR spectra (stability); Figure S5: Series of NMR spectra at different temperatures; Figure S6: UV-Vis spectrums of dilutions of different types of FOH; Figure S7: DLS and Z-potential; Figure S8: Curve fitting for IC50 estimation; Figure S9: Effect of external addition of PC; Figure S10: variation of cell viability (48 h) in presence of PC; Figure S11: ANOVA tables; Figure S12: cell phase results.

Author Contributions: Conceptualization, Á.G.-G. and E.M.M.d.V.; methodology, I.d.D.-P.; software, Á.G.-G.; validation, I.d.D.-P. and Á.G.-G.; resources, E.M.M.d.V.; writing—original draft preparation, I.d.D.-P.; writing—review and editing, Á.G.-G. and E.M.M.d.V.; supervision, E.M.M.d.V.; project administration, E.M.M.d.V.; funding acquisition, E.M.M.d.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This project was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (CTQ2016-78988-R); the project Non-cytotoxic nanoparticles for promoting a double metabolic inhibition of tumour growth: Cancer cell as a biochemical reactor, financed by the Spanish Ministry of Science and Innovation (PID2019-108994RB-I00).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: Inmaculada de Dios Pérez would like to particularly acknowledge the Spanish Ministry of Education (BES-2017-080001) for her PhD grant (FPI). The authors would like to acknowledge the Organic Chemistry Department for their collaboration, the Nuclear Magnetic Resonance Service, and the Cytometry Service of the University of Salamanca for their contribution to the NMR tests and cell cycle analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the compounds SBE- β -CD, E,E-FOH, mix isomers of FOH and the complex are available from the authors.

References

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global cancer statistics 2020. GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin. Adv. Online Publ.* **2021**, *71*, 209–249. [CrossRef] [PubMed]
2. Millar, A.W.; Lynch, K.P. Rethinking clinical trials for cytostatic drugs. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 540–545. [CrossRef] [PubMed]
3. Miquel, K.; Pradines, A.; Tercé, F.; Selmi, S.; Favre, G. Competitive inhibition of choline phosphotransferase by geranylgeraniol and farnesol inhibits phosphatidylcholine synthesis and induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 26179–26186. [CrossRef]
4. Araújo, G.; Souza, D.; Queiroz, D.; Souza, A.; Moura, I.; Lins, G.; Felipe, P.; Bandeira, R.; Barbosa, R.; Douglas, H.; et al. Toxicological and pharmacologic effects of farnesol (C₁₅H₂₆O): A descriptive systematic review. *Food Chem. Toxicol.* **2019**, *129*, 169–200.
5. Joo, J.H.; Jetten, A.M. Molecular mechanisms involved in farnesol-induced apoptosis. *Cancer Lett.* **2010**, *287*, 123–135. [CrossRef]
6. Jung, Y.Y.; Hwang, S.T.; Sethi, G.; Fan, L.; Arfuso, F.; Ahn, K.S. Potential Anti-Inflammatory and Anti-Cancer Properties of Farnesol. *Molecules* **2018**, *23*, 2827. [CrossRef]
7. Kuete, V.; Efferth, T. Molecular determinants of cancer cell sensitivity and resistance towards the sesquiterpene farnesol. *Die Pharm.* **2013**, *68*, 608–615.
8. Nickerson, K.W.; Atkin, A.L.; Hornby, J.M. Quorum sensing in dimorphic fungi: Farnesol and beyond. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 3805–3813. [CrossRef]
9. Joo, J.H.; Liao, G.; Collins, J.B.; Grissom, S.F.; Jetten, A.M. Farnesol-induced apoptosis in human lung carcinoma cells is coupled to the endoplasmic reticulum stress response. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 7929–7936. [CrossRef]
10. Rioja, A.; Pizzey, A.R.; Marson, C.M.; Thomas, N.S.B. Preferential induction of apoptosis of leukaemic cells by farnesol. *FEBS Lett.* **2000**, *467*, 291–295. [CrossRef]

11. Scheper, M.A.; Shirliff, M.E.; Meiller, T.F.; Peters, B.M.; Jabra-Rizk, M.A. Farnesol, a fungal quorum-sensing molecule triggers apoptosis in human oral squamous carcinoma cells. *Neoplasia* **2008**, *10*, 954–963. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Wiseman, D.A.; Werner, S.R.; Crowell, P.L. Cell cycle arrest by the isoprenoids perillyl alcohol, geraniol, and farnesol is mediated by p21(Cip1) and p27(Kip1) in human pancreatic adenocarcinoma cells. *J. Pharmacol.* **2007**, *320*, 1163–1170. [[CrossRef](#)]
13. Adany, I.; Yazlovitskaya, E.M.; Haug, J.S.; Voziyan, P.A.; Melnykovych, G. Differences in sensitivity to farnesol toxicity between neoplastically- and non-neoplastically-derived cells in culture. *Cancer Lett.* **1994**, *79*, 175–179. [[CrossRef](#)]
14. Yazlovitskaya, E.M.; Melnykovych, G. Selective farnesol toxicity and translocation of protein kinase C in neoplastic HeLa-S3K and non-neoplastic CF-3 cells. *Cancer Lett.* **1995**, *88*, 179–183. [[CrossRef](#)]
15. Anthony, M.L.; Zhao, M.; Brindle, K.M. Inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis following induction of apoptosis in HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 19686–19692. [[CrossRef](#)]
16. Lagace, T.A.; Ridgway, N.D. Induction of apoptosis by lipophilic activators of CTP, phosphocholine cytidylyltransferase alpha (CCTalpha). *Biochem. J.* **2005**, *392*, 449–456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Melnykovych, G.; Haug, J.S.; Goldner, C.M. Growth inhibition of leukemia cell line CEM-C1 by farnesol: Effects of phosphatidylcholine and diacylglycerol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *186*, 543–548. [[CrossRef](#)]
18. Taylor, M.M.; Macdonald, K.; Morris, A.J.; McMaster, C.R. Enhanced apoptosis through farnesol inhibition of phospholipase D signal transduction. *FEBS J.* **2005**, *272*, 5056–5506. [[CrossRef](#)]
19. Wright, M.M.; Henneberry, A.L.; Lagace, T.A.; Ridgway, N.D.; McMaster, C.R. Uncoupling farnesol-induced apoptosis from its inhibition of phosphatidylcholine synthesis. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 25254–25261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Voziyan, P.A.; Goldner, C.M.; Melnykovych, G. Farnesol inhibits phosphatidylcholine biosynthesis in cultured cells by decreasing cholinephosphotransferase activity. *Biochem. J.* **1993**, *295*, 757–762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Miquel, K.; Pradines, A.; Favre, G. Farnesol and geranylgeraniol induce actin cytoskeleton disorganization and apoptosis in A549 lung adenocarcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *225*, 869–876. [[CrossRef](#)]
22. Ong, T.P.; Heidor, R.; de Conti, A.; Dagli, M.L.; Moreno, F.S. Farnesol and geraniol chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve similar actions on cell proliferation and DNA damage, but distinct actions on apoptosis, plasma cholesterol and HMGCoA reductase. *Carcinogenesis* **2006**, *27*, 1194–1203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Lee, J.H.; Kim, C.; Kim, S.H.; Sethi, G.; Ahn, K.S. Farnesol inhibits tumor growth and enhances the anticancer effects of bortezomib in multiple myeloma xenograft mouse model through the modulation of STAT3 signaling pathway. *Cancer Lett.* **2015**, *360*, 16391–16399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Joo, J.H.; Ueda, E.; Bortner, C.D.; Yang, X.P.; Liao, G.; Jetten, A.M. Farnesol activates the intrinsic pathway of apoptosis and the ATF4-ATF3-CHOP cascade of ER stress in human T lymphoblastic leukemia Molt4 cells. *Biochem. Pharmacol.* **2015**, *97*, 256–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Rouillet, J.B.; Luft, U.C.; Xue, H.; Chapman, J.; Bychkov, R.; Rouillet, C.M.; Luft, F.C.; Haller, H.; McCarron, D.A. Farnesol inhibits L-type Ca²⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32240–32246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Burke, Y.D.; Stark, M.J.; Roach, S.L.; Sen, S.E.; Crowell, P.L. Inhibition of Pancreatic Cancer Growth by the Dietary Isoprenoids Farnesol and Geraniol. *Lipids* **1997**, *32*, 151–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Epplen, R.; Stöckle, M.; Engelmann, U.; Heidenreich, A.; Ohlmann, C.H. Differential effects of ibandronate, docetaxel and farnesol treatment alone and in combination on the growth of prostate cancer cell lines. *Acta Oncol.* **2011**, *50*, 127–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Wang, Y.L.; Liu, H.F.; Shi, X.; Wang, Y. Antiproliferative activity of Farnesol in HeLa cervical cancer cells is mediated via apoptosis induction, loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) and PI3K/Akt signalling pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2018**, *23*, 752–757.
29. Joo, J.H.; Jetten, A.M. NF-kappaB-dependent transcriptional activation in lung carcinoma cells by farnesol involves p65-RelA(Ser276) phosphorylation via the MEK-MSK1 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 16391–16399. [[CrossRef](#)]
30. Duncan, R.E.; Archer, M.C. Farnesol induces thyroid hormone receptor (THR) beta1 but inhibits THR-mediated signaling in MCF-7 human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *343*, 239–243. [[CrossRef](#)]
31. Horev, B.; Klein, M.I.; Hwang, G.; Li, Y.; Kim, D.; Koo, H.; Benoit, D.S. pH-activated nanoparticles for controlled topical delivery of farnesol to disrupt oral biofilm virulence. *ACS Nano* **2015**, *9*, 2390–2404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Carneiro, S.B.; Duarte, F.I.C.; Heimfarth, L.; Quintans, J.S.S.; Quintans-Junior, L.J.; Junior, V.V.; de Lima, A.A.N. Cyclodextrin-Drug Inclusion Complexes. In Vivo and In Vitro Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Silva, J.C.; Alcantara, L.F.; Soares, J.M.D.; Silva, M.G.; Lavor, E.M.; Andrade, V.M.; Menezes, P.; Araújo, A.A.; Leite, L.H.I.; Menezes, I.R.A.; et al. Docking, characterization and investigation of β -cyclodextrin complexed with farnesol, an acyclic sesquiterpene alcohol, produces orofacial antinociceptive profile in experimental protocols. *Process Biochem.* **2017**, *62*, 193–204. [[CrossRef](#)]
34. Magnusdottir, A.; Masson, M.; Loftsson, T. Cyclodextrins. *J. Incl. Phenom. Macroc. Chem.* **2002**, *44*, 213–218. [[CrossRef](#)]
35. Kfoury, M.; Landy, D.; Fourmentin, S. Characterization of Cyclodextrin/Volatile Inclusion Complexes: A Review. *Molecules* **2018**, *23*, 1204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Capítulo 4

-

USO DE EXOSOMAS PARA TRATAMIENTOS TERAPÉUTICOS EN EL CÁNCER COLORRECTAL

1. Introducción

En el capítulo anterior se demostró que el farnesol (FOH) tenía la capacidad de inhibir la proliferación celular, al impedir la síntesis de fosfatidilcolina, y, por tanto, la formación de membranas celulares. Además, se determinó que la IC₅₀ del FOH, tanto en su forma libre como en forma de complejo (SBE- β -CD – FOH) era menor para la línea cancerígena de colon que para la línea de fibroblastos normales. Lo cual indica una acción selectiva, haciendo que el farnesol resulte interesante para una potencial aplicación terapéutica en cáncer.

Sin embargo, en los ensayos de viabilidad de la pregnenolona (P5), se observó que este compuesto precipitaba cuando se añadía en forma libre al medio celular, y aunque en la forma acomplejada (SBE- β -CD – P5) se disolvía correctamente, no reducía significativamente la viabilidad celular.

Por todo ello, se descartó el uso de P5 y se decidió continuar estudiando nuevas formas de aumentar la selectividad de FOH, a la par que se planteaba una alternativa al uso de P5.

1.1. Nanotecnología en el desarrollo de nuevas terapias oncológicas

Como se indica en la introducción de esta tesis (capítulo 1), en el desarrollo de terapias anticancerígenas existen numerosos sistemas de administración de fármacos (DDS), cuyo fin es garantizar una liberación controlada de los fármacos actuando sobre las células cancerígenas, minimizando su exposición a los tejidos sanos [2; 69; 70; 72]. En lo referente a la producción de DDS, la nanotecnología ha supuesto una gran revolución, puesto que, debido a su tamaño nanométrico, los nuevos DDS tienen una alta relación superficie/volumen y son capaces interactuar con biomoléculas del interior y de la superficie de las células [78; 79; 80]. Sin embargo, debido a la acción del sistema inmune, solo el 0.7 % de la dosis de las nanopartículas administrada por vía parental llegan a un tumor sólido [106; 107;

192]. Con el fin de asegurar la integridad de los DDS en el torrente sanguíneo, han surgido nuevas investigaciones que proponen para su formación el uso de compuestos que se encuentren de forma natural en el cuerpo humano. En este ámbito, se ha estudiado el potencial de los exosomas para albergar compuestos hidrofóbicos o lipófilos.

Los exosomas son vesículas biológicas secretadas por todo tipo de células y desempeñan un papel clave en la regulación de procesos biológicos y en la transferencia de información entre células en el entorno extracelular. Debido a su tamaño nanométrico, son capaces de atravesar membranas biológicas sin provocar respuesta inmune, funcionando como vehículos de fármacos [107 – 108].

Uno de los principales desafíos asociados a las NPs radica en el fenómeno conocido como “efecto corona”, como se muestra en la Figura 4.1. Cuando las nanopartículas entran en el torrente sanguíneo entran en contacto con las biomoléculas presentes en el medio, incluyendo proteínas y lípidos. Estas moléculas de la sangre terminan adsorbidas a la superficie de las nanopartículas. Esto puede provocar una respuesta inmunológica, haciendo que los macrófagos fagociten dichas nanopartículas. Mientras que los exosomas al ser vesículas que se encuentran de forma natural en el cuerpo, pueden interactuar con los componentes del entorno biológico, pero sin dar lugar a esa formación de la corona de proteínas. Esto resulta en que, a diferencia de las nanopartículas, los compuestos presentes de forma natural en el cuerpo humano, como lípidos y exosomas son capaces de evitar la detección por parte del sistema inmune.

Por tanto, puede concluirse que el uso de exosomas se presenta como una alternativa prometedora en comparación con las nanopartículas para el transporte eficaz de fármacos y la regulación de procesos biológicos, puesto que supone una estrategia más efectiva y biocompatible.

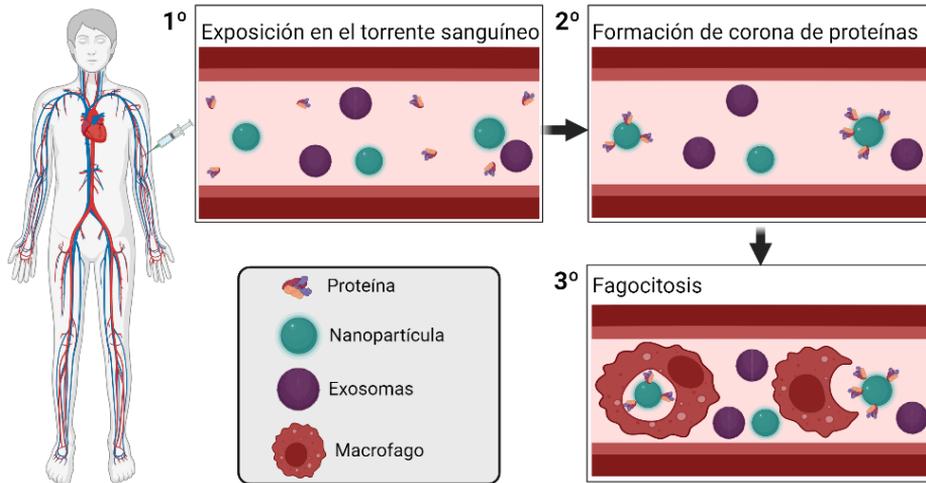


Figura 4.1 Acción del sistema inmune contra las nanopartículas. Fuente: elaboración propia.

1.2. Los exosomas como vehículos de fármacos

La estructura de los exosomas (Figura 4.2) está formada por una membrana lipídica de doble capa compuesta por fosfolípidos. Dentro de esta estructura, se albergan diversas moléculas biológicas cuya composición varía según la célula de origen y el método de aislamiento. Sin embargo, en términos generales, se incluyen [107 – 108; 193]:

1. **Material genético** en forma de **ARN** de diversos tipos, incluyendo ARN mensajero (ARNm), ARN ribosómico (ARNr), ARN de transferencia (ARNt), microARN (miARN) y ARN largos no codificantes (lncARN). Además, en ocasiones, pueden contener fragmentos de ADN de origen genómico o mitocondrial. Estos ácidos nucleicos pueden ser transferidos a las células receptoras, pudiendo tener un impacto en la regulación génica.
2. **Lípidos** tanto en la membrana (fosfolípidos y colesterol) como en el interior, que pueden influir en la función y la estabilidad de los exosomas.
3. **Metabolitos** que son parte de las vías metabólicas celulares: como aminoácidos, nucleótidos y otras pequeñas moléculas.
4. **Iones**, que pueden desempeñar un papel en la señalización celular.

5. **Proteínas de adhesión:** se encuentran en la membrana lipídica de los exosomas y son las tetraspaninas (CD9, CD63 y CD81), esenciales para la interacción entre células.
6. **Proteínas de carga:** son proteínas específicas relacionadas con su función biológica, involucradas en procesos de choque térmico (HSP90 y HSP70), de transporte y fusión (ATPasas, anexinas y flotilinas), o en la biogénesis de cuerpos multivesiculares (Alix y TSG101).

De acuerdo con la bibliografía consultada, a día de hoy no se ha identificado la presencia de proteínas exclusivas de los exosomas que no estén también presentes en la célula de origen. Aunque, cabe destacar que habitualmente se utilizan como identificadores de exosomas las proteínas CD63, CD81, CD9 y HSP70 [193].

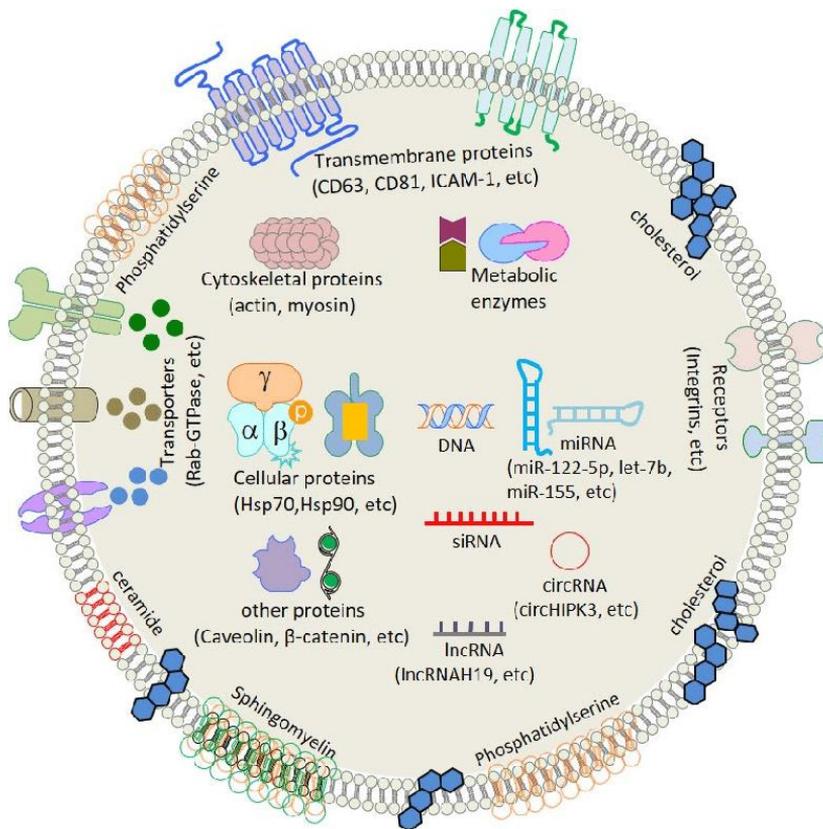


Figura 4.2 Estructura y composición del exosoma. Figura de Jan et al. [193]

Teniendo en cuenta su estructura, los exosomas presentan características adecuadas para utilizarse como vehículos de fármacos. De hecho, hay numerosas investigaciones en las que se ha estudiado las formas de incorporar fármacos en exosomas procedentes de un cultivo celular. Estas técnicas de carga se pueden clasificar principalmente en tres (Figura 4.3) [194]:

- I. **Incubación o carga pasiva:** el fármaco está en contacto con la célula donante, con el fin de que el exosoma incorpore la sustancia durante su formación, para que finalmente sea secretado al medio celular.
- II. **Carga activa *in vitro*:** en las células parentales se introduce ADN (transfección) que codifica compuestos terapéuticamente activos, para que la sustancia se sintetice en el exosoma antes de ser secretado.
- III. **Carga activa *ex vitro*:** el exosoma se aísla del cultivo celular y, después, se incorpora el fármaco.

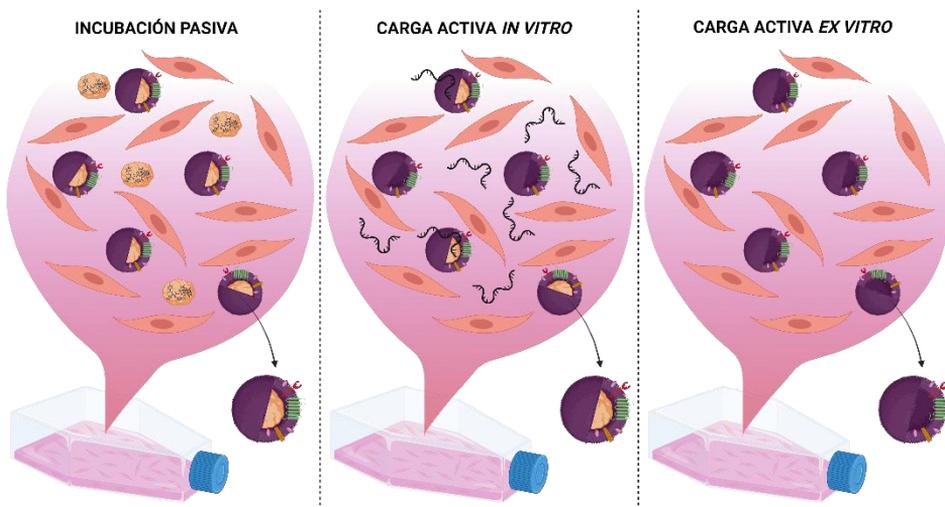


Figura 4.3 Técnicas de carga de fármacos en los exosomas. Fuente: elaboración propia.

Cada técnica tiene sus ventajas y sus limitaciones. Así, en la incubación pasiva el fármaco puede causar daño celular e impedir la producción de exosomas, y la carga activa *in vitro* requiere un procedimiento más complejo. Por tanto, puede

concluirse que, si se desea producir gran cantidad de exosomas de forma sencilla, la carga activa *ex vitro* es la más adecuada [111; 194]. En ese caso, los fármacos se pueden incorporar a los exosomas aislados, principalmente por los 6 métodos indicados en la Figura 4.4.

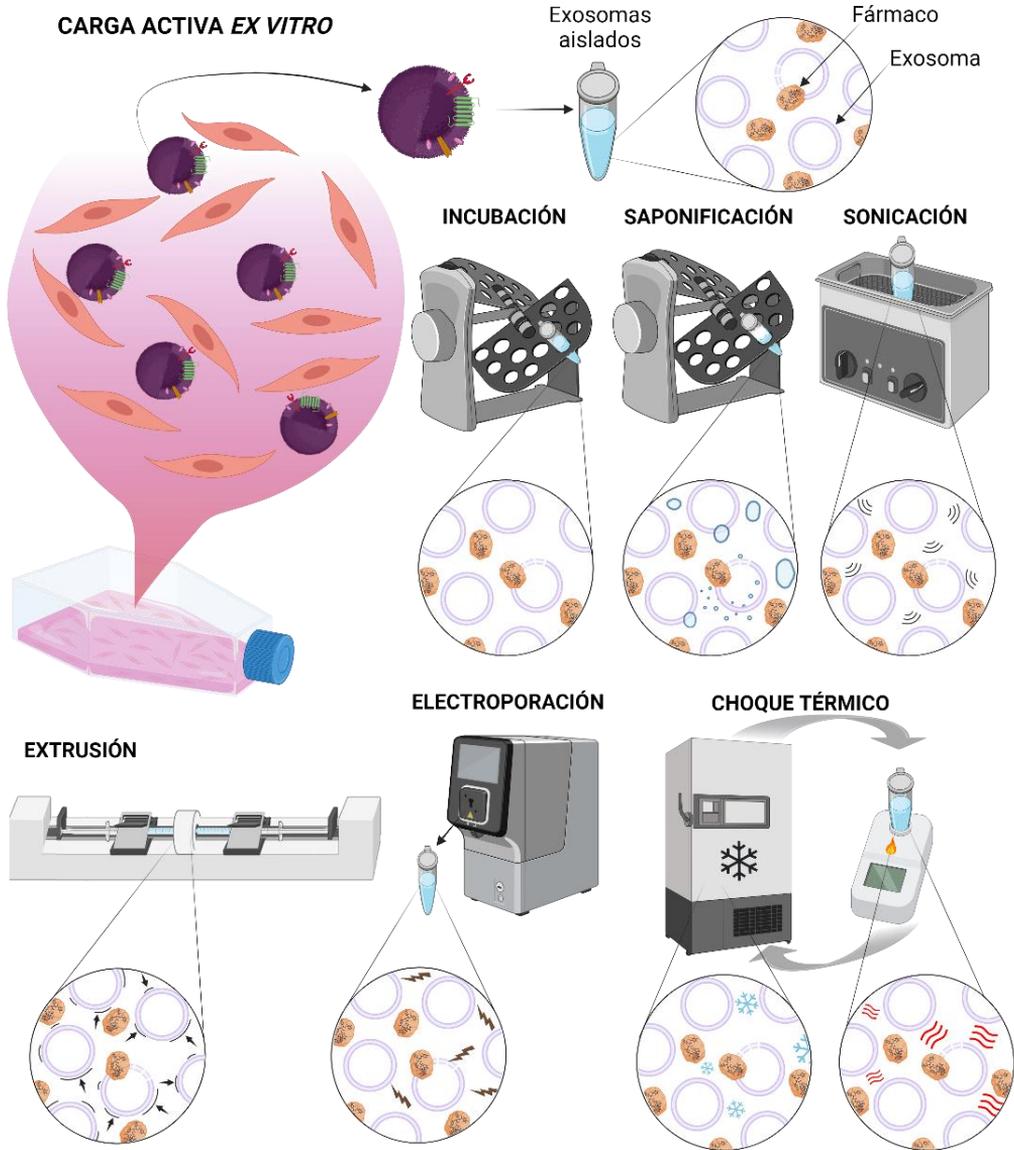


Figura 4.4 Métodos de carga de exosomas aislados. Fuente: elaboración propia.

1.3. Uso de Paclitaxel para evitar la reprogramación metabólica

Como se ha mencionado al inicio de este capítulo, con el fin de desarrollar un tratamiento más eficaz contra el CCR, se decidió utilizar exosomas como vehículos para mejorar la selectividad de FOH y P5, para que actúen de forma sinérgica contra las células cancerosas, con el fin de evitar la resistencia celular a diferentes fármacos [5; 7]. Sin embargo, puesto que en el capítulo anterior se concluyó que P5 no era una opción válida, se buscó un compuesto que actuase de forma sinérgica con FOH. Por lo que, se decidió trabajar con un fármaco citotóxico antineoplásico ampliamente descrito en bibliografía y utilizado habitualmente como tratamiento en diferentes tipos de tumores sólidos: paclitaxel (PTX). Este compuesto se extrajo por primera vez en 1962, y desde que recibió la aprobación de la FDA en 1992, se utiliza ampliamente como medicamento de quimioterapia bajo el nombre de *Taxol*. La citotoxicidad de PTX se debe a que altera el equilibrio dinámico dentro del sistema de microtúbulos, impidiendo su despolimerización y bloqueando a las células en el Fase G2 y M del ciclo celular, inhibiendo la replicación celular de diferentes tumores sólidos, como el CCR [195; 196; 197]. En la Figura 4.5 se muestran los mecanismos de actuación de FOH y PTX para impedir la proliferación celular.



Figura 4.5 Mecanismos de actuación del farnesol y el Paclitaxel para impedir la proliferación celular. Fuente: elaboración propia.

Otro motivo para utilizar PTX es la existencia de artículos que abordan la carga de este fármaco en exosomas (Exo_{PTX}), por tanto, el uso de exosomas para liberar de forma conjunta PTX y FOH puede permitir una actuación sinérgica en un potencial tratamiento. Un ejemplo es el estudio de Kim *et al.*, en el cual se llevaron a cabo experimentos *in vitro* donde PTX fue cargado en exosomas derivados de células HELA (adenocarcinoma cervical humano). Los resultados de esta investigación revelaron que la IC₅₀ de Exo_{PTX} era menor que la de PTX en su forma libre. A pesar de que sus resultados fueron prometedores, es importante señalar que no se efectuaron ensayos en células normales para determinar si la acción de PTX es selectiva [119].

2. Aislamiento y caracterización de exosomas

A lo largo de este capítulo, se detallan los ensayos realizados utilizando los exosomas como vehículos de fármacos. El objetivo principal de estos experimentos es utilizar los exosomas para transportar dos compuestos que actúen de forma sinérgica contra el cáncer colorrectal: FOH, un agente citostático que inhibe la proliferación de células cancerosas, y PTX, un agente citotóxico capaz de inducir la muerte celular. Para lograrlo, se aislaron los exosomas de un cultivo de células de cáncer de colon (línea HCT-116). La idea detrás de este enfoque es dirigir específicamente estos exosomas hacia las células cancerosas homotípicas, permitiendo que los agentes terapéuticos actúen directamente sobre las células cancerosas sin afectar a las normales. Esto tiene el potencial de reducir los efectos secundarios perjudiciales asociados a los tratamientos convencionales contra el cáncer [108; 111; 194; 198 – 200].

Finalmente, se llevará a cabo una comparación de los resultados de toxicidad obtenidos con los exosomas aislados de la línea de células de cáncer de colon con los resultados obtenidos utilizando exosomas aislados de una línea de fibroblastos normales (línea HS-5). De esta forma se evaluará la selectividad y la eficacia de los exosomas como vehículos de fármacos en el tratamiento del cáncer [108; 111; 194; 198 – 200].

2.1. Producción de exosomas y su aislamiento del medio

Para el aislamiento de exosomas se sembraron $2 \cdot 10^6$ células en matraces T150, con 15 mL de DMEM* (medio suplementado con FBS libre de exosomas) y se incubaron durante 72 horas a 37 °C y 5 % CO₂, para que secreten los exosomas. Después, se recogió el medio de cultivo y se centrifugó 15 minutos a 3000 g, para eliminar restos celulares, y nuevamente 30 minutos a 15000 g, para eliminar otras microvesículas del sobrenadante. Finalmente, los exosomas se aislaron siguiendo dos técnicas diferentes: precipitación basada en polímeros y ultracentrifugación. Ambos procesos de aislamiento se representan gráficamente en la Figura 4.6 y se describen detalladamente a continuación.

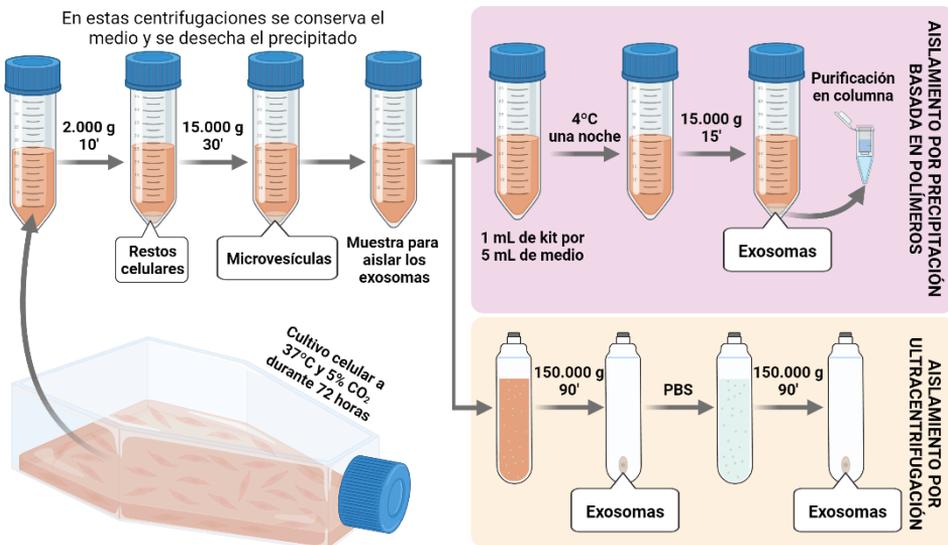


Figura 4.6 Esquema del proceso de aislamiento de exosomas a partir de cultivos celulares mediante 2 métodos: precipitación basada en polímeros y ultracentrifugación. Fuente: elaboración propia.

2.1.1. Precipitación basada en polímeros

El aislamiento realizado mediante precipitación basada de polímeros se llevó a cabo utilizando el kit comercial ExoQuick-TC® ULTRA de System BioSciences y siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

En este procedimiento, el sobrenadante, que previamente había sido sometido a centrifugación, se mezcló con la solución comercial que contenía

polímeros que provocan la precipitación de exosomas, en una proporción de 1 mL de solución por cada 5 mL de sobrenadante. Esta mezcla se mantuvo a una temperatura de 4 °C durante toda la noche, posteriormente, se centrifugó durante 15 minutos a 15000 g, obteniéndose el sedimento que contenía los exosomas aislados. Este precipitado se resuspendió en una solución de PBS (solución salina tamponada con fosfato) y los exosomas se purificaron utilizando las columnas de resina incluidas en el kit.

2.1.2. Aislamiento por ultracentrifugación

Las muestras, previamente centrifugadas, se ultracentrifugaron a 150000 g durante 90 minutos para obtener los exosomas totales y otras sustancias que debían eliminarse. Para obtener un mayor grado de pureza, el sedimento se resuspendió en PBS y se centrifugó nuevamente a 150000 g durante 90 minutos para lavar los exosomas, eliminando los residuos de componentes no deseados. Finalmente, se resuspendieron en PBS.

2.2. Caracterización de exosomas

Una vez aislados, los exosomas se caracterizaron de 4 formas diferentes:

- 1) Cuantificación de la **concentración proteica**, la cual es proporcional a la concentración de exosomas.
- 2) Identificación de proteínas que habitualmente se expresan en la superficie de los exosomas por **inmunotransferencia**.
- 3) Estudio de su morfología mediante análisis por **Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)**.
- 4) Determinación del tamaño y carga superficial de los exosomas mediante el método de **dispersión dinámica de la luz (DLS) y potencial zeta (ZP)**.

Para comparar los resultados de todos los ensayos de caracterización, estos se realizaron de forma simultánea con las muestras obtenidas del aislamiento de exosomas desde tres medios: de un cultivo de células cancerígenas (Exo ^{HCT-116}), de uno de fibroblastos normales (Exo ^{HS-5}) y de uno sin células, como control.

2.2.1. Análisis de concentración proteica

El contenido de proteína total se cuantificó utilizando el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA. Este análisis contiene dos reactivos: reactivo de Biuret (que contiene cobre en forma de Cu^{2+}) y ácido bicinconínico (BCA). Se fundamenta en que las proteínas reaccionan con el cobre (Cu^{2+}) en condiciones alcalinas, reduciéndolo a Cu^+ , obteniéndose una coloración azul. Y para obtener una detección más sensible, el BCA reacciona con Cu^+ , formando un complejo soluble en agua de coloración púrpura intenso, cuya absorbancia se mide a 562 nm. Este kit, también incluye una solución de albúmina de suero bovino (BSA) con una concentración proteica conocida; de tal forma que se puede realizar una recta de calibrado para cuantificar la concentración de proteínas en las muestras problema.

De este modo, el ensayo se realizó mezclando cada muestra de exosomas con el reactivo de trabajo en una proporción 1:8, seguidamente se incubó a 60 °C durante 30 minutos. Y finalmente, se midió la absorbancia a 562 nm en un Nanodrop (BioDrop μ Lite) [201]. De forma simultánea, se realizó la curva de calibrado de albúmina sérica bovina (BSA) representada en la Figura 4.7 A, para determinar la concentración proteica presente en cada muestra, cuyos resultados se muestran en la Figura 4.7 B.

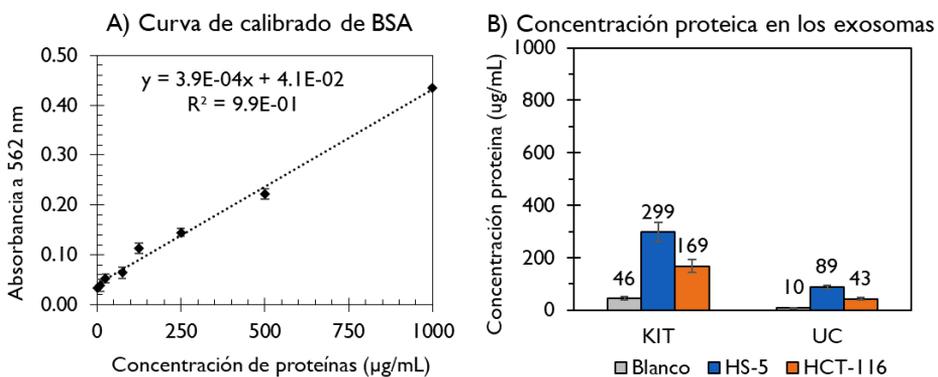


Figura 4.7 A) Curva de calibrado de Albúmina Sérica Bovina (BSA). B) Cálculo de la concentración proteica en las muestras tras el aislamiento por precipitación basada en polímeros (kit) o por ultracentrifugación (UC), desde el medio de cultivo sin células o con las líneas celulares HS-5 o HCT-116

En la Figura 4.7 B se observa una mayor concentración proteica en todas las muestras que se aislaron mediante el método por precipitación utilizando el kit. Sin embargo, surgieron ciertos problemas, ya que los controles de las muestras no deberían mostrar presencia de proteínas. En el caso del control de ultracentrifugación, se obtuvo una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$, un valor que carece de relevancia significativa, ya que se encuentra dentro del margen del error experimental. Por otro lado, el control del kit mostró una concentración de proteínas más elevada, alcanzando los 46 $\mu\text{g/mL}$, mientras que la concentración en la muestra de Exo^{HCT-116} aislados por ultracentrifugación era de 43 $\mu\text{g/mL}$. Este hecho planteaba la posibilidad de que los reactivos empleados en el kit pudiesen estar interfiriendo en la cuantificación de proteínas.

2.2.2. Análisis de inmunotransferencia

Una vez determinada la cantidad proteica, se llevó a cabo un ensayo de inmunotransferencia, también conocida como Western Blot (WB), con el fin de confirmar que las proteínas presentes correspondían a los característicos de los exosomas. De este modo se verificaba la presencia de Exo en las muestras.

WB permite detectar proteínas de interés mediante el empleo de anticuerpos específicos. De tal forma que primero se realiza una electroforesis en gel de la muestra, para separar las proteínas en función de su tamaño. Después, esas proteínas se transfieren a una membrana. Y finalmente, se incuba la membrana con anticuerpos que permiten la identificación de proteínas específicas en una muestra. El protocolo llevado a cabo para la identificación de las proteínas de exosomas, fue el siguiente:

- 1°) Lisar las muestras con tampón RIPA en una proporción de 1:1, con un cóctel de inhibidores de proteasa durante 30 minutos a 4 °C. De esta forma se rompen los exosomas y se obtienen las proteínas libres.

- 2°) Adicionar tampón Laemly 4x a las muestras lisadas en una proporción de 1:3 y mantener 5 minutos a 95 °C y, después, enfriar en 15 minutos hielo, para promover la desnaturalización de las proteínas.
- 3°) Separar las proteínas por su tamaño mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio al 10% (SDS-PAGE).
- 4°) Transferir las proteínas a membranas de PVDF (GE Healthcare).
- 5°) Bloquear las membranas, para ello se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con TBS-TL.
- 6°) Incubar a 4 °C toda la noche: la membrana con uno de los anticuerpos primarios del kit ExoAb Antibody diluido 1: 1000 en TBS-TL. Finalizar, lavando la membrana con TBS-T.
- 7°) Incubar la membrana 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (dilución 1:20000 en TBS-TL). A continuación, lavar la membrana con TBS-T.
- 8°) Cubrir la membrana con sustrato Super Signal™ West Pico Plus durante 5 minutos y visualizar con ChemiDoc™ MP (Bio-Rad).

Este procedimiento se realizó con los 4 anticuerpos primarios del kit ExoAb Antibody, ya que cada anticuerpo sirve para identificar proteínas que es habitual encontrar en los exosomas: CD63, CD81, CD9 y HSP70. En todas las membranas se analizó una muestra de cada línea celular (o del control) siguiendo ambos métodos de aislamiento: kit ExoQuick TC® ULTRA (Control_{kit}, Exo^{HCT-116}_{kit}, Exo^{HS-5}_{kit}) o ultracentrifugación (Control_{UC}, Exo^{HCT-116}_{UC}, Exo^{HS-5}_{UC}). Además, siempre se incluía un marcador de peso molecular, ya que cada una de las proteínas exhibe una señal en función de su peso molecular: CD63 a 53 kDa, CD81 a 26 kDa, CD9 a 28 kDa y HSP70 a 70 kDa. En la Figura 4.8 se muestran las imágenes de las cuatro membranas procesadas con el software ImageLab (Bio-Rad).

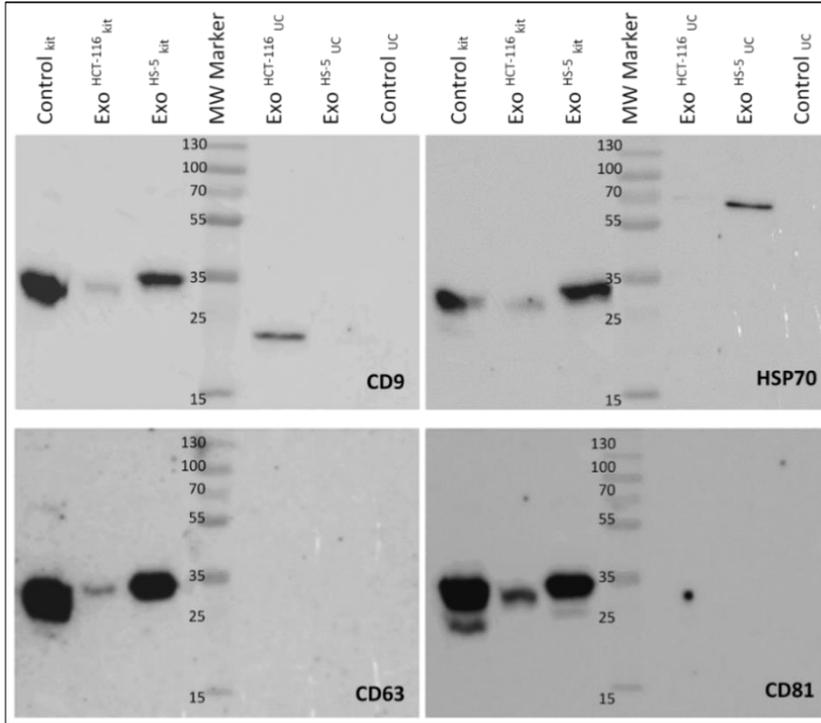


Figura 4.8 Análisis de transferencia Western para determinar la presencia de marcadores de proteínas exosomales CD9 (28 kDa), HSP70 (50-70 kDa), CD63 (53 kDa) y CD81 (26 kDa). Los exosomas fueron aislados de las muestras del cultivo de HCT-116, del cultivo de HS-5 y del medio de control, mediante dos métodos de aislamiento: kit ExoQuick-TC® ULTRA (Control kit, Exo^{HCT-116} kit, Exo^{HS-5} kit) o ultracentrifugación (Control UC, Exo^{HCT-116} UC, Exo^{HS-5} UC).

Como se puede observar en la Figura 4.8 todas las muestras aisladas con el kit, incluido el control sin células, presentaban una señal inespecífica a 35 kDa, aproximadamente, sin embargo, no mostraban las señales específicas correspondiente a los cuatro marcadores de proteínas exosomales. En lo que respecta a las muestras aisladas por ultracentrifugación, el control, no presenta ninguna señal y en las demás tampoco se detecta la presencia de CD63 y CD81. Sin embargo, los exosomas de HS-5 mostraron una fuerte señal para HSP-70, mientras que los de la línea cancerosa HCT-116 tuvieron una señal más baja para HSP-70 y, también, se detecta la presencia de CD9.

Debido a los hallazgos obtenidos, tanto en el análisis por Western Blot (Figura 4.8) como en la determinación proteica (Figura 4.7 B), se excluyó el uso

del kit como método de aislamiento y se centró el resto del estudio en los exosomas aislados mediante ultracentrifugación.

2.2.3. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Los exosomas aislados mediante ultracentrifugación fueron observados mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) en el Servicio Central de la Universidad de Salamanca (NUCLEUS). El procedimiento consistió en colocar gotas de las muestras de exosomas sobre rejillas de cobre recubiertas de carbono/Formvar (malla 400) y dejarlas 4 minutos en ausencia de luz. Después, se lavaron las rejillas con una gota de agua Milli-Q durante 1 minuto y, posteriormente, se suspendieron durante 30 segundos en un agente de contraste (acetato de uracilo al 2%). Finalmente, las rejillas se secaron con papel de filtro y se almacenaron para ser analizadas con el microscopio de transmisión JEOL-1010 a 80 kV. Las imágenes obtenidas (Figura 4.9) fueron analizadas por el software ImageJ [202].

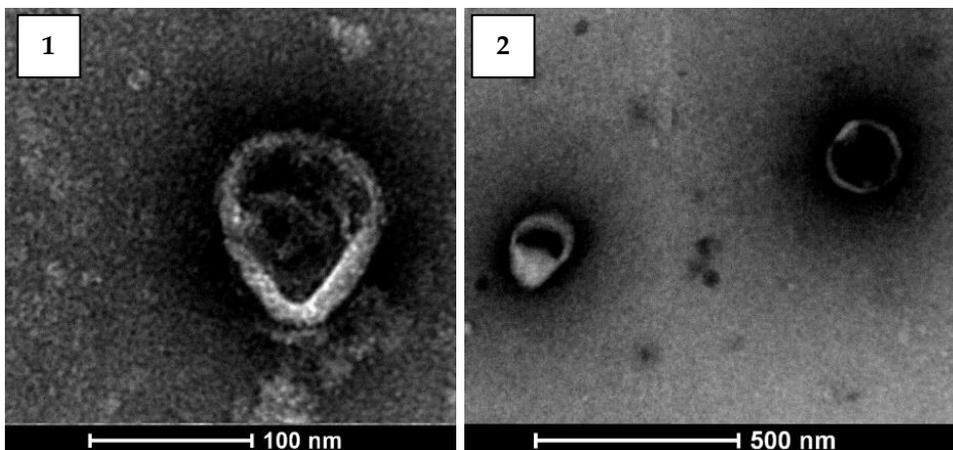


Figura 4.9 Imágenes TEM de exosomas aislados por ultracentrifugación de HCT-116 (1) o HS-5 (2)

Tal como se muestra en la Figura 4.9, las imágenes de las muestras procedentes de ambos cultivos y aisladas por ultracentrifugación, mostraron que los exosomas

de ambos cultivos celulares tenían partículas esféricas, como las mostradas en otras publicaciones [203 – 209].

2.2.4. Análisis de Tamaño y Potencial Zeta

Con el fin de continuar con la caracterización, se determinó el tamaño y carga superficial de los exosomas, ya que estos parámetros varían dependiendo de la fuente celular, del método de aislamiento, y de si han experimentado modificaciones para la incorporación de fármacos [128; 210]. Para ello se utilizó un equipo Zetasizer Nano ZS90. Este equipo determina la distribución de tamaño de partículas que hay en una muestra mediante dispersión de luz dinámica (DLS), y también permite determinar la carga superficial al medir el potencial zeta (ZP), en función de la movilidad electroforética de la muestra.

Para realizar esta caracterización, las muestras se diluyeron hasta un volumen final de 1 mL en PBS a pH 7.4. Primero se realizó el análisis de tamaño, cada muestra se midió por triplicado y la curva de tamaño de partícula se construyó mediante integración estrecha múltiple. Después, se determinó la carga, cada muestra se midió por triplicado y el valor ZP se calculó mediante el modelo monomodal. Los resultados de ambas muestras se muestran en la Figura 4.10.

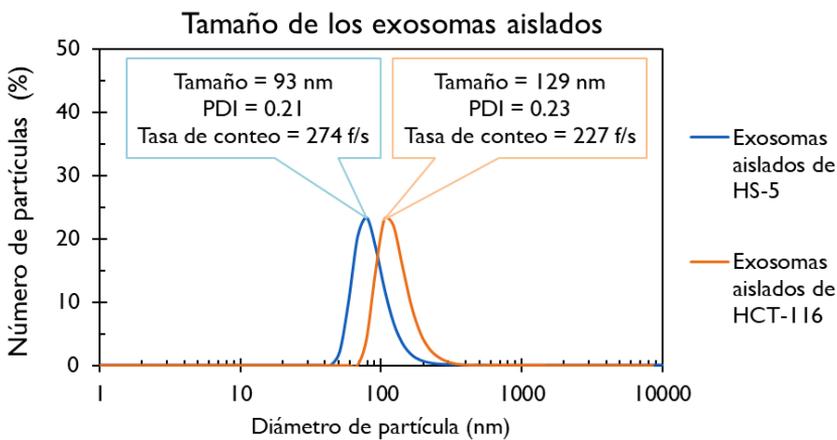


Figura 4.10 Caracterización del tamaño de los exosomas aislados mediante ultracentrifugación de líneas celulares HS-5 y HCT-116 mediante DLS.

Los resultados de DLS (Figura 4.10) muestran que el tamaño medio de los exosomas aislados por ultracentrifugación del cultivo celular de HS-5 era de 93 nm con una polidispersión (PDI) de 0.21, mientras que los de HCT-116 eran ligeramente más grandes (129 nm) y tenían una PDI similar (0.23). Además, ambas muestras tenían un ZP de -11 ± 2 mV.

Estos resultados fueron similares a estudios anteriores. Kalimuthu *et al.* determinaron por Análisis de Rastreo de Nanopartículas (NTA), que el tamaño de partícula de los exosomas era, aproximadamente, de 149 nm [211]. Wang *et al.* compararon el tamaño de sus exosomas originales antes y después de cargarlos con PTX, y resultaron ser 129 nm y 93 nm, respectivamente [212]. Pramanik *et al.* compararon el tamaño de los exosomas de dos líneas celulares diferentes, los procedentes de SKBR3 reflejaban un tamaño de 170 ± 60 nm por DLS y 180 ± 60 nm por TEM, mientras que los valores de los aislados de MDA-MB-231 fueron de 180 ± 60 nm por DLS y 200 ± 50 nm por TEM [213]. Kim y *et al.* estudiaron exosomas derivados de macrófagos y obtuvieron un tamaño medio 76 nm y un ZP de -15 mV [214].

Las diferencias entre los tamaños de los exosomas según la técnica utilizada, ya sea TEM o DLS, evidencia la importancia de considerar la metodología para determinar el tamaño.

En el caso de los valores obtenidos por DLS, se puede concluir que los tamaños de los exosomas aislados concuerdan con los resultados de las investigaciones previas descritas en la bibliografía.

2.2.5. Estudio de estabilidad

Con el fin de estudiar la estabilidad de los exosomas con el tiempo, las muestras fueron almacenadas durante 6 meses en ultracongelación a -80 °C y se analizaron por TEM como se muestra en la Figura 4.11 [203].

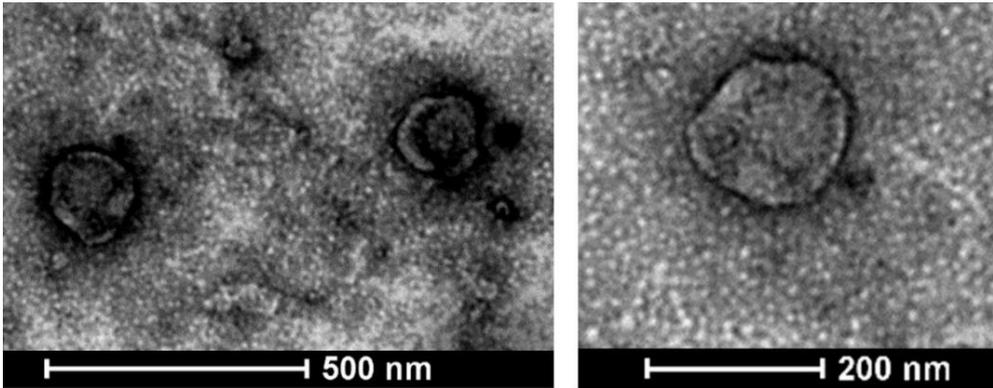


Figura 4.11 Imágenes TEM de exosomas aislados tras ser almacenados durante 6 meses en ultracongelación.

Observando las imágenes de la Figura 4.11 se concluye que la morfología no se vio afectada tras almacenar los exosomas en PBS durante 6 meses a -80°C .

3. Carga de fármacos en exosomas

Una vez caracterizados los exosomas aislados desde el cultivo celular de la línea cancerígena (Exo^{HCT-116}) y de la línea de fibroblastos normales (Exo^{HS-5}), se incorporaron los fármacos: FOH (Exo^{FOH}) o PTX (Exo^{PTX}).

3.1. Métodos de carga

Para proceder a realizar la carga de PTX y FOH, los exosomas aislados se diluyeron hasta una concentración final de proteína de $50\ \mu\text{g/ml}$ en $200\ \mu\text{l}$ de PBS. Posteriormente, se agregaron FOH o PTX en unas concentraciones finales de $50\ \text{mg/ml}$ y $500\ \mu\text{g/ml}$, respectivamente. Es importante señalar que la concentración de PTX se vio limitada por su solubilidad máxima en DMSO ($50\ \text{mg/mL}$), ya que, en este caso, se partió de una disolución madre y se añadió el mínimo volumen. Por otro lado, FOH se presenta en estado líquido, así que se pudo añadir directamente a las muestras de exosomas.

Se probaron cuatro métodos diferentes de carga de fármacos, para lo cual se siguieron los siguientes procedimientos [107; 110; 118; 196; 203]:

- ↳ **Incubación:** las muestras se incubaron en ES-20 Orbital Shaker-Incubator durante 2 horas a 37 °C con agitación orbital a 200 rpm.
- ↳ **Choque térmico:** se realizaron 3 ciclos de congelación–descongelación, 15 minutos a – 80 °C y 15 minutos a 37 °C a 200 rpm, y una incubación final a 37 °C durante 30 minutos con agitación orbital a 200 rpm.
- ↳ **Sonicación:** las muestras se sonicaron realizando 6 ciclos de pulsos de 40 kHz durante 30 segundos en un baño ultrasónico Branson 1510, alternados con un enfriamiento en hielo durante 2 minutos, este paso termina incubando muestras durante 1 hora a 37 °C en agitación orbital a 200 rpm.
- ↳ **Extrusión:** se realizaron 11 pases de extrusión con una mini extrusora utilizando membranas de policarbonato Whatman Nucleopore de 200 nm.

Finalmente, como procedimiento común en todos los casos, el fármaco libre, que no estaba incorporado en los exosomas, se separó de los exosomas mediante centrifugación a 15000 g.

3.2. Cuantificación de carga

Un aspecto esencial en la investigación y el desarrollo de terapias basadas en exosomas es la cuantificación de fármacos cargados en estas vesículas. Esta importancia está basada en varias razones clave [111 – 112; 115 – 118]:

1. Evaluación de la eficiencia de carga: Determinar la cantidad de fármacos incorporados en los exosomas es crucial para garantizar una carga efectiva y, por tanto, mejorar la eficacia del tratamiento.

2. Control de la dosis: La cuantificación de fármacos permite administrar dosis precisas de exosomas, evitando subdosis o sobredosis, lo que podría resultar en tratamientos ineficaces o efectos secundarios perjudiciales.
3. Optimización de la terapia: Con una cuantificación precisa, se pueden ajustar y optimizar las estrategias de administración de exosomas cargados, asegurando se alcancen niveles terapéuticos en el sitio de acción.
4. Seguimiento del tratamiento: monitorizar la concentración de fármacos en exosomas garantiza que la concentración de fármacos se mantenga dentro de los rangos terapéuticos deseados a lo largo del tiempo del tratamiento.
5. Minimización de efectos secundarios: Una cuantificación precisa de los fármacos en los exosomas contribuye a minimizar los efectos secundarios no deseados, ya que los fármacos se dirigen específicamente a las células objetivo, reduciendo la exposición de las células normales a dosis elevadas.

En nuestro sistema la concentración de fármaco incorporada en los exosomas se determinó cuantitativamente por espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 275 nm con un espectrofotómetro Nanodrop (BioDrop μ Lite) y calculando la concentración con las curvas de calibrado que se muestran en la Figura 4.12.

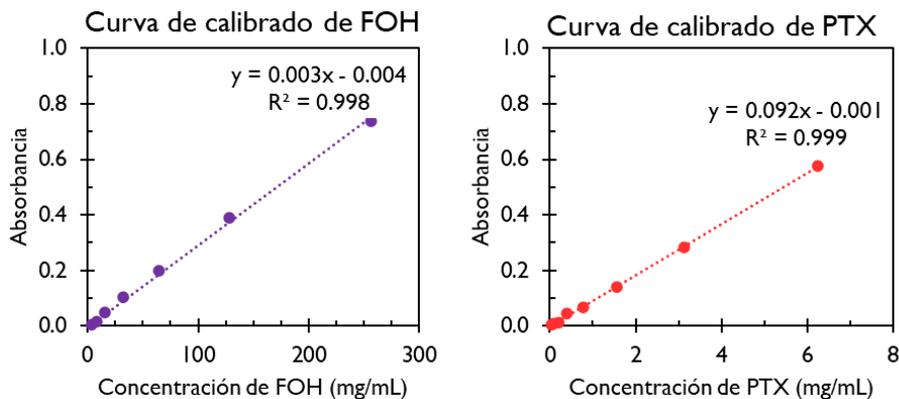


Figura 4.12 Curva de calibrado del FOH en metanol y de PTX en DMSO

La Figura 4.13 muestra la concentración del fármaco en las muestras, tras su incorporación a los exosomas por los diferentes métodos de carga.

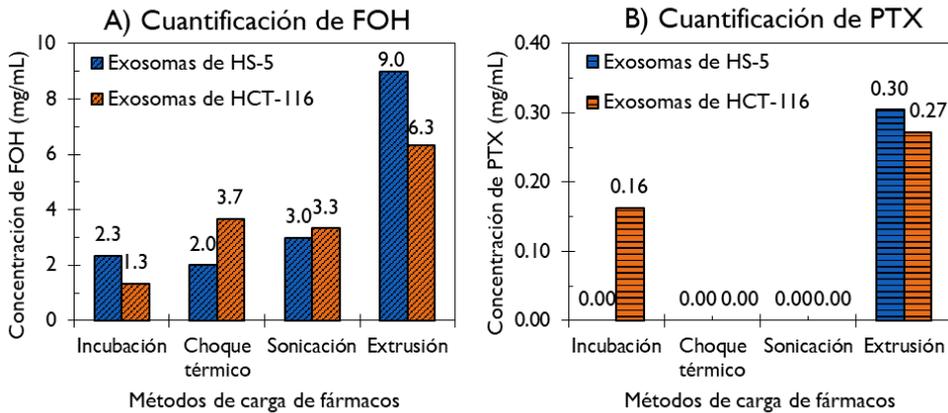


Figura 4.13 Cuantificación de la concentración de los fármacos (FOH y PTX) después de la incorporación en muestras de exosomas de líneas celulares HS-5 (azul) o HCT-116 (naranja) utilizando 4 métodos de carga diferentes: incubación, congelación-descongelación, sonicación y extrusión.

De acuerdo con los resultados presentados en la Figura 4.13 A, se concluye que el FOH puede ser incorporado en los exosomas utilizando cualquiera de los métodos estudiados. No obstante, la extrusión demostró ser significativamente mejor en términos de concentración de FOH. Puesto que utilizando esta técnica se alcanzó una concentración de 6.3 mg/ml en las muestras de Exo^{HCT-116} y de 9 mg/ml en las de Exo^{HS-5}, mientras que cuando se empleaba cualquiera de los otros procedimientos, la concentración de FOH fue inferior a 3.7 mg/mL.

En lo que respecta al PTX, como se observa en la Figura 4.13 B, su presencia solo se detecta tras la incubación en la muestra de exosomas de colon, con una concentración que solo alcanza los 0.16 mg/mL, mientras que, mediante el proceso de extrusión, las concentraciones obtenidas son de 0.30 mg/mL en Exo^{HS-5} y 0.27 mg/mL en Exo^{HCT-116}. Teniendo en cuenta la estructura de los exosomas y que la extrusión es el método más “agresivo” para incorporar los fármacos, es lógico que este método sea la opción capaz de cargar mayor cantidad de fármacos. En este proceso, las muestras se someten a una elevada presión, lo que facilita la

integración tanto de FOH como de PTX en la capa lipídica o en el citosol. Un potencial problema con respecto a este método radicaba en la posible ruptura de los exosomas, pero mediante imágenes TEM (Figura 4.14) se observó que la estructura permanecía sin daño estructural observable.

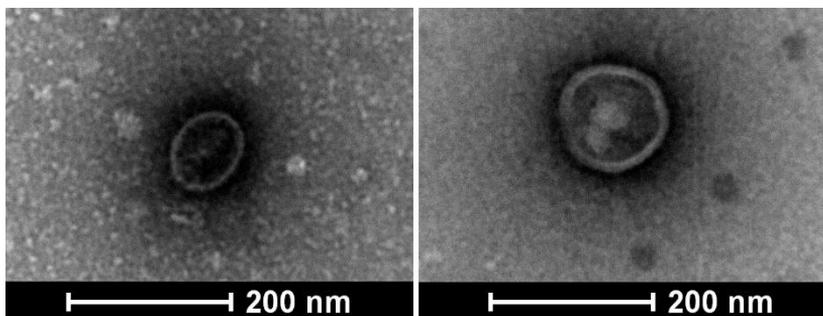


Figura 4.14 Imágenes TEM de los exosomas aislados a partir del cultivo celular de HCT-116, tras cargarlos con FOH por extrusión.

Todos estos resultados indican que se puede trabajar cargando exosomas con Farnesol y Paclitaxel por el método de extrusión. Estas muestras se pueden mantener estables si se almacenan a -80°C .

4. Validación de exosomas como sistemas de administración de fármacos mediante ensayos de toxicidad *in vitro*

En base a los resultados del apartado 3, se evaluó la toxicidad de los exosomas cargados por extrusión con cada fármaco analizando su efecto en la viabilidad celular mediante ensayos MTT.

4.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo.

Las líneas celulares de fibroblastos normales HS-5 (ATCC® CRL11882™) y carcinoma colorrectal HCT-116 (ATCC® CCL247™) se adquirieron en la American Tissue Collection (Manassas, VA). Ambas se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 1 % P-S y 10 % de FBS normal (DMEM⁺) o libre de exosomas, FBS⁻, (DMEM^{*}) utilizado para el

aislamiento de exosomas. Las células se cultivaron a 37 °C en CO₂ al 5% en un incubador 311 (Thermo Electron Corporation). Con una confluencia del 70 – 90 %, las células se subcultivaron usando tripsina al 0.05 % EDTA 1x.

4.2. Ensayo de viabilidad mediante MTT

Las células se sembraron por cuadruplicado en placas de 24 pocillos a diferentes concentraciones iniciales: 16000 células por pocillo para HCT-116 y 20000 células por pocillo para HS-5. Las placas se incubaron durante 24 horas, se descartó el medio inicial y se añadió DMEM⁺ con diferentes tratamientos:

- ↪ 5.5 µL/mL de exosomas sin cargar (libres) de ambas líneas celulares
- ↪ 5.5 µL/mL de exosomas cargados con fármacos
- ↪ Fármacos libres disueltos en DMSO (500 µg/ml de FOH o 5.5 µg/ml de PTX)

Se añadió a las células 100 µl/pocillo de MTT disuelto en PBS en una concentración de 5 mg/ml. Después de la incubación a 37 °C durante 1 h, se desechó el medio y los cristales de formazán se disolvieron en 0.5 ml de DMSO. Finalmente, la absorbancia (ABS) a 550 nm se midió en un lector de microplacas EZ Read 2000.

Para calcular la viabilidad celular (V_c) se utilizaron como controles la absorbancia de las células sin tratar y del medio, como se indica en la Ecuación 8.

$$V_c (\%) = \frac{\text{promedio } ABS_{\text{pozos muestra}} - \text{promedio } ABS_{\text{pozos control medio}}}{\text{promedio } ABS_{\text{pozos control celular}} - \text{promedio } ABS_{\text{pozos control medio}}}$$

Ecuación 8 Cálculo de la viabilidad celular

El análisis estadístico de los datos se realizó con Statgraphics Centurion XVI Versión 16.1.03 (StatPoint Technologies), mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con los resultados de viabilidad celular del ensayo MTT. La prueba F en la tabla ANOVA determinaba si había diferencias significativas entre tratamientos, con un intervalo de confianza del 95% ($p < 0.05$).

4.3. Viabilidad celular utilizando exosomas como sistemas de administración de fármacos

En la Figura 4.15 se resumen los resultados de viabilidad de las células de cáncer de colon (HCT-116) y en la Figura 4.16 los de los fibroblastos sanos (HS-5), tras incubarlas con los diferentes tratamientos durante 24 y 48 horas.

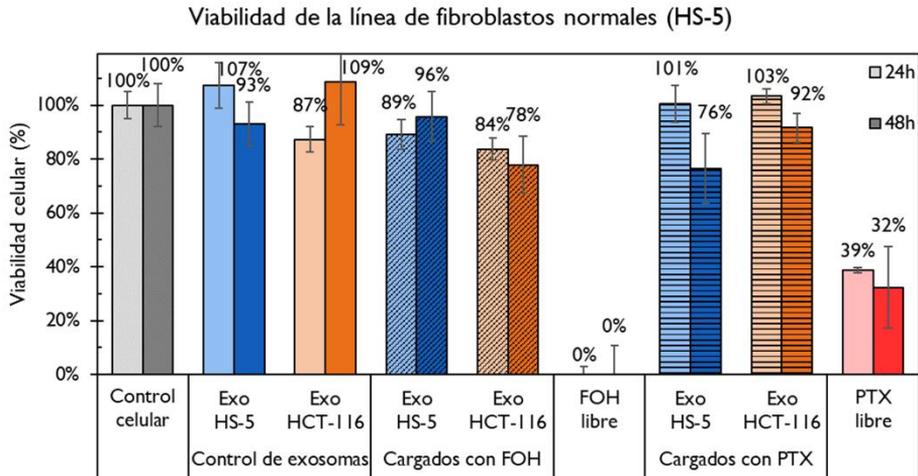


Figura 4.15 Viabilidad de las fibroblastos normales (HS-5) determinada por ensayo MTT, tras 24 o 48 horas de tratamiento con exosomas derivados de estas líneas (Exo^{HS-5} o Exo^{HCT-116}) sin cargar o cargados con los fármacos (PTX o FOH), o con el fármaco libre disuelto en DMSO. Los datos se normalizaron con respecto al control no tratado.

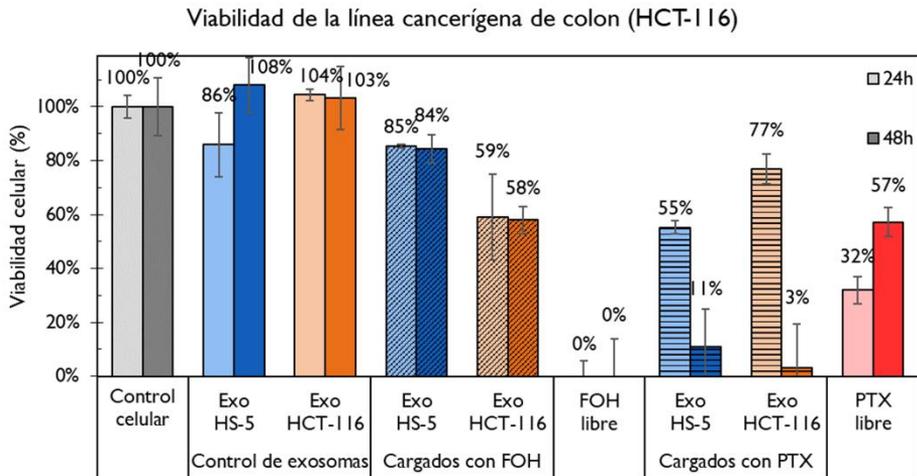


Figura 4.16 Viabilidad de las células cancerígenas de colon (HCT-116) determinada por ensayo MTT, tras 24 o 48 horas de tratamiento con exosomas derivados de estas líneas (Exo^{HS-5} o Exo^{HCT-116}) sin cargar o cargados con los fármacos (PTX o FOH), o con el fármaco libre disuelto en DMSO. Los datos se normalizaron con respecto al control no tratado.

Por un lado, la viabilidad de los fibroblastos sanos era superior al 93 % cuando se trataban con exosomas de la misma línea celular (Exo^{HS-5}) y superior al 87 % cuando los exosomas provenían de la línea cancerosa (Exo^{HCT-116}). Por tanto, se puede concluir que la presencia de exosomas sin cargar no afectan de manera significativa a su viabilidad.

En lo que respecta al tratamiento de estas células con FOH libre, tras 48 horas de tratamiento todas las células murieron. Sin embargo, la viabilidad disminuía mínimamente, hasta el 96 %, cuando el fármaco había sido cargado en exosomas procedentes de esa línea celular (Exo^{HS-5 FOH}), mientras que descendía hasta el 78 % cuando se trataban con Exo^{HCT-116 FOH}.

En el caso del tratamiento con PTX libre, se observó una reducción en la viabilidad, situándose entre el 33 – 39 %. No obstante, cuando se utilizaba PTX cargado en exosomas procedentes de esa misma línea (Exo^{HS-5 PTX}), la viabilidad también disminuía, pero solo hasta el 76 %, y no se vio significativamente afectada al tratar con los procedentes de la línea cancerígena (Exo^{HCT-116 PTX}), ya que solo se redujo hasta el 92 %.

Por otro lado, la línea de cáncer de colon muestra el mismo comportamiento que la línea normal al ser tratada con ambos exosomas sin cargar (Exo^{HCT-116} y Exo^{HS-5}), sus resultados de viabilidad a las 48 horas muestran que no existen diferencias significativas con respecto al control.

Cuando esta línea se trata con exosomas cargados con FOH, la viabilidad baja significativamente, pero se observa una diferencia dependiendo de la línea de origen, reduciéndose la viabilidad hasta el 82 % con Exo^{HS-5 FOH} y hasta el 58 % con Exo^{HCT-116 FOH}, mientras que la FOH libre destruye todas las células.

Sin embargo, si los exosomas están cargados con PTX, la viabilidad relativa al control es del 11% con Exo^{HS-5 PTX} y del 3 % con Exo^{HCT-116 PTX}, mientras que la viabilidad con PTX libre se mantiene por encima del 30 %.

En resumen, la presencia de exosomas no cargados no interfiere en la viabilidad de ninguna de las líneas celulares. En el caso de los exosomas cargados con FOH, se observa una ligera disminución de la viabilidad en los fibroblastos, así como en la línea de células cancerosas cuando se tratan con Exo^{HS-5}_{FOH}. No obstante, la viabilidad de esta última línea se reduce al 58 % cuando se trata con Exo^{HCT-116}_{FOH}. En cuanto a la presencia de PTX en su forma libre, afecta de manera similar a ambas líneas celulares, reduciendo la viabilidad en aproximadamente un 30 %. Es notable que las células normales se vean menos afectadas cuando se carga PTX en los exosomas, mientras que la viabilidad de la línea cancerígena se reduce en menos del 11 %.

Por lo tanto, se observa que las células cancerosas son más susceptibles que las normales cuando se tratan con exosomas cargados, especialmente aquellos que contienen PTX. Estos resultados son coherentes con la hipótesis inicial de que los fármacos en su forma libre pueden causar daño a las células *in vitro* debido a su alta toxicidad. La diferencia en la viabilidad entre los dos tipos de líneas celulares parece estar relacionada con una mayor fusión de la bicapa lipídica de los exosomas con la membrana plasmática de las células diana, lo que aumenta la internalización celular de los fármacos encapsulados [209].

4.4. Comparación de ciclodextrinas o exosomas como sistemas de administración de fármacos.

Como se expuso en el capítulo 3 de esta tesis, el empleo de ciclodextrinas es común para mejorar la solubilidad de los fármacos. Por lo que para determinar que estrategia es más efectiva y selectiva, si utilizar ciclodextrinas o exosomas, se ha realizado una comparación entre los resultados obtenidos en dicho capítulo con los obtenidos en el presente. A continuación, se muestran los resultados de viabilidad obtenidos por ensayo MTT después de 24 y 48 horas de incubación, cuando las células se trataron con FOH en diferentes sistemas: ya sean formando un complejo con una ciclodextrina (SBE- β -CD) o cargado en los exosomas de

ambas líneas celulares (Exo^{HS-5} y Exo^{HCT-116}). En la Figura 4.17 se presentan los resultados de viabilidad de la línea de fibroblastos normales (HS-5), mientras que en la Figura 4.18 se muestran los resultados correspondientes a la línea de células cancerígenas de colon (HCT-116).

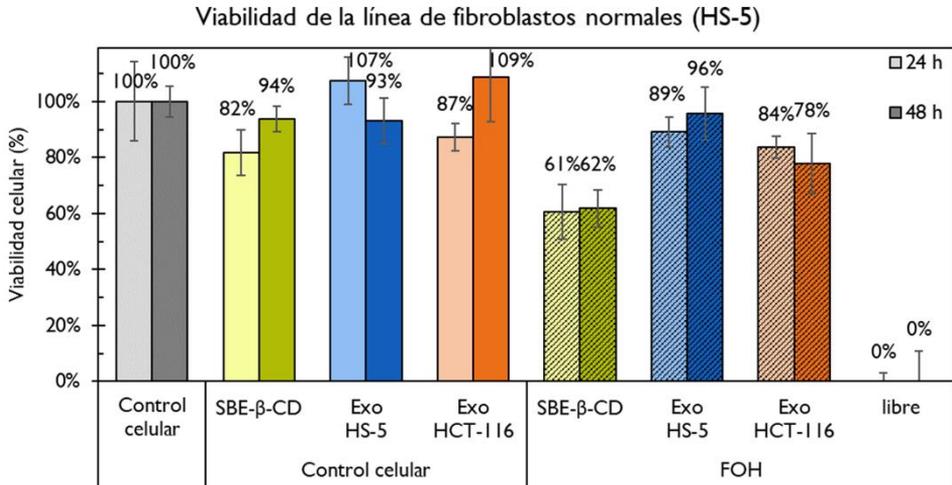


Figura 4.17 Viabilidad de las fibroblastos normales (HS-5) determinada por ensayo MTT, tras 24 o 48 horas de tratamiento con SBE-β-CD o exosomas derivados de estas líneas Exo^{HS-5} o Exo^{HCT-116} sin cargar y cargados con FOH, o con el fármaco disuelto en DMSO. Los datos se normalizaron con respecto al control no tratado.

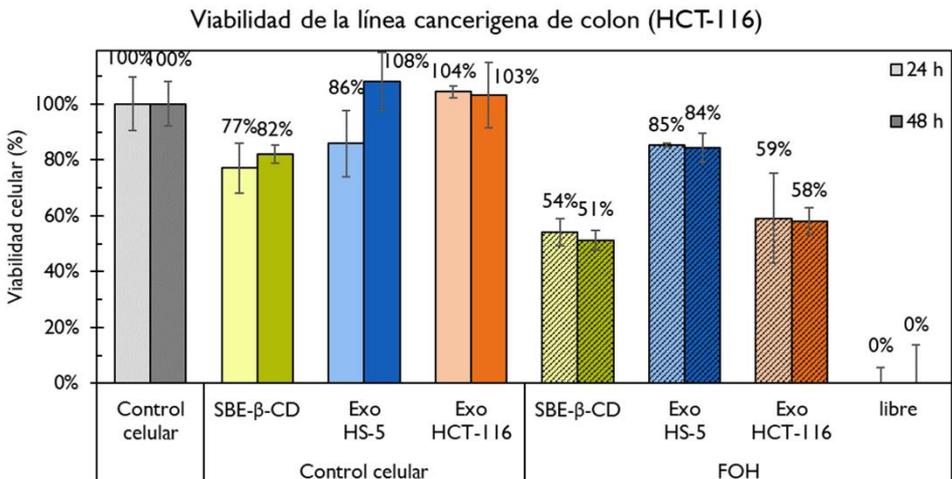


Figura 4.18 Viabilidad de las células cancerígenas de colon (HCT-116) determinada por ensayo MTT, tras 24 o 48 horas de tratamiento con SBE-β-CD o exosomas derivados de estas líneas Exo^{HS-5} o Exo^{HCT-116} sin cargar y cargados con FOH, o con el fármaco disuelto en DMSO. Los datos se normalizaron con respecto al control no tratado.

En las Figuras 4.17 y 4.18 puede observarse que en las muestras tratadas con el control SBE- β -CD, la viabilidad celular de ambas líneas celulares se redujo al 82 – 94 %, y en los controles de exosomas siempre fue superior al 86 %. En lo que respecta al tratamiento con FOH, se concluye que su forma libre destruía todas las células, sin embargo, al utilizarse en forma de complejo, reducía la viabilidad de HS-5 al 61 % y la de HCT-116 al 53 %. Mientras que cuando se cargaba en los exosomas, los resultados variaban en función del origen de los exosomas y la línea estudiada. Si procedían de HS-5 (Exo^{HS-5}), la viabilidad de ambas líneas celulares disminuía ligeramente, con valores superiores al 83 %; sin embargo, si procedían de HCT-116 (Exo^{HCT-116}), la viabilidad de los fibroblastos era del 78 %, pero la de la línea cancerígena disminuía al 58 %.

En consecuencia, los exosomas procedentes de la línea cancerígena resulta ser mejor sistema, ya que muestran una mayor selectividad, evidenciada por una marcada diferencia en los resultados de viabilidad entre ambas líneas celulares.

5. Conclusiones

De los resultados presentados en este capítulo puede concluirse que las muestras aisladas utilizando el producto comercial *ExoQuick-TC® ULTRA* contenían alguna sustancia que interfería con los ensayos utilizados para determinar la concentración de proteínas (BCA) y el tipo de proteínas (WB). Debido a esta interferencia, se tuvo que descartar este método de aislamiento. En contraste, en las muestras aisladas por ultracentrifugación a partir de ambos cultivos celulares, se confirmó la presencia de exosomas en forma de esferoides, lo cual fue observado mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Además, mediante el uso de Dispersión Dinámica de Luz (DLS), se determinó que los diámetros de estos esferoides eran inferiores a 200 nm, siendo de 93 nm para Exo^{HS-5} y de 129 nm para Exo^{HCT-116}. Por otro lado, el ensayo de Western Blot

(WB) confirmó la presencia de proteínas CD9 en Exo^{HCT-116} y HSP-70 en los exosomas de ambas líneas, aunque se observó una señal más intensa en Exo^{HS-5}.

Tras su caracterización, los exosomas se cargaron con los dos fármacos propuestos (FOH y PTX) utilizando diferentes métodos (incubación, choque térmico, sonicación y extrusión). Los resultados mostraron que FOH podía incorporarse mediante cualquiera de los métodos, pero fueron las muestras de extrusión las que mostraron la concentración más alta (8.3 mg/mL en Exo^{HS-5 FOH} y 5.7 mg/mL en Exo^{HCT-116 FOH}), y la presencia de PTX solo se determinó en los exosomas cargados por extrusión (0.20 mg/ml en Exo^{HS-5 PTX} y 0.16 mg/ml en Exo^{HCT-116 PTX}). Por lo que la extrusión fue el método elegido para trabajar.

Asimismo, los estudios de toxicidad demostraron que el control de exosomas (sin cargar) no afectaban significativamente a la viabilidad celular al cabo de 48 horas. Los exosomas cargados con FOH mostraron resultados diferentes según las células de origen: la viabilidad de ambas líneas se redujo en menor medida con los exosomas procedentes del cultivo de fibroblastos (Exo^{HS-5 FOH}) que con los de colon (Exo^{HCT-116 FOH}). Del mismo modo, los resultados de viabilidad de los fibroblastos tratados con los exosomas cargados con PTX mostraron resultados similares a los del FOH, pero la viabilidad de la línea cancerosas redujo drásticamente, alcanzando valores hasta el 11 % y 3 %, tras tratar con Exo^{HS-5 PTX} y Exo^{HCT-116 PTX}, respectivamente.

Finalmente, se compararon los resultados del efecto en la viabilidad de la ciclodextrina con farnesol (SBE- β -CD – FOH) obtenidos en el capítulo 3. Este complejo reducía la viabilidad de los fibroblastos hasta un 61 % y la de las células cancerosas hasta el 51 %. Estos valores son comparables a los obtenidos con Exo^{HCT-116 FOH} ya que reducen la viabilidad de las células cancerosas hasta un 58% pero afectan de forma más leve a las células sanas, reduciendo su viabilidad levemente,

hasta el 78%. Por tanto, se concluye que los exosomas son una forma prometedora de transportar fármacos de forma selectiva.

6. Artículos publicados relacionados con este capítulo

↪ de Dios-Pérez, I., González-Garcinuño, Á., Muñoz-Barroso, I. & Martín del Valle, E. M. (2023).

A Synergistic Approach Therapy for Colorectal Cancer Based on Exosomes and Exploitation of Metabolic Pathways.

Journal of Pharmaceutical Sciences, S0022-3549 (23) 00426-4.

<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.10.017>

ARTICLE IN PRESS

Journal of Pharmaceutical Sciences 000 (2023) 1–9



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical Sciences

journal homepage: www.jpharmsci.org

Pharmaceutics, Drug Delivery and Pharmaceutical Technology

A Synergistic Approach Therapy for Colorectal Cancer Based on Exosomes and Exploitation of Metabolic Pathways

Inmaculada de Dios-Pérez^a, Álvaro González-Garcinuño^{a,b}, Isabel Muñoz-Barroso^c,
Eva María Martín del Valle^{a,b,*}^a Department of Chemical Engineering, University of Salamanca, Salamanca, Spain^b Institute for Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain^c Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Salamanca, Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 May 2023

Revised 11 October 2023

Accepted 11 October 2023

Available online xxx

Keywords:

Colorectal cancer

Drug targeting

Drug delivery system(s)

Exosome(s)

Cell line(s)

Nanotechnology

Cyclodextrin(s)

Poorly water-soluble drug(s)

Farnesol

Paclitaxel

ABSTRACT

In order to reduce the side effects of traditional chemotherapy in the treatment of colorectal cancer (CRC), a new drug delivery system has been developed in this work, based on exosomes that can host two drugs that act synergistically: farnesol (that stops the cell cycle) and paclitaxel (prevents microtubule system depolymerization). Firstly, exosomes were isolated from different cell cultures (from colorectal cancer and from fibroblast as example of normal cell line) by different methods and characterized by western blot, TEM and DLS, and results showed that they express classical protein markers such as CD9 and HSP-70 and they showed spherical morphology with sizes from 93 nm to 129 nm depending on the source. These exosomes were loaded with both drugs and its effect was studied in vitro. The efficacy was studied by comparing the viability of cell cultures with a colorectal cancer cell line (HCT-116) and a normal cell line (fibroblast HS-5). Results showed that exosomes present a specific effect with more reduction in cell viability in tumour cultures than healthy ones. In summary, exosomes are presented in this work as a promising strategy for colorectal cancer treatment.

© 2023 American Pharmacists Association. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer worldwide and the second leading cause of cancer deaths. In 2020, over 1.9 million new cases were diagnosed and almost one million deaths were attributed to CRC worldwide¹. Therapy for CRC depends on the stage of development, ranging from surgery (stage I) to surgery followed by chemotherapy (advanced stages).²

Traditional chemotherapy has been widely used for the treatment of this pathology, but it has limiting factors such as poor specificity, low efficacy, and high toxicity, that involve serious side effects; and, in the last term, after long periods of exposure, a possible phenomenon of multidrug resistance.³

Abbreviations: FOH, farnesol; PTX, paclitaxel; SBE- β -CD, sodium salt of sulfobutylated β -cyclodextrin; Exo^{HCT-116}, exosomes from HCT-116; Exo^{HS-5}, exosomes from HS-5.

* Corresponding author.

E-mail address: emvalle@usal.es (E.M. Martín del Valle).

One of the hallmarks of tumours described by Hanahan and coworkers is metabolic reprogramming which explains how the metabolism of cancer cells generates enough energy for rapid cell growth, and this change is also supposed to contribute to cell resistance to chemotherapy.^{4,5} One possible strategy to face drug resistance is the use of two drugs that act synergistically by reducing cell viability in two different ways at the same time. Over the past decades, the development of nanotechnology-based drug delivery systems has emerged considerably as a promising platform for the delivery of therapeutic drugs. Nanomaterials have common properties (small surface area, nanometric size, and drug-loading capacity) that provide benefits over traditional drug delivery systems, such as improved solubility, pharmacokinetics, and biodistribution, as well as being easier to administer. Moreover, they have fewer side effects.^{3,5,6}

However, Wilhelm et al. (2016) found that only 0.7 % of the administered nanoparticle dose reaches a solid tumour.⁶ There are three key points to consider for the biodistribution of nanoparticles: haemolysis, thrombogenicity, and complement activation. When the particles are administered parenterally (the most common way),

<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.10.017>

0022-3549/© 2023 American Pharmacists Association. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

once they enter the bloodstream, they are able to attract biomolecules present in biological fluids, which leads to the formation of a protein corona and may influence the immune response. This interaction depends on several characteristics of the particle (charge, size and shape, hydrophobicity, and roughness among others).^{6–8}

Ideally, the integrity of the nanoparticles should not be altered in the biological environment, ensuring good circulation in the blood and delivery to the target site; they also should not be toxic to blood cell components and should be “invisible” to immune cells that can remove them from the circulation.⁷ Therefore, to prevent problems related to the presence of nanoparticles in the human body, new and more efficient drug delivery systems must be designed. Therefore, most research efforts focus on the use of some compounds already present in the human body.

Tumour masses are composed of cancer cells (parenchyma) and the tumour microenvironment (stroma), where communication between cells is mediated by different compounds, cytokines, chemokines, growth factors, inflammatory molecules, and extracellular vesicles. The first reports on extracellular vesicles date back to the late 1960s when it was observed that platelet-free plasma contained vesicular material. These vesicles are mainly composed of phospholipids and are classified according to their size: exosomes (30–200 nm), microvesicles (200–1000 nm), and apoptotic bodies (>1 μm).^{3,9,10}

Exosomes are initially formed as vesicles from late endosomes that form multivesicular bodies, being released into the medium after the fusion of these multivesicular bodies with the plasma membrane during reticulocyte maturation. Although the purpose for which cells secrete exosomes is unspecified, it is known that cells use them, among other things, as a form of intercellular communication. The importance of exosomes is relative with 9 key points: (i) they are naturally present in body fluids; (ii) they have a small size and a slightly negative charge on the surface; (iii) they have good stability under physiological conditions; (iv) they have low immunogenicity and toxicity; (v) they can transport molecules thanks to their structure, as they have an aqueous cytosol surrounded by a lipid membrane (just like cells); (vi) they have the ability to deliver their content to target cells in a selective and specific way thanks to the proteins and lipids present in their membrane, which act as a fingerprint; (vii) they possess an intrinsic ability to cross biological barriers, including the blood-brain barrier and the gastrointestinal tract; and (viii) they can be stored and preserved for long periods of time.^{3,11–13}

Due to these characteristics, the potential of exosomes to harbour hydrophobic and lipophilic drugs and deliver them through biological membranes without invoking the immune response has been studied, working as a nano-sized drug delivery system. Synthesised nanoparticles have significant disadvantages after administration, as mentioned above, but exosomes are natural nanomaterials, which implies that there will be no specific interactions with the circulating proteins in the bloodstream. Therefore, they can be considered inert particles in the formation of the protein corona.

Exosomes are secreted by all types of cells and have different characteristics depending on the cell that secretes them. For example, in the case of exosomes originating from cancer cells, they tend to target homotypic tumour cells and can therefore be used as a therapeutic target for cells of the same tumour type from which they have been isolated.^{10,12,14–16} They can be loaded with drugs using two different techniques: (i) keeping the drug in contact with the donor cell so that the exosome incorporates the substance during its formation; or (ii) *ex-vitro*, the drug keeps in touch with the exosome after its isolation. The latter form has an important advantage: the drug would not cause cell damage and cells could grow and produce exosomes without any problems.^{12,14}

In this article, we have attempted to use exosomes as vehicles to introduce a cytostatic agent that prevents cancer cell proliferation and a

cytotoxic agent that causes cell death. The isoprenoid farnesol (FOH) is a cytostatic agent whose effects had been reported by different authors. For example, FOH can increase levels of reactive oxygen species, activate the nuclear farnesoid X receptor, inhibit thyroid hormone receptor beta-mediated transcriptional activation, and inhibit Ca^{2+} signaling by blocking plasma membrane channels. But one of the most studied effects was that FOH inhibits the action of phosphocholine cytidylyltransferase, an essential enzyme in the synthesis pathway of phosphatidylcholine, which is the main membrane lipid in mammalian cells, by arresting the cell cycle in the G0/G1 phase in a variety of carcinoma cell types, so FOH bypasses the membrane of cancer cells.¹⁷ On the other hand, paclitaxel (PTX) is an antineoplastic cytotoxic drug, which disrupts the dynamic equilibrium within the microtubule system, preventing its depolymerization, and blocks cells in the late G2 and M phase of the cell cycle, inhibiting cell replication against various types of solid tumours, such as CRC. PTX is commonly used as a treatment in different types of solid tumours, such as CRC.^{18–20}

Both compounds have a low solubility in aqueous media (approximately $8 \cdot 10^{-6}$ M). Consequently, to enhance their solubility and allow their parenteral administration they must be loaded into different delivery systems, preventing their toxicity in other non-cancer cells in the human body and minimising their side effects. No previous research on exosomes loaded with FOH has been found, but PTX was loaded into exosomes in past studies: Kim et al. carried out *in vitro* tests of HELA-derived exosomes loaded with PTX and observed that the IC50 of PTX on exosomes was lower than PTX in its free form, although the results were promising, they did not perform studies in normal cells to determine whether the action was selective.²¹

Another very usual way to increase the solubility of drugs is the use of cyclodextrins. In a previous paper, we studied the possibility of improving the solubility of FOH by forming inclusion complexes with the sodium salt of sulfobutylated β -cyclodextrin (SBE- β -CD). In this work, we showed a reduction in viability of up to 60 % compared to control in fibroblasts and 50 % in colon cancer cells. In order to determine if it is more effective and selective to use cyclodextrins or exosomes, the results of both methods will be compared.¹⁷

Therefore, the main objective of this study was to develop a more effective treatment against CRC, using exosomes as nanoparticles to improve the solubility of two drugs that act synergistically to attack cancer cells. To do this, the specific aims are to: (i) isolate exosomes from a normal cell line and a cancer cell line; (ii) characterise these exosomes using different techniques; (iii) load the exosomes with PTX and FOH; (iv) evaluate the potential toxicity of PTX/FOH loaded exosomes in normal and cancer cells; and (v) compared the toxicity results of SBE- β -CD – FOH and exosomes loaded with FOH.

Materials and Methods

Reagents

Farnesol 95 % (FOH), Paclitaxel (PTX), Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT), RIPA Buffer, penicillin-streptomycin (P-S), Tween 20, TEMED, Tris, Glicine and SDS were purchased from Sigma-Aldrich. Acrylamide-bisacrylamide was purchased from Merck. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco™), Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco™), exosomes-depleted Fetal Bovine Serum (FBS γ , Gibco™), trypsin 0.05 % EDTA (Gibco™), Phosphate Buffer Saline (PBS, Gibco™), Pierce bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit, Super Signal™ West Pico Plus Substrate (Thermo Scientific) and PageRuler Plus Prestained Protein ladder were purchased from Fisher Scientific. PVDF membranes were from GE Healthcare. ExoQuick-TC Ultra kit and ExoAb Antibody from System BioSciences.

Cell Lines and Culture Conditions

Normal fibroblast HS-5 (ATCC® CRL11882™) and colorectal carcinoma HCT-116 (ATCC® CCL247™) cell lines were purchased from the American Tissue Collection (Manassas, VA) and cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 1 % penicillin-streptomycin (Corning); and 10 % FBS (DMEM*) or 10 % FBS* (DMEM*) used for exosomes isolation.

Cells were cultured at 37 °C in a 5 % CO₂ on 311 Thermo Electron Corporation (Waltham, Massachusetts, USA). At 70–90 % confluence, cells were subcultured using 0.05 % trypsin/EDTA 1x.

Isolation of Exosomes

The exosomes were isolated from cell cultures of two different cell lines: HS-5 healthy fibroblasts and HCT-116 colon cancer cells, to have exosomes from a healthy line and a cancer line, with the aim of reducing their viability.

The cells were seeded in 15 mL DMEM* on T150 (2 · 10⁶ cells/flask) and they were incubated for 72 h. The culture medium was collected and centrifugated at 3000 g for 15 min and the supernatant was centrifugated again at 15000 g for 30 min, both centrifugations in a 5804 centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Germany) to remove cell debris and other molecules from the supernatant. After centrifugation, exosome isolation was carried out following two different techniques, polymer-based precipitation and ultracentrifugation.

Polymer-Based Precipitation Isolation

The polymer-based precipitation isolation was performed with the commercial *ExoQuick-TC Ultra* kit (System BioSciences, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Briefly, the supernatant obtained from the previous centrifugation was mixed with the commercial solution for precipitation (1 mL per 5 mL of supernatant) and kept at 4 °C overnight. The mixture was centrifuged at 15000 g for 15 min with a 5804 centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Germany) to obtain a pellet containing isolated exosomes. This precipitate was resuspended in PBS and the exosomes were purified with resin columns from the kit.

Ultracentrifugation Isolation

Samples were ultracentrifuged at 150000 g for 90 min to obtain total exosomes and other substances to be removed. To obtain a higher degree of purity, the pellet was resuspended in PBS and centrifuged again at 150000 g for 90 min to remove contaminants. The ultracentrifugation procedures were performed on a Beckman Optima XL-100k with a 70 Ti type rotor (Beckman Coulter, California, United States).

Characterisation of Exosomes

Exosomes were characterized by BCA protein analysis to quantify the concentration, Western Blot (WB) was used to identify the characteristic proteins, dynamic light scattering (DLS) and zeta potential (ZP) to determine their size and surface charge, and TEM microscopy to view their morphology.

Protein Analysis (BCA)

The total protein content was quantified by BCA colorimetric assay using Pierce BCA protein assay kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). In brief, in each microtube, exosomes samples or standard solutions were mixed with working reagent at a 1:8 ratio and incubated at 60 °C for 30 min. The absorbance at 562 nm was measured on a nanodrop (BioDrop μ Lite).²² Protein concentration was calculated with a standard curve for Bovine Serum Albumin (see SM1).

Western Blot Analysis (WB)

Samples were lysed by incubation with RIPA buffer at a 1:1 ratio containing a cocktail of protease inhibitors (Thermo Scientific™) for 30 min at 4 °C. After that, Laemly 4x was added to the lysed samples at a 1:3 ratio and the samples were heated at 95 °C for 5 min and then placed on ice for 15 min to promote protein denaturation. Samples were separated by 10 % sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to PVDF membranes (GE Healthcare). The membranes were blocked for 1 h at room temperature in TBS-T blocking buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween 20) containing 5 % dry skimmed milk. Then, membranes were incubated overnight at 4 °C with C63, CD81, CD9 and HSP70 primary antibodies from the ExoAb Antibody kit (System BioSciences, CA, USA) diluted 1:1000 in TBS-T containing 5 % dry skimmed milk. After extensive washing with blocking buffer, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with secondary anti-rabbit conjugated with horseradish peroxidase (1:20000 dilution, System BioSciences, CA, USA) washed, and developed with Super Signal™ West Pico Plus substrate (Thermo Scientific). Membranes were visualized with ChemiDoc™ MP (Bio-Rad) and images were processed with ImageLab software (Bio-Rad).

Size Analysis (DLS) and Zeta Potential (ZP)

The exosome size distribution was determined by DLS, the samples were diluted to a final volume of 1 mL in PBS pH 7.4. Each sample was measured in triplicate and the particle size curve was built by multiple narrow integration. Then, the charge of exosomes was determined by ZP measurements; each sample was measured in triplicate and the ZP value was calculated by the Monomodal model. Both tests were performed using a Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., UK).

Transmission Electron Microscopy (TEM)

The isolated exosomes were observed by Transmission Electron Microscopy (NUCLEUS facilities of the University of Salamanca). Droplets of the exosome samples were plated onto carbon/Formvar coated copper (400 mesh) grids in the absence of light. After 4 min they were washed with a drop of Milli-Q water for 1 minute and finally suspended in a contrast agent, (in this case, 2 % uracil acetate) for 30 s. Finally, the grids were dried with filter paper and stored to be analysed with the JEOL-1010 transmission microscope at 80 kV. The microphotographs obtained were analysed by ImageJ software.¹³

Stability after Long-Term Storage

Exosomes are usually stored at –80 °C, however, to determine their stability samples in this condition, they were analysed by TEM six months after their isolation.²³

Drug Loading into Exosomes

Loading Methods

For PTX and FOH loading, the isolated exosomes were diluted in 200 μ L of PBS to a final protein concentration of 50 μ g/mL, and 500 μ g/mL or 50 mg/mL of PTX and FOH, respectively, were added. Different methods of drug loading were investigated: incubation at room temperature, sonication, extrusion, and freeze-thaw cycles. For the incubation method, samples were incubated at 37 °C for 2 h with orbital shaking at 200 rpm (ES-20 Orbital Shaker-Incubator, Biosan, Latvia). For the sonication method, exosomes and drugs were sonicated using an ultrasonic bath Branson 1510 (Danbury, CT, USA) with the following conditions: 6 cycles of 40 kHz pulses for 30 seconds, and cooling on ice for 2 min between each cycle, this step ends incubating samples at 37 °C in orbital shaking at 200 rpm (ES-20 Orbital Shaker-Incubator, Biosan, Latvia) for 1 h to allow drug entry into the exosomal membrane. For the extrusion method, 11 extrusion passes

were carried out with a mini extruder (Avanti Polar Lipids, USA) using 200 nm Whatman Nuclepore polycarbonate membranes (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA). Finally, for the freeze-thaw cycles method, samples were exposed at three freeze-thaw cycles: 15 min at -80°C and 15 min at 37°C at 200 rpm, and then, they were incubated at 37°C for 30 min with orbital shaking at 200 rpm (ES-20 Orbital Shaker-Incubator, Biosan, Latvia).^{3,12,14,21,22}

Finally, as a common procedure in all cases, the free drug, that was not incorporated in exosomes, was separated from exosomes by centrifugation at 15000 g with a 5804 centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Germany).

Load Quantification

The concentration of the drug loaded into exosomes was determined by measuring the absorbance at 275 nm using the Nanodrop Spectrophotometer (BioDrop μ Lite, UK). Finally, the concentration was calculated according to the calibration curves of the drugs (supplementary material 2, SM2).

Loaded drug into exosomes was corroborated by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC MS/MS). To quantify the amount of FOH, the samples were analysed by using a mass spectrometer Agilent 7890 GC chromatograph equipment coupled to a 220 ion TRAP-MS, using a VF5MS column 30 m long, 0.25 mm internal diameter and 0.25 microns thick stationary phase layer, applying an initial temperature of 50°C that will increase $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ up to 270°C , hold time was 5 min, and run time 32 min per sample. To determine the amount of PTX, the samples and the corresponding calibration were analysed in a Waters2795 chromatograph mass spectrometer coupled to a ZQ4000 quadrupole using an X bridge C18 column, working at a flow rate of 0.2 ml/min using an eluent A of 0.1 % formic water Constant at 58 % and an eluent B of ACN Constant at 42 %.

Validation of Exosomes as Drug-Delivery Systems by In Vitro Toxicity Assays

The toxicity of the drug-loaded exosomes was evaluated by analysing their effect on cell viability by using an MTT assay. The cells were plated in quadruplicate in 24-well flat-bottomed plates (Falcon) at different initial concentrations: for HCT-116 (16000 cells per well) and HS-5 (20000 cells per well). Plates were incubated for 24 hours, the initial medium was discarded and fresh DMEM^{*} was added, containing different treatments: 5.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of exosomes from both unloaded cell lines (free), 5.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of exosomes loaded with drugs and free drugs (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FOH or 5.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PTX).

MTT dissolved in PBS at 5 mg/mL was added to the cells (100 μL well). After incubation at 37°C for 1 h, the DMEM^{*} medium was removed, and formazan crystals were dissolved in 0.5 mL DMSO. The absorbance (ABS) at 550 nm was measured on an EZ Read 2000 Microplate Reader (Biochrom, UK). Non-treated cells and medium were used as a control, to calculate the cell as indicated in Equation 1.

$$\text{cell viability (\%)} = \frac{\text{average ABS wells} - \text{average ABS wells medium control}}{\text{average ABS control wells} - \text{average ABS wells medium control}}$$

Equation 1. Cell viability calculation

Statistical Analysis

The data analysis was performed using Statgraphics Centurion XVI Version 16.1.03 (StatPoint Technologies, Inc. 1982–2010, Warrenton, Virginia, USA). This procedure performed a one-way analysis of variance (ANOVA) for results of cell viability from MTT assay; it determined if there were significant differences between the mean of the control and the mean of the rest of the samples, using Fisher's Least Significant Difference (LSD) multiple comparison test with a confidence interval of 95 % ($p < 0.05$, *), 99 % ($p < 0.01$, **), or 99.9 % ($p < 0.001$, ***).

Results and Discussion

In the present study, exosomes were isolated by two different methods, ultracentrifugation and precipitation using the commercial product Exo Quick TC Ultra¹⁰. This section shows the results of isolating exosomes from a culture of healthy cells (HS-5), another from a colon cancer line (HCT-116), and a blank (a medium that has not been in contact with cells). Firstly, the number of exosomes was quantified by analysing the protein concentration using a Pierce BCA protein assay kit, to carry out the rest of the tests under the same conditions. Then the samples of exosomes were compared by analysing their morphology by TEM and determining the presence of antigens by WB. Then, the particle size was analysed by DLS.

Once the exosomes have been characterised, this section concludes by discussing the results of the drug loading (PTX or FOH) that the exosomes are capable of harbouring, and the viability results after treating the cells with them.

Characterisation of Exosomes

To confirm the isolation of exosomes, the presence of some of the most common antigens in the exosomes was verified by WB. The data is presented in Fig. 1: it was performed with samples from each cell line (or the control) following the two methods for isolation: kit ExoQuick TC Ultra (Control_{kit}, Exo_{HCT-116 kit}, Exo_{HS-5 kit}) or ultracentrifugation (Control_{UC}, Exo_{HCT-116 UC}, Exo_{HS-5 UC}). The presence of different exosomal markers was determined by incubation with the different antibodies from the ExoAb Antibody kit, each of which should give a different signal depending on the molecular weight, CD63 at 53 kDa, CD81 at kDa, CD9 at 28 kDa, and HSP70 between 50 and 70 kDa.

All the samples isolated with the kit, including the control without cells, showed a non-specific signal at about 35 kDa, but no specific signal for the four exosomal protein markers. Nevertheless, although the samples isolated by ultracentrifugation do not show any sign for CD63 and CD81 markers, exosomes from HS-5 showed a strong signal for HSP-70, while those from the cancerous line HCT-116 showed the presence of CD9 and had a lower signal for HSP-70.

From these results, we may conclude that samples obtained by centrifugation contain extracellular vesicles, but there is something in the samples isolated with the kit that is affecting the assay. This is corroborated by the quantification of proteins by BCA, as the negative control of the ultracentrifugation method showed no presence of protein, whereas the kit control indicated a similar amount of protein as the cell culture samples. Considering the problems of characterisation of the exosomes isolated with the kit (Fig. 1), further work samples from this procedure were discharged, focusing the rest of the study on the exosomes isolated by ultracentrifugation.

Next, the exosomes from ultracentrifugation were analysed by TEM (see Fig. 2). Images of the samples isolated by ultracentrifugation showed that the exosomes from both cell cultures had spherical particles, like those shown in other publications.^{23–29}

According to the literature, the size of the exosomes can vary depending on the isolation method, the cells of origin, and whether they have been manipulated to introduce drugs into it.^{30,31} DLS analysis (Fig. 3) showed that exosomes isolated by ultracentrifugation from HS-5 cells had a size of 93 nm and a PDI of 0.21, while those from HCT-116 were slightly larger (129 nm) and had similar polydispersion (0.23), and both of them had a ZP of -11 ± 2 mV. These results were similar to previous studies. Kalimuthu et al. reported that the particle size of exosomes was around 149 nm by NTA³²; Wang et al. compared their original exosomes size after and before loading with PTX, and they resulted to be 93 nm and 129 nm, respectively³³; Pramanik et al. compared the size of exosomes from two different cell lines, SKBR3 exosomes size was 170 ± 60 nm by DLS

ARTICLE IN PRESS

I. de Dios-Pérez et al. / Journal of Pharmaceutical Sciences 00 (2023) 1–9

5

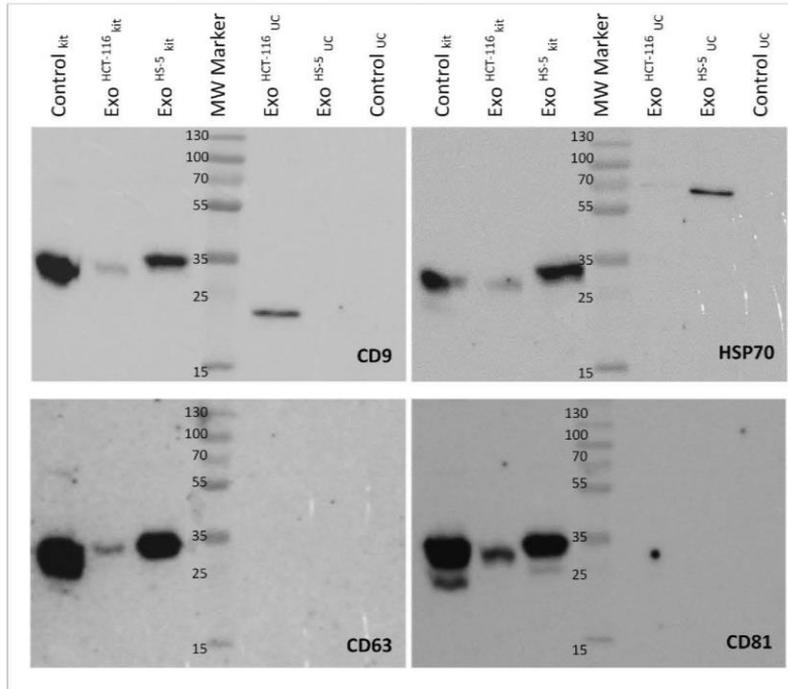


Figure 1. Western blot analysis to determine the presence of exosomal protein markers CD9 (28 kDa), HSP70 (50-70 kDa), CD63 (53 kDa), and CD81 (26 kDa). The presence of these proteins was studied from exosomes isolated samples from HCT-116 culture, HS-5 culture, and the control medium. For each cell line, two methods were used for isolation: kit Exo-Quick-TCTM Ultra or ultracentrifugation (UC). Molecular weight markers are located in the central well, with the three samples obtained by kit located at its left and the three samples obtained by UC located at its right.

and 180 ± 60 nm by TEM, whereas MDA-MB-231 exosomes size was 180 ± 60 nm by DLS and 200 ± 50 nm by TEM³⁴; Kim et al. studied the size and ZP of macrophage-derived exosomes, and the results were 76 nm and -15 mV respectively.³⁵

Quantification of Loaded Exosomes

Exosomes are nanometer-sized natural carriers that provide efficient transport thanks to their morphology and their lipid membrane.

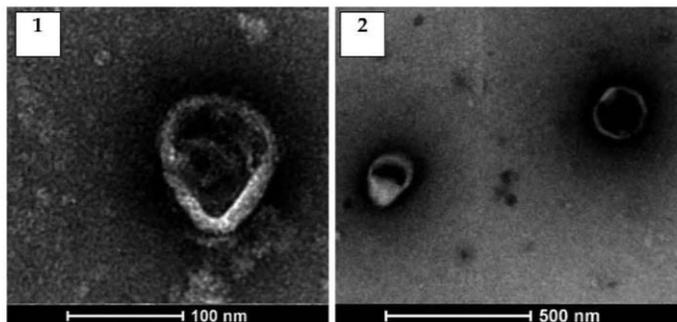


Figure 2. TEM images of exosomes isolated by ultracentrifugation from HCT-116 (1) or HS-5 (2).

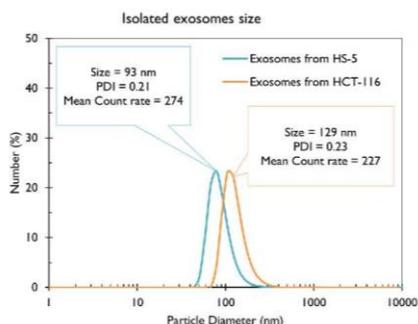


Figure 3. Characterisation of size exosomes by DLS, isolated by ultracentrifugation from HS-5 and HCT-116 cell lines.

The incorporation of drugs into the exosomes was demonstrated qualitatively by absorbance and quantitatively by HPLC MS/MS. Fig. 4 shows the concentration of the drug in the samples, after incorporation into the exosomes by the different loading methods. According to these results, FOH can be introduced into exosomes by any method, however, extrusion provided by far the best results, with colon exosomes containing 5.7 mg/mL FOH and fibrous exosomes containing 8 mg/mL, while the concentrations are below 3 mg/mL when using all other procedures (Fig. 4 A). Regarding PTX (Fig. 4 B), its presence is only determined by incubation in colon exosomes, but with a concentration of 0.05 mg/mL, while in those loaded by extrusion, values of 0.20 mg/mL are obtained in fibrous exosomes and 0.16 mg/mL in colon exosomes. Considering the structure of exosomes and that the most damaging method to incorporate them is extrusion, it is logical that this is the best method to load drugs into exosomes, since the samples are subjected to high pressure, making both FOH and PTX integrate into the lipid layer or cytosol. The problem with this method was the possibility of breaking the exosomes, but it was observed by TEM imaging that the structure was not modified (see supplementary material SM3). Based on these results, the remaining toxicity tests were carried out with the exosomes loaded by extrusion.

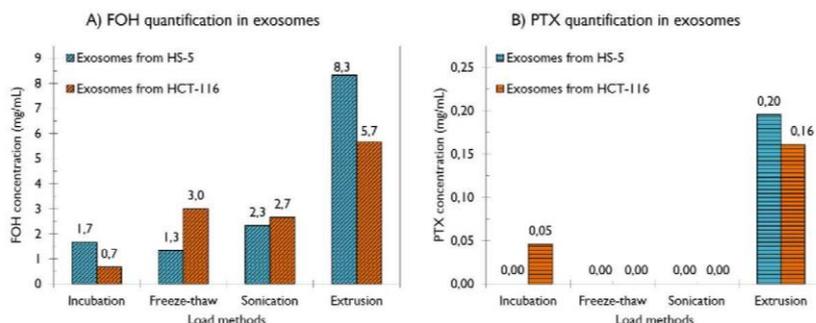


Figure 4. Quantification of drug concentration after incorporation into exosomes samples from HS-5 (blue) or HCT-116 (orange) cell lines using 4 different loading methods: incubation, frozen-thaw, sonication, and extrusion.

Cell Viability Using Exosomes as Drug-Delivery Systems

Colon cancer cells (HCT-116) and healthy fibroblasts (HS-5) were treated with the exosomes (unloaded and loaded with FOH and PTX respectively), as well as with the drugs in free form dissolved in DMSO (500 µg/mL FOH or 5.5 µg/mL PTX). Fig. 5 summarises the viability results of the MTT assay after 24 and 48 h of incubation.

On the one hand, the viability of healthy fibroblasts is higher than 93 % when treated with exosomes from the same cell line (Exo^{HS-5}) and higher than 91 % when the exosomes come from the cancer line (Exo^{HCT-116}) (Fig. 5 A). Therefore, it can be concluded that unloaded exosomes do not affect their viability. Regarding the treatment of these cells with FOH in its free form or loaded in exosomes, we observed that after 48 hours it is minimally reduced when the drug has been loaded in Exo^{HS-5} FOH (96 %), but drops significantly, up to 78 % in the case of Exo^{HCT-116} FOH and destroys all the cells when it is free FOH. In the case of PTX treatment, a reduction is observed, reaching around 33-39 % when cells are treated with the free drug, but when PTX is loaded into the exosomes, viability also drops to 77 % when cells are treated with Exo^{HS-5} PTX, however viability is not significantly affected with Exo^{HCT-116} PTX treatment.

On the other hand, the colon cancer line shows the same behaviour as the normal line when treated with both unloaded exosomes (Exo^{HCT-116} and Exo^{HS-5}), their viability results after 48 hours show that there are no significant differences with respect to the control (Fig. 5 B). When this line is treated with exosomes loaded with FOH the viability drops significantly, but a difference is observed depending on the line of origin, with viability being reduced to 83 %–85 % with Exo^{HS-5} FOH and 58 % with Exo^{HCT-116} FOH, while free FOH destroys all cells. However, if the exosomes are loaded with PTX, the viability relative to the control is 12 % with Exo^{HS-5} PTX and 4 % with Exo^{HCT-116} PTX, while the viability with free PTX remains above 30 %.

In summary, the viability of both cell lines is not reduced by the presence of unloaded exosomes. Regarding the exosomes loaded with FOH, a slight decrease in viability is observed in the fibroblasts, as in the carcinogenic line if treated with Exo^{HS-5} FOH, while the viability of this line is reduced to 58 % if treated with Exo^{HCT-116} FOH. Finally, free PTX affects both cell lines similarly, reducing viability by about 30 %, but it is striking that normal cells are less affected when PTX has been loaded into the exosomes while the viability of the carcinogenic line is reduced by less than 12 %.

Therefore, cancer cells were more affected than normal cells when treated with loaded exosomes, especially those containing PTX. These results are consistent with the initial hypothesis since free drugs are

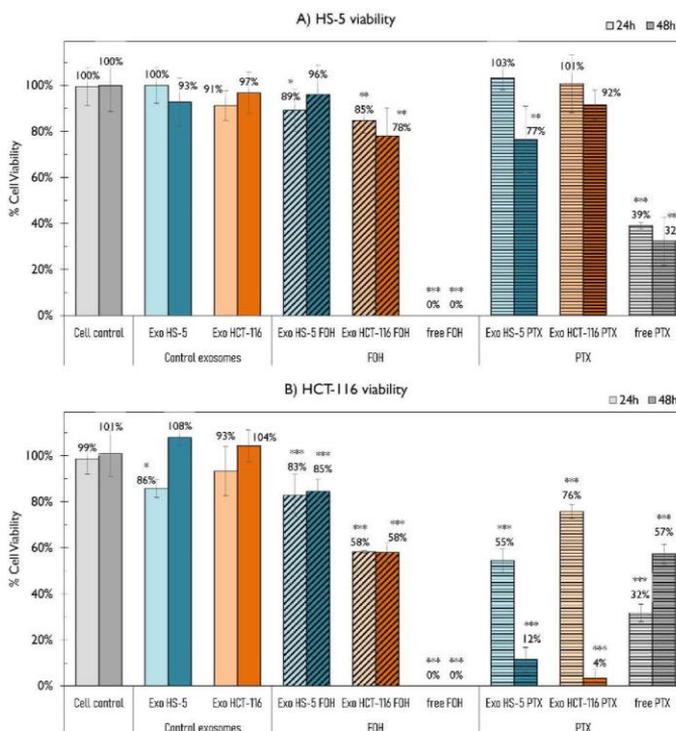


Figure 5. Cell viability (determined by MTT assay) after treatment with loaded exosomes after 24 or 48 h of treatment: A. Normal fibroblast (HS-5), B. colorectal cancer (HCT-116). For each cell line, they were treated with exosomes derived from these unloaded lines (Exo HS-5 or Exo HCT-116 respectively), loaded with PTX or FOH, or with the free drug dissolved in DMSO. Each treatment was carried out by triplicate (n=3) and error bars represents the mean standard deviation.

capable of damaging cells in vitro due to their low solubility and high toxicity. The difference in viability between both types of cell lines seems to be due to better fusion of the lipid bilayer of the exosomes with the plasma membrane of the target cell, which increases the cellular internalization of the encapsulated drugs.³⁰

Cyclodextrin or Exosomes as Drug Delivery system

As it was mentioned in the introduction, the use of cyclodextrins is common to improve the solubility of drugs, so in order to decide which method is more effective and selective (cyclodextrins or exosomes), the results obtained in this study have been compared with those of Dios-Pérez et al. 2022.¹⁷ Fig. 6 shows the viability of healthy fibroblasts (HS-5) and Colon cancer cells (HCT-116) from the MTT assay after 24 and 48 hours of incubation when they were treated with FOH on different systems: forming a complex with a cyclodextrin (SBE-β-CD) or loaded on the exosomes from both cell lines (Exo^{HS-5} and Exo^{HCT-116}). To corroborate that these results are due to FOH, the effect of cyclodextrin and exosomes without FOH was studied. In the control SBE-β-CD samples, cell viability of both lines cells was reduced to 88–94 %, and the complex with FOH reduced HS-5 viability to 61 % and HCT-116 viability to 53 %, being the form that

most affected cell proliferation. FOH loaded in the exosomes had different results depending on the origin of the exosomes. If they came from HS-5, the viability of both cell lines decreased slightly (cell viability was over 83 %), but if they came from HCT-116, the viability of fibroblasts was over 78 %, while that of the carcinogenic line decreased to 58 %, resulting in the best selective system, being the one with the most different results between the two lines.

Conclusions

According to our data, the samples isolated with ExoQuick TC Ultra contained something that interfered with the assays to determine the protein concentration (BCA) and the type (WB) of protein, so this method of exosome isolation had to be discarded. Instead, it can be concluded that exosomes had been isolated by ultracentrifugation from both cell cultures (normal and cancerous lines), due to the presence of spheroids with diameters below 200 nm observed by DLS (93nm Exo^{HS-5} and 129 nm Exo^{HCT-116}) and by TEM. In addition, the WB assay confirmed the presence of CD9 proteins in Exo^{HCT-116} and HSP-70 in the exosomes from both lines, although the signal was stronger in Exo^{HS-5}.

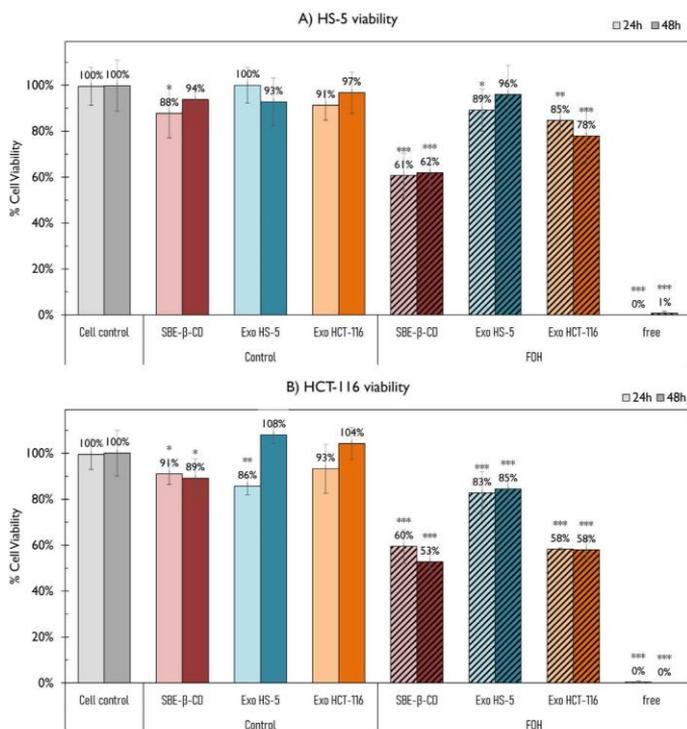


Figure 6. Cell viability (determined by MTT assay) after treatment with loaded exosomes after 24 or 48 h of treatment: A. Normal fibroblast (HS-5). B. colorectal cancer (HCT-116). For each cell line, they were treated with exosomes derived from these unloaded lines (Exo HS-5 or Exo HCT-116 respectively), loaded with SBE-β-CD or FOH, or with the free drug dissolved in DMSO. Each treatment was carried out by triplicate (n=3) and error bars represents the mean standard deviation.

After their characterisation, the exosomes were loaded with the two proposed drugs (FOH and PTX) using different methods (incubation, frozen-thaw, sonication, and extrusion). The results showed that FOH could be incorporated by any of the methods, but it was the extrusion samples that showed the highest concentration (8.3 mg/mL to Exo^{HS-5}_{PTX} and 5.7 mg/mL to Exo^{HCT-116}_{PTX}), and the presence of PTX was only determined in the extrusion-loaded exosomes (0.20 mg/mL to Exo^{HS-5}_{PTX} and 0.16 mg/mL to Exo^{HCT-116}_{PTX}). So it was the method chosen to work.

Moreover, the toxicity studies showed that the control of unloaded exosomes determined that they did not significantly affect the viability of any of the cell lines after 48 hours, since all values were higher than 93% in all cases. Exosomes loaded with FOH showed different results depending on the cells of origin: fibroblast viability was less reduced with Exo^{HS-5}_{FOH} (89 – 96 %) than with Exo^{HCT-116}_{FOH} (85 – 78 %), and the same occurred with the cancer line, whose viability was 85–83 % when treated with Exo^{HS-5}_{FOH} and 58 % with Exo^{HCT-116}_{FOH}. PTX-loaded exosomes showed similar results in fibroblasts, obtaining values of 77 % with Exo^{HS-5}_{PTX} and 92 % with Exo^{HCT-116}_{PTX}; but were more effective against the cancer line, reaching viability values after 48 hours of treatment of 12 % for Exo^{HS-5}_{PTX} and 4 % for Exo^{HCT-116}_{PTX}.

Finally, the effect of including the farnesol in cyclodextrin (SBE-β-CD) showed that the viability was reduced by up to 61 % in fibroblasts and 53 % in cancer cells. These values are comparable to those obtained with Exo^{HCT-116}_{FOH} since they reduce the viability of cancer cells by up to 58 % but affect healthy cells more mildly, reducing their viability by around 80 %. It is therefore concluded that exosomes are a promising way to selectively transport drugs.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

CRediT authorship contribution statement

Inmaculada de Dios-Pérez: Methodology, Software, Validation, Writing – original draft. **Álvaro González-Garcinuño:** Conceptualization, Writing – review & editing. **Isabel Muñoz-Barroso:** Writing – review & editing. **Eva María Martín del Valle:** Conceptualization, Resources, Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

ARTICLE IN PRESS

I. de Dios-Pérez et al. / Journal of Pharmaceutical Sciences 00 (2023) 1–9

9

Funding

This research was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, grant number **CTQ2016-78988-R** and **PID2019-108994RB-I00**.

Institutional Review Board Statement

Not applicable.

Informed Consent Statement

Not applicable.

Data Availability Statement

Not applicable.

Acknowledgments

This project was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (CTQ2016-78988-R); the project Non-cytotoxic nanoparticles for promoting a double metabolic inhibition of tumour growth: Cancer cell as a biochemical reactor, financed by the Spanish Ministry of Science and Innovation (PID2019-108994RB-I00). Inmaculada de Dios Pérez would like to particularly acknowledge the Spanish Ministry of Education (BES-2017-080001) for her PhD grant (FPI).

The authors would like to thank the Electron Microscopy Facilities-NUCLEUS of the University of Salamanca for their contribution to the TEM images.

Supplementary Materials

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.xphs.2023.10.017.

References

1. Sung H, Ferlay J, Siegel R L, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
2. Ahmed S, Johnson K, Ahmed O, Iqbal N. Advances in the management of colorectal cancer: from biology to treatment. *Int J Colorectal Dis.* 2014;29(9):1031–1042. <https://doi.org/10.1007/s00384-014-1928-5>.
3. Arrighetti N, Corbo C, Evangelopoulos M, Pastò A, Zuco V, Tasciotti E. Exosome-like nanovehicles for drug delivery in cancer. *Curr Med Chem.* 2018;26(33):6132–6148. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180831150259>.
4. Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discovery.* AACR. 2022;12(1):31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CCR-21-1059>.
5. Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell J.* 2011;144(5):646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
6. Tenzer S, Doctor D, Rofsa S, Wlodarski A, Kuharev J, Rekkik A, Knauer S K, Bantz C, Nawroth T, Bier C, Siriratnanapan J, Mann W, Treuel L, Zellner R, Maskos M, Schild H, Stauber R H. Nanoparticle size is a critical physicochemical determinant of the human blood plasma corona: a comprehensive quantitative proteomic analysis. *ACS Nano.* 2011;5(9):7155–7167. <https://doi.org/10.1021/nn201950e>.
7. Dobrowolska M A, Aggarwal P, Hall J B, McNeil S E. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. *Mol Pharmaceutics.* 2008;5(4):487–495. <https://doi.org/10.1021/mp800032f>.
8. Wilhelm S, J Tavares A, Dai Q, Ohta S, Audet J, F Dvorak H, C W Chan W. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nat Rev Mater.* 2016;1(5):1–12. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.14>.
9. Pegtel D M, Gould S J. Exosomes. *Annu Rev Biochem.* 2019;20(88):487–514. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111902>.
10. Sreemersch S, de Smedt S C, Raemdonck K. The therapeutic and diagnostic applications of extracellular vesicles. *J Control Release.* 2016;244(Pt B):167–183. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.07.054>.
11. Shao J, Zaro J, Shen Y. Advances in exosome-based drug delivery and tumor targeting: from tissue distribution to intracellular fate. *Int J Nanomedicine.* 2020;15:9355–9371. <https://doi.org/10.2147/IJN.S281890>.

12. Liao W, Du Y, Zhang C, Pan F, Yao Y, Zhang T, Peng Q. Exosomes: the next generation of endogenous nanomaterials for advanced drug delivery and therapy. *Acta Biomater.* 2019;86:1–14. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.12.045>.
13. Zhang X, Yuan X, Shi H, Wu L, Qian H, Xu W. Exosomes in cancer: small particle, big player. *J Hemato Oncol.* 2015;8(83). <https://doi.org/10.1186/s13045-015-0181-x>.
14. Batrakova E V, Kim M S. Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery. *J Control Release.* 2015;219:396–405. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.07.030>.
15. Vader P, Mol E A, Pasterkamp G, Schifflers R M. Extracellular vesicles for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;106:148–156. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.02.006>.
16. Gurnathan S, Kang M H, Jeayaraj M, Qasim M, Kim J H. Review of the isolation, characterization, biological function, and multifarious therapeutic approaches of exosomes. *Cells.* 2019;8(4):307. <https://doi.org/10.3390/cells8040307>.
17. De Dios-Pérez I, González-Garcinuro A, del Valle E M M. An approach to minimize tumour proliferation by reducing the formation of components for cell membrane. *Molecules.* 2022;27(9):2735. <https://doi.org/10.3390/molecules27092735>.
18. Smitha K T, Anitha A, Furuike T, Tamura H, Nair S V, Jayakumar R. In vitro evaluation of paclitaxel loaded amorphous chitin nanoparticles for colon cancer drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013;104:245–253. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.11.031>.
19. Danhier F, Lecouturier N, Vroman B, Jérôme C, Marchand-Brynaert J, Feron O, Préat V. Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation. *JCR.* 2009;133(1):11–17. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.09.086>.
20. Gaucher G, Marchessault R H, Leroux J C. Polyester-based micelles and nanoparticles for the parenteral delivery of taxanes. *JCR.* 2010;143(1):2–12. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.11.012>.
21. Kim M S, Haney M J, Zhao Y, Mahajan V, Deygen I, Klyachko N L, Inskoe E, Piroyan A, Sokolsky M, Okolie O, Hingtgen S D, Kabanov A V, Batrakova E V. Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. *Nanomedicine NBM.* 2016;12(3):655–664. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.10.012>.
22. Tran P H L, Wang T, Yin W, Tran T T D, Barua H T, Zhang Y, Midge S B, Nguyen T N G, Lee B J, Duan W. Development of a nanoamorphous exosomal delivery system as an effective biological platform for improved encapsulation of hydrophobic drugs. *Int J Pharm.* 2019;566:697–707. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.06.028>.
23. Charoenviriyakul C, Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y. Preservation of exosomes at room temperature using lyophilization. *Int J Pharm.* 2018;553(1–2):1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.10.032>.
24. Sancho-Alberro M, Martín-Pardillos A, Luján L, Sebastián V, Santamaría J, Martín-Duque P. Exosomes loaded with ultrasmall Pt nanoparticles: a novel low-toxicity alternative to cisplatin. *J Nanobiotechnology.* 2022;20(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01675-4>.
25. Jiang Y, Ji X, Liu K, Shi Y, Wang C, Li Y, Zhang T, He Y, Xiang M, Zhao R. Exosomal miR-200c-3p negatively regulates the migration and invasion of lipopolysaccharide (LPS)-stimulated colorectal cancer (CRC). *BMC Mol Cell Biol.* 2020;21(48). <https://doi.org/10.1186/s12860-020-00291-0>.
26. Javidi-Sharif N, Martinez J, English I, Joshi S K, Scopim-Ribiero R, Edwards V D K, Agarwal A, Lopez C, Jorgens D, Tyrer J W, Drucker B J, Traer E. FGFR2-FGFR1 signaling regulates release of Leukemia-Protective exosomes from bone marrow stromal cells. *Elife.* 2019;8. <https://doi.org/10.7554/eLife.40033.001>.
27. Bai J, Zhang X, Shi D, Xiang Z, Wang S, Yang C, Liu Q, Huang S, Fang Y, Zhang W, Song J, Xiong B. Exosomal miR-128-3p promotes epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cells by targeting FOXO4 via TGF- β /SMAD and JAK/STAT3 signaling. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.56873>.
28. Farahani M, Rubbi C, Liu L, Slupsky J R, Kalakonda N. CLL exosomes modulate the transcriptome and behaviour of recipient stromal cells and are selectively enriched in MIR-202-3p. *PLoS ONE.* 2015;10(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141429>.
29. Sancho-Alberro M, Navascués N, Mendoza G, Sebastián V, Arruebo M, Martín-Duque P, Santamaría J. Exosome origin determines cell targeting and the transfer of therapeutic nanoparticles towards target cells. *J Nanobiotechnology.* 2019;17(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0437-z>.
30. Salarpour S, Foroutanfar H, Pournamdar M, Ahmadi-Zeidiabadi M, Esmaeili M, Pardakhy A. Paclitaxel incorporated exosomes derived from glioblastoma cells: comparative study of two loading techniques. *DARU J. Pharm.* 2019;27(2):533–539. <https://doi.org/10.1007/s00499-019-0280-5>.
31. Bai T, Martin P, Fogarty B, Brown A, Schurman K, Phipps R, Yin V P, Lockman P, Bai S. Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in Danio Rerio. *Pharm Res.* 2015;32(6):2003–2014. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1593-y>.
32. Kalimuthu S, Gangadaran P, Rajendran R L, Zhu L, Oh J M, Lee H W, Gopal A, Baek S H, Jeong S Y, Lee S W, Lee J, Ahn B C. A new approach for loading anticancer drugs into mesenchymal stem cell-derived exosome mimetics for cancer therapy. *Front Pharmacol.* 2018;9(1116). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01.116>.
33. Wang P, Wang H, Huang Q, Peng C, Yao L, Chen H, Qiu Z, Wu Y, Wang L, Chen W. Exosomes from M1-polarized macrophages enhance paclitaxel antitumor activity by activating macrophage-mediated inflammation. *Theranostics.* 2019;9(6):1714–1727. <https://doi.org/10.7150/thno.30716>.
34. Pramanik A, Mayer J, Paribandla S, Gates K, Gao Y, Davis D, Seshadri R, Ray P C. Mixed-dimensional heterogeneous material-based SERs for trace level identification of breast cancer-derived exosomes. *ACS Omega.* 2020;5(27):16602–16611. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01441>.
35. Kim M S, Haney M J, Zhao Y, Yuan D, Deygen I, Klyachko N L, Kabanov A V, Batrakova E V. Engineering macrophage-derived exosomes for targeted paclitaxel delivery to pulmonary metastases: in vitro and in vivo evaluations. *Nanomedicine NBM.* 2018;14(1):195–204. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.09.011>.

Capítulo 5

-

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES CON FARNESOL PARA TRATAMIENTO ONCOLÓGICO LOCALIZADO

1. Introducción

La cirugía continúa siendo la estrategia clínica principal para la mayoría de los tumores sólidos, aunque generalmente requiere terapia adyuvante. No obstante, estas terapias presentan ciertos problemas que se pretenden solventar mediante diferentes enfoques de la nanomedicina [215; 216]. En este contexto, los capítulos anteriores de esta tesis doctoral se han centrado en estudiar el efecto antitumoral del farnesol, tanto en su forma libre (FOH), como en forma de complejo con una ciclodextrina (SBE- β -CD – FOH), o incluido en el interior de exosomas (EXO_{FOH}).

En el tercer capítulo se evidenció la eficacia antitumoral del FOH, capaz de inhibir la proliferación celular en cáncer de colon e hígado en mayor medida que en los fibroblastos normales. A pesar de que el FOH en su forma libre es más eficaz, su baja solubilidad hace que sea preferible su utilización en forma de SBE- β -CD – FOH. Posteriormente, en el cuarto capítulo se mejoró esta selectividad mediante el empleo de exosomas derivados de las células cancerígenas de colon, ya que actuaban de manera más efectiva contra células homotípicas.

Las estrategias descritas anteriormente, fueron desarrolladas con un fin de aplicación por vía sistémica. No obstante, esta forma de administración plantea desafíos, ya implica que los fármacos alcancen el tumor a través del torrente sanguíneo, mientras que es necesario una liberación específica y localizada de los fármacos en los tumores. Debido a esto, en este capítulo se aborda la posibilidad de una administración local, para conseguir un efecto más focalizado [215; 216].

En comparación con los tratamientos sistémicos, los sistemas de administración local de fármacos (LDDS) ofrecen la ventaja de liberar altas concentraciones de medicamentos directamente en el tumor, evitando la distribución no específica del fármaco y reduciendo su toxicidad en tejidos sanos. Además, permiten una regulación más precisa de la liberación del fármaco y la

eliminación del período de latencia asociado a la quimioterapia posquirúrgica, durante las cuales las células cancerosas pueden proliferar. Esto es fundamental, ya que habitualmente se esperan varias semanas a que el paciente se recupere de la operación antes de iniciar los tratamientos [129; 132 – 133; 215 – 217].

Los LDDS se pueden encontrar en diferentes formas físicas, ya sea en forma de obleas, geles, espumas, enemas, fibras o micropartículas. La Tabla 5.1 presenta algunos ejemplos de estos sistemas en tratamientos anticancerígenos, los cuales han sido aprobados por la FDA [129; 132].

Tabla 5.1 LDDS aprobados por la FDA en tratamientos anticancerígenos

LDDS	Funcionamiento	Ref.
<i>Microesferas de Paclimer</i> ®	Administración en la zona tumoral para liberación de paclitaxel, se utiliza para varios tipos de cáncer.	[218]
<i>Milibarras de polímero</i>	Barras sólidas de polímero implantadas en el sitio del tumor que contienen fármacos para combatir diversos tipos de cáncer. Requieren otra intervención quirúrgica para retirarse.	[219]
<i>Gliadel Wafers</i> ®	Se implanta en la cavidad postquirúrgica en los tumores cerebrales malignos, liberando carmustina. Requiere una segunda intervención para retirar los wafers.	[220]
<i>Oncogel</i> ®	Gel con Paclitaxel aplicado localmente en la cavidad peritoneal en los cánceres de mama y ovario; puede irritar el lugar de administración y requiere habilidades especializadas para su formulación.	[221]
<i>Eligard</i> ®, <i>Trelstar</i> ®, <i>Lupron Depot</i> ®, <i>Vantas</i> ®, <i>Zoladex</i> ®	Sistemas que utilizan análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) para suprimir la producción de hormonas sexuales y tratar cánceres como el de próstata. Asociados con efectos secundarios hormonales; requieren administración continua.	[222]

A pesar de la variedad de sistemas de administración para la terapia localizada, la mayoría de ellos no son completamente biodegradables, por lo que se requiere una intervención quirúrgica para su eliminación post-tratamiento. Por

esta razón, actualmente los hidrogeles son objeto de atención en la investigación, ya que son capaces de degradarse por completo [129; 132; 217].

La primera vez que se describió un *hidrogel* en un artículo fue en 1894, pero no fue hasta 1960, cuando Wichterle y Lim desarrollaron el primer hidrogel para su aplicación biológica [223]. Desde entonces, la investigación de estos compuestos ha ido en aumento, ya que son los LDDS más interesantes desde el punto de vista fisicoquímico, al ser similares a las matrices tisulares y extracelulares [132; 223].

En este sentido, los hidrogeles inteligentes son ideales para esta aplicación debido a su capacidad para gelificar en el cuerpo humano al responder a estímulos como la temperatura o el pH. Esta característica permite su aplicación de manera uniforme, adaptándose a cavidades irregulares. Específicamente, los hidrogeles termosensibles, es decir, los que responden a cambios térmicos, han sido objeto de numerosos estudios en tratamientos anticancerígenos, como se mencionó en el capítulo 1 [129; 132]. Un parámetro fundamental en este tipo de hidrogeles es la temperatura crítica de la solución (CST), que representa el punto en el que la estructura experimenta una transición a la fase de gel. Estos hidrogeles se clasifican en función de su CST en:

- ↳ Hidrogeles UCGT (Upper Critical Gelation Temperature): Gelifican al enfriarse por debajo de una CST superior.
- ↳ Hidrogeles LCGT (Lower Critical Gelation Temperature): Gelifican al calentarse por encima de una CST inferior.

En el caso de hidrogeles inyectables diseñados para la liberación de fármacos, los más interesantes son los de comportamiento LCGT, ya que permite sintetizarlos y cárgalos a bajas temperaturas, al tiempo que tienen una estructura de gel estable a 37 °C [129; 132; 223]. La mayoría de los polímeros para la preparación de este tipo de hidrogeles termosensibles son los poloxámeros, más conocidos por el nombre comercial de Pluronic® [223].

1.1. Pluronic F-127

Los poloxámeros son copolímeros tribloque no iónicos, solubles en agua, y su estructura se basa en un bloque central hidrófobo de óxido de polipropileno (PPO) y dos extremos hidrófilos de óxido de polietileno (PEO). Los grupos PEO proporcionan biocompatibilidad y solubilidad en agua, mientras que los grupos PPO confieren capacidad de carga de fármacos hidrofóbicos [224].

Las soluciones de estos polímeros gelifican cuando la temperatura supera la CST. Tal como se muestra en la Figura 5.1, este proceso se da por una deshidratación de las cadenas de PPO, dando lugar a interacciones hidrofóbicas que provocarán la formación micelas que terminarán agregándose. Es importante destacar que a medida que se incrementa la concentración de polímero, la temperatura requerida para la transición sol-gel disminuye [129; 132].

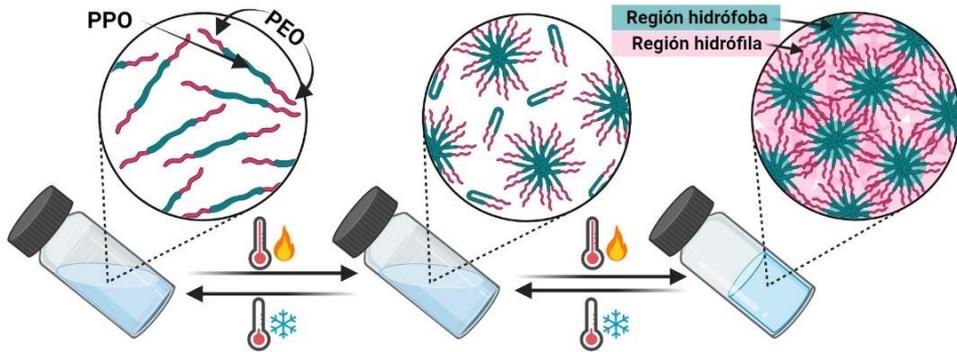


Figura 5.1 Efecto de la temperatura en la estructura de una disolución de poloxámero. Fuente: elaboración propia

Estos polímeros son conocidos por su equilibrio hidrofílico-lipofílico, es decir el proporción de los grupos PEO y de los grupos PPO. Esta característica los hace útiles para diversas aplicaciones, incluyendo formulaciones farmacéuticas. Uno de los más comunes para la preparación de estos hidrogeles se encuentra el Poloxámero 407, también llamado Pluronic® F-127 (PF-127), cuya estructura se muestra en la Figura 5.2.

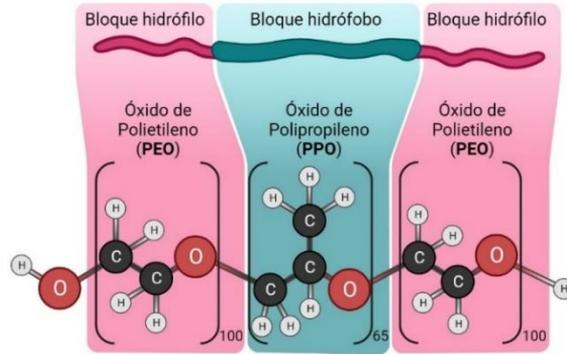


Figura 5.2 Estructura de Pluronic F-127. Fuente: elaboración propia

Este compuesto es biocompatible, biodegradable y no tóxico, por lo que la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) lo ha aprobado para su uso en humanos [223 – 225]. Además, se ha demostrado que PF-127 ayuda a mejorar la unión celular y la formación de colágeno, lo que facilita la formación de vasos sanguíneos, contribuyendo a la cicatrización posquirúrgica. Por lo tanto, PF-127 puede emplearse en el desarrollo y síntesis de hidrogeles termosensibles, con el fin de utilizarlos en terapias localizadas, desarrollando así sistemas potenciales de tratamientos anticancerígenos. Esto permite aprovechar los beneficios de los sistemas de depósito tradicionales y se evita la exposición sistémica a fármacos [129].

No obstante, la resistencia mecánica de estos geles es reducida, esto significa que se degradan rápidamente porque no tienen una fuerza de cohesión necesaria para mantener su integridad estructural. Esta limitación ha restringido su aplicación y ha dado lugar a la exploración de modificaciones. En este sentido, se propone añadir un polisacárido para aumentar el tiempo de degradación, formando geles co-poliméricos en lugar de geles homo-poliméricos [132; 225]. Con este propósito, algunos autores agregaron N,N,N-trimetilquitosano o diisocianato de hexametileno a soluciones de PF-127, formando geles que servirían para liberar docetaxel [225 – 226]. Por ejemplo, Turabee *et al.* añadieron N,N,N-trimetilquitosano, pero no tuvo efecto sobre el tiempo de degradación de

los geles. Por otro lado, Chen *et al.* prolongaron la degradación al sintetizar un copolímero de PF-127 con diisocianato de hexametileno. Sin embargo, utilizaron éter de petróleo como disolvente, lo que podría ser un problema para una futura aplicación en biomedicina debido a su toxicidad [225 – 226].

Para evitar este tipo de problemas se propone el uso de polisacáridos naturales. Algunos de los más empleados para la preparación de hidrogeles según la literatura son el alginato, el quitosano, el ácido hialurónico y la goma gellan [227 – 228]. De todos ellos, la goma gellan se ha convertido en un componente clave en la nanomedicina y la medicina regenerativa, debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, estabilidad, propiedades mecánicas adecuadas, resistencia al ácido y al calor, su sensibilidad ionotrópica, y al hecho de ser un compuesto aprobado por la FDA. En consecuencia, este polisacárido se utiliza habitualmente en la síntesis de nuevos DDS [228 – 229].

1.2. Goma Gellan

La goma gellan (GG) es un polisacárido natural extracelular producido por la bacteria *Pseudomonas elodea*, cuyo descubrimiento data de 1978. GG tiene un elevado peso molecular, oscilando entre 600 g/mol y 1 kg/mol, y es soluble en agua, además presenta características necesarias en la formación de hidrogeles: biocompatibilidad, biodegradabilidad, estabilidad, y sensibilidad ionotrópica. En la Figura 5.3 se muestra la estructura de GG, la cual se presenta como un tetrasacárido lineal aniónico compuesto por β -D glucosa, L-ramnosa y ácido D-glucurónico en una relación molar 2:1:1 [228].

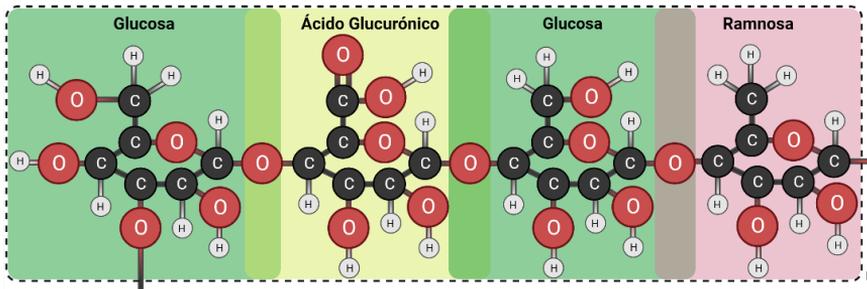


Figura 5.3 Estructura de Goma Gellan Baja en Acilo. Fuente: elaboración propia

El desarrollo de hidrogeles con GG es posible porque las soluciones que contienen este polisacárido son capaces de sufrir una gelificación térmicamente reversible. Su estructura tiene forma de espiral desordenada a temperaturas superiores a 80 °C y cambia a una estructura más ordenada de doble hélice cuando se enfría. Este proceso es ionotrópico, lo que significa que la presencia de cationes promueve el sitio de agregación mediante la unión entre pares de grupos carboxilato en hélices vecinas. Además, las propiedades viscoelásticas del GG facilitan su fácil administración mediante inyección, gelificándose en un gel fluido una vez completada la aplicación [230 – 231].

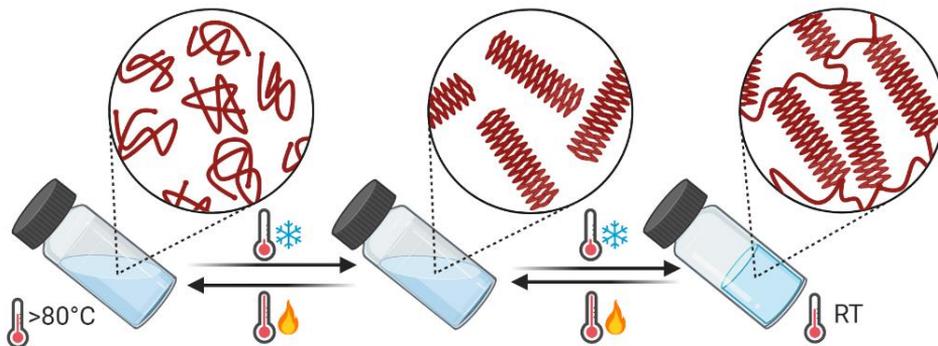


Figura 5.4 Efecto de la temperatura en la estructura de una disolución de Goma Gellan. Fuente: elaboración propia

Dentro de las diversas formas comerciales de GG, la elegida en este proyecto para la síntesis de hidrogeles fue GELRITE® (Gelzan™). Esta elección se basó en su capacidad para dispersarse e hidratarse adecuadamente en agua, su rápida y homogénea gelificación, su capacidad de ser esterilizado en autoclave y su naturaleza químicamente inerte a la mayoría de los aditivos presentes en los medios de crecimiento biológicos [230].

2. Síntesis y caracterización reológica de los hidrogeles

Con el objetivo de desarrollar un LDDS como terapia del cáncer colorrectal, se sintetizaron hidrogeles termosensibles con distintas concentraciones de

Pluronic® F-127 (PF-127) y/o Goma Gellan (GG). Para determinar la proporción óptima de cada compuesto, se realizó la caracterización reológica de dichos geles. Finalmente, se procedió a la incorporación del fármaco para inhibir la proliferación celular, el farnesol, estudiando cómo afecta su inclusión a las propiedades viscoelásticas de los hidrogeles.

Se llevaron a cabo 3 tipos de experimentos reológicos con un reómetro AR 1500 (TA instrument) utilizando una geometría de placa acrílica de 40 mm de diámetro:

- i. **Barrido de temperatura:** se determinaron los módulos de almacenamiento (G') y viscoso (G'') al variar la temperatura desde 10 °C hasta 45 °C con un incremento de 1 °C/min. Manteniendo constantes la frecuencia (1 Hz) y la deformación (0.2 %). El objetivo fue determinar la CST, temperatura en la que el valor de G' es mayor que el de G'' .
- ii. **Barrido de frecuencia:** se determinaron G' y G'' al variar la frecuencia angular desde 0.5 hasta 500 rad/s, manteniendo constantes la temperatura (37 °C) y la deformación (0.2 %). Esto permitió evaluar su capacidad para mantener su forma y resistir deformaciones a temperatura corporal.
- iii. **Prueba de flujo en estado estacionario:** se determinó como cambia la viscosidad al variar la velocidad de corte de 0.1 a 200 s⁻¹ con una temperatura de trabajo constante a 10 °C o 37 °C. El objetivo fue evaluar el tipo de comportamiento reológico en estado líquido (10 °C), condición en el que se manipularán las soluciones, o dentro del cuerpo humano (37 °C).

Para cada ensayo se depositaron 2 mL de la solución estudio en la placa inferior, se ajustó la geometría para dejar un espacio de trabajo de 1 mm y, después de retirar el exceso de gel, se procedió a realizar el ensayo seleccionado.

2.1. Hidrogeles con PF-127

Para decidir la concentración ideal de PF-127, se prepararon soluciones en PBS con diferentes concentraciones del polímero (15 %, 20 %, 25 % y 30 % w/v) y se estudió su reología. Considerando que este polímero se disuelve mejor a bajas temperaturas, la elaboración se realizó en una cámara frigorífica a 4 °C. Tras adicionar las cantidades correspondientes de PF-127, las soluciones se mantuvieron en agitación toda la noche para garantizar su homogeneidad. Una vez listas, se almacenaron en viales hasta su uso.

Hay que tener en cuenta que la condición ideal de los hidrogeles inyectables diseñados para la liberación de fármacos es que su CST sea superior a 25 °C, para poder manipularlos en estado líquido a temperatura ambiente, pero inferior a 37 °C, asegurando que sea un gel estable a la temperatura corporal [129; 132; 223]. Por lo tanto, el primer paso en la síntesis de estos hidrogeles fue determinar la CST en función de la concentración de PF-127, puesto que la principal característica de estas soluciones es que, a mayor concentración del polímero, menor será la temperatura a la que se producirá la gelificación [129: 232]. Así pues, en la Figura 5.5 se muestra como varían G' y G'' en función de la temperatura.

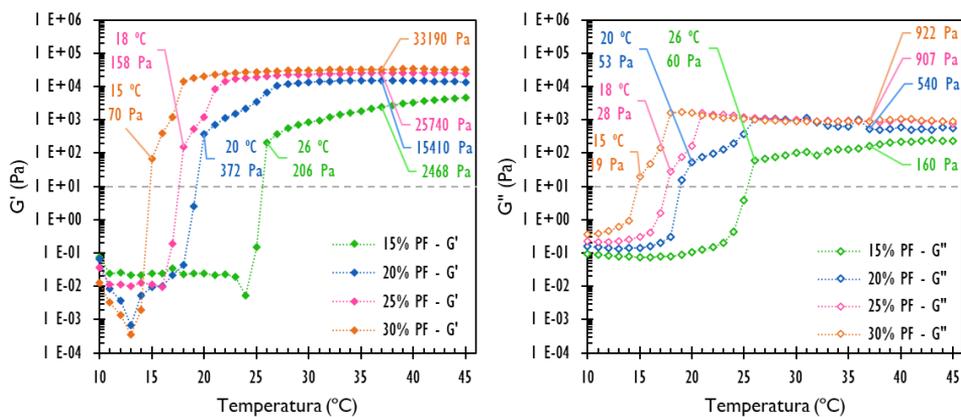


Figura 5.5 Barrido de temperatura en las soluciones de PF-127 a diferentes concentraciones (15 %, 20 %, 25 % y 30 % w/v) en PBS.

En la Figura 5.5 se evidencia que, de acuerdo con la literatura, los valores de CST de las soluciones disminuyeron al aumentar la concentración de PF-127. Para un mejor entendimiento, en la Tabla 5.2 se exponen los resultados de CST y los valores de G' y G'' a esa temperatura.

Tabla 5.2 Resumen de valores de CST de las soluciones de PF-127 a diferentes concentraciones (15 %, 20 %, 25 % y 30 % w/v) en PBS, junto con los valores de G' y G'' a dicha temperatura.

Concentración PF-127	CST	Valores para esa CST	
		G'	G''
15 %	26 °C	206 Pa	60 Pa
20 %	20 °C	372 Pa	53 Pa
25 %	18 °C	158 Pa	28 Pa
30 %	15 °C	70 Pa	19 Pa

A temperaturas por debajo de la CST, todas las muestras presentaban valores de G'' y G' inferiores a 10 Pa. Mientras que, a temperaturas superiores a la CST, los valores de G' fueron mayores que G'' , y ambos continuaban aumentando con la temperatura hasta alcanzar un máximo, tras el cual se mantuvieron relativamente estables. Los valores de la temperatura de estabilidad se encuentran en la Tabla 5.4, junto con los valores de G' y G'' a dicha temperatura.

Tabla 5.3 Resumen de valores de temperatura a la que se estabilizan las soluciones de PF-127 a diferentes concentraciones (15 %, 20 %, 25 % y 30 % w/v) en PBS, junto con los valores de G' y G'' a dicha temperatura.

Concentración PF-127	T estabilidad	Valores para esa temperatura	
		G'	G''
15 %	>45 °C	5 kPa	0.2 kPa
20 %	30 °C	13 kPa	0.5 kPa
25 %	31 °C	24 kPa	0.9 kPa
30 %	32 °C	32 kPa	0.9 kPa

En el caso de la concentración más baja (15%) la estabilidad no se logró en el rango estudiado, por lo que a 37 °C el valor de G' era aún bajo (2468 Pa). Para la solución del 20%, la estabilidad se alcanzó a 30 °C, con un G' de 13 kPa.

Finalmente, las concentraciones más altas, 25 % y 30 %, alcanzaron estabilidad a 31 °C y 32 °C, con valores de G' de 24 kPa y 32 kPa, respectivamente.

Un valor de G' alto garantiza que el hidrogel permanezca el tiempo suficiente *in vitro*, según Jons *et al.* el valor mínimo requerido es una G' de al menos 10 kPa, algo que cumplen todos los sistemas que contienen una concentración superior al 20% de PF-127 [233 – 235].

A continuación, para determinar la capacidad para resistir deformaciones a temperatura corporal se realizó un barrido de frecuencia cuyo resultados se muestra en la Figura 5.6.

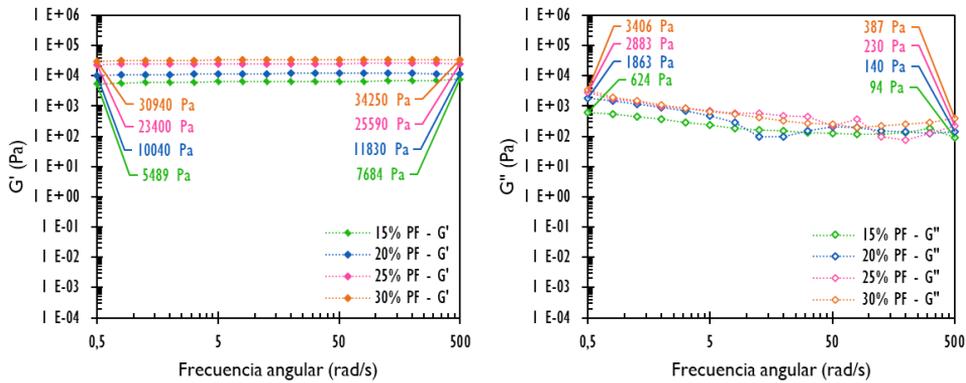


Figura 5.6 Barrido de frecuencia a 37 °C en las soluciones de PF-127 a diferentes concentraciones (15 %, 20 %, 25 % y 30 % w/v) en PBS.

Al analizar los valores de G' y G'' en función de la frecuencia angular que se representan en la Figura 5.6, se concluyó que G' permanece prácticamente constante, experimentando un ligero aumento. Es decir, G' no se ve afectado de forma significativa por la frecuencia angular, mientras que G'' disminuye del orden de 10^3 a 10^2 Pa. Estos resultados indican que se trata de un gel estable a temperatura fisiológica.

Finalmente, la Figura 5.7 presenta los resultados del comportamiento reológico de las muestras a baja temperatura (10 °C), que refleja las condiciones de manipulación de las soluciones, y a temperatura fisiológica (37 °C).

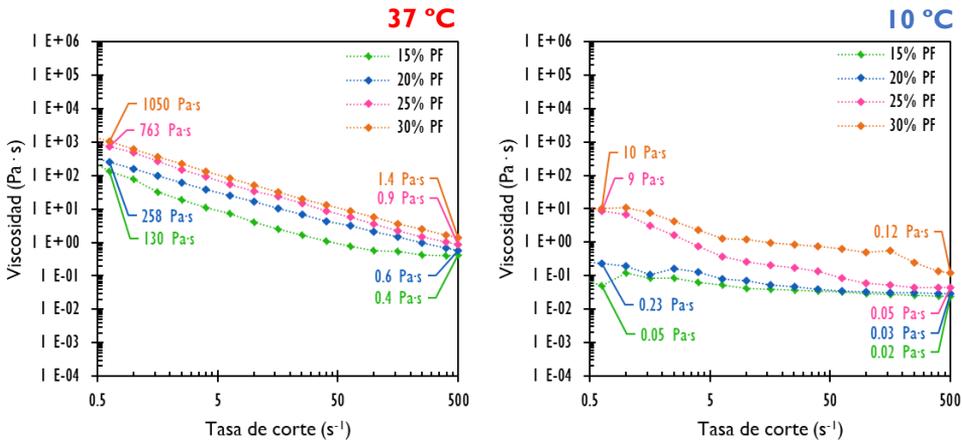


Figura 5.7 Comportamiento reológico a 37 °C y a 10 °C de soluciones de PF-127 a diferentes concentraciones (15 %, 20 %, 25 % y 30 %).

En las pruebas de flujo estacionario mostradas en la Figura 5.7, se observa que a 37 °C todas las muestras experimentaron una reducción de su viscosidad al aumentar la velocidad de corte, pasando de 100 - 1000 Pa·s a 0.4 - 1.4 Pa·s, lo que se corresponde con un fuerte carácter pseudoplástico. Por otro lado, a 10 °C, las muestras con concentraciones más bajas (15 % y 20 %) mostraron una viscosidad inicial inferior a 1 Pa·s, disminuyendo ligeramente con el aumento de la velocidad de corte, mostrando un comportamiento casi newtoniano. Sin embargo, las muestras con las concentraciones más altas (25 y 30 %) mostraron de nuevo un comportamiento pseudoplástico, con una disminución de su viscosidad desde 10 Pa·s hasta por debajo de 1 Pa·s.

Cabe destacar que en el estudio de Schütt *et al.* determinaron que la tasa de corte máxima en el colon fue de 20 s⁻¹, valor que se encuentra dentro del rango estudiado (de 0.5 a 500 s⁻¹) [236]. Además, este fenómeno de adelgazamiento por cizallamiento es crucial para formulaciones inyectables, ya que la tensión o presión de cizallamiento aplicada a la formulación en la jeringa durante la inyección facilitará su flujo adecuado a través de la aguja, incluso cuando se somete a la temperatura corporal después de la punción [237 – 238].

De acuerdo con estos resultados, se descartó la solución del 15 % de PF-127 porque tenían unos valores de G' y G'' muy bajos, lo que indicaba que esa muestra no llegaba a formar un gel estable. Este fenómeno también se observa en las imágenes de la Figura 5.8: antes de incubar (0 h) las muestras se encontraban en estado líquido, la muestra al 20 % gelificó tras incubar 1 hora a 37 °C, mientras que la del 15 % no gelificó ni después de 24 horas de incubación.

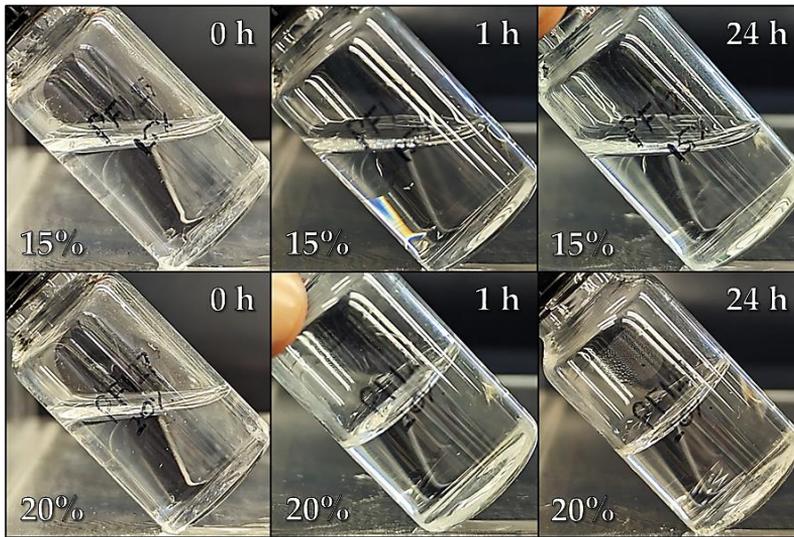


Figura 5.8 Fotografías de las muestras de PF-127 al 15 % y al 20 % en PBS a tiempo 0 h y tras incubar a 37 °C durante 1 hora o 24 horas.

Asimismo, se descartaron las muestras cuyas concentraciones eran más altas (25 % y 30 %), dado que su CST era inferior a 20 °C y formaban geles estables por debajo de los 25 °C. Esto dificulta su manipulación en el laboratorio y su administración en el cuerpo humano, ya que podrían gelificar antes de ser implantados. Por todo ello, se decidió trabajar con una concentración del 20 % de PF-127, ya que se encontraba en forma líquida por debajo de los 20 °C y no alcanzaba su valor máximo de G' a los 27 °C, siendo un gel estable a 37 °C con una G' de unos 15 kPa y G'' de 540 Pa en las condiciones de trabajo estudiadas, cumpliendo así con los requisitos mínimos ($G' > 10$ kPa) [233 – 235; 239].

2.2. Hidrogeles con GG

Considerando la caracterización reológica de la solución de PF-127 al 20 %, se puede suponer una rápida degradación del gel. Por lo que, con el propósito de aumentar el tiempo de degradación del gel, se propuso mejorar su estabilidad incorporando Goma Gellan. Para ello prepararon soluciones de GG con diferentes concentraciones, primero sin PF-127, para corroborar su comportamiento reológico, y después con PF-127 al 20%.

Teniendo en cuenta la naturaleza de GG, es imprescindible que la solución este a una temperatura superior de los 80 °C para su disolución. Además, se decidió, utilizar una concentración máxima de GG del 1 %, debido a que el uso de concentraciones más elevadas podría resultar en una solución excesivamente viscosa, provocando complicaciones en la administración inyectable.

De este modo, las soluciones se prepararon añadiendo 0.125 %, 0.25 %, 0.50 % y 1.00 % w/v de GG a PBS a 80 °C y agitando durante 1 hora, seguido de un enfriamiento a temperatura ambiente durante 1 hora más y posteriormente se llevaron a una cámara fría para reducir su temperatura hasta los 4 °C. Finalmente, se añadió a las muestras la cantidad correspondiente de PF-127 y se mantuvieron en agitación durante toda la noche. Una vez que las soluciones estuvieron homogéneas, se almacenaron en viales a 4 °C hasta su uso.

En este apartado, se exponen los resultados de los análisis reológicos de las soluciones con diferentes concentraciones de GG. En primer lugar, en ausencia de PF-127, y, en segundo lugar, en presencia de PF-127.

2.2.1. Reología GG sin PF-127

Para comprobar si existía un efecto termosensible en las disoluciones de GG, se realizó un barrido de temperatura de las soluciones de GG sin PF-127, cuyos resultados se muestra en la Figura 5.9 .

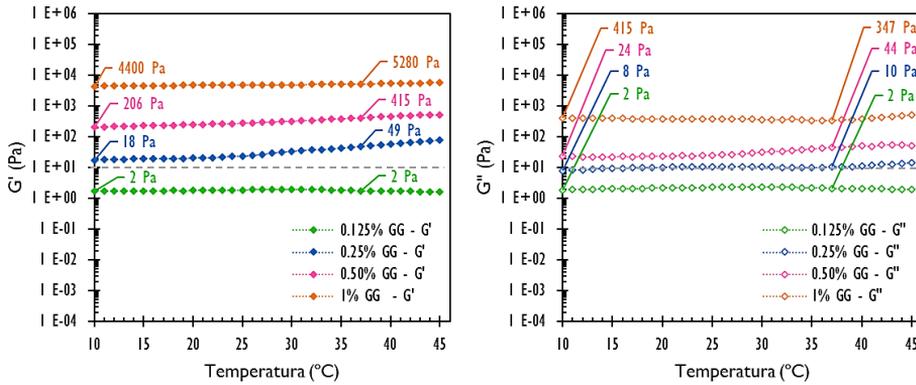


Figura 5.9 Barrido de temperatura en las soluciones de GG a diferentes concentraciones (0.125 %, 0.25 %, 0.50 % y 1 % w/v) en PBS.

El efecto de la temperatura de la Figura 5.9 indicó que G' permanecía prácticamente constante al variar la temperatura de 10 °C a 45 °C, como se esperaba. Según la bibliografía, GG cambia de una estructura ordenada a desordenada cuando la temperatura es superior a 80 °C, y vuelve a cambiar al enfriarse, por debajo de los 42 °C. Por lo que para revertir el proceso de gelificación la temperatura debería superar los 80 °C [240 – 241]. En la Tabla 5.4 se muestran los resultados a 37 °C de los módulos elástico y viscoso, así como la diferencia entre ambos:

Tabla 5.4 Resumen de valores de CST, G' y G'' de las soluciones de GG a diferentes concentraciones (0.125 %, 0.25 %, 0.50 % y 1 % w/v) en PBS.

Concentración GG	G'	G''	$G' - G''$
0.125 %	2 Pa	2 Pa	0 Pa
0.25 %	49 Pa	10 Pa	39 Pa
0.50 %	415 Pa	44 Pa	371 Pa
1 %	5280 Pa	347 Pa	4934 Pa

En la muestra de 0.125% la diferencia entre G' y G'' era nula, lo que indica que tiene estructura líquida, mientras que esa diferencia aumentaba con la concentración de GG, lo que significa la formación de geles más fuertes.

Y, al igual que se hizo con PF-127, para determinar la capacidad para resistir deformaciones a temperatura corporal se realizó un barrido de frecuencia, los resultados se exponen en la Figura 5.10.

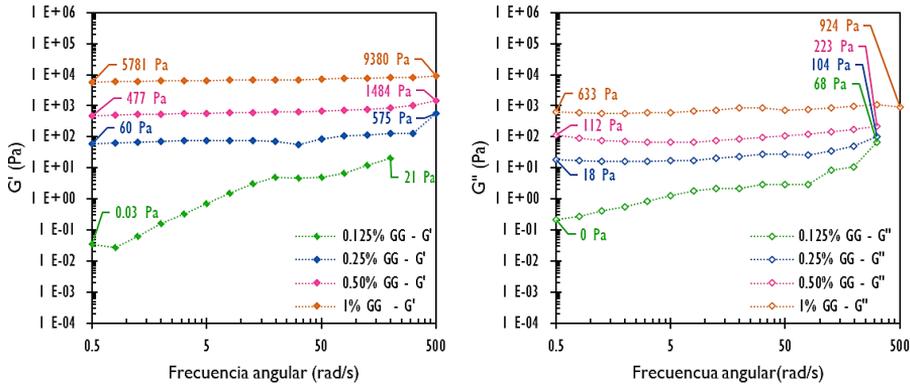


Figura 5.10 Barrido de frecuencia a 37 °C en las soluciones de GG a diferentes concentraciones (0.125 %, 0.25 %, 0.50 % y 1 % w/v) en PBS.

El efecto de la frecuencia angular en G' y G'' mostrado en la Figura 5.10, confirmó que la muestra al 0.125% era líquida, ya que los valores de G'' eran superiores a los de G' . En cuanto al resto de muestras, ambos valores aumentaban ligeramente con el aumento de la frecuencia angular, pero G'' siempre era menor que G' , indicando mayor estabilidad cuando se aumenta la concentración de GG.

Finalmente, la Figura 5.11 presenta el comportamiento reológico a 37 °C y 10 °C mediante el análisis de flujo estacionario.

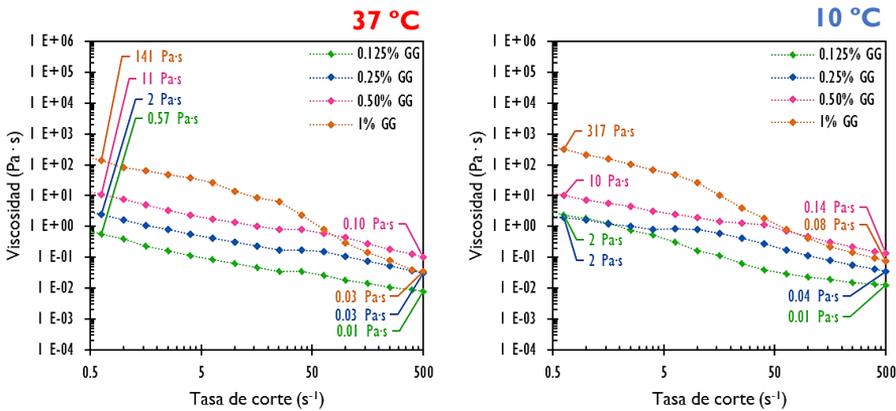


Figura 5.11 Comportamiento reológico a 37 °C y a 10 °C de soluciones de GG a diferentes concentraciones (0.125 %, 0.25 %, 0.50 % y 1 %).

Las gráficas presentadas en la Figura 5.11 resultaron ser similares en ambas temperaturas, ya que en este rango de temperatura estas soluciones no se vieron afectadas en gran medida. En todos los casos, cuanto mayor era la velocidad de corte, menor era la viscosidad, indicando un comportamiento pseudoplástico de los fluidos.

2.2.2. Reología GG con 20% PF-127

Con el fin de evaluar si variaba la CST al adicionar diferentes concentraciones de GG en la solución de PF-127 al 20% se hizo un barrido de temperatura, el cual se muestra en la Figura 5.12.

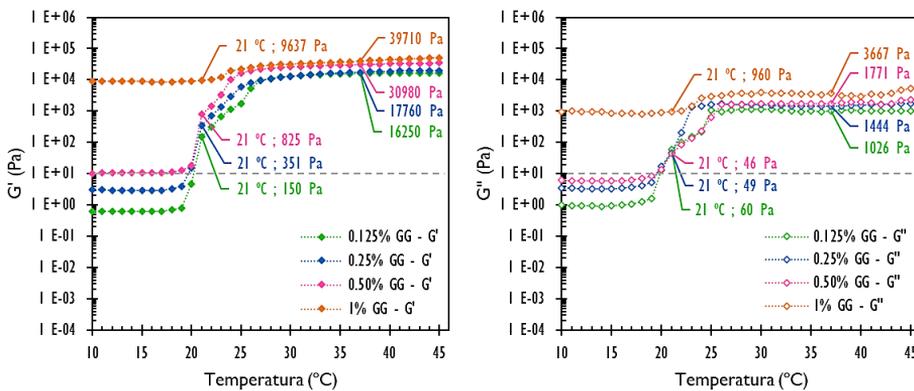


Figura 5.12 Barrido de temperatura en las soluciones de PF-127 al 20% y GG a diferentes concentraciones (0.125%, 0.25%, 0.50% y 1% w/v) en PBS.

Las gráficas de la Figura 5.12 indican que en las muestras con las tres concentraciones más bajas de GG, el sistema es claramente sensible a la temperatura (de 10 a 45 °C), y la CST de esas muestras fue la misma, 21 °C. Sin embargo, en el caso del GG al 1%, la estructura del polisacárido predominó sobre el PF-127, por lo que la muestra mantuvo forma de gel sin sensibilidad a la temperatura, lo que supone un problema para su aplicación como gel termosensible. Además, todos los geles eran estables a 37 °C, cuyos valores de G' y G'' se resumen en la Tabla 5.5. En esta tabla también se incluye la diferencia entre ambos valores ($G' - G''$), con el fin de concretar si la estructura del hidrogel es líquida o no.

Tabla 5.5 Resumen de valores de G' , G'' y $G' - G''$ a 37 °C de las soluciones de PF-127 al 20 % y GG a diferentes concentraciones (0.125 %, 0.25 %, 0.50 % y 1 % w/v) en PBS.

Concentración GG	G'	G''	$G' - G''$
0.125 %	16250 Pa	1026 Pa	15224 Pa
0.25 %	17760 Pa	1444 Pa	16316 Pa
0.50 %	30980 Pa	1771 Pa	29209 Pa
1 %	39710 Pa	3667 Pa	36043 Pa

En resumen, los resultados de la Tabla 5.5. indican que todas las muestras presentan estructura solida a 37 °C, siendo más estable a medida que aumenta la concentración de GG.

Con el propósito de determinar la capacidad para resistir deformaciones a temperatura corporal se realizó un barrido de frecuencia, cuyos resultados se exponen en la Figura 5.13.

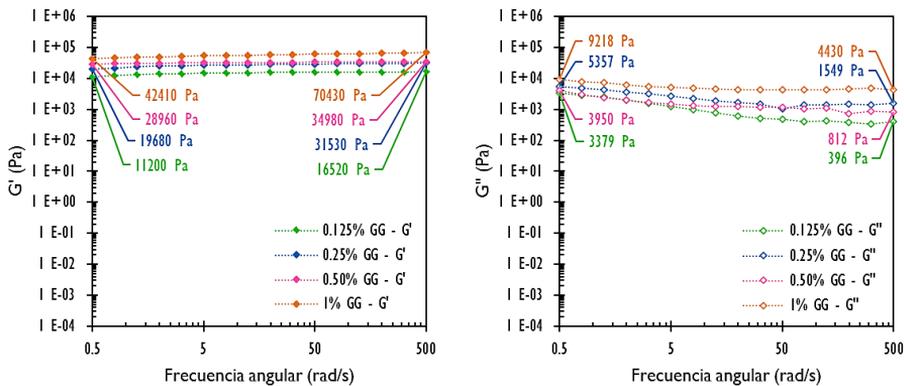


Figura 5.13 Barrido de frecuencia a 37 °C en las soluciones de PF-127 al 20% y GG a diferentes concentraciones (0.125 %, 0.25 %, 0.50 % y 1 % w/v) en PBS.

El análisis de barrido de frecuencia de la Figura 5.13, corroboró los resultados del barrido de temperatura, al aumentar la frecuencia angular había un ligero aumento de G' y una ligera reducción de G'' ; lo que se relaciona con un comportamiento más sólido y elástico de los hidrogeles.

Para finalizar, la Figura 5.14 presenta el comportamiento reológico a 37 °C y 10 °C mediante el análisis de flujo estacionario.

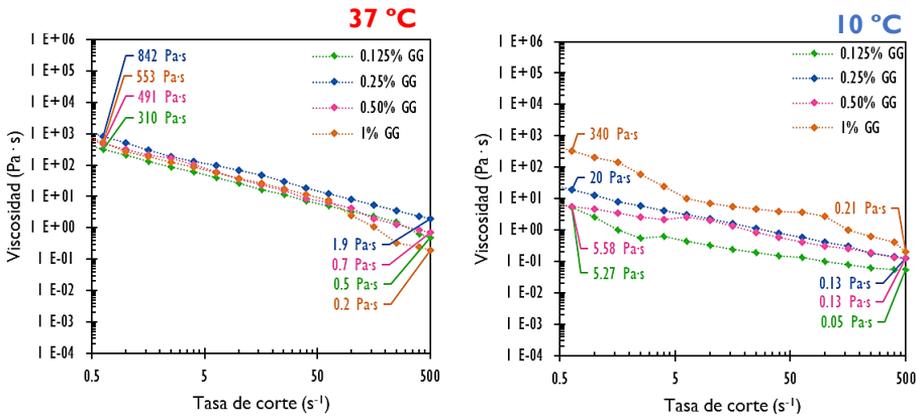


Figura 5.14 Comportamiento reológico a 37 °C y a 10 °C de soluciones de PF-127 al 20 % y GG a diferentes concentraciones (0.125 %, 0.25 %, 0.50 % y 1 %).

Finalmente, los resultados de las pruebas de flujo en estado estacionario de la Figura 5.14 revelan que las soluciones mantienen su carácter pseudoplástico. Aunque, al igual que en las muestras de PF-127 sin GG, la viscosidad era mayor a 37 °C que a 10 °C en todas las soluciones debido a la formación de una red más fuerte como resultado de la adición de GG; excepto para la solución al 1%, donde los valores fueron similares porque GG, en esa concentración, predomina sobre PF-127, como se mencionó anteriormente.

2.2.3. Consideraciones finales sobre el uso de GG

Teniendo en cuenta todos estos resultados, se decidió descartar la concentración más alta de GG (1%), ya que implicaría trabajar con un gel no termosensible. De tal forma que la concentración óptima de GG era la segunda más alta (0.50 %), puesto que permite trabajar con sistemas en estado líquido a bajas temperaturas (G' era 18 Pa a 20 °C) y, a su vez, fomenta que el gel sea más fuerte y estable a 37 °C (G' era 30 kPa y G'' era 1 kPa).

2.3. Hidrogeles cargados con fármacos

Finalmente, tras determinar las proporciones óptimas de PF-127 (20 %) y GG (0.5 %), se investigó el efecto de incluir el fármaco en la reología del hidrogel. Dada la baja solubilidad del farnesol en disolventes acuosos ($8 \cdot 10^{-6} \text{M}$), se analizó el efecto de adicionarlo en forma libre (FOH) o como complejo con ciclodextrina (CDF). Por lo que se preparó una solución madre de CDF, agregando 400 mM de FOH a una solución de CD 400 mM en PBS, mezclándola y filtrándola para eliminar el FOH libre. También se estudió el comportamiento de la CD libre para verificar que no interfiriera en la reología.

Para la formación de los geles, esquematizada en la Figura 5.15, se preparó una solución de 0.5 % de GG en PBS a 80 °C, agitándola durante 1 hora, seguida de un enfriamiento a temperatura ambiente durante 1 hora más. Luego, se trasladó a una cámara fría para reducir su temperatura a 4 °C y se agregó PF-127 al 20 % manteniéndose en agitación a esa temperatura toda la noche. Una vez obtenida la solución homogénea se dividió en frascos para incorporar el compuesto correspondiente en cada caso: FOH, CDF o CD. Las soluciones se agitaron nuevamente durante la noche (al menos 12 horas) y, al día siguiente, se almacenaron en viales a 4 °C hasta su uso.

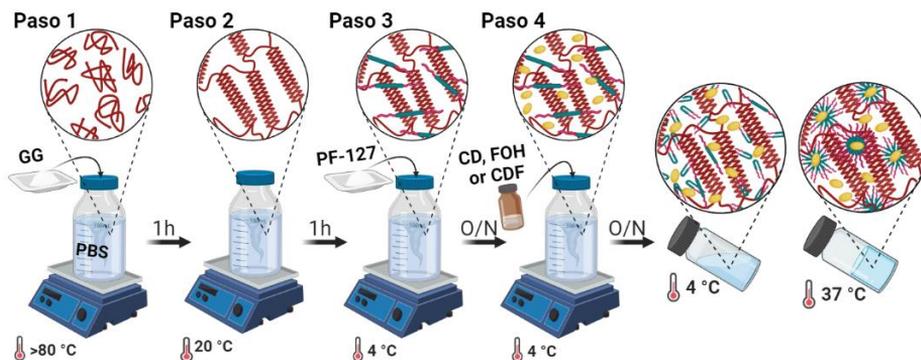


Figura 5.15 Proceso de síntesis de los hidrogeles con 0.5 % de GG, 20 % de PF-127 y farnesol en diferentes formulaciones y concentraciones. Fuente: elaboración propia.

La concentración final de los compuestos estudiados fue de 400, 200, 40, 20 y 4 mM para FOH libre; 40-20 mM y 8-4 mM para CDF; y, 40 mM y 8 mM de CD como control de ciclodextrina. Estas concentraciones se eligieron con el fin de lograr una liberación sostenida (con un efecto antitumoral adecuado) que podría cuantificarse, ya que supera el límite de detección del instrumento [242].

Para evitar cambios en la reología debido a la incorporación de diferentes volúmenes de la solución madre, se optó por trabajar con un volumen final añadido del 10 % v/v, ajustándolo con PBS si fuera necesario.

Para comprobar si existía un efecto termosensible en las disoluciones de 20 % PF-127 y 0.5 % GG al variar las concentraciones de FOH libre desde 0 a 400 mM, los resultados se muestran en la Figura 5.16.

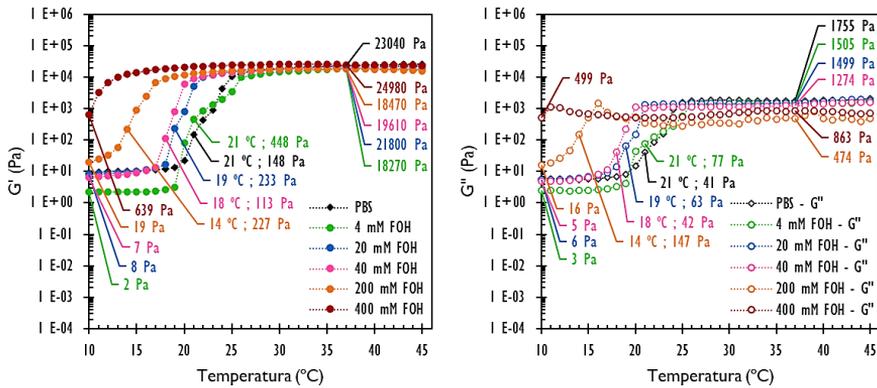


Figura 5.16 Efecto de temperatura en los hidrogeles de PF-127 al 20 % y GG al 0.50 %, a los que se adicionó un 10 % v/v de diferentes soluciones: FOH a concentraciones variables, y PBS como control.

Como se puede observar en la Figura 5.16, el CST de la muestra control (PBS) era 21 °C y dicho valor no cambió cuando se agregó una concentración mínima de FOH libre (4 mM). Sin embargo, a medida que se incrementaba dicha concentración, CST disminuyó, siendo estos valores de 19 °C y 18 °C para las muestras de 20 mM y 40 mM, y de hasta 14 °C para FOH 200 mM. Además, la muestra de FOH 400 mM no muestra un cambio en su estructura a una temperatura específica, ya que mantuvo la estructura de gel en todo el rango

estudiado, registrando valores de G' de 639 Pa y de G'' de 499 Pa a 10 °C. Aunque, resalta el hecho de que todas las muestras tienen estructura de gel estable a 37 °C, donde G' aumentaba con la concentración de FOH (de 16 kPa a 20 kPa).

Teniendo en cuenta estos resultados se descartó utilizar las muestras cuyas concentraciones de FOH superaban los 200 mM de FOH, puesto que la CST era demasiado baja. Además, tal como se observa en la Figura 5.17, dichas soluciones mostraban una tendencia a formar una emulsión en lugar de una dispersión.

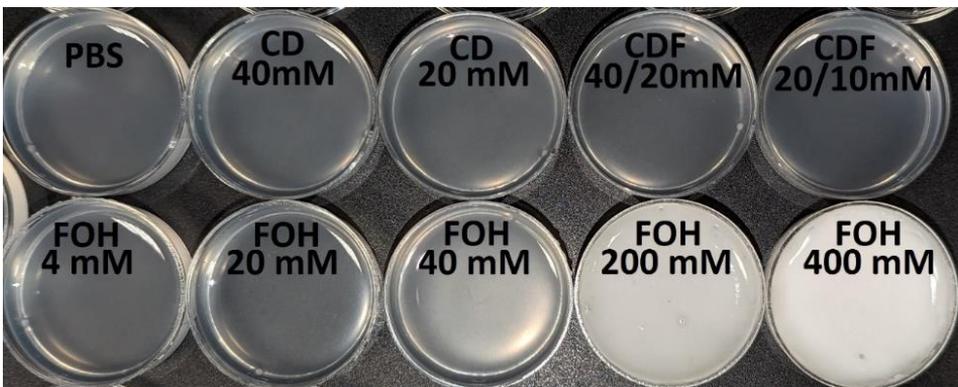


Figura 5.17 Hidrogeles de PF-127 al 20 % y GG al 0.50 %, a los que se adicionó un 10 % v/v de diferentes soluciones: CD, CDF o FOH a concentraciones variables, y PBS como control (temperatura ambiente).

Dada la naturaleza lipídica de FOH, resulta razonable anticipar la formación de emulsiones. Además, existe la posibilidad de que no se solubilice en sangre al liberarse del hidrogel. Por esta razón, se exploró el efecto termosensible en las disoluciones que contenían un 20 % de PF-127 y un 0.5 % de GG al trabajar con el complejo CDF a 2 concentraciones: 40-20 mM o 8-4 mM, así como del control de la ciclodextrina en la misma concentración (40 mM y 8 mM de CD). Cuyos resultados se exponen en la Figura 5.18.

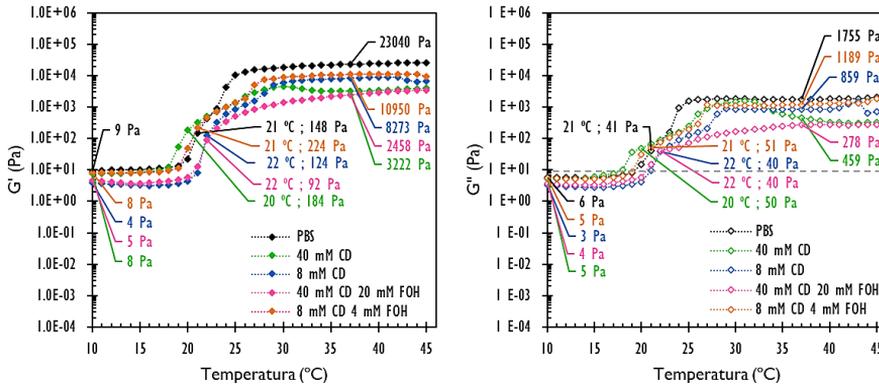


Figura 5.18 Efecto de temperatura en los hidrogeles de PF-127 al 20 % y GG al 0.50 %, a los que se adicionó un 10 % v/v de CDF 40-20 mM y 8-4 mM, con los controles de CD y PBS.

La Figura 5.18 muestra que la CD en esas concentraciones no afectó significativamente al resultado de CST, siendo de $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sin embargo, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ la presencia de CD redujo drásticamente la G' , siendo de 3 kPa para las muestras con mayor concentración de CD (40 mM), y de 9 kPa en el caso de 20 mM, mientras que la del control era de 20 kPa. Parece, por tanto, que la adición de ciclodextrinas libres o en forma de complejo, dificultan la formación de la red polimérica. Esto sugiere que las cadenas poliméricas intentan alojarse en la cavidad de la CD, dificultando la interacción de las cadenas poliméricas con la parte hidrofóbica del PF-127, como se muestra en la Figura 5.19. Esta explicación concuerda con trabajos previos que usaron ciclodextrinas para minimizar el ensamblaje en micelas poliméricas [243].

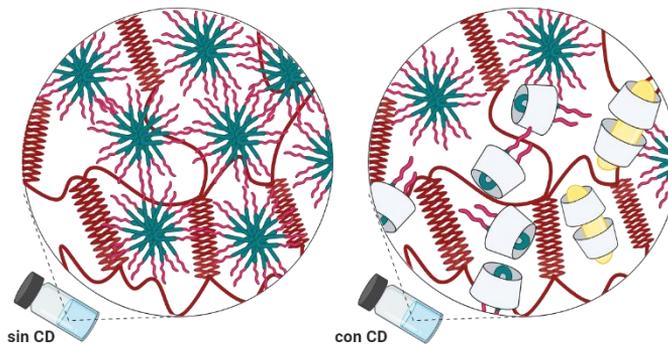


Figura 5.19 Efecto de la presencia d CD en las soluciones de 20 % PF-127 y 0.5 % GG. Fuente: elaboración propia

Con el objetivo de evaluar la capacidad para resistir deformaciones a temperatura corporal, se llevó a cabo un análisis de barrido de frecuencia en los geles con concentraciones variables de FOH, como se muestra en la Figura 5.20.

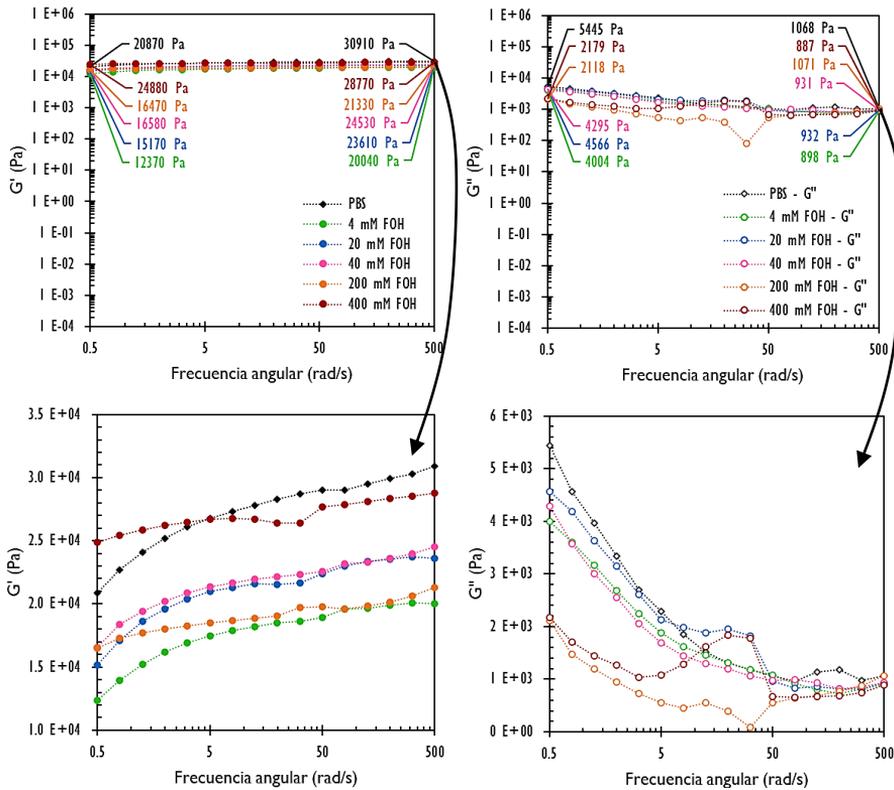


Figura 5.20 Barrido de frecuencia de hidrogel de PF-127 al 20 % y GG al 0.50 %, a los que se adicionó un 10 % v/v de diferentes soluciones: FOH a concentraciones variables, y PBS como control.

En lo que respecta al análisis de barrido de frecuencia de las muestras con diferentes concentraciones de FOH libre, la Figura 5.20 muestra que al aumentar la frecuencia angular había un ligero aumento de G' y una reducción de G'' , lo que se relaciona con un comportamiento más sólido y elástico de los hidrogel. Esto también indicó la formación de un gel fuerte para todas las concentraciones de FOH. En base a estos resultados se optó por una concentración de 20 mM de FOH ya que esta es la máxima cantidad que se puede agregar sin modificar el comportamiento reológico de las formulaciones.

Se realizó el mismo análisis de barrido de frecuencia en los geles con distintas formulaciones, incluyendo FOH 20 mM, CD 40 mM y CDF 40-20 mM. Cuyos resultados se exponen en la Figura 5.21.

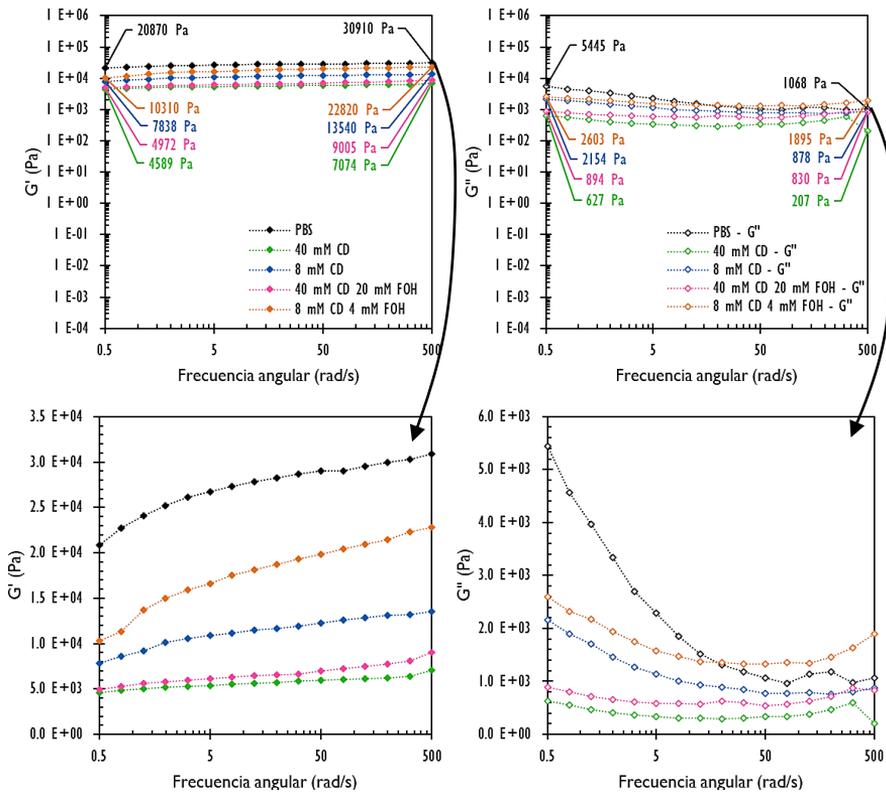


Figura 5.21 Barrido de frecuencia de hidrogel de PF-127 al 20 % y GG al 0.50 %, a los que se adicionó un 10 % v/v de CDF 40-20 mM y 8-4 mM, con los controles de CD y PBS.

Para ver los resultados de forma más clara, en la Figura 5.21 están los resultados en escala logarítmica y no logarítmica ampliada. En resumen, en todas las formulaciones estudiadas, la frecuencia angular no afectó a G' (formación de gel fuerte), sin embargo, cuanto mayor era la concentración de CD, más se reducía G' , lo que se debe a que la CD alberga cadenas poliméricas, reduciendo así la naturaleza sólida de la formulación. Además, se observa una mayor reducción cuando se utiliza la CD, en vez de en forma de complejo. Esto se debe a que FOH

está albergado en la cavidad de CD, impidiendo que esta albergue las cadenas poliméricas de PF-127.

Por último, la Figura 5.22 presenta el comportamiento reológico a 37 °C y 10 °C mediante el análisis de flujo estacionario de las soluciones 20 % PF-127 y 0.5 % GG, al variar las concentraciones de FOH libre desde 0 a 400 mM.

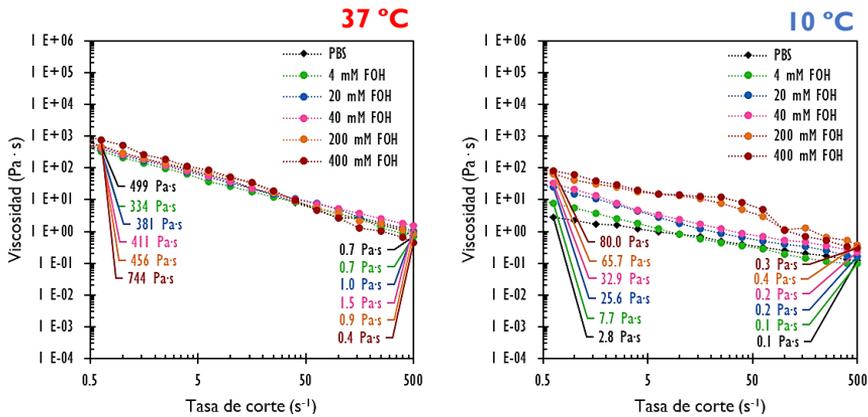


Figura 5.22 Comportamiento reológico de soluciones con PF-127 al 20 %, GG al 0.50 % y FOH a diferentes concentraciones a 37 °C y 10 °C.

En el análisis de barrido de frecuencia de la Figura 5.22, todas las muestras de FOH libre tuvieron un comportamiento similar. A 37 °C la viscosidad inicial era del orden de 10² Pa·s, pero se reducía por debajo de 1 Pa·s al aumentar la tasa de corte. Mientras que a 10 °C los valores de viscosidad inicial aumentaron con la concentración de FOH (de 2 a 100 Pa·s), este fenómeno se asoció a la baja solubilidad del FOH y la formación de emulsiones. Sin embargo, a 37 °C la solución tiene estructura de gel debido a la presencia PF-127 y, como consecuencia, el FOH quedó atrapado en el gel y su contribución a la viscosidad fue menos significativa.

Finalmente, se estudió ese comportamiento reológico al trabajar con diferentes formulaciones FOH 20 mM, CD 40 mM y CDF 40-20 mM. Estos resultados se exponen en la Figura 5.23.

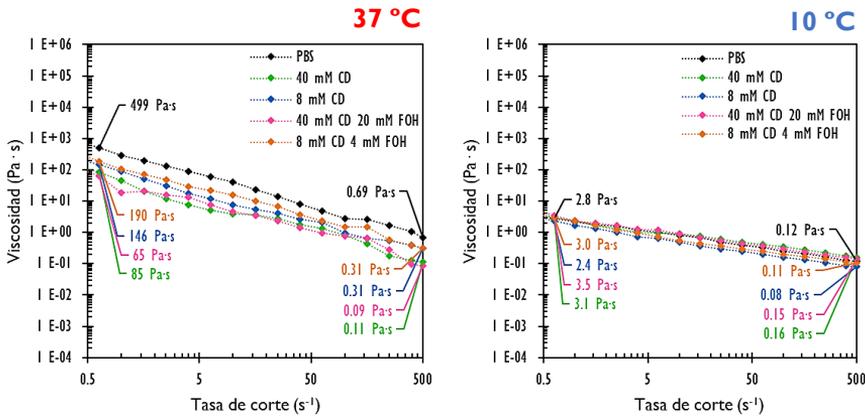


Figura 5.23 Comportamiento reológico de soluciones con PF-127 al 20%, GG al 0,50% a los que se adicionó un 10% v/v de CDF 40-20 mM y 8-4 mM, con los controles de CD y PBS.

Finalmente, el análisis de estado estacionario mostrado en la Figura 5.23 ilustra que el sistema mantuvo su comportamiento pseudoplástico con la adición del complejo y de las moléculas individuales. Por otro lado, comparando los valores de CD y CDF, se observa que a 37 °C cuanto mayor es la concentración de CD, más baja es la viscosidad. En este caso, estos resultados se pueden explicar considerando la competencia entre los diferentes compuestos que albergará la CD (como se explicó anteriormente) y cómo las cadenas poliméricas pueden incluirse en la CD, disminuyendo su contribución a la viscosidad. Este hecho no se observó a 10 °C porque la solución con PF-127 no había gelificado (sin estructura).

Estos resultados indicaron la posibilidad de controlar las propiedades reológicas del hidrogel con la adición de diferentes compuestos, como GG, FOH o CD. Este fenómeno resalta cómo se puede modificar el carácter inyectable de una formulación con PF-127, hasta llegar a preparar un hidrogel, incluso a la carta. Este hecho puede ser relevante para definir una potencial aplicación farmacéutica del sistema desarrollado.

3. Experimentos de degradación del gel y liberación de fármacos

La degradación de los hidrogeles y la liberación de fármaco se investigaron *in vitro*, para ello se gelificaron 5 mL de las soluciones en placas petri de 35 mm de diámetro incubando a 37 °C durante la noche.

3.1. Metodología de la degradación de geles

Las placas Petri se colocaron en unos soportes dentro de vasos que contenían 70 mL de PBS (pH 7.4) a temperatura fisiológica y se sometieron a agitación magnética, como se muestra en la Figura 5.24. La degradación de los geles se midió pesándolos cada hora.



Figura 5.24 Sistema de degradación de los geles. Fuente: elaboración propia

Los resultados de la degradación se utilizaron para construir un modelo de proceso que explicase la contribución de ambos polímeros (GG y PF-127) a la estabilidad de los geles, así como a la liberación de los compuestos en su interior (FOH en este caso). Según publicaciones anteriores [129; 132], el porcentaje de pérdida de masa se puede calcular según la Ecuación 9, en función de la masa relativa de ambos polímeros involucrados (% v/v) y la fracción de cadenas liberadas de la estructura interna del hidrogel (FC):

$$\% \text{ Masa perdida} = W_{PF} \cdot FC_{PF} + W_{GG} \cdot FC_{GG}$$

Ecuación 9. Cálculo del porcentaje de pérdida de masa

Para estimar el valor de FC para cada polímero es necesario definir otro parámetro (P), que es una función dependiente del tiempo según la Ecuación 10, y que depende del parámetro K' (tasa de degradación) y del tiempo (t).

$$P = 1 - \exp(-K' \cdot t)$$

Ecuación 10. Cálculo del parámetro P

A partir de este parámetro, es posible definir la fracción de cadenas liberadas para GG (Ecuación 11) y para PF-127 (Ecuación 12).

$$F_{GG} = (1 - (1 - P)^2)^N$$

Ecuación 11. Cálculo de las cadenas liberadas para GG

$$F_{PF} = P^2 + P(1 - P) \cdot F_{GG}$$

Ecuación 12. Cálculo de las cadenas liberadas para PF-127

Por lo tanto, es necesario estimar dos parámetros (k' y N) a partir de los datos experimentales. Inicialmente se realiza una estimación preliminar para analizar si ambos parámetros son linealmente independientes y el rango de valores. Luego de esta estimación preliminar, se puede observar que el valor de N tiene resultados similares para todas las simulaciones (valor alrededor de 10). Por lo tanto, puede considerarse como un valor fijo para las siguientes simulaciones, con mayor precisión (N = 10). Para la estimación de k' (parámetro de tasa de degradación), se ha utilizado el complemento Solver en Excel para minimizar el valor de error entre el valor predicho (teórico) y el valor experimental. Esta desviación absoluta promedio (AAD) se calcula como la suma del valor absoluto de la diferencia entre los valores experimentales y teóricos para cada tiempo, según la Ecuación 13.

$$AAD (\%) = \frac{\sum_i |T_{v_i} - E_{v_i}|}{n} \cdot 100$$

Ecuación 13. Cálculo de la desviación absoluta promedio (AAD)

Donde T_{v_i} es el valor teórico para cada tiempo, E_{v_i} es el valor experimental para cada tiempo y n es el número de puntos experimentales.

3.1.1. Resultados de la degradación de geles

Los resultados de pérdida de masa a lo largo del tiempo de los geles de PF-127 al 20% con concentración variable de GG se muestran en la Figura 5.25.

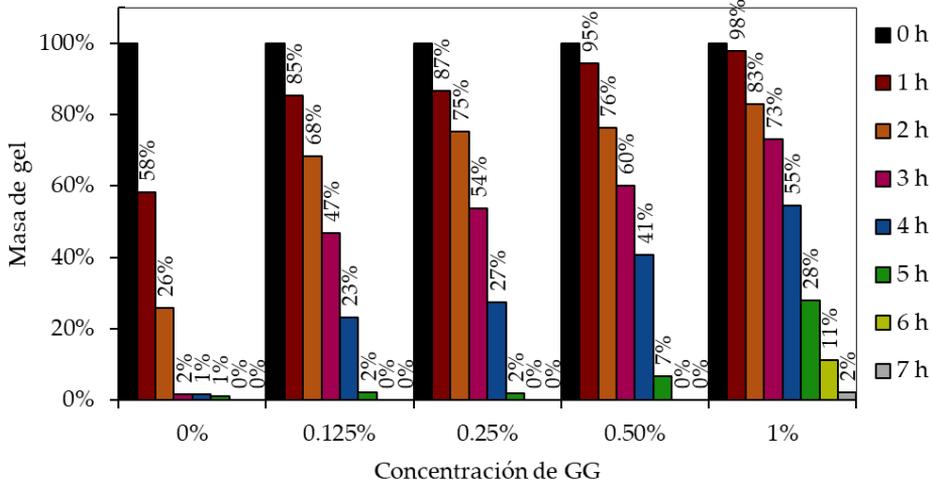


Figura 5.25. Resultados de la degradación experimental de hidrogeles de PF-127 al 20% con concentraciones variables de GG

En la Figura 5.25 se observa un aumento en el tiempo de degradación al aumentar la concentración de GG. De esta forma, la muestra de PF-127 al 20% sin GG, experimentó una degradación casi completa a las 3 horas, quedando solo un 2% de masa; considerando se consideró casi completa cuando la masa era inferior al 5% de la masa inicial. La incorporación de 0.125% de GG implicó que aun quedase un 47% de la masa inicial en ese mismo tiempo (3 h), aproximándose a la degradación completa (2%) a las 5 horas, valores similares a los obtenidos con 0.25% de GG. En el caso de aumentar hasta el 0.50% de G, aún quedaba un 7% de la masa a las 5 horas, logrando la completa degradación (0%) a las 6 horas. Finalmente, la adición del 1% de GG llevó a una degradación casi completa (2%) después de 7 horas de ensayo.

Con estos resultados se llevó a cabo la modelización y ajuste de parámetros (ecuaciones 9 a 13), lo cual se representa en la Figura 5.26.

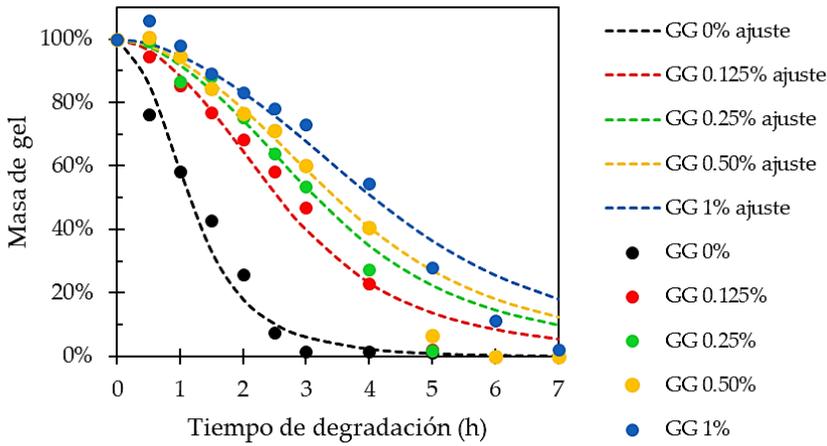


Figura 5.26. Ajuste tras la estimación de parámetros de la degradación de los hidrogeles de PF-127 al 20 % con concentraciones variables de GG.

En la Figura 5.26 destaca cómo la concentración de GG en la preparación de hidrogel modificó el perfil de degradación. En primer lugar, en todos los perfiles, no se observó ganancia de masa en la primera hora, considerada insignificante para la modelización. Se evidenció que una mayor concentración de GG se asociaba con un gel más estable (menor velocidad de degradación), demostrando que hay más interacciones entre las cadenas y, por lo tanto, se necesita más tiempo para una degradación completa de las cadenas. Revelando una degradación más lenta con concentraciones más altas de GG, puesto que en ausencia del polisacárido esta degradación se alcanza llegadas las 3 horas de ensayo, mientras que aumenta hasta las 5 horas con 0.125 % o 0.25 % de GG, e incluso hasta las 6 horas en la muestra de 0.50 % GG, y de 7 horas en la de 1 % de GG.

Tras estudiar el efecto de GG en los hidrogeles de pluronic, se estudió el impacto en la degradación de los hidrogeles 20 % PF-127 y 0.5 % GG si se adicionaba el farnesol en su forma liber o de complejo (FOH o CDF). Cuyos resultados se muestran en la Figura 5.27.

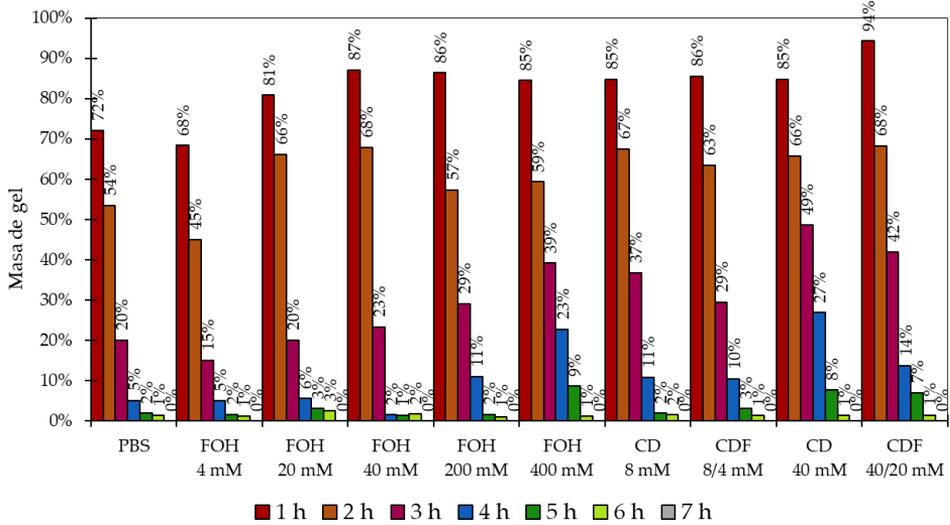


Figura 5.27. Resultados de la degradación experimental de hidrogeles de PF-127 al 20 % con GG al 0.5 % que contienen PBS como control; FOH, CD o CDF en diferentes concentraciones.

En la Figura 5.27 muestra que no hay gran diferencia respecto al tiempo de degradación cuando se adiciona PBS o FOH en bajas concentraciones, ya que la masa inicial tras 4 horas de ensayo se reduce hasta el 5 % de la masa inicial en el caso de PBS, 5 % en FOH 4 mM, 6 % en FOH 20 mM y 2 % en FOH 40mM. Mientras que en ese mismo tiempo (4 h) el resto de muestras conservan más del 10 % de la masa inicial. Las concentraciones más altas de FOH libre hasta las 5 horas en el caso de 200 mM (2 %) y hasta las 6 horas para FOH 400 mM (1%). En lo que respecta a las muestras con CD o CDF, se obtienen resultados similares cuando la concentración de ciclodextrina es la misma. De tal forma que para una conncetración de 8 mM de CD, la degradación se alcanza las 5 horas (2 % y 3 %); mientras que para la concentración de 40 mM esta degradación se alcanza a las 6 horas, con valores inferiores al 5 %.

Con los valores experimentales, se llevo a cabo una modelización y ajuste de parametros, utilizando las ecuaciones indicadas en el apartado 3.1 (de la 9 a la 13), cuyos resultados se representan en las gráficas presentadas en la Figura 5.28.

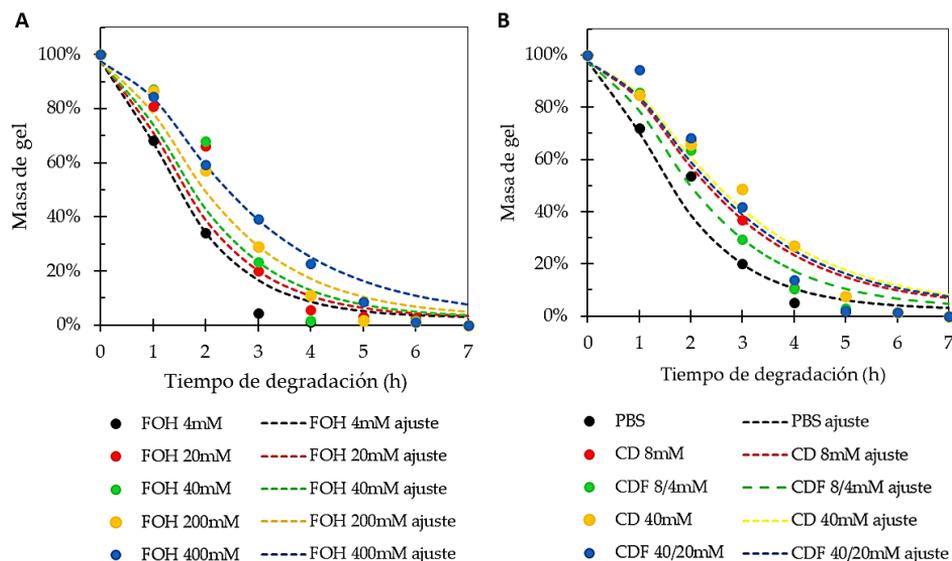


Figura 5.28. Ajuste tras la estimación de parámetros de la degradación de los hidrogeles de PF-127 al 20 % con GG al 0.5 % que contienen (A) FOH libre en diferentes concentraciones o (B) PBS como control y CD o CDF en diferentes concentraciones

En las gráficas de la Figura 5.28 indican que la adición de FOH en forma libre o complejada con CD modificó la degradación de la formulación cuando se agregaron al gel 20 % de PF-127 y 0.50 % de GG. Específicamente, la primera gráfica muestra cómo la adición de FOH libre al hidrogel modificó el perfil de degradación, donde la velocidad más lenta se logró con la mayor cantidad de FOH en la muestra. Una posible explicación a este fenómeno es que la hidrofobicidad del FOH, al formar una emulsión, modifica el proceso de relajación entre las cadenas dentro del gel, por lo que se necesita más tiempo para obtener el mismo grado de degradación.

Finalmente, la gráfica de la Figura 5.28 B muestra cómo la adición de CD, tanto libre como en forma de complejo con FOH, modificó la velocidad de degradación. Cuanto mayor sea la concentración de CD en la muestra, más lenta será la degradación. Este fenómeno podría explicarse por el hecho de que algunas cadenas poliméricas pueden formar complejos con las CD dentro del gel, lo que dificulta su disponibilidad para la degradación. En el pasado, la CD ha

demostrado ser eficaz para albergar cadenas de micelas poliméricas [243]. Se puede considerar el mismo fenómeno cuando el complejo de inclusión queda atrapado dentro del gel PF-127.

Todos los resultados de la modelización pueden corroborarse analizando los valores de K' estimados por Excel Solver. Se resumen en la Tabla 5.6 así como los errores calculados para cada ajuste.

Tabla 5.6 Valores de estimación por Excel Solver

Muestra	K'	AAD	Muestra	K'	AAD	Muestra	K'	AAD
20% PF + 0 % GG	0.940	3 %	FOH 4 mM	0.524	4 %	PBS	0.787	4 %
20% PF + 0.125% GG	0.422	4 %	FOH 20 mM	0.639	6 %	CD 8 mM	0.544	7 %
20% PF + 0.25% GG	0.343	6 %	FOH 40 mM	0.725	8 %	CDF 8 mM / 4 mM	0.633	9 %
20% PF + 0.50% GG	0.314	6 %	FOH 200 mM	0.787	7 %	CD 40 mM	0.502	6 %
20% PF + 1 % GG	0.270	6 %	FOH 400 mM	0.864	4 %	CDF 40 mM / 20 mM	0.524	9 %

Los resultados de la Tabla 5.6 muestran que el proceso de ajuste se ha realizado correctamente, ya que los DAA son inferiores al 10% en todos los casos y, por tanto, existe significancia estadística en el ajuste propuesto. El comportamiento observado las gráficas previas fue corroborado al analizar los valores de K' . Hubo una disminución significativa en el valor de K' a medida que aumentó la concentración de FOH. Se observó un efecto similar cuando se consideró la proporción de GG en la composición del hidrogel. Con base en estos datos, podría ser posible controlar el perfil de degradación de los hidrogeles modificando su composición según la aplicación prevista.

Aunque el tiempo de degradación (menos del 5 % de la masa inicial) para cada gel fue de alrededor de 7 horas, es posible observar diferentes perfiles de degradación. Este fenómeno se confirma por las diferencias en el valor del

parámetro de degradación K' . Por ejemplo, este parámetro cambia en el complejo CDF aumentando de 0.633 al tener una concentración de 8/4 Mm, hasta 0.524 en la concentración de 40/20 mM, es decir, alrededor de un 15 %. Además, alrededor del 55 % del gel se degradó en 3 horas para CDF 40/20 mM, mientras que solo se encontró el 30 % de la masa del gel para la formulación CDF 8/4 mM en el mismo tiempo.

Estos resultados del modelado también pueden explicarse por los resultados reológicos oscilatorios y de estado estacionario. Para comprender mejor esta conclusión se elaboró la Figura 5.29.

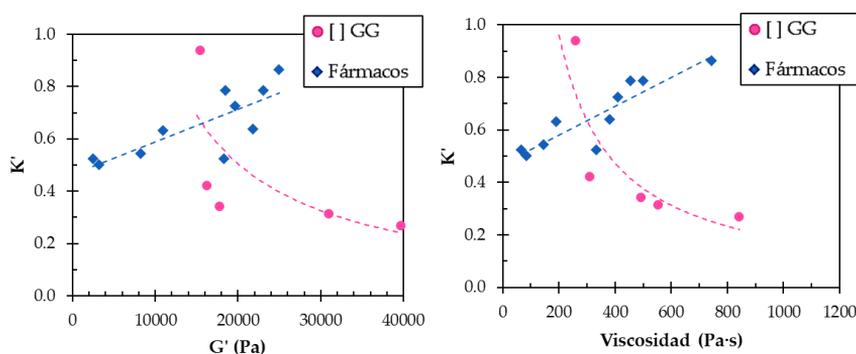


Figura 5.29. Variación de K' en función de G' o de la viscosidad.

Como se observa en la Figura 5.29 a medida que aumenta el módulo de almacenamiento o la viscosidad, lo cual ocurría al aumentar la concentración de GG, la degradación es más lenta, por eso K' desciende de 0.940 a 0.270, reduciéndose a 1/3. El aumento del módulo de almacenamiento favoreció la formación de un gel más fuerte, dificultando la liberación de las cadenas poliméricas debido a las interacciones facilitadas. Sin embargo, este fenómeno no se observó en los geles con los fármacos. La adición de FOH a bajas concentraciones no modificó el módulo de almacenamiento. Sin embargo, el atrapamiento las cadenas de PF-127 en CD disminuyó la tasa de degradación debido a la formación de complejos de inclusión, como se mencionó anteriormente, pero también reduce el módulo de almacenamiento de las

soluciones porque las cadenas poliméricas estaban alojadas en la cavidad, impidiendo la posibilidad de contribuir a la solidez del sistema.

3.2. Metodología de la liberación *in vitro* de FOH

Después del estudio de degradación, se realizó el ensayo de liberación para simular de manera más realista el proceso de administración de fármacos en el microambiente del tumor, se diseñó e imprimió una estructura 3D para simular la geometría y las condiciones hidrodinámicas. En esta sección se describirán los detalles del modelado e impresión del dispositivo utilizado en los procesos de prueba y validación del medicamento creado/usado.

El principal objetivo en el diseño del dispositivo es maximizar la superficie de contacto del canal de fluido con el gel, evitando desbordamientos en los canales, puesto que entonces se desconocería la superficie de contacto. El dispositivo cilíndrico (Figura 5.30) creado tiene una base cuadrada con un lado de 50 mm y una altura de 13 mm. El cuerpo (cilindro central) en el que se deposita el gel tiene un diámetro interno de 35 mm y una altura de 8 mm. Respecto a la alimentación, hay un tubo de entrada de 4 mm de diámetro interior con un espesor de pared de 1 mm y una longitud de 20 mm. El canal de salida se creó en forma semicircular abierta porque en esa zona (efluente) había problemas de desbordes superficiales por tensión superficial. El canal de contacto tiene una superficie lateral de 443.75 mm^2 , una superficie total de 703.46 mm^2 y un volumen de 692.86 mm^3 .

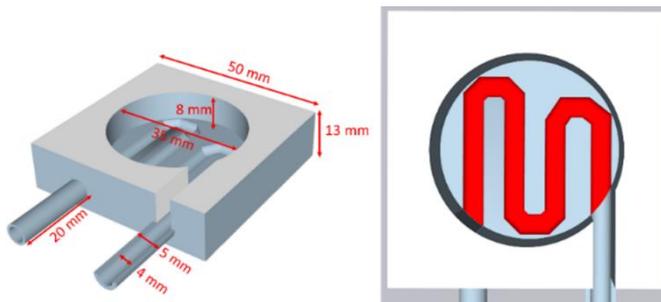


Figura 5.30 Modelo 3D del dispositivo: (a) vista isométrica; (b) vista superior. Fuente: elaboración propia.

El dispositivo ha sido diseñado y modelado con Sketchup, un software de diseño asistido por ordenador (CAD) de la empresa Trimble, muy utilizado por sus numerosas utilidades para modelar y diseñar objetos 3D y funcionalidades para exportar a diversos formatos de archivos, como STL.

Utilizando el modelo CAD 3D, el dispositivo ha sido construido mediante fabricación aditiva con un material de ácido poliláctico, resistente a posibles alteraciones químicas, con una impresora 3D Witbox-1 de la empresa BQ. Como aplicación de corte de impresión 3D, se ha utilizado Ultimaker Cura versión 4.12.1 para generar el archivo de código G para controlar la impresora 3D. Respecto a los parámetros de impresión que se han definido, el dispositivo se ha construido a una temperatura de impresión de 220 °C y una velocidad de 60 mm/s. Finalmente, para obtener una buena calidad de impresión se ha utilizado una capa de 0.1 mm de alto, paredes de 1 mm de espesor y un relleno con una densidad del 30 % para asegurar la robustez del diseño.

Para llevar a cabo los ensayos de liberación, el dispositivo se colocó en una incubadora a 37 °C y se conectó a 2 matraces mediante tubos. Dichos tubos pasaban a través de una bomba peristáltica (Heidolph Pumdrive PD 5201, con cabezal Mehrkanal Pumpenkopf C4 524-80420-00 y casete pequeño 524-90022-00). De tal forma que había un matraz con PBS y el otro vacío, de tal forma que el PBS era absorbido, fluía a través del dispositivo y desembocaba en el matraz vacío, como se muestra en la Figura 5.31.

Los geles preparados en las placas de 35 mm contenían un doble fondo para facilitar su extracción. Una vez formado el gel, se retiró de la placa y se insertó en el dispositivo. Para evitar que los espacios se obstruyan con el gel, se colocó previamente en el dispositivo un filtro de nailon de 35 mm (tamaño de poro de 11 μM). La bomba se activó a un caudal de 2 ml/min y se recogieron muestras cada hora hasta la completa degradación del gel.

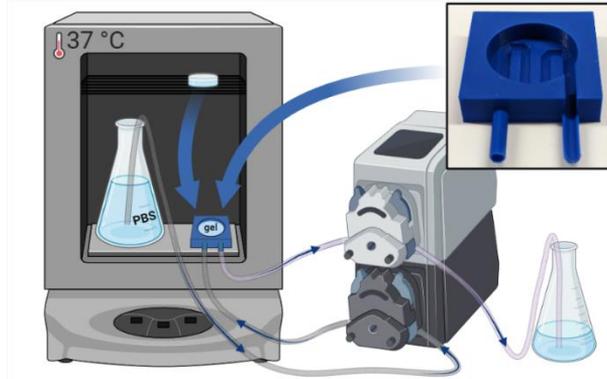


Figura 5.31 Sistema de liberación. Fuente: elaboración propia.

3.2.1. Cuantificación de fármacos

La concentración de fármaco que se liberó en el experimento descrito en la sección anterior fue corroborada mediante cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas en tándem (HPLC MS/MS).

Para determinar la concentración de FOH, se analizaron las muestras y se calibraron los espectros correspondientes mediante un espectrómetro de masas de trampa iónica (TRAP-MS) de 220 iones, el cual estaba acoplado a un cromatógrafo Agilent 7890 GC. Se utilizó una columna VF-5ms con dimensiones de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor de fase estacionaria. El programa de temperatura aplicado inició a 50 $^{\circ}\text{C}$ y se incrementó a una tasa de 10 $^{\circ}\text{C}$ por minuto hasta alcanzar 270 $^{\circ}\text{C}$. El tiempo de retención fue de 5 minutos y el tiempo de ejecución de 32 minutos por muestra. Y para determinar la cantidad de ciclodextrina, las muestras y la calibración correspondiente se analizaron en un equipo Thermo Q-Exactive Focus Orbitrap utilizando una columna Poroshell 120 EC-C18. El líquido utilizado en el proceso de elución era una mezcla de 58% de un eluyente A (agua con un 0.1% de ácido fórmico) y un 42% de un eluyente B (acetonitrilo), el cual fluye a través de la columna cromatográfica con un caudal de 0.2 ml/min.

3.2.2. Resultados de la liberación de fármacos

Después del estudio de degradación, se realizó el ensayo de liberación con las muestras que contenían las mayores concentraciones de FOH libre (400 mM) y en forma de complejo 40/20 mM de CDF, además para poder comparar los resultados, se analizó la muestra de FOH libre de concentración 20 mM. Los resultados de la liberación de FOH cada hora se muestran en la Figura 5.32.

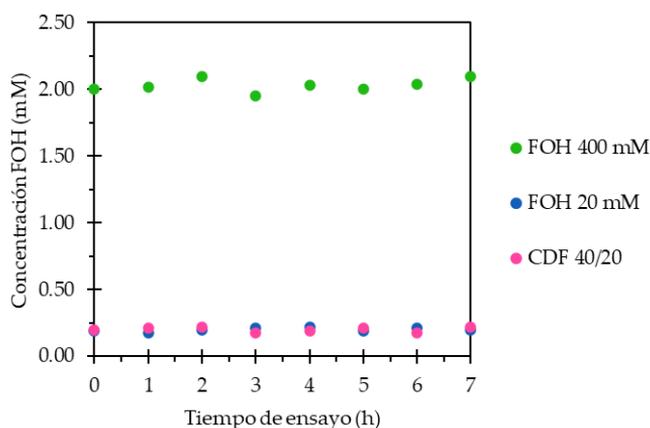


Figura 5.32 Concentración de FOH durante el ensayo de liberación.

Como se muestra en la Figura 5.32, se liberó continuamente una cantidad constante de farnesol, en la muestra de mayor concentración se liberó 2 mM de FOH cada hora. Se encontraron resultados similares cuando se determinó la liberación de FOH para el complejo CDF 40/20 mM y FOH 20 mM, farnesol se liberó sostenidamente. Todo esto hace suponer que debido a la baja solubilidad del farnesol, FOH permanece preferentemente en el gel y se libera sólo por degradación del gel.

Por tanto, aunque el FOH podría administrarse en cualquier forma, se propone utilizar como complejo con ciclodextrina, con el fin de asegurar la solubilidad del FOH en la sangre, así como su permeabilización en las células.

4. Conclusiones

Se desarrollaron geles termosensibles con el propósito de explorar una terapia local potencial contra el cáncer. Debido a las características reológicas de las soluciones de PF-127, se concluyó que la concentración óptima era un 20%. Ya que de esta forma se puede trabajar con una solución líquida a temperaturas inferiores a la ambiente y se obtienen geles estables.

La inclusión de GG promovió la formación de interacciones poliméricas, incrementando tanto el módulo de almacenamiento como la viscosidad, así como la velocidad de degradación. Específicamente, una concentración del 0.50 % de GG duplicó la velocidad de degradación de un gel base, con PF-127 al 20 %, de 3 a 6 horas, sin afectar significativamente la temperatura de gelificación (que comenzó a los 20 °C aproximadamente).

A continuación, se introdujo FOH en el gel, tanto en forma de fármaco libre como de complejo de inclusión (CDF). Estas adiciones alteraron la reología y la red polimérica. En primer lugar, la inclusión de CD (libre o en forma de CDF) facilitó la formación de complejos polímero-CD, disminuyendo el módulo de almacenamiento y la viscosidad de los geles, pero prolongando el tiempo de degradación. En segundo lugar, el FOH libre por encima de una concentración de 40 mM aumentó la naturaleza sólida de la formulación y aceleró la velocidad de degradación debido a la presencia de una emulsión. Mientras que bajas concentraciones de FOH no afectaban a la reología del gel.

La modelización de los resultados de degradación explicó estos hallazgos en función de las cadenas de liberación del sistema polimérico. Las cadenas de liberación coincidieron con los resultados reológicos de las estructuras de los geles de PF-127 – GG, ya que las interacciones incrementaron la tasa de degradación y el módulo de almacenamiento.

En lo que respecta al efecto en la degradación de CD y CDF, la adición de la ciclodextrina aumentó la tasa de degradación, pero disminuyó el módulo de almacenamiento, atribuible a la dificultad del sistema para liberar las cadenas cuando están alojadas en el CD y al aumento resultante de la tasa de degradación.

Finalmente, los estudios de administración del fármaco indicaron que se logró una liberación sostenida y proporcional a la degradación del gel. La liberación fue de 2 mM por hora cuando se cargaron 400 mM de FOH libre en el gel y 0.2 mM por hora cuando los geles se cargaron con el 20 mM de FOH o con el complejo de inclusión (CD 40 mM y FOH 20 mM). Sin embargo, el problema del FOH libre radica en que, al liberarse, alcanza una concentración superior a su solubilidad en solventes acuosos ($8 \cdot 10^{-3}$ mM), por lo que se recomienda el uso del complejo CDF, que permite la solubilidad total del fármaco liberado.

Los hidrogeles diseñados para la liberación de fármacos son una herramienta prometedora en el tratamiento localizado del cáncer. Además, podrían emplearse de forma simultánea en la regeneración de tejidos, o para simular tumores *in vitro*, tal como se describe de forma detallada en el Anexo I.

5. Artículos publicados relacionados con este capítulo

✦ de Dios-Pérez, I., González-Garcinuño, Á., Tabernero, A., Blanco-López, M., García-Esteban, J. A., Moreno-Rodilla, V., Curto, B., Pérez-Esteban, P., & Martín Del Valle, E. M. (2023).

Development of a thermosensitive hydrogel based on Polaxamer 407 and gellan gum with inclusion complexes (Sulfobutylated- β -cyclodextrin-Farnesol) as a local drug delivery system.

European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences, 191, 106618.

<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2023.106618>



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutical Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejps

Development of a thermosensitive hydrogel based on Polaxamer 407 and gellan gum with inclusion complexes (Sulfobutylated- β -cyclodextrin–Farnesol) as a local drug delivery system

Inmaculada de Dios-Pérez^a, Álvaro González-Garcinuño^{a,b}, Antonio Taberero^{a,b}, Marcos Blanco-López^a, Juan A. García-Esteban^c, Vidal Moreno-Rodilla^c, Belén Curto^c, Patricia Pérez-Esteban^d, Eva M. Martín del Valle^{a,b,*}

^a Department of Chemical Engineering, University of Salamanca, Spain

^b Institute for Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), Spain

^c Department of Computer Science and Automation, University of Salamanca, Spain

^d Institute of Translational Medicine, Heritage Building, Mundeleson Way, Birmingham, B15 2TH, England

ARTICLE INFO

Keywords:
Drug delivery
Thermosensitive gels
Pluronic F-127
Gellan gum

ABSTRACT

This work proposes the development of a thermosensitive local drug release system based on Polaxamer 407, also known as Pluronic® F-127 (PF-127), Gellan Gum (GG) and the inclusion complex Sulfobutylated- β -cyclodextrin (CD) with Farnesol (FOH). Rheological properties of the hydrogels and their degradation were studied. According to the rheological results, a solution of 20% w/v of PF-127 forms a strong gel with a gelling temperature of about 25 °C (storage modulus of 15,000 Pa). The addition of the GG increased the storage modulus (optimal concentration of 0.5 % w/v) twofold without modifying the gelling temperature. Moreover, including 0.5% w/v of GG also increased 6 times the degradation time of the hydrogel. Regarding the inclusion complex, the addition of free CD decreased the viscosity and the gel strength since polymer chains were included in CD cavity without affecting the gelling temperature. Contrarily, the inclusion complex CD-FOH did not significantly modify any property of the formulation because the FOH was hosted in the CD. Furthermore, a mathematical model was developed to adjust the degradation time. This model highlights that the addition of the GG decreases the number of released chains from the polymeric network (which coincides with an increase in the storage modulus) and that the free CD reduces the degradation rate, protecting the polymeric chains. Finally, FOH release was quantified with a specific device, that was designed and printed for this type of system, observing a sustainable drug release (similar to FOH aqueous solubility, 8 μ M) dependent on polymer degradation.

1. Introduction

Cancer has become the main cause of death worldwide, with a five-year net survival rate depending on the type and stage of cancer. Based on these factors, the appropriate treatment is decided, with surgery being the main strategy for localised tumours. The disadvantages of surgery are that it involves many possible complications, and the conventional complementary treatments (radiotherapy and chemotherapy) are very aggressive, with high toxicity, low efficacy, and numerous side effects. Furthermore, some tumours are unresectable or require adjuvant therapy before or after surgical removal (to reduce tumour size or remove cell debris in order to prevent tumour regeneration) (Rafael

et al., 2021). To minimise these problems, new approaches have focused on the use of local drug delivery systems. These systems are available in different physical forms (wafers, gels, foams, enemas, fibres, or micro-particles) (Rafael et al., 2021; Mohammadi et al., 2022; Chen et al., 2021), but from a physicochemical point of view, hydrogels might be the most interesting because they are similar to tissue and extracellular matrices (Mohammadi et al., 2022). There are currently examples of these systems in anticancer treatments with good results in clinical trials, but most of them are not completely biodegradable, requiring surgery to remove them after treatment (Rafael et al., 2021; Mohammadi et al., 2022).

Specifically, hydrogels are 3D network structures formed by

* Corresponding author.

E-mail address: emvalle@usal.es (E.M. Martín del Valle).

<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2023.106618>

Received 12 July 2023; Received in revised form 12 September 2023; Accepted 17 October 2023

Available online 20 October 2023

0928-0987/© 2023 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

hydrophilic polymers capable of retaining a high amount of water (Rafael et al., 2021; Kesharwani et al., 2021; Xiao et al., 2021). Depending on the type of crosslinking, they are classified as chemical or physical crosslinking, the second method being more biocompatible, as the chemical process leaves residues that generate compatibility problems (Rafael et al., 2021; Mohammadi et al., 2022). Moreover, based on their physical properties they can be conventional gels, preformed gels, or smart gels, which respond to external triggers changing their structure from solution to gel under physiological conditions; this feature allows the therapeutic compound to be added to a liquid hydrogel, which will be injected and then solidify at the application site and release the drug over time (Mohammadi et al., 2022; Chen et al., 2021; Nieto et al., 2022; Mohanty et al., 2018).

Smart hydrogels are a great option for use as local delivery systems after tumour resection, as they allow a uniform application that conforms to the irregular shape of the post-surgical cavity, with minimal invasiveness and a mild gelation process, allowing for prolonged release and degradation over time (Mohammadi et al., 2022; Xiao et al., 2021; Marabelle et al., 2018). They have numerous advantages for use as controlled release systems to prevent tumour regeneration: (i) easy and minimally invasive application (Mohammadi et al., 2022; Xiao et al., 2021; Mohanty et al., 2018), (ii) good adaptability to irregular surfaces (Mohammadi et al., 2022), (iii) easy incorporation of the drug into the system (Kesharwani et al., 2021; Mohanty et al., 2018), (iv) controlled and sustained drug release in the target tissue (Xiao et al., 2021; Mohanty et al., 2018), (v) greater efficacy of the drug (Mohanty et al., 2018), (vi) reduction in dosing frequency and drug toxicity (Mohanty et al., 2018), (vii) protection of the drug against changes in environmental conditions (Kesharwani et al., 2021; Mohanty et al., 2018), (viii) greater bioavailability and residence time of the drug (Mohammadi et al., 2022), and (ix) do not induce immune response (Mohanty et al., 2018).

Smart hydrogels that respond to temperature are called thermosensitive, and their study is interesting because their gelling process can be performed at conditions homogeneous to those of the human body (Rafael et al., 2021; Mohammadi et al., 2022). There are numerous studies of thermosensitive gels for anticancer treatments: Li et al. and Liu et al. prepared a hydrogel based on Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) and another polysaccharide by loading them with 5-fluorouracil (Li et al., 2018) or doxorubicin (Liu et al., 2017); Soo Gil et al. loaded poly(ethylene glycol)-poly(β -aminoester urethane) (PEG-PAEU) nanogels with cisplatin for release (Gil et al., 2017); Hang et al. developed an antitumour therapy based on an intratumoral injection using hydrogels made of dialdehyde-functionalized polyethylene glycol (DF-PEG) and chitosan cross-linked with β -glycerophosphate that release doxorubicin (Wu et al., 2014); and Wu et al. prepared polymeric micelles with cisplatin and which were loaded with paclitaxel (Xiao et al., 2021; Yu et al., 2021). In all these studies interesting results regarding release and gelation temperature were obtained, however, all of them have the same drawbacks in common: firstly, the gel preparation processes were long; secondly, many organic compounds (such as 2-propanol) had to be used; and, finally, it is necessary carrying out purification processes.

Most of the polymers for the preparation of thermosensitive hydrogels are poloxamers, which are amphiphilic triblock copolymers, having a hydrophobic polypropylene oxide (PPO) central block and two hydrophilic polyethylene oxide (PEO) ends. PEO groups provide biocompatibility and water solubility, while PPO groups confer hydrophobic drug loading capacity. The solutions of these polymers gel with increasing temperature, due to the dehydration of the PPO and the production of hydrophobic interactions, forming micelles that eventually aggregate. The higher the polymer concentration, the lower the required temperature (Rafael et al., 2021; Mohammadi et al., 2022).

One of the most common polymers is Poloxamer 407, also called Pluronic® F-127 (PF-127), which has a hydrophilic-lipophilic balance of 20–29 and a PPO chain of 62 units (Diniz et al., 2015). Besides forming

thermosensitive solutions, PF-127 helps improve cell union and collagen formation, which facilitates the formation of blood vessels, contributing to post-surgical healing. In addition, PF-127 is approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) for use in humans, since it is non-toxic, biocompatible, and biodegradable (Turabee et al., 2019). Therefore, PF-127 can be used for the formation of biocompatible and biodegradable thermosensitive hydrogels for localised therapy to develop potential systems for cancer treatment, taking advantage of the benefits of traditional depot systems while avoiding systemic drug exposure (Rafael et al., 2021). In this context, PF-127 has been studied for the formation of hydrogels, however, these gels have inadequate mechanical strength and stability, causing rapid degradation of the gels, and therefore cannot be used in certain biomedical applications. Consequently, some modifications are needed to increase the degradation time. One possibility is to add other polymers to the solution, developing copolymeric gels, instead of homopolymer gels (Mohammadi et al., 2022; Chen et al., 2013). With this purpose, some authors added N,N,N-trimethyl chitosan or hexamethylene diisocyanate to solutions of PF-127, forming gels that would be used to release docetaxel (Turabee et al., 2019; Chen et al., 2013). Specifically, Turabee et al. added N,N,N-trimethyl chitosan, but it had no effect on the degradation time of the gels. On the other hand, Chen et al. were able to increase the degradation time by synthesizing a copolymer of PF-127 with hexamethylene diisocyanate. However, they used petroleum ether as a solvent, that might be a problem for a future application in biomedicine due to its toxicity (Turabee et al., 2019; Chen et al., 2013).

In this sense, our hypothesis is that the degradation time of the gel can be modified by adding a polysaccharide, forming a polymeric network. Both strategies aim to achieve a controlled and extended drug release over time. For this reason, a thermosensitive gel using PF-127 combined with gellan gum (GG) is proposed for anticancer therapy. GG is a natural polysaccharide that presents characteristics necessary to hydrogels (biocompatibility, biodegradability, stability, and ionotropic sensitivity). GG is a water-soluble anionic linear tetrasaccharide with a high molecular weight. Its solutions undergo thermally reversible gelation, its spiral structure becomes random at temperatures above 80 °C and changes to double helical when cooled. This process is ionotropic, that is, the presence of cations promotes the aggregation site by binding between pairs of carboxylate groups in neighbouring helices. In addition, the viscoelastic properties of GG facilitate its easy administration by injection, gelling into a fluid gel once the application is complete (Nieto et al., 2022; Sweetly et al., 2022).

In order to prevent the proliferation of cancer cells remains, the thermosensitive hydrogel was loaded with a cytostatic agent. Farnesol (FOH) is a natural isoprenoid that can arrest the cell cycle at the G0/G1 phase in various types of carcinoma cells. FOH controls the localisation and activity of phosphocholine cytidyltransferase (CTP), an enzyme involved in the biosynthesis of phosphatidylcholine (PC). In this way, FOH inhibits the action of CTP disrupting PC synthesis and, as a result, mammalian cells cannot produce their membrane and proliferate (de Dios-Pérez et al., 2022). However, due to its low solubility in aqueous media (approximately $8 \cdot 10^{-6}$ M), the possibility of forming an inclusion complex with cyclodextrins to improve FOH solubility was studied in our previous work. In that work, authors worked with Sulfobutylated- β -cyclodextrin Sodium Salt (CD), due to its high aqueous solubility and because it is a FDA approved compound. Our previous results showed that the solubility of FOH was improved since a concentration of 100 mM of SBE- β -CD allows a solubilization of 50 mM of FOH. Another relevant result of that study was that the half maximal inhibitory concentration (IC50) of cyclodextrin in healthy and cancer cells is higher than 1 mM; while free and complexed FOH is 71 μ M and 127 μ M, respectively, in the HCT-116 colon cancer line and 113 μ M and 204 μ M, respectively, in the HS-5 normal cell line (de Dios-Pérez et al., 2022).

Summarising, taking into account the selective action of FOH, the main objective of this work was the preparation of a thermosensitive hydrogel that incorporates a complex CD with a highly hydrophobic

drug (FOH in this case) and GG, studying how the addition of the different compounds can modify the formulation properties.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Pluronic® F-127 (PF-127, #2443), Gelzan™ CM, Gelrite® (GG, #G1910, low acyl, molecular weight 1000 kg/mol), Phosphate Buffer Saline (PBS, pH 7.4) and FOH 95 %, were purchased from Sigma-Aldrich whereas Sulfobutylated-cyclodextrin Sodium Salt (SBE-β-CD) was purchased on Cyclolab (CY-2041.2).

2.2. Formation of gels

To develop formulations, it is necessary to determine the optimal percentage of different polymers and drug concentrations.

2.2.1. PF-127 gel formation

Due to the thermosensitive nature of PF-127, it dissolves better in solutions at low temperatures. Consequently, solutions were prepared in PBS at 4 °C and 15 %, 20 %, 25 %, and 30% w/v PF-127. After stirring overnight, at least 12 h, the homogeneous solutions were stored in tubes at 4 °C until use.

2.2.2. GG gel formation

The optimal GG concentration was studied in the presence and absence of PF-127. The solutions were prepared by adding 0.125 %, 0.25 %, 0.50 %, and 1.00% w/v GG to PBS at 80 °C with stirring for 1 h, after which they were cooled at room temperature for a further 1 h, shifted to 4 °C, and PF-127 was added with stirring overnight, at least 12 h. The homogeneous solutions were stored in tubes at 4 °C until use.

2.2.3. PF-127-GG-CD-FOH gel formation

Finally, after determining the optimal concentrations of PF-127 and GG, the influence of drug addition was studied. A solution was prepared by adding GG to PBS at 80 °C and stirring for 1 h, after which it was cooled at room temperature for a further 1 h, then shifted to 4 °C and PF-127 was added with stirring overnight at least 12 h. Once homogeneous solutions were obtained, the solution was separated into other bottles where the corresponding drug was incorporated in each case. Solutions were stirred overnight (at least 12 h) again and, the next day, stored in tubes at 4 °C until use.

However, since FOH has poor solubility in aqueous solvents, the CD-FOH complex was studied using the same molar concentration as free FOH. A stock solution of CD-FOH was prepared, 200 mM FOH was added at a solution of 400 mM CD on PBS, mix and filter to remove free FOH. Free CD was also studied to verify that it did not interfere with rheology.

The drugs studied were free FOH at a final concentration of 400, 200, 40, 20, and 4 mM; CD-FOH at a concentration of 40–20 and 8–4 mM; and, CD at a concentration of 40 and 8 mM. It was considered that the rheology could change when preparing the solutions with the different drug concentrations, due to the addition of different volumes of the stock solution. To avoid this problem, it was decided to work with a final volume of 10 % v/v, supplementing with PBS if necessary.

2.3. Rheology

Rheological measurements were performed using an AR 1500 Rheometer (TA instrument, Newark, DE), equipped with an acrylic plate geometry (with a diameter of 40 mm and a gap distance of 1 mm).

The lower critical solution temperature (LCST) is the value at which the solution changes from a liquid to a gel by heating. Therefore, for injectable hydrogels, the ideal condition is to use a thermosensitive gel that changes by heating, being the LCST higher than 25 °C and lower than 37 °C.

Briefly, the solution was pipetted into the diameter plate and 3 types of tests were determined: (i) Temperature sweep from 10 °C to 45 °C with an increase of 1 °C/min to determine the LCST, at a constant frequency (1 Hz) with a controlled strain percentage (0.2 %). (ii) Frequency sweep by varying the angular frequency from 0.5 to 500 rad/s and applying a constant strain (0.2 %), to evaluate its storage modulus G' and viscous modulus G'' as a function of the angular frequency $[\omega]$ at body temperature (37 °C). (iii) Steady-state flow test by varying the shear rate from 0.1 to 200 s^{-1} at 10 °C and 37 °C to determine the deviations from ideal Newtonian behaviour at different temperatures.

2.4. Gel degradation testing and modelling

2.4.1. Gel swelling and degradation experiments

The swelling and degradation time of hydrogels was investigated in vitro. 5 mL of the solutions were plated in

35 mm diameter Petri dishes and incubated at 37 °C overnight, at least 12 h. After that, the Petri dishes were placed in beakers containing 70 mL of PBS (pH 7.4) at physiological temperature and subjected to magnetic stirring. The gels were weighed every hour to determine the swelling and degradation time.

2.4.2. Modelling, parameter estimation, and statistical analysis

Degradation results were used to build a model to explain the contribution of both polymers (GG and PF-127) to the stability of the gels as well as the release of the compounds inside them (FOH in this case). According to previous publications [1; 2], the percentage of mass loss can be calculated according to the Eq. (1), as a function of the relative mass of both polymers involved (W) and the fraction of chains released from the internal structure of the hydrogel (F):

$$\% \text{ Mass loss} = W_{plur} \cdot F_{plur} + W_{GG} \cdot F_{GG} \quad (1)$$

In order to estimate the F value for each polymer, it is necessary to define another parameter (P), which is a variable function of time according to Eq. (2), and that depends on the degradation parameter k' .

$$P = 1 - \exp(-k' \cdot t) \quad (2)$$

From this parameter, it is possible to define the fraction of chains released for PF-127 (Eq. (3)) and for GG (Eq. (4)).

$$F_{GG} = (1 - (1 - P)^N) \quad (3)$$

$$F_{plur} = P^2 + P(1 - P) \cdot F_{GG} \quad (4)$$

Therefore, two parameters have to be estimated (k' and N) from the experimental data. Initially, preliminary estimation is carried out in order to analyse if both parameters are lineally independent and the range of values. After this preliminary estimation, it can be observed that the N value has similar results for all simulations (value around 10). Therefore, it can be considered as a fixed value for the following simulations, with more accuracy ($N = 10$).

For the estimation of k' (degradation rate parameter), the Solver add-in Excel has been used to minimise the error value between the predicted (theoretical) value and the experimental value. This average absolute deviation (AAD) is calculated as the summation of the absolute value of the difference between the experimental and theoretical values for each time, according to Eq. (5).

$$AAD (\%) = \frac{\sum_i |T_{vi} - E_{vi}|}{n} \cdot 100 \quad (5)$$

Where T_{vi} is the theoretical value for each time, E_{vi} is the experimental value for each time and n is the number of experimental points.

2.5. In vitro FOH release from hydrogels

In order to simulate more realistically the drug delivery process in

drug (FOH in this case) and GG, studying how the addition of the different compounds can modify the formulation properties.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Pluronic® F-127 (PF-127, #2443), Gelzan™ CM, Gelrite® (GG, #G1910, low acyl, molecular weight 1000 kg/mol), Phosphate Buffer Saline (PBS, pH 7.4) and FOH 95 %, were purchased from Sigma-Aldrich whereas Sulfobutylated-cyclodextrin Sodium Salt (SBE-β-CD) was purchased on Cyclolab (CY-2041.2).

2.2. Formation of gels

To develop formulations, it is necessary to determine the optimal percentage of different polymers and drug concentrations.

2.2.1. PF-127 gel formation

Due to the thermosensitive nature of PF-127, it dissolves better in solutions at low temperatures. Consequently, solutions were prepared in PBS at 4 °C and 15 %, 20 %, 25 %, and 30% w/v PF-127. After stirring overnight, at least 12 h, the homogeneous solutions were stored in tubes at 4 °C until use.

2.2.2. GG gel formation

The optimal GG concentration was studied in the presence and absence of PF-127. The solutions were prepared by adding 0.125 %, 0.25 %, 0.50 %, and 1.00% w/v GG to PBS at 80 °C with stirring for 1 h, after which they were cooled at room temperature for a further 1 h, shifted to 4 °C, and PF-127 was added with stirring overnight, at least 12 h. The homogeneous solutions were stored in tubes at 4 °C until use.

2.2.3. PF-127-GG-CD-FOH gel formation

Finally, after determining the optimal concentrations of PF-127 and GG, the influence of drug addition was studied. A solution was prepared by adding GG to PBS at 80 °C and stirring for 1 h, after which it was cooled at room temperature for a further 1 h, then shifted to 4 °C and PF-127 was added with stirring overnight at least 12 h. Once homogeneous solutions were obtained, the solution was separated into other bottles where the corresponding drug was incorporated in each case. Solutions were stirred overnight (at least 12 h) again and, the next day, stored in tubes at 4 °C until use.

However, since FOH has poor solubility in aqueous solvents, the CD-FOH complex was studied using the same molar concentration as free FOH. A stock solution of CD-FOH was prepared, 200 mM FOH was added at a solution of 400 mM CD on PBS, mix and filter to remove free FOH. Free CD was also studied to verify that it did not interfere with rheology.

The drugs studied were free FOH at a final concentration of 400, 200, 40, 20, and 4 mM; CD-FOH at a concentration of 40–20 and 8–4 mM; and, CD at a concentration of 40 and 8 mM. It was considered that the rheology could change when preparing the solutions with the different drug concentrations, due to the addition of different volumes of the stock solution. To avoid this problem, it was decided to work with a final volume of 10 % v/v, supplementing with PBS if necessary.

2.3. Rheology

Rheological measurements were performed using an AR 1500 Rheometer (TA instrument, Newark, DE), equipped with an acrylic plate geometry (with a diameter of 40 mm and a gap distance of 1 mm).

The lower critical solution temperature (LCST) is the value at which the solution changes from a liquid to a gel by heating. Therefore, for injectable hydrogels, the ideal condition is to use a thermosensitive gel that changes by heating, being the LCST higher than 25 °C and lower than 37 °C.

Briefly, the solution was pipetted into the diameter plate and 3 types of tests were determined: (i) Temperature sweep from 10 °C to 45 °C with an increase of 1 °C/min to determine the LCST, at a constant frequency (1 Hz) with a controlled strain percentage (0.2 %). (ii) Frequency sweep by varying the angular frequency from 0.5 to 500 rad/s and applying a constant strain (0.2 %), to evaluate its storage modulus G' and viscous modulus G'' as a function of the angular frequency $[\omega]$ at body temperature (37 °C). (iii) Steady-state flow test by varying the shear rate from 0.1 to 200 s^{-1} at 10 °C and 37 °C to determine the deviations from ideal Newtonian behaviour at different temperatures.

2.4. Gel degradation testing and modelling

2.4.1. Gel swelling and degradation experiments

The swelling and degradation time of hydrogels was investigated in vitro. 5 mL of the solutions were plated in

35 mm diameter Petri dishes and incubated at 37 °C overnight, at least 12 h. After that, the Petri dishes were placed in beakers containing 70 mL of PBS (pH 7.4) at physiological temperature and subjected to magnetic stirring. The gels were weighed every hour to determine the swelling and degradation time.

2.4.2. Modelling, parameter estimation, and statistical analysis

Degradation results were used to build a model to explain the contribution of both polymers (GG and PF-127) to the stability of the gels as well as the release of the compounds inside them (FOH in this case). According to previous publications [1; 2], the percentage of mass loss can be calculated according to the Eq. (1), as a function of the relative mass of both polymers involved (W) and the fraction of chains released from the internal structure of the hydrogel (F):

$$\% \text{ Mass loss} = W_{plur} \cdot F_{plur} + W_{GG} \cdot F_{GG} \quad (1)$$

In order to estimate the F value for each polymer, it is necessary to define another parameter (P), which is a variable function of time according to Eq. (2), and that depends on the degradation parameter k' .

$$P = 1 - \exp(-k' \cdot t) \quad (2)$$

From this parameter, it is possible to define the fraction of chains released for PF-127 (Eq. (3)) and for GG (Eq. (4)).

$$F_{GG} = (1 - (1 - P)^2)^N \quad (3)$$

$$F_{plur} = P^2 + P(1 - P) \cdot F_{GG} \quad (4)$$

Therefore, two parameters have to be estimated (k' and N) from the experimental data. Initially, preliminary estimation is carried out in order to analyse if both parameters are lineally independent and the range of values. After this preliminary estimation, it can be observed that the N value has similar results for all simulations (value around 10). Therefore, it can be considered as a fixed value for the following simulations, with more accuracy ($N = 10$).

For the estimation of k' (degradation rate parameter), the Solver add-in Excel has been used to minimise the error value between the predicted (theoretical) value and the experimental value. This average absolute deviation (AAD) is calculated as the summation of the absolute value of the difference between the experimental and theoretical values for each time, according to Eq. (5).

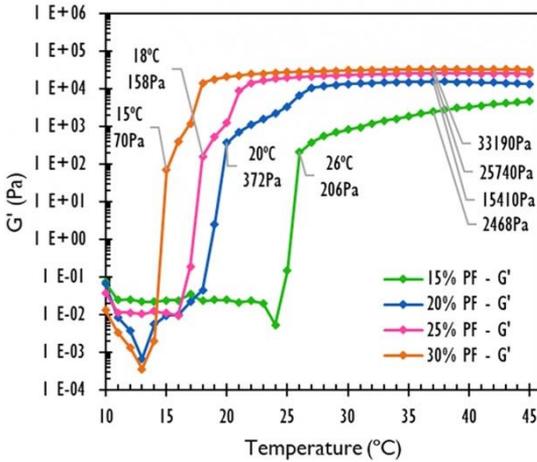
$$AAD (\%) = \frac{\sum_i |T_{vi} - E_{vi}|}{n} \cdot 100 \quad (5)$$

Where T_{vi} is the theoretical value for each time, E_{vi} is the experimental value for each time and n is the number of experimental points.

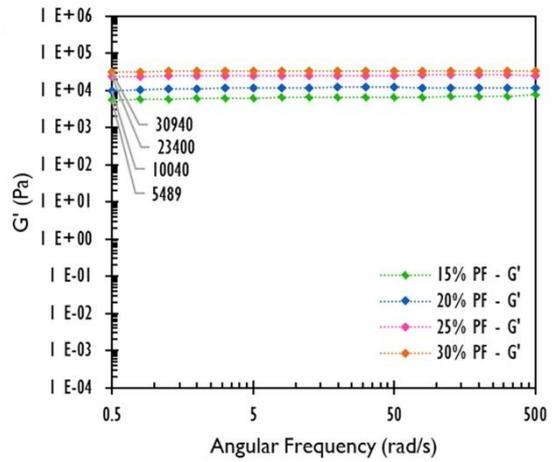
2.5. In vitro FOH release from hydrogels

In order to simulate more realistically the drug delivery process in

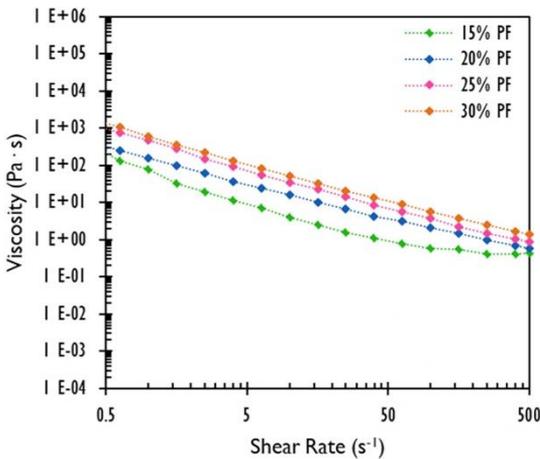
A) Temperature effect of gels with a variable concentration of PF-127



B) Frequency sweep of gels with a variable concentration of PF-127



C) Rheological behaviour of gels with a variable concentration of PF-127 (37°C)



D) Rheological behaviour of gels with a variable concentration of PF-127 (10°C)

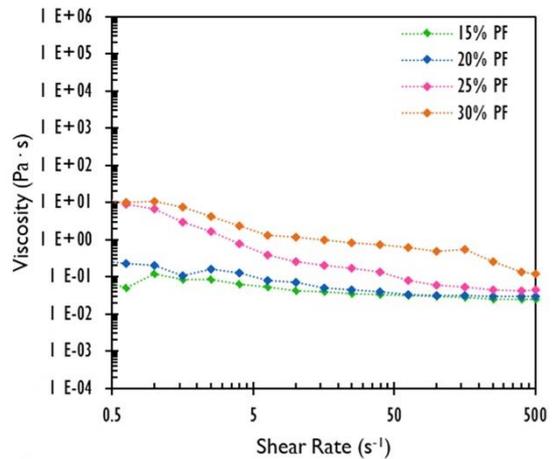


Fig. 2. A) Temperature sweep of the different PF-127 solutions (15 %, 20 %, 25 %, and 30 %) in PBS B) Frequency sweep of PF-127 solutions at 37 °C. Rheological behaviour of PF-127 solutions at different concentrations (15 %, 20 %, 25 %, and 30 %) at 37 °C (C) and 10 °C (D).

3.1.2. Effect of the addition of GG

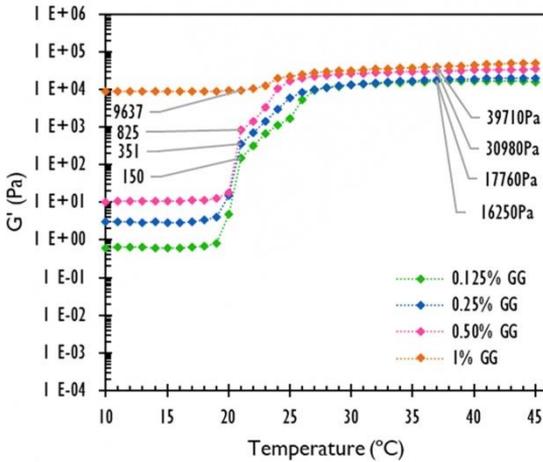
In order to increase the gel degradation time by tuning the gel structure without changing the rheological properties, it was proposed to incorporate GG into the PF-127 gels, for which tests with different concentrations of GG (0.125 %, 0.25 %, 0.50 %, and 1 % w/v) were carried out. A maximum GG concentration of 1 % was used to prevent potential problems for a potential injectable administration.

On the one hand, oscillatory analysis of GG solutions without PF-127 (see supplementary material, Fig. S.3.A) indicated that G' was not affected by temperature changes between 10 °C and 45 °C, as expected, since, according to the bibliography (Bradbeer et al., 2015; Joseph et al., 2007), GG changes its structure (from double helical to spiral) above 80 °C. When it cools down, it changes its structure as it drops below 42 °C, but in the heating process it needs a higher temperature. The G'

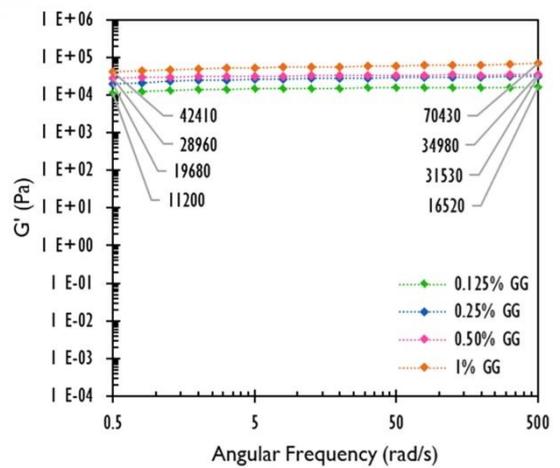
values were 2 Pa, 49 Pa, 415 Pa, and 5280 Pa for each concentration: 0.125 %, 0.25 %, 0.50 %, and 1 %, respectively, at 37 °C. Regarding the rheological oscillatory results of these solutions (Fig. S.3.B), it is important to indicate that GG at a concentration of 0.125 % promoted a crossover point between the G'' and G' , noting the weak character of the gel formed and its viscous nature at high frequency; the rest of them were strong gels because G'' was much lower than G' . This was confirmed with the frequency sweep test, since there is a higher dependence of the storage modulus on the frequency for the 0.125 % GG solutions. However, this dependence was not observed for higher concentrations (formation of stronger gels). The G' values for those concentrations at 0.5 rad/s were: 60 Pa, 477 Pa, and 5781 Pa for 0.25 %, 0.50 %, and 1 % GG, respectively.

On the other hand, the results of combining PF-127 (20 %) and GG

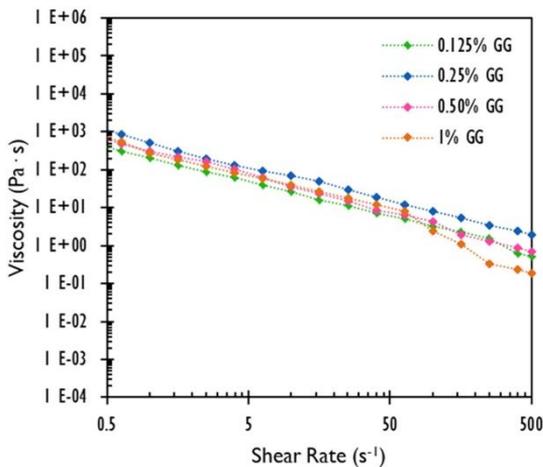
A) Temperature effect of gels with 20% PF-127 and a variable concentration of GG



B) Frequency sweep of gels with 20% PF-127 and a variable concentration of GG



C) Rheological behaviour of gels with 20% PF-127 and a variable concentration of GG (37 °C)



D) Rheological behaviour of gels with 20% PF-127 and a variable concentration of GG (10 °C)

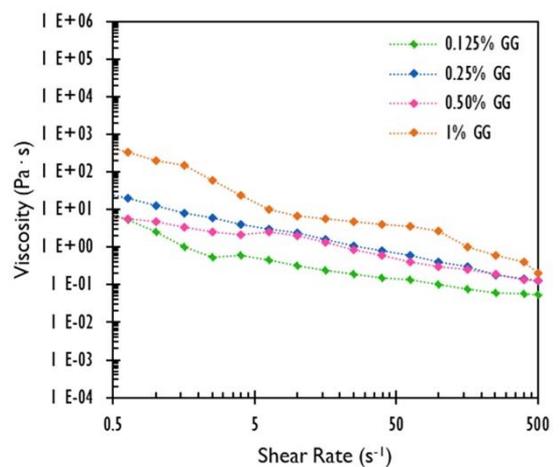


Fig. 3. (A) Temperature sweeps from 10 to 45 °C of samples with PF-127 at 20% and GG at different concentrations in PBS. (B) Frequency sweep of PF-127 and GG solutions at 37 °C. And rheological behaviour of solutions with PF-127 (20%) and GG at different concentrations at 37 °C (C) and 10 °C (D).

(Fig. 3A) indicate that at low concentrations of GG, the system is clearly temperature sensitive (from 10 to 45 °C). The LCST was 20 °C for all samples and they were stable gels at 37 °C, the G' values were: 16,250 Pa at 0.125 %, 17,760 Pa at 0.25 %, and 30,980 Pa at 0.50 %. Nevertheless, in the case of 1 % GG, the polysaccharide gel structure predominated over PF-127, keeping the sample in gel form without temperature sensitivity, which could be a problem for future systemic administration. Furthermore, frequency sweep analysis (Fig. 3B), indicated that there is a slight increase of the G' with frequency; showing that the gels still have remaining interactions between the different chains.

Finally, Fig. 3 also shows the rheological behaviour at 37 °C and 10 °C with steady state analysis. In the case of samples without PF-127, similar plots were obtained at different temperatures, since in this range

of temperature these solutions were not affected to a great extent (see supplementary material, Fig. S.4). In all cases, the higher the shear rate, the lower the viscosity, so they behaved as pseudoplastic fluids. When GG was combined with PF-127 at 20% differences in the graphs of the different temperatures were observed (Fig. 3C and D). Although they continued to be pseudoplastic solutions, the viscosity values were higher at 37 °C than at 10 °C for all solutions due to the formation of a stronger network as a result of the addition of GG; except for the 1 % solution, where the values were similar because, as mentioned before, GG predominates over PF-127.

Results of combining PF-127 (20%) and GG concerning loss modulus (G'') versus temperature and angular frequency are included in the supplementary material (Fig. S.5).

Taking all these results into account, it was decided that the optimal

concentration of GG was 0.50 %, which allows working with systems in the liquid state at low temperatures (G' is 18 Pa at 20 °C) and makes the gel stronger and more stable at 37 °C (G' is more than 30 kPa).

3.1.3. Study of the effect of the addition of FOH, CD, and CD-FOH

To determine the effect of the addition of FOH on the gel, the rheology was studied by adding FOH at different concentrations (4 mM, 20 mM, 40 mM, 200 mM, and 400 mM) to solutions with 20 % PF-127 and 0.50% w/v GG. Nevertheless, since FOH has poor solubility in aqueous solvents (approximately $8 \cdot 10^{-6}$ M), the CD-FOH complex was also studied, using CD-FOH at 40–20 or 8–4 mM and, as a control of cyclodextrin, CD at 40 or 8 mM without FOH. These concentrations were chosen based on the respective IC50 and the low solubility of FOH, in order to achieve a sustained release (with a proper antitumoral effect) that could be quantified, overcoming instruments detection limit (Xu et al., 2014). As can be seen in the Fig. 4, above 200 mM of FOH we have an emulsion, not a dispersion.

Fig. 5A shows that the LCST did not change with respect to the control when FOH was added at the minimum concentration (4 mM), but as the concentration of free FOH increased, the LCST decreased, reaching a LCST of around 10 °C (G' of 600 Pa) if 400 mM FOH was added. However, once gelled at 37 °C, the FOH concentration increased the G' (from 16 kPa to 20 kPa), and these values remained constant with the angular frequency (Fig. 5B). This also indicated the formation of a strong gel for all FOH concentrations. Based on these results, a concentration of 20 mM FOH was chosen since this is the maximum amount that can be added to overcome the problems of using FOH as a drug, following our explanation in our previous paragraph, without modifying the rheological behaviour of the formulations.

Moreover, as the use of CD may be necessary to increase the solubility of FOH, a rheological study was performed with the respective systems with free CD and CD-FOH with 20 mM FOH. Fig. 5C shows that the addition of FOH or CD at those concentrations did not significantly affect the LCST; however, at 37 °C the presence of CD drastically reduced the G' , which was approximately 20 kPa for the PBS control and the sample with free FOH, compared to approximately 3 kPa for the CD and CD-FOH samples. It seems, therefore, that the addition of the inclusion complex hinders the formation of the polymeric network, as some polymeric chains try to be hosted in the CD cavity. This explanation is consistent with previous works that used cyclodextrins to minimise the assembly in polymeric micelles [26]. Finally, Fig. 5D shows that, for all the studied formulations, the angular frequency did not affect G' (strong gel formation). This figure also indicates that the addition of the free CD reduced the G' because the CD hosts polymeric chains, thus reducing the solid nature of the formulation. However, this reduction was not observed for the other formulations because, as explained above, the CD hosts FOH instead of polymeric chains in the formulation network. In this context, the results concerning the loss modulus (G'') of the respective formulations are included in the supplementary material (Fig. S.6).

Finally, Fig. 6 (steady state analysis) illustrates that the system



Fig. 4. Hydrogels of PF-127 at 20 % and GG at 0.50 %, with 10 % v/v of different solutions added: CD, CF-FOH (CDF) or FOH at variable concentrations, and PBS as control.

maintained its pseudoplastic behaviour with the addition of the complex and the single molecules. In the case of free FOH samples at different concentrations, it is observed that at 37 °C (Fig. 6A) all samples had approximately the same behaviour (zero viscosity around 1000 Pa s), while at 10 °C (Fig. 6B) the viscosity values increased with increasing FOH concentration (from 10 to 100 Pa s). This phenomenon at 10 °C was attributed to the poor solubility of FOH in water, forming an emulsion, which contributed to an increase in the initial viscosity with the amount of FOH added. However, at 37 °C, the gel was formed due to the gelation of PF-127, and as a consequence the FOH was entrapped in the gel and its contribution to the viscosity was less significant.

On the other hand, comparing the CD, CD-FOH and FOH values, it is observed that at 37 °C (Fig. 6C) the control sample (PBS) had similar values to those of free FOH, while the samples with CD had a lower viscosity. In this case, these results can be explained by considering the competition between the different compounds to be hosted by the CD (as was explained before) and how polymeric chains can be included in the CD, decreasing their contribution to the viscosity. This fact was not observed at 10 °C (Fig. 6D) because the PF-127 gel was not formed (with no structure) and only free FOH increased the viscosity because of the emulsification phenomenon.

These results indicated the possibility of controlling the LCST of the hydrogel with the addition of different compounds, such as CD, GG or FOH. This phenomenon highlights how the injectable character of a formulation with PF-127 can be modified. This fact can be relevant to define a potential pharmaceutical application of the developed system.

3.2. Gels degradation and drug delivery

According to the method described in Section 2.4.1., the degradation of gels was quantified by measuring the amount of mass loss at different times. The results were used for parameter estimation (Section 2.4.2.) and the adjustment for different sets of samples analysed is represented in Fig. 7.

Fig. 7A shows how the concentration of GG in hydrogel preparation modified the degradation profile. First of all, in all degradation profiles, the swelling phenomenon was not significant and can therefore be considered negligible for modelling and parameter estimation.

This figure also shows that a higher amount of GG in the hydrogel was related to a more stable gel (slower degradation rate), which shows that there are more interactions between the chains and, therefore, more time is needed for a complete degradation of the structure. The degradation is slower, increasing from 3 h, when there is no GG, to 5 h, when the GG concentration is higher than 0.125 %, or even to 6 and 7 h when it is 0.50 % and 1 %, respectively.

Fig. 7B and C indicate that the addition of FOH in free form or complexed with CD modified the degradation of the formulation when 20 % PF-127 and 0.50 % GG were added to the gel. Specifically, Fig. 7B shows how the addition of free FOH to the hydrogel modified the degradation profile, where the slowest rate was achieved with the highest amount of FOH in the sample. One possible explanation for this phenomenon is that the hydrophobicity of FOH, by forming an emulsion, modifies the relaxation process between the chains within the gel, and therefore, more time is needed to obtain the same degree of degradation.

Finally, Fig. 7C shows how the addition of CD, both free and complexed with FOH, modified the degradation rate. The higher the concentration of CD in the sample, the slower the degradation. This phenomenon could be explained by the fact that some polymeric chains may be complexed with the CD inside the gel, making them more difficult to be available for degradation. In the past, CD has proven to be effective in hosting polymeric micelle chains [26]. The same phenomenon can be considered when the inclusion complex is trapped inside the PF-127 gel.

These results can also be corroborated by analysing the values of K' estimated by Excel Solver. They are summarised in Fig. 7 as well as the

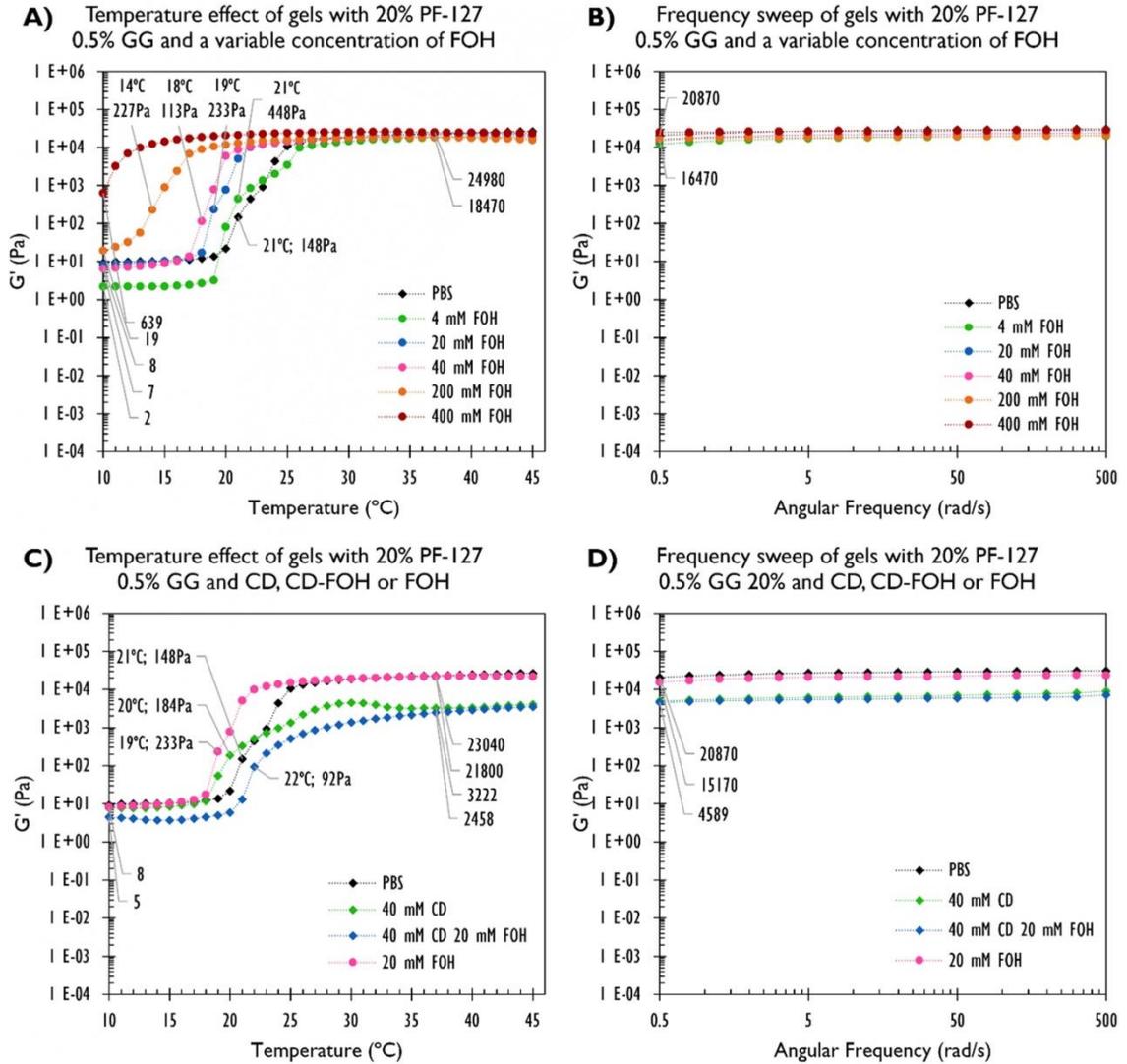


Fig. 5. (A) Temperature sweeps from 10 to 45 °C of samples with PF-127 at 20 %, GG at 0.50 %, and free FOH at different concentrations in PBS. (B) Frequency sweeps of solutions with different concentrations of FOH at 37 °C. (C) Temperature sweeps from 10 to 45 °C of samples with PF-127 at 20 %, GG at 0.50 %, and FOH on different systems (free FOH, CD-FOH, and CD control). (D) Frequency sweeps of solutions with PF-127 at 20 %, GG at 0.50 %, and FOH on different systems (free FOH, CD-FOH, and CD control) at 37 °C.

errors calculated for each adjustment. Results in Fig. 7 show that the fitting process has been carried out correctly, as the AADs are less than 10% in all cases and, therefore, there is a statistical significance in the proposed adjustment. The behaviour observed in Fig. 7 was corroborated by analysing the K' values. There was a significant decrease in the K' value as the FOH concentration increased. A similar effect was observed when the proportion of GG in the hydrogel composition was considered. Based on this data, it could be possible to control the degradation profile of hydrogels by modifying their composition according to the intended application.

Although the degradation time for every gel was around 7 h, it is possible to observe different degradation profiles. This phenomenon is

confirmed by the differences in the value of the degradation parameter K' . For instance, this parameter increases from 0.633 (CD-FOH 8/4 mM) to 0.524 (CD-FOH 40/20 mM) that is around a 15 %. Also, around 55 % of the gel was degraded in 3 h for CD-FOH 40/20 mM whereas only 30 % of gel mass was found for the formulation CD-FOH 8/4 mM in the same time.

These modelling results can also be explained by the oscillatory and steady state rheological results. The K' value decreased with the increase in the storage modulus of the PF-127–GG solutions and with an increase in the initial viscosity of the solutions. The increase in storage modulus favoured the formation of a stronger gel, making the release of the polymeric chains more difficult due to the facilitated interactions.

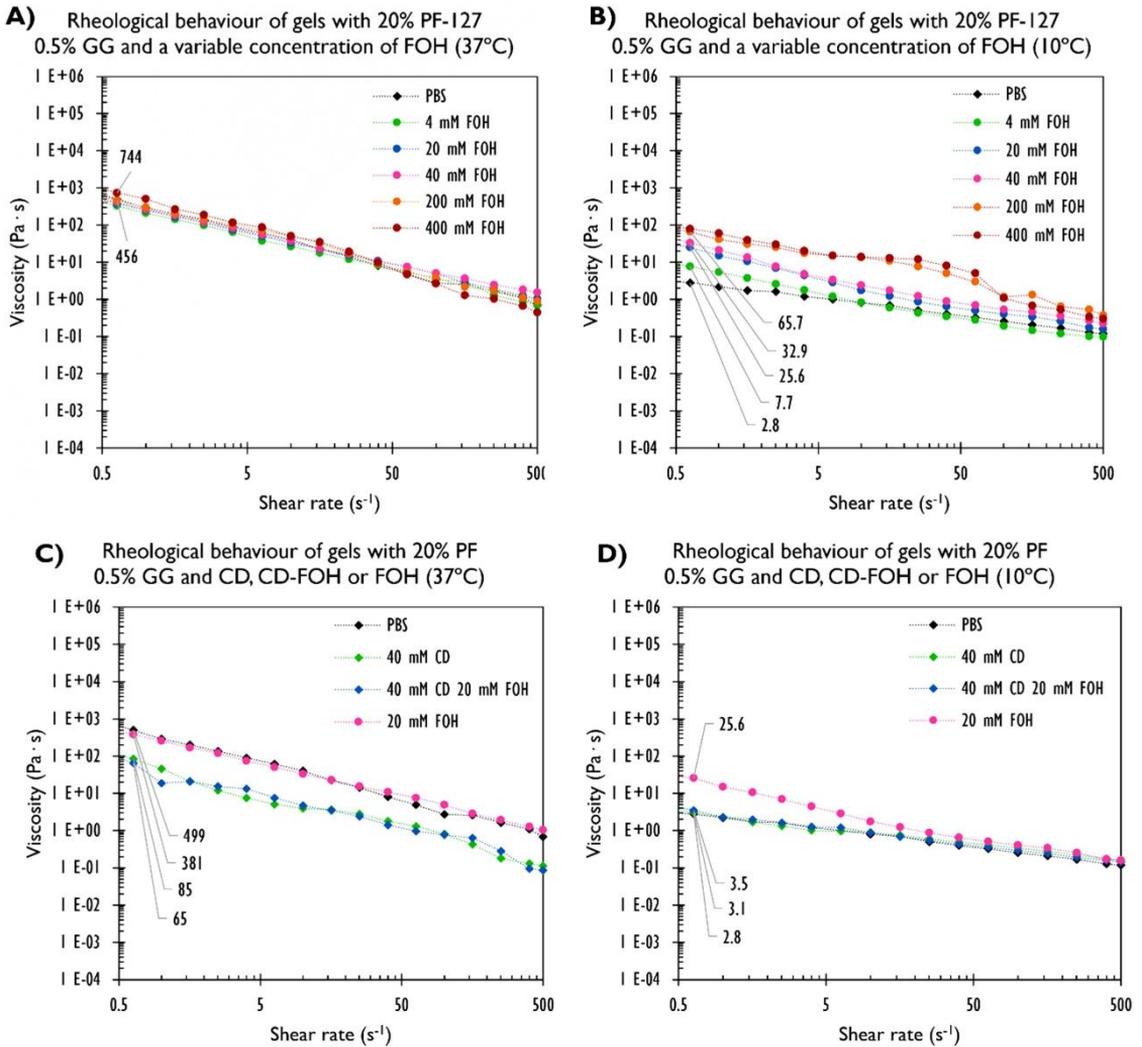


Fig. 6. Rheological behaviour of solutions with PF-127 at 20%, GG at 0.50 %, and FOH at different concentrations at 37 °C (A) and 10 °C (B). Rheological behaviour of solutions with PF-127 at 20 %, GG at 0.50 %, and FOH on different systems at 37 °C (C) and 10 °C (D).

This phenomenon, however, was not observed in the gels with the inclusion complex. The addition of CD-FOH did not modify the storage modulus due to the competition that can occur between CD and the different compounds. However, the entrapping of CD within the PF-127 gel decreased the degradation rate due to the formation of inclusion complexes, as mentioned above, but also reduces the storage modulus of the solutions because the polymeric chains were hosted in the cavity, preventing the possibility of contributing to the solid nature of the system.

After the degradation study, the release assay was performed with the sample with the highest concentration of non-emulsified FOH (lower than 40 mM FOH) without CD, analysing the released of FOH (given in concentration) every hour. A constant amount of FOH was continuously released every hour, up to a saturated concentration around 8 μM FOH. This result indicates that the released quantity of FOH is approximately the maximum solubility of FOH in aqueous media. This causes the FOH

to remain preferentially in the gel and be released only by degradation of the gel. Similar results were found when the FOH release was determined for the CD-FOH complex 40/20 mM (the FOH was sustainedly released according to the FOH aqueous solubility). Therefore, although FOH can be administered in any form, it is best used as a complex with cyclodextrin, ensuring the solubility of FOH in the blood and its permeabilization in cells.

From a pharmaceutical point of view, Fig. 7 indicates that, besides controlling the LCST, the degradation of an injectable hydrogel can be also tuned with the addition of GG and CD. This fact is important, since CD can act as a carrier for a hydrophobic and FDA approved drug, FOH in this case, providing a sustained drug release. The proposed injectable formulation can overcome different drawbacks that have been found in other type of drug release systems.

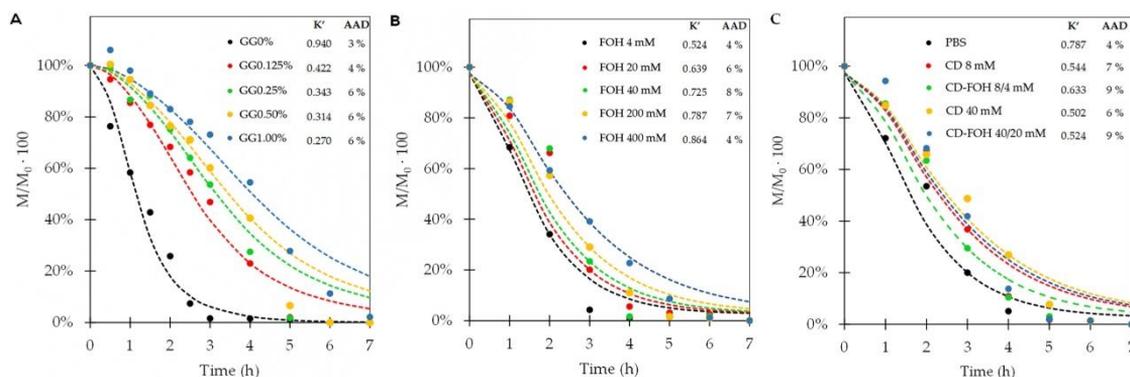


Fig. 7. Results of experimental degradation of different types of hydrogels and their adjustment after parameter estimation. (A) Degradation of hydrogels with different proportions of gellan gum. (B) Degradation of hydrogels containing free FOH at different concentrations. (C) Degradation of hydrogels containing CD at different concentrations and with inclusion complexes CD-FOH. Filled dots represent experimental data and their corresponding adjustment is represented by lines in the same colours. With values of parameters determined by adjusting the experimental results and their average absolute deviation.

4. Conclusions

Thermosensitive gels based on PF-127 and GG were prepared for potential local cancer therapy. The addition of the GG favoured the formation of polymeric interactions, increasing the storage modulus and viscosity, as well as the degradation rate. Furthermore, GG could be useful to control temperature sensitivity. In fact, a concentration of 0.50 % GG doubled the degradation rate (from 3 to 6 h) of a based gel (20 % PF-127) without further modifying the gelation temperature (which started at about 20 °C). Moreover, FOH was incorporated into the gel as a free drug and as an inclusion complex (CD-FOH). These incorporations modified the rheology and the polymeric network, depending on the temperature and also on the addition of the CD. In particular, the inclusion of free CD promoted the formation of polymer-CD complexes, decreasing the storage modulus and viscosity, but also increasing the degradation time. However, free FOH always increases the solid nature of the formulation as well as the degradation rate due to the existence of an emulsion. The complex CD-FOH did not modify the rheological spectrum to a great extent, due to the competition between the previous phenomena.

The degradation results were also modelled, explaining the results based on the release chains of the polymeric system. The release chains matched with the rheological results for the PF-127–GG structures, as the interactions increased the degradation rate and storage modulus. However, the addition of the inclusion complex increased the degradation rate but decreased the storage modulus. This can be explained by the difficulty of the system to release the chains when they are hosted in the CD and as a consequence of the increased degradation rate.

Finally, the drug delivery studies indicated that sustained release was achieved, and was proportional to gel degradation, being 2 mM per hour when 400 mM of free FOH was loaded into the gel and 0.2 mM per hour when the gels were loaded with the inclusion complex (40 mM CD and 20 mM FOH). The problem with free FOH is that when it is released, it is at a concentration higher than its solubility in aqueous solvents ($8 \cdot 10^{-3}$ mM), therefore, the use of the CD-FOH complex, which allows total solubility of the released concentration, is recommended.

Funding

This research was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, grant number CTQ2016–78988-R and PID2019–108994RB-I00.

Institutional review board statement

Not applicable.

Informed consent statement

Not applicable.

Supplementary materials

The following supporting information can be downloaded at: [https://doi.org/10.1016/j.ejps.2023.106618](#). S.1. Incubation of PF-127 at a concentration of 15 % and 20 % at 37 °C; S.2. Loss modulus (G'') of gels at a variable concentration of PF-127 versus temperature (A) and angular frequency (B); S.3. Loss modulus (G'') of gels at a variable concentration of GG without PF-127 versus temperature (A) and angular frequency (B) and loss modulus (G'') of gels at a variable concentration of GG with 20 % PF-127 versus temperature (C) and angular frequency (D); and S.4. Loss modulus (G'') of gels (20 % PF-127 and 0.5 % GG) at a variable concentration of FOH versus temperature (A) and angular frequency (B). And loss modulus (G'') of gels (20 % PF-127 and 0.5 % GG) with FOH, CD or CD-FOH versus temperature (C) and angular frequency (D).

CRedit authorship contribution statement

Inmaculada de Dios-Pérez: Methodology, Validation, Formal analysis, Writing – original draft. **Álvaro González-Garcinuño:** Conceptualization, Investigation, Software, Writing – review & editing, Supervision. **Antonio Tabernero:** Conceptualization, Investigation, Software, Writing – review & editing, Supervision. **Marcos Blanco-López:** Methodology, Validation, Formal analysis. **Juan A. García-Esteban:** Methodology, Validation, Software, Writing – original draft. **Vidal Moreno-Rodilla:** Investigation, Supervision, Resources, Writing – review & editing. **Belén Curto:** Investigation, Supervision, Resources, Writing – review & editing. **Patricia Pérez-Esteban:** Supervision, Formal analysis, Writing – review & editing. **Eva M. Martín del Valle:** Funding acquisition, Project administration, Investigation, Resources, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

This project was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (CTQ2016–78988-R); the project Non-cytotoxic nanoparticles for promoting a double metabolic inhibition of tumour growth: Cancer cell as a biochemical reactor, financed by the Spanish Ministry of Science and Innovation (PID2019–108994RB-I00). Inmaculada de Dios Pérez would like to particularly acknowledge the Spanish Ministry of Education (BES-2017–080001) for her PhD grant (FPI).

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ejps.2023.106618.

References

Bradbeer, J.F., Hancock, R., Spyropoulos, F., Norton, I.T., 2015. Low acyl gellan gum fluid gel formation and their subsequent response with acid to impact on satiety. *Food Hydrocoll.* 43, 501–509. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.07.006>.

Chen, Y.C., Gad, S.F., Chobisa, D., Li, Y., Yeo, Y., 2021. Local drug delivery systems for inflammatory diseases: status quo, challenges, and opportunities. *JCR* 330, 438–460. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.12.025>.

Chen, Y.Y., Wu, H.C., Sun, J.S., Dong, G.C., Wang, T.W., 2013. Injectable and thermoresponsive self-assembled nanocomposite hydrogel for long-term anticancer drug delivery. *Langmuir* 29 (11), 3721–3729. <https://doi.org/10.1021/la400268p>.

de Dios Pérez, I., González Garcinuño, A., Del Valle, E.M.M., 2022. An approach to minimize tumour proliferation by reducing the formation of components for cell membrane. *Molecules* 27 (9). <https://doi.org/10.3390/molecules27092735>.

Diniz, I.M.A., Chen, C., Xu, X., Ansari, S., Zadeh, H.H., Marques, M.M., Shi, S., Moshaverinia, A., 2015. Phronics F 127 hydrogel as a promising scaffold for encapsulation of dental-derived mesenchymal stem cells. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 26 (3), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10856-015-5493-4>.

Gil, M.S., Thambi, T., Phan, V.H.G., Kim, S.H., Lee, D.S., 2017. Injectable hydrogel-incorporated cancer cell-specific cisplatin releasing nanogels for targeted drug delivery. *J. Mater. Chem. B* 5 (34), 7140–7152. <https://doi.org/10.1039/c7tb00873h>.

Joseph, J., Dreiss, C.A., Cosgrove, T., Pedersen, J.S., 2007. Rupturing polymeric micelles with cyclodextrins. *Langmuir* 23 (2), 460–466. <https://doi.org/10.1021/la061850g>.

Kesharwani, P., Bishit, A., Alexander, A., Dave, V., Sharma, S., 2021. Biomedical applications of hydrogels in drug delivery system: an update. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 66 <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102914>.

Li, P., Hou, X., Qu, L., Dai, X., Zhang, C., 2018. PNIPAM-MAPOSS hybrid hydrogels with excellent swelling behavior and enhanced mechanical performance: preparation and drug release of 5-fluorouracil. *Polymers (Basel)* 10 (2). <https://doi.org/10.3390/polym10020137>.

Liu, M., Song, X., Wen, Y., Zhu, J.L., Li, J., 2017. Injectable thermoresponsive hydrogel formed by alginate g-poly(N-isopropylacrylamide) that releases doxorubicin-encapsulated micelles as a smart drug delivery system. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9 (41), 35673–35682. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b12849>.

Marabelle, A., Audtbacka, R., Harrington, K., Melero, I., Leidner, R., de Baere, T., Robert, C., Ascierto, P.A., Baurain, J.F., Imperiale, M., Rahimian, S., Tersago, D., Klumper, E., Hendriks, M., Kumar, R., Stern, M., Ohrling, K., Massacesi, C., Tchakov, I., Tse, A., Douillard, J.-Y., Taberero, J., Haanen, J., Brody, J., 2018. Starting the fight in the tumor: expert recommendations for the development of human intratumoral immunotherapy (HIT-IT). *Ann. Oncol.* 29 (11), 2163–2174. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy423>.

Mohammadi, M., Karimi, M., Malaekhe-Nikouei, B., Torkashvand, M., Alibolandi, M., 2022. Hybrid in situ-forming injectable hydrogels for local cancer therapy. *Int. J. Pharm.* 616 <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121534>.

Mohanty, D., Bakshi, V., Sinharaju, N., Haque, M.A., Sahoo, C.K., 2018. A review on in situ gel. A novel drug delivery system. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 50 (1), 175–181.

Nieto, C., Vega, M.A., Rodriguez, V., Pérez-Esteban, P., Martín del Valle, E.M., 2022. Biodegradable gellan gum hydrogels loaded with paclitaxel for HER2+ breast cancer local therapy. *Carbohydr. Polym.* 294 <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119732>.

Rafael, D., Melendres, M.M.R., Andrade, F., Montero, S., Martínez-Trucharte, F., Vilar-Hernandez, M., Durán-Lara, E.F., Schwartz, S., Abasolo, I., 2021. Thermo-responsive hydrogels for cancer local therapy: challenges and state of art. *Int. J. Pharm.* 606 <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120954>.

Sweety, J.P., Selvasandha, N., Dhanalekshmi, U.M., Sridurgadevi, N., 2022. Gellan gum and its composites. Suitable candidate for efficient nanodrug delivery. In: *Nanoengineering of Biomaterials*, 2. Wiley, pp. 33–61.

Sworn, G., Sanderson, G.R., Gibson, W., 1995. Gellan gum fluid gels. *Food Hydrocoll.* 9 (4), 265–271. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80257-9](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80257-9).

Turabee, M.H., Jeong, T.H., Ramalingam, P., Kang, J.H., Ko, Y.T., 2019. N, N, N-trimethyl chitosan embedded in situ Phronics F127 hydrogel for the treatment of brain tumor. *Carbohydr. Polym.* 203, 302–309. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.09.065>.

Wu, Z.X., Zou, X.Y., Yang, L.L., Lin, S., Fan, J., Yang, B., Sun, X.Y., Wan, Q., Chen, Y., Fu, S.Z., 2014. Thermosensitive hydrogel used in dual drug delivery system with paclitaxel loaded micelles for in situ treatment of lung cancer. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 122, 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.06.052>.

Xiao, Y., Gu, Y., Qin, L., Chen, L., Chen, X., Cui, W., Li, F., Xiang, N., He, X., 2021. Injectable thermosensitive hydrogel-based drug delivery system for local cancer therapy. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 200. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111581>.

Xu, J., Feng, E., Song, J., 2014. Bioorthogonally cross linked hydrogel network with precisely controlled disintegration time over a broad range. *J. Am. Chem. Soc.* 136 (11), 4105–4108. <https://doi.org/10.1021/ja4130862>.

Yu, J., Qiu, H., Yin, S., Wang, H., Li, Y., 2021. Polymeric drug delivery system based on phronics for cancer treatment. *Molecules* 26 (12). <https://doi.org/10.3390/molecules26123610>.

Capítulo 6

-

CONCLUSIONES GENERALES

1. Conclusiones generales

En este capítulo, se presentan las conclusiones generales derivadas de los resultados obtenidos a lo largo de la tesis doctoral. Estas conclusiones están organizadas según las tres estrategias, descritas en el capítulo de objetivos y resumidas en la Figura 6.1, cuyo fin es mejorar los tratamientos actuales para el cáncer colorrectal.

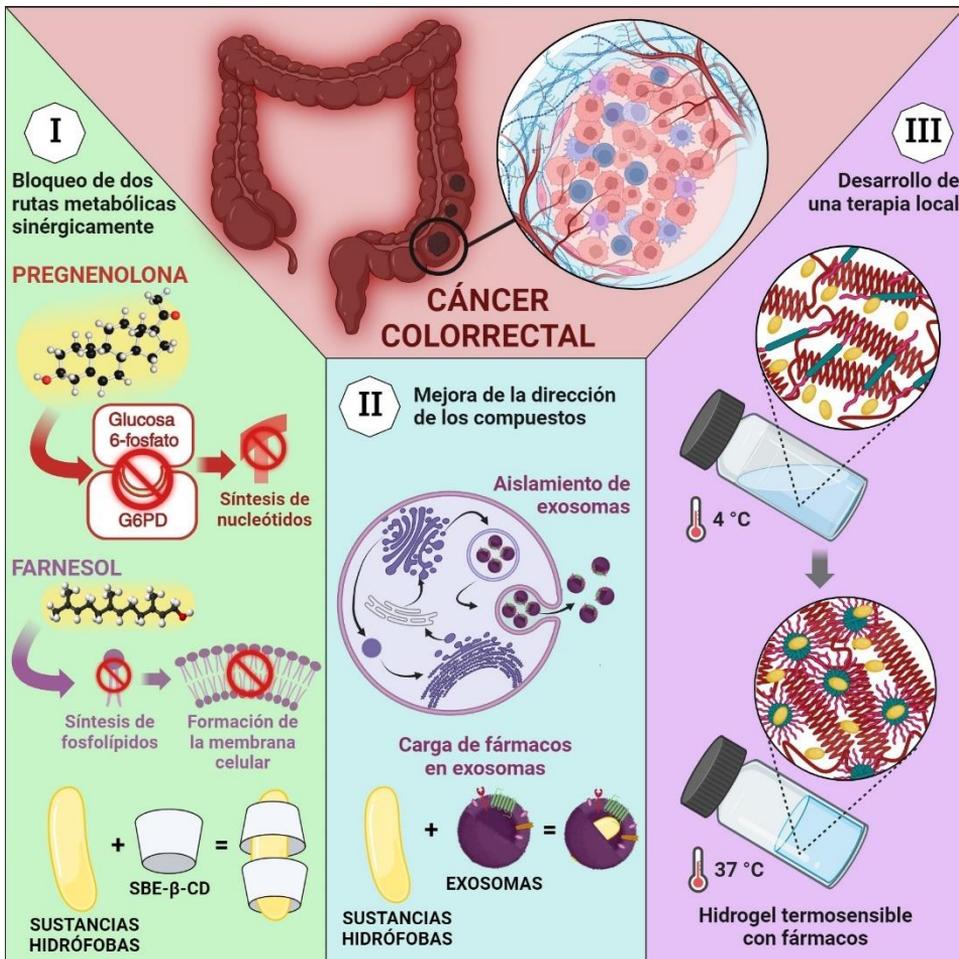


Figura 6.1 Principales estrategias desarrolladas en esta tesis para mejorar los actuales tratamientos del Cáncer colorrectal.

Como se indica en la Figura 6.1, la **primera estrategia** se centró en bloquear simultáneamente dos rutas metabólicas en las células cancerígenas, utilizando P5 y FOH. Debido a la baja solubilidad de estos compuestos, se desarrollaron complejos con SBE- β -CD. La caracterización de estos complejos reveló una formación era instantánea y una estabilidad de mínimo 2 meses, con ratios molares CD:SUST de 2:1 en el caso de FOH y de 5:1 en la P5.

Se demostró que la ciclodextrina libre requería concentraciones muy elevadas para tener un efecto inhibitorio significativo, puesto que la IC_{50} era superior a 1 mM para todas las líneas celulares.

En lo que respecta a la pregnenolona, su adición en forma libre al medio celular resultaba en precipitación, dificultando la determinación de la concentración real solubilizada. Además, el complejo SBE- β -CD – P5 necesitaba concentraciones muy elevadas, superiores a 5 mM de la ciclodextrina, para alcanzar una IC_{50} . Por todas estas razones se descartó este compuesto.

Por otro lado, se destacó la selectividad del farnesol, tanto en forma libre como en complejo, en diferentes líneas celulares. Los valores de IC_{50} para su forma libre oscilaron entre 62 y 71 μ M para las líneas cancerígenas de colon e hígado, pero eran superiores a 100 μ M para la cancerígena de mama y los fibroblastos normales. En cuanto al complejo SBE- β -CD – FOH, esas IC_{50} fueron entre 254 y 304 μ M de FOH para las líneas cancerígenas y 408 μ M en los fibroblastos normales. Del mismo modo, se demostró que el efecto de farnesol era independiente al isómero utilizado y que su acción consistía en inhibir la síntesis de fosfatidilcolina (PC), bloqueando el ciclo celular en la fase G0/G1. Asimismo, se observó que se trataba de un fenómeno capaz de revertirse al adicionar PC al medio.

La **segunda estrategia**, tenía como objetivo mejorar la selectividad de los fármacos administrados por vía sistémica, por lo que se exploró el uso de exosomas como vehículos de transporte.

La caracterización de las muestras aisladas con el kit *ExoQuick-TC® ULTRA* mostraron interferencias en los ensayos de concentración de proteínas (BCA) y del tipo de proteínas (Western Blot), por lo que este método de aislamiento se descartó. En cambio, las muestras aisladas por ultracentrifugación confirmaron la presencia de exosomas, caracterizados por su forma esferoide, tamaño inferior a 200 nm y la presencia de las proteínas CD9 y HSP-70.

A continuación, se cargaron los exosomas aislados por ultracentrifugación con los fármacos propuestos (FOH y PTX) mediante diferentes métodos, siendo la extrusión el que permitió alcanzar las concentraciones más elevadas: entre 5.7 y 8.3 mg/mL de FOH y entre 0.16 y 0.20 mg/ml para PTX.

Posteriormente, los estudios de toxicidad mostraron que los exosomas sin cargar no afectaban de forma significativa a la viabilidad celular tras 48 horas de tratamiento. No obstante, se observaron diferencias en los exosomas cargados dependiendo del cultivo de procedencia. La viabilidad de las células cancerosas se redujo hasta el 3 % al tratar con $\text{EXO}^{\text{HCT-116}}_{\text{PTX}}$ o hasta el 11 % con $\text{EXO}^{\text{HS-5}}_{\text{PTX}}$, mientras que la de los fibroblastos se mantuvo por encima del 76% en ambos casos. Del mismo modo, al comparar los resultados de FOH en función de si se utilizaban exosomas o ciclodextrinas, se demostró una mayor selectividad en los exosomas. Ya que las células cancerosas redujeron su viabilidad hasta el 51% al tratar con SBE- β -CD – FOH y al 58% con $\text{EXO}^{\text{HCT-116}}_{\text{FOH}}$, mientras que en los fibroblastos normales la viabilidad era el 61% al usar ciclodextrina, y del 78% con los exosomas. En resumen, los exosomas demostraron ser una prometedora forma de transportar fármacos de manera selectiva.

Finalmente, la **tercera estrategia** buscó mejorar la liberación de fármacos directamente en el tumor mediante la producción de hidrogeles para terapia local.

Al evaluar las propiedades reológicas de PF-127, se determinó que la concentración óptima era de 20 % w/v, ya que permitía tener una estructura líquida a temperaturas inferiores a la ambiente y una estructura de gel estable a la temperatura corporal. Se comprobó que la adición de GG al 0.50 % w/v incrementaba el módulo de almacenamiento y la viscosidad, así como el tiempo de degradación, el cual aumentó de 3 a 6 horas. Mientras que esta incorporación no afectaba de forma significativa a la temperatura de gelificación.

Posteriormente, la adición de FOH libre en una concentración superior a 200 mM formaba emulsiones, impidiendo su uso de esta forma; sin embargo, concentraciones inferiores a 40 mM no afectaban a la reología. Por otro lado, cuando se añadía en forma de complejo de inclusión, tenía la capacidad de modificar la reología, reduciendo el módulo de almacenamiento y la viscosidad, a la vez que aumentaba el tiempo de degradación. Este efecto se debe a la interacción de las cadenas hidrofóbicas con la cavidad de las ciclodextrinas.

Finalmente, los estudios de liberación del fármaco indicaron que era sostenida y proporcional a la degradación del gel. La liberación fue de 2 mM por hora cuando se cargaron 400 mM de FOH libre y 0.2 mM por hora con el complejo de inclusión (CD 40 mM y FOH 20 mM). A pesar de que la liberación de FOH libre permitía concentraciones más elevadas del compuesto, se recomendó el uso del complejo para garantizar la solubilidad total del fármaco liberado.

En conclusión, los hidrogeles diseñados para la liberación de fármacos demuestran ser una herramienta prometedora en el tratamiento localizado del cáncer.

En conjunto, estas estrategias representan enfoques innovadores para mejorar la eficacia terapéutica, reducir la toxicidad secundaria y abordar la posible resistencia a los tratamientos convencionales en el cáncer colorrectal. Y establecen una base sólida para futuras investigaciones, ya sea el desarrollo de hidrogeles para liberación de exosomas cargados con fármacos, o con el objetivo de simular tumores o regenerar tejidos.

2. General conclusions

In this chapter, the general conclusions derived from the results obtained throughout the doctoral thesis are presented. These conclusions are organized according to the three strategies described in the objectives chapter and summarized in Figure 6.2, with the aim of improving current treatments for colorectal cancer.

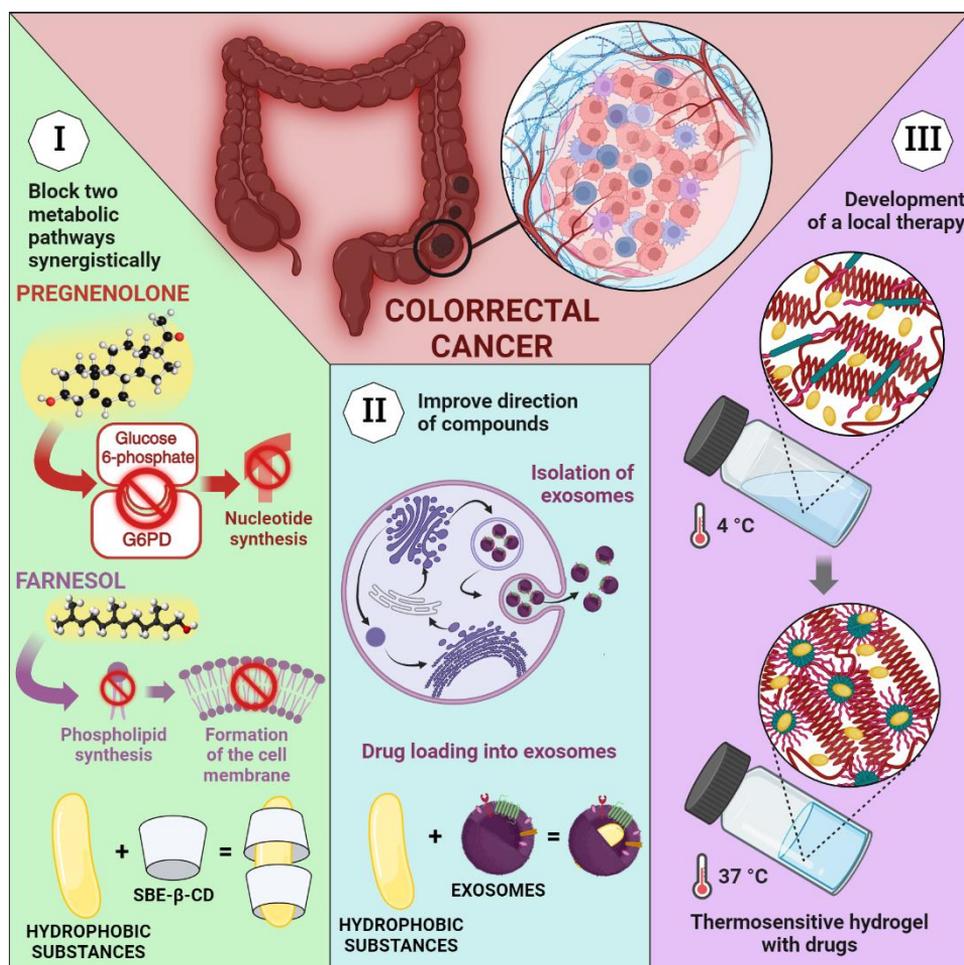


Figure 6.2 Main strategies developed in this thesis to enhance existing treatments for colorectal cancer.

As indicated in Figure 6.1, the first strategy focused on simultaneously blocking two metabolic pathways in cancer cells using P5 and FOH. Due to the

low solubility of the compounds, complexes with SBE- β -CD were developed. The characterization of these complexes revealed an instantaneous formation and a stability of at least two months, with drug:cyclodextrin molar ratios of 1:2 for FOH and 1:5 for P5.

It was demonstrated that free cyclodextrin required very high concentrations to have a significant inhibitory effect, as the IC_{50} exceeding 1 mM for all cell lines.

Regarding pregnenolone, its addition in free form to the cell medium resulted in precipitation, making it difficult to determine the actual solubilized concentration. Furthermore, the SBE- β -CD – P5 complex required very high concentrations, exceeding 5 mM of cyclodextrin, to achieve an IC_{50} . For all these reasons, this compound was discarded.

On the other hand, the selectivity of farnesol, both in free form and in complex, was emphasized across various cell lines. The IC_{50} values for its free form ranged between 62 and 71 μ M for colon and liver cancer cell lines but were higher than 100 μ M for breast cancer and normal fibroblasts. As for the SBE- β -CD – FOH complex, these IC_{50} values were 254 to 304 μ M of FOH for cancer cell lines and 408 μ M in normal fibroblasts. Similarly, it was demonstrated that the effect of farnesol was independent of the isomer used and that its action involved of inhibiting phosphatidylcholine (PC) synthesis, blocking the cell cycle in the G0/G1 phase. Moreover, this phenomenon was reversible by adding PC to the medium.

The **second strategy** aimed to improve the selectivity of systemically administered drugs, so the use of exosomes as transport vehicles was explored.

The characterization of the samples isolated with the *ExoQuick-TC® ULTRA* kit showed interferences in protein concentration assays (BCA) and protein type assays (Western Blot), so this isolation method was discarded. Conversely, samples isolated by ultracentrifugation confirmed the presence of exosomes,

characterized by their spheroid shape, size below 200 nm, and the presence of CD9 and HSP-70 proteins.

Afterward, the isolated exosomes by ultracentrifugation were loaded with the proposed drugs (FOH and PTX) through various methods, with extrusion allowing the highest concentrations: between 5.7 and 8.3 mg/mL of FOH and between 0.16 and 0.20 mg/ml for PTX.

Subsequently, toxicity studies showed that unloaded exosomes did not significantly impact on cell viability after 48 hours of treatment. However, differences were observed in loaded exosomes depending on the origin of the culture. The viability of cancer cells was decreased to 3% when treated with Exo^{HCT-116} PTX or up to 11% with Exo^{HS-5} PTX, while that of fibroblasts remained above 76% in both cases. Similarly, comparing FOH results based on whether cyclodextrins or exosomes were used demonstrated greater selectivity with exosomes. Cancer cells reduced their viability to 51% when treated with SBE- β -CD – FOH and to 58% with Exo^{HCT-116} FOH, while in normal fibroblasts, viability was 61% using cyclodextrin and 78% with exosomes. In summary, exosomes proved to be a promising means of selectively transporting drugs.

Finally, the **third strategy** was focused on improve the drug release directly into the tumour through the production of thermosensitive hydrogels for local therapy.

When evaluating the rheological properties of PF-127, it was determined that the optimal concentration was 20 % w/v, allowing for a liquid structure at temperatures below room temperature and a stable gel structure at body temperature. It was confirmed that the addition of GG at 0.50 % w/v increased the storage modulus and viscosity, as well as the degradation time, which extended

from 3 to 6 hours. Highly, this incorporation did not significantly affect the gelation temperature.

Subsequently, the addition of free FOH at a concentration higher than 200 mM formed emulsions, rendering it unusable in this form; however, concentrations below 40 mM did not affect rheology. On the other hand, when added in the form of an inclusion complex, it had the ability to modify rheology, reducing the storage modulus and viscosity, while increasing the degradation time. This effect is due to the interaction of hydrophobic chains with the cavity of cyclodextrins.

Finally, drug release studies indicated that it was sustained and proportional to gel degradation. The release was 2 mM per hour when 400 mM of free FOH was loaded, and 0.2 mM per hour with the inclusion complex (CD 40 mM and FOH 20 mM). Although the release of free FOH allowed higher concentrations of the compound, the use of the complex was recommended to ensure the total solubility of the released drug.

In conclusion, hydrogels designed for drug release prove to be a promising tool in the localized treatment of cancer.

Together, these strategies represent innovative approaches to enhance therapeutic efficacy, reduce secondary toxicity, and address potential resistance to conventional treatments in colorectal cancer. Additionally, they establish a solid foundation for future research, whether in the development of hydrogels for the release of exosomes loaded with drugs, or with the aim of simulating tumours or regenerating tissues.

Anexo I

-

**HIDROGELES PARA
SIMULACIÓN DE TUMORES**

El uso de hidrogeles en medicina abarca diversas aplicaciones, como se detalla en el capítulo 1 de esta tesis (Capítulo 1). Se emplean tanto en liberación de fármacos, uso descrito en el Capítulo 5, como en la simulación de tumores, ya que los hidrogeles ofrecen un soporte tridimensional capaz de simular entornos *in vitro* que reproduzcan fielmente las complejidades físicas y químicas de los tejidos tumorales. Esta aplicación surge de la necesidad de mejorar los tratamientos clínicos del cáncer y perfeccionar los ensayos previos al estudiar nuevos fármacos.

En este anexo, se estudió la posibilidad de utilizar estos hidrogeles para la simulación de tumores en cultivos tridimensionales, para lo cual se deben tomar decisiones cruciales sobre la configuración de la estructura del cultivo 3D, asegurando que las células reproduzcan fielmente las características del tumor. Esto implica no solo tener en cuenta las diferencias en el metabolismo y las vías de señalización entre las células cancerígenas y normales, sino también considerar las propiedades físicas distintivas, como la elasticidad celular. Para ello, se estudió el efecto reológico de la adición de células en los hidrogeles.

Con el fin de aprovechar los geles utilizados como tratamiento anticancerígeno local en el capítulo 5, se propuso estudiar la reología cuando se cultivaban células en ellos. Se prepararon los geles de 20 % PF-127 y 0.5 % GG en DMEM⁺, ya que, contiene los componentes necesarios para que las células proliferen (aminoácidos, glucosa, sales inorgánicas, vitaminas, minerales y lípidos). Estos hidrogeles se plaquearon en placas de 6 pocillos, incorporando 3 mL/pocillo, y se incubaron durante 1 hora a 37 °C para gelificarlos. Después, se adicionaron 150 μ L de células disueltas en DMEM⁺, obteniendo una concentración de $5 \cdot 10^5$ células por pocillo. Finalmente se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂ durante 72 horas (Figura A. I. 1).



Figura A. I. 1 Placas de hidrogeles de 20% PF-127 y 0.5% GG en DMEM* tras ser incubados 72 horas con diferentes líneas

En las 72 horas de incubación las células han crecido, usando el gel como soporte. Este hecho se puede ver especialmente en la Figura A. I. 1, ya que se observa que las células HCT-116 han consumido nutrientes del medio haciendo que el color rojo pase a una tonalidad más anaranjada. Con estas muestras se llevaron a cabo los ensayos reológicos, realizando un barrido de frecuencia para evaluar su resistencia para resistir deformaciones, cuyos resultados se presentan en la Figura A. I. 2.

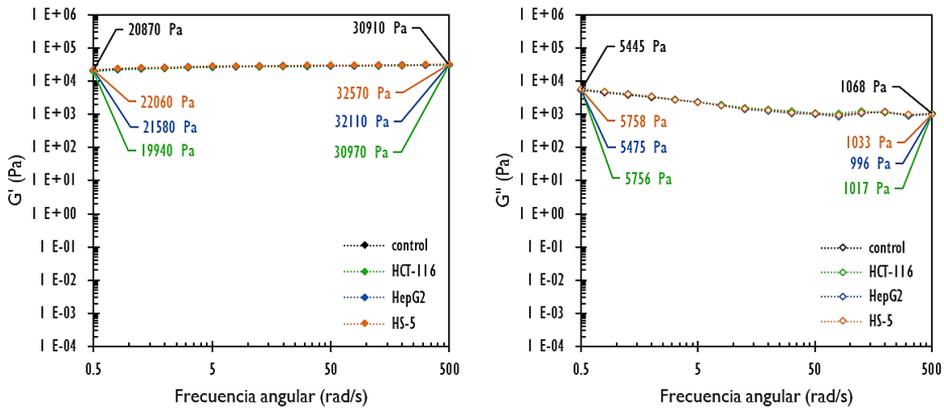


Figura A. I. 2 Barrido de frecuencia a 37 °C en las soluciones de 20% PF-127 y 0.5% GG en DMEM+ tras ser incubados 72 horas con diferentes líneas

Se observa que los módulos no se ven afectados, ya que las gráficas de la Figura A. I. 2 son idénticas al control. Posteriormente se estudió el efecto en la viscosidad de los hidrogeles, como se observa en la Figura A. I. 3.

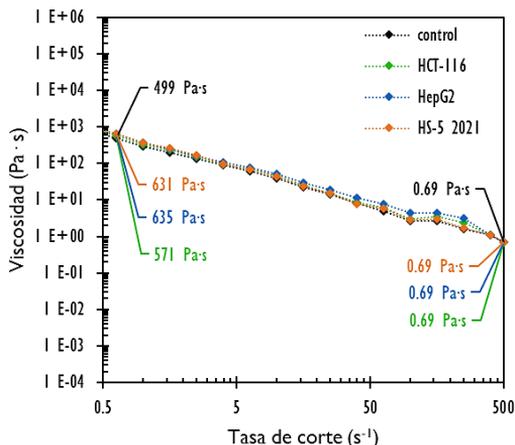


Figura A. I. 3 Comportamiento reológico a 37 °C de las soluciones de 20% PF-127 y 0.5% GG en DMEM+ tras ser incubados 72 horas con diferentes líneas celulares

Nuevamente, con los resultados de la Figura A. I. 3 se confirmó que el cultivo celular no afectaba a la reología de los hidrogeles.

Después de validar el efecto sobre la reología, se realizaron ensayos *in vitro*, tal como se realizaron en el capítulo 3 de esta tesis, pero cultivando las células en el gel, en lugar de en la superficie de la placas. Por lo que se prepararon hidrogeles con la línea celular de cáncer de colon HCT-116 (Figura A. I. 4) se incubaron durante 24 horas a 37 °C y 5 % de CO₂. Después, las células se trataron con el farnesol en sus diferentes formas: libre (FOH) o en complejo con la ciclodextrina (CD-FOH), realizando, a su vez un control con la CD. Por lo que se añadieron los tratamientos utilizando un volumen final de 100 µL para que no afectase a la estructura de gel, trabajando con unas concentraciones finales de 400 µM de FOH y 800 µM de CD.



Figura A. I. 4 Placa de geles con células HCT-116 con los diferentes tratamientos

Una vez tratadas, se procedió a determinar la viabilidad celular por contaje. Para ello la placa se incubó a 4 °C durante 2 horas, así los hidrogeles cambiarían su estructura a líquida, y se añadieron 3 mL de PBS frío por pocillo con el fin de reducir la concentración de PF-127 y GG. De esta forma se garantizó que no pudiesen volver a gelificar (Figura A. I. 5).

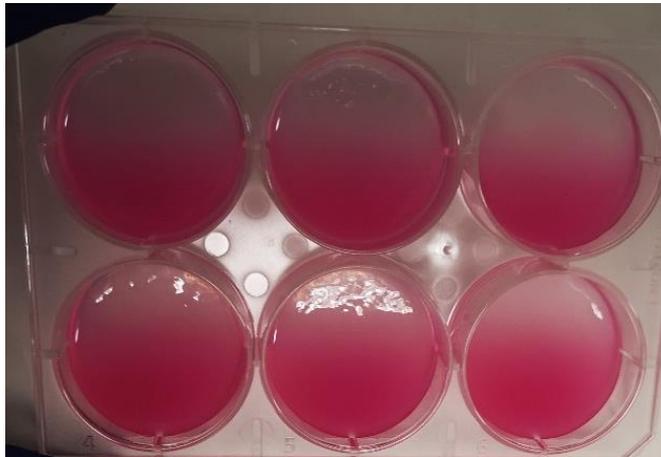


Figura A. I. 5 Placa de geles con células HCT-116 con los diferentes tratamientos tras incubación a 4 °C durante 2 horas.

Finalmente, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 200 g para sedimentar las células y poder suspenderlas en el mínimo volumen posible,

asegurando que el conteo fuese lo más preciso posible. Sin embargo, cómo se observa en la Figura A. I. 6 también sedimentaban los compuestos del hidrogel.

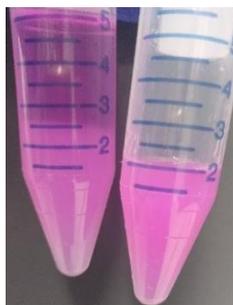


Figura A. I. 6 Muestras de hidrogeles con células tras centrifugar: a la derecha sin adicionar nada y a la izquierda adicionando agua.

La sedimentación de los compuestos impedía el conteo celular, por lo que se abordó otra estrategia para cuantificar la viabilidad celular. Para ello se procedió a preparar nuevamente hidrogeles y se trabajó con un volumen de gel de 1 mL, al que posteriormente se adicionarían 4 mL de diferentes solventes en frío: DMEM+, agua, PBS, etanol, tripsina (Figura A. I. 7).

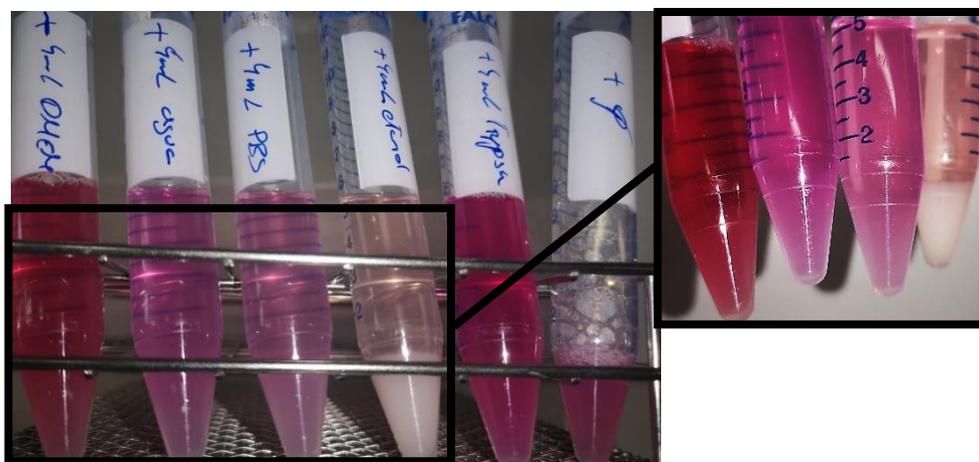


Figura A. I. 7 Geles solubilizados en diferentes disolventes para la recuperación de células. De izquierda a derecha: DMEM+, agua, PBS, etanol, tripsina y nada (control).

Sin embargo, como se puede observar en la Figura A. I. 7, aumentar la cantidad de solvente resulta una táctica ineficaz para prevenir la sedimentación de los compuestos del hidrogel. Como alternativa para cuantificar la concentración

celular se propuso analizar los geles por microscopía. Para corroborar que se podría hacer por esta técnica se prepararon geles con células que estaban previamente teñidas y se observaron con un microscopio Leica SP8, tras 24 horas de incubación. En la Figura A. I. 8 se observa el gel con las células HCT-116 (cancerígenas de colon) teñidas de rojo con cell tracker red y en la Figura A. I. 9 las HS-5 (fibroblastos normales) teñidas de verde con cell tracker green.

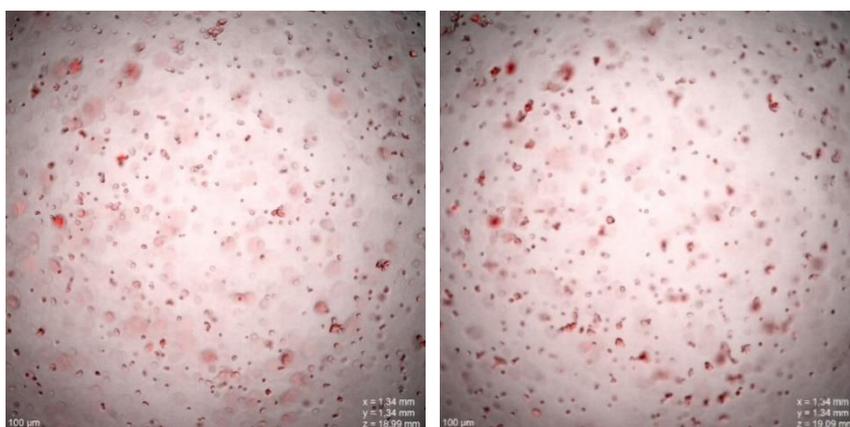


Figura A. I. 8 Imágenes de microscopía de los hidrogeles con células cancerígenas HCT-116 teñidas de rojo.

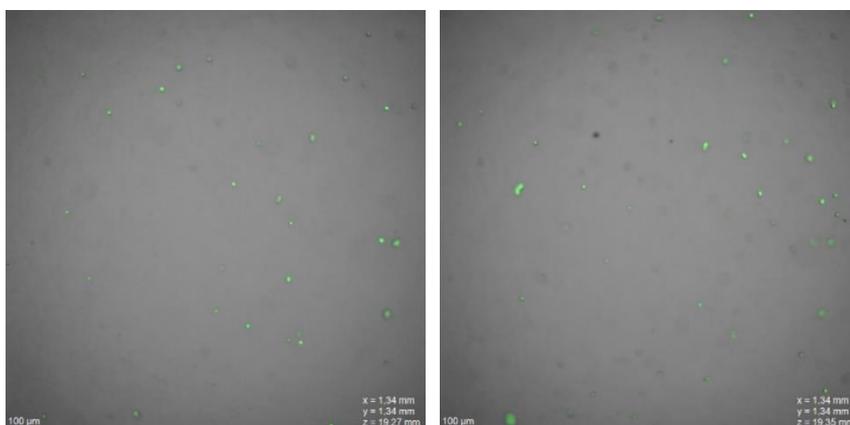


Figura A. I. 9 Imágenes de microscopía de los hidrogeles con células normales HS-5 teñidas de verde.

El resultado fue muy prometedor, ya que se pudieron ver las células teñidas, posibilitando los ensayos con cocultivos. Además, se observaron las células enfocando a diferentes alturas. En la Figura A. I. 8 la altura de la lente al tomar la

imagen de la izquierda es 18.99 mm y la de la derecha es 19.09 mm, es decir, permite la visualización de las células a diferentes alturas del gel. Sin embargo, aunque de esta forma se pudo comprobar la concentración celular, no se podía definir qué porcentaje de esas células estaban vivas o muertas. Por lo que se probaron 3 productos utilizados habitualmente para determinar la viabilidad celular: yoduro de propidio, Dapi 405 y reactivo MTT.

En primer lugar, se añadió Yoduro de propidio al hidrogel con células cancerígenas. Este compuesto actúa penetrando en las células dañadas, donde se une al ADN y emite fluorescencia roja al ser excitado. De tal forma, que se podía cuantificar la cantidad de células dañadas al contar aquellas que mostraban una fluorescencia roja intensa. Las imágenes de estos hidrogeles se muestran en la Figura A. I. 10, se obtuvieron utilizando dos fuentes de luz: blanca (B) para cuantificar el número total de células y roja (R) para cuantificar las células dañadas. Finalmente, se combinaron ambas para obtener una visión completa.

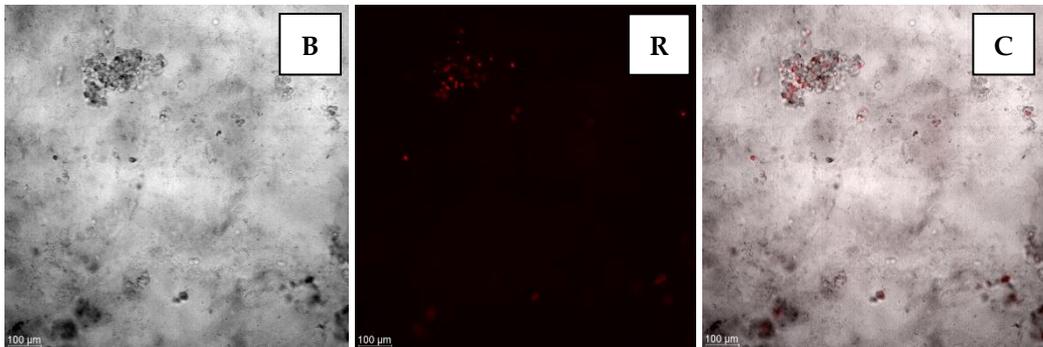


Figura A. I. 10 Imágenes de microscopía de los hidrogeles con células cancerígenas HCT-116 tras añadir Yoduro de propidio. Capturas tomadas con diferentes fuentes de luz: blanca (B) y roja (R), y su combinación (C).

En las imágenes se puede observar la intensidad rojiza del yoduro, por lo que se podría utilizar para determinar la viabilidad celular en los geles.

En segundo lugar, se incorporó DAPI 405 a un cultivo de fibroblastos normales (HS-5) teñidos de verde. Este compuesto es un colorante de ADN que, al unirse al material genético de las células vivas, emite fluorescencia azul al ser excitado,

por lo que se pueden cuantificar la cantidad de células vivas contando las que tienen coloración azul al utilizar esa fuente de luz. En la Figura A. I. 11 se muestran las capturas de estos hidrogeles utilizando la fuente de luz blanca (B), para cuantificar el número total de células; verde (V) para comprobar que se pueden teñir las células y luego utilizar un reactivo colorimétrico para determinar la viabilidad celular; y azul (A) para cuantificar las células vivas. Finalmente, se combinaron todas para obtener una visión completa.

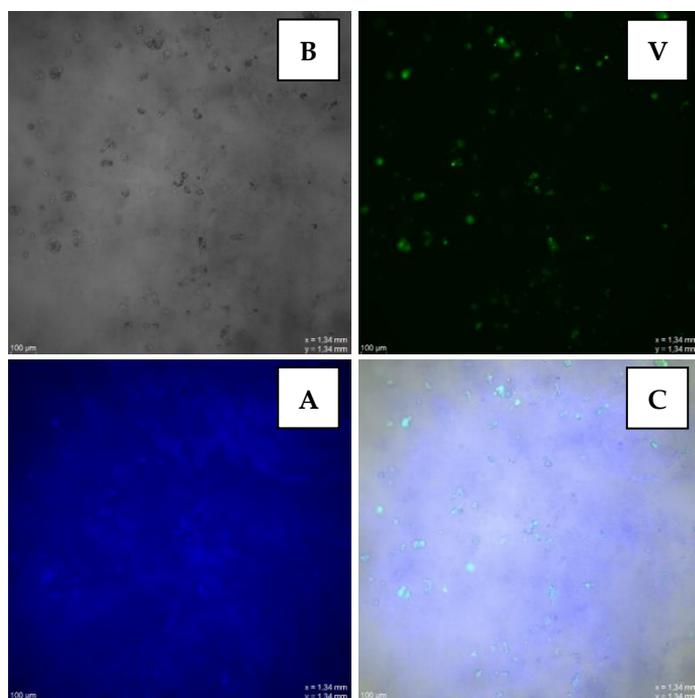


Figura A. I. 11 Imágenes de microscopía de los hidrogeles con células normales HS-5 teñidas de verde, a las que se les ha añadido DAPI. Capturas tomadas con diferentes fuentes de luz: blanca (B), verde (V) y azul (A), y su combinación (C).

A pesar de que en la Figura A. I. 11 se observa cierta interacción de DAPI con las células, la imagen muestra mucho ruido, lo cual dificulta una cuantificación precisa. Para obtener conclusiones definitivas, se deben realizar experimentos adicionales.

En tercer lugar, se estudió la posibilidad de utilizar el reactivo de MTT a un cocultivo de células normales HS-5 teñidas de verde y células cancerígenas HCT-116 teñidas de rojo. Como se menciona en el apartado 3.2 del capítulo 3, este reactivo, conocido como bromuro de azul de tiazolilo tetrazolio, es capaz de formar cristales de color púrpura al reaccionar con las células vivas. En la Figura A. I. 12 se muestran las capturas de estos hidrogeles utilizando la fuente de luz blanca (B), para cuantificar el número total de células y determinar qué células han formado cristales al reaccionar con el reactivo; rojo (R) para cuantificar el número de células cancerígenas y verde (V) para cuantificar el número de células sanas. Finalmente, se combinaron todas para obtener una visión completa.

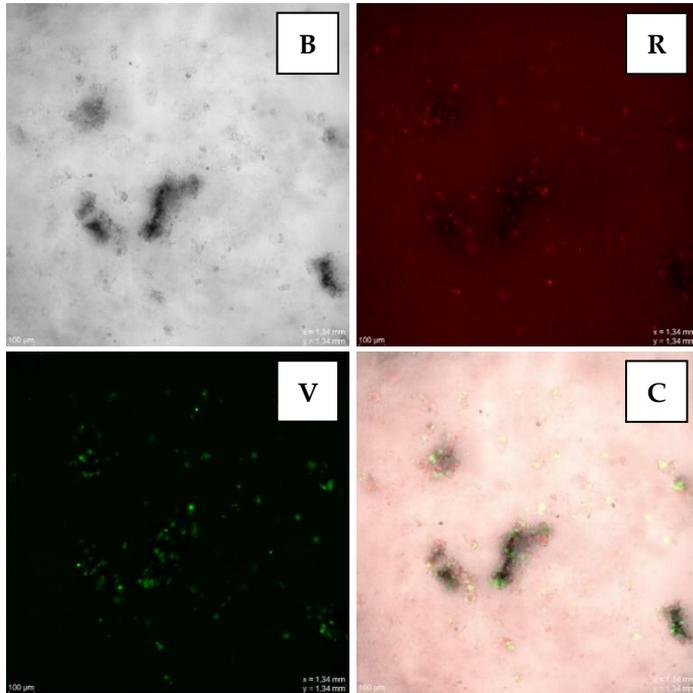


Figura A. I. 12 Hidrogeles con células normales HS-5 teñidas de verde cancerígenas HCT-116 teñidas de rojo y con reactivo MTT.

Al observar las imágenes de la Figura A. I. 12 se concluye que se puede cuantificar la cantidad de células cancerígenas, sanas y totales. También se

observa la formación de cristales, sin embargo, no es útil para cuantificar la viabilidad celular, porque se muestran como una sombra negra.

En resumen, se ha comenzado a poner a punto la técnica para evaluar la viabilidad celular por microscopía utilizando diferentes reactivos. Haciendo posible el uso de los hidrogeles de PF-127 20% y GG 0.5 % como soporte, permitiendo su utilización en la simulación tumores.

En futuras investigaciones, será necesario abordar el estudio del crecimiento celular dentro de estos geles para determinar su capacidad de simular adecuadamente el microambiente tumoral. Así como determinar la viabilidad celular mediante microscopía después de la exposición a distintos fármacos.

Anexo II

-

PRODUCTOS Y EQUIPOS

Productos

Producto	Marca comercial
Acetato de uracilo 2%	Fisher Chemical
Acrilamida-bisacrilamida	Merck
Agua deuterada (D ₂ O)	Sigma-Aldrich
Anticuerpo ExoAb	System BioSciences
Bromuro de tetrazolio azul de tiazolilo	Sigma-Aldrich
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Fisher Chemical
Dodecilsulfato sódico (SDS)	Fisher BioReagents
<i>E,E</i> - Farnesol 96% (<i>E,E</i> -FOH)	Sigma-Aldrich
Farnesol 95% (FOH)	Sigma-Aldrich
Glicina	Sigma-Aldrich
Goma Gellan, Gelzan TM (GELRITE®)	Sigma-Aldrich
Inhibidores de proteasa	Thermo Scientific TM
Kit de ensayo de proteínas Pierce BCA	Thermo Scientific TM
Kit ExoAb Antibody	System BioSciences
Kit ExoQuick-TC ® ULTRA	System BioSciences
L - α -fosfatidilcolina 99% (PC)	Sigma-Aldrich
Línea celular BT-474 (ATCC® HTB20 TM)	American Tissue Collection
Línea celular HCT-116 (ATCC® CCL247 TM)	American Tissue Collection
Línea celular HepG2 (ATCC® HB8065 TM)	American Tissue Collection
Línea celular HS-5 (ATCC® CRL11882 TM)	American Tissue Collection
Marcador de proteínas preteñidas PageRuler Plus	Fisher Scientific
Marcador rojo: Cell tracker TM Red CMTPIX Dye	Invitrogen TM
Marcador verde: Cell tracker TM Green CMFDA Dye	Invitrogen TM
Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)	Gibco TM
membranas de policarbonato Whatman Nuclepore de 200 nm	GE Healthcare Life Sciences
membranas de PVDF	GE Healthcare Life Sciences
Paclitaxel (PTX)	Sigma-Aldrich

Producto	Marca comercial
Penicilina-estreptomicina (P-S)	Sigma-Aldrich
Placas de 24 pocillos	Falcon
Producto	Marca comercial
Placas de 6 pocillos	Falcon
Placas μ -Dish 35 mm de fondo plano de vidrio alto	Ibidi
Pluronic® F-127	Sigma-Aldrich
Pregnenolona (P5)	Sigma-Aldrich
Rejillas de cobre recubiertas con Carbono/Formvar	Sigma-Aldrich
Ribonucleasa A	Sigma-Aldrich
Sal sódica de β -ciclodextrina sulfobutilada (SBE- β -CD) CY-2041.2	Cyclolab
Solución salina tampón fosfato (PBS)	Gibco™
Suero fetal bovino (FBS)	Gibco™
Suero fetal bovino sin exosomas (FBS)	Gibco™
Sustrato Super Signal™ West Pico Plus	Thermo Scientific™
Tampón Laemly 4x	Thermo Scientific™
Tampón RIPA	Sigma-Aldrich
Tetrametiletildiamina (TEMED)	Sigma-Aldrich
tripsina al 0.05 % EDTA 1x	Gibco™
Tris	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich
Yoduro de propidio (CYT-PIR-25)	Cytognos

Equipos

Equipo y modelo	Marca
Baño ultrasónico 1510	Branson
Bomba peristáltica Pumdrive PD 5201	Heidolph
Cabezal Mehrkanal Pumpenkopf C4 524-80420-00	Heidolph
Casete pequeño 524-90022-00	Heidolph
Centrífuga 5804	Eppendorf
ChemiDoc™ MP	Bio-Rad
Citómetro de flujo FACSCalibur	Becton-Dickinson
Congelador – 80 °C	
Cromatógrafo Agilent 7890 GC	
ES-20 Orbital Shaker-Incubator	Biosan, Letonia
Espectrofotómetro Avance Neo 400 MHz DRX	Bruker
Espectrofotómetro UV-1800	Shimadzu Scientific Instruments
Espectrofotómetro WEP-200-SY	Bruker
EZ Read 2000	Biochrom
Impresora 3D Witbox-1	BQ
Incubador 311	Thermo Electron Corporation
Microscopio de transmisión JEOL-1010	
Mini extrusora	Avanti Polar Lipids
Nanodrop Biodrop µLite	BioDrop µLite
Reómetro AR 1500	TA instrument
Rotor 70 Ti (ultracentrífuga)	Beckman Coulter
Ultracentrífuga Beckman Optima XL-100k	Beckman Coulter
Zetasizer Nano ZS90	Malvern Instruments

Anexo III

-

GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA

Glosario de abreviaturas y nomenclatura

Símbolo/abreviatura	Significado
% v/v	% en volumen / volumen
% w/v	% en peso / volumen
[]	Concentración
µm	Micrómetro
AAD	desviación absoluta promedio
ABS	Absorbancia
ADME	Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALT	alargamiento alternativo de telómeros
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
ARNt	ARN de transferencia
ATP	Adenosín Trifosfato
BCA	Ácido bicinónico
BSA	Albúmina sérica bovina
CAM	Moléculas de adhesión célula-célula
CCR	Cáncer colorrectal
CD	Ciclodextrina
CD:SUST	Ratio de moles de CD frente a sustancias hidrófobas
CDF	Complejo ciclodextrina farnesol
CDMH	Complejo de inclusión con molécula huesped
<i>CIMP</i>	<i>Neoplasia serrada o del fenotipo del metilador de la isla CpG</i>
<i>CIN</i>	<i>Inestabilidad cromosómica</i>
CPD-colina	Citidina 5'-difosfocolina
CS	Quitosano
CST	Temperatura crítica de la solución
CTP	Fosfocolina citidilil transferasa
D ₂ O	Agua deuterada
DDS	Sistemas de administración de fármacos
DF-PEG	Polietilenglicol funcionalizado con dialdehído

Símbolo/abreviatura	Significado
DLS	Dispersión Dinámica de Luz
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DMEM*	DMEM suplementado con 10 % de FBS libre de exosomas
DMEM ⁺	DMEM suplementado con 10% de FBS y 1% P-S
DMSO	Dimetilsulfóxido
E	Módulo de Young
<i>E, E- FOH</i>	Isómero <i>trans, trans</i> - farnesol
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
EGFR	Factor de crecimiento epidérmico
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
EMC	Matriz extracelular
EPR	Permeabilidad y Retención Aumentada
E_{vi}	Valor experimental de degradación para cada tiempo
Exo	Exosomas
Exo ^{HCT-116}	Exosomas procedentes de un cultivo de HCT-116
Exo ^{HS-5}	Exosomas procedentes de un cultivo de HS-5
Exo ^{PTX}	Exosomas cargados con PTX
Exo ^{PTX}	Exosomas cargados con FOH
FBS	Suero fetal bovino
FC	Fracción de las cadenas liberadas
FDA	Administración Federal de Medicamentos de EE. UU.
FOH	Farnesol
<i>FPP</i>	<i>Pirofosfato de farnesilo</i>
G'	Módulo de almacenamiento
G''	Módulo viscoso
G6PD	glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GCO	Observatorio Global del Cáncer
GG	Goma Gellan
GP	β -glicerofosfato
GRAS	Sustancias generalmente reconocidos como seguras
GSH	Glutación sulfhidrilo

Símbolo/abreviatura	Significado
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
IFP	Presión del líquido intersticial
INE	Instituto Nacional de Estadística
K	Constante de equilibrio ciclodextrina - fármaco
K'	Tasa de degradación de los geles
LDDS	Sistemas de administración local de fármacos
lncARN	ARN largos no codificantes
M	Molar
MH	Molécula Huésped
MDR	Resistencia a múltiples fármacos
MHz	Megahercios
miARN	Micro ARN
mm	Milímetros
mM	Milimolar
<i>MSI</i>	<i>Inestabilidad de microsatélites</i>
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)
MVBs	Cuerpos multivesiculares
MW	Peso molecular
n	Mol o moles
N	Parámetro N de los geles
n_s	Tamaño muestral
nm	Nanómetro
NP	Nanopartícula
NTA	Análisis de Rastreo de Nanopartículas
OI	Parámetro del orden de inhibición
OMS	Organización Mundial de la Salud
P	Parámetro P de los geles
P5	Pregnenolona
P53	Proteína supresora de tumores
PA	Ácido fosfatídico
Pa	Pascales

Símbolo/abreviatura	Significado
PBS	Tampón fosfato salino
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PEG	Polietilenglicol
PEG-PAEU	Poli(etilenglicol)-poli(β -aminoéster uretano)
PEO	Óxido de polietileno
PF-127	Pluronic® F-127/ polioxamer 127
PI	Fosfatidilinositoles
PNIPAM	Poli(N-isopropilacrilamida)
PNL	Programación no lineal
PPAR	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas
ppm	Partes por millón
PPO	Óxido de polipropileno
PPP	Ruta pentosa fosfato
PPRE	Elemento de Respuesta a PPA
PS	Fosfatidilserina
P-S	Penicilina-estreptomicina
PTX	Paclitaxel
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
rad	Radianes
RB	Proteína de la retinoblastoma
REDECAN	Red Española de Registros de Cáncer
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
s	Segundos
S/V	Relación superficie/volumen
SASP	Fenotipo secretor asociado a la senescencia
SBE- β -CD	Sulfobutileter- β -ciclodextrina
SBE- β -CD – FOH	Complejo de SBE- β -CD y FOH
SBE- β -CD – P5	Complejo de SBE- β -CD y P5
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio
SEOM	Sociedad Española de Oncología Médica

Símbolo/abreviatura	Significado
SFM	Sistema de fagocitos mononucleares
SPION	Nanopartícula superparamagnética de óxido de hierro
t	Tiempo
TBS	Tampón Tris salino
TBS-T	TBS con Tween20
TBS-T _L	TBS-T con 5% de leche desnatada
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TMS	Tetrametilsilano
T _{vi}	Valor teórico de degradación para cada tiempo
UV	Ultravioleta
V _c	Viabilidad celular
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
W	Masa
WB	Western Blot
WR	valor ponderado de los residuales
X ²	Valor de chi-cuadrado
Z, Z - FOH	<i>Cis, cis – farnesol</i>
ZP	Potencial zeta
δ	Desplazamientos químicos de protones en espectro de RMN
Δ	Variación
ΔG	Cambio de energía libre de Gibbs
ΔH	Cambio de entalpía
ΔS	Cambio de entropía
λ	Longitud de onda
μM	Micromolar

Anexo IV

-

REFERENCIAS

-
- [1] World Health Organization. (n.d.). Cancer. Organización Mundial de la Salud. Disponible en línea y visitada el 21 de enero de 2024
- [2] Sudhakar A. (2009). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of cancer science & therapy*, 1(2), 1–4
- [3] Cofre, J., & Abdelhay, E. (2017). Cancer Is to Embryology as Mutation Is to Genetics: Hypothesis of the Cancer as Embryological Phenomenon. *The Scientific World Journal*, 2017, 3578090
- [4] Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) (n.d.). Las cifras del cáncer en España 2022. Disponible en línea y visitada el 21 de enero de 2024
- [5] Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674
- [6] Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70
- [7] Hanahan D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31–46
- [8] Negrini, S., Gorgoulis, V. G., & Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(3), 220–228
- [9] Alemani, D., Pappalardo, F., Pennisi, M., Motta, S., & Brusici, V. (2012). Combining cellular automata and Lattice Boltzmann method to model multiscale avascular tumor growth coupled with nutrient diffusion and immune competition. *Journal of immunological methods*, 376(1-2), 55–68
- [10] Singh, N., Baby, D., Rajguru, J. P., Patil, P. B., Thakkannavar, S. S., & Pujari, V. B. (2019). Inflammation and cancer. *Annals of African medicine*, 18(3), 121–126
- [11] DeBerardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Science advances*, 2(5), e1600200
- [12] Helmkink, B. A., Khan, M. A. W., Hermann, A., Gopalakrishnan, V., & Wargo, J. A. (2019). The microbiome, cancer, and cancer therapy. *Nature medicine*, 25(3), 377–388
- [13] Nahta, R., Al-Mulla, F., Al-Temaimi, R., Amedei, A., Andrade-Vieira, R., Bay, S. N., Brown, D. G., Calaf, G. M., Castellino, R. C., Cohen-Solal, K. A., Colacci, A., Cruickshanks, N., Dent, P., Di Fiore, R., Forte, S., Goldberg, G. S., Hamid, R. A., Krishnan, H., Laird, D. W., Lasfar, A., ... Bisson, W. H. (2015). Mechanisms of environmental chemicals that enable the cancer hallmark of evasion of growth suppression. *Carcinogenesis*, 36 Suppl 1(Suppl 1), S2–S18
- [14] Dick, F. A., Goodrich, D. W., Sage, J., & Dyson, N. J. (2018). Non-canonical functions of the RB protein in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 18(7), 442–451
- [15] Macheret, M., & Halazonetis, T. D. (2015). DNA replication stress as a hallmark of cancer. *Annual review of pathology*, 10, 425–448
- [16] Blasco M. A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature reviews. Genetics*, 6(8), 611–622

- [17] Crivellato E. (2011). The role of angiogenic growth factors in organogenesis. *The International journal of developmental biology*, 55(4-5), 365–375
- [18] Berx, G., & van Roy, F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(6), a003129
- [19] Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit *International journal of molecular sciences* Cancer Cells?. *Trends in biochemical sciences*, 41(3), 211–218
- [20] Burns, J. S., & Manda, G. (2017). Metabolic Pathways of the Warburg Effect in Health and Disease: Perspectives of Choice, Chain or Chance. *International journal of molecular sciences*, 18(12), 2755
- [21] Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5930), 1029–1033
- [22] Gilboa E. (1999). How tumors escape immune destruction and what we can do about it. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, 48(7), 382–385
- [23] Street, K., Siegmund, K., & Shibata, D. (2023). Epigenetic Conservation Infers That Colorectal Cancer Progenitors Retain The Phenotypic Plasticity Of Normal Colon, *Research Square*
- [24] Wang, B., Kohli, J., & Demaria, M. (2020). Senescent Cells in Cancer Therapy: Friends or Foes? *Trends in cancer*, 6(10), 838–857
- [25] Hossain, M. S., Karuniawati, H., Jairoun, A. A., Urbi, Z., Ooi, J., John, A., Lim, Y. C., Kibria, K. M. K., Mohiuddin, A. K. M., Ming, L. C., Goh, K. W., & Hadi, M. A. (2022). Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers*, 14(7), 1732
- [26] Mori, G., & Pasca, M. R. (2021). Gut Microbial Signatures in Sporadic and Hereditary Colorectal Cancer. *International journal of molecular sciences*, 22(3), 1312
- [27] Fischer, J., Walker, L. C., Robinson, B. A., Frizelle, F. A., Church, J. M., & Eglinton, T. W. (2019). Clinical implications of the genetics of sporadic colorectal cancer. *ANZ journal of surgery*, 89(10), 1224–1229
- [28] Carethers, J. M., & Jung, B. H. (2015). Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 149(5), 1177–1190.e3
- [29] Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) (n.d.). Los avances en el cáncer colorrectal. Disponible en línea y visitada el 21 de enero de 2024
- [30] Gobierno de Reino Unido (n. d.) Estadísticas sobre la Quimioterapia, radioterapia y resección quirúrgica de tumores. Disponible en línea y visitada el 21 de enero de 2024
- [31] Contra el cáncer (n. d.) Todo sobre el cáncer. Disponible en línea y visitada el 21 de enero de 2024

- [32] Instituto Nacional del Cáncer (NCI) (n. d. -a.) Tratamiento en el cáncer. Disponible en línea y visitada el 21 de enero de 2024
- [33] Sociedad Americana del Cáncer (n.d.-a.) Tipos de tratamiento. Disponible en línea y visitada el 21 de enero de 2024
- [34] Instituto Nacional del Cáncer (NCI) (n. d. -a.) Tratamiento en el cáncer colorrectal. Disponible en línea y visitada el 21 de enero de 2024
- [35] Van Laethem J. L. (2001). Adjuvant treatment for colorectal cancer. *Acta gastro-enterologica Belgica*, 64(3), 263–267
- [36] Gulbake, A., Jain, A., Jain, A., Jain, A., & Jain, S. K. (2016). Insight to drug delivery aspects for colorectal cancer. *World journal of gastroenterology*, 22(2), 582–599
- [37] Yang, C., & Merlin, D. (2020). Lipid-Based Drug Delivery Nanoplatforms for Colorectal Cancer Therapy. *Nanomaterials* (Basel, Switzerland), 10(7), 1424
- [38] Zhang, L., Ma, L., & Zhou, Q. (2011). Overall and KRAS-specific results of combined cetuximab treatment and chemotherapy for metastatic colorectal cancer: a meta-analysis. *International journal of colorectal disease*, 26(8), 1025–1033
- [39] Alpaca, H. (2022). Biomarcadores plasmáticos:¿ nuevas pruebas no invasivas en el diagnóstico precoz de cáncer colorrectal?. *Horizonte Médico* (Lima), 22(3)
- [40] Wyld, L., Audisio, R. A., & Poston, G. J. (2015). The evolution of cancer surgery and future perspectives. *Nature reviews. Clinical oncology*, 12(2), 115–124
- [41] DeVita, V. T., Jr, & Chu, E. (2008). A history of cancer chemotherapy. *Cancer research*, 68(21), 8643–8653
- [42] Gupta, A., Kumar, B. S., & Negi, A. S. (2013). Current status on development of steroids as anticancer agents. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 137, 242–270
- [43] Cairns, R. A., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nature reviews. Cancer*, 11(2), 85–95
- [44] Deville Jr, C., Shukla, G., Rengan, R., & Thomas Jr, C. R. (2017). Historical Viewpoint. *The American Cancer Society's Principles of Oncology: Prevention to Survivorship*
- [45] Shirzadfar, H., & Khanahmadi, M. (2018). Current approaches and novel treatment methods for cancer and radiotherapy. *International Journal of Biosensors & Bioelectronics*, 4(5), 224–229
- [46] Kooshkaki, O., Derakhshani, A., Hosseinkhani, N., Torabi, M., Safaei, S., Brunetti, O., Racanelli, V., Silvestris, N., & Baradaran, B. (2020). Combination of Ipilimumab and Nivolumab in Cancers: From Clinical Practice to Ongoing Clinical Trials. *International journal of molecular sciences*, 21(12), 4427
- [47] Ribas A. (2012). Tumor immunotherapy directed at PD-1. *The New England journal of medicine*, 366(26), 2517–2519

- [48] Davis L. E. (2018). The evolution of biomarkers to guide the treatment of metastatic colorectal cancer. *The American journal of managed care*, 24(7 Suppl), S107–S117.
- [49] Cassidy, S., & Syed, B. A. (2017). Colorectal cancer drugs market. *Nature reviews. Drug discovery*, 16(8), 525–526
- [50] Instituto Nacional del Cáncer (NCI) (n. d. -a.) Fármacos aprobados en el cáncer colorrectal. Disponible en línea y visitada el 21 de enero de 2024
- [51] Kazazi-Hyseni, F., Beijnen, J. H., & Schellens, J. H. (2010). Bevacizumab. *The oncologist*, 15(8), 819–825
- [52] Syed Y. Y. (2020). Ramucirumab: A Review in Hepatocellular Carcinoma. *Drugs*, 80(3), 315–322
- [53] Giuliani, F., & Colucci, G. (2007). Cetuximab in colon cancer. *The International journal of biological markers*, 22(1 Suppl 4), S62–S70.
- [54] Wainberg, Z., & Hecht, J. R. (2006). Panitumumab in colon cancer: a review and summary of ongoing trials. *Expert opinion on biological therapy*, 6(11), 1229–1235
- [55] Saad, P., & Kasi, A. (2020). Ipilimumab. *StatPearls Publishing*.
- [56] Gunturi, A., & McDermott, D. F. (2015). Nivolumab for the treatment of cancer. *Expert opinion on investigational drugs*, 24(2), 253–260
- [57] Kanani, A., Veen, T., & Sørdeide, K. (2021). Neoadjuvant immunotherapy in primary and metastatic colorectal cancer. *The British journal of surgery*, 108(12), 1417–1425
- [58] Othman, M. H., Zayed, G. M., Ali, U. F., & Abdellatif, A. A. H. (2020). Colon-specific tablets containing 5-fluorouracil microsponges for colon cancer targeting. *Drug development and industrial pharmacy*, 46(12), 2081–2088
- [59] Chen, R., Zhai, R., Wang, C., Liang, S., Wang, J., Liu, Z., & Li, W. (2022). Compound Capecitabine Colon-Targeted Microparticle Prepared by Coaxial Electrospray for Treatment of Colon Tumors. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(17), 5690
- [60] Bailly C. (2019). Irinotecan: 25 years of cancer treatment. *Pharmacological research*, 148, 10439
- [61] Hegde, V. S., & Nagalli, S. (2023). Leucovorin. *StatPearls Publishing*.
- [62] Mani, S., Graham, M. A., Bregman, D. B., Ivy, P., & Chaney, S. G. (2002). Oxaliplatin: a review of evolving concepts. *Cancer investigation*, 20(2), 246–263
- [63] Doleschel, D., Hoff, S., Koletnik, S., Rix, A., Zopf, D., Kiessling, F., & Lederle, W. (2021). Regorafenib enhances anti-PD1 immunotherapy efficacy in murine colorectal cancers and their combination prevents tumor regrowth. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, 40(1), 288
- [64] Burness, C. B., & Duggan, S. T. (2016). Trifluridine/Tipiracil: A Review in Metastatic Colorectal Cancer. *Drugs*, 76(14), 1393–1402
- [65] Lee, A. (2020). Tucatinib: First Approval. *Drugs*, 80(10), 1033–1038

- [66] Saif, M. W., Relias, V., Syrigos, K., & Gunturu, K. S. (2014). Incidence and management of Ziv-aflibercept related toxicities in colorectal cancer. *World Journal of Clinical Oncology*, 5(5), 1028–1035
- [67] André, T., Meyerhardt, J., Iveson, T., Sobrero, A., Yoshino, T., Souglakos, I., Grothey, A., Niedzwiecki, D., Saunders, M., Labianca, R., Yamanaka, T., Boukovinas, I., Vernerey, D., Meyers, J., Harkin, A., Torri, V., Oki, E., Georgoulas, V., Taieb, J., Shields, A., ... Shi, Q. (2020). Effect of duration of adjuvant chemotherapy for patients with stage III colon cancer (IDEA collaboration): final results from a prospective, pooled analysis of six randomised, phase 3 trials. *The Lancet. Oncology*, 21(12), 1620–1629
- [68] Haller, D. G., Tabernero, J., Maroun, J., De Braud, F., Price, T., Van Cutsem, E., Hill, M., Gilberg, F., Rittweger, K., & Schmoll, H. J. (2011). Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 29(11), 1465–1471
- [69] Dang, Y., & Guan, J. (2020). Nanoparticle-based drug delivery systems for cancer therapy. *Smart materials in medicine*, 1, 10–19
- [70] Park, H., Otte, A., & Park, K. (2022). Evolution of drug delivery systems: From 1950 to 2020 and beyond. *Journal of Controlled Release*, 342, 53–65
- [71] Singh, N. B., Hasan Susan, Md. A. B., & Chaudhary, R. J. Emerging Nanomaterials and Their Impact on Society in the 21st Century. *Materials Research Foundations*, 135
- [72] Van der Meel, R., Sulheim, E., Shi, Y., Kiessling, F., Mulder, W. J. M., & Lammers, T. (2019). Smart cancer nanomedicine. *Nature nanotechnology*, 14(11), 1007–1017
- [73] Rodríguez, F., Caruana, P., De la Fuente, N., Español, P., Gámez, M., Balart, J., Llubra, E., Rovira, R., Ruiz, R., Martín-Lorente, C., Corchero, J. L., & Céspedes, M. V. (2022). Nano-Based Approved Pharmaceuticals for Cancer Treatment: Present and Future Challenges. *Biomolecules*, 12(6), 784
- [74] Bobo, D., Robinson, K. J., Islam, J., Thurecht, K. J., & Corrie, S. R. (2016). Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharmaceutical research*, 33(10), 2373–2387
- [75] Roy, R., Tiwari, S. P., Yadav, R., & Sharma, S. (2023). Role Of Nanoparticles In Colorectal Cancer. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, 2029-2032
- [76] Vinchhi, P., & Patel, M. M. (2021). Triumph against cancer: invading colorectal cancer with nanotechnology. *Expert opinion on drug delivery*, 18(9), 1169–1192
- [77] Brar, B., Ranjan, K., Palria, A., Kumar, R., Ghosh, M., Sihag, S., & Minakshi, P. (2021). Nanotechnology in colorectal cancer for precision diagnosis and therapy. *Frontiers in Nanotechnology*, 3, 699266

- [78] Donahue, N. D., Acar, H., & Wilhelm, S. (2019). Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. *Advanced drug delivery reviews*, 143, 68–96
- [79] Modena, M. M., Rühle, B., Burg, T. P., & Wuttke, S. (2019). Nanoparticle Characterization: What to Measure? *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 31(32), e1901556
- [80] Mohanraj, V. J., & Chen, Y. (2006). Nanoparticles-a review. *Tropical journal of pharmaceutical research*, 5(1), 561-573
- [81] Danhier, F., Feron, O., & Préat, V. (2010). To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 148(2), 135–146
- [82] Heinz, H., Pramanik, C., Heinz, O., Ding, Y., Mishra, R. K., Marchon, D., Flatt, R. J., Estrela-Lopis, I., Llop, J., Moya, S., & Ziolo, R. F. (2017). Nanoparticle decoration with surfactants: molecular interactions, assembly, and applications. *Surface Science Reports*, 72(1), 1-58
- [83] Sun, T., Zhang, Y. S., Pang, B., Hyun, D. C., Yang, M., & Xia, Y. (2014). Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 53(46), 12320–12364
- [84] Gao, Y., Gu, S., Zhang, Y., Xie, X., Yu, T., Lu, Y., Zhu, Y., Chen, W., Zhang, H., Dong, H., Sinko, P. J., & Jia, L. (2016). The Architecture and Function of Monoclonal Antibody-Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles Loaded with Mifepristone: Repurposing Abortifacient for Cancer Metastatic Chemoprevention. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 12(19), 2595–2608
- [85] Hossen, S., Hossain, M. K., Basher, M. K., Mia, M. N. H., Rahman, M. T., & Uddin, M. J. (2018). Smart nanocarrier-based drug delivery systems for cancer therapy and toxicity studies: A review. *Journal of advanced research*, 15, 1–18
- [86] Jeena, M. T., Jin, S., Jeong, K., Cho, Y., Kim, J. C., Lee, J. H., ... & Ryu, J. H. (2022). Cancer-Selective Supramolecular Chemotherapy by Disassembly-Assembly Approach. *Advanced Functional Materials*, 32(52), 2208098
- [87] Bansal, A., & Simon, M. C. (2018). Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. *The Journal of cell biology*, 217(7), 2291–2298
- [88] Wells, C. M., Harris, M., Choi, L., Murali, V. P., Guerra, F. D., & Jennings, J. A. (2019). Stimuli-Responsive Drug Release from Smart Polymers. *Journal of functional biomaterials*, 10(3), 34
- [89] Lacovino, R., V Caso, J., Di Donato, C., Malgieri, G., Palmieri, M., Russo, L., & Isernia, C. (2017). Cyclodextrins as complexing agents: preparation and applications. *Current Organic Chemistry*, 21(2), 162-176

- [90] Buvári-Barcza, Á., Rohonczy, J., Rozlosnik, N., Gilányi, T., Szabó, B., Lovas, G., ... & Barcza, L. (2001). Aqueous solubilization of [60] fullerene via inclusion complex formation and the hydration of C 60. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (2), 191-196
- [91] Wüpper, S., Lüersen, K., & Rimbach, G. (2021). Cyclodextrins, Natural Compounds, and Plant Bioactives-A Nutritional Perspective. *Biomolecules*, 11(3), 401
- [92] Khan, K. U., Minhas, M. U., Badshah, S. F., Suhail, M., Ahmad, A., & Ijaz, S. (2022). Overview of nanoparticulate strategies for solubility enhancement of poorly soluble drugs. *Life sciences*, 291, 120301
- [93] Qiu, L., Liu, J., Alessandri, R., Qiu, X., Koopmans, M., Havenith, R. W., ... & Hummelen, J. C. (2017). Enhancing doping efficiency by improving host-dopant miscibility for fullerene-based n-type thermoelectrics. *Journal of Materials Chemistry A*, 5(40), 21234-21241
- [94] Silva, J. C., de Moraes Alcantara, L. F., Dias Soares, J. M., e Silva, M. G., de Lator, É. M., Andrade, V. M., dos Passos Menezes, P., de Souza Araújo, A. A., Leite, L. H. I., de Menezes, I. R. A., Scotti, L., Scotti, M. T., Oliveira, R. C. M., Quintans, J. S. S., Silva Almeida, J. R. G., & Quintans-Júnior, L. J. (2017). Docking, characterization and investigation of β -cyclodextrin complexed with farnesol, an acyclic sesquiterpene alcohol, produces orofacial antinociceptive profile in experimental protocols. *Process Biochemistry*, 62, 193–204
- [95] Loftsson, T., Másson, M., & Brewster, M. E. (2004). Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *Journal of pharmaceutical sciences*, 93(5), 1091–1099
- [96] Păduraru, D. N., Niculescu, A. G., Bolocan, A., Andronic, O., Grumezescu, A. M., & Bîrlă, R. (2022). An Updated Overview of Cyclodextrin-Based Drug Delivery Systems for Cancer Therapy. *Pharmaceutics*, 14(8), 1748
- [97] Zhang, D., Lv, P., Zhou, C., Zhao, Y., Liao, X., & Yang, B. (2019). Cyclodextrin-based delivery systems for cancer treatment. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 96, 872–886
- [98] Yang, B., Yang, L. J., Lin, J., Chen, Y., & Liu, Y. (2009). Binding behaviors of scutellarin with α -, β -, γ -cyclodextrins and their derivatives. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 64, 149-155
- [99] Guo, Y., Li, J., Liu, Y., Ma, Y., Cheng, H., Yang, B., Liu, D., & Yang, R. (2016). Inclusion complexes of anhydrolycorine with cyclodextrins: preparation, characterization, and anticancer activity. *Canadian Journal of Chemistry*, 94(6), 575-582
- [100] Xiao, C. F., Li, K., Huang, R., He, G. J., Zhang, J. Q., Zhu, L., Yang, Q. Y., Jiang, K. M., Jin, Y., & Lin, J. (2014). Investigation of inclusion complex of epothilone A with cyclodextrins. *Carbohydrate polymers*, 102, 297–305

- [101] Abdur Rouf, M., Vural, I., Bilensoy, E., Hincal, A., & Erol, D. D. (2011). Rapamycin-cyclodextrin complexation: improved solubility and dissolution rate. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 70, 167-175
- [102] Murugan, M., Sivakumar, K., & Rajamohan, R. (2016). A study of host-guest complexation between amodiaquine and native cyclodextrin. Characterization in solid state and its in-vitro anticancer activity. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 53(5), 282-289
- [103] Oliveri, V., Bellia, F., Viale, M., Maric, I., & Vecchio, G. (2017). Linear polymers of β and γ cyclodextrins with a polyglutamic acid backbone as carriers for doxorubicin. *Carbohydrate polymers*, 177, 355–360
- [104] Zhang, L., Man, S., Qiu, H., Liu, Z., Zhang, M., Ma, L., & Gao, W. (2016). Curcumin-cyclodextrin complexes enhanced the anti-cancer effects of curcumin. *Environmental toxicology and pharmacology*, 48, 31–38
- [105] Alcaro, S., Ventura, C. A., Paolino, D., Battaglia, D., Ortuso, F., Cattel, L., Puglisi, G., & Fresta, M. (2002). Preparation, characterization, molecular modeling and in vitro activity of paclitaxel-cyclodextrin complexes. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 12(12), 1637–1641
- [106] Wilhelm, S., Tavares, A. J., Dai, Q., Ohta, S., Audet, J., Dvorak, H. F., & Chan, W. C. (2016). Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature reviews materials*, 1(5), 1-12
- [107] Dobrovolskaia, M. A., Aggarwal, P., Hall, J. B., & McNeil, S. E. (2008). Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. *Molecular pharmaceutics*, 5(4), 487–495
- [108] Arrighetti, N., Corbo, C., Evangelopoulos, M., Pastò, A., Zuco, V., & Tasciotti, E. (2019). Exosome-like Nanovectors for Drug Delivery in Cancer. *Current medicinal chemistry*, 26(33), 6132–6148
- [109] Burger, D., Schock, S., Thompson, C. S., Montezano, A. C., Hakim, A. M., & Touyz, R. M. (2013). Microparticles: biomarkers and beyond. *Clinical science (London, England : 1979)*, 124(7), 423–441
- [110] Chen, B., Li, Q., Zhao, B., & Wang, Y. (2017). Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles as a Novel Potential Therapeutic Tool for Tissue Repair. *Stem cells translational medicine*, 6(9), 1753–1758
- [111] Liao, W., Du, Y., Zhang, C., Pan, F., Yao, Y., Zhang, T., & Peng, Q. (2019). Exosomes: The next generation of endogenous nanomaterials for advanced drug delivery and therapy. *Acta biomaterialia*, 86, 1–14
- [112] Pegtel, D. M., & Gould, S. J. (2019). Exosomes. *Annual review of biochemistry*, 88, 487–514
- [113] Zhou, X., Xie, F., Wang, L., Zhang, L., Zhang, S., Fang, M., & Zhou, F. (2020). The function and clinical application of extracellular vesicles in innate immune regulation. *Cellular & molecular immunology*, 17(4), 323–334

- [114] Cossetti, C., Iraci, N., Mercer, T. R., Leonardi, T., Alpi, E., Drago, D., Alfaro-Cervello, C., Saini, H. K., Davis, M. P., Schaeffer, J., Vega, B., Stefanini, M., Zhao, C., Muller, W., Garcia-Verdugo, J. M., Mathivanan, S., Bachi, A., Enright, A. J., Mattick, J. S., & Pluchino, S. (2014). Extracellular vesicles from neural stem cells transfer IFN- γ via Ifngr1 to activate Stat1 signaling in target cells. *Molecular cell*, 56(2), 193–204
- [115] Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science (New York, N.Y.)*, 367(6478), eaau6977
- [116] Sokolova, V., Ludwig, A. K., Hornung, S., Rotan, O., Horn, P. A., Epple, M., & Giebel, B. (2011). Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 87(1), 146–150
- [117] Shao, J., Zaro, J., & Shen, Y. (2020). Advances in Exosome-Based Drug Delivery and Tumor Targeting: From Tissue Distribution to Intracellular Fate. *International journal of nanomedicine*, 15, 9355–9371
- [118] Gilligan, K. E., & Dwyer, R. M. (2017). Engineering Exosomes for Cancer Therapy. *International journal of molecular sciences*, 18(6), 1122
- [119] Kim, M. S., Haney, M. J., Zhao, Y., Mahajan, V., Deygen, I., Klyachko, N. L., Inskoe, E., Piroyan, A., Sokolsky, M., Okolie, O., Hingtgen, S. D., Kabanov, A. V., & Batrakova, E. V. (2016). Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*, 12(3), 655–664
- [120] Dai, S., Wei, D., Wu, Z., Zhou, X., Wei, X., Huang, H., & Li, G. (2008). Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 16(4), 782–790
- [121] Escudier, B., Dorval, T., Chaput, N., André, F., Caby, M. P., Novault, S., Flament, C., Leboulaire, C., Borg, C., Amigorena, S., Boccaccio, C., Bonnerot, C., Dhellin, O., Movassagh, M., Piperno, S., Robert, C., Serra, V., Valente, N., Le Pecq, J. B., Spatz, A., Lantz, O., Tursz, T., Angevin, E., Zitvogel, L. (2005). Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *Journal of translational medicine*, 3(1), 10
- [122] Morse, M. A., Garst, J., Osada, T., Khan, S., Hobeika, A., Clay, T. M., Valente, N., Shreeniwas, R., Sutton, M. A., Delcayre, A., Hsu, D. H., Le Pecq, J. B., & Lyerly, H. K. (2005). A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Journal of translational medicine*, 3(1), 9
- [123] Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., & Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nature medicine*, 4(5), 594–600

- [124] André, F., Chaput, N., Scharzt, N. E., Flament, C., Aubert, N., Bernard, J., Lemonnier, F., Raposo, G., Escudier, B., Hsu, D. H., Tursz, T., Amigorena, S., Angevin, E., & Zitvogel, L. (2004). Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. I. Dendritic cell-derived exosomes transfer functional MHC class I/peptide complexes to dendritic cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 172(4), 2126–2136
- [125] Chaput, N., Scharzt, N. E., André, F., Taïeb, J., Novault, S., Bonnaventure, P., Aubert, N., Bernard, J., Lemonnier, F., Merad, M., Adema, G., Adams, M., Ferrantini, M., Carpentier, A. F., Escudier, B., Tursz, T., Angevin, E., & Zitvogel, L. (2004). Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. II. Exosomes in CpG adjuvants efficiently prime naive Tc1 lymphocytes leading to tumor rejection. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 172(4), 2137–2146
- [126] Viaud, S., Terme, M., Flament, C., Taieb, J., André, F., Novault, S., Escudier, B., Robert, C., Caillat-Zucman, S., Tursz, T., Zitvogel, L., & Chaput, N. (2009). Dendritic cell-derived exosomes promote natural killer cell activation and proliferation: a role for NKG2D ligands and IL-15Ralpha. *PLoS one*, 4(3), e4942
- [127] Romagnoli, G. G., Zelante, B. B., Toniolo, P. A., Migliori, I. K., & Barbuti, J. A. (2015). Dendritic Cell-Derived Exosomes may be a Tool for Cancer Immunotherapy by Converting Tumor Cells into Immunogenic Targets. *Frontiers in immunology*, 5, 692
- [128] Yang, T., Martin, P., Fogarty, B., Brown, A., Schurman, K., Phipps, R., Yin, V. P., Lockman, P., & Bai, S. (2015). Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in Danio rerio. *Pharmaceutical research*, 32(6), 2003–2014
- [129] Rafael, D., Melendres, M. M. R., Andrade, F., Montero, S., Martínez-Trucharte, F., Vilar-Hernandez, M., Durán-Lara, E. F., Schwartz, S., Jr, & Abasolo, I. (2021). Thermo-responsive hydrogels for cancer local therapy: Challenges and state-of-art. *International journal of pharmaceuticals*, 606, 120954
- [130] Kesharwani, P., Bisht, A., Alexander, A., Dave, V., & Sharma, S. (2021). Biomedical applications of hydrogels in drug delivery system: An update. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 66, 102914
- [131] Xiao, Y., Gu, Y., Qin, L., Chen, L., Chen, X., Cui, W., Li, F., Xiang, N., & He, X. (2021). Injectable thermosensitive hydrogel-based drug delivery system for local cancer therapy. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 200, 111581
- [132] Mohammadi, M., Karimi, M., Malaekheh-Nikouei, B., Torkashvand, M., & Alibolandi, M. (2022). Hybrid in situ- forming injectable hydrogels for local cancer therapy. *International journal of pharmaceuticals*, 616, 121534

- [133] Chen, Y. C., Gad, S. F., Chobisa, D., Li, Y., & Yeo, Y. (2021). Local drug delivery systems for inflammatory diseases: Status quo, challenges, and opportunities. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 330, 438–460
- [134] Mohanty, D., Bakshi, V., Simharaju, N., Haque, M. A., & Sahoo, C. K. (2018). A review on in situ gel: a novel drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 50(1), 175-181
- [135] Li, P., Hou, X., Qu, L., Dai, X., & Zhang, C. (2018). PNIPAM-MAPOSS Hybrid Hydrogels with Excellent Swelling Behavior and Enhanced Mechanical Performance: Preparation and Drug Release of 5-Fluorouracil. *Polymers*, 10(2), 137
- [136] Liu, M., Song, X., Wen, Y., Zhu, J. L., & Li, J. (2017). Injectable Thermoresponsive Hydrogel Formed by Alginate-g-Poly(N-isopropylacrylamide) That Releases Doxorubicin-Encapsulated Micelles as a Smart Drug Delivery System. *ACS applied materials & interfaces*, 9(41), 35673–35682
- [137] Gil, M. S., Thambi, T., Phan, V. H. G., Kim, S. H., & Lee, D. S. (2017). Injectable hydrogel-incorporated cancer cell-specific cisplatin releasing nanogels for targeted drug delivery. *Journal of materials chemistry. B*, 5(34), 7140–7152
- [138] Wu, Z., Zou, X., Yang, L., Lin, S., Fan, J., Yang, B., Sun, X., Wan, Q., Chen, Y., & Fu, S. (2014). Thermosensitive hydrogel used in dual drug delivery system with paclitaxel-loaded micelles for in situ treatment of lung cancer. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 122, 90–98
- [139] Kitaeva, K. V., Rutland, C. S., Rizvanov, A. A., & Solovyeva, V. V. (2020). Cell Culture Based *in vitro* Test Systems for Anticancer Drug Screening. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 322
- [140] Guillaume, L., Rigal, L., Fehrenbach, J., Severac, C., Ducommun, B., & Lobjois, V. (2019). Characterization of the physical properties of tumor-derived spheroids reveals critical insights for pre-clinical studies. *Scientific reports*, 9(1), 6597
- [141] Liu, H., Wang, N., Zhang, Z., Wang, H., Du, J., & Tang, J. (2017). Effects of Tumor Necrosis Factor- α on Morphology and Mechanical Properties of HCT116 Human Colon Cancer Cells Investigated by Atomic Force Microscopy. *Scanning*, 2017, 2027079
- [142] Rodríguez-Nieto, M., Mendoza-Flores, P., García-Ortiz, D., Montes-de-Oca, L. M., Mendoza-Villa, M., Barrón-González, P., Espinosa, G., & Menchaca, J. L. (2020). Viscoelastic properties of doxorubicin-treated HT-29 cancer cells by atomic force microscopy: the fractional Zener model as an optimal viscoelastic model for cells. *Biomechanics and modeling in mechanobiology*, 19(3), 801–813
- [143] Quan, F. S., & Kim, K. S. (2016). Medical applications of the intrinsic mechanical properties of single cells. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 48(10), 865–871

- [144] Kwon, S., Yang, W., Moon, D., & Kim, K. S. (2020). Comparison of Cancer Cell Elasticity by Cell Type. *Journal of Cancer*, 11(18), 5403–5412
- [145] Pachenari, M., Seyedpour, S. M., Janmaleki, M., Babazadeh Shayan, S., Taranejoo, S., & Hosseinkhani, H. (2014). Mechanical properties of cancer cytoskeleton depend on actin filaments to microtubules content: investigating different grades of colon cancer cell lines. *Journal of biomechanics*, 47(2), 373–379.
- [146] Hartono, D., Liu, Y., Tan, P. L., Then, X. Y., Yung, L. Y., & Lim, K. M. (2011). On-chip measurements of cell compressibility via acoustic radiation. *Lab on a chip*, 11(23), 4072–4080
- [147] Amado, J. A., & Flórez, J. (2003). Hormonas sexuales: estrógenos, gestágenos, andrógenos y anticonceptivos hormonales. *Farmacología humana*, 887-911
- [148] Bermudez, J. A., Doerr, P., & Lipsett, M. B. (1970). Measurement of pregnenolone in blood. *Steroids*, 16(5), 505–515
- [149] Yoshida, S., Honda, A., Matsuzaki, Y., Fukushima, S., Tanaka, N., Takagiwa, A., Fujimoto, Y., Miyazaki, H., & Salen, G. (2003). Anti-proliferative action of endogenous dehydroepiandrosterone metabolites on human cancer cell lines. *Steroids*, 68(1), 73–83
- [150] Xiao, X., Chen, L., Ouyang, Y., Zhu, W., Qiu, P., Su, X., Dou, Y., Tang, L., Yan, M., Zhang, H., Yang, X., Xu, D., & Yan, G. (2014). Pregnenolone, a cholesterol metabolite, induces glioma cell apoptosis via activating extrinsic and intrinsic apoptotic pathways. *Oncology letters*, 8(2), 645–650
- [151] Qujeq D. (2002). Development of a quantitative assay method for 3 beta-hydroxy-delta 5-steroid dehydrogenase in the rat testis. *Steroids*, 67(13-14), 1071–1077
- [152] Jung, Y. Y., Hwang, S. T., Sethi, G., Fan, L., Arfuso, F., & Ahn, K. S. (2018). Potential Anti-Inflammatory and Anti-Cancer Properties of Farnesol. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(11), 2827
- [153] De Loof, A., & Schoofs, L. (2019). Mode of Action of Farnesol, the "Noble Unknown" in Particular in Ca²⁺ Homeostasis, and Its Juvenile Hormone-Esters in Evolutionary Retrospect. *Frontiers in neuroscience*, 13, 141.
- [154] Horev, B., Klein, M. I., Hwang, G., Li, Y., Kim, D., Koo, H., & Benoit, D. S. (2015). pH-activated nanoparticles for controlled topical delivery of farnesol to disrupt oral biofilm virulence. *ACS nano*, 9(3), 2390–2404
- [155] Rioja, A., Pizzey, A. R., Marson, C. M., & Thomas, N. S. (2000). Preferential induction of apoptosis of leukaemic cells by farnesol. *FEBS letters*, 467(2-3), 291–295
- [156] Singh, S., Anand, A., & Srivastava, P. K. (2012). Regulation and properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase: A review. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 4(1), 1-19

- [157] Marks, P. A., & Banks, J. (1960). Inhibition of mammalian Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase by steroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 46(4), 447–452
- [158] Barajas, J. M., Reyes, R., Guerrero, M. J., Jacob, S. T., Motiwala, T., & Ghoshal, K. (2018). The role of miR-122 in the dysregulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) expression in hepatocellular cancer. *Scientific reports*, 8(1), 9105
- [159] Cocco P. (1987). Does G6PD deficiency protect against cancer? A critical review. *Journal of epidemiology and community health*, 41(2), 89–93
- [160] Grigoryev, D. N., Long, B. J., Njar, V. C., & Brodie, A. H. (2000). Pregnenolone stimulates LNCaP prostate cancer cell growth via the mutated androgen receptor. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 75(1), 1–10
- [161] Adany, I., Yazlovitskaya, E. M., Haug, J. S., Voziyan, P. A., & Melnykovich, G. (1994). Differences in sensitivity to farnesol toxicity between neoplastically- and non-neoplastically-derived cells in culture. *Cancer letters*, 79(2), 175–179
- [162] Yazlovitskaya, E. M., & Melnykovich, G. (1995). Selective farnesol toxicity and translocation of protein kinase C in neoplastic HeLa-S3K and non-neoplastic CF-3 cells. *Cancer letters*, 88(2), 179–183
- [163] de Araújo Delmondes, G., Bezerra, D. S., de Queiroz Dias, D., de Souza Borges, A., Araújo, I. M., Lins da Cunha, G., Bandeira, P. F. R., Barbosa, R., Melo Coutinho, H. D., Felipe, C. F. B., Barbosa-Filho, J. M., Alencar de Menezes, I. R., & Kerntopf, M. R. (2019). Toxicological and pharmacologic effects of farnesol (C₁₅H₂₆O): A descriptive systematic review. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 129, 169–200
- [164] Joo, J. H., & Jetten, A. M. (2010). Molecular mechanisms involved in farnesol-induced apoptosis. *Cancer letters*, 287(2), 123–135
- [165] Voziyan, P. A., Goldner, C. M., & Melnykovich, G. (1993). Farnesol inhibits phosphatidylcholine biosynthesis in cultured cells by decreasing cholinephosphotransferase activity. *The Biochemical journal*, 295 (Pt 3), 757–762.
- [166] McAnally, J. A., Jung, M., & Mo, H. (2003). Farnesyl-O-acetylhydroquinone and geranyl-O-acetylhydroquinone suppress the proliferation of murine B16 melanoma cells, human prostate and colon adenocarcinoma cells, human lung carcinoma cells, and human leukemia cells. *Cancer letters*, 202(2), 181–192.
- [167] Burke, Y. D., Stark, M. J., Roach, S. L., Sen, S. E., & Crowell, P. L. (1997). Inhibition of pancreatic cancer growth by the dietary isoprenoids farnesol and geraniol. *Lipids*, 32(2), 151–156

- [168] Wiseman, D. A., Werner, S. R., & Crowell, P. L. (2007). Cell cycle arrest by the isoprenoids perillyl alcohol, geraniol, and farnesol is mediated by p21(Cip1) and p27(Kip1) in human pancreatic adenocarcinoma cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 320(3), 1163–1170
- [169] Miquel, K., Pradines, A., Tercé, F., Selmi, S., & Favre, G. (1998). Competitive inhibition of choline phosphotransferase by geranylgeraniol and farnesol inhibits phosphatidylcholine synthesis and induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells. *The Journal of biological chemistry*, 273(40), 26179–26186
- [170] Joo, J. H., Liao, G., Collins, J. B., Grissom, S. F., & Jetten, A. M. (2007). Farnesol-induced apoptosis in human lung carcinoma cells is coupled to the endoplasmic reticulum stress response. *Cancer research*, 67(16), 7929–7936
- [171] Joo, J. H., Ueda, E., Bortner, C. D., Yang, X. P., Liao, G., & Jetten, A. M. (2015). Farnesol activates the intrinsic pathway of apoptosis and the ATF4-ATF3-CHOP cascade of ER stress in human T lymphoblastic leukemia Molt4 cells. *Biochemical pharmacology*, 97(3), 256–268
- [172] Ong, T. P., Heidor, R., de Conti, A., Dagli, M. L., & Moreno, F. S. (2006). Farnesol and geraniol chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve similar actions on cell proliferation and DNA damage, but distinct actions on apoptosis, plasma cholesterol and HMGCoA reductase. *Carcinogenesis*, 27(6), 1194–1203
- [173] Duncan, R. E., & Archer, M. C. (2006). Farnesol induces thyroid hormone receptor (THR) beta1 but inhibits THR-mediated signaling in MCF-7 human breast cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 343(1), 239–243
- [174] Scheper, M. A., Shirtliff, M. E., Meiller, T. F., Peters, B. M., & Jabra-Rizk, M. A. (2008). Farnesol, a fungal quorum-sensing molecule triggers apoptosis in human oral squamous carcinoma cells. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 10(9), 954–963
- [175] Pfister, C., Pfrommer, H., Tatagiba, M. S., & Roser, F. (2013). Detection and quantification of farnesol-induced apoptosis in difficult primary cell cultures by TaqMan protein assay. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 18(4), 452–466
- [176] Lee, J. H., Kim, C., Kim, S. H., Sethi, G., & Ahn, K. S. (2015). Farnesol inhibits tumor growth and enhances the anticancer effects of bortezomib in multiple myeloma xenograft mouse model through the modulation of STAT3 signaling pathway. *Cancer letters*, 360(2), 280–293
- [177] Epplen, R., Stöckle, M., Engelmann, U., Heidenreich, A., & Ohlmann, C. H. (2011). Differential effects of ibandronate, docetaxel and farnesol treatment alone and in combination on the growth of prostate cancer cell lines. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*, 50(1), 127–133

- [178] Park, J. S., Kwon, J. K., Kim, H. R., Kim, H. J., Kim, B. S., & Jung, J. Y. (2014). Farnesol induces apoptosis of DU145 prostate cancer cells through the PI3K/Akt and MAPK pathways. *International journal of molecular medicine*, 33(5), 1169–1176
- [179] Wang, Y. L., Liu, H. F., Shi, X. J., & Wang, Y. (2018). Antiproliferative activity of Farnesol in HeLa cervical cancer cells is mediated via apoptosis induction, loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and PI3K/Akt signalling pathway. *Journal of B.U.ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology*, 23(3), 752–757
- [180] Miquel, K., Pradines, A., & Favre, G. (1996). Farnesol and geranylgeraniol induce actin cytoskeleton disorganization and apoptosis in A549 lung adenocarcinoma cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 225(3), 869–876
- [181] Nickerson, K. W., Atkin, A. L., & Hornby, J. M. (2006). Quorum sensing in dimorphic fungi: farnesol and beyond. *Applied and environmental microbiology*, 72(6), 3805–3813
- [182] Cao, Q., Garib, V., Yu, Q., Connell, D. W., & Campitelli, M. (2009). Quantitative structure-property relationships (QSPR) for steroidal compounds of environmental importance. *Chemosphere*, 76(4), 453–459
- [183] Eckerle, S., Ringler, M., Lecaudey, V., Nitschke, R., & Driever, W. (2018). Progesterone modulates microtubule dynamics and epiboly progression during zebrafish gastrulation. *Developmental biology*, 434(2), 249–266
- [184] Marreto, R. N., Almeida, E. E., Alves, P. B., Niculau, E. S., Nunes, R. S., Matos, C. R., & Araújo, A. A. (2008). Thermal analysis and gas chromatography coupled mass spectrometry analyses of hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex containing *Lippia gracilis* essential oil. *Thermochimica Acta*, 475(1-2), 53-58
- [185] Mourtzinos, I., Kalogeropoulos, N., Papadakis, S. E., Konstantinou, K., & Karathanos, V. T. (2008). Encapsulation of nutraceutical monoterpenes in beta-cyclodextrin and modified starch. *Journal of food science*, 73(1), S89–S94.
- [186] Waleczek, K. J., Marques, H. M., Hempel, B., & Schmidt, P. C. (2003). Phase solubility studies of pure (-)-alpha-bisabolol and camomile essential oil with beta-cyclodextrin. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e. V*, 55(2), 247–251
- [187] Lockwood, S. F., O'Malley, S., & Mosher, G. L. (2003). Improved aqueous solubility of crystalline astaxanthin (3,3'-dihydroxy-beta, beta-carotene-4,4'-dione) by Captisol (sulfobutyl ether beta-cyclodextrin). *Journal of pharmaceutical sciences*, 92(4), 922–926
- [188] Quintans, J. de S., Menezes, P. P., Santos, M. R., Bonjardim, L. R., Almeida, J. R., Gelain, D. P., Araújo, A. A., & Quintans-Júnior, L. J. (2013). Improvement of p-cymene antinociceptive and

- anti-inflammatory effects by inclusion in β -cyclodextrin. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 20(5), 436–440
- [189] Zoetemelk, M., Rausch, M., Colin, D. J., Dormond, O., & Nowak-Sliwinska, P. (2019). Short-term 3D culture systems of various complexity for treatment optimization of colorectal carcinoma. *Scientific reports*, 9(1), 7103
- [190] Padberg, F., Hering, H., Luch, A., & Zellmer, S. (2020). Indirect co-cultivation of HepG2 with differentiated THP-1 cells induces AHR signalling and release of pro-inflammatory cytokines. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 68, 104957
- [191] Fasolino, I., Guarino, V., Marrese, M., Cirillo, V., Vallifuoco, M., Tamma, M. L., Vassallo, V., Bracco, A., Calise, F., & Ambrosio, L. (2017). HepG2 and human healthy hepatocyte in vitro culture and co-culture in PCL electrospun platforms. *Biomedical materials (Bristol, England)*, 13(1), 015017
- [192] Tenzer, S., Docter, D., Rosfa, S., Wlodarski, A., Kuharev, J., Rekić, A., Knauer, S. K., Bantz, C., Nawroth, T., Bier, C., Sirirattanapan, J., Mann, W., Treuel, L., Zellner, R., Maskos, M., Schild, H., & Stauber, R. H. (2011). Nanoparticle size is a critical physicochemical determinant of the human blood plasma corona: a comprehensive quantitative proteomic analysis. *ACS nano*, 5(9), 7155–7167
- [193] Jan, A. T., Rahman, S., Badierah, R., Lee, E. J., Mattar, E. H., Redwan, E. M., & Choi, I. (2021). Expedition into Exosome Biology: A Perspective of Progress from Discovery to Therapeutic Development. *Cancers*, 13(5), 1157
- [194] Batrakova, E. V., & Kim, M. S. (2015). Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 219, 396–405
- [195] Smitha, K. T., Anitha, A., Furuike, T., Tamura, H., Nair, S. V., & Jayakumar, R. (2013). In vitro evaluation of paclitaxel loaded amorphous chitin nanoparticles for colon cancer drug delivery. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 104, 245–253
- [196] Danhier, F., Lecouturier, N., Vroman, B., Jérôme, C., Marchand-Brynaert, J., Feron, O., & Préat, V. (2009). Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 133(1), 11–17
- [197] Gaucher, G., Marchessault, R. H., & Leroux, J. C. (2010). Polyester-based micelles and nanoparticles for the parenteral delivery of taxanes. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 143(1), 2–12

- [198] Stremersch, S., De Smedt, S. C., & Raemdonck, K. (2016). Therapeutic and diagnostic applications of extracellular vesicles. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 244(Pt B), 167–183.
- [199] Gurunathan, S., Kang, M. H., Jeyaraj, M., Qasim, M., & Kim, J. H. (2019). Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells*, 8(4), 307
- [200] Vader, P., Mol, E. A., Pasterkamp, G., & Schiffelers, R. M. (2016). Extracellular vesicles for drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 106(Pt A), 148–156
- [201] Tran, P. H. L., Wang, T., Yin, W., Tran, T. T. D., Barua, H. T., Zhang, Y., Midge, S. B., Nguyen, T. N. G., Lee, B. J., & Duan, W. (2019). Development of a nanoamorphous exosomal delivery system as an effective biological platform for improved encapsulation of hydrophobic drugs. *International journal of pharmaceutics*, 566, 697–707
- [202] Zhang, X., Yuan, X., Shi, H., Wu, L., Qian, H., & Xu, W. (2015). Exosomes in cancer: small particle, big player. *Journal of hematology & oncology*, 8, 83
- [203] Charoenviriyakul, C., Takahashi, Y., Nishikawa, M., & Takakura, Y. (2018). Preservation of exosomes at room temperature using lyophilization. *International journal of pharmaceutics*, 553(1-2), 1–7.
- [204] Sancho-Albero, M., Martín-Pardillos, A., Lujan, L., Sebastian, V., Santamaria, J., & Martín-Duque, P. (2022). Exosomes loaded with ultrasmall Pt nanoparticles: a novel low-toxicity alternative to cisplatin. *Journal of nanobiotechnology*, 20(1), 473
- [205] Jiang, Y., Ji, X., Liu, K., Shi, Y., Wang, C., Li, Y., Zhang, T., He, Y., Xiang, M., & Zhao, R. (2020). Exosomal miR-200c-3p negatively regulates the migration and invasion of lipopolysaccharide (LPS)-stimulated colorectal cancer (CRC). *BMC molecular and cell biology*, 21(1), 48
- [206] Javidi-Sharifi, N., Martinez, J., English, I., Joshi, S. K., Scopim-Ribeiro, R., Viola, S. K., Edwards, D. K., Agarwal, A., Lopez, C., Jorgens, D., Tyner, J. W., Druker, B. J., & Traer, E. (2019). FGF2-FGFR1 signaling regulates release of Leukemia-Protective exosomes from bone marrow stromal cells. *eLife*, 8, e40033.
- [207] Bai, J., Zhang, X., Shi, D., Xiang, Z., Wang, S., Yang, C., Liu, Q., Huang, S., Fang, Y., Zhang, W., Song, J., & Xiong, B. (2021). Exosomal miR-128-3p Promotes Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Colorectal Cancer Cells by Targeting FOXO4 via TGF- β /SMAD and JAK/STAT3 Signaling. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 568738
- [208] Farahani, M., Rubbi, C., Liu, L., Slupsky, J. R., & Kalakonda, N. (2015). CLL Exosomes Modulate the Transcriptome and Behaviour of Recipient Stromal Cells and Are Selectively Enriched in miR-202-3p. *PloS one*, 10(10), e0141429

- [209] Sancho-Albero, M., Navascués, N., Mendoza, G., Sebastián, V., Arruebo, M., Martín-Duque, P., & Santamaría, J. (2019). Exosome origin determines cell targeting and the transfer of therapeutic nanoparticles towards target cells. *Journal of nanobiotechnology*, 17(1), 16
- [210] Salarpour, S., Forootanfar, H., Pournamdari, M., Ahmadi-Zeidabadi, M., Esmaeeli, M., & Pardakhty, A. (2019). Paclitaxel incorporated exosomes derived from glioblastoma cells: comparative study of two loading techniques. *Daru: journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, 27(2), 533–539
- [211] Kalimuthu, S., Gangadaran, P., Rajendran, R. L., Zhu, L., Oh, J. M., Lee, H. W., Gopal, A., Baek, S. H., Jeong, S. Y., Lee, S. W., Lee, J., & Ahn, B. C. (2018). A New Approach for Loading Anticancer Drugs Into Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosome Mimetics for Cancer Therapy. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1116
- [212] Wang, P., Wang, H., Huang, Q., Peng, C., Yao, L., Chen, H., Qiu, Z., Wu, Y., Wang, L., & Chen, W. (2019). Exosomes from M1-Polarized Macrophages Enhance Paclitaxel Antitumor Activity by Activating Macrophages-Mediated Inflammation. *Theranostics*, 9(6), 1714–1727
- [213] Pramanik, A., Mayer, J., Patibandla, S., Gates, K., Gao, Y., Davis, D., Seshadri, R., & Ray, P. C. (2020). Mixed-Dimensional Heterostructure Material-Based SERS for Trace Level Identification of Breast Cancer-Derived Exosomes. *ACS omega*, 5(27), 16602–16611
- [214] Kim, M. S., Haney, M. J., Zhao, Y., Yuan, D., Deygen, I., Klyachko, N. L., Kabanov, A. V., & Batrakova, E. V. (2018). Engineering macrophage-derived exosomes for targeted paclitaxel delivery to pulmonary metastases: in vitro and in vivo evaluations. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 14(1), 195–204
- [215] Bu, L. L., Yan, J., Wang, Z., Ruan, H., Chen, Q., Gunadhi, V., Bell, R. B., & Gu, Z. (2019). Advances in drug delivery for post-surgical cancer treatment. *Biomaterials*, 219, 119182
- [216] Tang, R. Z., Liu, Z. Z., Gu, S. S., & Liu, X. Q. (2021). Multiple local therapeutics based on nano-hydrogel composites in breast cancer treatment. *Journal of materials chemistry. B*, 9(6), 1521–1535
- [217] Askari, E., Seyfoori, A., Amereh, M., Gharaie, S. S., Ghazali, H. S., Ghazali, Z. S., Khunjush, B., & Akbari, M. (2020). Stimuli-Responsive Hydrogels for Local Post-Surgical Drug Delivery. *Gels* (Basel, Switzerland), 6(2), 14
- [218] De Clercq, K., Xie, F., De Wever, O., Descamps, B., Hoorens, A., Vermeulen, A., Ceelen, W., & Vervaeke, C. (2019). Preclinical evaluation of local prolonged release of paclitaxel from gelatin microspheres for the prevention of recurrence of peritoneal carcinomatosis in advanced ovarian cancer. *Scientific reports*, 9(1), 14881
- [219] Firozian, F., Emadi, M. A., Chehardoli, G., & Ghafari, F. (2021). Inulin Stearate Self-assembly Micro-rod Containing Paclitaxel: Synthesis and In Vitro Cytotoxicity MTT Assay in HeLa Cell Line. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 17(4), 1215-1220

- [220] Bregy, A., Shah, A. H., Diaz, M. V., Pierce, H. E., Ames, P. L., Diaz, D., & Komotar, R. J. (2013). The role of Gliadel wafers in the treatment of high-grade gliomas. *Expert review of anticancer therapy*, 13(12), 1453–1461
- [221] Bastiancich, C., Malfanti, A., Pr at, V., & Rahman, R. (2021). Rationally designed drug delivery systems for the local treatment of resected glioblastoma. *Advanced drug delivery reviews*, 177, 113951.
- [222] Lv, J., & Lin, J. (2021). Relugolix as a promising novel oral GnRH antagonist for prostate cancer treatment. *Asian journal of andrology*, 23(3), 229–230
- [223] Russo, E., & Villa, C. (2019). Poloxamer Hydrogels for Biomedical Applications. *Pharmaceutics*, 11(12), 671.
- [224] Diniz, I. M., Chen, C., Xu, X., Ansari, S., Zadeh, H. H., Marques, M. M., Shi, S., & Moshaverinia, A. (2015). Pluronic F-127 hydrogel as a promising scaffold for encapsulation of dental-derived mesenchymal stem cells. *Journal of materials science. Materials in medicine*, 26(3), 153
- [225] Turabee, M. H., Jeong, T. H., Ramalingam, P., Kang, J. H., & Ko, Y. T. (2019). N,N,N-trimethyl chitosan embedded in situ Pluronic F127 hydrogel for the treatment of brain tumor. *Carbohydrate polymers*, 203, 302–309
- [226] Chen, Y. Y., Wu, H. C., Sun, J. S., Dong, G. C., & Wang, T. W. (2013). Injectable and thermoresponsive self-assembled nanocomposite hydrogel for long-term anticancer drug delivery. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*, 29(11), 3721–3729
- [227] Gasperini, L., Mano, J. F., & Reis, R. L. (2014). Natural polymers for the microencapsulation of cells. *Journal of the Royal Society, Interface*, 11(100), 20140817
- [228] Muthukumar, T., Song, J. E., & Khang, G. (2019). Biological Role of Gellan Gum in Improving Scaffold Drug Delivery, Cell Adhesion Properties for Tissue Engineering Applications. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(24), 4514
- [229] D'Arrigo, G., Navarro, G., Di Meo, C., Matricardi, P., & Torchilin, V. (2014). Gellan gum nanohydrogel containing anti-inflammatory and anti-cancer drugs: a multi-drug delivery system for a combination therapy in cancer treatment. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 87(1), 208–216
- [230] Nieto, C., Vega, M. A., Rodríguez, V., Pérez-Esteban, P., & Martín Del Valle, E. M. (2022). Biodegradable gellan gum hydrogels loaded with paclitaxel for HER2+ breast cancer local therapy. *Carbohydrate polymers*, 294, 119732
- [231] Sweetey, J. P., Selvasudha, N., Dhanalekshmi, U. M., & Sridurgadevi, N. (2022). Gellan Gum and Its Composites: Suitable Candidate for Efficient Nanodrug Delivery. *Nanoengineering of Biomaterials*, 33–61.

- [232] Sworn, G., Sanderson, G. R., & Gibson, W. (1995). Gellan gum fluid gels. *Food Hydrocolloids*, 9(4), 265-271
- [233] Yang, X., Gao, L., Wei, Y., Tan, B., Wu, Y., Yi, C., & Liao, J. (2021). Photothermal hydrogel platform for prevention of post-surgical tumor recurrence and improving breast reconstruction. *Journal of nanobiotechnology*, 19(1), 307
- [234] Thakur, V. K., & Thakur, M. K. (Eds.). (2018). *Hydrogels: recent advances*. Springer.
- [235] Chenite, A., Buschmann, M., Wang, D., Chaput, C., & Kandani, N. J. C. P. (2001). Rheological characterisation of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions. *Carbohydrate polymers*, 46(1), 39-47
- [236] Schütt, M., O'Farrell, C., Stamatopoulos, K., Hoad, C. L., Mariciani, L., Sulaiman, S., Simmons, M. J. H., Batchelor, H. K., & Alexiadis, A. (2022). Simulating the Hydrodynamic Conditions of the Human Ascending Colon: A Digital Twin of the Dynamic Colon Model. *Pharmaceutics*, 14(1), 184
- [237] Carreño, G., Pereira, A., Ávila-Salas, F., Marican, A., Andrade, F., Roca-Melendres, M. M., Valdés, O., Vijayakumar, S., Schwartz, S., Jr, Abasolo, I., Rafael, D., & Durán-Lara, E. F. (2021). Development of "on-demand" thermo-responsive hydrogels for anti-cancer drugs sustained release: Rational design, in silico prediction and in vitro validation in colon cancer models. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 131, 112483
- [238] Loebel, C., Rodell, C. B., Chen, M. H., & Burdick, J. A. (2017). Shear-thinning and self-healing hydrogels as injectable therapeutics and for 3D-printing. *Nature protocols*, 12(8), 1521–1541
- [239] Jons, C. K., Grosskopf, A. K., Baillet, J., Yan, J., Klich, J. H., Saouaf, O. M., & Appel, E. A. (2022). Yield-Stress and Creep Control Depot Formation and Persistence of Injectable Hydrogels Following Subcutaneous Administration. *Advanced Functional Materials*, 32(40), 2203402
- [240] Bradbeer, J. F., Hancocks, R., Spyropoulos, F., & Norton, I. T. (2015). Low acyl gellan gum fluid gel formation and their subsequent response with acid to impact on satiety. *Food hydrocolloids*, 43, 501-509
- [241] Joseph, J., Dreiss, C. A., Cosgrove, T., & Pedersen, J. S. (2007). Rupturing polymeric micelles with cyclodextrins. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*, 23(2), 460–466
- [242] Xu, J., Feng, E., & Song, J. (2014). Bioorthogonally cross-linked hydrogel network with precisely controlled disintegration time over a broad range. *Journal of the American Chemical Society*, 136(11), 4105–4108
- [243] Miro, A., Ungaro, F., & Quaglia, F. (2011). Cyclodextrins as smart excipients in polymeric drug delivery systems. *Cyclodextrins in Pharmaceutics, Cosmetics, and Biomedicine: Current and Future Industrial Applications*, 65-89

*No temas a las dificultades,
lo mejor surge de ellas*

Rita Levi-Montalcini



VNiVERSIDAD D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS