





### Calienni, María Natalia

# Formulaciones liposomales de activos antitumorales para la vía tópica : diseño y caracterización



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina. Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5 https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

### Cita recomendada:

Calienni, M. N. (2024). Formulaciones liposomales de activos antitumorales para la vía tópica: diseño y caracterización. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/4959

Puede encontrar éste y otros documentos en: https://ridaa.unq.edu.ar



Roque Sáenz Peña 352 // Bernal Buenos Aires // Argentina t:: (+41 11) 4365 7100 f:: (+54 11) 4365 7101 info@unq.edu.ar María Natalia Calienni, Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Septiembre de 2019, pp. 218, http://ridaa.unq.edu.ar, Universidad Nacional de Quilmes, Secretaría de Posgrado, Doctorado en Ciencia y Tecnología

# Formulaciones liposomales de activos antitumorales para la vía tópica: Diseño y Caracterización.

**TESIS DOCTORAL** 

### María Natalia Calienni

nati.calienni@gmail.com

#### Resumen

En el 2018, la incidencia del cáncer de piel no melanoma superó el millón de casos en el mundo, lo que corresponde al 5.8% de todos casos de cáncer a nivel mundial. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, son los cánceres de piel no melanoma -carcinoma de células escamosas (SCC) y carcinoma de células basales (BCC)- los que presentan mayor incidencia, con tasas de mortalidad semejantes a las del melanoma cutáneo. Este tipo de tumores suelen presentarse en zonas de la piel que se encuentran en constante exposición al sol, como la cara, las orejas, el cuero cabelludo y las manos, y su tratamiento consiste, en la mayoría de los casos, en la escisión quirúrgica. Por lo que no sólo se trata de tratamientos invasivos, sino que pueden dejar rastros que generan un fuerte impacto emocional en el paciente que se suma al de la propia enfermedad. Si bien existen algunos agentes quimioterapéuticos tópicos, como el 5-fluorouracilo (5-FU) e imiquimod, su uso está restringido a lesiones precancerosas, como la gueratosis actínica –la cual puede progresar a SCC-, o a algunos casos puntuales de BCC y de SCC detectados precozmente, donde las lesiones son localizadas y muy superficiales. Cuando estos tumores avanzan las posibilidades de lograr un tratamiento efectivo disminuyen. Estos cánceres pueden causar destrucción local, producir deformidad grave y extenderse a zonas próximas comprometiendo órganos sensoriales. Ambos cánceres pueden generar metástasis en otras regiones del cuerpo y ser mortales.

Esta tesis presenta la obtención y caracterización de dos nanoformulaciones con el potencial de poder ser utilizadas para el tratamiento de lesiones relacionadas al SCC y BCC, no solo en estadios tempranos sino también más avanzados (no metastásicos). Estas nanoformulaciones contienen, por un lado, el agente quimioterapéutico tradicional 5-FU, y por otro, la droga de última generación Vismodegib. La principal novedad es que se propone la vía tópica cutánea para la administración de ambos principios activos, mediante el transporte y entrega a estratos profundos de la piel, donde se desarrollan los BCC y SCC, con un sistema nanoestructurado. Esto permitiría en el caso del 5-FU mejorar su penetración

cutánea y cambiar la ruta de administración en el caso del Vismodegib. Lo que se buscó de esta manera fue reducir los efectos secundarios relacionados a la administración sistémica. aumentar la eficacia de acción mediante tratamientos sitio-específicos, y proponer una terapia menos invasiva para el paciente. El nanosistema de delivery elegido fueron los liposomas ultradeformables (UDL), un tipo particular de nanoliposomas unilamelares capaces de atravesar el estrato córneo de la piel, la principal barrera a vencer en la administración cutánea, y transportar a las células de la epidermis viable diversos activos. Por lo tanto, se desarrollaron dos formulaciones: UDL con 5-FU (UDL-5FU) y UDL con Vismodegib (UDL-Vis), las cuales fueron caracterizadas fisicoquímicamente, mostrando en ambos casos una buena estabilidad coloidal a diferentes temperaturas (ambiente, de almacenamiento y corporal), y con una elevada eficiencia de encapsulación en el caso de los UDL-Vis. Se pudo determinar cómo es que la droga interactúa con la membrana liposomal y cómo esta interacción afectó la elasticidad de las vesículas, disminuyendo (para el caso de los UDL-5FU) o aumentando (UDL-Vis) dicha propiedad fundamental para que sean capaces de atravesar la piel. La caracterización implicó la combinación de múltiples técnicas experimentales –espectroscópicas, de fluorescencia, calorimetría– y teóricas, para poder obtener una idea acerca de cómo se estabilizan ambos sistemas. En el caso del Vismodegib, dada la poca información molecular disponible, se llevó a cabo en paralelo una caracterización química teórica de la molécula, la cual se comparó y ajustó con mediciones obtenidas por espectroscopía Raman e infrarrojo.

Una vez obtenidos y caracterizados ambos nanosistemas, se estudió el perfil de penetración in vitro de los mismos en muestras de piel humana, las cuales consistieron en estrato córneo, epidermis viable y dermis. Para ello se empleó el Método de Penetración de Saarbrücken (SPM), adaptado para llevar a cabo incubaciones no oclusivas, junto con técnicas de remoción de las capas del estrato córneo, histológicas y de seccionamiento óptico mediante microscopía confocal de fluorescencia. De esta manera se pudo obtener el perfil de penetración para las dos nanoformulaciones, observando en ambos casos que fueron capaces de atravesar el estrato córneo y entregar el principio activo en la epidermis viable en el rango de concentración terapéutico. Hasta este momento, este fue el primer trabajo que estabilizó en un nanosistema de transporte de activos, específicamente diseñado para penetrar la barrera impermeable del estrato córneo de la piel, al Vismodegib, y que probó su penetración cutánea mediante el SPM.

Por otro lado, se estudió la citotoxicidad in vitro de las nanoformulaciones en dos líneas celulares humanas ampliamente utilizadas para este tipo de estudios, HaCaT y SK-Mel-28, comparando los efectos con la matriz liposomal sin droga y con la droga libre, mediante tres ensayos bioquímicos diferentes. También se estudió la captura celular de los mismos y la tasa de activación de la vía de muerte celular por apoptosis. En ambos casos la encapsulación de los principios activos incrementó la citotoxicidad.

Por último, se realizaron estudios de toxicidad in vivo en larvas de pez cebra (Danio rerio), un modelo de estudio intermedio entre los ensayos in vitro con células y los modelos mamíferos, cada vez más utilizado y aceptado. Para ello se llevaron a cabo diferentes tipos de determinaciones de parámetros indicadores de toxicidad y teratogénesis. En el caso de los UDL-5FU estos resultaron ser más tóxicos para las larvas que el 5-FU libre, mientras que con los UDL-Vis se observó lo contrario. UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES

Departamento de Ciencia y Tecnología

## Formulaciones liposomales de activos antitumorales para la vía tópica: Diseño y Caracterización

### Lic. Maria Natalia Calienni

Tesis para optar por el título de Doctora en Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes

## Director: Dr. Jorge Anibal Martinetti Montanari Co-directora: Dra. Silvia del Valle Alonso

Lugar de trabajo: Laboratorio de Bio-Nanotecnología, Departamento de Ciencia y Tecnología, GBEyB IMBICE, CCT-LA PLATA, CONICET, Universidad Nacional de Quilmes.

Bernal, 2019

Mi sono promessa di non smettere mai di sognare, troverò sempre la forza per rialzarmi in ogni caduta e il coraggio per non mollare, perchè ci vuole pazienza per persistere e passione per avere successo.

El presente trabajo fue desarrollado por la doctoranda desde abril de 2015 hasta mayo de 2019 bajo la dirección del Dr. Jorge Martinetti Montanari y la codirección de la Dra. Silvia del Valle Alonso, dentro del marco del Programa de Bionanotecnología de Lípidos y Proteínas de la Universidad Nacional de Quilmes (UNQ) y del Proyecto de Investigación Plurianual del CONICET (2014-2016) "Nanosistemas de liberación dirigida de drogas de acción antitumoral por vía tópica para cáncer de piel". La mayor parte del trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Bio-Nanotecnología de la UNQ. Asimismo, se realizaron actividades de investigación en colaboración con:

-Laboratorio de Expresión y Plegado de Proteínas de la UNQ.

-Laboratorio de Inmunología y Virología de la UNQ.

-INQUINOA-CONICET, Instituto de Química Física, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán.

-Centro de Investigación en Ingeniería Molecular, Universidad Católica de Santa María, Perú.

-Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

-Advanced Drug Delivery Systems Laboratory, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Università degli Studi Magna Graecia di Catanzaro, Italia. -Institute of Materials Science and Nanotechnology, National Nanotechnology Research Center (UNAM), Bilkent University, Turquía.

La doctoranda ha sido beneficiada con una beca del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) (2015-2020), organismo del cual forman parte también el director y la co-directora de esta tesis como miembros de la Carrera del Investigador Científico. También ha sido beneficiada con una beca del Ministero degli Affari Esteri e della Cooperazione Internazionale (MAECI) de Italia para realizar una estancia corta de investigación en la Università degli Studi Magna Graecia di Catanzaro (2017).

Como fruto de las investigaciones llevadas a cabo en el marco de esta tesis, se han publicado los siguientes artículos en revistas internacionales con referato: 1) Nanoformulation for potential topical delivery of Vismodegib in skin cancer treatment. **MN Calienni**, C Febres-Molina, RE Llovera, C Zevallos-Delgado, ME Tuttolomondo, D Paolino, M Fresta, HL Barazorda-Ccahuana, B Gómez, SdelV Alonso, J Montanari. **Int. J. Pharm. (2019)**. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.05.002.

2) Raman spectroscopy study of a topical penetration of a new generation skin cancer antineoplastic drug. MN Calienni, J Montanari, ME Tuttolomondo, G Gomez, S Alonso, FC Alvira. Latin America Optics and Photonics Conference (2018). DOI: 10.1364/LAOP.2018.Tu3C.5.

 3) 5-Fluorouracil-loaded ultradeformable liposomes for skin therapy. MN Calienni, MJ Prieto, V Muniz Couto, E de Paula, SV Alonso, J Montanari. AIP Conference Proceedings (2018). DOI: 10.1063/1.5047778.

4) Nano-formulation for topical treatment of precancerous lesions: skin penetration, in vitro and in vivo toxicological evaluation. MN Calienni, CF Temprana, MJ Prieto, D Paolino, M Fresta, AB Tekinay, SV Alonso, J Montanari. Drug Deliv. Transl. Res.
(2017). DOI: 10.1007/s13346-017-0469-1.

Asimismo, al momento de la publicación de esta tesis, ha sido enviado para su evaluación el siguiente artículo:

*Experimental and theoretical study of the structural features of Vismodegib molecule.* **MN Calienni,** ME Tuttolomondo, S Alonso, J Montanari, FC Alvira. Enviado en Julio de 2019 a *Journal of Molecular Structure*.

La doctoranda ha participado en otras colaboraciones científicas, además de las mencionadas anteriormente, tanto dentro como por fuera del Laboratorio de Bio-Nanotecnología, aplicando los conocimientos adquiridos durante su doctorado. Los grupos colaboradores externos fueron:

-Cátedra de Tecnología Farmacéutica I, Facultad de Farmacia y Bioquímica Universidad de Buenos Aires.

-Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), CCT-La Plata-CONICET.

-Instituto de Nanosistemas (INS), Universidad Nacional de San Martin.

-Laboratorio de Disfunción Celular en Enfermedades Neurodegenerativas y Nanomedicina, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Instituto de Química Biológica Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN-CONICET), Universidad de Buenos Aires.

-Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), CCT-La Plata-CONICET.

Como fruto de estas colaboraciones se han publicado los siguientes artículos en revistas internacionales con referato:

1) Comparative toxicity of PEG and folate-derivated blue-emitting silicon nanoparticles: in vitro and in vivo studies. **MN Calienni**\*, CR Lillo\*, MJ Prieto, RM Gorojod, SV Alonso, ML Kotler, MC Gonzalez, J Montanari. \*Primera autoría compartida. **Nanomedicine** (**2019**). DOI: 10.2217/nnm-2018-0251.

2) Zebrafish (Danio rerio) model as an early stage screening tool to study the biodistribution and toxicity profile of doxorubicin-loaded mixed micelles. **MN Calienni**\*, CM Cagel\*, MJ Prieto, MA Moretton, J Montanari, DA Chiappetta, SV Alonso. \*Primera autoría compartida. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** (**2018**). DOI: 10.1016/j.taap.2018.07.019.

 Towards biomedical application of amino-functionalized silicon nanoparticles. CR Lillo\*, MN Calienni\*, RM Gorojod, MB Rivas Aiello, MJ Prieto, S Alonso, ML Kotler, MC Gonzalez, J Montanari. \*Primera autoría compartida. Nanomedicine (2018). DOI: 10.2217/nnm-2018-0010.

 Anotoxicological and teratogenic effects: A linkage with dendrimer surface charge and zebrafish developmental stages. MN Calienni, DA Feas, D Igartúa, N Chiaramoni, SdelV Alonso, MJ Prieto. Toxicol. Appl. Pharm. (2017). DOI: 10.1016/j.taap.2017.10.003.

5) Skin penetration and UV-damage prevention by nanoberries. PL Bucci, MJ Prieto, L Milla, **MN Calienni**, L Martínez, V Rivarola, S Alonso, J Montanari. **J. Cosmet. Derm.** (2017). DOI: 10.1111/jocd.12436.

6) *Relation between biophysical properties of nanostructures and their toxicity on zebrafish.* CS Martinez, DE Igartúa, **MN Calienni**, DA Feas, M Siri, J Montanari, NS Chiaramoni, SV Alonso and MJ Prieto. **Biophys. Rev. (2017)**. DOI: 10.1007/s12551-017-0294-2.

7) Nutraceutical emulsion containing valproic acid (NE-VPA): a drug delivery system for reversion of seizures in zebrafish larvae epilepsy model. DA Feas, DE Igartúa, **MN Calienni**, CS Martinez, M Pifano, NS Chiaramoni, S. del V. Alonso, MJ Prieto. **J. Pharm. Inv. (2017)**. DOI: 10.1007/s40005-017-0316-x.

 B) Development of Nutraceutical Emulsions as Risperidone Delivery Systems: Characterization and Toxicological Studies. D Igartúa, MN Calienni, DA Feas, N Chiaramoni, SV Alonso, MJ Prieto. J. Pharm. Sci (2015). DOI: 10.1002/jps.24636.
 9) Nanoberries: cómo transportar antioxidantes a través de la piel para protegerla de la radiación UV. PL Bucci, N Calienni, S Alonso, JA Montanari. Revista Cosmética. I.S.S.N. 0326-7385, Nº 89 - Vol.30 Nº1 (2015). Asociación Argentina de Químicos Cosméticos.

Al momento de la publicación de esta tesis, han sido enviados para su evaluación o se encuentran en proceso de preparación los siguientes artículos generados a partir de las colaboraciones antes mencionadas:

1) Electrospun nanofibers of polyvinyl alcohol and chitosan-based emulsions functionalized with cabreuva essential oil. J Lamarra, **MN Calienni**, S Rivero, A Pinotti. Enviado en Julio de 2019 a **Biomacromolecules**.

 Toxicity, skin penetration and singlet oxygen generation by BSA-capped gold nanoclusters. CR Lillo, MN Calienni, B Rivas Aiello, MJ Prieto, D Rodriguez Sartori, MC Gonzalez, J Montanari, G Soler-Illia. En preparación.

3) Rheological properties of lipid dispersions: concentration and temperature implications for drug delivery. LM Martínez, CF Temprana, MN Calienni, J Montanari and S del V Alonso. En preparación.

Las comunicaciones en reuniones científicas efectuadas por la doctoranda durante el progreso de su trabajo han sido las siguientes:

 XXI Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica (CAFQI).
 "Caracterización fisicoquímica y espectral de Vismodegib". MN Calienni, FC Alvira, ME Tuttolomondo, SV Alonso y J Montanari. San Miguel de Tucumán, Argentina, 14-17 de Abril 2019. *Presentación de póster*. 2) XX Jornadas anuales de la Sociedad Argentina de Biología y XVII Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias. "Paclitaxel and curcumin coloaded mixed micelles as potential nanovehicles for breast and ovarian cancer therapy". MA Moretton, E Bernabeu, N Calienni, V Calabro, J Riedel, J Prieto, L Gonzalez, C Martinez, S Alonso, J Montanari, P Evelson, DA Chiappetta. Buenos Aires, Argentina, 7 de Diciembre 2018.

 OSA-Latin America Optics & Photonics Conference. "Raman spectroscopy study of a topical penetration of a new generation skin cancer antineoplastic drug".
 MN Calienni, J Montanari, ME Tuttolomondo, G Gomez, S Alonso, FC Alvira. Lima, Perú, 12-15 de Noviembre 2018.

4) **IUBMB-IUPAB Advanced School/Workshop on Protein-Protein and Protein-Membrane Interaction: Experimental and Theoretical Approaches (POSLATAM).** "Biophysical characterization of Vismodegib-loaded ultradeformable liposomes: drug-membrane interaction". **MN Calienni**, R Llovera, S Alonso, J Montanari. Varadero, Cuba, 22 al 26 de Octubre **2018**. *Presentación de póster*.

5) International Workshop on Self-Assembly and Hierarchical Materials in Biomedicine. "Evaluation of photosensitizer properties of folic acid conjugated Au@BSA nanoclusters in B16 cell line". C Lillo, T Laporte, N Calienni, J Prieto, J Montanari, M Simian, G Soler-Illia. San Sebastián, España, 8-10 de Octubre de 2018.

6) **3ra Reunión de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología UNQ.** "Seguimiento por fluorescencia en explantos cutáneos de nanoformulaciones para uso cosmecéutico". MC Izquierdo, **MN Calienni**, S Alonso, J Montanari. Universidad Nacional de Quilmes, Argentina, 30-31 de Agosto **2018**. *Presentación de póster.* 

7) **3ra Reunión de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología UNQ.** "Detección en piel por espectroscopía Raman de una droga oncológica de última generación nanoformulada". GE Gómez, **MN Calienni**, S Alonso, F Alvira, J Montanari. Universidad Nacional de Quilmes, Argentina, 30-31 de Agosto **2018**. *Presentación de póster.* 

8) ICGEB-LAZEN 2018 "V Latin American Zebrafish Network Course and Symposium". "Toxicity evaluation of doxorubicin-loaded mixed micelles on larvae of zebrafish". MN Calienni, CM Cagel, MJ Prieto, MA Moretton, S Alonso, DA Chiappetta, J Montanari. Cuernavaca, México, 11 y 12 de Mayo 2018. Presentación oral y de póster.

9) Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias (Sociedad Argentina de Biofísica). "A novel nanoformulation of Vismodegib for topical skin therapy: design and biophysical characterization". MN Calienni, R Llovera, S Alonso, J Montanari. Buenos Aires, Argentina, 13-17 de Noviembre 2017. Presentación de póster.

10) **II Simposio de Jóvenes Biofísicos.** *"A novel nanoformulation of Vismodegib for topical skin therapy: design and biophysical characterization"*. **MN Calienni**, R Llovera, S Alonso, J Montanari. Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires, Argentina, 11 de Noviembre **2017**. *Presentación de póster*.

11) **NanoInnovation 2017**. *"Nano-formulation for topical therapy of skin precancerous lesions: in vitro, ex vivo and in vivo evaluation"*. **MN Calienni (***invited speaker***)**. Sapienza Università di Roma, Roma, Italia, 26-29 de Septiembre **2017**. *Invited speaker en la sesión: Innovative approaches for medical applications*.

12) Jornada Estado actual de la nanotecnología y sus aplicaciones en las ciencias farmacéuticas y bioquímicas. "Nanosistemas liposomales de aplicación tópica con penetración cutánea y actividad antitumoral". N Calienni, R Llovera, F Temprana, S Alonso, J Montanari. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires, Argentina, 10 de Agosto 2017. Presentación de póster.

13) **10**<sup>th</sup> European and Global Conference and Exhibition for Clinical Nanomedicine & Targeted Medicine. European Foundation for Clinical Nanomedicine CLINAM. "Nano-formulation of a drug for skin cancer penetrates the stratum corneum and induces high rate apoptosis in tumor cell line and alterations in in vivo zebrafish model". MN Calienni, F Temprana, J Prieto, S Alonso, J Montanari. Basilea, Suiza, 7-10 de Mayo **2017**. *Presentación de póster.* 

14) **10**<sup>th</sup> European and Global Conference and Exhibition for Clinical Nanomedicine & Targeted Medicine. European Foundation for Clinical Nanomedicine CLINAM. *"In vitro, ex vivo and in vivo evaluation of a nano drug delivery system for skin cancer therapy"*. MN Calienni. Basilea, Suiza, 7-10 de Mayo **2017**. *Presentación oral en la sesión: Small Speeches.* 

15) Imaging Techniques for Biotechnology and Biomedical Applications – International Workshop. "Skin penetration of ultradeformable liposomes for topical drug delivery: CLSM as a tool of analysis". MN Calienni, S Alonso, J Montanari. La Plata, Buenos Aires, Argentina, 30 de Noviembre y 1ro de Diciembre 2016. Presentación de póster. 16) III Latin American Federation of Biophysical Societies (LAFeBS) – IX IberoAmerican Congress of Biophysics – XLV Reunión Anual Sociedad Argentina de Biofísica (SAB). "Design and biophysical characterization of 5fluorouracil-loaded nanosystem for topical skin cancer therapy: in vitro, ex vivo and in vivo studies". MN Calienni, J Prieto, S Alonso, J Montanari. Tucumán, Argentina, 23-25 de Noviembre 2016. Presentación de póster.

17) VI Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental de Argentina (SETAC). "Nanotoxicidad in vitro e in vivo en zebrafish de *liposomas ultradeformables con 5-fluorouracilo"*. MN Calienni, NS Chiaramoni, MJ Prieto, S Alonso, J Montanari. Córdoba, Argentina, 11-14 de Octubre **2016**.

18) II Jornadas de Doctorandos y Estudiantes Avanzados de Ciencia y
Tecnología. "Caracterización y estudios de penetración en piel humana de liposomas ultradeformables con 5-Fluorouracilo". N Calienni, J Prieto, J Montanari, S Alonso. Universidad Nacional de Quilmes, Argentina, 13-15 de Octubre 2015. Presentación de póster.

19) NanoTR11 – Nanoscience and Nanotechnology Conference. "Characterization and skin penetration of 5-fluorouracil-loaded ultradeformable liposomes for topical delivery". MN Calienni, AE Topal, M Ürel, S Alonso, J Montanari. ODTU - Middle East Technical University, Ankara Turquía, 22-25 de Junio 2015.

20) Nanobiotechnology Days 2015 – Workshops/Lectures. "Ex vivo skin penetration and in vivo toxicity of nanoberries for topical delivery of antioxidants". P Bucci, MN Calienni, J Prieto, S Alonso, J Montanari. Istanbul Kemerburgaz University, Estambul, Turquía, 14 y 15 de Mayo 2015.

La doctoranda ha realizado presentaciones orales en congresos y ha sido invitada como disertante en seminarios:

1) Conferencista invitada, junto con el Dr. Montanari, por el periodista científico y docente Eduardo Porto para hablar sobre "Enfermedades huérfanas: cuestionando los supuestos de autonomía y objetividad históricamente asociados con la práctica científica", en el marco de Ciclo de Conferencias que organiza la materia Ciencia, Tecnología y Sociedad de la Universidad Nacional de San Martín. Buenos Aires, 23 de Mayo **2019**.

2) Seminario "Estudios de toxicidad de micelas mixtas cargadas con doxorrubicina en larvas de *zebrafish* (*Danio renio*)". Realizado en el Departamento de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, 28 de Septiembre de **2018**.

3) Presentación oral en el ICGEB-LAZEN 2018 "V Latin American Zebrafish Network Course and Symposium". "Toxicity evaluation of doxorubicin-loaded mixed micelles on larvae of zebrafish". Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México, 11 y 12 de Mayo **2018**.

4) Oradora invitada en la sesión Innovative approaches for medical applications del NanoInnovation 2017. "Nano-formulation for topical therapy of skin precancerous lesions: *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* evaluation". Sapienza Università di Roma, Roma, Italia, 26-29 Septiembre **2017**.

5) Presentación oral en la sesión Small Speeches de la 10<sup>th</sup> European and Global Conference and Exhibition for Clinical Nanomedicine & Targeted Medicine. European Foundation for Clinical Nanomedicine CLINAM. "*In vitro, ex vivo* and *in vivo* evaluation of a nano drug delivery system for skin cancer therapy". Basilea, Suiza, 8 Mayo **2017**.

La doctoranda ha sido distinguida con el **Segundo Premio POSLATAM** "**Carl Zeiss Award**" por la presentación del póster: "Design and biophysical characterization of 5-fluorouracil-loaded nanosystem for topical skin cancer therapy: *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* studies", en la III Latin American Federation of Biophysical Societies (LAFeBS) – IX Iberoamerican Congress of Biophysics – XLV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica (SAB) **2016**.

En el año 2017 realizó una estancia corta de investigación de cuatro meses en la Università degli Studi Magna Graecia di Catanzaro, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Advanced Drug Delivery Systems Laboratory, Italia, bajo la dirección de la Dra. Donatella Paolino. También llevó a cabo una pasantía de investigación en el INQUINOA-CONICET, Instituto de Química Física, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, bajo la dirección de la Dra. M. Eugenia Tuttolomondo, durante el 2019. Parte de los trabajos realizados dieron lugar a dos publicaciones en revistas científicas internacionales con referato y un artículo recientemente enviado para su revisión. Durante su doctorado también ha realizado diversos cursos teóricoprácticos:

1) Advanced School/Workshop on Protein-Protein and Protein-Membrane Interaction: Experimental and Theoretical Approaches (POSLATAM) - IUBMB-IUPAB (40 h). Varadero, Cuba, 22-26 de Octubre 2018.

2) V Latin American Zebrafish Network Course and Symposium - ICGEB-LAZEN (80 h). Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México, 4-12 de Mayo 2018.

3) Curso teórico-práctico Entrenamiento en el cuidado y uso de modelos animales para investigación - UNQ (40 h). Universidad Nacional de Quilmes, Argentina, 3 de Noviembre al 2 de Diciembre 2017, (Nota 9/10).

 Workshop Innovative technologies for biomolecules and nanoparticles characterization – Malvern Instruments (8 h). Università degli Studi Magna Graecia di Catanzaro, Catanzaro, Italia, 20 de Abril 2017.

 Workshop L'affascinante Mondo delle Emulsioni Cosmetiche – Società Italiana di Chimica e Scienze Cosmetologiche (SICC) (16 h). Milano, Italia, 28 y 29 de Marzo 2017.

6) IX POSLATAM Course: Quantitative imaging in Biophysics - International Union for Pure and Applied Biophysics (IUPAB) (40 h). San Miguel de Tucumán, Argentina, 21-25 de Noviembre 2016, (Nota 8/10).

7) Curso teórico-práctico Nanotecnologia para inovação da produção de biofármacos – CABBIO (80 h). Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, 16-27 de Noviembre 2015.

8) Curso teórico-práctico Microscopía de tejidos y células *in-vivo* - UNQ (80
h). Universidad Nacional de Quilmes, Argentina, 2-13 de Noviembre 2015, (Nota 10/10).

9) Curso teórico Elementos de producción científica y tecnológica - UNQ (28
h). Universidad Nacional de Quilmes, Argentina, 22-29 de Octubre 2015, (Nota 10/10).

10) **Curso teórico-práctico de HPLC – UNQ (40 h).** Universidad Nacional de Quilmes, Argentina, 5-9 de Octubre **2015**, (Nota 10/10).

11) **Curso teórico Bioética - UNQ (30 h).** Universidad Nacional de Quilmes, Argentina, 7-18 de Septiembre **2015**, (Nota 10/10).

12) **Curso teórico Ciencia, Tecnología y Sociedad – UNQ (30 h)**. Universidad Nacional de Quilmes, Argentina, 7-18 de Septiembre **2015**, (Nota 7/10).

13) **Curso teórico Diseño de experimentos - UNQ (30 h).** Universidad Nacional de Quilmes, Argentina, 18-22 de Mayo **2015**, (Nota 10/10).

Para la asistencia y participación en algunos de los cursos de posgrado y congresos científicos antes mencionados la doctoranda recibió becas de apoyo económico por parte de:

-Universidad Nacional de Quilmes y de la International Union for Pure and Applied Biophysics (IUPAB) para participar del XI POSLATAM course: IUBMB-IUPAB Advanced School/Workshop on Protein-Protein and Protein-Membrane Interaction: Experimental and Theoretical Approaches, Varadero, Cuba.

-Universidad Nacional Autónoma de México e International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology para participar del ICGEB-LAZEN 2018: V Latin American Zebrafish Network Course and Symposium, Cuernavaca, México.

-Sociedad Argentina de Biofísica para participar de la Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias, Buenos Aires, Argentina.

-European Foundation for Clinical Nanomedicine (CLINAM) para la participación en el 10<sup>th</sup> European and Global Conference and Exhibition for Clinical Nanomedicine & Targeted Medicine, Basilea, Suiza.

-International Union for Pure and Applied Biophysics (IUPAB) para la participación en el IX POSLATAM Course: Quantitative imaging in Biophysics, San Miguel de Tucumán, Argentina.

-Centro Argentino-Brasileño de Biotecnología (CABBIO) para la participación en el Curso teórico-práctico Nanotecnologia para inovação da produção de biofármacos, Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

La doctoranda además recibió subsidios y apoyo financiero para la investigación, y es integrante de un PICT Start Up:

-Integrante del PICT-2017-2083 (PICT Start Up) "Protectores solares y antioxidantes naturales formulados con micosporinas fúngicas" del FONCyT. Director: Dr. Martin Moliné, co-director: Dr. Diego Libkind Frati (08/2018-07/2020). -Subsidio de apoyo a la investigación para estudiantes de grado e investigadores en formación (SAI 2017) de la Universidad Nacional de Quilmes. Beneficiaria:

**Natalia Calienni.** Director: Dr. Jorge Montanari. Resolución (CS) Nº 1845/17. Monto: **\$16.000**.

-Subsidio Viajes y Viáticos para Investigadores en Formación (VIEF-2016) de la Universidad Nacional de Quilmes. Beneficiaria: **Natalia Calienni**. Resolución (CS) Nº 481/16. Monto: **\$20.000**.

-Subsidio de apoyo a la investigación para estudiantes de grado e investigadores en formación (SAI 2015) de la Universidad Nacional de Quilmes. Beneficiaria: **Natalia Calienni.** Director: Dr. Jorge Montanari. Resolución (CS) Nº 433/15. Monto: **\$12.000**.

Por otra parte, durante el desarrollo del doctorado, ha participado activamente en la formación de recursos humanos dentro de la esfera del laboratorio de pertenencia, así como dentro del Área Bioquímica de la Lic. en Biotecnología de la UNQ.

La doctoranda colabora en la dirección de los Seminarios de Investigación de los estudiantes: Gisela Eliane Gómez, María Cecilia Izquierdo y David Ybarra. Además, fue co-directora de la beca CIN de la estudiante Gisela Gómez (2018-2019), es actualmente co-directora de la beca CIN de la estudiante Cecilia Izquierdo (2019-2020), y es tutora del Auxiliar Alumno David Ybarra de las materias del Área Bioquímica de la Lic. en Biotecnología (2019).

También ha participado en la formación de la Lic. Eliana Lopez Venditti (Universidad Nacional del Comahue), durante su pasantía en el Laboratorio de Bio-Nanotecnología de la UNQ, en relación a ensayos de citotoxicidad *in vitro*.

Actualmente, la doctoranda es Profesora Instructora de Planta Interina de la UNQ con dedicación Simple, de la materia Bioquímica II de la Lic. en Biotecnología.

Por último, durante los años en los cuales desarrolló su doctorado participó en múltiples actividades de divulgación científica en escuelas y en la misma UNQ, y ha realizado diversas comunicaciones en medios de comunicación públicos (televisión, diarios, revistas y radios) para difundir su labor científica con toda la sociedad.

### <u>Índice</u>

Objetivos	.25
1. Introducción general	.27
1.1 Cáncer de piel	.29
1.1.1 Etiología, incidencia y mortalidad a nivel mundial	29
1.1.2 Principales tipos de cáncer de piel	.32
1.1.2.1 Carcinoma de células basales o carcinoma basocelular	32
1.1.2.2 Carcinoma de células escamosas o carcinoma espinocelular	33
1.1.2.3 Melanoma	34
1.1.3 Tratamientos contra el cáncer de piel	35
1.1.3.1 Terapia convencional y nuevos avances	35
1.1.3.2 Quimioterapia tópica convencional: 5-FU	37
1.1.3.3 Quimioterapia dirigida: Vismodegib	40
1.2 Nanomedicina y cáncer	.43
1.3 La piel humana	.48
1.3.1 Estructura y función	48
1.3.2 La epidermis	49
1.3.3 La dermis e hipodermis	52
Referencias	54
2. Obtención, caracterización y penetración cutánea de liposomas ultradeformabl	les
con 5-fluorouracilo	.59
2.1 Introducción	.61
2.2 Materiales y métodos	.64
2.2.1 Materiales	64
2.2.2 Métodos	64
2.2.2.1 Preparación de los liposomas ultradeformables	64
2.2.2.2 Eficiencia de encapsulación y relación droga-lípido	65
2.2.2.3 Determinación del tamaño, carga superficial y estabilidad coloidal	65
2.2.2.4 Interacción del 5-FU con la membrana liposomal	67
2.2.2.5 Prueba de deformabilidad	68
2.2.2.6 Liberación del 5-FU	69
2.2.2.7 Estudios de penetración cutánea in vitro	69

2.2.2.7.1 Tape stripping	70
2.2.2.7.2 Seccionamiento óptico mediante microscopía confocal	72
2.2.2.7.3 Obtención de cortes histológicos transversales	72
2.2.2.7.4 Declaración de ética	72
2.2.2.8 Análisis estadístico	73
2.3 Resultados	73
2.3.1 Caracterización fisicoquímica de los UDL-5FU	73
2.3.2 Interacción del 5-FU con la membrana liposomal	76
2.3.3 Prueba de deformabilidad	79
2.3.4 Liberación del 5-FU de los UDL-5FU	80
2.3.5 Estudios de penetración cutánea in vitro	81
2.4 Discusión	85
Referencias	89
3. Estudios de citotxicidad in vitro y de toxicidad in vivo de	liposomas
ultradeformables con 5-fluorouracilo	95
3.1 Introducción	97
3.2 Materiales y métodos	100
3.2.1 Materiales	100
3.2.2 Métodos	100
3.2.2.1 Obtención de un extracto de arándanos rico en antioxidantes	100
3.2.2.2 Preparación de los liposomas ultradeformables	101
3.2.2.3 Estudios in vitro con líneas celulares	101
3.2.2.3.1 Estudios de citotoxicidad	101
3.2.2.3.2 Estudios de activación de vías de muerte celular	103
3.2.2.3.3 Captura celular de los liposomas	103
3.2.2.4 Evaluación de la toxicidad in vivo en larvas de pez cebra	104
3.2.2.4.1 Tratamiento de las larvas	104
3.2.2.4.2 Cambios en la actividad de nado	105
3.2.2.4.3 Alteraciones del ritmo cardíaco y cambios morfológicos	105
3.2.2.4.4 Estudios histológicos	106
3.2.2.4.5 Declaración de ética	107
3.2.2.5 Análisis estadístico	107
3.3 Resultados	107
3.3.1 Estudios in vitro	107

3.3.1.1 Citotoxicidad 10	80
3.3.1.2 Captura celular 10	09
3.3.1.3 Muerte celular1	10
3.3.2 Estudios <i>in vivo</i>	11
3.3.2.1 Alteración de la actividad de nado1	12
3.3.2.2 Alteración del ritmo cardíaco y cambios morfológicos1	13
3.3.2.3 Estudios histológicos1	16
3.4 Discusión1	18
Referencias 12	21
4. Obtención, caracterización y penetración cutánea de liposomas ultradeformabl	les
con Vismodegib1	25
4.1 Introducción1	27
4.2 Materiales y métodos1	29
4.2.1 Materiales12	29
4.2.2 Métodos 12	29
4.2.2.1 Cuantificación mediante RP-HPLC 12	29
4.2.2.2 Extracción del principio activo Vis a partir de las cápsulas de Erivedge®1	30
4.2.2.3 Obtención de las nanoformulaciones liposomales 13	30
4.2.2.4 Determinación del tamaño, carga superficial y estabilidad 13	31
4.2.2.5 Relación droga-lípido, eficiencia de encapsulación y capacidad de carga	
	32
4.2.2.6 Interacción entre el Vis y la membrana liposomal 13	33
4.2.2.6.1 Grado de fluidez y empaquetamiento de la membrana 13	33
4.2.2.6.2 Calorimetría diferencial de barrido13	33
4.2.2.6.3 Espectroscopía infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR) 13	33
4.2.2.6.4 Espectroscopía Raman 13	34
4.2.2.6.5 Análisis por simulación de los UDL-Vis13	34
4.2.2.7 Prueba de deformabilidad 13	35
4.2.2.8 Penetración cutánea13	36
4.2.2.8.1 Recuperación y cuantificación del Vis luego del tape stripping 13	36
4.2.2.8.2 Microscopía confocal de muestras de piel 13	36
4.2.2.9 Análisis estadístico 13	37
4.3 Resultados1	37
	~-

4.3.2 Caracterización fisicoquímica de los UDL-Vis 13	38
4.3.3 Interacción droga-membrana liposomal 14	11
4.3.3.1 Análisis con sondas 14	11
4.3.3.2 Calorimetría diferencial de barrido 14	12
4.3.3.3 Análisis espectroscópico mediante FT-IR 14	12
4.3.3.4 Análisis por espectroscopía Raman 14	15
4.3.3.5 Simulaciones de dinámica molecular de la membrana de UDL-Vis 14	19
4.3.3.5.1 Análisis de descriptores moleculares de Vis 14	19
4.3.3.5.2 Análisis mediante dinámica molecular 15	51
4.3.4 Prueba de deformabilidad 15	54
4.3.5 Penetración en piel humana 15	55
4.4 Discusión15	58
Referencias	51
5. Estudios de citotoxicidad in vitro y de toxicidad in vivo de liposoma	as
ultradeformables con Vismodegib16	37
5.1 Introducción	39
5.2 Materiales y métodos16	39
5.2.1 Materiales	39
5.2.2 Métodos 17	70
5.2.2.1 Preparación de los liposomas ultradeformables	70
5.2.2.2 Estudios in vitro con líneas celulares 17	70
5.2.2.1 Estudios de citotoxicidad 17	70
5.2.2.2 Estudios de activación de vías de muerte celular 17	71
5.2.2.3 Captura celular 17	71
5.2.2.3 Evaluación de la toxicidad in vivo en larvas de pez cebra 17	72
5.2.2.3.1 Tratamiento de los peces 17	72
5.2.2.3.2 Cambios en la actividad de nado, alteraciones del ritmo cardíaco	у
cambios morfológicos 17	73
5.2.2.3.3 Declaración de ética 17	73
5.2.2.4 Análisis estadístico 17	73
5.3 Resultados17	74
5.3.1 Estudios <i>in vitro</i>	74
5.3.1.1 Citotoxicidad	74
5.3.1.2 Muerte celular	77

5.3.1.3 Captura celular de los liposomas	178
5.3.2 Estudios in vivo	179
5.3.2.1 Alteraciones en la actividad de nado	180
5.3.2.2 Alteraciones del ritmo cardíaco y cambios morfológicos	181
5.4 Discusión	183
Referencias	185
6. Caracterización teórica y experimental de la molécula Vismodegib	187
6.1 Introducción	189
6.2 Materiales y métodos	190
6.2.1 Materiales	190
6.2.2 Métodos	190
6.2.2.1 Extracción del Vis a partir de las cápsulas comerciales	190
6.2.2.2 Análisis espectroscópicos	190
6.2.2.2.1 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR)	190
6.2.2.2 Espectroscopía Raman	190
6.2.2.3 Métodos computacionales	191
6.3. Resultados	192
6.3.1 Estructura molecular	192
6.3.2 Análisis NBO	195
6.3.3 Análisis AIM	196
6.3.4 Análisis vibracional	199
6.4 Discusión	201
Referencias	203
7. Conclusiones finales	205
Perspectivas a futuro	213

### <u>Objetivos</u>

El objetivo general de este trabajo fue el de contribuir al tratamiento del cáncer de piel mejorando la *performance* de principios activos que accederían a los sitios blanco por la vía tópica, disminuyendo efectos colaterales y aumentando eficacia de acción por medio de toxicidad sitio-específica.

Los objetivos específicos fueron el desarrollar formulaciones nanotecnológicas para principios activos utilizados en terapias contra el cáncer de piel, caracterizarlos fisicoquímicamente, evaluar su citotoxicidad *in vitro* y toxicidad *in vivo* (en el modelo pez cebra), y estudiar su penetración en piel por medio del Método de Penetración de Saarbrücken.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1.1 Cáncer de piel

### 1.1.1 Etiología, incidencia y mortalidad a nivel mundial

El cáncer es una enfermedad compleja, heterogénea y agresiva, y es globalmente considerada como un desafío en términos de manejo clínico. Se trata de un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado y la propagación de células anormales, que puede derivar en la muerte si no se controla (American Cancer Society 2015). El cáncer es causado por factores externos tales como el tabaco, agentes infecciosos y una dieta poco saludable, y por factores internos, como mutaciones genéticas heredadas, hormonas y afecciones inmunitarias (American Cancer Society 2015). A menudo suelen transcurrir varios años entre la exposición a factores externos y el desarrollo del cáncer. Los datos recientes de GLOBOCAN a nivel mundial estiman 18,1 millones de nuevos casos y 9,6 millones de muertes por cáncer en 2018 (Bray et al. 2018).

En el caso particular del cáncer de piel, son el carcinoma de células basales (BCC) y el carcinoma de células escamosas (SCC) los que presentan mayor frecuencia de aparición; ambos derivan de las células de la epidermis viable (Karimkhani et al. 2015). En el 2018, la incidencia de cáncer de piel no melanoma superó el millón de casos (Fig. 1A), lo que corresponde al 5,8% de todos casos de cáncer en el mundo (Bray et al. 2018). El melanoma cutáneo, el cual deriva de los melanocitos (Gray-Schopfer et al. 2007), es menos frecuente que los anteriores. Sin embargo, la tasa de supervivencia de los pacientes en estadios avanzados de la enfermedad es aún baja (Domingues et al. 2018). El número de casos de melanoma cutáneo ha aumentado en los últimos años, con una incidencia estimada de 287.723 casos en 2018 (Fig. 2A), lo que corresponde al 1,6% de todos los cánceres en el mundo (Bray et al. 2018). En comparación con el cáncer de piel no melanoma, que es responsable de 65.155 muertes (0,7%) por año (Fig. 1B), la mortalidad por melanoma cutáneo (Fig. 2B) alcanza el 0,6% (60.712 muertes) a pesar de ser menos frecuente (Bray et al. 2018).

Existen otros tipos de cáncer de piel no melanoma, pero son mucho menos frecuente que los anteriores, como el carcinoma de células de Merkel, linfoma cutáneo de células T, tumores que se originan en los folículos pilosos o en las glándulas sudoríparas, varios tipos de sarcomas (PDQ Adult Treatment Editorial



Board 2018). De acuerdo al *National Institudes of Health* (NIH) de USA, el cáncer de piel es más frecuente en las latitudes meridionales del hemisferio norte.

Figura 1. Tasas anuales por 100.000 de incidencia (A) y de mortalidad (B) en 2018 de cáncer de piel no melanoma a nivel mundial para ambos sexos y todas las edades. Los valores se expresan en ASR por sus siglas en inglés (*age-standardised rate*), tasa relativa ajustada por edad. Fuente: adaptación de los datos de GLOBOCAN 2018, Agencia Internacional de Investigaciones en Cáncer y de la Organización Mundial de la Salud (http://gco.iarc.fr).



Figura 2. Tasas anuales por 100.000 de incidencia (A) y de mortalidad (B) en 2018 de cáncer de piel melanoma a nivel mundial para ambos sexos y todas las edades. Los valores se expresan en ASR por sus siglas en inglés (*age-standardised rate*), tasa relativa ajustada por edad. Fuente: adaptación de los datos de GLOBOCAN 2018, Agencia Internacional de Investigaciones en Cáncer y de la Organización Mundial de la Salud (http://gco.iarc.fr).

Los factores de riesgo varían según los diferentes tipos de cáncer de piel. Para todos los casos la exposición acumulada en el tiempo al sol y la radiación ultravioleta (UV), incluso por el uso de camas salares, y la sensibilidad cutánea individual (quemarse con facilidad o presentar dificultad para broncearse, tener tez y ojos claros y/o color de cabello pelirrojo o rubio, trastornos heredados como xerodermia pigmentosa, albinismo, síndrome KID: queratitis-ictiosis-sordera, entre otros), son los principales factores de riesgo (American Cancer Society 2015; PDQ Adult Treatment Editorial Board 2018). Sin embargo, el tipo de exposición (exposición a una intensidad alta y de corta duración vs. exposición crónica) y la modalidad de exposición (patrón continuo vs. patrón intermitente) puede diferir entre los tres tipos principales de cáncer de piel (Schwartz 2008). También son factores de riesgo tener enfermedades o estar sujeto a tratamientos que suprimen el sistema inmunológico, tener antecedentes familiares o personales de cáncer de piel, inflamación cutánea crónica, lesiones precancerosas como la queratosis actínica, o bien ciertos factores ambientales, como por ejemplo la exposición al arsénico que aumenta el riesgo particular de contraer SCC (PDQ Adult Treatment Editorial Board 2018), la exposición repetida a rayos x, ciertas toxinas, virus, el tabaquismo y factores ocupacionales (Gupta & Trivedi 2018). Para el caso particular del melanoma, los principales factores de riesgo incluyen la presencia de lunares atípicos, grandes o numerosos (más de 50) (American Cancer Society 2015).

A pesar del aumento de la conciencia pública sobre los efectos nocivos de la exposición al sol, la incidencia y la morbilidad del cáncer de piel siguen aumentando (Gupta & Trivedi 2018), lo que ha generado un gran interés en desentrañar su etiología y la búsqueda de nuevas estrategias de tratamiento no invasivas.

### 1.1.2 Principales tipos de cáncer de piel

### 1.1.2.1 Carcinoma de células basales o carcinoma basocelular

El BCC es el tipo más común de cáncer de piel y consiste en el 80% de todos los casos (Bik & Thio 2019), y es por lo menos tres veces más frecuente que el SCC en pacientes sin inmunodepresión (PDQ Adult Treatment Editorial Board 2018). Se origina a partir de las células basales de la epidermis, tiene un crecimiento lento, generalmente se diagnostica en etapas tempranas y rara vez produce metástasis (Bik & Thio 2019). Por lo habitual, se presenta en las áreas de la piel expuestas al sol, y tiende a causar destrucción local, producir deformidad grave y puede extenderse a áreas próximas, pudiendo de esta forma invadir

estructuras vitales como el ojo, nariz, conducto auditivo, etc., si no se trata o si no se puede extirpar por completo (Fig. 3).

Si bien existen muchos cuadros clínicos diferentes de BCC, el tipo más característico es la lesión nodular asintomática o nodular ulcerosa en la que se eleva de la piel circundante, tiene aspecto nacarado y contiene vasos telangiectásicos. Los BCC a menudo presentan una mutación característica en el gen supresor tumoral *Patched-1* (PTCH1), aunque el mecanismo de carcinogénesis no está totalmente clarificado (PDQ Adult Treatment Editorial Board 2018).



Figura 3. Representación de la morfología de algunos tipos de lesiones relacionadas con el BCC. Fuente: https://dermskincancercenter.com.

### 1.1.2.2 Carcinoma de células escamosas o carcinoma espinocelular

El SCC representa el 20% de todos los casos de cáncer de piel no melanoma (Bik & Thio 2019) y son más peligrosos que los BCC. Sin embargo, varían en cuanto al potencial de crecimiento, invasión y metástasis. Se origina a partir de queratinocitos de la epidermis y tienden a aparecer en las partes de la piel expuestas al sol, como las orejas, nariz, el labio inferior y el dorso de las manos (Fig. 4).

La enfermedad de Bowen (o SCC *in situ*) es la forma más temprana de SCC (PDQ Adult Treatment Editorial Board 2018). Se trata de una lesión no invasiva y que no se propaga a tejidos cercanos porque es superficial y el riesgo de que se transforme en un SCC invasivo es bajo, 3-4 % (Kao 1986). Por otra parte, las queratosis actínicas, lesiones precancerosas, son posibles precursores de los SCC, pero la tasa de progresión es muy baja y la gran mayoría no se transforma en SCC (PDQ Adult Treatment Editorial Board 2018). Los SCC que derivan de queratosis

actínicas previas tienen menos posibilidades de hacer metástasis en comparación a aquellos que se originan *de novo* o que aparecen en zonas de la piel no expuestas al sol (Wagner & Casciato 2000).



Figura 4. Representación de la morfología de un tipo posible de lesión producida por SCC. Adaptada de: https://mesadentalsd.com.

### 1.1.2.3 Melanoma

El melanoma es el cáncer de piel más peligroso y se origina en los melanocitos. La mayoría de las células del melanoma continúan produciendo melanina de modo que estos tumores usualmente son de color café o negro. Sin embargo, algunos melanomas no producen melanina y pueden lucir color rosado o incluso blanco. Los melanomas pueden aparecer en cualquier parte de la piel (Fig. 5), pero son más propensos a comenzar en el tronco (pecho y espalda) de los hombres y en las piernas de las mujeres. El cuello y el rostro son otros sitios comunes.

Los melanomas detectados tempranamente se pueden curar mediante escisión quirúrgica. No obstante, los melanomas pueden rápidamente invadir tejidos vecinos y hacer metástasis, por lo que la supervivencia a largo plazo es pobre para la enfermedad avanzada (Gupta & Trivedi 2018).



Figura 5. Representación de la morfología de un tipo posible de lesión producida por melanoma. Fuente: https://dermskincancercenter.com.

### 1.1.3 Tratamientos contra el cáncer de piel

### 1.1.3.1 Terapia convencional y nuevos avances

La mayoría de los cánceres de piel en estadios tempranos se diagnostican y tratan mediante extirpación y examen microscópico de las células. Sin embargo, los tratamientos dependerán del tipo de cáncer, cuán grande es el tumor, la localización del mismo en el cuerpo, su grado de avance y estadio, entre otros factores.

Los BCC y SCC en etapas tempranas pueden tratarse en la mayoría de los casos por diversos métodos: escisión quirúrgica, cirugía micrográfica de Mohs, electrodesecación y legrado, o criocirugía (American Cancer Society 2015). La radioterapia y ciertos medicamentos tópicos se utilizan en particular luego de la cirugía en aquellos casos con un alto riesgo de propagación (American Cancer Society 2016). Sin embargo, estos tratamientos convencionales son invasivos y generan inflamación severa y dolor. Además, estos tumores se presentan principalmente en áreas expuestas al sol crónicamente, como la cara, las orejas, el cuero cabelludo y las manos; por ende, tanto el impacto físico como emocional de la escisión son significativos para los pacientes (Youl et al. 2011). En algunos casos las lesiones son tan extensas que después de la cirugía para eliminar el BCC o SCC no posible estirar la piel contigua lo suficiente como para poder suturar los bordes de la herida, por lo que se recurre a injertos de piel sana de otra parte del cuerpo (American Cancer Society 2016). Actualmente existen algunos agentes
quimioterapéuticos tópicos, como el 5-fluorouracilo (5-FU) e imiquimod, que se utilizan principalmente para tratar lesiones precancerosas, como la queratosis actínica, pero también en estadios iniciales de BCC y de SCC donde las lesiones son localizadas y muy superficiales (PDQ Adult Treatment Editorial Board 2018).

La terapia fotodinámica (PDT) con fotosensibilizadores ofrece una alternativa efectiva para el tratamiento de lesiones precancerosas como la queratosis actínica, y ha demostrado ser efectiva para algunos BCC superficiales (Cohen & Lee 2016). Para el caso de BCC nodulares y la enfermedad de Bowen se reportó una respuesta aceptable a tratamientos con PDT, aunque las tasas de recurrencia fueron mucho más elevadas. En Argentina, en el año 2017, la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) autorizó el uso de Metvix<sup>®</sup> (metil 5-aminolevulinato) tópico (Disposición Nº 0157-17), como agente fotosensibilizador, para PDT en el tratamiento de queratosis actínica, BCC superficial y/o nodular y la enfermedad de Bowen en adultos mayores a 18 años.

En el caso del melanoma, éste se trata principalmente mediante cirugía, ya que pueden ser resistentes a las quimio y radioterapias convencionales (Gupta & Trivedi 2018), removiendo tanto el crecimiento primario como el tejido normal circundante y, a veces, se realiza también una biopsia de un ganglio linfático centinela para determinar el estadio (American Cancer Society 2015). Puede ser necesaria una cirugía más extensa de los ganglios linfáticos si los ganglios centinela están afectados. Los melanomas con invasión profunda o que se han diseminado a los ganglios linfáticos pueden tratarse luego de la cirugía con inmunoterapia, quimioterapia y/o radioterapia. Para algunos pacientes metastásicos, la quimioterapia sistémica (con dacarbazina, temozolomida o carboplatino/paclitaxel) sigue desempeñando un papel importante (Gupta & Trivedi 2018). Aunque el tratamiento del melanoma avanzado fue cambiando en los últimos años con la aprobación por parte de la U.S. Food and Drug Administration (FDA) de terapias dirigidas como los inhibidores de BRAF vemurafenib (Zelboraf<sup>®</sup>), dabrafenib (Tafinlar<sup>®</sup>) y trametinib (Mekinist<sup>TM</sup>), para pacientes que presentan el gen BRAF mutado, y el medicamento de inmunoterapia ipilimumab (Yervoy<sup>®</sup>), un anticuerpo monoclonal IgG1 recombinante, totalmente humano, contra el antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA-4) (American Cancer Society 2015). Si bien se han obtenido progresos en el tratamiento del melanoma mediante terapias

dirigidas e inmunoterapias, continúa siendo una enfermedad difícil de controlar una vez que se extiende a otros órganos (Gupta & Trivedi 2018).

#### 1.1.3.2 Quimioterapia tópica convencional: 5-FU

La quimioterapia convencional consiste en el uso de medicamentos para combatir las células cancerosas. Usualmente se administran por vía intravenosa u oral. Estos medicamentos viajan a través del torrente sanguíneo a todas las partes del cuerpo y atacan a las células cancerosas, pero también a las células sanas. Como las células cancerosas suelen dividirse más rápido que la mayoría de las células normales, la quimioterapia tiene mayor efecto en las primeras. Debido a que la quimioterapia convencional es un tratamiento sistémico, es decir, los fármacos alcanzan todas las áreas del cuerpo, trae aparejados efectos secundarios no deseados y severos.

El término quimioterapia tópica se utiliza para señalar a aquellos principios activos (PA) contra el cáncer que se aplican directamente sobre la piel (usualmente en una crema, ungüento o gel), en lugar de administrarse por vía oral o ser inyectado. Debido a que el PA sólo se aplica en el sitio de la lesión, éste no se propaga por todo el cuerpo. Por lo tanto, no causa los mismos efectos secundarios que la quimioterapia sistémica, pero puede ocasionar efectos locales tales como inflamación, incremento en la sensibilidad de la zona y enrojecimiento, entre otros.

El 5-FU es el quimioterapéutico más frecuente para el tratamiento tópico (Efudex<sup>®</sup>, Carac<sup>™</sup> y Fluoroplex<sup>®</sup>) de queratosis actínica, desde su aprobación en 1970 por la FDA (Barrera & Herrera 2007), así como en algunos casos de BCC y SCC (enfermedad de Bowen) superficiales. Por lo general se aplica sobre la piel una o dos veces al día por varias semanas. El 5-FU elimina las células cancerosas cercanas a la superficie de la piel, pero no puede alcanzar a las células cancerosas más profundas o aquellas que se han extendido a otros órganos. Por este motivo, el 5-FU suele utilizarse solamente en afecciones precancerosas y para algunos cánceres de piel muy superficiales. El 5-FU es un análogo de uracilo que ejerce su acción a través de la inhibición de la enzima timidilato sintetasa (TS) y mediante la incorporación de sus metabolitos en el ARN y el ADN (Fig. 6) (Longley et al. 2003).

La TS cataliza la metilación del monofosfato de desoxiuridina (dUMP) para conventirlo en el monofosfato de desoxitimidina (dTMP), con el 5,10metilentetrahidrofolato como donante del grupo metilo. Esta reacción proporciona la única fuente de novo de timidilato, que es necesaria para la replicación y reparación del ADN. El agotamiento de dTMP da como resultado el agotamiento posterior del trifosfato de desoxitimidina (dTTP), lo cual genera alteraciones en los niveles de los otros desoxinucleótidos (dATP, dGTP y dCTP), interrumpiendo gravemente la reparación y la síntesis del ADN. Además, la inhibición de la TS da como resultado la acumulación de dUMP, lo que posteriormente conduce a un aumento de los niveles de trifosfato de desoxiuridina (dUTP). Tanto el dUTP como el metabolito derivado del 5-FU, el FdUTP, pueden incorporarse erróneamente en el ADN. La reparación del ADN que contiene uracilo y 5-FU mediante la enzima reparadora uracil-ADN-glicosilasa, resulta inútil en presencia de relaciones altas de (F)dUTP / dTTP y solo resulta en más incorporaciones erróneas. Estos ciclos fútiles de incorporación errónea, escisión y reparación conducen eventualmente a roturas de la cadena de ADN y la muerte celular. Por otra parte, el metabolito derivado del 5-FU fluorouridina trifosfato (FUTP) se incorpora ampliamente en el ARN, interrumpiendo el procesamiento y la función normal del mismo. No sólo inhibe el procesamiento de pre-rRNA en rRNA maduro, sino que también interrumpe la modificación post-transcripcional de tRNAs y el ensamblaje y la actividad de los complejos snRNA/proteína, inhibiendo así el corte y empalme de pre-mRNA (Longley et al. 2003). La actividad inhibitoria del 5-FU, por su analogía con el uracilo, tiene un mayor efecto sobre las células neoplásicas en veloz crecimiento, las cuales aprovechan preferentemente la molécula de uracilo para la biosíntesis de ácidos nucleicos.



Figura 6. Metabolismo del 5-FU. Una vez que ingresa a la célula, el 5-FU es metabolizado a diferentes metabolitos: fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP), fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) y fluorouridina trifosfato (FUTP). El mecanismo principal de activación del 5-FU es la conversión a fluorouridina monofosfato (FUMP), ya sea directamente mediante la enzima orotato fosforribosiltransferasa (OPRT) con fosforribosil pirofosfato (PRPP) como cofactor, o indirectamente a través de la fluorouridine (FUR) mediante la acción secuencial de la uridina fosforilasa (UP) y uridina quinasa (UK). FUMP luego se fosforila a fluorouridina difosfato (FUDP), que se puede fosforilar aún más hasta FUTP, o se puede convertir en fluorodesoxiuridina difosfato (FdUDP) mediante la ribonucleótido reductasa (RR). Una ruta de activación alternativa implica la conversión catalizada por la timidina fosforilasa (TP) de 5-FU en fluorodesoxiuridina (FUDR), que luego es fosforilada por la timidina quinasa (TK) a FdUMP (inhibidor de la TS). La conversión mediada por dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD) de 5-FU en dihidrofluororacilo (DHFU) es el paso limitante de la velocidad del catabolismo por 5-FU en células normales y tumorales. En el recuadro se muestra la molécula del 5-FU. La figura fue adaptada de Longley et al., 2003.

El 5-FU tópico genera algunos efectos secundarios tales como irritación, eritema, erosión, reacción inflamatoria local intensa y tumefacción, prurito,

exudado, rash cutáneo, hiperpigmentación, aparición de costras, dermatitis por contacto, dolor, fotosensibilidad y ulceración (síntomas indicados en el prospecto). Otras desventajas son el período de tratamiento relativamente largo y la ineficacia parcial del tratamiento en las capas profundas de la piel, como en los casos de queratosis actínica hiperqueratósica (Barrera & Herrera 2007).

#### 1.1.3.3 Quimioterapia dirigida: Vismodegib

La terapia dirigida consiste en el tratamiento que acciona en forma específica sobre blancos moleculares localizados en la superficie o el interior de las células tumorales, necesarios para el crecimiento, avance y diseminación del cáncer, interfiriendo, por lo tanto, en el proceso de carcinogénesis y crecimiento tumoral. A diferencia de la quimioterapia convencional que actúa sobre las células de rápido crecimiento sin distinción entre células normales y las cancerosas, las terapias dirigidas actúan sobre una población celular portadora del blanco específico al cual se encuentran dirigidas, actuando sobre los cambios que promueven el crecimiento, la división y diseminación de las células cancerosas (Do & Kummar 2020). Sin embargo, el paciente puede sufrir efectos secundarios que dependerán de la terapia y de las características del propio paciente.

Los principales tipos de terapias dirigidas están constituidos por las llamadas moléculas pequeñas y los anticuerpos monoclonales (Kue et al. 2016). Las quimioterapias dirigidas son con frecuencia citostáticas, mientras que los fármacos convencionales de quimioterapia son citotóxicos (Do & Kummar 2020).

Si bien la mayoría de los BCC se tratan quirúrgicamente, estas lesiones ocasionalmente progresan a un estado localmente avanzado que no puede ser tratado mediante cirugía o radioterapia, recidiva después de una cirugía o, menos frecuentemente, las lesiones se extienden a sitios distantes generando metástasis. Hasta el 2012 no existía una terapia eficaz para estos tipos de BCC localmente avanzado o metastásico (Sekulic et al. 2012) y el enfoque terapéutico para estos pacientes estaba representado exclusivamente por la quimioterapia convencional con limitados beneficios. En sus formas avanzadas, el BCC puede ser desfigurante y potencialmente mortal, y alrededor del 85% de los BCC metastásicos se originan

en la cabeza, el cuello o en la cara (Walling et al. 2004) próximos a órganos sensoriales. En estos pacientes, las opciones terapéuticas existentes podían resultar en una severa desfiguración y potencialmente en la pérdida de órganos y funciones como la vista y el oído (Wong et al. 2003). Por otra parte, en los casos en los que se expandió a otros órganos del cuerpo, como los ganglios linfáticos, los pulmones, los huesos, otros sitios de la piel y el hígado, el pronóstico era muy pobre (Ting et al. 2005).

En el 2012 la FDA y en el 2013 la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) aprobaron el Vismodegib (Vis), 2-cloro-N-[4-cloro-3-(piridin-2-il)fenil]-4- (metilsulfonil)benzamida (Erivedge<sup>®</sup>), el primer inhibidor selectivo de su clase de la proteína transmembrana *Smoothened* (SMO) que actúa sobre la vía de señalización Hedgehog (Hh), para el tratamiento de pacientes adultos con BCC localmente avanzado o metastásico (Bernardini et al. 2019).

Brevemente, la vía Hh se activa mediante la unión de un ligando de Hh al receptor transmembrana *Patched-1* (PTCH1), lo cual elimina la inhibición mediada por PTCH1 sobre SMO, un receptor acoplado a proteína G, promoviendo la activación de genes diana de la vía, incluidos PTCH1 y Gli1 (Fig. 7) (Frampton & Basset-Séguin 2018). Si bien esta vía constituye un regulador clave de la proliferación celular, la diferenciación y la organogénesis durante el desarrollo embrionario, se encuentra inactiva en la mayoría de los tejidos en adultos (Barakat et al. 2010). Las alteraciones genéticas que conducen a una activación constitutiva aberrante de la señalización de Hh, como mutaciones desactivantes de PTCH1 o, con menor frecuencia, mutaciones de ganancia de función en SMO, están asociadas con el desarrollo de la mayoría de los BCC (Frampton & Basset-Séguin 2018; Sekulic et al. 2012).



Figura 7. Vía de señalización de Hh y el mecanismo de acción del Vis. Cuando cualquiera de los 3 ligandos de Hh de mamíferos (Sonic, Indian o Desert Hedgehog) se unen a PTCH1 en la superficie celular, se elimina la inhibición que ejerce PTCH1 sobre SMO, el activador clave de la vía. La deficiencia de PTCH1, que se encuentra en la mayoría de BCC, está asociada con la activación constitutiva e independiente de ligando de SMO. Las señales de SMO, a través del intermediario Sufu, promueven la liberación de los factores de transcripción de la familia Gli, que luego se pueden traslocar al núcleo para afectar la transcripción genética. Existen múltiples proteínas Gli cuyas funciones dependen en cierta medida del tipo de célula; en general, Gli2 parece ser un potente activador de la transcripción de genes junto con Gli1, mientras que Gli3 es un inhibidor en la mayoría de los contextos. La activación de la vía promueve la transcripción de múltiples genes diana, incluidos los reguladores clave de la vía Hh, en particular Gli1 y PTCH1. Vis se une al dominio extracelular de SMO, inhibiendo la señalización posterior, incluso en ausencia de PTCH1.

En Argentina en el 2015 la ANMAT autorizó el uso de Erivedge<sup>®</sup>. La administración del mismo se realiza por vía oral y entre los efectos secundarios más comunes se encuentran, con una frecuencia leve a moderada, los espasmos musculares, alopecia, disgeusia o ageusia, pérdida de peso, fatiga, náuseas, diarrea, disminución del apetito, estreñimiento, artralgia, amenorrea y vómitos (síntomas reportados en el prospecto). Además, basado en su mecanismo de

acción, el Vis puede causar la muerte embriofetal o defectos congénitos graves cuando se administra a una mujer embarazada. En los estudios pre-clínicos de reproducción en animales, Vis fue embriotóxico, fetotóxico y teratogénico (Meiss et al. 2018) frente a exposiciones maternas menores que la dosis recomendada (150 mg/día) en humanos. Pese a los efectos secundarios, el Vis ha demostrado tener elevadas tasa de respuesta y eficacia a largo plazo en pacientes con BCC avanzado (Sekulic et al. 2017).

#### 1.2 Nanomedicina y cáncer

La nanotecnología, entendida como el diseño, control y manipulación de la materia en la escala nanométrica (Taniguchi et al. 1974), constituye un campo multidisciplinario en el que un conjunto de ciencias y tecnologías construyen un nuevo enfoque de sus métodos y objetivos a partir de la posibilidad de tener un acceso nunca antes logrado a unidades estructurales mínimas materiales, como los átomos o moléculas. En particular, la nanomedicina comprende la aplicación de la nanotecnología a la medicina (Freitas 1999), brindando la posibilidad de avanzar hacia diagnósticos y tratamientos mucho más precisos y específicos a través del trabajo a nivel subcelular y molecular. Uno de los principales roles de la Nanomedicina, es el transporte direccionado de PA, mediante nanosistemas de entrega de activos (NEA) (Fig. 8). Los NEA posibilitan el control espacio-temporal de la llegada del PA a las células blanco, dado que su farmacocinética y biodistribución ya no dependerá de su propia estructura – y por ende tampoco de sus propias características fisicoquímicas- sino de la del NEA (Wicki et al. 2015). Así, en cada caso la estructura de los NEA puede diseñarse para conseguir que los PA alcancen un determinado blanco celular o intracelular, siguiendo una determinada cinética de liberación.



Figura 8. Ilustración esquemática de diferentes NEA utilizados para tratamientos contra el cáncer. Adaptada de Wicki et al., 2015.

Por otra parte, la vía tópica cutánea ofrece como ventaja para el tratamiento del cáncer de piel que permite la aplicación directa de formulaciones en el sitio de acción, evadiendo el metabolismo de primer paso en el hígado y posibilitando una administración no invasiva. Sin embargo, el acceso de los PA a la piel está limitado por la barrera impermeable del estrato córneo (SC) (Jain et al. 2017) y por sus características fisicoquímicas (Ye et al. 2019). Es en este punto que la nanomedicina provee las herramientas para poder sortear dicha barrera y que permiten el transporte direccionado de PA a través de los NEA. De este modo, se puede lograr un direccionamiento selectivo, maximizar los efectos de un PA administrando cantidades drásticamente menores del mismo, así como se pueden minimizar los efectos colaterales debidos a la presencia del PA en otros tejidos a donde hubiese llegado de haber sido administrado en forma libre o con excipientes convencionales, y donde podría ser tóxico (Jiang et al. 2018). Los NEA capaces atravesar la piel lo hacen a través de los nanocanales hidrofílicos existentes entre el arreglo en capas estrechas de corneocitos (Cevc & Blume 2004) y/o a través del folículo piloso (El Maghraby et al. 2008), o bien, pueden proveer de un reservorio desde el cual se libera controladamente un PA, aumentando su concentración en la superficie de la piel y su permeación, además de proteger químicamente al PA (Jiang et al. 2018).

Los liposomas son uno de los transportadores de PA más estudiados para el tratamiento del cáncer (Taveira & Lopez 2011). Son vesículas coloidales biocompatibles y biodegradables, compuestas principalmente por fosfolípidos. Los fosfolípidos son capaces de autoensamblarse espontáneamente en medio acuoso dada su naturaleza anfifílica, dando origen a diferentes arreglos supramoleculares dependiendo de su geometría, estructura química y concentración (Fig. 9), y de variables externas tales como la temperatura, presión, pH y fuerza iónica de la fase acuosa (Wardhan & Mudgal 2017). La formación de diferentes agregados lipídicos es el resultado principalmente de fuerzas hidrofóbicas, que impulsan a las colas hidrocarbonadas de los fosfolípidos a alejarse de las moléculas de agua e interactuar con otras colas hidrofóbicas vecinas. Las estructuras supramoleculares formadas son estabilizadas además por fuerzas de Van der Waals, entre las cadenas de acilo hidrófobas adyacentes, y por los enlaces puente de hidrógeno e interacciones electrostáticas entre las cabezas polares de los fosfolípidos y las moléculas de agua. Sin embargo, la contribución de éstas últimas es siempre menor que la de las fuerzas hidrofóbicas (Wardhan & Mudgal 2017).



Grado de curvatura de los arreglos supramoleculares

Figura 9. Esquema representativo de diferentes arreglos supramoleculares que pueden adoptar los fosfolípidos espontáneamente en medio acuoso de acuerdo a su geometría molecular y naturaleza anfifílica.

Los liposomas son vesículas en las cuales un volumen acuoso está encerrado dentro de una membrana compuesta por una bicapa lipídica. Cuando

determinados tipos de fosfolípidos se dispersan en un medio acuoso dan origen a una población de liposomas con múltiples lamelas concéntricas cuyo diámetro varía desde los nanómetros hasta los micrómetros. Los liposomas pueden reducirse en tamaño y lamelaridad, hasta obtenerse una población de vesículas con una única bicapa lipídica – liposomas unilamelares – y dentro de un rango de tamaño deseado, mediante procesos de extrusión por medio del pasaje a través de membranas de poros de tamaño definido, o mediante sonicación (Fig. 10).



Figura 10. Esquema representativo de las vesículas obtenidas mediante el método utilizado en ente trabajo. Luego de la hidratación de la película de lípidos se obtiene una población de vesículas de diversos tamaños que pueden ir desde los 100 a los 1000 nm, y que consisten en múltiples lamelas concéntricas que encierran espacios acuosos entre ellas. Luego del proceso de extrusión o sonicación se obtienen vesículas unilamelares y con un tamaño más homogéneo –alrededor de los 100 nm en el presente trabajo–.

Para la vía tópica cutánea, uno de los NEA de base lipídica que ha logrado con éxito el transporte de activos a través del SC son los liposomas ultraderformables (UDL) (Cevc & Blume 1992; Honeywell-Nguyen & Bouwstra 2005), compuestos por una mezcla de fosfolípidos de simetría de cono truncado y sales biliares como surfactantes (Fig. 11). Estas vesículas poseen una energía elástica en el orden de la energía térmica ambiente, que es casi 20 veces más baja que la de los liposomas convencionales, lo cual les confiere una elevada deformabilidad que les permite impulsarse espontáneamente hacia estratos profundos de la piel impulsados por el gradiente de hidratación entre el exterior del SC y el interior de la epidermis viable (Verma et al. 2003). Este fenómeno ocurre conjuntamente con el ensanchamiento del espacio entre corneocitos, también promovido por estas fuerzas originadas por el gradiente transepitelial, que genera

unos nanocanales de entre 20 y 40 nm de diámetro (Cevc 1996; Aguilella et al. 1994) a través de los cuales ocurre la penetración de los UDL. Dado que los nanocanales hidrofílicos en el SC poseen un diámetro efectivo varias veces por debajo de los liposomas convencionales, su tamaño y/o ausencia de elasticidad dificultan su penetración cutánea. En el ambiente seco de la superficie del SC, los liposomas convencionales coalescen y se fusionan, y sólo funcionan como depósitos para la liberación sostenida del fármaco (Abraham & Downing 1990; Hofland et al. 1995). Los UDL pueden encapsular tanto PA hidrofóbicos (en la membrana), hidrofílicos (en su núcleo acuoso), así como compuestos anfifílicos que pueden interaccionar con las superficies de la membrana mediante interacciones electrostáticas y/o hidrofóbicas.



Figura 11. Representación esquemática de un liposoma ultradeformable formado por fosfatidilcolina y colato de sodio como activador de borde.

Cevc y Blume (1992) fueron los primeros en trabajar con los UDL, y Cevc patentó los mismos en el año 1991 con el nombre de *Transfersomes*<sup>™</sup> (Schätzlein & Cevc 1998). Estos UDL estaban compuestos por fosfatidilcolina de soja y colato de sodio como activador de borde. En las últimas décadas, los UDL han sido estudiados para un amplio rango de aplicaciones en el campo de la tecnología farmacéutica como transportadores para la vía tópica cutánea, y diversidad de PA se han encapsulado dentro de UDL mejorar su eficacia terapéutica (Hussain et al. 2017). En estos últimos años se han reportado numerosos trabajos en los que se utilizaron UDL para la aplicación tópica tanto de agentes quimioterapéuticos y efectores para terapia fotodinámica contra diferentes tipos de cáncer de piel, así como para otras enfermedades y prevención del fotodaño (Rai et al. 2017; Jiang et al. 2018; Montanari et al. 2010; Ghai et al. 2012; Bucci et al. 2018).

#### 1.3 La piel humana

#### 1.3.1 Estructura y función

La piel y sus estructuras accesorias conforman el sistema tegumentario, constituyendo el órgano más grande del cuerpo y que le proporciona una protección general contra el calor, las lesiones y las infecciones (Kolarsick et al. 2011). La piel tiene funciones tales como la de colaborar en la termorregulación corporal, almacenar grasa, prevenir la perdida de agua y el ingreso de agentes infecciosos, proteger frente a factores físicos y químicos externos, y es además un órgano sensorial (Yousef & Sharma 2018).

La piel se compone de tres capas histológicas: epidermis, dermis e hipodermis, que se mantienen sujetas a estructuras subyacentes mediante tejido conectivo (Fig. 12). El nivel más externo, la epidermis, consiste en células epiteliales escamosas estratificadas conocidas como queratinocitos, los cuales son capaces de sintetizar queratina. La epidermis se encuentra sobre una capa subyacente de tejido conectivo vascularizado llamada dermis, ambas separadas por una membrana basal. La dermis está compuesta fundamentalmente por colágeno y se ubica sobre la hipodermis, o también conocida como tejido subcutáneo, que contiene pequeños lóbulos de células grasas conocidas como lipocitos. El grosor de las capas varía considerablemente dependiendo de la zona del cuerpo. El párpado, por ejemplo, tiene la capa más delgada de epidermis, con menos de 0,1 mm de espesor, mientras que las palmas de las manos y las plantas de los pies tienen la capa epidérmica más gruesa, de aproximadamente 1,5 mm (Kolarsick et al. 2011).



Figura 12. Representación esquemática de la estructura de la piel humana sana. La piel se compone de tres capas principales: la epidermis, formada por células epiteliales muy compactas; la dermis, compuesta por tejido conectivo denso e irregular que alberga vasos sanguíneos, folículos pilosos, glándulas sudoríparas entre otras estructuras; y por debajo de se encuentra la hipodermis (o tejido subcutáneo), que se compone principalmente de tejidos conectivos y grasos. La epidermis alberga los queratinocitos basales (que pueden dar origen al BCC), los queratinocitos del epitelio escamoso (que pueden dar origen al SCC) y los melanocitos (que pueden dar origen al melanoma). Fuente: https://www.cancer.gov.

#### 1.3.2 La epidermis

La epidermis es un epitelio escamoso estratificado cuyas células se multiplican, diferencian y renuevan en un lapso promedio de alrededor de cuatro semanas (Milstone 2004), sin embargo, la velocidad de renovación de las células de la piel disminuye con la edad (Silverberg & Sliverberg 1989). Tiene por funciones fundamentales la impermeabilidad relativa y la pigmentación. Carece de vascularización, por lo que los nutrientes y productos de desecho deben difundir a través de la interfase epidermis-dermis para mantener la viabilidad celular (El Maghraby et al. 2008). Es en la epidermis donde se originan los tres tipos más frecuentes de cáncer de piel (Fig. 13).



Figura 13. Representación de los tres tipos de cáncer de piel más frecuentes: carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y melanoma. Adaptada de: https://www.mayoclinic.org.

La epidermis está estratificada en cinco capas de células diferencias, siendo éstas el estrato córneo (SC) –la porción más superficial–, el estrato lúcido, el estrato granuloso, el estrato espinoso y el estrato basal –la porción más profunda– (Fig. 14). A los estratos subyacentes al SC de la piel se los suele diferenciar de éste denominándolos en conjunto epidermis viable, ya que están conformados por células metabólicamente activas a diferencia de los corneocitos del SC.

El estrato basal está compuesto por una hilera única de células de morfología cilíndrica dispuestas paralelamente entre sí y perpendiculares el límite con la dermis. Están unidas entre sí por desmosomas y a la membrana basal, que representa la frontera con la dermis, por hemidesmosomas. A partir de las células basales se generan por diferenciación y migración las células de los demás estratos epidérmicos. En este estrato también se encuentran dispersos los melanocitos, células dendríticas encargadas de producir el pigmento melanina, el cual aporta la coloración a la piel y el cabello, y protege a las células de la epidermis viable del

daño de la radiación UV. Los melanocitos son las células que pueden dar lugar al melanoma cutáneo. En el estrato basal también se encuentran dispersas las células de Merkel, que actúan como receptores y son responsables de estimular los nervios sensoriales que el cerebro percibe como tacto. Estas células son especialmente abundantes en la superficie de las manos y los pies. Por último, son las células del estrato basal las cuales pueden dar origen al BCC.

Por encima del estrato basal se ubican las células escamosas que pueden dar origen al SCC. En primer lugar, se halla el estrato espinoso, formado por células poliédricas dispuestas en mosaico, en un arreglo de aproximadamente 8-10 filas de células, las cuales se van aplanando conforme se ubican más cerca de la superficie de la piel. En este estrato también pueden encontrarse células de Langerhans, células dendríticas presentadoras de antígeno.

El estrato granuloso, por encima del espinoso, está formado por 3 a 5 hileras de queratinocitos superpuestos que presentan gránulos de queratohialina en su citoplasma. Estos gránulos contienen precursores de queratina, ya que en este estrato se inicia el proceso de queratinización. Estas células contienen también gránulos lamelares compuestos de glucolípidos que secretan a la superficie y les permiten a las células mantenerse unidas entre sí.

El estrato lúcido, es una fina capa de entre 2 y 3 hileras de células que se encuentra en las zonas donde la piel presenta su máximo espesor, como lo son las palmas de las manos y las plantas de los pies. Los queratinocitos de este estrato carecen de núcleo y su citoplasma está cargado de eleidina, producto de la transformación de la queratohialina, la cual se convertirá en queratina.

La capa más externa de la epidermis es el SC, compuesto por varias hileras (generalmente alrededor de 20) de células escamosas muertas y queratinizadas, anucleadas y sin organelas citoplasmáticas, que se conocen como corneocitos, embebidas en una matriz de lípidos no fosfolipídicos (Bouwstra & Ponec 2006). Los corneocitos son el estadio final de la diferenciación de los queratinocitos. Esta estructura es la responsable de la impermeabilidad cutánea y es el estrato que más varia en espesor de acuerdo a la zona del cuerpo que se analice.



Figura 14. Estructura de la epidermis. La capa más externa de la piel es el estrato córneo, el principal responsable de la impermeabilidad cutánea. Por debajo de éste se encuentra la epidermis viable, la cual está compuesta por el estrato lúcido, granuloso, espinoso y basal (siendo este último el más profundo). En la epidermis están presentes queratinocitos (en diferentes estadios de diferenciación), y otros tipos celulares no provenientes de diferenciación a partir de las células basales: los melanocitos, las células de Langerhans y las células de Merkel. Adaptada de: https://courses.lumenlearning.com.

## 1.3.3 La dermis e hipodermis

La dermis es un tejido fibroso, de 3 a 5 mm de espesor, formado por una red de colágeno y fibras elásticas que desempeña una función protectora, sensorial e inmunológica (El Maghraby et al. 2008; Pasparakis et al. 2014). Es la estructura de sostén de la piel y contiene el sistema vascular cutáneo, cumpliendo funciones claves en la termorregulación y drenaje linfático, siendo también depósito de agua y electrolitos. Además, tiene numerosas fibras nerviosas sensoriales, autónomas y simpáticas que garantizan la comunicación hacia y desde el cerebro.

En la dermis pueden encontrarse células tales como fibroblastos (responsables de los elementos fibrosos de la dermis, especialmente colágeno), mastocitos, dendrocitos dérmicos y macrófagos de origen monocítico, elementos vasculares, neurales y anexos (pelos, glándulas ecrinas, apocrinas y sebáceas) (Pasparakis et al. 2014).

La hipodermis, por su parte, se compone principalmente de tejido adiposo y tiene por función principal la aislación térmica del cuerpo y el acopio de reservas energéticas en forma de grasa.

### **Referencias**

Abraham, W. & Downing, D.T., 1990. Interaction between corneocytes and stratum corneum lipid liposomes in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1021(2), pp.119-125.

Aguilella, V. et al., 1994. Estimation of the pore size and charge density in human cadaver skin. *Journal of controlled release*, 32(3), pp.249-257.

American Cancer Society, 2015. Cancer facts & figures 2015.

American Cancer Society, 2016. Surgery for Basal and Squamous Cell Skin Cancers. Available at: https://www.cancer.org/.

Barakat, M.T., Humke, E.W. & Scott, M.P., 2010. Learning from Jekyll to control Hyde: Hedgehog signaling in development and cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 16(8), pp.337-348.

Barrera, M. V & Herrera, E., 2007. Topical chemotherapy for actinic keratosis and nonmelanoma skin cancer: current options and future perspectives. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)*, 98(8), pp.556-562.

Bernardini, N. et al., 2019. Face and scalp basal cell carcinoma treatment: A review of the literature. *Acta dermatovenerologica Croatica*, 27(1), p.33.

Bik, L. & Thio, H.B., 2019. Pharmacodynamic Evaluation: Dermatology. *Drug Discovery and Evaluation: Methods in Clinical Pharmacology*, pp.1-17.

Bouwstra, J.A. & Ponec, M., 2006. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(12), pp.2080-2095.

Bray, F. et al., 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), pp.394-424.

Bucci, P. et al., 2018. Skin penetration and UV-damage prevention by nanoberries. *Journal of cosmetic dermatology*, 17(5), pp.889-899.

Cevc, G., 1996. Transfersomes, liposomes and other lipid suspensions on the skin: permeation enhancement, vesicle penetration, and transdermal drug delivery. *Critical reviews<sup>TM</sup> in therapeutic drug carrier systems*, 13(3-4).

Cevc, G. & Blume, G., 2004. Hydrocortisone and dexamethasone in very deformable drug carriers have increased biological potency, prolonged effect, and reduced therapeutic dosage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1663(1-2), pp.61-73.

Cevc, G. & Blume, G., 1992. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1104(1), pp.226-232.

Cohen, D. & Lee, P., 2016. Photodynamic therapy for non-melanoma skin cancers. *Cancers*, 8(10), p.90.

Do, K.T. & Kummar, S., 2020. Therapeutic Targeting of Cancer Cells: Era of Molecularly Targeted Agents. En *Abeloff's Clinical Oncology*. Elsevier, pp. 420-430. Domingues, B. et al., 2018. Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets and therapy*, 7, p.35.

Frampton, J.E. & Basset-Séguin, N., 2018. Vismodegib: a review in advanced basal cell carcinoma. *Drugs*, 78(11), pp.1145-1156.

Freitas, R.A., 1999. *Nanomedicine, volume I: basic capabilities*, Landes Bioscience Georgetown, TX.

Ghai, I. et al., 2012. A Review of Transdermal Drug Delivery Using Nano-Vesicular Carriers: Transfersomes. *Recent Patents on Nanomedicine*, 2(2), pp.164-171.

Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C. & Marais, R., 2007. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*, 445(7130), p.851.

Gupta, V. & Trivedi, P., 2018. In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical topical nanocarriers containing anticancer drugs for skin cancer treatment. En *Lipid Nanocarriers for Drug Targeting*. Elsevier, pp. 563-627.

Hofland, H.E.J. et al., 1995. Interactions between liposomes and human stratum corneum in vitro: freeze fracture electron microscopical visualization and small angle X-ray scattering studies. *British Journal of Dermatology*, 132(6), pp.853-866.

Honeywell-Nguyen, P.L. & Bouwstra, J.A., 2005. Vesicles as a tool for transdermal and dermal delivery. *Drug discovery today: technologies*, 2(1), pp.67-74.

Hussain, A. et al., 2017. Elastic liposomes as novel carriers: recent advances in drug delivery. *International journal of nanomedicine*, 12, p.5087.

Jain, S. et al., 2017. Recent Advances in Lipid-Based Vesicles and Particulate Carriers for Topical and Transdermal Application. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106(2), pp.423-445.

Jiang, T. et al., 2018. Enhanced Transdermal Drug Delivery by Transfersome-Embedded Oligopeptide Hydrogel for Topical Chemotherapy of Melanoma. *ACS nano*, 12(10), pp.9693-9701.

Kao, G.F., 1986. Carcinoma arising in Bowen's disease. Archives of dermatology,

122(10), pp.1124-1126.

Karimkhani, C. et al., 2015. It's time for "keratinocyte carcinoma" to replace the term "nonmelanoma skin cancer". *Journal of the American Academy of Dermatology*, 72(1), pp.186-187.

Kolarsick, P.A.J., Kolarsick, M.A. & Goodwin, C., 2011. Anatomy and physiology of the skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 3(4), pp.203-213.

Kue, C.S. et al., 2016. Small molecules for active targeting in cancer. *Medicinal research reviews*, 36(3), pp.494-575.

Longley, D.B., Harkin, D.P. & Johnston, P.G., 2003. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature reviews cancer*, 3(5), p.330.

El Maghraby, G.M., Barry, B.W. & Williams, A.C., 2008. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 34(4-5), pp.203-222.

Meiss, F., Andrlová, H. & Zeiser, R., 2018. Vismodegib. En *Small Molecules in Oncology*. Springer, pp. 125-139.

Milstone, L.M., 2004. Epidermal desquamation. *Journal of dermatological science*, 36(3), pp.131-140.

Montanari, J. et al., 2010. Sunlight triggered photodynamic ultradeformable liposomes against Leishmania braziliensis are also leishmanicidal in the dark. *Journal of Controlled Release*, 147(3), pp.368-376.

Pasparakis, M., Haase, I. & Nestle, F.O., 2014. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nature reviews immunology*, 14(5), p.289.

PDQ Adult Treatment Editorial Board, 2018. Skin Cancer Treatment (PDQ®). En PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. National Cancer Institute (US).

Rai, S., Pandey, V. & Rai, G., 2017. Transfersomes as versatile and flexible nano-vesicular carriers in skin cancer therapy: the state of the art. *Nano reviews* & *experiments*, 8(1), p.1325708.

Schätzlein, A. & Cevc, G., 1998. Non-uniform cellular packing of the stratum corneum and permeability barrier function of intact skin: a high-resolution confocal laser scanning microscopy study using highly deformable vesicles (Transfersomes). *The British journal of dermatology*, 138(4), pp.583-592.

Schwartz, R.A., 2008. Skin cancer: recognition and management, John Wiley & Sons.

Sekulic, A. et al., 2012. Efficacy and Safety of Vismodegib in Advanced Basal-Cell

Carcinoma. New England Journal of Medicine.

Sekulic, A. et al., 2017. Long-term safety and efficacy of vismodegib in patients with advanced basal cell carcinoma: final update of the pivotal ERIVANCE BCC study. *BMC cancer*, 17(1), p.332.

Silverberg, N. & Sliverberg, L., 1989. Aging and the skin. *Postgraduate medicine*, 86(1), pp.131-144.

Taniguchi, N., ARAKAWA, C. & KOBAYASHI, T., 1974. On the basic concept of nano-technology'. En *Proceedings of the International Conference on Production Engineering, 1974-8*. 一般社団法人日本機械学会, pp. 18-23.

Taveira, S.F. & Lopez, R.F.V., 2011. Topical administration of anticancer drugs for skin cancer treatment. En *Skin Cancers-Risk Factors, Prevention and Therapy*. IntechOpen.

Ting, P.T., Kasper, R. & Arlette, J.P., 2005. Metastatic basal cell carcinoma: report of two cases and literature review. *Journal of cutaneous medicine and surgery*, 9(1), pp.10-15.

Verma, D.D. et al., 2003. Liposomes increase skin penetration of entrapped and non-entrapped hydrophilic substances into human skin: a skin penetration and confocal laser scanning microscopy study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 55(3), pp.271-277.

Wagner, R.F. & Casciato, D.A., 2000. Skin cancers. *Manual of Clinical Oncology, Casciato, DA, BB Lowitz (Eds.). 4th Edn., Williams and Wilkins, Philadelphia, Pa: Lippincott*, pp.336-373.

Walling, H.W. et al., 2004. Aggressive basal cell carcinoma: presentation, pathogenesis, and management. *Cancer and Metastasis Reviews*, 23(3-4), pp.389-402.

Wardhan, R. & Mudgal, P., 2017. Membrane Structure. En *Textbook of Membrane Biology*. Springer, pp. 29-48.

Wicki, A. et al., 2015. Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. *Journal of controlled release*, 200, pp.138-157.

Wong, C.S.M., Strange, R.C. & Lear, J.T., 2003. Basal cell carcinoma. *Bmj*, 327(7418), pp.794-798.

Ye, Y. et al., 2019. Topical and Transdermal Nanomedicines for Cancer Therapy. En *Nanotheranostics for Cancer Applications*. Springer, pp. 231-251.

Youl, P.H. et al., 2011. Body-site distribution of skin cancer, pre-malignant and

common benign pigmented lesions excised in general practice. *British journal of dermatology*, 165(1), pp.35-43.

Yousef, H. & Sharma, S., 2018. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. *StatPearls. Treasure Island (FL); StatPearls Publishing LLC.: St. Petersburg, FA, USA*.

# **CAPÍTULO 2**

# OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y PENETRACIÓN CUTÁNEA DE LIPOSOMAS ULTRADEFORMABLES CON 5-FLUOROURACILO

Este capítulo ha sido publicado en:

Drug Delivery and Translational Research, 8(3), 496-514 (2018). "Nano-formulation for topical treatment of precancerous lesions: skin penetration, in vitro and in vivo toxicological evaluation", MN Calienni, CF Temprana, MJ Prieto, D Paolino, M Fresta, AB Tekinay, SV Alonso, J Montanari.

AIP Conference Proceedings, 1990, 020024 (2018). "5-Fluorouracil-loaded ultradeformable liposomes for skin therapy", MN Calienni, MJ Prieto, V Muniz Couto, E de Paula, SV Alonso, J Montanari.

Parte de los ensayos descriptos en el mismo fueron llevados a cabo durante mi estancia corta de investigación en la Università degli Studi Magna Graecia di Catanzaro, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Advanced Drug Delivery Systems Laboratory – Italia, bajo la dirección de la Dra. Donatella Paolino.

#### 2.1 Introducción

El cáncer de piel, melanoma y no melanoma, es el tipo de tumor maligno más común en la población caucásica (Apalla et al., 2017). El tratamiento convencional incluye cirugía y quimioterapia, pero muchos de los agentes quimioterapéuticos utilizados presentan efectos secundarios indeseables (Rigon et al., 2015). La nanotecnología ofrece una alternativa a las terapias tradicionales y tratamientos complementarios. La encapsulación de agentes antineoplásicos en nanosistemas de entrega de activos (NEA) podría dar lugar a ventajas tales como aumentar la estabilidad del principio activo (PA), reducir de la dosis total requerida, minimizar los efectos secundarios tóxicos y reducir significativamente el costo del tratamiento (Naves et al., 2017; Rigon et al., 2015). La administración tópica de PA ofrece muchas ventajas por sobre otras rutas tradicionales de administración. Los sistemas tópicos no son invasivos, pueden ser aplicados por el mismo paciente y permiten eludir el metabolismo prematuro de los fármacos en el hígado (Sanz et al., 2015).

El estrato córneo (SC) de la piel humana se considera la barrera limitante en la permeación cutánea para la mayoría de las moléculas (Barry, 1983). Consiste en 10-25 capas de corneocitos alargados y totalmente queratinizados, que están embebidos en una matriz de bicapas lipídicas no fosfolipídicas, con un espesor de aproximadamente 10-20 µm y es considerado metabólicamente inactivo (El Maghraby et al., 2008; Pirot et al., 1998). El SC es la capa superficial de la epidermis y es el producto final de la diferenciación celular epidérmica (Jain et al., 2017).

Los liposomas ultradeformables (UDL) son un tipo de liposomas altamente elásticos capaces de penetrar el SC porque pueden atravesar poros de diámetro mucho menor que su propio tamaño (Jain et al., 2017). Esta propiedad se debe a la presencia de un activador de borde que aumenta la deformabilidad de la bicapa al afectar la tensión interfacial de estas vesículas (El Zaafarany et al., 2010). Por lo tanto, los UDL son capaces de penetrar la piel impulsados por el gradiente de humedad transdérmico (Cevc y Blume, 1992), transportando los activos encapsulados a través del SC hacia estratos más profundos de la epidermis (Gupta et al., 2005a; Montanari et al., 2010). Una forma de evaluar la penetración *in vitro* de un NEA es a través del Método de Penetración de Saarbrücken (SPM) (Jacobi et al., 2005; Wagner et al., 2000), en el cual la suspensión que contiene al NEA se incuba sobre una porción de piel entera. Dicha porción de piel (SC, epidermis y dermis) funciona por sí misma como compartimiento receptor de la formulación a ensayar, por lo tanto, la formulación debe ser recuperada o cuantificada desde el interior del explanto al finalizar el ensayo. Por otro lado, los estudios en celdas de difusión de Franz (CDF) permiten evaluar la permeación, es decir, se centran en la detección del PA que atravesó completamente la barrera evaluada que puede ser SC, SC y epidermis viable, piel entera o una membrana artificial, en un compartimiento receptor ubicado por debajo de ésta (Essa et al., 2002; Mishra et al., 2006).

Cuando resulta crucial dilucidar el modo en que los UDL logran franquear la barrera impermeable del SC, el método de CDF deja interrogantes irresolutos dado que trata al espesor de la piel como un modelo de "caja negra" aunque pueda cuantificarse con una extracción posterior el PA que quedó retenido (El Maghraby et al., 2000). Si bien pueden acotarse previamente las capas de la piel sobre las que se trabajará por medio de procesos de separación por calor que permiten aislar dermis de SC y epidermis (Kligman y Christophers, 1963), e incluso procesos con digestiones enzimáticas que permiten aislar el SC aunque con gran dificultad experimental (Henning et al., 2008), el tortuoso camino a través de los nanocanales del SC nunca es revelado. En cambio, por medio del SPM seguido de la recuperación o cuantificación de los componentes del NEA y/o el PA incorporado, se puede estudiar en detalle la penetración, evaluando su distribución en función de la profundidad de la piel. Por otra parte, con el uso de la CDF la piel sufre una hidratación no fisiológica y excesiva, ya que el receptáculo aceptor se llena con líquidos en los que el PA es soluble, y esos cambios en el grado de hidratación por el lado inferior del explanto pueden provocar cambios en la penetración de diversos PA, así como un reflujo del mismo por penetración basolateral desde el compartimiento aceptor. En el SPM la hidratación de la piel es fisiológica, por lo que su pH solamente se ve influenciado por la suspensión que se agregue. Finalmente, la remoción sucesiva de las capas del SC (tape stripping) o el procesamiento por criosección tras la incubación permiten determinar el perfil de penetración con respecto a la profundidad del tejido.

El 5-fluorouracilo (5-FU) es un fármaco antineoplásico e hidrofílico empleado en el tratamiento de diversos tipos de cáncer de piel, el cual demostró ser eficaz para el tratamiento tópico de lesiones precancerosas superficiales como la queratosis actínica, la enfermedad de Bowen y el queratoacantoma (Paolino et al., 2008). Además, desde la década de los años '70, diversos artículos informaron la efectividad del 5-FU en el tratamiento del carcinoma de células escamosas, pero solo cuando éste era superficial (Cullen, 1979; Klein et al., 1971). Esto se debe a que el 5-FU por sí solo muestra una permeación cutánea deficiente, lo que reduce su efectividad contra el cáncer después de la administración tópica en lesiones profundas. Por lo tanto, un incremento en la permeación cutánea del 5-FU podría mejorar la eficacia del enfoque terapéutico tópico de este fármaco.

En este capítulo se presentan los resultados de la obtención y caracterización de una nanoformulación de UDL con 5-FU como potencial terapia tópica para lesiones precancerosas y cancerosas profundas en la piel.

#### 2.2 Materiales y métodos

#### 2.2.1 Materiales

La fosfatidilcolina de soja (SPC) fue comprada a Avanti<sup>®</sup> Polar Lipids. El 5-FU empleado provino de una solución inyectable de Laboratorios Filaxis (Buenos Aires, Argentina). El colato de sodio (NaChol), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3fosfoetanolamina-N-(Lissamine<sup>™</sup> rodamina B sulfonil) (Rh-DPPE), isotiocianato de fluoresceína (FITC), merocianina 540 (MC540) y sephadex G-50 se compraron a Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina). El 6-dodecanoil-2-dimetilaminonaftaleno (Laurdan) se adquirió en Thermo Fisher Scientific (Buenos Aires, Argentina). La eosina amarillenta, etanol y metanol (CH<sub>3</sub>OH) empleados fueron de BioPack (Buenos Aires, Argentina). El cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) fue de JTBaker<sup>®</sup>. La hematoxilina se compró a Anedra (Buenos Aires, Argentina). Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

#### 2.2.2 Métodos

#### 2.2.2.1 Preparación de los liposomas ultradeformables

Los UDL se prepararon mezclando SPC y NaChol, como activador de borde, en una relación en masa de 40:7, respectivamente. La mezcla se solubilizó en CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH (1:1 v/v) y seguidamente fue evaporada en rotavapor a 40 °C y 90 rpm en balón hasta eliminación del solvente orgánico. La fina película lipídica obtenida fue sometida a una corriente suave de N<sub>2</sub> para eliminar posibles trazas de solvente y luego fue hidratada con buffer Tris-HCl 10 mM con 0,9% (p/v) NaCl, pH 7,4 (buffer Tris), hasta una concentración final de 40 mg/ml de SPC. La suspensión liposomal resultante se redujo en tamaño y lamelaridad a temperatura ambiente en tres ciclos de sonicación de 30 s, separados por intervalos de 30 s, con un desplazamiento de la punta sonicadora de 10 µm y 17,5 W de potencia (Homogeneizador Ultrasónico con punta de titanio, Malvern Mastersizer, UK). Liposomas convencionales (CL), no ultradeformables, se prepararon mediante el mismo procedimiento que los UDL, pero sin el agregado de NaChol.

Los mismos pasos descriptos anteriormente fueron seguidos para incorporar en la fase acuosa 5-FU 0,25 % p/v, disolviendo el 5-FU en el buffer Tris de hidratación de la película lipídica, de modo tal de obtener UDL con 5-FU (UDL-5FU) y liposomas convencionales con 5-FU (CL-5FU).

Por otra parte, se obtuvieron formulaciones con doble marca fluorescente de UDL-5FU (F-UDL-5FU) y CL-5FU (F-CL-5FU). Las mismas se prepararon añadiendo FITC 1 mM al buffer Tris de hidratación con 5-FU y co-solubilizando la Rh-DPPE en la solución orgánica con los lípidos, en una relación molar Rh-DPPE:SPC de 1:1000.

En todos los casos, el 5-FU y FITC no incorporados se separaron mediante cromatografía de exclusión molecular en una columna Sephadex G-50, utilizando un método de centrifugación con minicolumas adaptado de Fry et al. 1978 (Fry et al., 1978).

#### 2.2.2.2 Eficiencia de encapsulación y relación droga-lípido

La concentración de 5-FU encapsulado se determinó mediante espectrofotometría a 266 nm (Jasco V-550, Japón) después de la disrupción completa de un volumen de suspensión liposomal en 2 volúmenes de etanol. La eficiencia de encapsulación (EE%) se determinó como el porcentaje de la masa incorporada dentro de los UDL (ED) y la masa inicial del PA agregado (TD), tal como se indica en la siguiente ecuación:

$$EE\% = \frac{ED}{TD} \times 100$$

La relación droga:lípido para UDL-5FU fue determinada. La concentración de fosfolípidos se determinó mediante el método colorimétrico de Stewart con ferrotiocianato de amonio (Stewart, 1980).

#### 2.2.2.3 Determinación del tamaño, carga superficial y estabilidad coloidal

Para evaluar el tamaño promedio de los liposomas y la carga superficial, se realizaron determinaciones de dispersión dinámica de la luz (DLS) y de potencial

Zeta con un Particle Size Analyzer 90 Plus (Brookhaven Instruments Corporation, USA), y *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) (NanoSight, Malvern Instruments, UK). Estos parámetros fueron medidos inmediatamente después de la preparación y monitoreados a través del tiempo para determinar la estabilidad coloidal y el efecto del almacenamiento a 4 °C.

La estabilidad de los UDL y UDL-5FU también se evaluó mediante el análisis por *Turbiscan Lab*<sup>®</sup> *Expert* (Formulaction, L'Union, Francia). Se analizó la variación del *backscattering* ( $\Delta$ BS) y de la transmisión ( $\Delta$ T) de las muestras en función del tiempo. Brevemente, las muestras se diluyeron 1:10 en buffer Tris y se colocaron en un tubo de vidrio el cual fue escaneado longitudinalmente. Las mediciones se realizaron durante 1 h a 4 °C (temperatura de almacenamiento), 25 °C (temperatura ambiente) y 37 °C (temperatura corporal). El *software* del equipo, Turbiscan Easy Soft, arroja un valor denominado índice de estabilidad de Turbiscan (TSI), el cual brinda una noción global de la estabilidad de la formulación y se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$TSI = \sum_{i} \frac{\sum |SCANi(h) - SCANi - 1(h)|}{H}$$

Donde scan<sub>i</sub> (h) es el promedio del *backscattering* para cada tiempo de medición (i), scan<sub>i</sub> - 1 (h) es la *backscattering* promedio para el tiempo de medición i-1, y H es la altura total de la suspensión en el frasco contenedor. El TSI tiene en cuenta todos los escaneos individuales durante el experimento y su valor se obtiene de su promedio. Valores bajos de TSI corresponden a un sistema estable (Xu et al., 2016).

Por otra parte, se obtuvieron imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de los UDL-5FU luego de la tinción negativa con acetato de uranilo (Microscopio Electrónico Zeiss EM 109T, Alemania) y de microscopía de fuerza atómica (Asylum Research MFP-3D AFM, USA). La inmovilización de las muestras para AFM se realizó sobre portaobjetos cargados positivamente y la topografía fue determinada en modo de contacto en la primera pasada.

#### 2.2.2.4 Interacción del 5-FU con la membrana liposomal

La interacción del 5-FU con la membrana liposomal se evaluó mediante tres métodos complementarios: calorimetría diferencial de barrido (DSC), y por medio de las sondas MC540 y Laurdan.

La temperatura de transición de fase (T<sub>m</sub>) y el cambio de entalpía asociado (ΔH<sub>cal</sub>) de los UDL y UDL-5FU fueron determinados mediante DSC calentando las muestras desde -50 a 30 °C a una tasa de 10 °C/min, con una isoterma inicial a -50 °C de 10 min (DSC Q200, TA Instruments, USA). Las muestras (10 mg) se pesaron en celdas de aluminio tratado y se cerraron herméticamente. Los parámetros termodinámicos se calcularon con el *software* TA Universal Analysis.

Las formulaciones liposomales se diluyeron con buffer Tris hasta una concentración de 172,04 µM de SPC. Se añadió una cantidad de MC540 tal que su concentración final sea de 0,768 µM y que la relación molar de MC540 y SPC fuera de 1:200. Se dejó equilibrar la muestra durante 2 min y se midieron espectros de absorción entre 400 y 600 nm con un espectrofotómetro UV-Vis. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente y se llevó a cabo una corrección de la línea de base para eliminar la dispersión de la luz provocada por los liposomas, restando la absorbancia de liposomas sin la sonda correspondiente a su *scattering* (Bernik y Disalvo, 1996). El factor de hidrofobicidad (HF) se calculó como:

$$\mathsf{HF} = \frac{\mathsf{A570}}{\mathsf{A500}}$$

El análisis con la sonda fluorescente Laurdan se basó en el corrimiento espectral de la fluorescencia de Laurdan, el cual se puede atribuir a los fenómenos de relajación dipolar, que se originan a partir de la sensibilidad de la sonda a la polaridad de su entorno (Parasassi et al., 1991). La concentración de Laurdan empleada fue de 0,33 en porcentaje molar con respecto a los lípidos (Hollmann et al., 2010). El Laurdan se añadió a la solución de SPC y NaChol en solvente orgánico durante la preparación de los liposomas. Los UDL y UDL-5FU se diluyeron con buffer Tris hasta una concentración de 80 µg/ml de SPC, y las muestras se

analizaron por espectroscopía de fluorescencia a temperatura ambiente (Fluorómetro FluoroMate FS2, SCINCO, Corea).

Cuando los lípidos están en la fase gel, el máximo de emisión del Laurdan se ubica alrededor de 440 nm, mientras que cuando los lípidos se encuentran en fase líquido-cristalina la máxima emisión se ubica alrededor de 490 mm (Marsanasco et al., 2015). Por lo tanto, la intensidad de emisión se adquirió a 443 nm (I443) y 485 nm (I485) excitando las muestras a 340 nm. El parámetro de polarización generalizada (GP) se calculó a partir de las intensidades de emisión utilizando la siguiente ecuación adaptada de Hollmann et al., 2010:

 $\mathsf{GP} = \frac{\mathsf{I443} - \mathsf{I485}}{\mathsf{I443} + \mathsf{I485}}$ 

#### 2.2.2.5 Prueba de deformabilidad

El flujo de 2 ml de UDL, UDL-5FU y CL-5FU (cuyo tamaño fue similar a los anteriores), impulsados por una presión externa de 1 MPa de N<sub>2</sub>, a través de una membrana de policarbonato con poros de 50 nm de diámetro en un extrusor Lipex 10 ml Thermobarrel Extruder (Transferra Nanosciences, Vancouver, Canadá), fue determinado para estudiar la deformabilidad según Cevc, 1995. El volumen extruido fue recolectado cada minuto a lo largo de 15 min y se cuantificaron los fosfolípidos presentes en cada fracción por el método colorimétrico de Stewart 1980.

Como parámetro de deformabilidad, la elasticidad de las bicapas liposomales (*D*) se calculó de acuerdo a van den Bergh et al., 2001:

$$D = J (r_v/r_p)^2$$

Donde el flujo (*J*) de los liposomas a través de una barrera nanoporosa se calculó como el área debajo de la curva a partir de la gráfica del paso del fosfolípidos en función del tiempo,  $r_v$  es el diámetro de los liposomas luego del pasaje y  $r_p$  es el diámetro del poro de la membrana (van den Bergh et al., 2001).

#### 2.2.2.6 Liberación del 5-FU

Los estudios de liberación *in vitro* del 5-FU se llevaron a cabo por duplicado utilizando tubos centricon (Amicon<sup>®</sup> Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices, Merck, Alemania) con membrana de celulosa con corte molecular de 3 kDa. Dentro de un período de 24 h, se colocaron 3 ml de UDL-5FU, UDL y 5-FU libre en tubos de polipropileno, los cuales se mantuvieron en agitación constante (120 rpm) y a 37 ± 1 °C. A intervalos de tiempo predeterminados (0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 12 y 24 h), 200 µl de muestra fueron retirados y reemplazados con un volumen igual de buffer Tris. Las alícuotas extraídas se centrifugaron 40 min en tubos centricon a 14.000xg y 4 °C. Los filtrados (droga liberada de los liposomas) se cuantificaron por absorbancia UV-Visible (NanoDrop 2000, ThermoScientific, USA). La ausencia de liposomas en los filtrados se confirmó mediante la cuantificación de fosfolípidos. El porcentaje de 5-FU liberado se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

Droga liberada (%) = 
$$\frac{\text{masa acumulada promedio en el filtrado}}{\text{masa inicial de droga}} \times 100$$

#### 2.2.2.7 Estudios de penetración cutánea in vitro

Las muestras de piel humana de un adulto sano se obtuvieron a partir de una cirugía de reducción abdominal de una mujer caucásica de 39 años. Se removió el tejido adiposo subcutáneo, la piel se limpió buffer Tris y fue cortada en trozos cuya medida no superase los 10 cm de lado, los cuales se envolvieron en papel de aluminio y se almacenaron en bolsas de polietileno con cierre, sin aire en su interior, a -20 °C hasta su uso, manteniendo así sus propiedades relativas a la penetración y permeación por un período de hasta 6 meses (Harrison et al., 1984; Schaefer y Loth, 1996).

Discos de 24 mm de diámetro se obtuvieron a partir de la piel congelada, se dejaron descongelar, se limpiaron con buffer Tris y se transfirieron directamente a una variante del dispositivo del SPM (Schaefer y Loth, 1996), el cual se adaptó para condiciones no oclusivas de aplicación de la muestra. La piel se colocó con el SC hacia arriba sobre un papel de filtro embebido previamente con 200 µl de buffer

Tris, para simular el gradiente de humedad transdérmico, en la cavidad de fondo plano de 25 mm de diámetro y 5 mm de profundidad del bloque de teflón diseñado *ad hoc*. Un volumen de 50 µl de 5-FU libre (en buffer Tris), UDL-5FU, F-UDL-5FU y F-CL-5FU se aplicaron en condiciones no oclusivas sobre la superficie de la piel, repartidos en gotas de 2,5 µl, y se incubó durante 1 h a  $35 \pm 1$  °C.

#### 2.2.2.7.1 Tape stripping

La técnica del *tape stripping* permite remover el SC en planos longitudinales sucesivos, del más externo al más profundo, por medio del uso de cinta adhesiva para después recuperar los PA de interés (Lademann et al., 2009), reconstruyendo el perfil de penetración de los mismos en esta capa de la piel. Asumiendo que cada cinta al ser retirada se lleva adherida consigo una cantidad similar de estrato córneo (Jui-Chen et al., 1991) –si bien algunos trabajos proponen que debido a la mayor cohesión entre los queratinocitos de las capas más profundas esta cantidad iría decreciendo (Bashir et al., 2001)–, puede relacionarse directamente el número de cinta con la profundidad en el estrato en la cual se detecta la marca o PA. Por debajo, queda una porción de epidermis viable y dermis que también es recogida y procesada para determinar el PA que logró sortear la barrera impermeable del SC.

Una vez finalizada incubación, los discos de piel fueron montados en un bloque de poliestireno expandido y sujetados con alfileres, formando un cuadrado de 25 mm de lado. Tanto la distancia como la geometría del estiramiento de la piel se mantuvieron constantes en todas las réplicas. La superficie de la piel se limpió con algodón. El *tape stripping* se realizó por quintuplicado del siguiente modo: secuencialmente 20 pedazos de cinta adhesiva (Doble A<sup>®</sup>, Abrasivos Argentinos SAIC), fueron colocados cubriendo toda la superficie la piel. Una vez adherida, a cada cinta se le colocó encima un cilindro de teflón de 25 mm de diámetro para distribuir uniformemente un peso de 2 Kg aplicado durante 10 s. Seguidamente, cada cinta fue removida con ayuda de pinzas y agrupadas en tubos tipo falcon de 15 ml: cintas 1-10 (SC superior) y cintas 11-20 (SC inferior). Finalmente, la piel remanente, epidermis viable + dermis (VED), fue disgregada con tijeras en otro tubo. Se incluyeron blancos de piel sin tratar.

De esta manera, realizando los ensayos por quintuplicado, estandarizando ciertos parámetros técnicos, y proviniendo todos los explantos de una misma muestra de piel escindida de un único paciente, se intentó minimizar la variabilidad que de por sí presenta el método de *tape stripping*, cuya potencialidad analítica está firmemente consolidada pero sobre el cual se ha señalado con frecuencia la necesidad de optimizar el control de los factores que pueden introducir alta variabilidad (Henning et al., 2009; Honeywell-Nguyen et al., 2004, 2003). La Figura 1 resume los pasos que se realizaron desde la obtención de los descartes de cirugía estética hasta el *tape stripping*.



Figura 1. Esquema representativo de los principales pasos llevados a cabo desde la obtención de la piel hasta la remoción capa por capa del SC mediante la técnica de *tape stripping*.

La extracción del 5-FU de las cintas y de la VED se hizo con 3 ml de una solución etanol:agua (1:1 v/v) en agitación durante 1 hora a 190 rpm y 37 °C. La presencia de 5-FU se determinó mediante espectroscopia UV-Vis a 266 nm. El 5-FU cuantificado se relativizó a la concentración inicial de 5-FU en cada formulación y fue reportado como el porcentaje de esta relación.

El mismo procedimiento se llevó a cabo con cinco muestras de piel incubadas con F-UDL-5FU y F-CL-5FU. En este caso, se extrajo cada cinta de manera individual. El perfil de penetración se midió mediante espectroscopía de fluorescencia. Las muestras fueron excitadas a 570 nm (Rh-DPPE) y 495 nm (FITC), y se determinó la emisión a 587 nm (Rh-DPPE) y 517 nm (FITC), en ambos casos con *slits* de 5 nm, con un fluorómetro FluoroMate FS-2 (Scinco, Seoul, Korea).
#### 2.2.2.7.2 Seccionamiento óptico mediante microscopía confocal

Luego de la incubación con F-UDL-5FU, explantos de piel fueron observado mediante microscopía confocal de barrido láser (CLSM) con un aumento 20x, excitando las muestras con un láser de diodo ( $\Lambda_{exc}$  488 nm para la excitación de FITC) y con un láser He-Ne ( $\Lambda_{exc}$  543 nm para Rh-DPPE) (Microscopio Confocal, Olympus FluoView FV 300). Se obtuvieron imágenes cada 6 µm de profundidad mediante un barrido en el eje Z desde 0 µm (superficie) hasta 60 µm de profundidad. La intensidad de fluorescencia de cada plano confocal se analizó mediante el *software* ImageJ.

# 2.2.2.7.3 Obtención de cortes histológicos transversales

Luego de la incubación con F-UDL-5FU, la piel se congeló rápidamente a -20 °C, se embebió en OCT (compuesto de temperatura de corte óptima) y se obtuvieron cortes histológicos perpendiculares a la superficie de la piel de 30 µm de espesor en un criostato Leica CM 1850 (Leica Microsystems, Alemania) a -20 °C. Los cortes fueron observados mediante CLSM. La penetración de ambas marcas fluorescentes fue determinada mediante el *software* ImageJ.

Algunos cortes fueron sometidos a tinción con hematoxilina y eosina para detectar alteraciones histológicas, los cuales fueron observados y fotografiados en una lupa.

# 2.2.2.7.4 Declaración de ética

Los protocolos de trabajo con muestras de piel humana fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Nacional de Quilmes (CE-UNQ N°1/2019), en conformidad con el Código de Ética de la Asociación Médica Mundial.

#### 2.2.2.8 Análisis estadístico

El software GraphPad Prism 6.0 se utilizó para realizar los análisis estadísticos. Se llevó a cabo el *t-test* de *Student* para comparar dos variables. Sólo los valores con p < 0,05 fueron aceptados como significativos.

#### 2.3 Resultados

# 2.3.1 Caracterización fisicoquímica de los UDL-5FU

Se obtuvieron UDL de 70 nm de diámetro en promedio, medido mediante DLS, con una distribución de tamaño unimodal y un valor negativo del potencial Zeta. Como se muestra en la Tabla 1, la incorporación del 5-FU no modificó significativamente el tamaño promedio de los liposomas, continuando en el orden de los 70 nm. Adicionalmente, las suspensiones de liposomas mostraron una buena estabilidad coloidal después de ser almacenadas a 4 °C durante 56 días, sin cambios significativos en su tamaño.

Muestra	Días	Tamaño promedio (nm) <sup>a</sup>	PDI⁵	Potencial Zeta (mV) <sup>c</sup>
UDL	0	$70,0 \pm 0,73$	0,261	-36,97 ± 5,85
	30	76,1 ± 0,99	0,354	-35,57 ± 1,87
UDL-5FU	0	$68,6 \pm 0,80$	0,280	-25,13 ± 0,31
	30	66,8 ± 1,56	0,318	-34,60 ± 0,57
	56	83,6 ± 1,30	0,262	-

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos a lo largo del tiempo de UDL con y sin 5-FU.

<sup>a</sup>El tamaño promedio fue determinado mediante DLS. Las suspensiones liposomales fueron adecuadamente diluidas y las determinaciones se llevaron a cabo a 20 °C. Promedio ± SD (n=3). <sup>b</sup>Índice de polidispersión.

<sup>c</sup>Las suspensiones liposomales fueron adecuadamente diluidas y las determinaciones se llevaron a cabo a 20 °C. Promedio  $\pm$  SD (n=10).

Por su parte, el análisis por NTA mostró que la formulación sin 5-FU tenía un tamaño promedio de 92,6  $\pm$  2,3 nm sin cambios significativos luego de 30 días (90,8  $\pm$  2,1 nm). Sin embargo, mediante NTA se observó que la incorporación de 5-FU

disminuyó el tamaño promedio de la formulación (79,4  $\pm$  0,8 nm), pero después de 30 días, la misma presentó un tamaño promedio similar a los UDL (93,2  $\pm$  2,9 nm).

En las micrografías de los UDL-5FU obtenidas por TEM se pueden observar vesículas unilamelares y, al igual que las imágenes obtenidas por AFM, confirman el rango de tamaño promedio determinado mediante DLS (Fig. 2).



Figura 2. (A) Microscopía electrónica de transmisión de UDL-5FU (100.000X), la barra de referencia corresponde a 100 nm; en el recuadro interno se muestra una micrografía 200.000X, la barra de referencia corresponde a 50 nm. (B) Imagen de UDL-5FU de AFM en modo de contacto.

Para completar los resultados de tamaño y del análisis del potencial Zeta en el tiempo, la estabilidad de los UDL y UDL-5FU también fue estudiada mediante el análisis por *Turbiscan Lab*<sup>®</sup> *Expert*. Este equipo es capaz de correlacionar la estabilidad coloidal y de almacenamiento de las formulaciones a diferentes temperaturas con su *backscattering* y transmisión en función del tiempo (Celia et al., 2009). Las mediciones se llevaron a cabo utilizando un LED pulsado en el infrarrojo cercano a una longitud de onda de 880 nm durante 1 h. Dos sensores ópticos diferentes recibieron la luz del *backscattering* y transmitida por las muestras en un ángulo de 45° y 180° con respecto al haz incidente, respectivamente. Estos parámetros posibilitan detectar procesos de desestabilización relacionadas con cambios en el tamaño promedio (coalescencia) o de migración de las vesículas

(sedimentación o cremado). Además, con el perfil TSI es posible monitorear la cinética de estabilidad de las formulaciones.

Las señales de  $\Delta$ BS y  $\Delta$ T de las formulaciones fueron cercanas a la línea de base durante los análisis. Una variación del perfil de  $\Delta$ BS dentro del intervalo ± 5% es un indicativo de que la formulación es table (Cosco et al., 2015). Por lo tanto, no hubo evidencia de fenómenos de inestabilidad para UDL y UDL-5FU a 4, 25 y 37 °C (Fig. 3).



Figura 3. Mediciones de  $\Delta$ T y  $\Delta$ BS de UDL y UDL-5-FU durante una hora a 37 °C. No hubo evidencia de fenómenos de desestabilización, dado que todas las mediciones fueron cercanas a la línea de base.

Los perfiles TSI fueron similares entre UDL y UDL-5FU, y mostraron una cinética lineal con un valor TSI final bajo a 25 y 37 °C (Fig. 4). Si bien no hubo cambios significativos en los perfiles de  $\Delta$ BS y  $\Delta$ T a 4 °C, hubo una ligera discrepancia en comparación con 25 y 37 °C en la cinética estabilidad para ambas formulaciones, con un valor TSI mayor.



Figura 4. Perfiles de estabilidad cinética de UDL (A) y UDL-5FU (B) a 4, 25 y 37 °C medidos con *Turbiscan Lab*<sup>®</sup> *Expert*.

Por otra parte, la concentración de 5-FU encapsulado en los UDL-5FU fue de 0,2868  $\pm$  0,0008 mM (promedio  $\pm$  SD, n=3), después de la cromatografía de exclusión molecular, y la relación en masa de 5-FU:SPC fue de 1:865. La eficiencia de encapsulación fue del 1,4%.

#### 2.3.2 Interacción del 5-FU con la membrana liposomal

La ubicación del 5-FU en los UDL se determinó mediante DSC y con las sondas MC540 y Laurdan.

El DSC se empleó para determinar el efecto de la incorporación del 5-FU en el comportamiento termotrópico de la bicapa liposomal. Los perfiles obtenidos mostraron dos mínimos endotérmicos, uno cercano a 0 °C correspondiente a la fusión del medio acuoso y otro, por debajo de 0 °C (Fig. 5). Los parámetros termodinámicos correspondientes a cada termograma se muestran en la Tabla 2.

No se observaron diferencias significativas en la  $T_m$  debido a la incorporación del 5-FU. Sin embargo, la incorporación de 5-FU en los liposomas disminuyó considerablemente la entalpía de transición de fase y el ancho del pico de la transición de fase.



Figura 5. Calorimetría diferencial de barrido de liposomas ultradeformables vacíos (UDL) y cargados con 5-FU (UDL-5FU).

Tabla 2. Efecto de la incorporación de 5-FU a los UDL en los parámetros termodinámicos de la membrana liposomal determinado mediante DSC.

Muestra	T <sub>m</sub> ª (°C)	ΔH <sub>cal</sub> <sup>b</sup> (J/g)
UDL	-22,9	3,82
UDL-5FU	-22,2	0,26

<sup>a</sup>Temperatura correspondiente al mínimo del pico calorimétrico.

<sup>b</sup>Entalpia calorimétrica calculada como el área bajo la curva.

La MC540 es una sonda que puede utilizarse para estudiar el grado de empaquetamiento de los fosfolípidos de las vesículas lipídicas (Disalvo et al., 2003). En agua la MC540 presenta dos máximos de absorbancia (la forma dimérica a 500 nm y el monómero a 530 nm), mientras que en ambientes hidrofóbicos el máximo se desplaza hacia 530 nm (dímero) y 570 nm (monómero) (Lelkes y Miller, 1980). El factor de hidrofobicidad (HF) es la relación de la absorbancia a 570 nm con respecto a 500 nm. Por lo tanto, el HF refleja el grado de exposición de sitios hidrofóbicos y de organización de la superficie liposomal. Un aumento en el HF está relacionado con una mayor exposición de sitios hidrofóbicos en la interfase agua-lípido, porque la MC540 se ubica como monómero ligeramente por encima del

esqueleto de glicerol de los fosfolípidos neutros y cargados (Lelkes y Miller, 1980). Esto explica la sensibilidad de la MC540 a las variaciones estructurales en la región de las cabezas polares de los fosfolípidos.

Se observaron diferencias significativas entre el HF de los UDL y el de los UDL-5FU a lo largo del tiempo (Tabla 3). La encapsulación de 5-FU resultó en un valor de HF para los UDL-5FU significativamente mayor respecto a los UDL vacíos a los 0, 7 y 32 días luego de su preparación (p < 0,0001).

Si bien la MC540 es una sonda externa, se podría esperar observar un efecto similar en la superficie interna de la bicapa.

Tabla 3. Factor de hidrofobicidad (HF) de UDL y UDL-5FU a largo del tiempo determinado a 20 °C. Promedio  $\pm$  SD (n=3).

Muestra	HF 0 días	HF 7 días	HF 32 días
UDL	2,29 ± 0,01	$2,12 \pm 0,08$	$1,71 \pm 0,04$
UDL-5FU	2,55 ± 0,01	$2,38 \pm 0,03$	2,53 ± 0,01

Los espectros de excitación y emisión de fluorescencia del Laurdan dependen fuertemente del estado de fase de la membrana donde es insertado (Hirsch-Lerner y Barenholz, 1999). El Laurdan se ubica en la interfaz hidrofílicahidrofóbica de la bicapa con la cola de ácido láurico anclada en la región de las cadenas de acilo de los fosfolípidos (Parasassi et al., 1991). Parasassi et al., 1991 demostraron que el Laurdan es sensible a la dinámica y polaridad de la membrana circundante. Por lo tanto, los espectros de GP de Laurdan en liposomas permiten la determinación del estado de fase de la membrana, gel o líquido-cristalina, así como la coexistencia de fases (Parasassi y Gratton, 1995). El valor de GP refleja corrimientos espectrales relacionados con diferencias en el nivel de hidratación entre las fases gel y líquido-cristalina (Bagatolli, 2006; Parasassi et al., 1991). Los valores de GP para fases gel y fases líquido-cristalinas son 0,6 y -0,2, respectivamente, utilizando una longitud de onda de excitación de 340 nm y longitudes de onda de emisión de 440 y 490 nm (Parasassi y Gratton, 1995). Un valor de GP alto indica menos relajación dipolar del Laurdan, lo que se corresponde con un entorno rígido (Marsanasco et al., 2015). Debido a que el valor de GP es independiente del pH y del tipo de grupo funcional que constituya la cabeza polar de los fosfolípidos, el proceso de relajación dipolar que establece las propiedades espectrales está relacionado con el número de moléculas de agua alrededor de Laurdan (Parasassi et al., 1991). Por lo tanto, es la relajación dipolar del agua el proceso que produce el corrimiento espectral, como consecuencia de la interacción entre el dipolo en estado excitado de la sonda y el dipolo del disolvente circundante (Parasassi et al., 1991).

Los espectros de GP de Laurdan de excitación y emisión de los UDL y UDL-5FU correspondieron a membranas de fase líquido-cristalina (Fig. 6). Sin embargo, hubo una diferencia significativa (p < 0,01) entre el valor de GP obtenido para UDL, -0,188 ± 0.003, y UDL-5FU, -0.200 ± 0.002.



Figura 6. Espectros GP de excitación y emisión de Laurdan de UDL y UDL-5FU a 20 ° C. Ambos corresponden a membranas en fase líquido-cristalina. Las curvas son el promedio de tres mediciones independientes.

# 2.3.3 Prueba de deformabilidad

El pasaje de los fosfolípidos liposomales a través de una membrana con un tamaño de poro de 50 nm bajo una presión externa de 1 MPa de N<sub>2</sub> se muestra en la Fig. 7. Los perfiles de UDL y UDL-5FU mostraron un comportamiento bifásico, caracterizado por un paso rápido durante el primer minuto seguido por un paso lento el resto 15 min. Por el contrario, no se registró pasaje de fosfolípidos para CL-5FU durante los primeros 13 min, recuperándose solamente un 1% de fosfolípidos al final del período de tiempo.

Los resultados mostraron que los UDL vacíos tuvieron una elasticidad de D = 645, mientras que los UDL-5FU D = 486. Los UDL y UDL-5FU fueron 430 y 324 veces, respectivamente, más elásticos que los CL-5FU (D = 1,5). Aunque los UDL-

5FU presentaron una menor elasticidad que los UDL, tuvieron un comportamiento similar durante el pasaje forzado por la membrana y la diferencia con los liposomas convencionales con 5-FU fue muy significativa.



Figura 7. Perfil del pasaje de UDL, UDL-5FU y CL-5FU a través de una membrana de policarbonato con poros de 50 nm de diámetro en función del tiempo.

# 2.3.4 Liberación del 5-FU de los UDL-5FU

El perfil de liberación de 5-FU de los UDL-5FU fue estudiado a lo largo del tiempo (Fig. 8). Durante las dos primeras horas, casi el 60% de la droga había sido liberada, mientras que luego de 12 h se liberó alrededor del 80% del 5-FU encapsulado. Finalmente, todo el contenido de los UDL-5FU fue liberado durante las primeras 24 h.



Figura 8. Perfil de liberación de 5-FU de los UDL-5FU. Los experimentos se llevaron a cabo a 37 °C. Promedio  $\pm$  SD (n = 2).

#### 2.3.5 Estudios de penetración cutánea in vitro

El perfil de penetración en piel humana del fluoróforo hidrosoluble FITC, coencapsulado con el 5-FU en UDL y CL, y de la sonda hidrofóbica Rh-DPPE, se determinó utilizando el SPM seguido de la remoción de capas individuales del SC, por medio de la técnica de *tape stripping*, o seguido del seccionamiento óptico mediante CLSM hasta 60 µm de profundidad. La penetración en la piel también se estudió a partir de cortes histológicos observados mediante CLSM. Finalmente, la presencia de 5-FU en el SC y en la VED, luego de la incubación con 5-FU libre o UDL-5FU, se cuantificó mediante espectroscopia UV-Vis.

El SPM se empleó en condiciones no oclusivas para mantener el gradiente de hidratación transdérmica, que se considera como la fuerza locomotora para la penetración de los UDL (Cevc, 1995; Cevc y Blume, 1992). El SPM junto con las técnicas subsiguientes empleadas *–tape stripping*, obtención de cortes histológicos y seccionamiento óptico por CLSM– permiten determinar el perfil de penetración de los PA a lo largo de la piel. El uso del SPM asegura que el paso a través de la piel se debe exclusivamente a la penetración desde la parte superior (el SC) hacia las capas inferiores (la epidermis y dermis).

Luego de 1 h de incubación con 5-FU libre en buffer Tris, fue poca la droga recuperada tanto de las cintas como de la VED (Fig. 9). Por el contrario, después de la incubación con UDL-5FU, se observó que el 5-FU alcanzó capas profundas del SC y llegó al VED (Fig. 9).



Figura 9. Perfil de penetración a través de la piel obtenido mediante incubación con SPM seguido de *tape stripping*. La presencia del 5-FU se determinó en el SC superior (cintas 1-10), el SC inferior (cintas 11-20) y la epidermis viable + dermis (VED). Los resultados se muestran como el porcentaje de 5-FU recuperado de la piel en relación a la concentración inicial de droga incubada. Promedio  $\pm$  SD (n = 5).

Los perfiles de penetración de F-UDL-5FU y F-CL-5FU fueron significativamente diferentes entre sí para ambos fluoróforos (Fig. 10A). El acumulado de fluorescencia de FITC y Rh-DPPE en las 20 cintas (correspondientes a todo el SC), fue alrededor de 7,2 veces y 3,9 veces mayor, respectivamente, para F-UDL-5FU que para F-CL-5FU (Fig. 10B). Debido a que en este procedimiento cada capa celular eliminada tiene casi el mismo espesor, el número de tiras de cinta se correlaciona linealmente con el grosor restante del SC (Montanari et al., 2010). De acuerdo a estos resultados, los F-UDL-5FU penetraron más profundamente en el SC que los F-CL-5FU, los cuales permanecieron en la superficie de la piel.



Figura 10. (A) Perfil de penetración en la piel de las sondas Rh-DPPE y FITC, obtenido mediante incubación, durante 1 h de manera no oclusiva, de piel con F-UDL-5FU y F-CL-5FU en un dispositivo de SPM seguido de *tape stripping*. (B) Fluorescencia acumulada en las 20 capas del SC, \*\*p <0,007 y \*\*\*p <0,0005. Los datos se muestran como el promedio ± SD (n = 5).

Los cortes histológicos transversales mostraron que la Rh-DPPE se distribuyó a lo largo de todo el SC (Fig. 11), y presentó una intensidad de

fluorescencia máxima a una profundidad de 24  $\mu$ m. Dado que el SC abdominal tiene un grosor de aproximadamente 40  $\mu$ m cuando se encuentra hidratado (El Maghraby et al., 2008), los lípidos de los F-UDL-5FU se estarían acumulando principalmente en el SC, y en menor proporción en la VED. El FITC se halló tanto en el SC como en la VED (Fig. 11), con una intensidad de fluorescencia máxima a una profundidad de 120  $\mu$ m. Las mismas muestras se sometieron también a una tinción con hematoxilina-eosina, las cuales confirmaron la ausencia de alteraciones histológicas (Fig. 12).



Figura 11. Imágenes de CLSM de cortes histológicos de 30 µm de espesor de piel incubada 1 h con F-UDL-5FU (20x). Las señales en color rojo y verde corresponden a la Rh-DPPE y al FITC, respectivamente. La figura de la izquierda es la combinación de las imágenes de ambos fluoróforos, mientras que la de la derecha incluye, además, la imagen de transmisión superpuesta.



Figura 12. Imagen (6,3x) de un corte histológico de piel de 30 µm de espesor teñido con hematoxilina y eosina. El explanto de piel había sido previamente incubado con F-UDL-5FU durante 1 h. El seccionamiento óptico a lo largo del eje z de los explantos de piel (Fig. 13), reveló que las marcas de FITC y Rh-DPPE se distribuyeron a través de las capas SC, particularmente en el espacio intercelular. Este resultado estuvo en concordancia con el perfil de penetración de los F-UDL-5FU determinado mediante *tape stripping* (Fig. 10).



Figura 13. Imágenes de planos confocales en el eje z de un explanto de piel obtenidas por CLSM a 24 (A), 42 (B) y 60  $\mu$ m (C) desde la superficie de la piel (0  $\mu$ m), luego de 1 h de incubación con F-UDL-5FU (20x). Las señales en color rojo y verde corresponden a la Rh-DPPE y el FITC, respectivamente.

La cuantificación de la fluorescencia para ambos fluoróforos en cada plano confocal (Fig. 14), evidenció que las marcas penetraron juntas a lo largo del SC de piel. Si bien a partir de los 30 µm la fluorescencia comienza a decaer, esto no significa que ambos fluoróforos no están presentes en la piel –de hecho, con las microscopías de los cortes histológicos se observa que sí están presentes a mayores profundidades–, sino que está relacionado con la limitación de la técnica para penetrar la muestra.



Figura 14. Intensidad de fluorescencia de Rh-DPPE y FITC a través del SC determinada mediante el software ImageJ a partir de imágenes de los planos

confocales en el eje z obtenidas por CLSM. Los explantos de piel se incubaron con F-UDL-5FU durante 1 h. Promedio ± SEM.

#### 2.4 Discusión

Los resultados de caracterización de los UDL-5FU mostraron que se obtuvieron liposomas unilamelares y estables a lo largo del tiempo, de alrededor de 70 nm, sin cambios significativos en cuanto al tamaño y estabilidad de los UDL debido a la incorporación del 5-FU. Los UDL y UDL-5FU serían menos estables a 4 °C en comparación con 25 y 37 °C, pero pudieron mantenerse ambos al menos 30 días a 4 °C, sin evidencia de fenómenos de desestabilización.

La lamelaridad y el tamaño son también factores que determinarán si una formulación liposomal puede traspasar la barrera de la piel. Cuando la misma mezcla de lípidos utilizada en este trabajo se empleó para preparar liposomas multilamelares más grandes, dicha formulación no penetró en la piel (Bucci et al., 2018). En la última década, un artículo propuso una formulación liposomal multilamelar, no ultradeformable de casi 5 µm en tamaño promedio para el suministro de 5-FU (Glavas-Dodov et al., 2003); una formulación de este tipo podría ser buena para actuar como un depósito de medicamentos en el lado externo del SC, pero no podría transportar 5-FU a la epidermis viable.

Los UDL-5FU presentaron una EE% baja, la cual era esperable de acuerdo a otros esfuerzos por encapsular 5-FU en trabajos previos (Glavas-Dodov et al., 2005; Maghraby et al., 2001). Kaiser et al., 2003 sostienen que este efecto depende de la composición lipídica, el grado de empaquetamiento de las cadenas de acilo, y particularmente puede suceder con compuestos hidrosolubles en liposomas de tamaño pequeño, debido a la pequeña relación entre el volumen interno y externo (Kaiser et al., 2003). Elmeshad et al., 2014 observaron que existe una relación proporcional entre el tamaño de la vesícula, el espacio acuoso subsecuente y la cantidad de 5-FU encapsulada (Elmeshad et al., 2014).

Por otra parte, Elorza et al., 1993 sugirió que el 5-FU tiende a ser adsorbido en la interfaz externa de agua-lípido (Elorza et al., 1993). En el caso de los UDL-5FU, la droga podría quedar atrapada tanto dentro de los liposomas como quedar adsorbida en la superficie interna y externa de la membrana. La baja EE% podría estar relacionada con la más o menos rápida fuga del 5-FU débilmente retenido en la superficie de los liposomas luego de la cromatografía de exclusión molecular. La primera evidencia para pensar en la adsorción del 5-FU fue la diferencia significativa entre el potencial Zeta de los UDL y UDL-5FU. El UDL-5FU alcanzó una carga superficial similar a la del UDL después del paso del tiempo, por lo que se podría hipotetizar que conforme pasa el tiempo el 5-FU se desadsorbe de la superficie, disminuyendo la carga superficial de los liposomas (potencial Zeta más negativo).

Por medio del análisis de DSC, MC540 y Laurdan se observó que el 5-FU interactúa con la membrana liposomal. Por DSC se determinó que su incorporación disminuye la entalpía de la transición de fase de la membrana, lo cual podría estar relacionado con un cambio en la organización y una disminución de la cooperatividad de las moléculas en la bicapa (El Maghraby et al., 2005a; Postigo et al., 2004). Además, la presencia del 5-FU favoreció la entrada de moléculas de MC540 a la interfaz agua-lípido, lo cual podría deberse a la interacción del 5-FU con las cabezas polares de los fosfolípidos. A su vez, los bajos valores de GP de los UDL-5FU en comparación a los UDL se pueden atribuir a un mayor número de moléculas de agua entre las cabezas polares de los fosfolípidos y un entorno menos rígido. Por lo tanto, el 5-FU podría contribuir a la desorganización de la membrana alterando el empaquetamiento de las cabezas polares, pero sin llegar a afectar el estado de fase.

Las moléculas de 5-FU podrían ser en parte adsorbidas en la interfase agualípido con acceso constante a la fase acuosa. Esta interacción molecular fue evaluada previamente por Lopes et al., 2011 en grandes vesículas unilamelares de 2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC), quienes también observaron cierto grado de penetración en el dominio lipídico mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear y anisotropía de fluorescencia en estado estacionario (Lopes et al., 2011). Observaron cambios dependientes del tiempo en la difusión del 5-FU en liposomas y que el transporte de la droga a través de la membrana era reversible, pero la retención dentro de la membrana era pobre.

La interacción droga-membrana depende del coeficiente de partición del PA, sus grupos funcionales, del tamaño y del área superficial polar (El Maghraby et al., 2005b). El 5-FU es una droga parcialmente lipofílica con un valor moderado de coeficiente de partición –log P = -0,824– un área superficial polar de 65,7 Å<sup>2</sup> (El Maghraby et al., 2005b). Estos dos parámetros se correlacionan con el transporte molecular pasivo a través de las membranas y la posibilidad de adsorción superficial de 5-FU en la superficie de la membrana liposomal interna y externa (El Maghraby et al., 2005b; Lopes et al., 2011). Además, a pH 7,4 el 5-FU se comporta como un tensioactivo, con una concentración de micelar crítica estimada de 8 x 10<sup>-10</sup> M (Srivastava et al., 1987).

Por lo tanto, la interacción entre el 5-FU y la interfaz agua-lípido en los UDL-5FU podría resultar en una desorganización de las cabezas polares y afectando la entalpía de la transición de fase. Los resultados también fueron consistentes con los datos publicados acerca de la unión del 5-FU y su movilidad en bicapas de fosfatidilcolina de huevo, vesículas unilamelares grandes de DMPC y dipalmitoilfosfatidilcolina (El Maghraby et al., 2005b; Lopes et al., 2011; Okamura y Yoshii, 2008; Yoshii y Okamura, 2009).

El hecho de que parte del 5-FU pudiera estar adsorbido en la superficie del liposoma podría explicar la liberación tipo *burst* observada durante las primeras 2 h en los estudios de liberación. Este comportamiento también fue observado por Cosco et al., 2015 en otros liposomas ultradeformables con 5-FU (Cosco et al., 2015).

Por su parte, el 5-FU atrapado en el núcleo acuoso del liposoma puede haber atravesado la membrana, posiblemente por difusión pasiva, debido a su moderado coeficiente de partición, tamaño pequeño y área de superficie polar (El Maghraby et al., 2005b; Lopes et al., 2011).

Por otro lado, la reducción de la deformabilidad después de la incorporación del 5-FU podría estar relacionada con la interacción de la droga con la membrana liposomal observada en este trabajo. Sin embargo, los UDL-5FU conservaron la capacidad de atravesar el SC de la piel y transportar el 5-FU hasta la VED.

El encapsulamiento del 5-FU en UDL incrementó significativamente su penetración cutánea en comparación al 5-FU libre en buffer. Prácticamente no se detectó 5-FU en la piel cuando éste fue aplicado de forma libre sobre la misma.

Este resultado estuvo en concordancia con otros estudios que observaron una permeación percutánea deficiente del 5-FU libre, lo que reduce su efectividad en el tratamiento de tumores profundos mediante la administración tópica (Gupta et al., 2005b; Singh et al., 2005).

En las pruebas de penetración con F-UDL-5FU marcados con dos fluoróforos, tanto la marca correspondiente a la membrana como la del núcleo acuoso se hallaron en todo el SC llegando a la VED. Es posible que el FITC haya sido liberado desde los liposomas durante la penetración, permitiendo su difusión a estratos más profundos de la piel en comparación a la Rh-DPPE.

Por lo tanto, la ultradeformabilidad parece ser un factor clave en el transporte y entrega exitosa del 5-FU en la VED. Se logró el suministro de 5-FU a las capas profundas de la piel mediante la aplicación tópica de UDL-5FU, lo que muestra el potencial de esta nanoformulación para el tratamiento de lesiones precancerosas y cancerosas no superficiales, ya que la eficacia del 5-FU libre está limitada por su falta de acceso a la epidermis viable.

# **Referencias**

Apalla, Z., Nashan, D., Weller, R.B., Castellsagué, X., 2017. Skin Cancer: Epidemiology, Disease Burden, Pathophysiology, Diagnosis, and Therapeutic Approaches. Dermatol. Ther. (Heidelb). https://doi.org/10.1007/s13555-016-0165-y Bagatolli, L.A., 2006. To see or not to see: lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy. Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes 1758, 1541-1556.

Barry, B.W., 1983. Dermatological formulations: percutaneous absorption. 1983. Volume 18, 3-15.

Bashir, S.J., Chew, A., Anigbogu, A., Dreher, F., Maibach, H.I., 2001. Physical and physiological effects of stratum corneum tape stripping. Ski. Res. Technol. 7, 40-48. https://doi.org/10.1034/j.1600-0846.2001.007001040.x

Bernik, D.L., Disalvo, E.A., 1996. Determination of the dimerization constant of merocyanine 540 at the membrane interface of lipid vesicles in the gel state. Chem. Phys. Lipids 82, 111-123. https://doi.org/10.1016/0009-3084(96)02568-6

Bucci, P., Prieto, M.J., Milla, L., Calienni, M.N., Martinez, L., Rivarola, V., Alonso, S., Montanari, J., 2018. Skin penetration and UV-damage prevention by nanoberries. J. Cosmet. Dermatol. 17, 889-899. https://doi.org/10.1111/jocd.12436 Celia, C., Trapasso, E., Cosco, D., Paolino, D., Fresta, M., 2009. Turbiscan Lab® Expert analysis of the stability of ethosomes® and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. Colloids Surfaces B Biointerfaces 72, 155-160. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.03.007

Cevc, G., 1995. Material transport across permeability barriers by means of lipid vesicles. Handb. Biol. Phys. 1, 465-490.

Cevc, G., Blume, G., 1992. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes 1104, 226-232. https://doi.org/10.1016/0005-2736(92)90154-E

Cosco, D., Paolino, D., Maiuolo, J., Marzio, L. Di, Carafa, M., Ventura, C.A., Fresta, M., 2015. Ultradeformable liposomes as multidrug carrier of resveratrol and 5-fluorouracil for their topical delivery. Int. J. Pharm. 489, 1-10. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.04.056

Cullen, S.I., 1979. Topical fluorouracil therapy for precancers and cancers of the skin. J. Am. Geriatr. Soc. 27, 529-535.

89

Disalvo, E.A., Arroyo, J., Bernik, D.L., 2003. Interfacial Properties of Liposomes as Measured by Fluorescence and Optical Probes. Methods Enzymol. 367, 213-233. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)67014-X

El Maghraby, G.M., Barry, B.W., Williams, A.C., 2008. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. Eur. J. Pharm. Sci. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.05.002

El Maghraby, G.M.M., Campbell, M., Finnin, B.C., 2005a. Mechanisms of action of novel skin penetration enhancers: phospholipid versus skin lipid liposomes. Int. J. Pharm. 305, 90-104.

El Maghraby, G.M.M., Williams, A.C., Barry, B.W., 2005b. Drug interaction and location in liposomes: correlation with polar surface areas. Int. J. Pharm. 292, 179-185.

El Maghraby, G.M.M., Williams, A.C., Barry, B.W., 2000. Oestradiol skin delivery from ultradeformable liposomes: refinement of surfactant concentration. Int. J. Pharm. 196, 63-74. https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00441-X

El Zaafarany, G.M., Awad, G.A.S., Holayel, S.M., Mortada, N.D., 2010. Role of edge activators and surface charge in developing ultradeformable vesicles with enhanced skin delivery. Int. J. Pharm. 397, 164-172. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.06.034

Elmeshad, A.N., Mortazavi, S.M., Mozafari, M.R., 2014. Formulation and characterization of nanoliposomal 5-fluorouracil for cancer nanotherapy. J. Liposome Res. 24, 1-9.

Elorza, B., Elorza, M.A., Frutos, G., Chantres, J.R., 1993. Characterization of 5fluorouracil loaded liposomes prepared by reverse-phase evaporation or freezingthawing extrusion methods: study of drug release. Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes 1153, 135-142.

Essa, E.A., Bonner, M.C., Barry, B.W., 2002. Iontophoretic estradiol skin delivery and tritium exchange in ultradeformable liposomes. Int. J. Pharm. 240, 55-66. https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00107-2

Fry, D.W., White, J.C., Goldman, I.D., 1978. Rapid separation of low molecular weight solutes from liposomes without dilution. Anal. Biochem. 90, 809-815.

Glavas-Dodov, M., Fredro-Kumbaradzi, E., Goracinova, K., Calis, S., Simonoska, M., Hincal, A.A., 2003. 5-Fluorouracil in topical liposome gels for anticancer treatment--formulation and evaluation. Acta Pharm. 53, 241-250.

Glavas-Dodov, M., Fredro-Kumbaradzi, E., Goracinova, K., Simonoska, M., Calis, S., Trajkovic-Jolevska, S., Hincal, A.A., 2005. The effects of lyophilization on the stability of liposomes containing 5-FU. Int. J. Pharm. 291, 79-86.

Gupta, P.N., Mishra, V., Rawat, A., Dubey, P., Mahor, S., Jain, S., Chatterji, D.P., Vyas, S.P., 2005a. Non-invasive vaccine delivery in transfersomes, niosomes and liposomes: a comparative study. Int. J. Pharm. 293, 73-82. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.12.022

Gupta, R.R., Jain, S.K., Varshney, M., 2005b. AOT water-in-oil microemulsions as a penetration enhancer in transdermal drug delivery of 5-fluorouracil. Colloids Surfaces B Biointerfaces 41, 25-32.

Harrison, S.M., Barry, B.W., Dugard, P.H., 1984. Effects of freezing on human skin permeability. J. Pharm. Pharmacol. 36, 261-262.

Henning, A., Neumann, D., Kostka, K.-H., Lehr, C.-M., Schaefer, U.F., 2008. Influence of human skin specimens consisting of different skin layers on the result of in vitro permeation experiments. Skin Pharmacol. Physiol. 21, 81-88. https://doi.org/10.1159/000112958

Henning, A., Schaefer, U.F., Neumann, D., 2009. Potential pitfalls in skin permeation experiments: influence of experimental factors and subsequent data evaluation. Eur. J. Pharm. Biopharm. 72, 324-331. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.07.016

Hirsch-Lerner, D., Barenholz, Y., 1999. Hydration of lipoplexes commonly used in gene delivery: Follow-up by laurdan fluorescence changes and quantification by differential scanning calorimetry. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 1461, 47-57. https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00145-5

Hollmann, A., Delfederico, L., De Antoni, G., Semorile, L., Disalvo, E.A., 2010. Interaction of bacterial surface layer proteins with lipid membranes: synergysm between surface charge density and chain packing. Colloids Surfaces B Biointerfaces 79, 191-197.

Honeywell-Nguyen, P.L., Gooris, G.S., Bouwstra, J.A., 2004. Quantitative assessment of the transport of elastic and rigid vesicle components and a model drug from these vesicle formulations into human skin in vivo. J. Invest. Dermatol. 123, 902-910. https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23441.x

Honeywell-Nguyen, P.L., Groenink, H.W.W., de Graaff, A.M., Bouwstra, J.A., 2003. The in vivo transport of elastic vesicles into human skin: effects of occlusion, volume and duration of application. J. Control. release 90, 243-255. https://doi.org/10.1016/S0168-3659(03)00202-5

Jacobi, U., Taube, H., Schäfer, U.F., Sterry, W., Lademann, J., 2005. Comparison of four different in vitro systems to study the reservoir capacity of the stratum corneum. J. Control. release 103, 61-71. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.11.013

Jain, S., Patel, N., Shah, M.K., Khatri, P., Vora, N., 2017. Recent Advances in Lipid-Based Vesicles and Particulate Carriers for Topical and Transdermal Application. J. Pharm. Sci. https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.10.001

Jui-Chen, T., Cappel, M.J., Weiner, N.D., Flynn, G.L., Ferry, J., 1991. Solvent effects on the harvesting of stratum corneum from hairless mouse skin through adhesive tape stripping in vitro. Int. J. Pharm. 68, 127-133.

Kaiser, N., Kimpfler, A., Massing, U., Burger, A.M., Fiebig, H.H., Brandl, M., Schubert, R., 2003. 5-Fluorouracil in vesicular phospholipid gels for anticancer treatment: entrapment and release properties. Int. J. Pharm. 256, 123-131.

Klein, E., Stoll Jr, H.L., Milgrom, H., Helm, F., Walker, M.J., 1971. Tumors of the skin. XII. Topical 5-fluorouracil for epidermal neoplasms. J. Surg. Oncol. 3, 331-349. Kligman, A.M., Christophers, E., 1963. Preparation of isolated sheets of human stratum corneum. Arch. Dermatol. 88, 702-705. https://doi.org/10.1001/archderm.1963.01590240026005

Lademann, J., Jacobi, U., Surber, C., Weigmann, H.-J., Fluhr, J.W., 2009. The tape stripping procedure–evaluation of some critical parameters. Eur. J. Pharm. Biopharm. 72, 317-323. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.08.008

Lelkes, P.I., Miller, I.R., 1980. Perturbations of membrane structure by optical probes: I. Location and structural sensitivity of merocyanine 540 bound to phospholipid membranes. J. Membr. Biol. 52, 1-15. https://doi.org/10.1007/BF01869001

Lopes, S., Simeonova, M., Gameiro, P., Rangel, M., Ivanova, G., 2011. Interaction of 5-fluorouracil loaded nanoparticles with 1, 2-dimyristoyl-sn-glycero-3phosphocholine liposomes used as a cellular membrane model. J. Phys. Chem. B 116, 667-675.

Maghraby, G.M.M. El, Williams, A.C., Barry, B.W., 2001. Skin delivery of 5fluorouracil from ultradeformable and standard liposomes in-vitro. J. Pharm. Pharmacol. 53, 1069-1077.

92

Marsanasco, M., Márquez, A.L., Wagner, J.R., Chiaramoni, N.S., Del V. Alonso, S., 2015. Bioactive compounds as functional food ingredients: Characterization in model system and sensory evaluation in chocolate milk. J. Food Eng. 166, 55-63. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.05.007

Mishra, D., Dubey, V., Asthana, A., Saraf, D.K., Jain, N.K., 2006. Elastic liposomes mediated transcutaneous immunization against Hepatitis B. Vaccine 24, 4847-4855. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.03.011

Montanari, J., Maidana, C., Esteva, M.I., Salomon, C., Morilla, M.J., Romero, E.L., 2010. Sunlight triggered photodynamic ultradeformable liposomes against Leishmania braziliensis are also leishmanicidal in the dark. J. Control. Release 147, 368-376. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.08.014

Naves, L.B., Dhand, C., Venugopal, J.R., Rajamani, L., Ramakrishna, S., Almeida, L., 2017. Nanotechnology for the treatment of melanoma skin cancer. Prog. Biomater. 6, 13-26. https://doi.org/10.1007/s40204-017-0064-z

Okamura, E., Yoshii, N., 2008. Drug binding and mobility relating to the thermal fluctuation in fluid lipid membranes. J. Chem. Phys. 129, 12B602.

Paolino, D., Cosco, D., Muzzalupo, R., Trapasso, E., Picci, N., Fresta, M., 2008. Innovative bola-surfactant niosomes as topical delivery systems of 5-fluorouracil for the treatment of skin cancer. Int. J. Pharm. 353, 233-242. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.11.037

Parasassi, T., De Stasio, G., Ravagnan, G., Rusch, R.M., Gratton, E., 1991. Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. Biophys. J. 60, 179-189. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82041-0

Parasassi, T., Gratton, E., 1995. Membrane lipid domains and dynamics as detected by Laurdan fluorescence. J. Fluoresc. 5, 59-69. https://doi.org/10.1007/BF00718783

Pirot, F., Berardesca, E., Kalia, Y.N., Singh, M., Maibach, H.I., Guy, R.H., 1998. Stratum corneum thickness and apparent water diffusivity: facile and noninvasive quantitation in vivo. Pharm. Res. 15, 492-494.

Postigo, F., Mora, M., De Madariaga, M.A., Nonell, S., Sagrista, M.L., 2004. Incorporation of hydrophobic porphyrins into liposomes: characterization and structural requirements. Int. J. Pharm. 278, 239-254.

Rigon, R.B., Oyafuso, M.H., Fujimura, A.T., Gonçalez, M.L., Prado, A.H. do,

93

Gremião, M.P.D., Chorilli, M., 2015. Nanotechnology-based drug delivery systems for melanoma antitumoral therapy: a review. Biomed Res. Int. 2015.

Sanz, R., Calpena, A.C., Mallandrich, M., Clares, B., 2015. Enhancing topical analgesic administration: review and prospect for transdermal and transbuccal drug delivery systems. Curr. Pharm. Des. 21, 2867-2882. https://doi.org/10.2174/1381612821666150428145627

Schaefer, U., Loth, H., 1996. An ex-vivo model for the study of drug penetration into human skin. Pharm. Res 13, b24.

Singh, B.N., Singh, R.B., Singh, J., 2005. Effects of ionization and penetration enhancers on the transdermal delivery of 5-fluorouracil through excised human stratum corneum. Int. J. Pharm. 298, 98-107.

Srivastava, R.C., Shankar, M., Tandon, A., Nagappa, A.N., 1987. Liquid membrane phenomena in anticancer drugs. Studies on 5-fluorouracil and its derivatives. Int. J. Pharm. 38, 239-245. https://doi.org/10.1016/0378-5173(87)90120-7

Stewart, J.C.M., 1980. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. Anal. Biochem. 104, 10-14. https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90269-9

van den Bergh, B.A.I., Wertz, P.W., Junginger, H.E., Bouwstra, J.A., 2001. Elasticity of vesicles assessed by electron spin resonance, electron microscopy and extrusion measurements. Int. J. Pharm. 217, 13-24. https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00576-2

Wagner, H., Kostka, K.-H., Lehr, C.-M., Schaefer, U.F., 2000. Drug distribution in human skin using two different in vitro test systems: comparison with in vivo data. Pharm. Res. 17, 1475-1481. https://doi.org/10.1023/A:1007648807195

Xu, D., Zhang, J., Cao, Y., Wang, J., Xiao, J., 2016. Influence of microcrystalline cellulose on the microrheological property and freeze-thaw stability of soybean protein hydrolysate stabilized curcumin emulsion. LWT-Food Sci. Technol. 66, 590-597. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.002

Yoshii, N., Okamura, E., 2009. Kinetics of membrane binding and dissociation of 5fluorouracil by pulsed-field-gradient 19F NMR. Chem. Phys. Lett. 474, 357-361. https://doi.org/10.1016/j.cplett.2009.04.078

# CAPÍTULO 3

# ESTUDIOS DE CITOTXICIDAD *IN VITRO* Y DE TOXICIDAD *IN VIVO* DE LIPOSOMAS ULTRADEFORMABLES CON 5-FLUOROURACILO

Este capítulo ha sido publicado en:

Drug Delivery and Translational Research, 8(3), 496-514 (2018). "Nano-formulation for topical treatment of precancerous lesions: skin penetration, in vitro and in vivo toxicological evaluation", MN Calienni, CF Temprana, MJ Prieto, D Paolino, M Fresta, AB Tekinay, SV Alonso, J Montanari.

AIP Conference Proceedings, 1990, 020024 (2018). "5-Fluorouracil-loaded ultradeformable liposomes for skin therapy", MN Calienni, MJ Prieto, V Muniz Couto, E de Paula, SV Alonso, J Montanari.

#### 3.1 Introducción

Al formular un principio activo en un nanosistema resulta crucial realizar pruebas de citotoxicidad *in vitro* y contar con un modelo que permita evaluar la toxicidad *in vivo* del mismo. En este capítulo se analizarán, por un lado, la citotoxicidad, la vía de muerte celular activada, y la captura celular de los liposomas ultradeformables con 5-fluorouracilo (UDL-5FU) descriptos en el Capítulo 2. Se comparará, además, con el 5-fluorouracilo (5-FU) libre, se analizará el efecto de la matriz liposomal y el efecto de la co-encapsulación del 5-FU con un extracto de arándanos rico en antioxidantes previamente caracterizado. Por otra parte, se determinará la toxicidad y teratogénesis *in vivo*, en larvas de pez cebra.

Tres ensayos in vitro de citotoxicidad que suelen utilizarse como pruebas complementarias para determinar la viabilidad celular son el ensayo con la sal de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-3,5-difeniltetrazolio (MTT), rojo neutro (NR) y cristal violeta (CV). El ensayo con MTT determina la capacidad de las células viables para convertir una sal soluble de tetrazolio en un precipitado de formazán insoluble como resultado de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial de las células (Supino, 1995). Por su parte, la captación del NR depende de la capacidad de la célula para mantener los gradientes de pH a través de la producción de ATP (Repetto et al., 2008). A pH fisiológico, el colorante presenta una carga neta cercana a cero, lo que le permite penetrar las membranas de la célula. Dentro de los lisosomas, el colorante se carga porque existe un gradiente de protones que mantiene un pH más bajo que el del citoplasma, y es retenido en su interior por las interacciones electrostáticas con la matriz lisosomal. Por lo tanto, las sustancias que dañan las membranas y la muerte celular dan lugar a una disminución de la retención del NR. Por último, dado que las células adherentes se desprenden de las placas de cultivo celular durante la muerte celular, esta característica se puede utilizar para la cuantificación indirecta de la viabilidad celular. Un método simple para detectar la adherencia es la tinción de las células con CV, el cual se une a las proteínas y al ADN (Feoktistova et al., 2016). Las células que experimentan la muerte celular pierden su adherencia, lo que reduce la cantidad de tinción con CV del cultivo.

Por otra parte, el pez cebra (*Danio rerio*) es un modelo creciente en el campo de la nanotoxicología (Haque y Ward, 2018). Es un modelo animal que ofrece información imposible de obtener de estudios *in vitro* (Fig. 1), y que a la vez es capaz de predecir efectos adversos, como un paso previo a los estudios en mamíferos (Lee et al., 2017), por lo que es considerado un modelo intermedio.





El pez cebra es un teleósteo de agua dulce perteneciente a la familia *Cyprinidae*. Se trata de un pez tropical, originario del sureste de Asia, que alcanza en su vida adulta un tamaño de 4-5 cm. Los embriones y larvas son de tamaño pequeño, su desarrollo es rápido, alcanzando un estadio con características semejantes a la de adulto a las 72 horas post fecundación (hpf) (Fig. 2). Son traslúcidos y todo su desarrollo ocurre *ex utero*, lo cual posibilita un análisis fenotípico *in vivo* de la embriogénesis y organogénesis, efectos teratogénicos y toxicológicos (Lin et al., 2013). Estas características permiten realizar determinaciones no sólo de cambios morfológicos externos, sino también de órganos internos como el corazón, hígado e intestino.

El pez cebra desarrolla muchos de los principales sistemas de órganos presentes en los mamíferos durante la primera semana de vida. Se ha demostrado una elevada homología genética con los humanos (~70%) (Howe et al., 2013) y que algunos de sus órganos y tejidos son similares a los de los mamíferos a nivel anatómico, fisiológico y molecular (Lee et al., 2017).



Figura 2. Línea de tiempo representativa, en horas post fecundación (hpf), del desarrollo del pez cebra.

Por otra parte, varios trabajos sostienen que el suplemento de antioxidantes durante tratamientos contra el cáncer podría reducir los efectos adversos y aumentar el potencial de éxito de dicha terapia (Block et al., 2007); aunque, en algunos casos, se considera que podrían antagonizar los efectos antitumorales al reducir el daño oxidativo (Yasueda et al., 2016). Por su parte, Cosco et al., 2015 han demostrado que la co-encapsulación del resveratrol, un polifenol natural utilizado en gran parte como antioxidante, con 5-FU en liposomas, potenció la acción antitumoral de este último de manera sinérgica en células derivadas de cáncer de piel (Cosco et al., 2015). Dentro del grupo de pertenencia, el Laboratorio de Bio-Nanotecnología de la Universidad Nacional de Quilmes, previamente se había probado la eficacia de acción antioxidante de una fracción de polifenoles rica en antocianinas provenientes de un extracto etanólico de arándanos, los cuales fueron incorporados en UDL (Bucci et al., 2018; Montanari et al., 2013). Por lo que se decidió estudiar el efecto *in vitro* de la co-encapsulación de este extracto con 5-FU en UDL.

#### 3.2 Materiales y métodos

# 3.2.1 Materiales

La fosfatidilcolina de soja (SPC) fue comprada a Avanti<sup>®</sup> Polar Lipids. El 5-FU empleado provino de una solución invectable de Laboratorios Filaxis (Buenos Aires, Argentina). El colato de sodio (NaChol), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3fosfoetanolamina-N-(Lissamine™ rodamina B sulfonil) (Rh-DPPE), isotiocianato de fluoresceína (FITC) y sephadex G-50 se compraron a Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina). La carboximetilcelulosa sódica utilizada fue de Fluka-BioChemika (Sigma-Aldrich, Argentina). La eosina amarillenta, cristal violeta (CV), rojo neutro (RN), dimetilsulfóxido (DMSO), ácido acético y etanol empleados fueron de BioPack (Buenos Aires, Argentina). La hematoxilina y la sacarosa se compraron a Anedra (Buenos Aires, Argentina). Agar-agar fue de Laboratorios Britania SA (Buenos Aires, Argentina). La sal de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-3,5-difeniltetrazolio (MTT) se obtuvo de Life Technologies™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Argentina). Medio esencial mínimo (MEM), medio RPMI 1640, suero fetal bovino, glutamina, piruvato, penicilina y estreptomicina se obtuvieron de Gibco (Waltham, USA). Las artemias (Artemia persimilis) fueron de Biosima SRL (Buenos Aires, Argentina). Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

# 3.2.2 Métodos

# 3.2.2.1 Obtención de un extracto de arándanos rico en antioxidantes

Se obtuvo un extracto etanólico de arándanos (BE) (*Vaccinium myrtillus*, variedad "Millenia") rico en antioxidantes de acuerdo a Bucci et al., 2018. Los arándanos fueron cosechados en diciembre de 2015 en San Pedro, Argentina (Latitud 33° 45' S, Longitud 59° 45' O, a 36 m sobre el nivel del mar). Se pesaron y molieron 25 g de fruta, a los cuales se les añadió 150 ml de etanol (96%) y HCl al 0,1%. La mezcla se sonicó durante 30 min en un sonicador de baño a 25 °C y 40 kHz, y luego fue filtrada al vacío utilizando un filtro de papel Whatman No. 1. El etanol y el agua de la fruta se eliminaron mediante evaporación en vació con rotavapor (30 °C, 200 rpm) hasta no observar cambio en el peso del extracto.

#### 3.2.2.2 Preparación de los liposomas ultradeformables

Los UDL, UDL-5FU y F-UDL-5FU se prepararon tal como se describió en el Capítulo 2, sección 2.2.2.1.

Adicionalmente, se obtuvieron UDL que co-encapsularon 5-FU y BE (UDL-5FU-BE). Para ello el extracto se solubilizó en la solución de 0,25% p/v de 5-FU en buffer Tris para obtener una concentración de 6,13 mg/ml de BE. Con dicha solución se hidrató la película lipídica de SPC y NaChol para obtener UDL-5FU-BE, los cuales presentaron tamaño promedio similar a los UDL-5FU.

# 3.2.2.3 Estudios in vitro con líneas celulares

Los estudios *in vitro* fueron realizados con dos líneas celulares humanas: HaCaT, derivada de queratinocitos de la piel inmortalizados y SK-Mel-28, derivada de melanoma (tumoral). Ambas líneas fueron obtenidas del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular. (IMBICE-CIC-CONICET, Argentina).

Las células fueron mantenidas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> en medio suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB), inactivado por calor, glutamina 2 mM,100 UI/mI de penicilina, 100 µg/mI de estreptomicina y 0,25 µg/mI de anfotericina B. Las HaCaT fueron mantenidas en medio RPMI 1640 y SK-Mel-28 en MEM suplementado con piruvato de sodio 1 mM.

Todos los ensayos se llevaron a cabo utilizando medio de cultivo con SFB al 10%.

# 3.2.2.3.1 Estudios de citotoxicidad

La viabilidad celular luego de 4 y 24 h de incubación con UDL, ULD-5FU, UDL-5FU-BE y 5-FU libre, fue determinada mediante tres ensayos bioquímicos diferentes. Dado que los reactivos colorimétricos utilizados miden la viabilidad celular mediante diferentes mecanismos, se decidió combinar estos ensayos para obtener una más robusta comprensión de la interacción entre las formulaciones y las células, disminuyendo posibles interpretaciones erróneas de falsos positivos y falsos negativos.

Se sembraron 1 x  $10^4$  células/pocillo en microplacas de 96 pocillos de fondo plano. Después de 24 h de incubación a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>, el medio de cultivo fue reemplazado por 100 µl de UDL, UDL-5FU, UDL-5FU-BE o 5-FU, previamente diluidos en el medio de cultivo. La concentración de 5-FU evaluada osciló entre 0,18 y 114,4 µM, lo cual corresponde a concentraciones de SPC de 0,033 a 20,6 mM.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los tratamientos fueron removidos. Las monocapas celulares se lavaron tres veces con buffer fosfato salino (PBS) y, a continuación, se llevaron a cabo los ensayos de determinación de viabilidad celular MTT, CV y NR.

En el caso del ensayo por MTT, se añadió medio fresco que contenía 0,5 mg/ml de sal de MTT y se incubó durante 2 h a 37 °C. Los cristales insolubles de formazán formados tras la reacción del MTT fueron disueltos en 200 µl de DMSO, y la absorbancia a 570 nm se midió en un lector de microplacas Rayto RT-2100C (Nashan, China).

Para la prueba con CV, 100 µl de solución de CV fueron añadidos a cada pocillo y se incubó durante 15 min a 37 °C en una cámara húmeda. El CV fue removido y la placa se sumergió dos veces en agua destilada. Se añadieron 100 µl/pocillo de una solución de ácido acético al 30% para disolver los cristales y se midió la absorbancia a 530 nm en un lector de microplacas.

Por último, para el ensayo con NR, se añadieron 200 µl de una solución 50  $\mu$ g/ml de NR, y las células se dejaron incubando durante 3 h a 37 °C. Una vez retirado el NR se agregaron 200 µl de una solución fijadora de formaldehído al 1% la cual se removió al cabo de 2 min lavando con solución salina (NaCl 0,9%). Para revelar se añadieron 200 µl de una solución etanol al 50% y ácido acético glacial al 1% a cada pocillo. Se homogeneizó y se determinó la absorbancia en un lector de microplacas a 540 nm.

El porcentaje de viabilidad celular se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

Viabilidad celular (%) = 
$$\frac{Abs T}{Abs C} \times 100$$

102

Donde Abs T es la absorbancia de las células tratadas y Abs C es la absorbancia de las células control (no tratadas). La concentración de formazán, CV y NR es directamente proporcional a la viabilidad celular, la cual se reportó como el promedio de tres experimentos independientes ± SD.

# 3.2.2.3.2 Estudios de activación de vías de muerte celular

La evaluación de la inducción de apoptosis y necrosis celular se llevó a cabo por triplicado empleando el kit de detección de apoptosis Anexina V acoplada a FITC (BD Pharmingen<sup>™</sup>, USA). Se sembraron 3 x 10<sup>5</sup> células/pocillo en placas de 6 pocillos y se mantuvieron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h. El medio de cultivo fue reemplazado con medio fresco que contenía UDL-5FU, UDL-5FU -NB y 5-FU (114,4 µM de 5-FU). Las células fueron incubadas durante 6 h a 37 °C y 5% de CO2. Transcurrido el tiempo, se retiraron los tratamientos y las células fueron lavadas tres veces con PBS y tripsinadas. La tripsina fue inactivada con SFB. Las células se centrifugaron a 125xg y la densidad celular se ajustó a 1 x 10<sup>6</sup> células/ml en buffer de unión. La tinción se realizó de acuerdo a las instrucciones del kit. Brevemente, a 100 µl (1 x 10<sup>5</sup> células) de la suspensión celular se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad con 5 µl de Anexina V-FITC y/o 5 µl de ioduro de propidio, y se añadieron 400 µl de buffer de unión. Un total de 1,9 x 10<sup>4</sup> células fueron analizadas, sin demorar más de 1 h desde el momento de la incubación, mediante citometría de flujo (Becton Dickinson FACSCalibur, USA). Las muestras se excitaron con un láser de 488 nm y se emplearon los filtros detectores FL1 (530/30 nm) para FITC y FL3 (670 nm LP) para el ioduro de propidio. Los datos fueron procesados utilizando el software CellQuest Pro.

#### 3.2.2.3.3 Captura celular de los liposomas

La captura celular de los F-UDL-5FU (22,9 µM de 5-FU) fue monitoreada en HaCaT y SK-Mel-28 mediante microscopía de fluorescencia. Las células se cultivaron sobre cubreobjetos y se las dejó crecer durante 24 h en placas de 6 pocillos. Se las incubó con los F-UDL-5FU durante 3 h en a 37 °C (temperatura óptima del crecimiento) y a 4 °C (temperatura a la que se ve reducido el metabolismo celular) (Montanari et al., 2010). Se incluyeron blancos de células sin tratar. Transcurrido el tiempo, las células se lavaron 3 veces con PBS y los cubreobjetos fueron montados sobre portaobjetos para ser observados en un microscopio de fluorescencia (Nikon Alphaphot- 2 YS2, Japón).

#### 3.2.2.4 Evaluación de la toxicidad in vivo en larvas de pez cebra

Se realizaron estudios de toxicidad en larvas de pez cebra entre el 4º y 7º día post fecundación (dpf). Los peces cebra adultos (cepa salvaje) se mantuvieron en tanques a 26 ± 1 °C con un ciclo de 14/10 h de luz/oscuridad en el acuario del Laboratorio de Bio-Nanotecnología de la Universidad Nacional de Quilmes. Los peces adultos fueron alimentados con alimento seco (TetraMin PRO<sup>®</sup>) tres veces al día y una vez al día con artemias vivas (*Artemia persimilis*). El agua fue constantemente aireada y mantenida a pH 7,0–8,0.

Luego del desove y la fertilización, los embriones fueron recolectados y conservados en medio E3 (NaCl 0,29 g/l, KCl 0,012 g/l, CaCl<sub>2</sub> 0,036 g/l y MgSO<sub>4</sub> 0,039 g/l en agua desionizada y 50 ppb de azul de metileno para inhibir el crecimiento de hongos). Sólo los huevos fertilizados en buenas condiciones fueron seleccionados para los ensayos posteriores. Después de 1 dpf, se colocaron tres embriones de pez cebra en cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos con medio E3, y se mantuvieron a 28 ± 1 °C hasta los 4 dpf en las mismas condiciones de luz que los adultos.

#### 3.2.2.4.1 Tratamiento de las larvas

A los 4 dpf se les retiró el medio y se reemplazó con 250  $\mu$ l de diluciones seriadas en medio E3 de 5-FU libre y UDL-5FU, o con E3 para el control sin tratar. La solución de tratamiento se mantuvo durante todo el estudio y las larvas se incubaron a 28 ± 1 °C con un ciclo de luz/oscuridad de 14/10h. El rango de concentración de 5-FU estudiado fue entre 1,25 y 20 mM para 5-FU libre y entre 1,8 y 117  $\mu$ M de 5-FU (0,825–52,8 mM de SPC) para UDL-5FU. Se analizaron

diferentes concentraciones de 5-FU libre y encapsulado para estudiar el rango de concentraciones que producen efectos detectables.

La actividad de nado, las alteraciones en el ritmo cardíaco y los cambios morfológicos se evaluaron en el mismo grupo de larvas.

Sólo fueron considerados válidos aquellos ensayos con un 90% de viabilidad de los controles.

# 3.2.2.4.2 Cambios en la actividad de nado

Los eventos de actividad de las larvas se registraron durante 15 min a las 4, 24, 48 y 72 horas post incubación (hpi) a temperatura ambiente con un dispositivo automatizado, el cual cuenta con un sistema de detección de por haces infrarrojos (WMicrotracker, Designplus SRL, Argentina) (Bichara et al., 2014). La actividad de nado se determinó como el número de interrupciones del arreglo de haces durante el tiempo de medición, y dichos datos fueron relativizados al control. Un total de ocho pocillos por condición se analizaron por triplicado.

# 3.2.2.4.3 Alteraciones del ritmo cardíaco y cambios morfológicos

El ritmo cardíaco y los cambios morfológicos fueron evaluados a las 72 hpi (7 dpf). Las larvas tratadas y control fueron transferidas individualmente a un pocillo de una microplaca de 96 pocillos, y se inmovilizaron con carboximetilcelulosa de sodio. Se fotografiaron 8 larvas por condición y se grabó un video de 15 s con una cámara Microsoft LifeCam Studio acoplada a una lupa trinocular Nikon SMZ800 (Nikon Corporation, Japón). El ritmo cardíaco se determinó contando el número de latidos durante 15 s y se reportó como el número de latidos por minuto. Como parámetros morfológicos se tuvo en cuenta la presencia de una vejiga natatoria desinflada, cuerpo arqueado, ulceración de tejidos y edema pericardial. También se midieron el área del ojo, la longitud rostrocaudal y la longitud de la médula espinal mediante el *software* ImageJ.

#### 3.2.2.4.4 Estudios histológicos

Con el fin de analizar los efectos en el cerebro e hígado de las larvas de pez cebra de los UDL-5FU en comparación con el 5-FU libre, se realizaron cortes histológicos de 10 larvas por condición, los cuales se tiñeron con hematoxilinaeosina (H-E) de acuerdo a Calienni et al., 2017. Los estudios se realizaron al 5 y 7 dpf (24 y 72 hpi).

Larvas de 4 dpf se incubaron, tal como se explicó en la sección 3.2.2.4.1, con UDL-5FU –1,8  $\mu$ M de 5-FU y 0,825 mM de SPC–, y con 4 mM de 5-FU libre. A los controles sin tratar se los mantuvo con medio E3.

Larvas de 5 y 7 dpf fueron anestesiados en una solución de metanosulfonato de tricaína 0,3 mg/ml y fueron fijadas *overnight* a 4 °C en una solución de paraformaldehído 4% p/v en buffer fosfato 0,1 M (pH 7,4). Para eliminar el fijador se realizaron 5 lavados con PBS de 5 min cada uno. A continuación, se embebieron y acomodaron las larvas en una mezcla de agar-sacarosa (agar 1,5% y sacarosa 10% p/v en buffer fosfato) la cual se dejó solidificar en moldes plásticos. Los bloques fueron criopreservados con sacarosa 30% p/v en buffer fosfato, mediante agitación continua *overnight* a temperatura ambiente.

Se realizaron cortes histológicos parasagitales seriados de 20 µm de espesor en criostato a -22 °C utilizando portaobjetos gelatinizados, y fueron teñidos con H-E. En primer lugar, se removió el agar con un primer lavado de 5 min en PBS, un segundo lavado de 5 min PBS:agua 50:50, y un tercer lavado de 5 min con agua destilada. Se tiñó con hematoxilina durante 1 min 30 s y se lavó con agua corriente durante 30 min. Luego se tiñó con eosina durante 1 min y se hizo un pasaje rápido por agua destilada. A continuación, se deshidrataron los cortes pasándolos durante 2 min por concentraciones crecientes de etanol –50, 70, 80, 96 y dos pasajes por etanol absoluto–. Por último, se hicieron 3 pasajes de 3 min cada uno en xileno. Los cortes se cubrieron con un cubreobjeto con medio de montaje.

Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000-U (Nikon Corporation, Japón) acoplado a una cámara Nikon Digital Sight DS-5M-U2.

#### 3.2.2.4.5 Declaración de ética

Todos los procedimientos con animales se realizaron en estricta conformidad con las guías internacionales para el cuidado y mantenimiento de animales de laboratorio. Los protocolos fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y el Comité de Ética de la Universidad Nacional de Quilmes, Argentina (CE-UNQ 2/2014, CICUAL-UNQ 013-15 y CICUAL-UNQ 014-15).

# 3.2.2.5 Análisis estadístico

El *software* GraphPad Prism 6.0 se utilizó para realizar todos los análisis estadísticos. Se llevaron a cabo pruebas ANOVA de una vía y el *post-test* de comparaciones múltiples de Dunnett. Los tratamientos fueron comparados con el control. Sólo los valores con p < 0.05 fueron aceptados como significativos.

# 3.3 Resultados

# 3.3.1 Estudios in vitro

Los efectos citotóxicos, la captura de los liposomas y la inducción de la apoptosis de UDL, UDL-5FU, UDL-5FU-BE y 5-FU se evaluaron en las líneas celulares HaCaT, como control de una línea celular que no deriva de un tumor, y SK-Mel-28, derivada de melanoma. En el caso particular de los UDL-5FU-BE, dado que el BE exhibe actividad antioxidante por la presencia de una fracción de polifenoles rica en antocianinas en una concentración no citotóxica para células HaCaT (Montanari et al., 2013), se decidió co-encapsular BE y 5-FU, buscando obtener un efecto sinérgico en términos de reducir el estrés oxidativo en células que no son blanco (Cosco et al., 2015).
## 3.3.1.1 Citotoxicidad

La viabilidad celular se midió mediante los ensayos de MTT, CV y NR después de 4 y 24 h de tratamiento por triplicado (Fig. 3).

Los UDL-5FU y UDL-5FU-BE a la máxima concentración estudiada fueron más citotóxicos en SK-Mel-28 que en HaCaT a las 4 h, mientras que ambas formulaciones fueron más tóxicas que el 5-FU libre en ambas líneas luego de 24 h de tratamiento. En SK-Mel-28, los UDL-5FU y UDL-5FU-BE redujeron alrededor de un 70%, con respecto al control no tratado, la actividad metabólica en las mitocondrias después de 4 y 24 h de tratamiento. Además, las SK-Mel-28 tratadas con ambas formulaciones presentaron una actividad metabólica menor, ~70% (4 h) y ~40% (24 h) menos, que aquellas tratadas con 5-FU libre.

Mediante NR se observó que los tratamientos con UDL-5FU y UDL-5FU-BE –concentración de 5-FU encapsulado de 114,4  $\mu$ M– indujeron un mayor daño celular en comparación con el control y el 5-FU libre luego de 4 y 24 h de tratamiento para ambas líneas. Sin embargo, estos tratamientos no afectaron la adhesión celular a la microplaca a las 4 h, como fue evidenciado mediante CV. Solo a las 24 h los UDL-5FU-BE redujeron la adhesión en un 20% en SK-Mel-28, y ambas formulaciones redujeron la adhesión de HaCaT alrededor del 40%.

Los UDL vacíos presentaron tasas de toxicidad más altas que las formulaciones con BE y/o 5-FU y que la droga libre en todas las condiciones estudiadas.



Figura 3. Viabilidad celular luego de 4 y 24 h de incubación con UDL (blanco), UDL-5FU (gris claro), UDL-5FU-BE (gris oscuro) y 5-FU libre (negro) en HaCaT y SK-Mel-28, determinada por MTT, NR y CV. Los valores de concentración de 5-FU se expresan en µM y los de SPC en mM. Los datos se muestran como promedio  $\pm$  SD (n = 3), \* p < 0,05, \*\* p < 0,004, \*\*\* p < 0,0006, \*\*\*\* p < 0,0001. Una versión ampliable de esta figura se encuentra disponible en Calienni et al., 2018.

## 3.3.1.2 Captura celular

Para estudiar la captura celular de los liposomas, ambas líneas celulares se incubaron con una concentración subletal de F-UDL-5FU (22,9  $\mu$ M de 5-FU) durante 3 h a 37 y 4 °C.

SK-Mel-28 mostró una mayor captura de F-UDL-5FU que HaCaT a 37°C (Fig. 4). Si bien SK-Mel-28 presentó fluorescencia a 4 °C, la intensidad fue menor que a 37 °C, mientras que no se pudo observar fluorescencia a 4°C en HaCaT.



Figura 4. Captura celular de F-UDL-5FU después de 3 h de incubación en HaCaT y SK-Mel-28. Las señales rojas y verdes corresponden a Rh-DPPE y FITC, respectivamente. Las imágenes superpuestas de ambos fluoróforos se obtuvieron con el *software* ImageJ.

## 3.3.1.3 Muerte celular

La inducción de apoptosis y necrosis fue seguida por citometría de flujo después de 6 h de tratamiento con 5-FU, UDL-5FU y UDL-5FU-BE (Fig. 5). Para la detección, se utilizó el kit de apoptosis Anexina V-FITC.

Se observó un efecto diferencial entre ambas líneas celulares. En SK-Mel-28, ambas formulaciones indujeron una mayor tasa de apoptosis que el 5-FU libre, mientras que en HaCaT solo se observó la inducción de un ligero porcentaje de células necróticas no deseables después de la incubación con UDL-5FU-BE. Por lo tanto, no sólo la co-encapsulación del 5-FU con el BE no alteró de manera significativa los efectos citotóxicos de los UDL-5FU en HaCaT y SK-Mel-28, sino que, además, produjo un efecto indeseable como lo es la inducción de muerte necrótica en la línea celular no melanoma.



Figura 5. Análisis por citometría de flujo para la detección y comparación de la inducción apoptótica y necrótica por 5-FU, UDL-5FU y UDL-5FU-BE en HaCaT y SK-Mel-28 después de 6 h de incubación. Los eventos fueron detectados mediante el kit Anexina V acoplada a FITC e ioduro de propidio. \*Una versión ampliable de esta figura se encuentra disponible en Calienni et al., 2018.

## 3.3.2 Estudios in vivo

El objetivo de los estudios en el pez cebra fue determinar la toxicidad de los UDL-5FU en comparación al 5-FU libre, como un paso preliminar para estudios *in vivo* posteriores en un modelo mamífero. La Fig. 6 muestra un esquema representativo de los ensayos realizados y en el estadio larvario en el que fueron llevados a cabo.



Figura 6. Esquema representativo de los estudios de toxicidad *in vivo* realizados en larvas de pez cebra y su secuencia temporal en el desarrollo de la larva en horas post incubación (hpi).

## 3.3.2.1 Alteración de la actividad de nado

La actividad de nado se evaluó con un sistema automatizado a las 4, 24, 48 y 72 hpi. El 5-FU libre disminuyó la actividad de nado, particularmente después de 48 y 72 hpi para todas las concentraciones estudiadas (Fig. 7). Las larvas tratadas con 5-FU 10 y 20 mM no presentaron movimiento a las 72 hpi. Al observarlas a la lupa, se corroboró que las mimas se encontraban muertas. Por otro lado, el tratamiento con UDL-5FU mostró un efecto de excitación, incrementando la actividad de nado respecto al control sin tratar, a bajas concentraciones, mientras que a mayores concentraciones no se detectó movimiento después de las 48 hpi (Fig. 7). Se observó una elevada tasa de mortalidad para los tratamientos con UDL-5FU 117  $\mu$ M (concentración de 5-FU encapsulado) entre las 24 y 72 hpi, y con 58,5  $\mu$ M a las 72 hpi.



Figura 7. Porcentaje de actividad de nado espontánea de las larvas respecto al control (línea punteada que corresponde al 100% de la actividad de nado) a las 4, 24, 48 y 72 horas post incubación (hpi). Los datos se muestran como promedio  $\pm$  SEM (n = 24), \* *p* < 0,05, \*\* *p* < 0,01, \*\*\* *p* < 0,001, \*\*\*\* *p* < 0,0001.

## 3.3.2.2 Alteración del ritmo cardíaco y cambios morfológicos

Ocho larvas de los estudios de actividad de nado fueron tomadas al azar a las 72 hpi (7 dpf). Fueron inmovilizadas para ser fotografiadas y filmadas para estudiar alteraciones morfológicas y afecciones cardíacas aprovechando del hecho de que en dicho estadio son translúcidas.

El 5-FU libre 2,5 mM produjo arritmia y las larvas tratadas con concentraciones igual o mayores a 5 mM estaban muertas a las 72 hpi (Fig. 8). El tratamiento con UDL-5FU también produjo alteración de la frecuencia cardíaca a las 72 hpi. Las concentraciones bajas indujeron un aumento del ritmo cardíaco, mientras que las concentraciones altas produjeron una disminución en la frecuencia cardíaca (Fig. 8). Las larvas expuestas a 58,5 y 117 µM de 5-FU encapsulado murieron a las 72 hpi.



Figura 8. Latidos por minuto a las 72 horas post-incubación (hpi). Promedio  $\pm$  SD (n = 8), \* p < 0.05, \*\*\*\* p < 0.0001.

Como parámetros de efectos tóxicos y teratogénicos en las larvas se analizaron cambios en el área del ojo, la longitud rostrocaudal y de la médula espinal, así como la presencia de una vejiga desinflada, cuerpo arqueado, tejido ulcerado y edema pericardial (Fig. 9).



Figura 9. Algunos de los parámetros que se analizan como indicadores de cambios morfológicos en larvas. Las imágenes son representativas, y corresponden larvas de 72 horas post incubación.

Las larvas incubadas con concentraciones sub-letales de 5-FU libre, es decir, menores a 5 mM, presentaron alteraciones morfológicas leves a moderadas. Sólo las larvas tratadas con 2,5 mM de 5-FU presentaron efectos tales como vejiga natatoria desinflada (25% de las larvas), presencia de cuerpo arqueado (37,5%) y tejido ulcerado (12,5%), y un aumento en la longitud rostrocaudal (Fig. 10). Mientras que en las larvas incubadas con concentraciones sub-letales de UDL-5FU no presentaron cambios morfológicos. No se observó edema pericárdico en ninguna de las condiciones estudiadas.



Figura 10. Parámetros morfológicos analizados en larvas a las 72 horas post incubación: área del ojo, longitud rostrocaudal y longitud de la médula espinal. Las mediciones fueron llevadas a cabo con el *software* ImageJ. Sólo se muestran los resultados de las larvas tratadas con concentraciones sub-letales. Promedio  $\pm$  SD (n = 8)., \* *p* < 0,05.

## 3.3.2.3 Estudios histológicos

Dado que las alteraciones en la actividad locomotora de las larvas pueden relacionarse con efectos neurológicos (Selderslaghs et al., 2013), se estudiaron, de manera exploratoria, alteraciones en el cerebro, en particular en las células del núcleo del rafe (Fig. 11). Para ello las larvas fueron incubadas con una concentración de 5-FU (4 mM) y de UDL-5FU (1,8  $\mu$ M de 5-FU encapsulado) que generó alteraciones en la actividad de nado. También se analizó el efecto de ambos tratamientos en el desarrollo del hígado (Fig. 11).



Figura 11. Corte histológico de 20 µm de espesor de una larva control de 5 días post fecundación (dpf) teñida con hematoxilina-eosina (10x). El estudio histológico se focalizó en el cerebro –en los núcleos del rafe– y en el hígado.

El análisis histológico no mostró alteraciones significativas en el cerebro y el hígado en las condiciones estudiadas. Los núcleos del rafe mostraron una organización normal (Fig. 12) para ambos tratamientos a 5 y 7 dpf, los cuales corresponden a las 24 y 72 hpi respectivamente. De manera similar, los tratamientos no alteraron la fisonomía normal del hígado (Fig. 13).



Figura 12. Tinción con hematoxilina-eosina de los núcleos del rafe en el cerebro de larvas control (sin tratar) y de larvas tratadas con 5-FU y UDL-5FU luego de 24 hpi (5 dpf) y 72 hpi (7 dpf) (40x).



Figura 13. Tinción con hematoxilina-eosina del hígado de larvas control (sin tratar) y de larvas tratadas con 5-FU y UDL-5FU luego de 24 hpi (5 dpf) y 72 hpi (7 dpf) (40x).

## 3.4 Discusión

Los resultados de citotoxicidad mostraron que la encapsulación del 5-FU en UDL aumentó significativamente su toxicidad en cultivos celulares. Este incremento en la toxicidad podría estar relacionado con la propia matriz liposomal, la cual fue más citotóxica que los demás tratamientos. La reducción de la citotoxicidad de la matriz por la incorporación de 5-FU y BE podría estar relacionada con la interacción detectada en este trabajo (Capítulo 2) entre el 5-FU y la membrana liposomal. Los UDL-5FU, además, presentaron una mayor tasa de inducción de apoptosis que el 5-FU libre. Este efecto fue mucho más significativo en la línea derivada de melanoma humano SK-Mel-28 que en HaCaT (derivada de queratinocitos inmortalizados). Por otra parte, en ambas líneas celulares la internalización de los UDL-5FU se estaría llevando a cabo principalmente mediante alguna vía endocítica. Aunque en SK-Mel-28, se evidenció un ingreso de los F-UDL-5FU por un mecanismo pasivo, no dependiente de actividad metabólica a 37 °C.

En vista de los resultados de citotoxicidad y muerte celular *in vitro*, se observó que la incorporación de los antioxidantes presentes en el BE a los UDL-5FU no mejoró el rendimiento general del 5-FU como se evidenció en otros trabajos publicados y, además, presentó un efecto no deseado en HaCaT que fue la inducción de un porcentaje de células necróticas significativo con respecto al control sin tratar.

La determinación de alteraciones en la actividad de nado espontáneo de las larvas de pez cebra es una manera de detectar efectos en el sistema nervioso en desarrollo. Tanto la hipo como la hiperactividad pueden ser indicativo de efectos adversos sobre uno o más componentes de los circuitos neuronales de la red del aparato locomotor temprano (médula espinal y el cerebro posterior –rombencéfalo–) (Selderslaghs et al., 2013). Además, la incubación al 4 dpf posibilita evidenciar efectos en el desarrollo de la vejiga. Entre el 4-5 dpf cuando la vejiga natatoria y los sistemas sensoriales, como la visión, son funcionales, las larvas comienzan a desplazarse y nadar de manera espontánea (Colwill y Creton, 2011; Drapeau et al., 2002). El pez cebra también es un buen modelo para determinar y estudiar cardiotoxicidad, pese a que su corazón difiera estructuralmente al del humano (Lee

et al., 2013). Por su parte, el hígado de las larvas está completamente formado y funcional a los 3 dpf (He et al., 2013). Si bien existen diferencias menores, la anatomía general, la composición celular y su función es virtualmente la misma que la del hígado de los mamíferos; y los estadios embrionarios tempranos de hepatogénesis son similares a los del ratón (He et al., 2013).

El 5-FU tanto en su forma libre como encapsulado produjo cambios en la actividad de las larvas dosis dependiente. Este efecto podría ser una evidencia de daño neurológico, lo cual encuentra sustento en el trabajo de Brannen et al., 2010, donde observaron en larvas expuestas de manera continua durante 5 días desde estadios embrionarios tempranos, que el 5-FU afectó al sistema nervioso central y al esqueleto de las mismas (Brannen et al., 2010). Además, existe evidencia sobre la incidencia de anormalidades en el desarrollo del sistema musculoesquelético en ratones y ratas (Dagg, 1960; Grafton et al., 1987) y que puede afectar a nivel del cerebro en humanos provocando síndromes cerebelosos como ataxia y nistagmo (McGrath, 2012). La disminución en la actividad locomotora de las larvas expuestas a concentraciones mayores a 5 mM de 5-FU libre y 117 µM de UDL-5FU también pudo estar relacionada con un incremento en la tasa de mortalidad.

Uno de los órganos diana de esta droga es el corazón (Jensen y Sørensen, 2006). El 5-FU libre produjo arritmia en larvas expuestas a 2,5 mM de droga, y no presentaron latidos en concentraciones superiores a 5 mM. Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos del análisis de la actividad de nado, ya que el mismo rango de concentraciones que produjo efecto cardíaco provocó alteraciones significativas en la actividad locomotora. El tratamiento con UDL-5FU también produjo una alteración de la frecuencia cardíaca a las 72 hpi. Bajas concentraciones altas produjeron un aumento del ritmo cardíaco, mientras que las concentraciones altas produjeron una disminución del mismo respecto al control. Los efectos observados entre la actividad de nado y el análisis del ritmo cardíaco también fueron congruentes. Las concentraciones que aumentaron el ritmo cardíaco fueron las mismas que incrementaron la actividad de nado respecto al control, mientras que todas las larvas expuestas a 117 µM murieron a las 72 hpi.

En los vertebrados la serotonina juega un papel clave en la modulación de los movimientos locomotores, y el sistema serotoninérgico está altamente conservado entre ellos (Lillesaar, 2011). Mientras que en mamíferos la mayoría de las células serotoninérgicas están localizadas dentro del rombencéfalo, el pez cebra tiene al menos tres *clusters* de neuronas serotoninérgicas, pero sólo los grupos localizados en el rombencéfalo (el rafe superior e inferior y células medulares) se encuentran también en tetrápodos (Maximino et al., 2013). El aparente parecido con las neuronas serotoninérgicas del rafe de mamíferos se sustenta en el hecho de que inervan de manera semejante numerosas áreas del cerebro, y pueden desarrollar roles funcionales equivalentes (Lillesaar, 2011). En el pez cebra las neuronas serotoninérgicas y sus proyecciones aparecen en el rombencéfalo y en la médula espinal alrededor del 2 dpf (Lillesaar, 2011). La población de células serotoninérgicas conocidas como núcleos del rafe inferior, son las únicas en su cerebro que se proyectan a la médula espinal (Airhart et al., 2007).

Debido a que se observaron alteraciones en la actividad de nado de las larvas tratadas con 5-FU y UDL-5FU, se realizaron estudios adicionales de cambios topológicos en los núcleos de rafe del cerebro de los peces cebra, en búsqueda de evidencia adicional de posibles efectos neurotóxicos del tratamiento. Para ello las larvas se incubaron desde el 4 dpf con concentraciones sub-letales de 5-FU (4 mM) y UDL-5FU (1,8 µM de 5-FU encapsulado) que produjeron alteraciones en la actividad de nado. Sin embargo, a partir de los estudios histológicos no se observaron alteraciones en los núcleos del rafe en el cerebro de las larvas luego de 24 y 72 hpi (5 y 7 dpf respectivamente). Tampoco se observaron alteraciones significativas en el hígado.

Por otra parte, las alteraciones en la actividad de nado podrían también estar relacionadas con problemas en el desarrollo en la vejiga natatoria y del sistema musculoesquelético de los peces. En los estudios de cambios morfológicos se observó que solamente el tratamiento con 5-FU libre afectó a la vejiga natatoria y derivó en el encorvamiento de las larvas y en el incremento de la longitud rostrocaudal.

Por lo tanto, los UDL-5FU resultaron ser más tóxicos que el 5-FU libre, ya que la formulación indujo efectos adversos a concentraciones más bajas. Esta toxicidad, en parte, podría estar relacionada con la matriz liposomal y la captación diferencial derivada de la naturaleza de los activos. En otro estudio del grupo de pertenencia, observamos que los UDL vacíos produjeron efectos en larvas de pez cebra en las mismas condiciones y en un rango de concentración similar al llevado a cabo en este trabajo (Bucci et al., 2018).

## **Referencias**

Airhart, M.J., Lee, D.H., Wilson, T.D., Miller, B.E., Miller, M.N., Skalko, R.G., 2007. Movement disorders and neurochemical changes in zebrafish larvae after bath exposure to fluoxetine (PROZAC). Neurotoxicol. Teratol. 29, 652-664. https://doi.org/10.1016/j.ntt.2007.07.005

Bichara, D., Calcaterra, N.B., Arranz, S., Armas, P., Simonetta, S.H., 2014. Set-up of an infrared fast behavioral assay using zebrafish (Danio rerio) larvae, and its application in compound biotoxicity screening. J. Appl. Toxicol. 34, 214-219. https://doi.org/10.1002/jat.2856

Block, K.I., Koch, A.C., Mead, M.N., Tothy, P.K., Newman, R.A., Gyllenhaal, C., 2007. Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic efficacy: a systematic review of the evidence from randomized controlled trials. Cancer Treat. Rev. 33, 407-418. https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2007.01.005

Brannen, K.C., Panzica-Kelly, J.M., Danberry, T.L., Augustine-Rauch, K.A., 2010. Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model. Birth Defects Res. Part B Dev. Reprod. Toxicol. 89, 66-77. https://doi.org/10.1002/bdrb.20223

Bucci, P., Prieto, M.J., Milla, L., Calienni, M.N., Martinez, L., Rivarola, V., Alonso, S., Montanari, J., 2018. Skin penetration and UV-damage prevention by nanoberries. J. Cosmet. Dermatol. 17, 889-899. https://doi.org/10.1111/jocd.12436 Calienni, M.N., Feas, D.A., Igartúa, D.E., Chiaramoni, N.S., Alonso, S. del V., Prieto, M.J., 2017. Nanotoxicological and teratogenic effects: A linkage between dendrimer surface charge and zebrafish developmental stages. Toxicol. Appl. Pharmacol. 337, 1-11. https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.10.003

Calienni, M.N., Temprana, C.F., Prieto, M.J., Paolino, D., Fresta, M., Tekinay, A.B., del Valle Alonso, S., Montanari, J., 2018. Nano-formulation for topical treatment of precancerous lesions: skin penetration, in vitro, and in vivo toxicological evaluation. Drug Deliv. Transl. Res. 8, 496-514. https://doi.org/10.1007/s13346-017-0469-1

Colwill, R.M., Creton, R., 2011. Locomotor behaviors in zebrafish (Danio rerio) larvae. Behav. Processes 86, 222-229. https://doi.org/10.1016/j.beproc.2010.12.003

Cosco, D., Paolino, D., Maiuolo, J., Marzio, L. Di, Carafa, M., Ventura, C.A., Fresta, M., 2015. Ultradeformable liposomes as multidrug carrier of resveratrol and 5-

fluorouracil for their topical delivery. Int. J. Pharm. 489, 1-10. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.04.056

Dagg, C.P., 1960. Sensitive stages for the production of developmental abnormalities in mice with 5-fluorouracil. Am. J. Anat. 106, 89-96. https://doi.org/10.1002/aja.1001060202

Drapeau, P., Saint-Amant, L., Buss, R.R., Chong, M., McDearmid, J.R., Brustein, E., 2002. Development of the locomotor network in zebrafish. Prog. Neurobiol. https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00075-8

Feoktistova, M., Geserick, P., Leverkus, M., 2016. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. Cold Spring Harb. Protoc. 2016, pdb-prot087379. https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379

Grafton, T.F., Bazare Jr, J.J., Hansen, D.K., Sheehan, D.M., 1987. The in vitro embryotoxicity of 5-fluorouracil in rat embryos. Teratology 36, 371-377. https://doi.org/10.1002/tera.1420360314

Haque, E., Ward, A., 2018. Zebrafish as a model to evaluate nanoparticle toxicity. Nanomaterials 8, 561. https://doi.org/10.3390/nano8070561

He, J.H., Guo, S.Y., Zhu, F., Zhu, J.J., Chen, Y.X., Huang, C.J., Gao, J.M., Dong, Q.X., Xuan, Y.X., Li, C.Q., 2013. A zebrafish phenotypic assay for assessing druginduced hepatotoxicity. J. Pharmacol. Toxicol. Methods 67, 25-32. https://doi.org/10.1016/j.vascn.2012.10.003

Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. Nature 496, 498. https://doi.org/10.1038/nature12111

Jensen, S.A., Sørensen, J.B., 2006. Risk factors and prevention of cardiotoxicity induced by 5-fluorouracil or capecitabine. Cancer Chemother. Pharmacol. 58, 487-493. https://doi.org/10.1007/s00280-005-0178-1

Lee, K.Y., Jang, G.H., Byun, C.H., Jeun, M., Searson, P.C., Lee, K.H., 2017. Zebrafish models for functional and toxicological screening of nanoscale drug delivery systems: promoting preclinical applications. Biosci. Rep. 37, BSR20170199. https://doi.org/10.1042/BSR20170199

Lee, S.H., Kim, H.R., Han, R.X., Oqani, R.K., Jin, D. II, 2013. Cardiovascular risk assessment of atypical antipsychotic drugs in a zebrafish model. J. Appl. Toxicol. 33, 466-470. https://doi.org/10.1002/jat.1768

Lillesaar, C., 2011. The serotonergic system in fish. J. Chem. Neuroanat. 41, 294-308. https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2011.05.009

Lin, S., Zhao, Y., Nel, A.E., Lin, S., 2013. Zebrafish: an in vivo model for nano EHS studies. Small 9, 1608-1618.

Maximino, C., Lima, M.G., Araujo, J., Oliveira, K.R.M., Herculano, A.M., Stewart, A.M., Kyzar, E.J., Cachat, J., Kalueff, A. V, 2013. The serotonergic system of zebrafish: genomics, neuroanatomy and neuropharmacology. Serotonin Biosynthesis, Regul Heal Implic. New York, NY Nov. Sci. 53-67.

McGrath, P., 2012. Zebrafish: methods for assessing drug safety and toxicity. John Wiley & Sons.

Montanari, J., Maidana, C., Esteva, M.I., Salomon, C., Morilla, M.J., Romero, E.L., 2010. Sunlight triggered photodynamic ultradeformable liposomes against Leishmania braziliensis are also leishmanicidal in the dark. J. Control. Release 147, 368-376. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.08.014

Montanari, J., Vera, M., Mensi, E., Morilla, M.J., Romero, E., 2013. Nanoberries for topical delivery of antioxidants. J. Cosmet. Sci. 64, 469-81.

Repetto, G., Del Peso, A., Zurita, J.L., 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. Nat. Protoc. 3, 1125. https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75

Selderslaghs, I.W.T., Hooyberghs, J., Blust, R., Witters, H.E., 2013. Assessment of the developmental neurotoxicity of compounds by measuring locomotor activity in zebrafish embryos and larvae. Neurotoxicol. Teratol. 37, 44-56. https://doi.org/10.1016/j.ntt.2013.01.003

Supino, R., 1995. MTT assays, en: In vitro toxicity testing protocols. Springer, pp. 137-149. https://doi.org/10.1385/0-89603-282-5:137

Yasueda, A., Urushima, H., Ito, T., 2016. Efficacy and interaction of antioxidant supplements as adjuvant therapy in cancer treatment: a systematic review. Integr. Cancer Ther. 15, 17-39. https://doi.org/10.1177/1534735415610427

123

## CAPÍTULO 4

# OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y PENETRACIÓN CUTÁNEA DE LIPOSOMAS ULTRADEFORMABLES CON VISMODEGIB

Este capítulo ha sido publicado en:

International Journal of Pharmaceutics, 565, 108-122 (2019). "Nanoformulation for potential topical delivery of Vismodegib in skin cancer treatment", MN Calienni, C Febres-Molina, RE Llovera, C Zevallos-Delgado, ME Tuttolomondo, D Paolino, M Fresta, HL Barazorda-Ccahuana, B Gómez, SV Alonso, J Montanari.

Parte de los ensayos descriptos en el mismo fueron llevados a cabo durante mi estancia corta de investigación en la Università degli Studi Magna Graecia di Catanzaro, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Advanced Drug Delivery Systems Laboratory – Italia, bajo la dirección de la Dra. Donatella Paolino.

## 4.1 Introducción

La administración tópica de fármacos muestra un mayor potencial que la administración sistémica en el tratamiento de enfermedades dermatológicas, como el cáncer de piel, debido a la posible reducción de los efectos secundarios y el incremento de las concentraciones locales de los fármacos. Sin embargo, el estrato córneo (SC) de la piel humana forma una barrera efectiva (Jain et al., 2017), y el éxito de la administración tópica depende de las características particulares de los compuestos, tales como su tamaño y propiedades químicas (Nastiti et al., 2017). La nanotecnología provee de herramientas para la encapsulación de agentes antineoplásicos en nanosistema de entrega de activos (NEA) para la liberación controlada de los mismos, los cuales son capaces de atravesar la barrera del SC de la piel (Betancourt et al., 2009). La encapsulación de los agentes antineoplásicos también podría resultar en ventajas tales como la reducción de la dosis total requerida y de los efectos secundarios, y un aumento en la estabilidad y biodisponibilidad del fármaco, entre otros (Naves et al., 2017).

Los liposomas ultradeformables (UDL) son liposomas altamente elásticos, que pueden penetrar a través del SC a la temperatura corporal, impulsados por el gradiente de hidratación transdérmica y la presión de deshidratación, sin agregarse ni coalescer (Cevc y Blume, 1992; Cevc y Gebauer, 2003). Los UDL son nanovesículas que consisten en una mezcla de fosfolípidos convencionales y activadores de borde, tal como sales biliares, que aumentan la deformabilidad de la bicapa al afectar la tensión interfacial (El Zaafarany et al., 2010). Los UDL son unilamelares, y son capaces de encapsular tanto activos hidrofílicos como hidrofóbicos, ya que tienen un espacio acuoso interno rodeado de una bicapa fosfolipídica. Por esta razón, muchas técnicas de estudio versátiles se pueden usar como herramientas para determinar cómo se incorporan los activos de diferentes solubilidades en UDL (Montanari et al., 2007).

La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) aprobaron en 2012 y 2013, respectivamente, el principio activo Vismodegib (Vis) (Erivedge<sup>®</sup>, Genentech), el primer inhibidor de su clase de la vía de señalización Hedgehog, para el tratamiento del carcinoma de células basales (BCC) (Dlugosz et al., 2012). La activación inapropiada de la vía de señalización Hedgehog, que debería estar inactiva en la

mayoría de los tejidos adultos, está asociada con el BCC (Barakat et al., 2010). El tratamiento con Vis consiste actualmente en la administración oral de cápsulas de Erivedge<sup>®</sup>. Si bien se demostró la eficacia terapéutica del Vis durante los ensayos clínicos (Sekulic et al., 2012), presenta severos efectos secundarios relacionados con la administración sistémica. Los efectos no deseados más comunes que experimentaron los pacientes tratados con Vis fueron espasmos musculares, fatiga, alopecia, disgeusia y náuseas (LoRusso et al., 2011). Por lo tanto, la encapsulación de Vis en un NEA podría reducir la distribución sistémica, mejorar la entrega sitio-específica del fármaco y su rendimiento, y permitir un tratamiento no invasivo para el BCC.

Si bien la vía tópica cutánea podría ser óptima para la administración de Vis para el tratamiento de lesiones cancerosas profundas de la piel, muy pocos trabajos reflejan un interés en ésta (Nguyen y Banga, 2015; Olesen et al., 2018) y, hasta ahora, este fármaco no se había incorporado a un NEA. Los UDL son buenos candidatos para la incorporación de Vis, el cual tiene un peso molecular de 421,3 g/mol y baja solubilidad en agua. Por este motivo, se diseñó, obtuvo y caracterizó UDL cargados con Vis para el desarrollo de una terapia novedosa contra el BCC. En este capítulo se incluyen los primeros pasos que fueron dados para lograr este objetivo.

Para caracterizar la nanoformulación y demostrar su potencial como sistema de administración tópico para el tratamiento del cáncer de piel, el foco estuvo en el estudio de cómo se incorporó el Vis en la nanoformulación y si el sistema era capaz de penetrar en la piel. Se analizó la estabilización del Vis en el entorno lipídico de la membrana liposomal y si su incorporación afectaba las características particulares de los UDL que los convierten en un buen transportador tópico para la administración de fármacos.

## 4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Materiales

Erivedge<sup>®</sup> (Vismodegib), Vismodegib estándar (2-cloro-N-(4-cloro-3-(piridin-2-il)fenil)-4-(metilsulfonil)benzamida) y la columna para RP-HPLC fueron donadas por Roche S.A.Q. e I. (Argentina). La fosfatidilcolina de soja (SPC) fue comprada a Avanti<sup>®</sup> Polar Lipids. El colato de sodio (NaChol), la merocianina 540 (MC540), el 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(Lissamine<sup>™</sup> rodamina B sulfonilo) (Rh-DPPE), la calceína y el sephadex G-50 utilizados fueron de Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina). El 6-dodecanoil-2-dimetilaminonaftaleno (Laurdan) fue comprado a Thermo Fisher Scientific (Buenos Aires, Argentina). Acetronitrilo (ACN), agua grado HPLC y el cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) fueron J. T. Baker<sup>®</sup> (Buenos Aires, Argentina). El metanol (CH<sub>3</sub>OH), el ácido trifluoroacético (TFA) y el dimetilsulfóxido (DMSO) utilizados fueron Biopack (Buenos Aires, Argentina). Todos los demás ractivos usados eran de grado analítico.

## 4.2.2 Métodos

## 4.2.2.1 Cuantificación mediante RP-HPLC

La detección y cuantificación del Vis se llevó a cabo mediante un método de cromatografía líquida de alta *performance* en fase reversa (RP-HPLC) adaptado a partir del protocolo de análisis de calidad de Roche. La cromatografía se realizó en un equipo HPLC Waters Alliance 2690 acoplado a un detector UV Waters Alliance 2487 (Massachusetts, USA), con una columna Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 (150 × 3,0 mm, tamaño de partícula de 3,5 µm) (Santa Clara, CA, USA). El flujo fue de 0,75 ml/min, la temperatura de la columna se mantuvo a 25 °C y el volumen de inyección fue de 50 µl. Las condiciones de elución consistieron en un gradiente entre las fases móviles A (agua + 0,05% TFA) y B (ACN + 0,05% TFA) como se detalla en la Tabla 1.

Tiempo (min)	A <sup>1</sup> (%)	B² (%)
0	85	15
15	60	40
27	5	95
28	5	95
28,1	85	15
35	85	15

Tabla 1. Condiciones de la cromatografía en fase líquida para la cuantificación de Vismodegib.

<sup>1</sup>Solvente A: agua + 0,05% TFA

<sup>2</sup>Solvente B: ACN + 0,05% TFA

La detección se realizó midiendo la absorbancia del eluato a 225 nm. Los cromatogramas se analizaron con el *software* Clarity 2.3 (DataApex). Se obtuvo una curva de calibración con la droga estándar por triplicado.

## 4.2.2.2 Extracción del principio activo Vis a partir de las cápsulas de Erivedge®

Un total de 5 cápsulas de Erivedge<sup>®</sup> fueron mezcladas y utilizadas en los posteriores estudios. La extracción y purificación del principio activo Vis fue llevada a cabo añadiendo 1 ml de CH<sub>3</sub>OH cada 4 mg de Erivedge<sup>®</sup>, vortexeando durante 1 min a máxima frecuencia y centrifugando la mezcla durante 5 min a 20.817xg y 25 <sup>o</sup>C para precipitar los excipientes, los cuales son insolubles en dicho solvente. El sobrenadante resultante fue utilizado para las subsiguientes determinaciones.

La eficiencia del método de extracción, el grado de pureza y el porcentaje de Vis recuperado fueron determinados mediante RP-HPLC.

## 4.2.2.3 Obtención de las nanoformulaciones liposomales

Los UDL y los UDL cargados con Vis (UDL-Vis) fueron preparados con SPC, NaChol y Vis en una relación de masa de 40:7 (SPC:NaChol) para UDL y 40:7:1,4 (SPC:NaChol:Vis) para UDL-Vis. Las mezclas fueron disueltas en soluciones CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH (1:1 v/v), y los solventes fueron evaporados en vacío, 120 rpm y a 40 °C en un rotavapor, para formar una fina película en las paredes de un balón de vidrio. La película fue sometida a una corriente suave de N<sub>2</sub> para eliminar posibles trazas de solvente y luego fue hidratada con buffer Tris-HCl 10 mM con 0,9% (p/v) NaCl, pH 7,4 (buffer Tris), para obtener una concentración final de 40 mg de SPC/ml. La suspensión liposomas fue extrudada 5 veces a través de una membrana de policarbonato de 0,1 µm de tamaño de poro, bajo un flujo de N<sub>2</sub> utilizando un extrusor LipexTM 10 ml (Transferra Nanosciences Inc., Canada).

Dado que el fármaco resultó virtualmente insoluble en solución acuosa, no se llevó a cabo ningún método separativo de la droga no encapsulada, asumiendo que la totalidad del Vis determinado se encontraba incorporado a la fase lipídica de los liposomas.

Liposomas convencionales no ultradeformables con Vis (CL-Vis) o sin Vis (CL), fueron preparados mediante el mismo procedimiento que los UDL-Vis y UDL, respectivamente, pero sin el agregado del activador de borde NaChol.

Se obtuvieron UDL-Vis con doble marca fluorescente (F-UDL-Vis) añadiendo Rh-DPPE a la solución orgánica con los lípidos y Vis, en una relación molar 1:1000 de Rh-DPPE:SPC, e hidratando la película lipídica obtenida con una solución de calceína 0,1 mM en buffer Tris. La suspensión fue extrudada al igual que los UDL-Vis, y luego fue sometida a una cromatografía de exclusión molecular, mediante el pasaje por una columna rellena con Sephadex G-50, para eliminar las moléculas de fluoróforo no encapsulado.

## 4.2.2.4 Determinación del tamaño, carga superficial y estabilidad

Las mediciones del tamaño promedio, determinado mediante dispersión dinámica de la luz (DLS), y del potencial Zeta de los UDL y ULD-Vis se llevaron a cabo con un Nanozetasizer (Malvern, UK). Las mediciones se realizaron por triplicado a temperatura ambiente a los 0, 7, 14 y 30 días desde la preparación, manteniendo las suspensiones almacenadas a 4 °C, para estudiar la estabilidad de las mismas en el tiempo. La estabilidad a 4, 25 y 37 °C de los UDL y ULD-Vis también se evaluó utilizando un *Turbiscan Lab® Expert* tal como se describió en el Capítulo 2, sección 2.2.2.3.

Se obtuvieron imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de los UDL-Vis luego de una tinción negativa con acetato de uranilo (Microscopio Electrónico Zeiss EM 109T, Alemania).

El análisis de turbidez de los UDL-Vis, como un indicador de la laminaridad, se llevó a cabo midiendo la absobancia a 400 nm en un espectrofotómetro (Jasco V-550, Tokio, Japón) de acuerdo a Montanari et al., 2009 (Montanari et al., 2009).

## 4.2.2.5 Relación droga-lípido, eficiencia de encapsulación y capacidad de carga

Los fosfolípidos y el Vis en los UDL-Vis se cuantificaron antes y después de la extrusión para determinar la relación droga-lípido y la eficiencia de encapsulación. Los fosfolípidos se cuantificaron mediante el método de Stewart, 1980. La concentración de Vis encapsulada en los UDL-Vis se determinó mediante RP-HPLC UV después de la disrupción completa de un volumen de suspensión liposomal en 3 volúmenes de ACN. UDL se incluyeron como control negativo. La mezcla se agitó en vórtex y se centrifugó cinco minutos a máximas rpm. El sobrenadante se diluyó luego con la solución de elución y se analizó mediante RP-HPLC. La eficiencia de dicho método de extracción se evaluó previamente agregando una cantidad conocida de Vis a una suspensión de UDL y a buffer Tris como control. Las muestras se agitaron durante 30 s y se dejaron reposar durante una hora, para asegurar la interacción del fármaco con los UDL. Luego, las mezclas se trataron como se describió anteriormente para los UDL-Vis, y se determinó la cantidad de Vis recuperada. La eficiencia de encapsulación (EE%) se calculó como se detalló en el Capítulo 2, sección 2.2.2.2.

La capacidad de carga (LC%) se calculó como la cantidad de fármaco atrapado total (DE) dividida por el peso total de UDL-Vis (LW), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$LC\% = \frac{ED}{LW} \times 100$$

## 4.2.2.6 Interacción entre el Vis y la membrana liposomal 4.2.2.6.1 Grado de fluidez y empaquetamiento de la membrana

La interacción de Vis con la membrana liposomal se evaluó por triplicado midiendo los cambios en el factor de hidrofobicidad (HF) de la MC540 y la polarización generalizada (GP) de la sonda Laurdan tal como se detalla en el Capítulo 2, sección 2.2.2.4. Ambas sondas permiten escanear la interfaz hidrofílica/hidrofóbica de la bicapa debido a su localización (Marsanasco et al., 2015).

En el caso del análisis con Laurdan de los UDL y UDL-Vis, la intensidad de emisión se adquirió a 440 nm (I440) y 490 nm (I490), excitando a 340 nm. La GP se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\mathsf{GP} = \frac{\mathsf{I440} - \mathsf{I490}}{\mathsf{I440} + \mathsf{I490}}$$

## 4.2.2.6.2 Calorimetría diferencial de barrido

El efecto de la presencia de Vis en la transición de fase de la membrana liposomal se determinó mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). La temperatura de la transición de fase (T<sub>m</sub>) y la variación asociada de la entalpía ( $\Delta$ H<sub>cal</sub>) de UDL y UDL-Vis se determinaron por duplicado en las mismas condiciones descriptas en el Capítulo 2, sección 2.2.2.4. Las muestras (14 mg) se pesaron en celdas Tzero y se cerraron herméticamente.

## 4.2.2.6.3 Espectroscopía infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR)

Alícuotas de 50 µl de UDL y UDL-Vis inmediatamente después de la preparación se secaron al vacío a temperatura ambiente en tubos Eppendorf. Los tubos se colocaron en un desecador con sílica gel seca conectado a una bomba de vacío durante 96 h hasta que el peso de las muestras permaneció constante.

Los espectros de FT-IR entre 4000 y 400 cm<sup>-1</sup>, con 4 cm<sup>-1</sup> de resolución, se adquirieron a 25 °C con un espectrómetro Nicolet 8700 FT-IR (Thermo Scientific, USA). Los mismos se obtuvieron por dos métodos: para UDL y UDL-Vis mediante reflectancia total atenuada (ATR) utilizando el accesorio Smart Orbit (64 barridos); mientras que para UDL-Vis y Vis se prepararon pastillas con KBr (32 barridos). La deconvolución se llevó a cabo con el *software* OriginPro 8<sup>®</sup>.

## 4.2.2.6.4 Espectroscopía Raman

Los espectros vibracionales Raman de suspensiones de UDL y UDL-Vis (con relaciones molares crecientes de Vis) se midieron con un microscopio confocal Raman DXR (Thermo Scientific, USA) acoplado a un detector de carga y con el *software* de mapeo OMNIC Atlµs. Las muestras fueron refrigeradas con un módulo Peltier. Todos los experimentos espectroscópicos se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

Para lograr una buena relación señal/ruido, se acumularon 100 adquisiciones con un tiempo de exposición de 5 s para todas las muestras. La potencia del láser utilizada fue de 10 mW y la longitud de onda fue 532 nm. Los espectros se analizaron utilizando el programa OMNIC<sup>™</sup> para Raman dispersivo.

## 4.2.2.6.5 Análisis por simulación de los UDL-Vis

El modelado computacional de los UDL-Vis se llevó a cabo considerando la composición molecular de SPC, NaChol y Vis en una proporción de 24:3:1. Las estructuras moleculares de Vis y NaChol se tomaron de la base de datos PubChem (PubChem CID = 24776445 y 23668194, respectivamente) (Fig. 1). La estructura del NaChol se optimizó en forma aniónica, con una carga de -1, como se sugiere en la literatura (Mustan et al., 2015). La estructura molecular de SPC se construyó utilizando el *software* Gaussview 5.0.9. La optimización de la geometría se realizó mediante el método cuántico semiempírico PM6 y la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) en el programa Gaussian 09 (Frisch et al., 2009). Las cargas atómicas de Hirshfeld se obtuvieron mediante los cálculos de punto único utilizando

la función CAM/B3LYP y el conjunto de funciones TZVP. El servidor generador de topología OPLS-AA (http://erg.biophys.msu.ru/tpp/) se utilizó para la obtención de los campos de fuerza.

Los métodos clásicos de mecánica molecular se realizaron con Gromacs 2016.4 (Abraham et al., 2015), utilizando el campo de fuerza OPLS-AA, un modelo acuoso de carga de punto simple, y se agregaron átomos de sodio para neutralizar. La simulación de dinámica molecular (MD) se llevó a cabo con condiciones de frontera periódicas (PBC) en todas las direcciones, termostato Nosé-Hoover y con el acoplamiento de presión semi-isotrópica mediante el barostato Parrinello Rahman. La interacción de Lennard-Jones con un corte de 1,2 nm, el método de Ewald de malla de partículas (PME) (Essmann et al., 1995), y el algoritmo LINCS (*Linear Constraint Solver*) (Hess et al., 1997) fueron considerados para la MD. El análisis de MD fue evaluado en la herramienta de trazado Grace-5.1.25 y el *software* Chimera UCSF (Pettersen et al., 2004).



Figura 1. Estructuras moleculares de Vismodegib (A) y Colato de Sodio (B).

## 4.2.2.7 Prueba de deformabilidad

La deformabilidad de UDL, UDL-Vis, CL y CL-Vis se determinó conduciendo 1,5 ml de cada formulación mediante una presión externa baja de N<sub>2</sub> (1 MPa) a través de una membrana de policarbonato con tamaño de poro de 50 nm, en un extrusor Lipex<sup>TM</sup> de 10 ml. El volumen extrudado se recogió cada min a lo largo de 15 min, y se determinó el porcentaje de fosfolípido para cada fracción. La elasticidad de las bicapas de liposomas (*D*) se calculó como se explicó en el Capítulo 2, sección 2.2.2.5.

#### 4.2.2.8 Penetración cutánea

## 4.2.2.8.1 Recuperación y cuantificación del Vis luego del tape stripping

El estudio de penetración *in vitro* de los UDL-Vis en piel humana se llevó a cabo utilizando el Método de Penetración Saarbrücken (SPM) (Schaefer y Loth, 1996) tal como se describió en el Capítulo 2, sección 2.2.2.7. La piel provino de una mujer caucásica de 39 años que gozaba de buena salud en el momento de la cirugía estética. Los protocolos de trabajo con muestras de piel humana fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Nacional de Quilmes (CE-UNQ N°1/2019), en conformidad con el Código de Ética de la Asociación Médica Mundial.

Un total de 60  $\mu$ g de Vis, encapsulado en la suspensión UDL-Vis o en una solución de Vis libre en DMSO, se aplicaron sobre la superficie de la piel de cada disco, repartidos en gotas de 2,5  $\mu$ l, y se incubó de forma no oclusiva a 35 ± 1 °C durante 1, 4 y 8 h. Transcurrido el tiempo de incubación se llevó a cabo el *tape stripping* (Capítulo 2, sección 2.2.2.7.1). Las cintas se agruparon en 3 grupos correspondientes al SC superior (cintas 1-5), medio (cintas 6-10) e inferior (cintas 11-20). La epidermis viable y dermis (VED) debajo del SC eliminado fueron disgregados y recolectados. La extracción del Vis a partir de las cintas se realizó con 3 ml de DMSO y 1 ml para VED en agitación (190 rpm) durante 1 hora a 37 °C. La determinación de Vis después de la extracción se llevó a cabo mediante RP-HPLC UV, como se indica en la sección 4.2.2.1. Los experimentos se realizaron por quintuplicado. Se restaron los blancos obtenidos a partir del mismo procedimiento aplicado a muestras de piel no incubadas con UDL-Vis o Vis libre.

## 4.2.2.8.2 Microscopía confocal de muestras de piel

Discos de piel fueron incubados con F-UDL-Vis durante 8 h como se indica en la sección 4.2.2.8.1 con el SPM. Transcurrido el tiempo, fueron rápidamente incluidos en OCT (compuesto de temperatura de corte óptima) y congelados a -20 °C. Se obtuvieron secciones transversales de 20 µm de grosor con un crióstato a -20 °C, las cuales se observaron mediante microscopía confocal de barrido láser (CLSM). Se utilizó el láser Ar (488 nm) para excitar la calceína y el láser He-Ne (543 nm) para Rh-DPPE. Otros discos de piel, luego de la incubación con F-UDL-Vis, se colocaron directamente en portaobjetos y fueron escaneados ópticamente por CLSM a intervalos de 7 µm a lo largo del eje z (10 imágenes desde la superficie hasta 70 µm de profundidad). Las imágenes fueron analizadas con el *software* ImageJ y se cuantificó la fluorescencia en cada plano confocal para ambas sondas.

## 4.2.2.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el *t-test* de *Student*. Cuando fue necesario comparar más de dos variables, se llevó a cabo ANOVA de una vía y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Solo los valores con p <0,05 fueron considerados significativos. El programa GraphPad Prism 6.0 se utilizó para realizar todos los análisis estadísticos.

## 4.3 Resultados

4.3.1 Eficiencia de la recuperación de Vis a partir de Erivedge®

El método de extracción del Vis a partir de las cápsulas comerciales de Erivedge<sup>®</sup> permitió una recuperación del 78,8 ± 7,2% del principio activo sin rastro de excipientes (Fig. 2). El método permitió extraer 1,35 ± 0,12 mg/ml de Vis en CH<sub>3</sub>OH. La ecuación de la curva de calibración obtenida ( $R^2 = 0.9995$ ) fue: Y = 203,5\*X – 8,997



Figura 2. (A) Cromatogramas del estándar de Vis (línea roja) y Vis extraído de Erivedge<sup>®</sup> (línea negra) por RP-HPLC UV. (B) Curva de calibración del estándar de Vis por triplicado.

## 4.3.2 Caracterización fisicoquímica de los UDL-Vis

Se obtuvieron UDL-Vis de alrededor de 110 nm en tamaño promedio con distribución unimodal de tamaño y potencial Zeta negativo. La incorporación de Vis no alteró dichos parámetros en comparación con los UDL vacíos. Además, no se observaron cambios significativos en el tamaño promedio y el potencial Zeta durante 30 días de almacenamiento a 4 °C para UDL y UDL-Vis. La eficiencia de encapsulación fue del 91,98 ± 5,14 %, la relación de masa Vis:SPC fue de 1:23 luego de la extrusión, y la capacidad de carga fue de un 2,7%. Estos parámetros fisicoquímicos se resumen en la Tabla 2.

Muestra	Días	Tamaño promedio (nm)ª	Potencial Zeta (mV) <sup>ь</sup>	EE (%)°	Vis:SPC (relación de masa) <sup>d</sup>
UDL	0	108 ± 1	-24 ± 1		-
	7	109 ± 4	-20 ± 1	_	
	15	110 ± 2	-17 ± 1		
	30	106 ± 1	-18 ± 1		
UDL-Vis	0	116 ± 2	-19 ± 1		1:23
	7	115 ± 1	-18 ± 0,4	01 08 + 5 1/	
	15	113 ± 2	-18 ± 1	. 91,90 ± 0,14	
	30	113 ± 0.4	-16 ± 1		

Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos de UDL y UDL-Vis en el tiempo

<sup>a,b</sup> Las suspensiones liposomales se diluyeron y el análisis se realizó a 25 °C. Promedio ± SD (n=5).
<sup>c</sup> EE: Porcentaje de eficiencia de encapsulación de Vis. Promedio ± SD (n=3).
<sup>d</sup> Relación de masa entre Vis y SPC después de la extrusión (n=3).

La estabilidad de las formulaciones también fue estudiada mediante el análisis con el *Turbiscan Lab*<sup>®</sup> *Expert* a tres temperaturas diferentes: 4 °C (temperatura de almacenamiento), 25 °C (temperatura ambiente) y 37 °C (temperatura corporal).

Los cambios en el *backscattering* ( $\Delta$ BS) y la transmisión ( $\Delta$ T) de los UDL y UDL-Vis estuvieron cerca de la línea de base (menores al ± 5%) durante el análisis

para las tres condiciones estudiadas (Fig. 3), por lo tanto, no hubo evidencia de fenómenos de inestabilidad.



Figura 3. Mediciones de  $\Delta$ T y  $\Delta$ BS de UDL y UDL-Vis durante una hora a 37 °C. No hubo evidencia de fenómenos de desestabilización, dado que todas las mediciones fueron cercanas a la línea de base.

Los perfiles TSI (Índice de Estabilidad de Turbiscan) para UDL y UDL-Vis mostraron una cinética lineal, excepto para UDL a 4 °C, con valores de TSI finales bajos (Fig. 4). Si bien no hubo cambios significativos en los perfiles de  $\Delta$ BS y  $\Delta$ T a 4 °C para UDL, hubo una ligera discrepancia en comparación con 25 y 37 °C en la cinética estabilidad, con un valor TSI mayor. En el caso de los UDL-Vis también hubo una pequeña diferencia entre las tres temperaturas estudiadas. La formulación sería apenas más estable a 25 °C y menos estable a 37 °C.



Figura 4. Perfiles de estabilidad cinética de UDL y UDL-Vis a 4, 25 y 37 °C medidos con *Turbiscan Lab*<sup>®</sup> *Expert*.

Las micrografías TEM y el análisis de turbidez confirmaron que el método de preparación daba como resultado UDL-Vis unilamelares (Fig. 5). Wang et al., 2018 demostraron que existe una fuerte dependencia entre la turbidez y la lamelaridad como consecuencia de la dispersión de Rayleigh de las membranas de los liposomas (Wang et al., 2018). Cuando la película lipídica se hidrata, se forman vesículas multilamelares heterogéneas y grandes. Si la suspensión liposomal se extruda a través de poros de menos de 200 nm de diámetro, la muestra se vuelve más translúcida. Al aumentar el número de extrusiones, los liposomas serán predominantemente unilamelares (Mayer et al., 1986) y de tamaño más pequeño (Montanari et al., 2014). Por lo tanto, para una concentración fija de lípidos, la turbidez disminuye a medida que la suspensión se extruda repetidamente. Para los UDL-Vis, a partir del quinto paso de extrusión –a través de una membrana con poros de 100 nm– en adelante, la dispersión de la luz no cambió (Fig. 5), lo cual indicaría que los liposomas alcanzaron el menor tamaño y lamelaridad posible en dichas condiciones de extrusión.



Figura 5. Análisis de la turbidez de la suspensión de UDL-Vis después de sucesivos pasajes a través de una membrana de policarbonato (tamaño de poro de 100 nm) durante el proceso de extrusión. La línea de puntos indica el valor mínimo de absorbancia debido a la dispersión de los liposomas. El recuadro interior muestra una micrografía TEM (200,000x) después de la tinción negativa de UDL-Vis, la línea de referencia corresponde a 20 nm. La flecha indica la membrana del liposoma.

## 4.3.3 Interacción droga-membrana liposomal

Vis es un fármaco hidrofóbico, por lo que se espera que interactúe con los fosfolípidos que forman la bicapa liposomal. Por esta razón, se estudió la interacción entre el Vis y la membrana de los UDL con diferentes técnicas complementarias.

## 4.3.3.1 Análisis con sondas

La incorporación de Vis aumentó significativamente (p < 0,0001) el HF de la MC540 de los UDL de 1,20 ± 0,05 (UDL vacíos) a 1,78 ± 0,04 (UDL-Vis).

Se observó una diferencia significativa (p < 0,05) entre los valores de GP de Laurdan obtenidos para UDL, -0,291 ± 0,002, y para UDL-Vis, -0,320 ± 0,007. Estos valores de GP corresponden a membranas en la fase líquido-cristalina, como se esperaba para liposomas de SPC (Parasassi y Gratton, 1995).

## 4.3.3.2 Calorimetría diferencial de barrido

Los perfiles termotrópicos obtenidos del análisis por DSC de los UDL y UDL-Vis (Fig. 6) mostraron dos mínimos endotérmicos, uno cercano a 0 °C correspondiente al punto de fusión del medio acuoso y otro por debajo de 0 °C. No hubo una diferencia significativa entre la T<sub>m</sub> de UDL y UDL-Vis. Sin embargo, la incorporación de Vis cambió significativamente (p < 0,05) el comportamiento termotrópico de la membrana liposomal disminuyendo la entalpía de transición de fase (Tabla 3).



Figura 6. Calorimetría diferencial de barrido de UDL y UDL-Vis.

Tabla 3. Parámetros termodinámicos de la transición de fase de UDL y UDL-Vis monitoreados mediante DSC

Muestra	T <sub>m</sub> <sup>a</sup> (ºC)	ΔH <sub>cal</sub> <sup>b</sup> (J/g)
UDL	-22,68 ± 0,45	2,17 ± 0,04
UDL-Vis	-22,48 ± 0,67	0,59 ± 0,12

<sup>a</sup> Temperatura correspondiente al mínimo del pico calorimétrico.

<sup>b</sup> Entalpía de la transición calculada como el área debajo de la curva.

## 4.3.3.3 Análisis espectroscópico mediante FT-IR

La espectroscopía FT-IR se utilizó para estudiar la localización del Vis incorporado en la membrana liposomal. El foco fue puesto en los grupos éster del esqueleto de glicerol de los fosfolípidos, los grupos fosfato y colina de SPC, el grupo

alcohol del NaChol y el grupo sulfona de Vis. La Tabla 4 resume la asignación de los grupos característicos y el número de onda en los espectros FT-IR obtenidos por ATR para UDL y UDL-Vis.

Tabla 4. Asignación de los principales grupos funcionales y los correspondientes números de onda obtenidos mediante ATR FT-IR para UDL y UDL-Vis.

	Número de onda (o		
Asignación	UDL	UDL-Vis	
-OH estiramiento	3348	3361	
CH <sub>2</sub> estiramiento antisimétrico	2922		
CH <sub>2</sub> estiramiento simétrico	2853		
C=O (éster) estiramiento	1739 (libre) y 1726 (unido a H)		
CH <sub>2</sub> scissoring	1465		
CH <sub>2</sub> bending	1420		
<sup>+</sup> N-CH <sub>3</sub> deformación simétrica	1398		
O-P-O estiramiento antisimétrico	1236		
O-P-O estiramiento simétrico	1086		
C-O (alcohol) estiramiento	1060	1056	
<sup>+</sup> N-CH <sub>3</sub> estiramiento antisimétrico	969		

Las vibraciones de estiramiento de los grupos carbonilo de los ésteres del esqueleto de glicerol de SPC presentan una banda de absorción dominante y característica en la región entre 1800 y 1650 cm<sup>-1</sup> (Mannock et al., 2010). Las bandas de absorción de estiramiento C=O proporcionan pistas importantes acerca de la organización del grupo cabeza y las regiones de interfaz polares/apolares de los lípidos en fase líquido-cristalina. Esta banda puede ser deconvolucionada en dos subcomponentes que usualmente aparecen en frecuencias cercanas a 1738–1742 cm<sup>-1</sup> y 1724–1729 cm<sup>-1</sup> (Lewis y McElhaney, 1998).

La incorporación de Vis no alteró la forma, la intensidad y la frecuencia de la banda de absorción de estiramiento C = O, ni alteró las sub-bandas 1739 (libre) y 1726 (unido a H) cm<sup>-1</sup> (Fig. 7A y B). Además, no se observaron cambios en las bandas correspondientes a los modos de estiramiento de O-P-O antisimétrico (Fig. 7C y D) y simétrico, las cuales se encuentran cercanas a1236 y 1086 cm<sup>-1</sup>,
respectivamente. No se observó alteración en el estiramiento antisimétrico ni en la deformación simétrica del grupo +N–CH<sub>3</sub> (969 y 1398 cm<sup>-1</sup>, respectivamente). De la misma manera, los modos de estiramiento simétrico (2853 cm<sup>-1</sup>), estiramiento antisimétrico (2922 cm<sup>-1</sup>), *scissoring* (1465 cm<sup>-1</sup>) y *bending* (1420 cm<sup>-1</sup>) de los -CH<sub>2</sub> no fueron alterados por la incorporación de Vis.

La banda observada en la región de alrededor de 1311 cm<sup>-1</sup> que corresponde al modo de estiramiento asimétrico del S-O del grupo de sulfona del Vis (Fig. 7E), apareció en el análisis de los UDL-Vis pero presentó un pico más del ancho que el de la droga estándar el cual no pudo ser resuelto (Fig. 7D). Esta banda no estaba presente en el espectro de UDL (Fig. 7C).



Figura 7. Deconvolución de la banda correspondiente al modo de estiramiento C=O obtenido mediante el análisis ATR FT-IR de UDL (A) y UDL-Vis (B) secados al

vacío. No se observaron cambios después de la incorporación de Vis en las subbandas 1739 (libre) y 1726 (unida a H) cm<sup>-1</sup>.

Espectros de FT-IR de UDL (C) y UDL-Vis (D), obtenidos por ATR, y de Vis (E) obtenido en pastilla en KBr. La banda 1236 cm<sup>-1</sup> en (C) y (D) corresponde al estiramiento antisimétrico O-P-O del grupo fosfato de los fosfolípidos. La flecha en (D) y (E) indica la banda correspondiente al modo de estiramiento asimétrico S-O del grupo de sulfona del Vis.

Espectros FT-IR de UDL (línea continua) y UDL-Vis (línea de puntos) obtenidos por ATR (F y G). La incorporación de Vis en los liposomas desplazó 13 cm<sup>-1</sup> el máximo de la banda de estiramiento -OH a números de onda mayores (F), y 4 cm<sup>-1</sup> la banda correspondiente al estiramiento de C-O de los grupos alcohol a números de onda menores (G).

Tanto los UDL como UDL-Vis presentaron una banda de estiramiento ancha de los grupos alcohol del NaChol alrededor de 3300 cm<sup>-1</sup> (Fig. 7F). La incorporación de Vis en la bicapa desplazó 13 cm<sup>-1</sup> el máximo de la banda a números de onda mayores y se incrementó el área de la misma (Fig. 7F). La banda correspondiente al estiramiento C-O de los grupos alcohol (alrededor de 1056-1060 cm<sup>-1</sup>) fue desplazada 4 cm<sup>-1</sup> a números de onda menores (Fig. 7G).

#### 4.3.3.4 Análisis por espectroscopía Raman

Se llevó a cabo espectroscopía Raman para estudiar el comportamiento y los cambios topológicos en la región hidrofóbica de la membrana liposomal después de la incorporación de Vis. La espectroscopía Raman es una técnica que proporciona información directa y sensible sobre el orden conformacional (Orendorff et al., 2002). Las mediciones de UDL y UDL-Vis –en fase líquida–, con concentraciones crecientes de Vis, se muestran en las figuras 8 y 9.



Figura 8. Modos vibracionales simétricos (v<sub>s</sub>) y antisimétricos (v<sub>as</sub>) de los grupos metilo y metileno en los espectros Raman de UDL y UDL-Vis, con concentraciones crecientes de Vis (indicadas en la figura como relaciones molares entre SPC:NaChol:Vis).



Figura 9. Espectros Raman en la región de 1800–500 cm<sup>-1</sup> de UDL y UDL-Vis, con concentraciones crecientes de Vis (indicadas en la figura como relaciones molares entre SPC:NaChol:Vis). Fueron asignadas las principales bandas. \*\* indica que

corresponde a señales de NaChol. Los espectros fueron obtenidos en skeletal optical mode.

A pesar de que hubo un desplazamiento de las frecuencias v<sub>s</sub>CH<sub>2</sub> entre UDL y UDL-Vis, el mismo no fue significativo dado que los desplazamientos se encontraban dentro del error experimental. Sin embargo, hubo un corrimiento significativo hacia menores frecuencias para los modos de estiramiento de los grupos CH<sub>3</sub> y las bandas  $\delta$ CH<sub>2</sub> (*scissoring*) y TCH<sub>2</sub> (*twisting*) luego de la adición del Vis (Tabla 5). Estos corrimientos podrían estar relacionados con un aumento en el orden conformacional y de la interacción lateral entre las cadenas de alquilo (Gaber y Peticolas, 1977).

Tabla 5. Efecto del Vis sobre las bandas correspondientes a los estiramientos vibracionales de CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub> (cm<sup>-1</sup>) de las cadenas de alquilo de UDL-Vis mediante mediciones de espectroscopía Raman a temperatura ambiente.

SPC:NaChol:Vis	vas <sup>a</sup> (CH <sub>3</sub> )	v₅ <sup>a</sup> (CH₃)	vas <sup>a</sup> (CH <sub>2</sub> )	vs <sup>a</sup> (CH <sub>2</sub> )	δ <sup>ь</sup> (CH <sub>2</sub> )	т <sup>с</sup> (СН₂)
(relacion molar)						
51,6 : 17 : 0	2958	2932	2899	2850	1440	1299
51,6 : 17 : 3	2956	2929	2895	2848	1437	1293
51,6 : 17 : 4,6	2955	2927	2895	2848	1437	1292
51,6 : 17 : 6	2953	2927	2993	2848	1437	1292
51,6 : 17 : 7,7	2953	2927	2893	2848	1437	1292

<sup>a</sup> Modos vibracionales simétricos (v<sub>s</sub>) y antisimétricos (v<sub>as</sub>).

<sup>b</sup> Scissoring (δ).

<sup>с</sup> *Twisting* (т).

Las relaciones de intensidad I<sub>2899</sub>/I<sub>2850</sub> (v<sub>as</sub>(CH<sub>2</sub>)/v<sub>s</sub>(CH<sub>2</sub>)) e I<sub>2932</sub>/I<sub>2850</sub> (v<sub>s</sub> (CH<sub>3</sub>)/v<sub>s</sub>(CH<sub>2</sub>)) se determinaron para cada relación molar de la formulación (Fig. 10). Estas relaciones se pueden considerar como un indicador del cambio de la proporción entre desorden y orden en la conformación de las cadenas de alquilo y la naturaleza de las conformaciones.

La relación I<sub>2899</sub>/I<sub>2850</sub> refleja el orden conformacional y el acoplamiento entre cadenas por ser una medida de la abundancia de conformaciones *all-trans* y *gauche* (Snyder et al., 1982). Para UDL-Vis hubo una ligera disminución (~0,02) en

las relaciones de intensidad para las proporciones más bajas de Vis (3 y 4,6 moles de Vis por cada 51,6 moles de SPC), con un ligero aumento (~0,04) en concentraciones más altas, en comparación a los UDL. Esto indicaría que la conformación *gauche* fue más dominante en proporciones molares de Vis bajas, con una disminución en la interacción entre las cadenas laterales (Tasumi et al., 1962). Mientras que, en concentraciones más altas de Vis, el incremento en la relación de intensidad I<sub>2899</sub>/I<sub>2850</sub> indicaría que hubo un aumento en la relación trans/*gauche* que se relaciona con un mayor orden conformacional (Snyder et al., 1982).

También se puede obtener información acerca del acoplamiento entre las cadenas a partir de la relación de intensidad de v<sub>s</sub>(CH<sub>3</sub>) en ~2932 cm<sup>-1</sup> y v<sub>s</sub>(CH<sub>2</sub>) alrededor de ~2850 cm<sup>-1</sup>. A medida que las cadenas se desacoplan, y las interacciones intermoleculares disminuyen, los grupos metilo terminales experimentan un incremento de la libertad rotacional y vibracional, y la relación de intensidad de I<sub>2932</sub>/I<sub>2850</sub> aumenta, aunque esta relación no es un indicador directo de la relación entre conformaciones *gauche*/trans (Larsson y Rand, 1973). Para las relaciones molares más bajas de Vis, hubo una disminución en la relación I<sub>2932</sub>/I<sub>2850</sub> que podría estar relacionada con un menor grado libertad de rotación y vibración de los grupos metilo terminales, mientras que para las relaciones molares más altas se observó un aumento en los grados de libertad de los grupos metilo terminales.

En la región 1300-1000 cm<sup>-1</sup> están presente los modos vibracionales de estiramiento del enlace C-C de las cadenas alquílicas de los fosfolípidos (Tabla 6). La relación de intensidad I<sub>1086</sub>/I<sub>1064</sub> (v(C-C)<sub>gauche</sub>/v(C-C)<sub>trans</sub>) también proporciona información sobre la proporción entre el desorden y orden que existe en la conformación de la cadena de alquilo (Fig. 10). Tanto los cambios en las posiciones de los picos como en la relación de intensidad de las bandas trans y *gauche* describen el estado conformacional de las cadenas de alquilo y la población de fosfolípidos con conformación trans/*gauche* (Gaber y Peticolas, 1977). En fase líquido-cristalina, la banda *gauche* en el *skeletal optical mode* está presente alrededor de 1086 cm<sup>-1</sup>, mientras que la banda trans se encuentra alrededor de 1153 cm<sup>-1</sup>. En las relaciones molares más bajas no hubo cambios significativos en comparación a los UDL, pero a partir de la relación molar de 51,7:17:4,6, se observó un aumento significativo en la relación de intensidades (~0.06), lo que significaría

un aumento en el número de conformaciones *gauche* y por ende, un incremento en el desorden de las cadenas (Orendorff et al., 2002).



Figura 10. Relaciones de intensidades Raman de  $v_{as}(CH_2)_{2899}/v_s(CH_2)_{2850}$ ,  $v(C-C)_{gauche}/v(C-C)_{trans}$  y  $v_s(CH_3)_{2932}/v_s(CH_2)_{2850}$  en función de la relación molar de SCP:NaChol:Vis en fase líquido-cristalina.

mediciones por Naman.						
SCP:NaChol:Vis	∨ <b>(C-C)</b> <i>т</i>	<b>Δ</b> ∨ <sup>a</sup> (C-C) <i>τ</i>	Va <b>(C-C)</b> G	Δ∨a(C-C) <sub>G</sub> <sup>a</sup>	∨ <b>(C-C)</b> 7	<b>Δ</b> ∨ <sup>a</sup> (C-C) <i>τ</i>
relación molar						
51,6:17:0	1154	0,0	1086	0,0	1064	0,0
51,6:17:3	1148	-6,0	1086	0,0	1061	-3,0
51,6:17:4,6	1150	-4,0	1085	-1,0	1059	-5,0
51,6:17:6	1153	-1,0	1085	-1,0	1064	-5,0
51,6:17:7,7	1156	+1,0	1094	-2,0	1064	-0,0

Tabla 6. Efecto del Vis en la región vC-C de UDL en fase líquido-cristalina mediante mediciones por Raman.

 $^{a}\Delta v = v(SCP:NaChol)-v(SCP:NaChol:Vis)$ 

\*Los subíndices T indican conformación trans y los G gauche

## 4.3.3.5 Simulaciones de dinámica molecular de la membrana de UDL-Vis 4.3.3.5.1 Análisis de descriptores moleculares de Vis

Se utilizó el método semiempírico PM6 para encontrar la configuración geométrica estable de las moléculas, sin frecuencias negativas. Los cálculos en base a la DFT fueron empleados para detectar las cargas de Hirshfeld y los

descriptores moleculares para Vis, como los orbitales moleculares de frontera (FMO), índices de reactividad global y local (Fig. 11B y C).

En el caso de Vis, los orbitales moleculares ocupados de mayor energía (HOMO) se encuentran en el anillo de piridina y el anillo de fenilo. Por otro lado, los orbitales moleculares no ocupados de menor energía (LUMO) se encuentran en el metilsulfonilo y la benzamida. Los átomos de cloro, por ser donantes de electrones sigma y aceptores de electrones pi, contribuyen al LUMO. Vis es poco polarizable; tiene una baja reactividad química y una elevada estabilidad cinética de acuerdo a la diferencia de energía HOMO-LUMO ( $\Delta E_{gap} = 6,70 \text{ eV}$ ).

Los siguientes descriptores se calcularon a partir de la aproximación de Koopmans: índices de reactividad global como potencial químico ( $\mu$ ), electronegatividad ( $\chi$ ), dureza ( $\eta$ ), suavidad (S) y electrofilicidad ( $\omega$ ) (Tabla 7). El valor de la dureza fue mayor que el de la suavidad, por esta razón Vis tiene menos capacidad para donar electrones. Los índices de reactividad local determinados a partir de la función de Fukui (Fig. 11E y F) indican que los sitios más susceptibles para un ataque electrofílico y nucleofílico se ubican en el C21 del anillo de fenilo y en el C10 de la benzamida, respectivamente (Fig. 12)

Tabla 7. Índices de reactividad global del Vis en eV.

	Е <sub>НОМО</sub>	E <sub>LUMO</sub>	E <sub>LUMO-HOMO</sub> <sup>a</sup>	$\mu^{b}$	χ <sup>c</sup>	$\eta^{d}$	Se	ω <sup>f</sup>
Vis	-7,75	-1.05	6,7	4,4	-4,4	3,35	0,29	2,89

 ${}^{a}E_{LUMO-HOMO}$ :  $\Delta E_{gap}$ ,  ${}^{b}\mu$ : potencial químico,  ${}^{c}\chi$ : electronegatividad,  ${}^{d}\eta$ : dureza,  ${}^{e}S$ : suavidad,  ${}^{f}\omega$ : electrofilicidad.



Figura 11. Descriptores moleculares de Vis. Estructura molecular de Vis (A). Isosuperficie de HOMO (B). Isosuperficie de LUMO (C). Isosuperficie de potencial electrostático\* (D). Zonas de ataque nucleofílico\*\* (E). Zonas de ataque electrofílico\*\* (F). \*Negativo en rojo y positivo en azul; \*\*en azul claro.



Figura 12. Estructura molecular del Vis calculada. Los C están representados en color gris oscuro, los H gris claro, Cl verde, N azul, O rojo y S amarillo.

#### 4.3.3.5.2 Análisis mediante dinámica molecular

El análisis por simulación MD mostró el punto de equilibrio de los sistemas. Este tipo de modelo reproduce el comportamiento de la membrana de SPC a lo largo de 50 ns. El cálculo de la raíz cuadrada de la desviación cuadrática media (RMSD) mostró que durante la trayectoria de 50 ns, la membrana con SPC y NaChol tardó en estabilizarse debido a las fluctuaciones de los residuos que causan desorden en el sistema. Por lo que la membrana con SPC y NaChol presentó un valor elevado de RMSD (1,06  $\pm$  0,21 nm) en comparación con la membrana con SPC puro (0,85  $\pm$  0,1 nm) (Fig. 13).



Figura 13. Evolución de RMSD (0–50 ns) de SPC (negro) y SPC + NaChol (rojo).



Figura 14. Simulaciones de dinámica molecular de la membrana de UDL-Vis. Se muestra t = 0 ns (izquierda) y t = 50 ns (derecha). NaChol, SPC y Vis se representaron en color azul, gris y verde, respectivamente. (A) y (B) corresponden a la vista lateral de la membrana, (C) y (D) corresponden a la vista superior. Las moléculas de colato a t = 0 ns (inicio de la simulación de dinámica molecular) se ubicaron en el medio de la bicapa, (A) y (C). Los colatos migraron hacia la superficie

de la bicapa creando pequeños *clusters*, mientras que Vis permaneció en el medio de la membrana después de 50 ns, (B) y (D).

Vis y NaChol fueron colocados en el medio de la bicapa (t = 0 ns) (Fig. 14A y C). Durante las simulaciones, el NaChol tendió a formar grupos de tres moléculas, con sus grupos carboxilo orientados hacia la superficie de la membrana, a distancias intermoleculares menores de 4 Å (Fig. 14B y D). Por otro lado, Vis se mantuvo en la mitad de la bicapa de SPC (t = 50 ns) (Fig. 14A y B). De acuerdo con los resultados de la simulación, el NaChol deforma la membrana por su movimiento hacia la hemicapa externa, como consecuencia de la presencia de grupos hidroxilo en su estructura esteroidea (baja lipofilicidad). Mientras que el Vis solamente se mueve sobre su eje de simetría.

La variación de los ángulos formados entre un eje geométrico (que cruza la estructura molecular de la molécula de Vis) y el eje z (eje normal) durante los 50 ns para cuatro moléculas de Vis se muestra en la Fig. 15A, sin ningún movimiento significativo hacia otras regiones de la membrana. La densidad parcial del sistema mostró un aumento en el espesor de la membrana inversamente proporcional a la concentración molecular de colato y Vis (Fig. 15B). Además, la densidad de la membrana en las áreas alejadas del centro geométrico del sistema (~2 nm desde el punto central) fue ~500 kg/m<sup>3</sup> mayor. De manera similar, la densidad de las moléculas de colato a aproximadamente 0,75 nm alrededor del centro geométrico fue ~60 kg/m<sup>3</sup> mayor en comparación con el centro. Para Vis, por el contrario, la densidad fue mayor en el centro (~100 kg/m<sup>3</sup>), disminuyendo drásticamente a 1 nm del centro. Todas estas observaciones indican un elevado grado de desorden de los grupos polares de los lípidos en la membrana, en el que las moléculas de colato junto con las fosfatidilcolinas experimentan un movimiento de onda característico, mientras que las moléculas de Vis permanecen estables a pesar de este efecto.



Figura 15. Análisis de MD. (A) Ángulos entre el eje geométrico y el eje z (normal) de cuatro moléculas de Vis en función del tiempo de la dinámica. (B) Densidad postdinámica de los componentes del sistema.

#### 4.3.4 Prueba de deformabilidad

Como parámetro de deformabilidad, la elasticidad de la membrana liposomal (D) fue calculada mediante el pasaje de los liposomas, impulsados por una presión externa baja ejercida con N<sub>2</sub>, a través de los poros de una membrana de policarbonato cuyo diámetro era menos de la mitad del diámetro de los liposomas (Fig. 16). Los perfiles de UDL y UDL-Vis mostraron un modo bifásico, con un pasaje rápido durante el primer minuto seguido de un pasaje lento durante el resto del tiempo. Los UDL-Vis presentaron el mayor valor de deformabilidad, D=6152, que fue un 28,2% más alto que para los UDL, D=4419. El 96% de los fosfolípidos fue recuperado en el caso de los UDL-Vis después de 15 min, mientras que fue recuperado el 74% de fosfolípidos para UDL. Por otro lado, el 45% de los fosfolípidos fueron recuperados para CL-Vis, los cuales presentaron un D=2447 y un comportamiento logarítmico (paso lento durante los primeros cinco min). Se incluyeron CL como control de formulación no ultradeformable. Solo el 1% de los fosfolípidos de los CL se recuperaron después de 15 min, y su D fue de 5. Por lo tanto, la incorporación de Vis en una formulación no ultradeformable también aumentó su deformabilidad, en este caso, 489 veces más que los CL.



Figura 16. Perfil del pasaje de fosfolípidos a través de poros de 50 nm de diámetro en función del tiempo.

#### 4.3.5 Penetración en piel humana

Después de la prueba de deformabilidad, se seleccionó a los UDL-Vis como la mejor nanoformulación candidata para la prueba de penetración cutánea, y se comparó con el Vis libre disuelto en DMSO. La determinación de Vis a partir de la extracción con cintas mediante la técnica *tape stripping* reveló que la encapsulación del fármaco en UDL-Vis aumentó significativamente su penetración de la piel (p < 0,0005), aproximadamente 7 veces, en comparación con Vis libre (Fig. 17, recuadro), luego de 1 h de incubación. Para los UDL-Vis, se detectó el principio activo a lo largo de todas las secciones de la piel: SC superior (cintas 1-5), SC medio (cintas 6-10), SC inferior (cintas 11-20) y en la epidermis viable + dermis (VED) (Fig. 17). Se recuperaron un total de 16,9 ± 1.1 µg (SC superior), 1,9 ± 0,7 µg (SC medio), 1,1 ± 0,3 µg (SC inferior) y 1,1 ± 0,5 µg (VED).

Se llevaron a cabo incubaciones de 1, 4 y 8 h con UDL-Vis (Fig. 18), obteniéndose una mayor recuperación de Vis después de 8 h de incubación (p < 0,02). Se observaron diferencias significativas en la VED, donde la acumulación de Vis aumentó con el tiempo de incubación. La cantidad de Vis recuperada después de 1, 4 y 8 h de incubación fue de 1,1 ± 0,5 µg, 3,1 ± 0,6 µg y 5,4 ± 0,4 µg, respectivamente.



Figura 17. Vis recuperado de la piel mediante *tape stripping* luego de la incubación con UDL-Vis y Vis libre en DMSO durante 1 h a 35 °C con el SPM. La masa de Vis recuperada del SC superior (cintas 1-5), medio (cintas 6-10), inferior (cintas 11-20), y en la epidermis viable + dermis (VED) se muestran como el promedio  $\pm$  SD (n=5). En el recuadro se muestra el total de Vis recuperado para ambas formulaciones (\*\*\* p < 0,0005).



Figura 18. Penetración cutánea de Vis tras 1, 4 y 8 h de incubación con UDL-Vis con SPM a 35 °C. En (A) se muestra la masa de Vis recuperado del SC superior (cintas 1-5), medio (cintas 6-10) e inferior (cintas 11-20), y de la epidermis viable + dermis (VED). En (B) se muestran los perfiles de penetración acumulados. Los datos en (A) y (B) se presentan como el promedio  $\pm$  SD (n=5), \* *p* < 0,02, \*\* *p* < 0,005, \*\*\* *p* <0,0005.

Incubando la piel con F-UDL-Vis, se puede realizar un seguimiento del destino de la membrana liposomal (marcada con el fluoróforo Rh-DPPE) y del espacio acuoso interno (marcado con calceína) mediante CLSM. Los cortes

histológicos transversales de la piel revelaron la presencia de ambos fluoróforos, principalmente en la región del SC, ingresando en la epidermis viable después de 8 h de incubación (Fig. 19). Además, por medio del seccionamiento óptico por CLSM (Fig. 20) se observó la distribución de la Rh-DPPE y calceína, con una dispersión de los datos mayor para calceína, lo cual podría ser indicativo de la liberación del contenido acuoso luego del pasaje a través del SC.



Figura 19. Sección transversal de un explanto de piel humana incubado 8 h con F-UDL-Vis (20x) por CLSM. Izquierda: superposición de imágenes confocales de Rh-DPPE y calceína. Ambos fluoróforos se localizaron principalmente en la región del SC. Derecha: imagen de transmisión de la muestra. La flecha amarilla indica el SC.



Figura 20. Fluorescencia de los F-UDL-Vis mediante seccionamiento óptico (*z*stacking) por CLSM. El panel de la izquierda muestra la distribución de ambos fluoróforos en función de la profundidad de la piel. Los valores se normalizaron para ser comparables entre sí. El panel derecho incluye un esquema con planos confocales representativos (20x) de un espécimen de piel.

#### 4.4 Discusión

Este es el primer trabajo que logró la encapsulación y caracterización de una nanoformulación cargada con Vis como el potencial tratamiento tópico contra el BCC. Se obtuvo una formulación unilamelar con una buena estabilidad coloidal durante al menos un mes. La formulación mostró una distribución unimodal de tamaño, con un diámetro promedio de alrededor de 110 nm.

Vis mostró poca solubilidad en el buffer, pH y fuerza iónica presentes en la formulación (al menos 400 veces menos soluble que en CH<sub>3</sub>OH). Por lo tanto, debido a la baja solubilidad del fármaco en el entorno acuoso y la alta eficiencia de la encapsulación obtenida, era de esperar que el activo se incorporara en la membrana liposomal en lugar del núcleo acuoso. El bajo módulo elástico que caracteriza a los UDL, y que les proporciona la capacidad de pasar intactos a través del SC, es una característica esencial para que cumplan su cometido este tipo de NEA. Por esa razón, se analizaron la interacción Vis-membrana y las propiedades de deformabilidad de la nanoformulación. Efectivamente, las moléculas de Vis se localizaron en la bicapa de los liposomas, favoreciendo la pérdida de empaquetamiento entre las cabezas de los fosfolípidos, dado que la presencia del fármaco aumentó significativamente el HF de la sonda MC540. El monómero MC540 se localiza cerca del grupo glicerol de los fosfolípidos, por lo que se atribuye un aumento en el HF a la exposición de los sitios hidrófobos en la interfaz agualípido (Lelkes y Miller, 1980). Aunque este efecto se midió en la hemicapa externa, también podría estar ocurriendo en la cara interna de la membrana. Mediante la sonda Laurdan también se observó que la incorporación de Vis provocó una disminución en la rigidez de la interfaz hidrofílica/hidrofóbica. Estas observaciones concuerdan con el elevado desorden en la distribución de los grupos polares de los fosfolípidos en la membrana observada en la simulación de dinámica molecular.

Con respecto a la espectroscopía Raman, la incorporación de Vis en la relación molar que se utilizó en todas las demás determinaciones (SPC:NaChol:Vis 51,6:17:3) dio lugar al predominio de conformaciones *gauche* en las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos. La incorporación de Vis redujo el grado de libertad de rotación y vibración de los grupos metilo terminales, posiblemente por la presencia del fármaco en el espacio entre ambas hemicapas como lo predice el

análisis computacional. Concentraciones más altas de Vis incrementaron el desordenaron entre las cadenas laterales de los fosfolípidos, disminuyendo la interacción intermolecular, con un aumento en el número de conformaciones *gauches*.

Estos efectos también se reflejaron en las determinaciones de calorimetría, donde la entalpía de la transición de fase de la membrana liposomal disminuyó considerablemente después de la incorporación del fármaco. Esto indicaría que Vis produjo cambios significativos en la organización de la bicapa, disminuyendo su cooperatividad durante la transición de fase (Montanari et al., 2007). Por otro lado, Vis no alteró el estado de fase de la membrana, evaluada por Laurdan, ni la temperatura de transición monitoreada mediante DSC. Estas interacciones con la bicapa también contribuyeron a mejorar la flexibilidad de la nanoformulación, dando como resultado valores más altos del parámetro *D* después de la incorporación de Vis. Este incremento en *D* también pudo observarse en los CL.

En los estudios de FT-IR, se pudo observar que la incorporación de Vis alteró el modo vibracional de los -OH y C-O del NaChol. La simulación computacional mostró que Vis no interactúa directamente con las moléculas de NaChol, por lo que este efecto podría estar relacionado con los cambios conformacionales observados por espectroscopía Raman en toda la membrana después de la adición del fármaco. La banda S-O alrededor de 1311 cm<sup>-1</sup> reveló la presencia de Vis en la formulación, pero no fue posible determinar si hubo alguna interacción con la matriz liposomal. La ausencia de corrimiento de las bandas de los principales grupos funcionales de las cabezas polares de los fosfolípidos indicaría que Vis no interactúa con ellos. Este resultado concuerda con la simulación, la cual predijo la ubicación de Vis en la zona intermedia de la membrana entre ambas hemicapas.

Dadas estas consideraciones, Vis podría ubicarse en la zona intermembrana induciendo cambios conformacionales en los fosfolípidos por impedimento estérico. Por otro lado, el NaChol tiende a agruparse en las superficies de la bicapa, donde les permite a los UDL sufrir eventos de elevada curvatura cuando se les somete a tensiones (Cevc et al., 1995; El Maghraby et al., 2008). La acumulación de moléculas de colato podría ser responsable del potencial Zeta negativo de estos liposomas. Los ensayos *in vitro* con explantos de piel humana demostraron que los UDL-Vis y F-UDL-Vis pudieron ingresar y atravesar el SC, y llegar a la epidermis viable. Vis fue encontrado a lo largo de todo el SC y en la VED, alcanzando la mayor concentración en la VED luego de 8 h de incubación. Por el contrario, el Vis libre en DMSO se encontró sólo en el SC superior y en una pequeña concentración en la VED. Si bien el DMSO actúa como un potenciador de la penetración de activos hidrofóbicos (Goyal et al., 2016; Montanari et al., 2010), en este caso, su uso fue necesario para solubilizar el Vis. Sin embargo, este efecto potenciador no fue suficiente para lograr el perfil de penetración obtenido por el nanosistema.

La dosis diaria indicada para la administración Vis por vía oral es de 150 mg (como puede leerse en el prospecto de Erivedge<sup>®</sup>). Teniendo en cuenta la biodisponibilidad absoluta media de una dosis única del fármaco (31,8%) y su volumen de distribución mínimo (16,4 l) (datos también disponibles en el prospecto), la concentración de Vis disponible después de la administración oral podría estimarse alrededor de ~3 µg/ml. En los estudios de penetración cutánea, fueron recuperados un total de 5,4 µg de Vis de la VED después de 8 h de incubación. Como el volumen del disco de la piel es de 0,64 cm<sup>3</sup>, la concentración de Vis presente en la VED fue de 8,4 µg/ml. Por lo tanto, estaría llegando con los UDL-Vis una concentración casi tres veces mayor que la dosis requerida para el tratamiento BCC.

Al marcar los UDL-Vis con sondas tanto hidrofílicas como hidrofóbicas es posible seguir el derrotero de su contenido acuoso interno y de sus componentes de membrana en los ensayos de penetración cutánea. Las dos sondas fluorescentes fueron observadas mediante CLSM a lo largo de todas las capas de piel: mientras que la Rh-DPPE podría tener una distribución similar a la esperada para Vis –y esto efectivamente se evidenció al comparar los resultados de las microscopías con la determinación de Vis por HPLC luego del *tape stripping*–, el transporte efectivo de la calceína también muestra el potencial de este nanosistema para el co-transporte del Vis con principios activos hidrofílicos. Esto podría ser útil para mejorar la eficacia de los agentes terapéuticos e incluso para ampliar el campo de acción para el tratamiento de otros tipos de cáncer de piel además del BCC, en el que Vis podría tener una función complementaria, como ya se ha propuesto en la literatura reciente (Mpekris et al., 2017).

#### **Referencias**

Abraham, M.J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J.C., Hess, B., Lindahl, E., 2015. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. SoftwareX 1, 19-25. https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001

Barakat, M.T., Humke, E.W., Scott, M.P., 2010. Learning from Jekyll to control Hyde: Hedgehog signaling in development and cancer. Trends Mol. Med. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.05.003

Bernik, D.L., Disalvo, E.A., 1996. Determination of the dimerization constant of merocyanine 540 at the membrane interface of lipid vesicles in the gel state. Chem. Phys. Lipids 82, 111-123. https://doi.org/10.1016/0009-3084(96)02568-6

Betancourt, T., Doiron, A., Homan, K.A., Brannon-Peppas, L., 2009. Controlled release and nanotechnology, en: Nanotechnology in drug delivery. Springer, pp. 283-312.

Celia, C., Trapasso, E., Cosco, D., Paolino, D., Fresta, M., 2009. Turbiscan Lab® Expert analysis of the stability of ethosomes® and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. Colloids Surfaces B Biointerfaces 72, 155-160. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.03.007

Cevc, G., Blume, G., 1992. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes 1104, 226-232. https://doi.org/10.1016/0005-2736(92)90154-E

Cevc, G., Gebauer, D., 2003. Hydration-Driven Transport of Deformable Lipid Vesicles through Fine Pores and the Skin Barrier. Biophys. J. 84, 1010-1024. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74917-0

Cevc, G., Schätzlein, A., Blume, G., 1995. Transdermal drug carriers: Basic properties, optimization and transfer efficiency in the case of epicutaneously applied peptides. J. Control. Release. https://doi.org/10.1016/0168-3659(95)00056-E

Disalvo, E.A., Arroyo, J., Bernik, D.L., 2003. Interfacial Properties of Liposomes as Measured by Fluorescence and Optical Probes. Methods Enzymol. 367, 213-233. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)67014-X

Dlugosz, A., Agrawal, S., Kirkpatrick, P., 2012. Vismodegib. Nat. Rev. Drug Discov. https://doi.org/10.1038/nrd3753

El Maghraby, G.M., Barry, B.W., Williams, A.C., 2008. Liposomes and skin: From

drug delivery to model membranes. Eur. J. Pharm. Sci. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.05.002

El Zaafarany, G.M., Awad, G.A.S., Holayel, S.M., Mortada, N.D., 2010. Role of edge activators and surface charge in developing ultradeformable vesicles with enhanced skin delivery. Int. J. Pharm. 397, 164-172. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.06.034

Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M.L., Darden, T., Lee, H., Pedersen, L.G., 1995. A smooth particle mesh Ewald method. J. Chem. Phys. 103, 8577-8593. https://doi.org/10.1063/1.470117

Frisch, M., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, Ga., 2009. Gaussian 09, revision a. 02, gaussian. Inc., Wallingford, CT 200.

Gaber, B.P., Peticolas, W.L., 1977. On the quantitative interpretation of biomembrane structure by Raman spectroscopy. Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes 465, 260-274. https://doi.org/10.1016/0005-2736(77)90078-5

Goyal, R., Macri, L.K., Kaplan, H.M., Kohn, J., 2016. Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery. J. Control. Release. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.10.049

Gupta, V., Trivedi, P., 2018. In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical topical nanocarriers containing anticancer drugs for skin cancer treatment, en: Lipid Nanocarriers for Drug Targeting. Elsevier, pp. 563-627.

Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H.J.C., Fraaije, J.G.E.M., 1997. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. J. Comput. Chem. 18, 1463-1472. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-

JCC4>3.0.CO;2-H

Hirsch-Lerner, D., Barenholz, Y., 1999. Hydration of lipoplexes commonly used in gene delivery: Follow-up by laurdan fluorescence changes and quantification by differential scanning calorimetry. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 1461, 47-57. https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00145-5

Jain, S., Patel, N., Shah, M.K., Khatri, P., Vora, N., 2017. Recent Advances in Lipid-Based Vesicles and Particulate Carriers for Topical and Transdermal Application. J. Pharm. Sci. https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.10.001

Larsson, K., Rand, R.P., 1973. Detection of changes in the environment of hydrocarbon chains by Raman spectroscopy and its application to lipid-protein

systems. Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Lipids Lipid Metab. 326, 245-255. https://doi.org/10.1016/0005-2760(73)90250-6

Lelkes, P.I., Miller, I.R., 1980. Perturbations of membrane structure by optical probes: I. Location and structural sensitivity of merocyanine 540 bound to phospholipid membranes. J. Membr. Biol. 52, 1-15. https://doi.org/10.1007/BF01869001

Lewis, R.N.A.H., McElhaney, R.N., 1998. The structure and organization of phospholipid bilayers as revealed by infrared spectroscopy. Chem. Phys. Lipids 96, 9-21. https://doi.org/10.1016/S0009-3084(98)00077-2

LoRusso, P.M., Rudin, C.M., Reddy, J.C., Tibes, R., Weiss, G.J., Borad, M.J., Hann, C.L., Brahmer, J.R., Chang, I., Darbonne, W.C., 2011. Phase I trial of hedgehog pathway inhibitor GDC-0449 in patients with refractory, locally-advanced or metastatic solid tumors. Clin. cancer Res. clincanres-2745. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2745

Mannock, D.A., Lewis, R.N.A.H., McElhaney, R.N., 2010. A calorimetric and spectroscopic comparison of the effects of ergosterol and cholesterol on the thermotropic phase behavior and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 1798, 376-388. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.09.002

Marsanasco, M., Márquez, A.L., Wagner, J.R., Chiaramoni, N.S., Del V. Alonso, S., 2015. Bioactive compounds as functional food ingredients: Characterization in model system and sensory evaluation in chocolate milk. J. Food Eng. 166, 55-63. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.05.007

Mayer, L.D., Hope, M.J., Cullis, P.R., 1986. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes 858, 161-168.

Montanari, J., Bucci, P., Alonso, S., 2014. A model based in the radius of vesicles to predict the number of unilamellar liposomes. Int. J. Res. Pharm. Chem 4, 484-489.

Montanari, J., Maidana, C., Esteva, M.I., Salomon, C., Morilla, M.J., Romero, E.L., 2010. Sunlight triggered photodynamic ultradeformable liposomes against Leishmania braziliensis are also leishmanicidal in the dark. J. Control. Release 147, 368-376. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.08.014

Montanari, J., Perez, A.P., Di Salvo, F., Diz, V., Barnadas, R., Dicelio, L.,

Doctorovich, F., Morilla, M.J., Romero, E.L., 2007. Photodynamic ultradeformable liposomes: design and characterization. Int. J. Pharm. 330, 183-194. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.11.015

Montanari, J., Roncaglia, D.I., Lado, L.A., Morilla, M.J., Romero, E.L., 2009. Avoiding failed reconstitution of ultradeformable liposomes upon dehydration. Int. J. Pharm. 372, 184-190. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.01.012

Mpekris, F., Papageorgis, P., Polydorou, C., Voutouri, C., Kalli, M., Pirentis, A.P., Stylianopoulos, T., 2017. Sonic-hedgehog pathway inhibition normalizes desmoplastic tumor microenvironment to improve chemo- and nanotherapy. J. Control. Release. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.06.022

Mustan, F., Ivanova, A., Madjarova, G., Tcholakova, S., Denkov, N., 2015. Molecular dynamics simulation of the aggregation patterns in aqueous solutions of bile salts at physiological conditions. J. Phys. Chem. B 119, 15631-15643. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.5b07063

Nastiti, C.M.R.R., Ponto, T., Abd, E., Grice, J.E., Benson, H.A.E., Roberts, M.S., 2017. Topical nano and microemulsions for skin delivery. Pharmaceutics 9, 37. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9040037

Naves, L.B., Dhand, C., Venugopal, J.R., Rajamani, L., Ramakrishna, S., Almeida, L., 2017. Nanotechnology for the treatment of melanoma skin cancer. Prog. Biomater. 6, 13-26. https://doi.org/10.1007/s40204-017-0064-z

Nguyen, H.X., Banga, A.K., 2015. Enhanced skin delivery of vismodegib by microneedle treatment. Drug Deliv. Transl. Res. 5, 407-423. https://doi.org/10.1007/s13346-015-0241-3

Olesen, U.H., Clergeaud, G., Lerche, C.M., Andresen, T.L., Haedersdal, M., 2018. Topical delivery of vismodegib using ablative fractional laser and micro-emulsion formulation in vitro. Lasers Surg. Med. 1-9. https://doi.org/10.1002/lsm.23013

Orendorff, C.J., Ducey, M.W., Pemberton, J.E., 2002. Quantitative correlation of Raman spectral indicators in determining conformational order in alkyl chains. J. Phys. Chem. A 106, 6991-6998. https://doi.org/10.1021/jp014311n

Parasassi, T., De Stasio, G., Ravagnan, G., Rusch, R.M., Gratton, E., 1991. Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. Biophys. J. 60, 179-189. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82041-0

Parasassi, T., Gratton, E., 1995. Membrane lipid domains and dynamics as detected

by Laurdan fluorescence. J. Fluoresc. 5, 59-69. https://doi.org/10.1007/BF00718783

Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E., 2004. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. J. Comput. Chem. 25, 1605-1612. https://doi.org/10.1002/jcc.20084

Schaefer, U., Loth, H., 1996. An ex-vivo model for the study of drug penetration into human skin. Pharm. Res 13, b24.

Sekulic, A., Migden, M.R., Oro, A.E., Dirix, L., Lewis, K.D., Hainsworth, J.D., Solomon, J.A., Yoo, S., Arron, S.T., Friedlander, P.A., Marmur, E., Rudin, C.M., Chang, A.L.S., Low, J.A., Mackey, H.M., Yauch, R.L., Graham, R.A., Reddy, J.C., Hauschild, A., 2012. Efficacy and Safety of Vismodegib in Advanced Basal-Cell Carcinoma. N. Engl. J. Med. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1113713

Snyder, R.G., Strauss, H.L., Elliger, C.A., 1982. Carbon-hydrogen stretching modes and the structure of n-alkyl chains. 1. Long, disordered chains. J. Phys. Chem. 86, 5145-5150. https://doi.org/10.1021/j100223a018

Stewart, J.C.M., 1980. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. Anal. Biochem. 104, 10-14. https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90269-9

Tasumi, M., Shimanouchi, T., Miyazawa, T., 1962. Normal vibrations and force constants of polymethylene chain. J. Mol. Spectrosc. 9, 261-287. https://doi.org/10.1016/0022-2852(62)90236-9

Taveira, S.F., Lopez, R.F.V., 2011. Topical administration of anticancer drugs for skin cancer treatment, en: Skin Cancers-Risk Factors, Prevention and Therapy. IntechOpen.

van den Bergh, B.A.I., Wertz, P.W., Junginger, H.E., Bouwstra, J.A., 2001. Elasticity of vesicles assessed by electron spin resonance, electron microscopy and extrusion measurements. Int. J. Pharm. 217, 13-24. https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00576-2

Wang, A., Miller, C.C., Szostak, J.W., 2018. Interpreting turbidity measurements for vesicle studies. BioRxiv 348904.

# CAPÍTULO 5

# ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD *IN VITRO* Y DE TOXICIDAD *IN VIVO* DE LIPOSOMAS ULTRADEFORMABLES CON VISMODEGIB

#### 5.1 Introducción

En el presente capítulo se analizarán la citotoxicidad, la vía de muerte celular activada, y la captura celular de los liposomas ultradeformables con Vismodegib (UDL-Vis) obtenidos y caracterizados en el Capítulo 4. También se estudiarán los efectos toxicológicos y teratogénicos *in vivo* en el modelo intermedio pez cebra (*Danio rerio*) en su estadio larvario del desarrollo. La citotoxicidad *in vitro* y toxicidad *in vivo* de los UDL-Vis se comparará con la droga libre.

Los fundamentos de las técnicas aquí empleadas, así como las razones que motivaron su elección pueden leerse en el Capítulo 3 –sección 3.1–, en donde se presenta la utilidad de estos modelos *in vitro* e *in vivo* en detalle para el estudio de formulaciones nanoestructuradas de principios activos farmacológicos.

### 5.2 Materiales y métodos

#### 5.2.1 Materiales

Erivedge<sup>®</sup> (Vismodegib –2-cloro-N-(4-cloro-3-(piridin-2-il)fenil)-4-(metilsulfonil)benzamida–) fue donado por Roche S.A.Q. e I. (Argentina). La fosfatidilcolina de soja (SPC) y el TopFluor<sup>®</sup> Colesterol (TF-Chol) fueron comprados a Avanti<sup>®</sup> Polar Lipids. El colato de sodio (NaChol) fue de Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina). La carboximetilcelulosa sódica utilizada fue de Fluka-BioChemika (Sigma-Aldrich, Argentina). El cristal violeta (CV), rojo neutro (RN) y dimetilsulfóxido (DMSO) empleados fueron de BioPack (Buenos Aires, Argentina). La sal de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-3,5-difeniltetrazolio (MTT) se obtuvo de Life Technologies™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Argentina). Medio esencial mínimo (MEM), medio RPMI 1640, suero fetal bovino, glutamina, piruvato, penicilina y estreptomicina se obtuvieron de Gibco (Waltham, USA). Todos los demás reactivos usados eran de grado analítico.

#### 5.2.2 Métodos

#### 5.2.2.1 Preparación de los liposomas ultradeformables

La extracción del Vis a partir de las cápsulas de Erivedge<sup>®</sup> y la obtención de los UDL y UDL-Vis se realizó tal como se describió en el Capítulo 4, secciones *4.2.2.2* y *4.2.2.3*.

UDL-Vis marcados con el marcador fluorescente de membrana TF-Chol (F-UDL-Vis) se obtuvieron co-solubilizando el TF-Chol en la solución orgánica con los lípidos, en una relación molar TF-Chol:SPC de 1:1000.

#### 5.2.2.2 Estudios in vitro con líneas celulares

Los estudios *in vitro* fueron realizados con las líneas celulares humanas HaCaT, derivada de queratinocitos de la piel inmortalizados y SK-Mel-28, derivada de melanoma (tumoral). Ambas líneas fueron obtenidas del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular. (IMBICE-CIC-CONICET, Argentina). Las células fueron mantenidas tal como se detalla en el Capítulo 3, sección *3.2.2.3*.

Todos los ensayos se llevaron a cabo utilizando medio de cultivo con SFB al 10%.

#### 5.2.2.2.1 Estudios de citotoxicidad

La viabilidad celular luego de 4 y 24 h de incubación con UDL, ULD-Vis y Vis libre, fue determinada mediante MTT, CV y RN como se detalla en el Capítulo 3, sección *3.2.2.3.1*.

Se sembraron 1 x  $10^4$  células/pocillo en microplacas de 96 pocillos de fondo plano. Después de 24 h de incubación a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>, el medio de cultivo fue reemplazado por 100 µl de UDL, UDL-Vis o Vis, previamente diluidos en el medio de cultivo. Dada la hidrofobicidad del Vis, se realizó la dilución con medio de cultivo a partir de un stock concentrado de Vis en DMSO, de modo que la concentración final de DMSO en el pocillo sea de 1%. Se incluyeron controles sin tratar y con medio de cultivo con DMSO 1%. La concentración de Vis evaluada osciló entre 0,04 y 0,65 mg/ml, lo cual corresponde a concentraciones de SPC de 1,6 a 25,8 mM en el caso de los UDL-Vis y UDL.

Para el cálculo de la viabilidad celular se tuvo en cuenta el control correspondiente a cada tratamiento (células incubadas sólo con medio de cultivo o con medio con DMSO 1%). El porcentaje de viabilidad celular se reportó como el promedio de tres experimentos independientes ± SD.

#### 5.2.2.2.2 Estudios de activación de vías de muerte celular

La evaluación de la inducción de apoptosis celular se llevó a cabo por triplicado empleando el kit de detección de apoptosis Anexina V acoplada a FITC (BD Pharmingen<sup>™</sup>, USA) del mismo modo que como se describió en el Capítulo 3, sección *3.2.2.3.2.* Se sembraron 3 x 10<sup>5</sup> células/pocillo en placas de 6 pocillos y se mantuvieron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h. El medio de cultivo fue reemplazado con medio fresco que contenía UDL-Vis y Vis (0,32 mg/ml de Vis). Se incluyeron controles sin tratar y con medio de cultivo con DMSO 1%. Las células fueron incubadas durante 4 h a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Un total de 1,9 x 10<sup>4</sup> células fueron analizadas, sin demorar más de 1 h desde el momento de la incubación, mediante citometría de flujo.

#### 5.2.2.2.3 Captura celular

La captura celular de los F-UDL-Vis (0,32 mg/ml de Vis) fue monitoreada en HaCaT y SK-Mel-28 mediante citometría de flujo.

Se sembraron 1 x 10<sup>5</sup> células por pocillo en placas de 24 pocillos y se las dejó crecer durante 24 h. Por un lado, se realizó una cinética de captura, por duplicado, para determinar el tiempo de incubación óptimo para llevar a cabo el estudio. Para ello las células fueron incubadas con 400 µl de F-UDL-Vis durante 1, 2 y 4 h a 37 °C. Transcurrido el tiempo fueron lavadas 3 veces con buffer fosfato salino (PBS), tripsinadas y centrifugadas a 125xg. Los *pellets* fueron resuspendidos con 300 µl de PBS. A continuación, se realizó citometría de flujo para cuantificar la

captura de los F-UDL-Vis en función del tiempo. Las muestras se excitaron con un láser de 488 nm y se empleó el filtro FL1 (530/30 nm) para detectar TF-Chol.

Una vez determinado el tiempo óptimo de incubación para ambas líneas (4 h para HaCaT y 1 h para SK-MeI-28), éstas se incubaron con los F-UDL-Vis a 4 y 37 °C. Un total de 1,9 x 10<sup>4</sup> células fueron analizadas mediante citometría de flujo por duplicado. Como control de la viabilidad celular, se realizó en paralelo la prueba de detección de apoptosis con el kit comercial Anexina V-FITC a células sin tratar que fueron incubadas con medio de cultivo en las mismas condiciones que aquellas tratadas con F-UDL-Vis.

Tanto en el estudio de cinética como en el de captura a 4 y 37 °C se incluyeron controles sin tratar, y se realizaron por triplicado.

#### 5.2.2.3 Evaluación de la toxicidad in vivo en larvas de pez cebra

Se realizaron estudios de toxicidad en larvas de pez cebra entre el 4º y 7º día post fecundación (dpf). Los peces cebra adultos (cepa salvaje) y las larvas fueron mantenidos en las mismas condiciones que se describieron en el Capítulo 3, sección *3.2.2.4.* Después de 1 dpf, se colocaron tres embriones de pez cebra en cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos con medio E3, y se mantuvieron a 28  $\pm$  1 °C hasta los 4 dpf en las mismas condiciones de luz que los adultos.

#### 5.2.2.3.1 Tratamiento de los peces

A los 4 dpf se les retiró el medio y se reemplazó con 250 µl de diluciones seriadas en medio E3 de UDL-Vis y Vis. La solución de tratamiento se mantuvo durante todo el estudio y las larvas se incubaron a  $28 \pm 1$  °C con un ciclo de luz/oscuridad de 14/10h. El rango de concentración de Vis estudiado fue entre 10,9 y 175 µg/ml para Vis libre y entre 40,6 y 650 µg/ml de Vis (1,6 y 25,8 mM de SPC) para UDL-Vis. Se preparó un stock de Vis concentrado en DMSO a partir del cual se realizaron diluciones seriadas en E3, de modo tal que en cada pocillo la concentración del solvente orgánico fuese de 1%. Por ellos se incluyeron dos controles, uno con E3 y otro con E3 con DMSO 1%. Todas las determinaciones se

evaluaron en el mismo grupo de larvas, y sólo fueron considerados válidos aquellos ensayos con un 90% de viabilidad de los controles.

5.2.2.3.2 Cambios en la actividad de nado, alteraciones del ritmo cardíaco y cambios morfológicos

Los eventos de actividad de las larvas se registraron y analizaron del mismo modo que en el Capítulo 3, sección *3.2.2.4.2*. En el caso de las determinaciones de alteraciones del ritmo cardíaco y cambios morfológicos también se llevaron a cabo tal como se describe en el Capítulo 3, sección *3.2.2.4.3*.

#### 5.2.2.3.3 Declaración de ética

Todos los procedimientos con animales se realizaron en estricta conformidad con las guías internacionales para el cuidado y mantenimiento de animales de laboratorio. Los protocolos fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y el Comité de Ética de la Universidad Nacional de Quilmes, Argentina (CE-UNQ 2/2014, CICUAL-UNQ 013-15 y CICUAL-UNQ 014-15).

#### 5.2.2.4 Análisis estadístico

El software GraphPad Prism 6.0 se utilizó para realizar todos los análisis estadísticos. Se llevaron a cabo pruebas ANOVA de una vía y el *post-test* de comparaciones múltiples de Dunnett, comparando los tratamientos con el control correspondiente. En el caso de los estudios de citotoxicidad, además de los anteriores, se utilizó el *t-test* de *Student* para la comparación entre los tratamientos de a dos variables. Sólo los valores con p < 0,05 fueron aceptados como significativos.

#### 5.3 Resultados

#### 5.3.1 Estudios in vitro

Se realizaron ensayos de citotoxicidad, de determinación de la vía muerte celular activada y de captura de los liposomas con las líneas celulares humanas SK-Mel-28 y HaCaT, las cuales presentan activa la vía se señalización Hedgehog (Liang et al., 2017; Olesen et al., 2017), sobre la cual ejerce su acción el Vis.

#### 5.3.1.1 Citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad consistieron en la determinación de la actividad metabólica por MTT, integridad de membranas y lisosomas por NR y adherencia de las células mediante CV. Los tres ensayos se realizaron por triplicado para determinar la viabilidad celular luego de 4 y 24 h de incubación con UDL, UDL-Vis y Vis libre.

No se observaron diferencias significativas entre el control sin tratar y el control con medio con DMSO 1%.

Para las dos concentraciones más altas estudiadas (12,9 mM de SPC/0,32 mg/ml de Vis y 25,8 mM de SPC/0,65 mg/ml) los UDL-Vis fueron más citotóxicos que los UDL y que la droga libre luego de 4 horas de incubación para SK-Mel-28 (Fig. 1). Las tres técnicas arrojaron resultados semejantes.

Nuevamente UDL-Vis fueron significativamente más citotóxicos que los demás tratamientos a las 24 h de incubación, a partir de concentraciones iguales y mayores a 3,2 mM de SPC/0,08 mg/ml de Vis. Sólo en el caso del ensayo con CV se observó que, en concentraciones intermedias, los UDL afectaron en mayor medida la adherencia de las células en comparación a los UDL-Vis.



Figura 1. Porcentaje de viabilidad celular de SK-Mel-28 luego de 4 y 24 h de incubación con UDL, UDL-Vis y Vis libre determinada mediante MTT, NR y CV. Los valores de concentración se expresan como la concentración de SPC en mM y dentro del paréntesis la concentración en mg/ml de Vis. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SD (n = 3). Sólo se muestra el análisis estadístico *t-test* en aquellas concentraciones en las que los cambios fueron significativos con respecto al control (determinado mediante análisis ANOVA de una vía). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001.

Para el caso de HaCaT, luego de 4 h de incubación sólo a la máxima concentración estudiada los UDL-Vis fueron más citotóxicos que el Vis libre (Fig. 2). A las 24 h los UDL-Vis continuaron siendo más tóxicos que el Vis libre y que los

UDL a concentraciones mayores e iguales a 12,9 mM de SPC/0,32 mg/ml de Vis. Sin embargo, a concentraciones más bajas se observó que Vis libre fue más citotóxico que HaCaT. Al igual que lo que ocurrió con SK-Mel-28, sólo se observó un mayor efecto tóxico de los UDL en comparación a los UDL-Vis en el ensayo con CV (24 h), y con MTT (4 h).



Figura 2. Viabilidad celular de HaCaT luego de 4 y 24 h de incubación con UDL, UDL-Vis y Vis libre determinada mediante MTT, NR y CV Los valores de concentración se expresan como la concentración de SPC en mM y dentro del paréntesis la concentración en mg/ml de Vis. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SD (n = 3). Sólo se muestra el análisis estadístico *t-test* en aquellas concentraciones en las que los cambios fueron significativos con respecto al control

(determinado mediante análisis ANOVA de una vía). \* p < 0,05, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001.

#### 5.3.1.2 Muerte celular

La tasa de inducción de apoptosis fue determinada por citometría de flujo después de 4 h de tratamiento con Vis y UDL-Vis (Fig. 3).



Figura 3. Análisis por citometría de flujo para la detección y comparación de la inducción de apoptosis por Vis y UDL-Vis en HaCaT y SK-Mel-28 después de 4 h de incubación. Los eventos fueron detectados mediante el kit Anexina V acoplada a FITC e ioduro de propidio.

Se observó un efecto diferencial entre ambas líneas celulares. En SK-Mel-28, los UDL-Vis indujeron una mayor tasa de apoptosis que el Vis libre. También produjo un incremento significativo con respecto a Vis y al control en el número de células con doble marca, las cuales podrían estar en apoptosis tardía, sufriendo necrosis o ya estar muertas. Por su parte HaCaT, no se observaron cambios significativos en cuanto a la inducción de apoptosis, pero si un incremento en la cantidad de células con doble marca cuando fueron incubadas con Vis y UDL-Vis. El incremento en el número de células con doble marca luego del tratamiento con UDL-Vis fue mayor que el del Vis libre, y estuvo en el orden del que produjo en SK-Mel-28.

No se detectaron diferencias significativas entre el control incubado con medio de cultivo con o sin DMSO 1%.

#### 5.3.1.3 Captura celular de los liposomas

En primer lugar, se llevó a cabo una cinética de captura de los F-UDL-Vis, la cual fue monitoreada mediante citometría de flujo, para determinar el tiempo óptimo de incubación (Fig. 4).

En base a los resultados obtenidos se decidió incubar durante 4 h a las HaCaT, ya que, si bien a 1 h prácticamente todas las células presentaron marca, la intensidad de fluorescencia fue significativamente mayor a las 4h. Mientras que para SK-Mel-28 se decidió incubarlas durante 1 h.



Figura 4. Histogramas para HaCaT y SK-Mel-28 obtenidos por citometría de flujo luego de 1 (verde), 2 (rosa) y 4 h (celeste) de incubación con F-UDL-Vis a 37 °C. El control sin tratar se muestra en color violeta.

Para determinar si la captura celular de los liposomas estaba mediada por una captación metabólicamente activa, las células fueron incubadas a 37 y 4 °C (Fig. 5). En paralelo se monitoreó la viabilidad celular de controles en las mismas condiciones de temperatura y tiempo de incubación mediante el kit de detección de apoptosis Anexina V-FITC e ioduro de propidio. No hubo diferencias entre los controles a 4 y 37 °C para ambas líneas.

En ambas líneas celulares la captura se produjo principalmente a 37 °C. Sin embargo, se observó un nivel de fluorescencia no despreciable tras la incubación a 4 °C para ambas, siendo más significativo en SK-Mel-28.



Figura 5. Histogramas para HaCaT y SK-Mel-28 obtenidos por citometría de flujo luego de una incubación a 37 °C (verde) y a 4 °C (rosa) con F-UDL-Vis durante 4 h para HaCaT y 1 h para SK-Mel-28. El control sin tratar se muestra en color violeta.

#### 5.3.2 Estudios in vivo

Los estudios de toxicidad con larvas de pez cebra permitieron comparar los efectos de los UDL-Vis y el Vis libre, mediante el análisis de diversos parámetros considerados indicadores: determinación de alteraciones en la actividad locomotora y en el ritmo cardíaco, y cambios morfológicos.

En todos los casos no se observaron diferencias significativas entre los controles incubados con medio E3 y medio E3 con DMSO 1%.
#### 5.3.2.1 Alteraciones en la actividad de nado

En primer lugar, se estudió el efecto de los UDL-Vis y del Vis en la actividad de nado de las larvas con respecto al control (sin tratar o incubado con DMSO 1% en E3, respectivamente) a las 4, 24, 48 y 72 horas post incubación (hpi) con (Fig. 6). La actividad de las larvas se midió mediante el equipo automatizado wMicrotracker, y los resultados fueron relativizados al control.



Figura 6. Porcentaje de actividad de nado espontánea de larvas tratadas con UDL-Vis y Vis respecto al control correspondiente (línea punteada que indica el 100% de actividad de nado), a las 4, 24, 48 y 72 horas post incubación (hpi). Los datos se muestran como promedio  $\pm$  SEM (n = 24), \* *p* < 0,05, \*\* *p* < 0,01, \*\*\*\* *p* < 0,0001.

El Vis libre causó alteraciones en la actividad de nado a menores concentraciones que los UDL-Vis (Fig. 6). La disminución de la actividad de las larvas en ambos tratamientos a altas concentraciones, podría estar relacionada con la elevada tasa de mortalidad en los rangos de concentración estudiados, observándose efectos desde las 4 hpi para el caso de Vis libre. Los UDL-Vis generaron una disminución de la actividad con respecto al control tiempo y dosis dependiente. A las 4 hpi la incubación con UDL-Vis produjo hiperactividad de las larvas a bajas concentraciones, la cual desapareció con el paso del tiempo. Este efecto puede deberse a una excitación inicial transitoria por la presencia del nanosistema en el medio, tal como se observó en otros estudios con nanopartículas (Calienni et al., 2019). En el caso de las concentraciones intermedias, un aumento en la actividad en las primeras horas seguido de un descenso en el tiempo podría ser indicativo de toxicidad.

#### 5.3.2.2 Alteraciones del ritmo cardíaco y cambios morfológicos

A las 72 hpi, 8 larvas de los estudios de actividad de nado fueron tomadas al azar. Se las inmovilizó en carboximetilceulosa de sodio para fotografiarlas y realizar un video de 15 s, con el fin de realizar el conteo de latidos/minuto y determinar la presencia de cambios morfológicos en las mismas.

Nuevamente se observó que el Vis produjo efectos a menores concentraciones que los UDL-Vis. Ambos tratamientos indujeron principalmente bradicardia en las larvas a elevadas concentraciones (Fig. 7). Aunque, para el caso de las larvas tratadas con 21,9 y 43,8 µg/ml de Vis libre, algunas presentaron bradicardia y otras taquicardia. Las larvas incubadas con 175 µg/ml de Vis libre y 650 µg/ml de UDL-Vis se encontraban muertas luego de 72 hpi.



Figura 7. Determinación de alteración en el ritmo cardíaco de larvas luego de 72 horas post incubación (hpi) con UDL-Vis y Vis. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  SD (n = 8), \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\*\* p < 0.0001.

Por otra parte, dado que el Vis es una droga altamente teratogénica se analizaron las alteraciones morfológicas en las larvas tratadas. Los parámetros indicadores de teratogénesis analizados fueron la presencia de una vejiga natatoria desinflada, cuerpo arqueado, ulceración de tejidos, edema pericardial, y cambios en el área del ojo, longitud rostrocaudal y longitud de la médula espinal. Sólo se observó una disminución significativa del área del ojo para las larvas tratadas con una concentración de Vis libre de 43,8 µg/ml (Fig. 8). En el rango de concentración estudiado, los UDL-Vis no produjeron cambios morfológicos.

Las larvas que fueron tratadas con concentraciones mayores a 325 µg/ml de UDL-Vis y 43,8 µg/ml de Vis no se les pudo realizar el análisis morfológico dado su nivel de daño.



Figura 8. Parámetros morfológicos analizados en larvas a las 72 horas post incubación (hpi): área del ojo, longitud rostrocaudal y longitud de la médula espinal. Las mediciones fueron llevadas a cabo con el *software* ImageJ y fueron relativizadas al control correspondiente (línea punteada que corresponde al 100%). Promedio  $\pm$  SD (n = 8), \*\* p < 0.01.

5.4 Discusión

Los UDL-Vis fueron más citotóxicos que la droga libre en SK-Mel-28 y HaCaT, tanto a las 4 como a las 24 h de incubación. Sin embargo, resultó ser más sensible a los UDL-Vis la línea derivada de melanoma (SK-Mel-28) que aquella derivada de queratinocitos (HaCaT).

A diferencia de lo que se observó en el Capítulo 3, donde los liposomas conteniendo la droga encapsulada —el 5-FU en ese caso— fueron menos tóxicos que las matrices liposomales vacías, en estos ensayos se observó que los UDL-Vis fueron más citotóxicos que los UDL vacíos. En este caso, su efecto podría ser una sinergia entre la toxicidad propia de la matriz liposomal y la acción del Vis transportado.

Esta nanoformulación estaría siendo internalizada por las células principalmente por vías endocíticas, aunque su ingreso pasivo –no dependiente de actividad metabólica a 37 °C– no puede despreciarse. La captura de los liposomas a 4 °C resultó ser mayor en SK-Mel-28 en relación a HaCaT, tal como se había observado mediante microscopía de fluorescencia con los UDL-5FU (Capítulo 3).

En relación a los estudios de apoptosis mediante Anexina V acoplada a FITC, no se pudo discernir el mecanismo de muerte gatillado en HaCaT, pero sí se observó que el encapsulamiento del Vis en UDL-Vis incrementó la muerte celular en comparación a la droga libre. Sin embargo, para SK-Mel-28, sí se pudo determinar que los UDL-Vis produjeron un incremento significativo la tasa de inducción de apoptosis en comparación a la misma concentración de Vis libre.

En cuanto a los estudios *in vivo* con larvas de pez cebra, este es el primer trabajo en llevar a cabo este tipo de determinaciones con el Vis. Se pudo observar que el Vis libre fue más tóxico que los UDL-Vis, ya que provocó alteraciones en la actividad de nado y del ritmo cardíaco a menores concentraciones que los UDL-Vis. Por lo que la encapsulación del principio activo en los liposomas estaría disminuyendo su toxicidad. Por otro lado, las concentraciones de Vis que llegan a la epidermis viable con los UDL-Vis resultaron ser inocuas para las larvas. Además, el rango de concentración estudiado no produjo efectos teratogénicos detectables en las larvas, sólo se evidenció un efecto leve a moderado con el tratamiento con Vis libre.

### **Referencias**

Los fundamentos y detalles protocolares de las técnicas descriptas en este capítulo son coincidentes con los referenciados en el Capítulo 3, a cuyos ensayos remiten tanto la introducción como la descripción de métodos del presente. Adicionalmente, se agregan las siguientes citas referidas *ut supra* en este capítulo quinto:

Calienni, M.N., Lillo, C.R., Prieto, M.J., Gorojod, R.M., V Alonso, S. del, Kotler, M.L., Gonzalez, M.C., Montanari, J., 2019. Comparative toxicity of PEG and folatederived blue-emitting silicon nanoparticles: in vitro and in vivo studies. Nanomedicine 14, 375-385. https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0251

Liang, G., Liu, M., Wang, Q., Shen, Y., Mei, H., Li, D., Liu, W., 2017. Itraconazole exerts its anti-melanoma effect by suppressing Hedgehog, Wnt, and PI3K/mTOR signaling pathways. Oncotarget 8, 28510. https://doi.org/10.18632/oncotarget.15324

Olesen, U.H., Bojesen, S., Gehl, J., Haedersdal, M., 2017. Anticancer drugs and the regulation of Hedgehog genes GLI1 and PTCH1, a comparative study in nonmelanoma skin cancer cell lines. Anticancer. Drugs 28, 1106-1117. https://doi.org/10.1097/CAD.000000000000551

## CAPÍTULO 6

# CARACTERIZACIÓN TEÓRICA Y EXPERIMENTAL DE LA MOLÉCULA VISMODEGIB

El presente capítulo ha sido enviado para su publicación al Journal of Molecular Structure (Elsevier BV). "Experimental and theoretical study of the structural features of Vismodegib molecule", MN Calienni, ME Tuttolomondo, SV Alonso, J Montanari, FC Alvira. Parte de los ensayos descriptos en el mismo fueron llevados a cabo durante mi pasantía de investigación en el INQUINOA (UNT, Tucumán) bajo la dirección de la Dra. María Eugenia Tuttolomondo.

#### 6.1 Introducción

El Vismodegib (Vis), 2-cloro-N-[4-cloro-3-(piridin-2-il)fenil]-4-(metilsulfonil)benzamida, es una molécula que actúa sobre la vía de señalización Hedgehog, bloqueando la activación de la proteína transmembrana *Smoothened* (un receptor acoplado a proteína G) (Barakat et al., 2010). Se trata de una droga de última generación para el tratamiento del carcinoma de células basales (BCC) localmente avanzado, recidivante o que no puede ser tratado mediante cirugía o radioterapia.

Pese a que se trata del primer inhibidor selectivo de su clase y que hasta su aprobación por la FDA en 2012 no existía una terapia eficaz para estos tipos de BCC (Sekulic et al., 2012), su estructura y propiedades moleculares han sido poco estudiadas. De hecho, en la literatura, no hay información detallada acerca de las distancias atómicas involucradas, los ángulos diédricos entre los anillos, o cuál es la conformación de la energía mínima de la molécula. Esos parámetros son importantes para predecir con mayor precisión la relación estructura-reactividad de la molécula, datos que podrían ser útiles, por ejemplo, para optimizar su incorporación a nanosistemas de entrega de activos, un tipo de estrategia que podría permitir modificar la ruta de administración reduciendo los efectos secundarios.

Por lo tanto, debido a la importancia de comprender mejor las características químicas y conformacionales del Vis, en este capítulo se presentarán los cálculos teóricos sobre sus propiedades estructurales y vibracionales comparados con datos experimentales, medidos mediante las técnicas espectroscópicas FT-IR (Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier) y Raman.

6.2 Materiales y métodos 6.2.1 Materiales

Las cápsulas de Erivedge<sup>®</sup> (Vismodegib) y el Vismodegib estándar fueron donados por Roche S.A.Q. e I. (Argentina). El metanol se compró a Biopack (Buenos Aires, Argentina).

### 6.2.2 Métodos

6.2.2.1 Extracción del Vis a partir de las cápsulas comerciales

Para los análisis experimentales, se recuperó el Vis a partir de las cápsulas de Erivedge<sup>®</sup> tal como de describió en el Capítulo 4, sección *4.2.2.2.* 

## 6.2.2.2 Análisis espectroscópicos 6.2.2.2.1 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros de FT-IR fueron obtenidos a 25 °C en un rango de medida de 4000 y 400 cm<sup>-1</sup>, con 4 cm<sup>-1</sup> de resolución, con un espectrómetro Nicolet 8700 FT-IR. Se formó una pastilla de KBr y se llevaron a cabo 32 barridos acumulados. La deconvolución se llevó a cabo con el software OriginPro 8<sup>®</sup>.

### 6.2.2.2.2 Espectroscopía Raman

Los espectros Raman del Vis en fase sólida fueron obtenidos a temperatura ambiente en el intervalo de 4000 a 100 cm<sup>-1</sup> con un microscopio Thermo Scientific DXR Raman, con un *pinhole* de 25 µm y un objetivo de 10X. Los datos se recogieron usando una bomba de diodo y un láser de estado sólido de 532 nm, con una resolución de 4 cm<sup>-1</sup>, empleando 10 mW de potencia. Se realizaron un total de 64 exploraciones para cada experimento y los espectros se analizaron utilizando el *software* OMNIC v.8.0.

#### 6.2.2.3 Métodos computacionales

Los cálculos computacionales fueron realizados con el programa Gaussian 03 (Frisch et al., 2009). Este programa permite calcular analíticamente las primeras derivadas de la energía, las cuales se utilizan para optimizar las geometrías moleculares. Los cálculos analíticos de la segunda derivada de la energía se utilizan para obtener las frecuencias vibracionales y para determinar las constantes de fuerza. También pueden calcularse otras propiedades como las polarizabilidades, los momentos dipolares, las cargas atómicas, etc.

El Vis fue modelado con el programa Gauss View 3.0 (McLean y Chandler, 1980), la interfase gráfica del Gaussian 03. Con el fin de encontrar las conformaciones estables del Vis se realizó un barrido de la superficie de energía potencial del estado electrónico fundamental, fijando el diedro formado por los grupos piridina-clorofenilo, C12-C8-C25-C26, y permitiendo que todos los demás parámetros se relajen. Para ello se utilizó el método DFT (Teoría del Funcional de la Densidad) con la base 6-31G(d,p) (Krishnan et al., 1980; McLean y Chandler, 1980), variando el ángulo cada 10 °. Los cálculos de DFT fueron realizados utilizando el funcional de intercambio híbrido de tres parámetros de Becke (B3) combinado con el funcional de correlación corregida por gradiente de Lee-Yang-Parr (LYP) (Becke, 1992; Lee et al., 1988). Todos los cálculos se realizaron utilizando técnicas de gradiente estándar y criterios de convergencia predeterminados. La naturaleza de los puntos estacionarios se verificó a través de los números de onda de vibracionales calculados a partir de las segundas derivadas analíticas de las energías, sin tener en cuenta las correcciones de energía de punto cero. Se realizó el análisis de los Orbitales Naturales de Enlace (NBO) al nivel de la teoría B3LYP/6-311G(d,p), utilizando el programa NBO 3.1 en el paquete Gaussian 03. Además, se realizó un análisis de la reactividad del Vis en base a la Teoría de Átomos en Moléculas de Bader (AIM) mediante el uso del código AIM2000 (Bader, 1990; Biegler-Konig et al., 2001).

#### 6.3. Resultados

#### 6.3.1 Estructura molecular

Se obtuvo una geometría optimizada para la molécula Vis partiendo de una estructura molecular basada en ángulos y distancias de enlace estándar, y utilizando diferentes conformaciones de prueba obtenidas por modificación del ángulo diedro C12-C8-C25-C26 (Fig. 1). Los cálculos llevaron a dos pares de estructuras equivalentes no simétricas que poseen la misma energía (Tabla 1).



Figura 1. Estructura molecular del confórmero más estable de Vis calculada. Los C están representados en color gris oscuro, los H gris claro, Cl verde, N azul, O rojo y S amarillo.

El cálculo de barrera de la superficie de energía potencial mostró que existen dos pares de conformaciones que son equivalentes entre sí: I/IV and II/III (Fig. 2). La diferencia energética que aparece entre cada par de confórmeros equivalentes es de alrededor de 0,1 kcal/mol, lo que sugiere un intercambio rápido entre ellos (Tabla 1).

Además, la optimización de los confórmeros más estables se realizó aplicando el método B3LYP y la base 6-311G (d,p) establecida dentro del modelo continuo polarizable (IEF-PCM) (Miertuš et al., 1981) para tener en cuenta los efectos del disolvente en el isomerismo rotacional. El solvente utilizado fue el agua ( $\epsilon$ =78). Los parámetros geométricos optimizados (distancias de enlace y ángulos) con diferentes conjuntos de funciones base se enumeran en la Tabla 2. Se

observaron diferencias relativamente pequeñas entre el Vis aislado o en agua para ambos parámetros.

Tabla 1. Energías y diferencias de energía de cuatro confórmeros de Vis al nivel de

Confórmero	Ángulo diedro			ΔE <sup>a,b</sup>	Poblaciones relativas
	C12-C8-C25-C26	C5-N3-C1-C13	C38-S35-C19-C18		
I	-123,6	178,5	88,3	2,08	1,57
II	-40	178,4	89,9	0	52,96
	40	178,3	89,3	0,1	44,23
IV	124	178	88,2	2,22	1,24

la teoría B3LYP/6-31G(d).

 $^{a}\Delta E = (E_{I} - E_{(II,III,IV)}); ^{b}\Delta E en kcal/mol$ 



Figura 2. Energía potencial para diferentes confórmeros del ángulo diedro C12-C8-C25-C26 calculado al nivel de la teoría B3LYP/6-31G(d,p).

El grupo sulfona de dos confórmeros de Vis asimétricos (grupo puntual C1), estables y estructuralmente equivalentes presenta una conformación *gauche* con un ángulo diedro C-S-O-C de aproximadamente 89°. El grupo sulfóxido fue el más afectado por la solvatación. La distancia S=O aumentó con la solvatación mientras que el enlace S-CH<sub>3</sub> se acortó. Este efecto también se observó en la disminución del ángulo O=S=O y el aumento en el ángulo C-S-C.

Vis presenta un enlace intramolecular entre el átomo de oxígeno del grupo carbonilo y un átomo de hidrógeno del anillo B, con una distancia O --- HC de

2,229/2,231 Å y un ángulo de 119/118,6º para la molécula aislada y en solución acuosa respectivamente.

Distancias (Å)	Aislado	Agua
S=O	1,464	1,471
S-CH <sub>3</sub>	1,808	1,799
S-Canillo	1,811	1,807
C=CanilloA	1,395	1,390
CanilloA-CI	1,749	1,755
CanilloA-C(O)	1,515	1,513
C=0	1,214	1,220
C(O)-N	1,373	1,367
N-CanilloB	1,413	1,411
C=CanilloB	1,400	1,400
CanilloB-CI	1,765	1,768
CanilloB-CanilloP	1,493	1,493
N-CanilloP	1,343	1,342
C-NanilloP	1,333	1,337
C-CanilloP	1,394	1,392
O — H-CanilloB	2,229	2,231
Ángulos (°)		
0=S=0	121,5	119,1
C-S-C	103,4	104,4
S-C-C	119,3	119,4
O=C-N	125,4	125,3
O—H-CanilloB	119,0	118,6
N-C-CanilloA	113	113,4
C(O)-N-CanilloB	128,6	128,6
CanilloB-C-NanilloP	115,4	115,7

Tabla 2. Distancias de enlace y ángulos seleccionados del Vis calculados al nivel de la teoría B3LYP/6-311G(d,p).

#### 6.3.2 Análisis NBO

El rol de las interacciones hiperconjugativas en la estabilización de los confórmeros de Vis fue evaluado mediante el análisis de NBO, donde la hiperconjugación representa la transferencia de un electrón entre un par libre o un orbital enlazante y un orbital antienlazante. La Tabla 3 presenta las principales interacciones hiperconjugativas para el Vis aislado y en solución acuosa.

En términos del análisis de NBO, en la mayoría de las deslocalizaciones, el efecto de hiperconjugación disminuyó con la solvatación, excepto en la interacción de los pares libres del N con los orbitales antienlazantes del C=O y C-C<sub>anilloB</sub>. Siendo esta última la de mayor deslocalización. Con respecto al grupo amida, esta interacción influye significativamente en el comportamiento del enlace C-N, aumentando la población del orbital antienlazante  $\sigma^*$  con la solvatación, y esto se evidencia en una mayor distancia de enlace. Mientras que, con la solvatación, la interacción de los pares libres del O del grupo C=O se da con el orbital  $\sigma^*$  C-N. Además, los pares libres del átomo de O del grupo sulfona transfieren carga electrónica al orbital  $\sigma^*$  antienlazante virtualmente vacío de los enlaces C-S y C-C<sub>anilloA</sub>. Esta interacción es responsable de la conformación *gauche* del grupo SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> con respecto al anillo A.

Tabla 3. Algunas interacciones hiperconjugativas (kcal/mol) de los NBO para Vis basadas en B3LYP/6-311G(d,p). \*n representa los pares libres del átomo. Ver numeración en Fig. 1.

			Aislado	Agua
nσO(2)	$\rightarrow$	σ*C(1)-N(3)	2,32	2,31
nσO(2)	$\rightarrow$	σ*C(1)-C(13)	2,13	2,10
nπO(2)	$\rightarrow$	σ*C(1)-N(3)	24,77	24,03
nπO(2)	$\rightarrow$	σ*C(1)-C(13)	20,56	20,07
nπO(2)	$\rightarrow$	σ*C(7)-H(11)	0,96	0,93
nπO(2)	$\rightarrow$	π*C(13)-C(14)	0,80	0,77
nσN(3)	$\rightarrow$	σ*C(1)-O(2)	1,46	1,45
nσN(3)	$\rightarrow$	π*C(1)-O(2)	47,30	48,84
nσN(3)	$\rightarrow$	π*C(5)-C(6)	30,50	30,78

nσCl(22)	$\rightarrow$	σ*C(13)-C(15)	1,91	1,84
nσCl(22)	$\rightarrow$	σ*C(15)-C(18)	1,54	1,52
nπCl(22)	$\rightarrow$	σ*C(13)-C(15)	5,01	5,04
nπCl(22)	$\rightarrow$	σ*C(15)-C(18)	4,30	4,10
nπCl(22)	$\rightarrow$	π*C(15)-C(18)	13,37	13,12
noCl(24)	$\rightarrow$	σ*C(8)-C(12)	1,92	1,86
noCl(24)	$\rightarrow$	σ*C(10)-C(12)	1,33	1,35
nπCl(24)	$\rightarrow$	σ*C(8)-C(12)	4,74	4,70
nπCl(24)	$\rightarrow$	σC(10)-C(12)	3,78	3,79
nπCl(24)	$\rightarrow$	π*C(8)-C(12)	11,87	11,78
nσN(34)	$\rightarrow$	σ*C(8)-C(25)	2,30	2,23
nσN(34)	$\rightarrow$	σ*C(25)-C(26)	9,95	10,05
nσN(34)	$\rightarrow$	σ*C(27)-C(30)	9,14	9,06
nσN(34)	$\rightarrow$	σ*C(27)-H(31)	4,57	4,46
nσO(36)	$\rightarrow$	σ*C(19)-S(35)	0,70	0,71
nσO(36)	$\rightarrow$	σ*S(35)-O(37)	1,34	1,05
nσO(36)	$\rightarrow$	σ*S(35)-C(38)	0,70	0,76
nπO(36)	$\rightarrow$	σ*C(19)-S(35)	19,01	18,59
nπO(36)	$\rightarrow$	σ*S(35)-C(38)	18,63	18,20
nπO(36)	$\rightarrow$	σ*S(35)-O(37)	21,23	20,69
nσO(37)	$\rightarrow$	σ*C(19)-S(35)	0,71	0,71
nσO(37)	$\rightarrow$	σ*S(35)-O(36)	1,35	1,05
nσO(37)	$\rightarrow$	σ*S(35)-C(38)	0,70	0,76
nπO(37)	$\rightarrow$	σ*C(19)-S(35)	19,18	18,80
nπO(37)	$\rightarrow$	σ*S(35)-C(38)	18,67	18,25
nπO(37)	$\rightarrow$	σ*S(35)-O(36)	21,31	20,73
Total			329,02	326,48

#### 6.3.3 Análisis AIM

La teoría cuántica de los átomos en moléculas (AIM) ha demostrado repetidamente ser útil para la caracterización de enlaces a través del análisis topológico de la densidad de carga electrónica  $-\rho(r_c)$ – y la función Laplaciana de la densidad  $-\nabla^2 \rho(r_c)$ – en los puntos críticos de enlace (PCE) (Bader, 1990). A su vez esta última proporciona una aproximación de la densidad electrónica local y de las relaciones entre las curvaturas de densidad perpendicular y paralela en el PCE (|  $\lambda 1 | / \lambda 3$ ) (Koch y Popelier, 1995).

La Figura 3 contiene los gráficos moleculares donde se muestran las trayectorias de enlace y la densidad electrónica para la molécula de Vis aislada. La Tabla 4 presenta los datos de PCE.



Figura 3. (a) Gráfico topológico para Vis donde se muestran las trayectorias de enlace y los anillos (líneas continuas que unen átomos adyacentes y también a aquellos involucrados en interacciones de enlace de hidrógeno). También se indican los puntos críticos de enlace (pequeñas esferas rojas ubicadas dentro de las trayectorias) y de anillo (pequeñas esferas de color amarillo ubicadas dentro de los anillos y pseudo-anillos). (b) Mapa de contorno del Laplaciano donde Vis presenta la misma orientación que en (a). Los átomos que se encuentran en el mismo plano aparecen como círculos verdes.

Los valores de  $\rho(r_c)$ ,  $\nabla^2 \rho(r_c)$ , y  $|\lambda 1|/\lambda 3 > 1$  para los enlaces C-C y C-N son típicos de interacciones covalentes. El valor de la densidad de carga en el PCE es relativamente alto y la función Laplaciana arroja un valor negativo, lo que indica que la densidad de carga está concentrada en la región internuclear. Mientras que el enlace C-S está ligeramente más polarizado y es por eso que el valor de  $|\lambda 1|/\lambda 3$  es menor.

El valor de la densidad de carga en el PCE C-CI es igual para molécula aislada y solvatada, y la función Laplaciana es negativa. El valor de  $\rho(r_c)$  en el PCE del C–CI es intermedio entre los valores propios de interacciones covalentes, como

el de los enlaces C-C y C-N antes mencionados, y los de una interacción en una capa cerrada (interacción iónica). Por lo tanto, el enlace C-Cl consiste en una interacción relativamente débil.

Enlace	ρ(r <sub>c</sub> )		∇²ρ(r <sub>c</sub> )		λ1 /λ3	
	Aislado	Agua	Aislado	Agua	Aislado	Agua
C-CanilloA <sup>a</sup>	0,308	0,308	-0,849	-0,849	1,993	1,989
C-CanilloB <sup>a</sup>	0,307	0,308	-0,848	-0,849	1,869	1,996
C-CanilloP <sup>a</sup>	0,310	0,311	-0,872	-0,872	2,004	2,006
C-NanilloP <sup>a</sup>	0,340	0,338	-0,970	-0,972	1,790	1,818
C-Cl <sup>a</sup>	0,193	0,192	-0,270	-0,264	0,926	0,916
N-CanilloB	0,280	0,281	-0,752	-0,752	1,736	1,723
C(O)- N	0,310	0,313	-0,862	-0,868	1,708	1,670
C=O	0,411	0,406	-0,236	-0,284	0,597	0,610
S=O <sup>a</sup>	0,289	0,286	0,890	0,808	0,262	0,271
C-S	0,197	0,199	-0,360	-0,372	1,114	1,139
S-CanilloA	0,197	0,198	-0,365	-0,372	1,156	1,163
CCCanilloA	0,0214	0,022	0,160	0,160	-	-
CCCanilloB	0,021	0,021	0,157	0,156	-	-
CCCanilloP	0,024	0,023	0,176	0,175	-	-
C=OH-CanilloB	0,017	0,017	0,063	0,063	-	-

Tabla 4. Propiedades topológicas locales de la densidad de carga electrónica calculadas al nivel de la teoría B3LYP/6-311++G(d,p). <sup>a</sup> Promedio

Para el grupo carboxilo los valores de  $\rho(r_c)$  y  $\nabla^2 \rho(r_c)$  se encuentran dentro del rango 0,411/0,406 u.a. y -0,236/-0,284 u.a., para el Vis aislado o en solución acuosa respectivamente. Para este tipo de enlace, dichos valores de  $\nabla^2 \rho(r_c)$  son indicativos de una interacción compartida fuerte (Okulik y Jubert, 2005).

El enlace de hidrógeno más importante es el C=O --- H-C intramolecular. La densidad de carga y la función Laplaciana no varían para el Vis aislado o en agua, y se encuentran dentro del rango propuesto por Koch y Popelier (Koch y Popelier, 1995) para interacciones intramoleculares de ese tipo. Además, en todos los PCE que corresponden a interacciones intramoleculares el valor de  $|\lambda 1|/\lambda 3$  es siempre

menor que uno. Este último indicador revela que la contribución de la energía cinética es mayor que la energía potencial en dicho PCE.

#### 6.3.4 Análisis vibracional

La asignación de las bandas experimentales a los 117 modos normales de vibración del Vis se basó en la comparación con los datos de moléculas relacionadas (Contreras Aguilar et al., 2018; Fernandez et al., 2002; Lestard et al., 2012).



Figura 4. Espectros Raman experimentales en la región 1800-1000 cm<sup>-1</sup> de Vis en fase sólida (arriba) y solvatado (debajo). Se asignaron las bandas de los principales grupos químicos.

Las posiciones de bandas observadas en los espectros FT-IR y Raman, junto con los números de onda calculados y las asignaciones aproximadas se resumen en la Tabla 5. La Figura 4 muestra los espectros Raman experimentales de Vis en fase sólida y solvatado.

Experimental		B3LYP/6-311g(d,p) <sup>d</sup>						
IR <sup>a,b</sup>	Ram	nan <sup>a,b,c</sup>		Aisla	ado	Agua		Asig. <sup>f</sup>
Sólido	aislado <sup>b</sup>	Solvatadob		Int. IR <sup>e</sup>	Act. Raman		Act. Raman	
3437 w	-	-	3611	22	22	3601	265	ν(N-H)
1675 vs	1670(29)	1666(15)	1767	250	214	1729	527	v(C=O)
1608 vw	1606(43)	1601(13)	1643	78	272	1639	624	$\nu$ (C=C) <sub>anilloB</sub>
1591 s	1590(95)	1586 (44)	1629	72	161	1626	264	$v(C=C)_{anilloP}$
1583 sh	1582 (73)	1582 (60)	1623	10	160	1624	312	$v(C=C)_{anilloA}$
1563 w	1563(18)	1563(13)	1595	8	10	1593	29	ν(C-N)anilloP
1540 s	1541 (12)	1535(40)	1552	688	418	1553	758	δ(N-H)
1312 s	1313(83)	1313 (100)	1328	151	361	1329	820	$\nu$ (N-C) <sub>anilloB</sub>
1302 sh	1304 sh	1299(41)	1302	140	7	1260	307	vas(S=O)
1258 w	1250(25)	1247(60)	1253	116	138	1250	10	ν(C-N) <sub>C=0</sub>
1152 s	1150(83)	1150(45)	1129	204	44	1118	129	v <sub>s</sub> (S=O)
736 w	735 (13)	732 vw	733	62	15	729	80	ν(C-S)
677 w	678(43)	675(20)	687	19	24	683	37	v(C-CI)

Tabla 5. Asignación de modos vibracionales relevantes experimentales, teóricos y tentativos para Vis.

<sup>a</sup> en cm<sup>-1</sup>

<sup>b</sup> s: fuerte; m: intermedio; w: débil; vw, muy débil; sh: hombro

<sup>c</sup> actividades (Å<sup>4</sup> amu<sup>-1</sup>) entre paréntesis

<sup>d</sup> Frecuencias calculadas para Raman (cm<sup>-1</sup>) y actividades (Å<sup>4</sup> amu<sup>-1</sup>)

e Intensidades IR calculadas (km mol-1)

 ${}^{\rm f}\nu\;y\;\delta$  representan los modos de estiramiento y torsión respectivamente

El estiramiento N-H se observa como una banda muy débil a 3437 cm<sup>-1</sup> en IR (Fig. 5), el cual se atribuyó al N–H unido al átomo de carbono carbonilo, considerando el efecto de extracción de los electrones por parte del átomo de O del carbonilo.

El estiramiento C=O apareció en IR como una banda muy fuerte a 1675 cm<sup>-1</sup> y en Raman a 1670 cm<sup>-1</sup>. Esta banda es sensible a la hidratación, y en entorno acuoso su frecuencia disminuyó 11 cm<sup>-1</sup>. Este comportamiento fue observado tanto en la determinación experimental como en los cálculos teóricos.

Las absorciones localizadas a 1563 y 1258 cm<sup>-1</sup> en IR y Raman, respectivamente, corresponden al estiramiento C-N que está unido al anillo B y al

grupo amida. La diferencia entre las frecuencias observadas de ambos enlaces C-N se atribuye al carácter parcial de doble enlace entre el N-C.

El estiramiento C-S corresponde a las bandas 736 (IR) y 735 (Raman) cm<sup>-1</sup>. La ubicación de esta banda sugiere el carácter único de este enlace (calculado a 733 cm<sup>-1</sup>).

A 677 cm<sup>-1</sup> se localiza una banda débil en el espectro IR y una banda intermedia a 676 cm<sup>-1</sup> en el espectro Raman de la muestra sólida. Las mismas fueron asignadas al modo de estiramiento C-Cl. Esta banda sufre una disminución en la intensidad considerable cuando el Vis se encuentra solvatado en agua.



Figura 5. Espectros de IR experimental (arriba) y calculado mediante B3LYP/6-311G(d,p) para Vis aislado (debajo) en la región de 3000 cm<sup>-1</sup>. Los principales grupos fueron asignados.

#### 6.4 Discusión

Un total de 117 bandas asignables a los modos vibracionales de Vis fueron analizadas en los espectros IR y Raman obtenidos experimentalmente. Los parámetros moleculares optimizados, la conformación y las frecuencias de vibración se calcularon utilizando la teoría B3LYP/6-311G(d,p) en combinación con DFT y el conjunto de funciones base.

Se determinó computacionalmente la conformación más estable para el Vis. La geometría optimizada del Vis mostró la conformación *gauche* como la más estable para el grupo sulfona con respecto al anillo A, lo cual corresponde a una característica estructural generalizada de los sulfonatos covalentes. De hecho, el ángulo diedro C-S-O-C de 89º determinado es cercano al calculado para otras sulfonas estudiadas que también presentan una conformación *gauche* (Lestard et al., 2012; Magnus, 1977; Nájera y Yus, 1999; Simpkins, 1990).

Finalmente, el contacto intramolecular C=O---H-C presente en la molécula, se caracterizó por la teoría NBO y AIM.

Estas predicciones proporcionan información a nivel molecular acerca de posibles sitios de interacción del Vis para optimizar futuras complejaciones e interacciones con nanosistemas de entrega de activos.

#### **Referencias**

Bader, R.F.W., 1990. Atoms in Molecules: A Quantum Theory, Clarendon.

Barakat, M.T., Humke, E.W., Scott, M.P., 2010. Learning from Jekyll to control Hyde: Hedgehog signaling in development and cancer. Trends Mol. Med. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.05.003

Becke, A.D., 1992. Density-functional thermochemistry. I. The effect of the exchange-only gradient correction. J. Chem. Phys. 96, 2155-2160. https://doi.org/10.1063/1.464913

Biegler-Konig, F., Schonbohm, J., Bayles, D., 2001. Software news and updates-AIM2000-A program to analyze and visualize atoms in molecules. J. Comput. Chem. Contreras Aguilar, E., Echeverría, G.A., Piro, O.E., Ulic, S.E., Jios, J.L., Tuttolomondo, M.E., Pérez, H., 2018. Weak and strong hydrogen bonds conducting the supramolecular framework of 1-butyl-3-(1-naphthoyl) thiourea: crystal structure, vibrational studies, DFT methods, Pixel energies and Hirshfeld surface analysis. Mol. Phys. 116, 399-413.

Fernandez, L.E., Ben Altabef, A., Varetti, E.L., 2002. The force constants in the isoelectronic series CF3SO2X (X. J. Mol. Struct. 612, 1-11.

Frisch, M., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, Ga., 2009. Gaussian 09, revision a. 02, gaussian. Inc., Wallingford, CT 200.

Koch, U., Popelier, P.L.A., 1995. Characterization of CHO hydrogen bonds on the basis of the charge density. J. Phys. Chem. 99, 9747-9754.

Krishnan, R., Binkley, J.S., Seeger, R., Pople, J.A., 1980. Self-consistent molecular orbital methods. XX. A basis set for correlated wave functions. J. Chem. Phys. 72, 650-654.

Lee, C., Yang, W., Parr, R.G., 1988. Development of the Colle-Salvetti correlationenergy formula into a functional of the electron density. Phys. Rev. B 37, 785.

Lestard, M.E.D., Ramos, L.A., Tuttolomondo, M.E., Ulic, S.E., Altabef, A. Ben, 2012. Bis (trifluoromethyl) sulfone, CF3SO2CF3: Synthesis, vibrational and conformational properties. Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc. 96, 332-339.

Magnus, P.D., 1977. Recent developments in sulfone chemistry. Tetrahedron 33, 2019-2045. https://doi.org/10.1016/0040-4020(77)80311-6

McLean, A.D., Chandler, G.S., 1980. Contracted Gaussian basis sets for molecular calculations. I. Second row atoms, Z= 11–18. J. Chem. Phys. 72, 5639-5648. https://doi.org/10.1063/1.438980

Miertuš, S., Scrocco, E., Tomasi, J., 1981. Electrostatic interaction of a solute with a continuum. A direct utilization of AB initio molecular potentials for the prevision of solvent effects. Chem. Phys. 55, 117-129. https://doi.org/10.1016/0301-0104(81)85090-2

Nájera, C., Yus, M., 1999. Desulfonylation reactions: recent developments. Tetrahedron 55, 10547-10658. https://doi.org/10.1016/S0040-4020(99)00600-6

Okulik, N., Jubert, A.H., 2005. Theoretical analysis of the reactive sites of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Internet Electron. J. Mol. Des. 4, 17-30.

Sekulic, A., Migden, M.R., Oro, A.E., Dirix, L., Lewis, K.D., Hainsworth, J.D., Solomon, J.A., Yoo, S., Arron, S.T., Friedlander, P.A., Marmur, E., Rudin, C.M., Chang, A.L.S., Low, J.A., Mackey, H.M., Yauch, R.L., Graham, R.A., Reddy, J.C., Hauschild, A., 2012. Efficacy and Safety of Vismodegib in Advanced Basal-Cell Carcinoma. N. Engl. J. Med. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1113713 Simpkins, N.S., 1990. The chemistry of vinyl sulphones. Tetrahedron 46, 6951-

6984. https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)87882-0

## CAPÍTULO 7

## CONCLUSIONES FINALES

Este trabajo comenzó con la propuesta de contribuir al tratamiento del cáncer de piel, desde un enfoque nanomedicinal, mejorando la *performance* de principios activos –que ya estaban siendo utilizados con tal fin– que accederían a los sitios blanco por la vía tópica, disminuyendo efectos colaterales y aumentando su eficacia de acción por medio de toxicidad sitio-específica.

Si bien la investigación sobre la etiología de los diferentes tipos de cáncer y la búsqueda de nuevos tratamientos fueron constantes en los últimos años, para el caso particular del cáncer de piel fueron limitados los avances durante las últimas cuatro décadas, mediante el uso de inmunoterapia, quimioterapia, radioterapia y combinaciones, debido a la reducción de las tasas de respuesta y la baja supervivencia media asociada con perfiles tóxicos significativos. A pesar del aumento de la conciencia pública sobre los efectos nocivos de la exposición al sol (el principal factor de riesgo, aunque no el único), la incidencia y la morbilidad del cáncer de piel siguen aumentando, lo que ha generado un gran interés en desentrañar su etiología y la búsqueda de nuevas estrategias de tratamiento no invasivas.

De acuerdo a los datos más recientes a nivel mundial de la Agencia Internacional de Investigaciones en Cáncer y de la Organización Mundial de la Salud, son los cánceres de piel no melanoma –carcinoma de células escamosas (SCC) y carcinoma de células basales (BCC)– los que presentan las mayores tasas de aparición, aunque presentan tasas de mortalidad semejantes a las del melanoma cutáneo. Pese a esto, el cáncer de piel no melanoma parece estar menos atendido en comparación al melanoma y a otros tipos de cáncer. Esto se evidencia en la dificultad para hallar estadística confiable acerca de las tasas de morbilidad y mortalidad, tanto en Argentina como en muchos otros países del mundo. En Argentina en particular, la recolección de datos sobre el cáncer de piel no melanoma resulta aún ineficiente y dispersa, lo que dificulta obtener datos certeros y fehacientes de las verdaderas tasas de incidencia de esta enfermedad en nuestra población.

Actualmente los tratamientos para los cánceres de piel no melanoma en estadios tempranos consisten principalmente en la escisión quirúrgica, cirugía micrográfica de Mohs, electrodesecación y legrado, o criocirugía. Sin embargo, no sólo estos tratamientos convencionales son invasivos, sino que este tipo de tumores suelen presentarse en zonas de la piel que se encuentran en constante

exposición al sol, como la cara, las orejas, el cuero cabelludo y las manos, por lo que no sólo existe un impacto físico producto del tratamiento, sino también efectos emocionales como consecuencia de la escisión para los pacientes. En algunos casos las lesiones son tan extensas que requieren de injertos de piel y pueden dejar marcas en zonas visibles -con un fuerte impacto psicológico-. Para el caso de tumores avanzados, éstos pueden causar destrucción local, producir deformidad grave y pueden extenderse a áreas próximas, pudiendo de esta forma invadir estructuras vitales como el ojo, nariz, conducto auditivo, etc., y son potencialmente mortales. Hasta el año 2012, cuando se aprobó el Vismodegib (Vis) por parte de la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) de los Estados Unidos, no existía terapia eficaz para el BCC localmente avanzado o metastásico, recidivante o que no podía ser tratado mediante cirugía, y el enfoque terapéutico para estos pacientes estaba representado exclusivamente por la quimioterapia convencional con limitados beneficios. Por otra parte, el 5-fluorouracilo (5-FU), un agente quimioterapéutico utilizado desde hace casi 50 años para diferentes tipos de cáncer, tiene severos efectos secundarios cuando es administrado por vía intravenosa, y su administración tópica está limitada a lesiones de la piel precancerosas, superficiales y localizadas, dada su pobre permeación cutánea.

En vistas de esto, se buscó aportar nuevas alternativas terapéuticas que permitan tratar tumores de la piel no melanoma (tanto en estadios tempranos como más avanzados). Para tal fin se utilizaron herramientas nanotecnológicas que permitieron, en el caso del Vis, cambiar la ruta de administración del fármaco y, para el caso del 5-FU, mejorar su ingreso a estratos más profundos de la piel. En otras palabras, se encapsularon principios activos, cuya eficacia antitumoral contra los cánceres de piel no melanoma estaba comprobada, en un nanosistema de entrega de activos (NEA) para mejorar su *performance*. Se eligió la vía tópica cutánea ya que uno de los principales objetivos era reducir los efectos secundarios severos que ambos principios activos provocan cuando son administrados de forma sistémica, y para llevar a cabo un tratamiento local, sitio-específico, que sea menos invasivo para el paciente. Sin embargo, el acceso a la epidermis viable donde se desarrollan el SCC y BCC está limitado por la barrera del estrato córneo de la piel. Por esa razón se utilizó un tipo particular de NEA, los liposomas ultradeformables (UDL), que son capaces de atravesarlo y transportar activos a la epidermis viable.

Además, los UDL son nanosistemas lipídicos biocompatibles, capaces de encapsular compuestos hidrofílicos, hidrofóbicos o anfifílicos, y que pueden a su vez ser incorporados en matrices de geles para facilitar su aplicación tópica, sin alterar significativamente sus propiedades de penetración cutánea.

Por un lado, se logró incorporar el 5-FU en UDL de alrededor de 70 nm. Si bien la eficiencia de encapsulación fue baja, la incorporación del 5-FU a la nanoformulación incrementó significativamente su llegada a la zona de la epidermis viable de la piel, y su penetración fue mayor en comparación a otros tipos de formulaciones liposomales probadas previamente. Además, este fue el primer trabajo en realizar pruebas de penetración cutánea empleando el Método de Penetración de Saarbrücken (SPM) - siendo el grupo de pertenencia uno de los pocos en el país en utilizarlo- para una nanoformulación con 5-FU. El SPM, acoplado a técnicas tales como el tape stripping, microscopía confocal e histológicas, permite estudiar en detalle el perfil de penetración del activo y de los componentes del nanosistema, evaluando la distribución de los mismos en función de la profundidad de la piel. Otra ventaja del método es que simula condiciones más semejantes a las fisiológicas en comparación a, por ejemplo, las celdas de Franz, y no limita el análisis a si el nanosistema o los activos atravesaron completamente cierta barrera de interés (el estrato córneo o toda la piel –epidermis y dermis- por dar ejemplos).

Los UDL-5FU fueron caracterizados fisicoquímicamente mediante diversas técnicas, revelando que la droga interacciona con la membrana liposomal, lo cual generaría alteraciones en la zona de interfaz agua-lípido al modificar el empaquetamiento de las cabezas polares de los fosfolípidos. Esta interacción modificó la elasticidad de los liposomas, pero en un nivel que no afectó su capacidad para penetrar el estrato córneo de la piel. Por otra parte, si bien el nanosistema presenta una buena estabilidad coloidal en el tiempo, existen indicios de que algunas moléculas de 5-FU podrían quedar adsorbidas en la superficie liposomal, y que la liberación de las mismas, y de las moléculas encapsuladas en el núcleo acuoso del liposoma, es relativamente rápida.

A su vez, la incorporación del 5-FU en UDL incrementó su actividad citotóxica *in vitro*, en particular, en una línea celular humana derivada de melanoma, en la cual indujo una mayor tasa de apoptosis que en la línea inmortalizada de queratinocitos de la piel que no tenía origen tumoral. También se llevó a cabo un intento por co-encapsular el 5-FU con un extracto de arándanos rico en antioxidantes, previamente caracterizado por el grupo de pertenencia, con el fin de mejorar la *performance* del tratamiento con los UDL-5FU. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en cuanto a la citotoxicidad del nanosistema luego de la incorporación del extracto. Sólo se evidenció una ligera inducción de necrosis en una de las líneas celulares estudiadas. Por lo tanto, se decidió no continuar con dicha formulación combinada.

Por último, en las pruebas de toxicidad *in vivo*, se observó que la incorporación del 5-FU en los UDL incrementó su toxicidad en larvas de pez cebra, lo cual podría estar relacionado con la toxicidad inherente a la matriz liposomal y/o porque podrían estar siendo modificadas las vías de internalización, la biodistribución y farmacocinética del principio activo en las larvas.

Por lo tanto, la incorporación del 5-FU en los UDL mejoró su perfil de penetración a través de la piel y su citotoxicidad *in vitro*, por lo que este nanosistema de administración tópica podría ser útil para el tratamiento de lesiones profundas, no solo en etapas tempranas sino también más avanzadas, relacionadas con cánceres de piel no melanoma.

La nanoformulación obtenida con 5-FU podría optimizarse para lograr una mayor retención del principio activo y mejorar la eficiencia de encapsulación, en vistas de un escalado en la producción del mismo. Sin embargo, tal como se presenta no pierde su potencial para ser empleado en terapias personalizadas.

Por otra parte, también se logró incorporar en UDL la droga de última generación Vis. Este es uno de los primeros trabajos que proponen la vía tópica cutánea para la administración de Vis, y el primero en estabilizarlo en un NEA específicamente diseñado para penetrar la barrera impermeable del estrato córneo de la piel, y en probar su penetración cutánea mediante el SPM. La flexibilidad, la elevada eficiencia de encapsulación y la estabilidad a lo largo del tiempo de la nanoformulación obtenida, la convierten en una potencial terapia para la administración tópica de este principio activo, para el tratamiento de lesiones cancerosas en regiones profundas de la piel relacionadas al BCC. Además, la presencia del Vis en la epidermis viable, determinada en los estudios *in vitro* con piel utilizando el SPM, en las dosis requeridas para el tratamiento del BCC luego

de la aplicación tópica no oclusiva de UDL-Vis, refuerza dicho potencial. Esta nueva vía de administración podría reducir los efectos secundarios que se presentan luego de la administración oral, mediante el uso de cantidades menores de droga y la administración sitio-específica en la zona del tumor. Al encapsularlo en este nanosistema se logró reducir unas ~2500 veces la cantidad de droga a administrar en cada aplicación, alcanzando concentraciones de Vis en la epidermis viable alrededor del doble del máximo que se estima llega a la zona del tumor cuando es administrado oralmente. Es en este punto, donde no sólo se pone en juego la mejora en la calidad de vida de los pacientes, desarrollando una terapia no invasiva y que reduce los efectos adversos en órganos y tejidos sanos, sino también la posibilidad de reducir los costos de los tratamientos, al poder administrar cantidades significativamente menores de principio activo para lograr el mismo efecto terapéutico. Sin embargo, los UDL-Vis no serían efectivos en aquellos casos donde el BCC haya hecho metástasis, dada su actividad local en la piel y su incapacidad de alcanzar los sitios hacia donde se extendió el cáncer.

El nanosistema UDL-Vis fue exhaustivamente caracterizado fisicoquímicamente mediante una batería de técnicas diferentes, logrando predecir la interacción del principio activo con la membrana liposomal. Dado que se trata de una droga hidrofóbica, era de esperar que su incorporación en este tipo de NEA se diera en la bicapa lipídica, por lo que existía el riesgo de que afectara a flexibilidad de las vesículas y, como consecuencia, su capacidad de penetración cutánea. Sin embargo, por el contrario, la incorporación del Vis incrementó la flexibilidad de los liposomas, incluso la de liposomas convencionales (no ultradeformables). Este hecho abre la puerta a pensar en potenciales futuras nanoformulaciones liposomales tópicas con Vis sin activador de borde.

La encapsulación del Vis en los UDL, aumentó su *citotoxicidad in vitro* de manera significativa en ambas líneas celulares utilizadas, mientras que disminuyó su toxicidad *in vivo* en las larvas de pez cebra. Tal como se postuló para el caso de los UDL-5FU, la incorporación del activo a un NEA modifica la farmacocinética y biodistribución del mismo en el organismo y, como consecuencia, puede aumentar o disminuir su toxicidad.

Durante el trabajo con el Vis, surgió la necesidad de conocer algunas de sus propiedades moleculares para poder explicar y entender los fenómenos estudiados en el Capítulo 4. Sin embargo, fue poca la información bibliográfica que pudo ser recolectada, por lo que se decidió llevar a cabo un análisis computacional teórico de la estructura molecular del Vis.

Por último, los estudios realizados en el marco de esta tesis doctoral, junto con el trabajo de Bucci et al., 2017 (también del grupo de pertenencia), fueron los primeros en estudiar la toxicidad de formulaciones del tipo UDL y del Vis en el modelo intermedio de estudios in vivo pez cebra (Danio rerio). Por lo que se aportó nueva información al estado del arte sobre los efectos toxicológicos de un tipo particular de nanoformulación en el pez cebra, un modelo en crecimiento y cada vez más aceptado para determinaciones de nanotoxicidad previas a las pruebas en modelos mamíferos, dada su capacidad de predicción de efectos no deseados. Esta información resulta relevante no sólo para generar nuevo conocimiento, sino también para ir robusteciendo al modelo e ir alcanzando una estandarización de las determinaciones que se realizan, dado que, hasta el momento, resulta dificultoso el poder llevar a cabo comparaciones entre estudios dadas las diferentes condiciones de prueba y variables puestas en juego. Como el pez cebra permite realizar las pruebas en un breve período de tiempo y con un elevado número de individuos, allana el camino hacia las subsiguientes pruebas in vivo en modelos murinos, en este caso, con carcinoma basal o escamoso.

#### Perspectivas a futuro

Las perspectivas a mediano-largo plazo, en relación a las nanoformulaciones obtenidas a partir de este trabajo, son acoplar los nanosistemas obtenidos a hidrogeles que liberen moduladamente los mismos para obtener formulaciones de producto final para aplicación tópica, y estudiar su actividad antitumoral *in vivo* en un modelo murino con carcinoma de células escamosas y/o basales. Para ello hemos iniciado contactos con un grupo experto en el área con vistas a poner a punto el modelo murino.

En el caso particular de la formulación con 5-fluorouracilo, sería interesante continuar explorando y optimizando el sistema para aumentar la eficiencia de encapsulación del principio activo, en vistas de un proceso de producción escalable.

A corto y mediano plazo estaremos trabajando en un pedido de patente y en la escritura de un cuarto artículo científico a partir de esta tesis. Nos encontramos, además, en la redacción de dos artículos de colaboraciones, que se estima, serán enviados este año; uno de ellos estudia las diferencias en el comportamiento reológico de liposomas conformados a partir de diferentes composiciones lipídicas, y un segundo en el que se caracteriza y se llevan a cabo estudios de toxicidad *in vitro* e *in vivo* de nanopartículas de oro recubiertas con BSA.

Por otro lado, dado que las frecuencias Raman características del Vismodegib fueron identificadas, estamos poniendo a punto, como parte del Seminario de Investigación de la estudiante Gisela Gómez (Licenciatura en Biotecnología, UNQ), a quien co-dirijo, la detección directa del principio activo mediante espectroscopía Raman a partir de las cintas del *tape stripping* de los ensayos *in vitro* en piel. Este trabajo ha dado lugar a dos presentaciones en congresos (uno nacional y otro internacional) durante el año 2018, y a la publicación del *proceeding* "Raman spectroscopy study of a topical penetration of a new generation skin cancer antineoplastic drug", MN Calienni, J Montanari, ME Tuttolomondo, G Gomez, S Alonso, FC Alvira.en la Latin America Optics and Photonics Conference (2018). DOI: 10.1364/LAOP.2018.Tu3C.5. Está previsto enviar un artículo para su evaluación a una revista científica con referato hacia finales del 2019-principios de 2020.

Además, continuamos trabajando con el principio activo Vismodegib, encapsulándolo en otros nanosistemas de delivery para diversas vías de administración: dendrímeros, etosomas, cubosomas y micelas mixtas. En todos los casos se ha logrado incorporar el principio activo y se llevaron a cabo pruebas de penetración en piel (incluso para aquellos en los que la vía tópica no había sido estudiada antes). Actualmente, el estudiante David Ybarra se encuentra trabajando en la puesta a punto y caracterización de complejos entre dendrímeros PAMAM generación 4 y 4.5 con Vismodegib, como parte de su Seminario de Investigación, habiendo obtenido hasta el momento resultados sumamente prometedores en cuanto a eficiencia de encapsulación y penetración cutánea. Con él se prevé publicar dichos resultados durante el 2020. En cuanto a la encapsulación del Vismodegib en micelas mixtas, estamos realizando una colaboración científica con el Dr. Diego Chiappetta de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA, ya que ellos cuentan con vasta experiencia de trabajo con este tipo de micelas. En paralelo estamos probando en nuestro laboratorio la toxicidad de micelas mixtas con paclitaxel obtenidas por su grupo en el modelo de pez cebra. Se estima que el artículo que incluye estos últimos resultados sea enviado antes de finales del 2019 a una revista para su evaluación.

Por otra parte, continuaré co-dirigiendo a la estudiante Cecilia Izquierdo en su Seminario de Investigación, el cual consiste en el estudio de la penetración cutánea de liposomas ultradeformables incorporados en diferentes vehículos cosméticos. Hasta el momento hemos presentado el trabajo en un congreso nacional y se espera, también en el mediano plazo, publicar dichos resultados.

En cuanto a lo personal, continuaré formando parte del grupo de investigación con una línea que consiste en la obtención y caracterización de nanosistemas híbridos para el transporte tópico de principios activos y/o efectores con fines teranósticos contra tumores de la piel.

#### Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres, quienes me acompañan y apoyan incondicionalmente en cada aventura en la que me adentro, quienes me dan fuerza y me inspiran a dar cada paso con su ejemplo de amor y perseverancia. Son ellos a quienes debo todo, lo que soy y lo que tengo, sin ellos nada hubiera sido igual. Los sacrificios que han hecho para que pudiera estudiar y para que pueda cumplir tanto mis objetivos como mis sueños, para mi resultan inmensurables, y es por ello que gran parte de este trabajo les pertenece también a ellos.

A mi familia, por estar en vela siempre, por ser mi sostén y apoyo en cada momento de mi vida, en los buenos y en los malos.

También quiero agradecer enormemente a mi director Jorge Montanari y a mi co-directora Silvia Alonso, quienes en todo momento me apoyaron y creyeron en mí. Buscaron siempre sacar lo mejor de mí, y por sobre todo me han enseñado tanto, en lo científico y en lo personal. Gracias por todas las oportunidades que me han dado para crecer y aprender, por escucharme y abrazarme en los momentos difíciles, por aconsejarme, dedicarme tiempo, compartir sus recursos, y por potenciarme siempre. Estaré infinitamente agradecida por todo lo que me han dado en todos estos años juntos. Gracias Silvia por abrirme las puertas de tu laboratorio y hacerme parte de tu grupo desde hace ya siete años.

No quiero dejar de agradecer a la Universidad Nacional de Quilmes, mi amada casa de estudios, y mi segundo hogar, desde hace ya diez años, la cual me ha abierto sus puertas, me ha formado como profesional y me ha permitido ser primera generación de graduado universitario en mi familia. Quizás, de no haber existido una universidad cerca de mi casa, pública y de calidad, este sueño no se hubiera cumplido. Tampoco quiero dejar de agradecer al CONICET por haberme dado una beca para que pudiera llevar a cabo este doctorado.

Agradezco a mis amigos, a quienes he desatendido un poco en este tiempo, en el que la pasión por lo que hacía me ha llevado a ocupar fines de semana, días y noches, y dispuse de poco tiempo para compartir con ellos. Sin embargo, estuvieron siempre presentes. No importó la distancia ni el tiempo juntos, como verdaderos amigos que son me han sabido comprender y me han apoyado siempre. A medida que fuimos creciendo tomamos caminos diversos, pese a ello, seguimos
más unidos que nunca. Gracias por escuchar mis audios larguísimos, mis preocupaciones, mis tristezas, y por haber estado en los momentos de felicidad y compartido mis alegrías; por haber compartido también conmigo sus problemas y buenas noticias. Sin su compañía todo hubiera sido mucho más difícil.

Un agradecimiento particular para toda la gente hermosa que fui conociendo estos últimos años en la Universidad, en el Laboratorio de Bio-Nanotecnología, en Italia, en el INQUINOA, en cursos y congresos. Muchos, incluso sin conocerme, me han ayudado y me han brindado su confianza y cariño. No sólo he cosechado hermosas amistades, sino que me he topado con personas maravillosas que quisiera tener siempre cerca mío. En particular, mis psicólogos y sostén diario Pame y Rami, a quienes quiero muchísimo y jamás olvidaré todo lo que hicieron y hacen por mí en lo personal y en lo profesional. A Ceci, Dani M., Gise, David y Sofi, quienes me han sacado risas incluso en los días más tristes y difíciles; sus mates, compañía y amistad son para mi invalorables.

Por último, gracias a todos aquellos que han puesto piedras en mi camino, porque gracias a ellos también estoy acá, hoy y ahora, y soy lo que soy. Me han enseñado muchísimo, me han dejado en claro lo que pretendo ser, me han fortalecido y me han ayudado a tener mis metas y objetivos más claros que nunca.

## <u>Notas</u>