



**Universidad Nacional Autónoma de
México**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE
NANOPARTÍCULAS SÓLIDAS LIPÍDICAS CON
DOXORRUBICINA ENCAPSULADA, PARA EL
TRATAMIENTO DE METÁSTASIS PULMONAR
DERIVADA DE CÁNCER DE MAMA EN UN MODELO IN
VIVO”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

HUGO GARDUÑO LARA



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX.

2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dr. José Luis Balderas López
VOCAL: Dra. Viridiana Gisela Llera Rojas
SECRETARIO: Dra. Monserrat Llaguno Munive.
1^{er} SUPLENTE: Dra. Berenice Ovalle Magallanes
2^{do} SUPLENTE: M. Rosa Jenifer Muñoz Gómez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

El presente trabajo fue realizado en los laboratorios de investigación de Farmacología y Física Médica del Instituto Nacional de Cancerología. El proyecto fue financiado por CONAHCYT con el número **CF-2023-I-2075**.

SUSTENTANTE:
Hugo Garduño Lara

ASESOR DEL TEMA:
Dra. Monserrat Llaguno Munive



AGRADECIMIENTOS



*A mi asesora la Dra. **Monserrat Llaguno Munive**, por compartirme todo su conocimiento y mostrarme todo lo bello que ofrece el mundo de la investigación. Gracias por guiarme durante esta etapa de mi vida, por todo el tiempo invertido en mí y sobre todo, por siempre dejarme ser libre, ser siempre yo.*

A mis padres, por siempre apoyarme en mis sueños y siempre estar para mí cuando los necesito. Gracias por criarme, formarme y hacer de mí el ser que soy ahora, todos mis triunfos siempre serán por y para ustedes.

A mi familia, por ser mi soporte en cada uno de mis proyectos y metas. Gracias por siempre inspirarme a ser mejor cada día y celebrar conmigo mis logros.

*A mis hermanos, **Erick y Christian**, por inspirarme y motivarme a ser siempre el mejor.*

A mis abuelos, por apoyarme a lograr mis sueños y darme todas las armas para conseguir todo lo que me propongo, son mi motor en esta vida y esto indudablemente es por ustedes.

*A mis gatos, **Mixio, Milo & Lila**; por acompañarme en mis noches de desvelo y darme su amor en los días más difíciles. Gracias por ser mi luz y alegría en esta vida.*

*A mis amigas, **Monserrat, Camila, Daniela, Ilse, Miri y Bibiana** por tantos años de amistad y cariño. Gracias por siempre estar para mí en los momentos más difíciles y por siempre acompañarme en mis triunfos.*

*A mis amigas, **Brenda, Verónica, Aurora, Majo e Ingrid**: por siempre confiar en mí y por siempre darme su cariño y apoyo en los momentos más difíciles de mi etapa universitaria. Gracias por su lealtad, amistad y cariño.*

*A mi amiga **Jessica Salas**, por ser mi cómplice en esta etapa tan maravillosa. Gracias por tu apoyo, por las risas y por siempre cuidar de mí en el laboratorio, sin ti esta etapa no hubiese sido tan increíble como lo fue.*

*A mis profesoras, **M. Christy, M. Cecilia y Dra. Liliana**; por ser mujeres que me inspiran como profesional farmacéutico. Gracias a ustedes conocí la Farmacovigilancia y la atención farmacéutica, áreas de la química de las que me enamoré y ahora soy parte. Las admiro infinitamente.*

*A la Dra. **Patricia García**, por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de pertenecer a una institución como el Instituto Nacional de Cancerología. Gracias por su confianza y por todo el conocimiento que compartió conmigo.*

*A mis colegas de los laboratorios de **Farmacología y Física Médica, Wendy, Alexis, Marlene, Rafa, Lulu, Josefina e Itzel**; porque sin ustedes esta travesía no hubiera sido así de mágica y especial. Gracias por cada una de las vivencias compartidas y por coincidir en esta etapa tan importante, hicieron del INCAN mi lugar feliz.*

Al Dr. Omar Muñoz, por todos los consejos, vivencias y conocimientos que me compartió, sin duda alguna es una de las personas más increíbles que pude conocer en el INCAN.

A mis ratonas, quienes me prestaron su vida para generar nuevo conocimiento científico y aprender sobre el funcionamiento in vivo del tratamiento farmacológico desarrollado en este escrito. No tengo como agradecerles, sólo puedo externar que su vida tubo un valor muy significativo para mí y culminar este escrito es mi manera de honrarlas.

A mí, por llegar a este punto de la vida y haber cumplido un sueño más. Gracias por nunca rendirte y ser siempre fiel a tus ideales y convicciones. Siempre siéntete orgulloso de quién eres y creé en el potencial tan grande que las personas ven en ti, pero si algún día se te olvida, regresa con las personas en las que has dejado huella porque serán ellas quienes te harán recordarlo.

A Abbá Dios, por permitirme vivir grandes experiencias, poniéndome en los lugares correctos con las personas correctas. Gracias por siempre llenarme de bendiciones.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Agradecimientos	I
Lista de Abreviaturas	III
Introducción	IV
1. Marco Teórico	1
1.1 <i>Cáncer de mama</i> 	1
1.1.1 <i>Clasificación molecular del cáncer de mama</i>	2
1.1.2 <i>Desarrollo de metástasis en cáncer de mama</i>	3
1.2 <i>Cáncer de Mama Triple Negativo</i> 	4
1.2.1 <i>Abordaje terapéutico del Cáncer de Mama Triple Negativo</i>	5
1.2.1.1 <i>Doxorrubicina</i>	7
1.2.1.2 <i>Mecanismos de acción antitumoral de Doxorrubicina</i>	7
1.3 <i>Nanopartículas sólidas lipídicas</i> 	9
1.3.1 <i>Estructura y características de las NSL</i>	9
1.3.2 <i>Caracterización fisicoquímica de las NSL</i>	11
1.3.3 <i>NSL catiónicas</i>	12
1.3.4 <i>Ventajas y desventajas de las NSL como DDS</i>	13
1.3.5 <i>Estado actual de los nanosistemas en el ámbito clínico</i>	14
2. Planteamiento del Problema	15
3. Hipótesis	16
4. Objetivos	16
4.1. <i>Objetivo General</i>	16
4.2. <i>Objetivos Particulares</i>	16
5. Métodos y Materiales	17
5.1 <i>Reactivos y materiales</i>	17
5.2 <i>Elaboración de NSL cargadas con doxorrubicina.</i>	17
5.3 <i>Caracterización de formulaciones de NSL</i>	18
5.3.1 <i>Análisis macroscópico de las nanoformulaciones</i>	18

5.3.2	<i>Determinación del TP, índice de polidispersión y PZ.....</i>	18
5.3.3	<i>Determinación de la eficiencia de encapsulación.....</i>	19
5.4	<i>Ensayo de hemo-compatibilidad.....</i>	19
5.5	<i>Línea celular</i>	19
5.6	<i>Animales de experimentación</i>	20
5.7	<i>Modelo ortotópico de cáncer de mama en ratones NOD/SCID</i>	20
5.8	<i>Tratamientos</i>	20
5.9.	<i>Evaluación de metástasis pulmonar.....</i>	21
5.9.1	<i>Obtención de imágenes NIRF de los pulmones ex vivo.....</i>	21
5.9.2.	<i>Análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia.....</i>	21
5.9.3	<i>Estudios Histológicos.....</i>	21
5.10	<i>Análisis estadístico.....</i>	21
6.	Resultados	22
6.1	<i>Caracterización Físicoquímica de formulaciones de NSL.....</i>	22
6.2	<i>Ensayo de Hemo-Compatibilidad.....</i>	23
6.3	<i>Implementación del Modelo ortotópico de cáncer de mama en ratones NOD/SCID.....</i>	24
6.4	<i>Evaluación de la actividad farmacológica de Dox-NSL sobre el crecimiento tumoral.....</i>	25
6.5	<i>Evaluación del peso corporal en los animales NOD/SCID durante los tratamientos.....</i>	26
6.6	<i>Evaluación de la actividad farmacológica de Dox-NSL sobre la metástasis pulmonar.....</i>	27
7.	Discusión	30
8.	Conclusión	39
9.	Fuentes de Consulta	39

LISTADO DE ABREVIATURAS

NSL	Nanopartículas Sólidas Lipídicas
MDR	Resistencia a Múltiples Fármacos
DDS	Sistema de administración de fármacos
IARC	Agencia Internacional de Investigación del Cáncer
RE	Receptores de estrógeno
RP	Receptores de progesterona
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
RH-	Receptores hormonales negativos
CMM	Cáncer de mama metastásico
CMTN	Cáncer de mama triple negativo
SNC	Sistema nervioso central
ADN	Ácido desoxirribonucleico
INC	Instituto Nacional del Cáncer
TOP2	Topoisomerasa II
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
TP	Tamaño de Partícula
PZ	Potencial Z
cNSL	Nanopartículas Sólidas Lipídicas catiónicas
DDAB	Bromuro de dimetildioctadecilamonio
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
DOTAP	1,2-dioleil-3-(trimetilamonio) propano
Dox-NSL	Doxorrubicina encapsulada en Nanopartículas sólidas Lipídicas
Dox	Doxorrubicina Libre

PDI	Índice de polidispersión
NIRF	Imágenes cercanas al infrarrojo
DOX	Doxorrubicina
AE	Ácido esteárico
DOX·HCl	Clorhidrato de Doxorrubicina
COMPRITOL	Compritol® 888 ATO
F127	Pluronic® F127
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
ROI	Región óptica de interés
H&E	Hematoxilina & Eosina
ANOVA	Análisis de Varianza
PBS	Solución buffer de fosfato
RGD	Arginina-Glicina-Ácido aspártico
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
NLL	Nanopartículas líquidas lipídicas
DMSO	Dimetilsulfóxido

INTRODUCCIÓN

El cáncer representa un problema de salud de alta relevancia a nivel mundial, debido a que las tasas de morbilidad y mortalidad atribuidas a tumores malignos son cifras en continuo crecimiento. Tan sólo en el 2020, la IARC (Agencia Internacional para la Investigación del cáncer) reportó casi 10 millones de muertes causadas por cáncer alrededor de todo el mundo. Una cifra alta pese a todos los esfuerzos por parte de las instituciones de salud para prevenir, diagnosticar y dar un tratamiento oportuno.

Siendo el cáncer de mama una de las neoplasias malignas de mayor relevancia, ya que de todos los tipos de cáncer ocupa el primer lugar de incidencia tanto en México como a nivel mundial. En México, durante el 2020 se reportó una incidencia del cáncer de mama del 15.3 % y una mortalidad del 8.8%.

Con la finalidad de disminuir estas cifras, actualmente la industria farmacéutica y la medicina moderna han avanzado mucho en el diseño y desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos, así como en la optimización de los esquemas terapéuticos para el tratamiento de cáncer de mama, tanto para etapas tempranas como para etapas metastásicas.

Lamentablemente, en muchos de los pacientes la farmacoterapia con antineoplásicos fracasa debido a la adquisición de la resistencia a múltiples fármacos, convirtiendo a pacientes que inicialmente respondían a la quimioterapia en pacientes resistentes a la misma. En algunos de los casos, se han empleado estrategias para revertir o disminuir la resistencia, como lo son el ajuste de dosis o el cambio en el intervalo de dosificación, así como la combinación del tratamiento estándar (Paclitxel/Doxorrubicina) con otros agentes antineoplásicos, sin embargo, la resistencia persiste o reaparece a pesar de las estrategias utilizadas.

Esta problemática ha estimulado el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, los sistemas de administración de Fármacos (Por sus siglas en inglés DDS: Drug Delivery Systems), han sido una estrategia prometedora durante los últimos años, estos sistemas han permitido mejorar los efectos terapéuticos de moléculas ya eficientes para tratar todo tipo de enfermedades.

En el caso particular del cáncer, las nanopartículas sólidas lipídicas (NSL) han surgido como una estrategia prometedora. Las NSL están constituidas por una matriz sólida de lípidos que permite una liberación controlada de los fármacos, manteniendo así concentraciones del fármaco por periodos más prolongados y permitiendo la entrega de los agentes antineoplásicos hasta la vecindad del microambiente tumoral, superando de esta forma las barreras fisiológicas que dificultan la administración de fármacos a los tumores y también evadiendo algunos de los mecanismos de resistencia de fármacos. Sumado a esto, las NSL han demostrado ser más seguras, más estables y baratas de producir en comparación con otros nanosistemas, además de ser biocompatibles con el medio ambiente, por lo que las NSL pueden ser una estrategia prometedora para el tratamiento del cáncer.

Partiendo de estos antecedentes, este proyecto tuvo como objetivo encapsular el fármaco Doxorubicina en un nanosistema de nanopartículas sólidas lipídicas y evaluar su actividad farmacológica en un modelo ortotópico de cáncer de mama con metástasis a pulmón, todo esto con la finalidad de buscar nuevas estrategias terapéuticas.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 | Cáncer de Mama |

El cáncer de mama sigue siendo un problema de salud que prevalece en todo el mundo y esto se ve reflejado en sus tasas de incidencia y mortalidad, las cuales siguen en continuo crecimiento año con año a pesar de los avances y esfuerzos para su prevención, diagnóstico y tratamiento oportuno. Tan sólo en el 2020, los datos emitidos por la IARC indicaron que el cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente a nivel mundial representando el 11.7% de todos los casos nuevos de cáncer diagnosticados en ese año, superando incluso las cifras de otras neoplasias malignas como el cáncer de pulmón, cáncer de colon y cáncer de próstata (IARC, 2020).

Aunado a esto, es importante destacar que aun cuando este tipo de cáncer se presenta tanto a mujeres como en hombres, la población femenina sigue siendo la más afectada. El cáncer de mama se ha convertido en la causa número uno de muerte en las mujeres a nivel mundial, registrando un total de 2 261 419 muertes a causa de esta enfermedad en 2020 (IARC 2020, Akram 2020).

Si bien estas cifras ponen al cáncer de mama como una enfermedad potencialmente mortal para las mujeres, las tasas de supervivencia de este tipo de cáncer son muy diferentes entre cada país, mostrando de manera general que en los países desarrollados la tasa de supervivencia estimada a los 5 años oscila en un 80%, mientras que en los países en desarrollo está por debajo del 40% (Coleman, 2008). Esto se debe a que los países en desarrollo presentan limitaciones tanto en recursos económicos como en infraestructura para atender la enfermedad (Anderson, 2020).

Sumado a esto, el abordaje terapéutico del cáncer de mama enfrenta dos desafíos que ponen en riesgo la efectividad de los tratamientos estándar utilizados actualmente en la clínica, uno de ellos es el diagnóstico en etapas muy avanzadas de la enfermedad, dejando a los pacientes en estadio metastásico con pocas alternativas terapéuticas para eliminar a las células cancerosas. El segundo es la quimio resistencia adquirida a los antineoplásicos, la cual convierte a pacientes que inicialmente respondían a la quimioterapia en pacientes insensibles a la misma (Astudillo, 2010). Lo cual genera la necesidad de investigar y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que nos ayuden a combatir esta enfermedad tan compleja.

En el caso particular de México, el cáncer de mama es una de las neoplasias malignas más comunes que afectan a las mujeres, ocupando el primer lugar de incidencia en nuestro país y representando el 15.3% de todos los casos de cáncer reportados. Sin embargo, durante los últimos años el porcentaje de mortalidad por cáncer mamario en nuestro país se ha incrementado, representando en el 2020 el 8.8% de las muertes causadas por cáncer (IARC, 2020).

1.1.1| Clasificación molecular del cáncer de mama |

Los avances de la biología molecular y la secuenciación del genoma humano han permitido desarrollar una clasificación molecular que ha permitido conocer de manera más precisa la heterogeneidad de la enfermedad. Esta clasificación agrupa a los tumores en función de la expresión génica de los receptores de estrógeno (RE), los receptores de progesterona (RP), el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y el marcador de proliferación Ki67. De esta forma el cáncer de mama se puede clasificar en cuatro subtipos, el siguiente esquema resume las características principales de cada uno de estos:

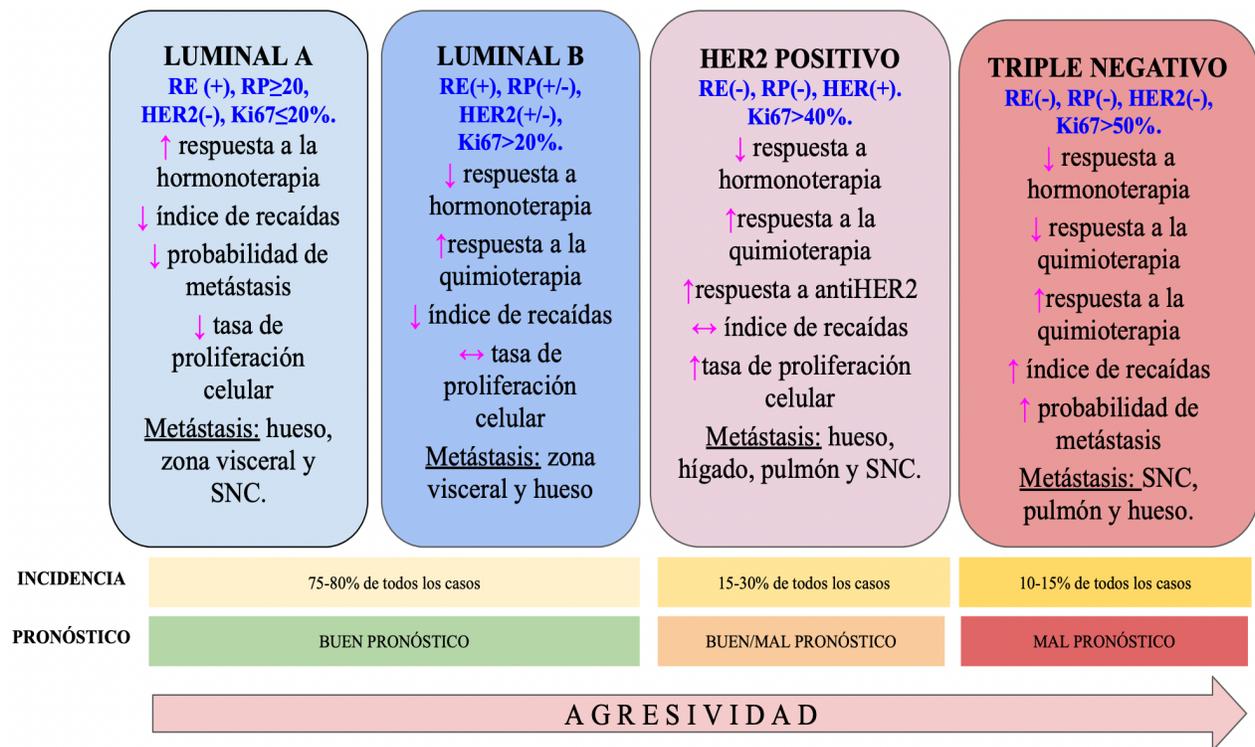


Figura 1. Clasificación Molecular del cáncer de mama: principales características por subtipos. Modificada de (Merino 2017, Alcaide 2021).

1.1.2 | Desarrollo de metástasis en cáncer de mama |

La metástasis se desarrolla cuando las células cancerosas se desprenden del sitio donde se generó el tumor primario y se propagan a otras partes del cuerpo a través del torrente sanguíneo o el sistema linfático formando nuevos tumores en otros órganos. De acuerdo con los últimos datos reportados por el INC (Por sus siglas en inglés NCI: National Cancer Institute) de EE. UU, el 6 % de las pacientes con cáncer de mama son diagnosticadas de manera sincrónica con metástasis en sitios distantes a la mama (NOON, 2018). Las partes más comunes del cuerpo donde el cáncer de mama tiende a propagarse son los ganglios linfáticos distantes, los huesos, los pulmones, el hígado y el cerebro (Neuman 2015, Patanaphan 1988, Chikarmane 2015, Lv 2022, Chen 2017, Wang, 2016).

Varios estudios recientes también han recopilado evidencia de que el fenotipo molecular del cáncer de mama determina el momento de aparición, el patrón de propagación y el pronóstico de la enfermedad metastásica. De manera general, los tumores luminales (RH-) tienen el mejor pronóstico de vida, presentando un patrón metastásico mayoritariamente a nivel óseo, aunque en proporciones más bajas también hacia la zona visceral y el sistema nervioso central (Whang, 2016). Por otro lado, el tipo HER2 positivo a mejorado mucho su pronóstico en los últimos años con el desarrollo de anticuerpos monoclonales antiHER2, disminuyendo la probabilidad de generar metástasis, en cuanto a las metástasis más frecuentes que suelen presentarse son en hígado y hueso (Whang, 2016). Por último, el subtipo de cáncer de mama triple negativo (CMTN) tiene más probabilidad de generar metástasis en el sistema nervioso central (SNC) y los pulmones, por lo que presentan el peor pronóstico de supervivencia (lv, 2022).

Asimismo, se ha encontrado que muchos factores relacionados con la edad pueden desempeñar un papel importante en la metástasis; incluida la acumulación de daño al ADN, la inflamación crónica y los cambios a nivel hormonal y la respuesta inmunitaria. Además de que los pacientes más jóvenes tienen más posibilidad de recibir quimioterapia, radioterapia y cirugía (Chen, 2017). En cuanto el patrón de metástasis, los pacientes de mayor edad tienen más probabilidad de presentar metástasis hacia los pulmones, pero una menor probabilidad de presentar múltiples sitios metastásicos en comparación con la población joven y de mediana edad. Además, por los factores antes mencionados, la población más joven presenta un mejor pronóstico de supervivencia (Chen 2017, lv 2022).

Aunque la terapia del cáncer ha tenido grandes avances en los últimos años, el abordaje terapéutico del cáncer de mama metastásico (CMM) aún tiene muchas limitantes y una baja efectividad para destruir a las células tumorales, por lo cual aún se asocia con una morbilidad y mortalidad sustanciales. Tan sólo el tiempo medio de supervivencia de los pacientes con CMM es de 18 a 24 meses, y las tasas de supervivencia a 5 y 10 años son bajas, del 27 % y 13 % respectivamente (Eng, 2016).

Es importante recalcar que la supervivencia a los 5 años es diferente para cada uno de los subtipos moleculares del cáncer de mama. Como se reporta en la literatura, los cánceres luminales son los que tienen el mejor pronóstico teniendo una supervivencia entre el 40 y el 80%. En el caso del subtipo HER2+ la tasa de supervivencia se encuentra al rededor del 30%, un poco más bajo que el de los luminales, pero aun preservando un buen pronóstico. Por el contrario, tenemos al cáncer de mama triple negativo el cual es el subtipo de peor pronóstico y el más agresivo de todos pues presenta una tasa de supervivencia del 10%, lo cual nos indica que sólo una de cada 10 mujeres con esta neoplasia logra sobrevivir (Merino 2017, Alcaide 2021).

1.2 | Cáncer de Mama Triple Negativo |

El CMTN representa entre el 10-20% de todos casos de neoplasias malignas en la mama, presentando una mayor prevalencia en mujeres menores de 40 años, afrodescendientes o que tienen una mutación en el gen BCRA1 (Alcaide 2021, MacDonald 2022).

Este subtipo se caracteriza por la nula o baja expresión de los receptores de progesterona, estrógeno y el receptor 2 del factor de crecimiento humano, obteniéndose tres resultados negativos en las pruebas inmunohistoquímicas. La carencia de estos receptores en las células tumorales ha convertido al CMTN en uno de los tumores malignos con menos opciones de tratamiento, ya que, dentro de la clínica estos receptores se emplean como blancos terapéuticos de muchos agentes antineoplásicos (Almansour, 2022).

La quimioterapia con agentes citotóxicos es la terapia que presenta mejores tasas de éxito farmacológico para estos pacientes, sobre todo en estadios tempranos, algunos de los agentes más empleados incluyen a las antraciclinas (Doxorrubicina), los taxanos (Paclitaxel) y agentes alquilantes (Ciclofosfamida). Por otro lado, el tratamiento en estadios avanzados incluye la utilización de antimetabolitos (Gemcitabina y Capecitabina), inhibidores de microtúbulos (Eribulina) y los derivados del platino (Carboplatino) (Chang 2019, Almansour 2022).

A pesar de que la quimioterapia presenta altas tasas de respuesta inicial en los pacientes de CMTN, el 90% de los casos adquiere resistencia farmacológica, convirtiéndose este factor en la principal causa de falla terapéutica (Nedeljković, 2019).

Las características particulares del CMTN culminan en un comportamiento clínico de la enfermedad más invasivo y agresivo en comparación con los otros subtipos de cáncer de mama, teniendo el peor pronóstico de todos (Dent, 2017). La tasa de supervivencia promedio de este subtipo es de aproximadamente 10.2 meses con respecto a las terapias actuales disponibles, con una tasa de supervivencia a los 5 años de 65% en los casos de tumores regionales y del 11% en casos metastásicos (Kohler, 2015). Del mismo modo, el riesgo de recurrencia y muerte del tumor es más alta en estos pacientes con respecto a los otros subtipos, ya que el tiempo de recurrencia promedio es de aproximadamente 1.2 años (Mersin, 2008).

Sumado a lo antes mencionado, el CMTN a menudo se asocia con malos resultados clínicos en los pacientes debido al desarrollo de metástasis en órganos distantes principalmente al cerebro, los huesos y los pulmones (Zeichner, 2016). El avance metastásico de la enfermedad hacia estos órganos representa un desafío clínico significativo, ya que la metástasis es la principal causa de muerte para la gran mayoría de los pacientes de CMTN (Nguyen, 2007).

1.2.1 | Abordaje terapéutico del Cáncer de Mama Triple Negativo|

El tratamiento actual del cáncer de mama involucra diferentes estrategias como lo son la terapia dirigida, la terapia hormonal, la radioterapia, la cirugía y la quimioterapia. El enfoque terapéutico que se le brinde a cada paciente dependerá del estadio de la enfermedad y del subtipo molecular de cáncer de mama que esté presente (Akram, 2017). Por su relevancia con este estudio, a continuación, se presentan los tratamientos mayormente empleados en la clínica para tratar el cáncer de mama triple negativo:

Tabla 1. Abordaje terapéutico actual del CMTN. (Waks & Winer, 2019)

		TRIPLE NEGATIVO
ETAPAS NO METASTÁSICAS (ESTADIOS I, II, III)		<p>QUIMIOTERAPIA:</p> <p>Todos los pacientes.</p> <p>Esquemas: Doxorrubicina/ciclofosfamida Doxorrubicina/ciclofosfamida/paclitaxel Docetaxel/ciclofosfamida</p> <p>Vía: Intravenosa</p>
		TERAPIAS NO FARMACOLÓGICAS: Cirugía y radioterapia.
ETAPA METASTÁSICA (ESTADIO IV)	Línea inicial de terapia	<p>QUIMIOTERAPIA de agente único:</p> <p>TAXANOS: Paclitaxel o Docetaxel.</p> <p>DERIVADOS DEL PLATINO: Carboplatino o Cisplatino</p> <p>ANTRACICLINAS: Doxorrubicina o epirubicina</p> <p>Vía: Intravenosa</p>
	Líneas posteriores de terapia	<p>QUIMIOTERAPIA de agente único:</p> <p>Capecitabina Eribulina Vinorelbina Gemcitabina</p> <p>Olaparib o talazoparib (si hay mutación en la línea germinal BRCA 1/2)</p> <p>Vías: Intravenosa u oral.</p>
		TERAPIAS NO FARMACOLÓGICAS: Cirugía y radioterapia.

1.2.1.1 | Doxorrubicina |

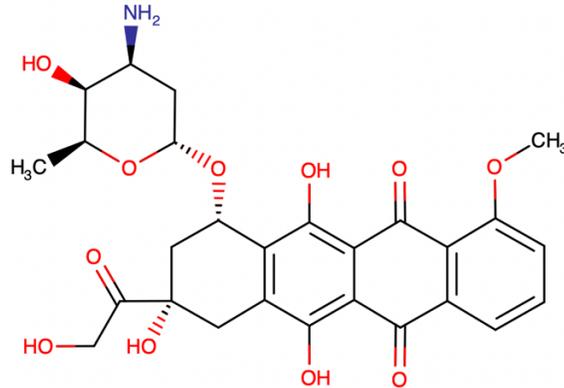


Figura.2 Estructura Química de Doxorrubicina (Drugbank, 2023).

La doxorubicina es una antraciclina aislada de la bacteria *Streptomyces peucetius var. caesius* y se utiliza para el tratamiento de varios tipos de cáncer; incluidos los sarcomas de tejidos blandos y óseos, los carcinomas de mama, ovario, vejiga y tiroides, y algunas leucemias como la leucemia linfoblástica aguda y la leucemia mieloblástica aguda (Johnson, 2017).

La dosis terapéutica de este fármaco es de 60-75 mg/m² y se administra por infusión intravenosa en ciclos de 21 días, con una dosis máxima acumulada permitida de 550 mg/m². Su biotransformación se da principalmente vía hepática y su eliminación es por la bilis y la orina. Su tiempo de vida media es de 20-48 h y tiene una unión a proteínas plasmáticas de 74-76 % (Wellstein 2017, Drugbank 2023).

1.2.1.2 | Mecanismos de acción antitumoral de Doxorrubicina |

Hay dos mecanismos propuestos por los cuales la doxorubicina actúa en las células cancerosas; el primero es la generación de radicales libres que dañan las membranas celulares, el ADN y las proteínas. El segundo se da por la intercalación de ésta en las cadenas de ADN produciendo una inhibición de la topoisomerasa II, afectando directamente la reparación y replicación del ADN. La figura 3 esquematiza dichos mecanismos (Thorn 2011, Wellstein 2017):

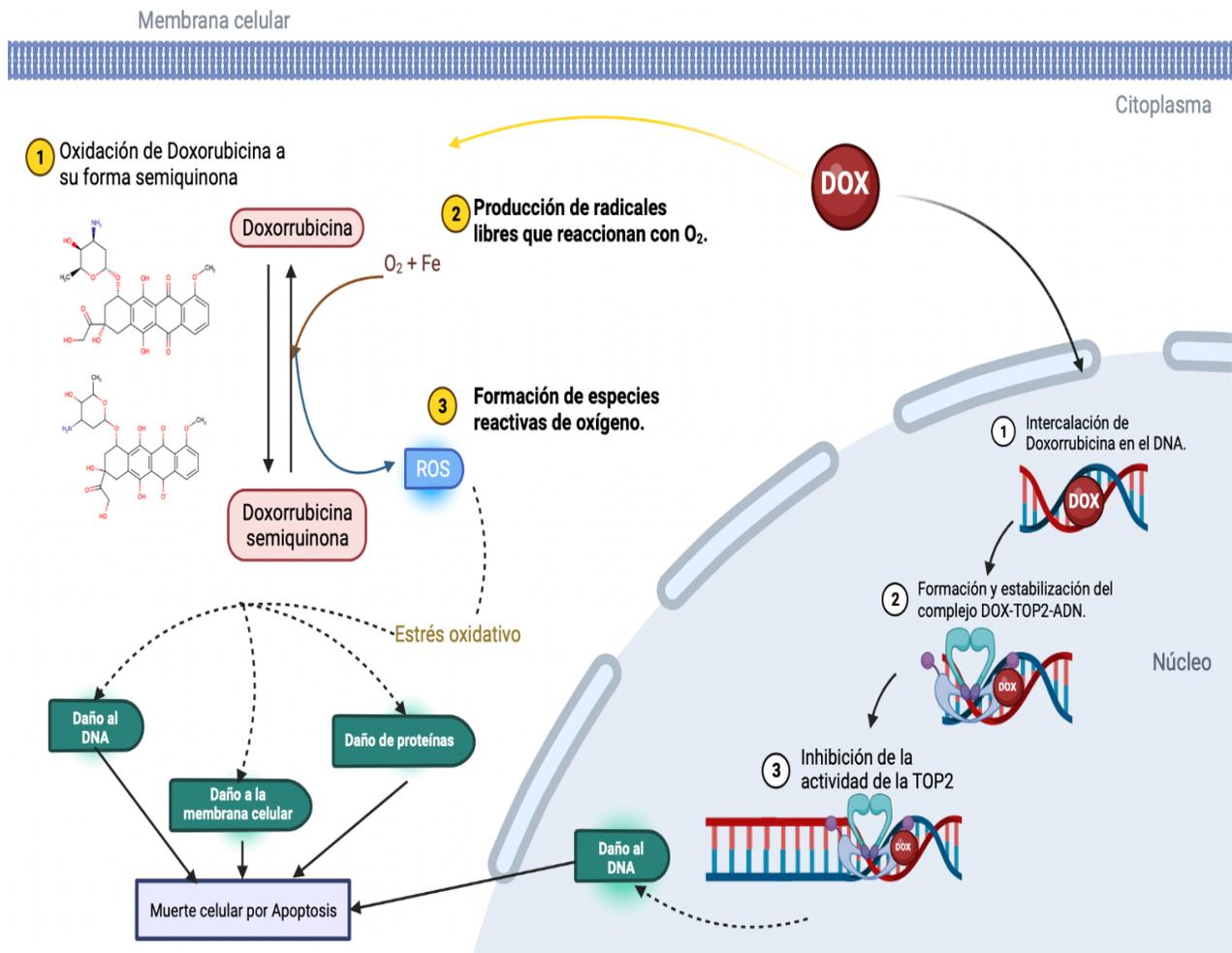


Figura 3. Mecanismos de acción de la doxorubicina en la célula cancerosa. Modificada de (Thorn 2011, Wellstein 2017). Elaborado en Biorender.

Por otro lado, la doxorubicina se asocia con una cardiotoxicidad significativa, produciendo miocardiopatías e insuficiencia cardíaca congestiva, estos efectos tóxicos son dependientes de la dosis y son acumulativos. Algunos otros efectos adversos relacionados con este fármaco incluyen; mielosupresión (leucopenia, trombocitopenia y anemia), fatiga, alopecia, náuseas, diarrea y vómitos (Wellstein, 2017).

Debido a la toxicidad que presenta la doxorubicina se han desarrollado diferentes vehículos para poder transportar el fármaco sin causar tanta toxicidad. Una de las estrategias que se ha explorado en la últimas década es el uso de las nanopartículas.

1.3 | Nanopartículas sólidas lipídicas |

La nanomedicina es una de las áreas de la ciencia con mayor crecimiento en la actualidad y esto puede verse reflejado en todos los nanosistemas de liberación de fármacos que se han desarrollado en los últimos años, los cuales prometen revolucionar las terapias convencionales de un gran número de enfermedades (Rojas, 2016).

Una de las aplicaciones más relevantes, es la utilización de estos nanosistemas como nanocarreadores de fármacos antineoplásicos para la terapia del cáncer. Ya que, debido a sus propiedades y estructura química, nos permiten transportar una gran variedad de moléculas hasta la vecindad de las células tumorales, manteniendo una liberación controlada del fármaco e incrementando la biodistribución del mismo, teniendo como consecuencia una mayor eficacia terapéutica e incluso pudiendo evitar algunos mecanismos de resistencia que se presentan durante la terapia con antineoplásicos (Rojas, 2016).

En las últimas décadas han surgido nuevas generaciones de nanopartículas a base de lípidos de las cuales destacan los liposomas y las Nanopartículas sólidas lipídicas (NSL). Las NSL aún se encuentran en una etapa temprana de desarrollo, sin embargo, los estudios preclínicos que se han realizado han mostrado que esta nueva generación de nanopartículas presenta mejor estabilidad, menor toxicidad y mayor eficiencia de encapsulación que los liposomas, convirtiéndose en la nueva promesa farmacológica dentro de la terapia del cáncer (Thi, 2021).

1.3.1 | Estructura y características de las NSL |

Las nanopartículas sólidas lipídicas han surgido como posibles sistemas de administración de fármacos, incorporando al campo biomédico y terapéutico, un nanosistema portador y protector con la capacidad de transportar una gran variedad de moléculas, tanto hidrofílicas como hidrofóbicas, pudiéndose dirigir hacia diferentes sitios diana para tratar una gran cantidad de enfermedades (Scioli 2020, Musielak 2022).

Las NSL son partículas coloidales de tamaño submicrón de entre 50 a 1000 nm de diámetro y están constituidas por una matriz de lípidos sólidos cristalinos y algunos tensoactivos, componentes que les confieren la capacidad de acomodar fármacos y moléculas entre sus cadenas de ácidos grasos ya sea en el interior del núcleo lipídico o sobre su superficie. Sus formas son variadas, pueden ser esféricas, elipsoidales planas o en forma de disco. A sí mismo, su carga superficial está determinada por sus constituyentes y el pH del medio circundante (Scioli 2020, Bayón 2019).

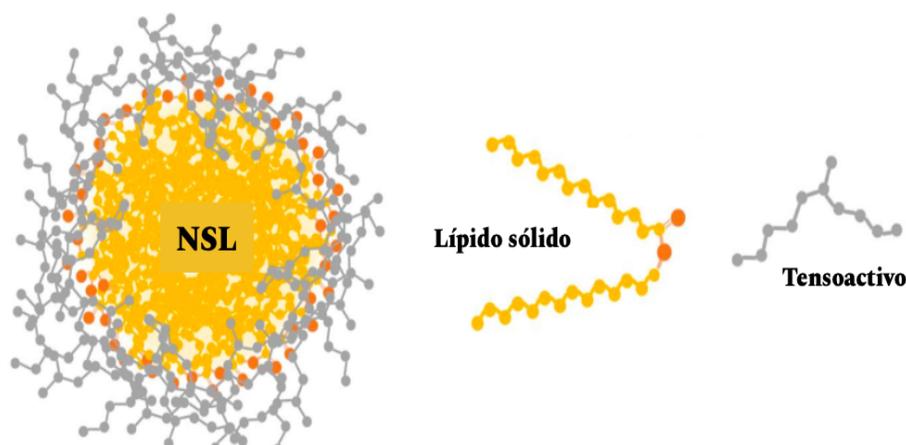


Figura 4. Estructura fundamental de las NSL. Modificado de Scioli, 2020.

Para obtener formulaciones de NSL de alta calidad es necesario determinar la proporción adecuada de los componentes lipídicos, los cuales deberán ser seleccionados teniendo en cuenta la naturaleza del fármaco que se va a incorporar, ya que la molécula incorporada debe solubilizarse en la matriz lipídica para tener una buena eficiencia de encapsulación. Las sustancias más utilizadas para formar el núcleo lipídico son glicéridos (mono-, di-, tri-), ácidos grasos, alcoholes grasos y ceras, los cuales son biocompatibles ya que se degradan enzimáticamente en componentes naturales que se encuentran en el cuerpo humano. Además, su punto de fusión está por encima de la temperatura fisiológica permaneciendo sólidos y estables tras su administración en el organismo (Bayón, 2019).

Las formulaciones de NSL están compuestas por dos fases inmiscibles: la fase acuosa y la fase oleosa; por lo que es necesario utilizar tensoactivos (o surfactantes) para estabilizar toda la estructura, incluso en algunos casos es necesario utilizar co-surfactantes. La utilización de estas sustancias evita la agregación o coalescencia de las nanopartículas, estabilizándolas electrostática y/o estéricamente. (Scioli 2020, Musielack 2019).

En cuanto a su síntesis, el método de preparación de las NSL es sumamente importante para obtener una estructura y estabilidad adecuada. Su preparación requiere necesariamente transferir energía al sistema para poder generar partículas muy pequeñas y estables en ambientes acuosos. La energía puede ser proporcionada por distintos métodos descritos exhaustivamente en la literatura como: homogenización a altas presiones o velocidades, sonicación, homogenización en frío o caliente y la emulsificación (Scioli 2020, Bayón 2019).

1.3.2 | Caracterización fisicoquímica de las NSL |

Posterior a la síntesis de las NSL es indispensable efectuar la caracterización fisicoquímica del nanosistema obtenido, esto con la finalidad de evaluar su estabilidad y la cinética de liberación del fármaco incorporado a la matriz lipídica, siendo este proceso un estándar de calidad que nos permite predecir el comportamiento químico de la nanoformulación. En este contexto, los parámetros mínimos necesarios para evaluar la calidad de NSL incluyen el tamaño de partícula, el potencial zeta, el grado de cristalinidad, el perfil de liberación del fármaco, la eficiencia de encapsulación y la morfología superficial (Duan 2020, Parhi 2012).

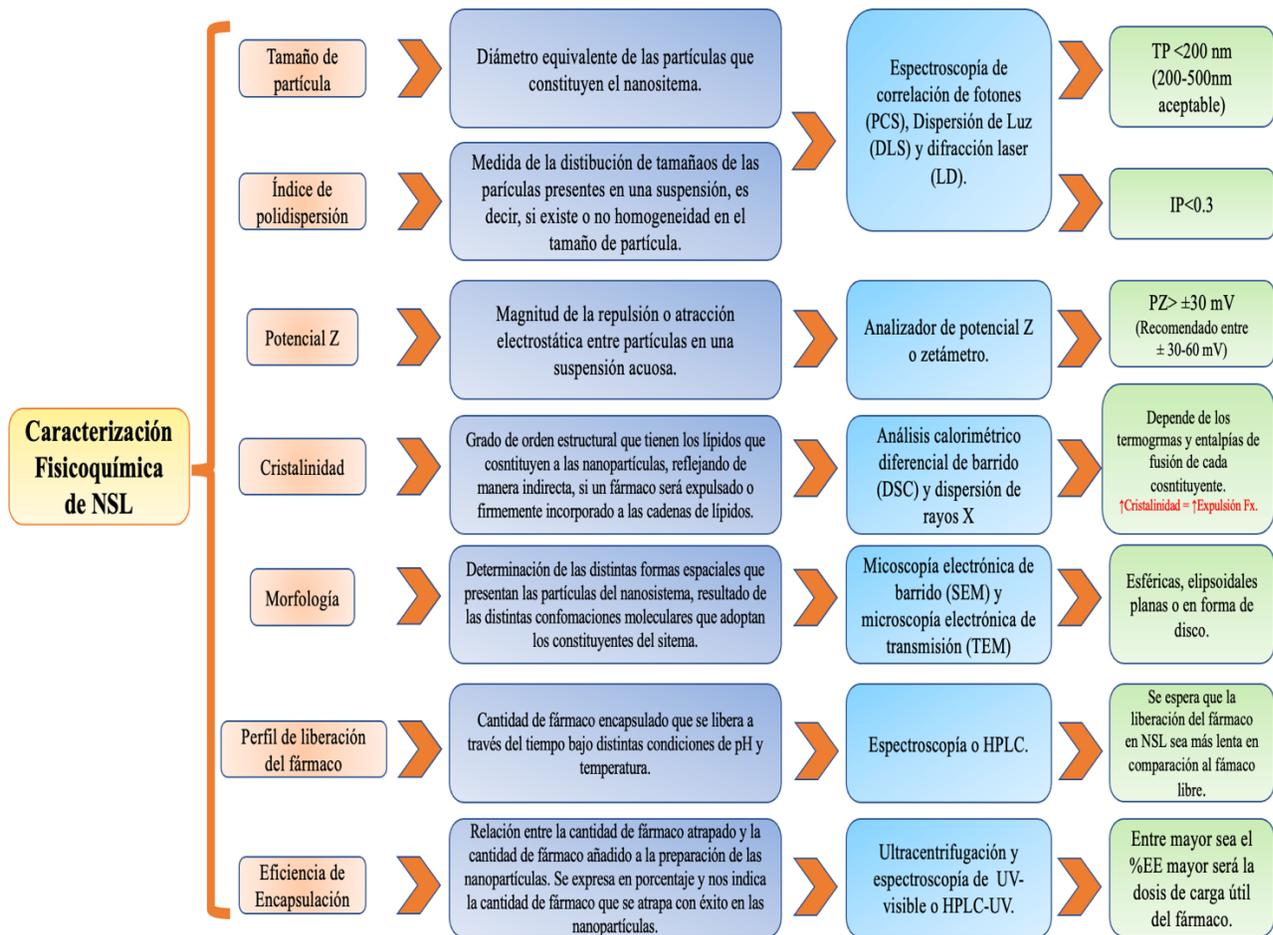


Figura 5. Parámetros mínimos requeridos para la caracterización fisicoquímica de NSL y sus principales técnicas para medirlos. Modificado de (Mishra 2018, Sastri 2020, Duan 2020, Parhi 2012).

1.3.3 | NSL Catiónicas |

Las nanopartículas sólidas lipídicas catiónicas (cNSL) son un subgrupo de NSL que poseen sobre su superficie una carga neta positiva, la cual es resultado de la utilización de tensoactivos o lípidos iónicos con grupos estructurales cargados positivamente (Silva, 2019). Algunos de los lípidos más utilizados en este tipo de nanoformulaciones son el Bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB) y el 1,2-dioleil-3-(trimetilamonio) propano (DOTAP) (Bondi, 2010).

Las cNSL se consideran uno de los nanosistemas más eficientes para la entrega de fármacos hidrofílicos y moléculas de material genético poco solubles en agua, teniendo un alto potencial para administrar genes para tratar una gran variedad de enfermedades. La carga superficial positiva de las cNSL puede mejorar las interacciones célula-partícula y partícula-proteína, debido a que las NSL catiónicas tienen una mayor afinidad con las membranas celulares y las proteínas séricas por las cargas negativas que presentan estas sobre su superficie (Silva 2019, Mandonca 2019).

Al igual que las NSL convencionales las cNSL deben ser caracterizadas para asegurar que cumplen con las características fisicoquímicas adecuadas para ser empleadas como sistemas de administración. Primordialmente se debe determinar la eficiencia de carga de los fármacos y/o del material genético que se desean transportar. Así mismo, es fundamental determinar el tamaño de partícula y el potencial Z, puesto que las cNSL deben tener un tamaño ≤ 200 nm para tener una internalización celular óptima y una carga superficial neta positiva entre los 30 a 60 mV para asegurar la interacción electrostática con el material genético que se transporta y posteriormente con las membranas celulares a las que se busca que estas lleguen (Bondi, 2010).

Se ha reportado que aunque las cNSL pueden tener una beneficiosa aplicación terapéutica en distintas enfermedades, los lípidos catiónicos que se emplean para su síntesis están asociados a un grado moderado de toxicidad, por lo que en su desarrollo y uso se recomienda determinar la concentración óptima para tener el mínimo grado de toxicidad posible en la nanoformulación sobre todo si esta se planea administrar a un modelo *in vivo*, en la literatura se recomiendan concentraciones de lípidos catiónicos entre 0.3 a 0.6% dentro de las nanoformulaciones (Bondi, 2010).

1.3.4 | Ventajas y desventajas de las NSL como DDS |

Tabla 2. Principales ventajas y desventajas de las NSL como sistemas de administración de fármacos.
(Ghasemiyeh 2018, Scoli 2020, Bayon 2019).

VENTAJAS	<ul style="list-style-type: none"> • Capacidad para incorporar y transportar una gran variedad de agentes terapéuticos. • Disminuyen la toxicidad y efectos adversos de los fármacos. • Alta estabilidad física y química. • Aumento de la biodistribución y biodisponibilidad de los fármacos (Mayor tiempo en circulación de los fármacos y un efecto terapéutico prolongado). • Pueden abordar los problemas de resistencia farmacológica de maneras indirectas. • Proporcionan un perfil de liberación controlada y sostenida de los fármacos • Baja toxicidad (su síntesis es posible sin utilizar disolventes orgánicos). • Producción simple y económica (rentable a gran escala). • Sistemas lipídicos biocompatibles y biodegradables. • Incrementan la solubilidad y estabilidad de las moléculas incorporadas. • Aumentan la permeabilidad de las moléculas en la barrera hematoencefálica. • Amplia diversidad de vías de administración: oral, rectal, nasal, ocular, parenteral, intravenosa, entre otras. • Se pueden emplear para tratar una amplia gama de enfermedades. • Mejoramiento de la permeabilidad de los fármacos y la retención en tejidos.
DESVENTAJAS	<ul style="list-style-type: none"> • Posibilidad de expulsión de fármaco encapsulado durante el tiempo de almacenamiento. • Alta polidispersidad de algunas preparaciones de NSL. • Crecimiento del tamaño de partículas durante el tiempo de almacenamiento. • Al ser dispersiones de lípidos, contienen grandes cantidades de agua. • Falta de estudios clínicos de su uso. • Baja eficiencia de carga de algunos fármacos hidrofílicos. • La acumulación de lípidos en el hígado y bazo pueden causar alteraciones patológicas.

1.3.5 | Estado actual de los nanosistemas en el ámbito clínico

En la década de 1990, la FDA aprobó por primera vez un nanosistema para su uso clínico hecho a base de liposomas con doxorubicina encapsulada, actualmente es comercializado como Doxil® y es utilizado para el tratamiento de cáncer de mama ovárico y metastásico, así como algunos tipos de mieloma. A partir de ese momento hasta la fecha, la FDA a aprobado alrededor de 50 nanoformulaciones, siendo las hechas a base de nanopartículas lipídicas las que encabezan dicha lista (Anselmo, 2019). En el caso particular de las NSL, su desarrollo aún se encuentra en fases preclínicas de investigación, sobre todo en fases I y II, lo cual nos indica que las NSL muy probablemente se convertirán en una nueva generación de sistemas de administración de fármacos con múltiples aplicaciones en el ámbito clínico.

Tabla 3. NSL en fases clínicas de investigación para su uso en humanos. Modificado de Abdel, 2022.

Tipo de Nanosistema	Fármaco o intervención (Vía Administración)	Indicación terapéutica	Estatus/Año (País)
NSL	Oxiconazol (Tópica: Gel)	Tiña corporal.	Fase I:2020 (Egipto)
NL-RNA _m	Durvalumab (Intravenosa: inyectable)	Tumores malignos sólidos recidivantes, linfomas, cáncer de mama triple negativo, cáncer cervicouterino, cáncer de cabeza y cuello.	Fase 1:2018 (EE.UU.)
NL-RNA _m	Durvalumab (Intravenosa: inyectable)	Tumores malignos sólidos, linfomas y cáncer de ovario.	Fase 2:2022 (EE. UU.)
NL-RNA _m	mRNA-127 (Intramuscular: inyectable)	Vacuna contra la infección del SARS- CoV-2	Fase:1 2020 (EE. UU.)
NL-siRNA	Oligonucleótido de ARN (siRNA) dirigido a MYC (Intravenosa: inyectable)	Tumores sólidos avanzados, tumores pancreáticos, cáncer de hígado y mieloma múltiple.	Fase:2 2018 (Singapur & EE. UU.)
NL-siRNA	SiRNA dirigido al gen PLK1 (Intravenosa: inyectable)	Pacientes con cáncer colorrectal, de páncreas, gástrico, de mama, de ovario y de esófago con metástasis hepática.	Fase 1:2018 (EE. UU.)

2. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA/JUSTIFICACIÓN

La falta de opciones terapéuticas efectivas para tratar el cáncer de mama de pacientes en estado metastásico avanzado o con resistencia a la quimioterapia, hace a esta enfermedad un problema de salud difícil de abordar. Como consecuencia de esto, las tasas de incidencia y mortalidad de este tipo de cáncer incrementan cada año, lo cual ha generado la necesidad de desarrollar nuevas terapias que ayuden a combatir las células cancerosas. En ese sentido, las NSL se han convertido en una estrategia farmacológica prometedora para administrar antineoplásicos, ya que mejoran las propiedades farmacológicas de los fármacos que transportan. Es un hecho que esta tecnología está en pleno desarrollo, por lo cual hay pocos estudios preclínicos que recopilen información relevante sobre su eficacia para disminuir o retardar la metástasis pulmonar que se deriva del cáncer de mama, algo que comúnmente se presenta en el ámbito clínico para este tipo de cáncer. Es a partir de esto, el interés de este proyecto de desarrollar un nanosistema de NSL que encapsule unos de los fármacos de primera línea para tratar el cáncer de mama como lo es la Doxorrubicina, teniendo como finalidad evaluar su potencial como tratamiento farmacológico para disminuir o retardar la progresión tumoral en un modelo *in vivo* de cáncer de mama con metástasis pulmonar.

3. HIPÓTESIS

La Doxorubicina encapsulada en un nanosistema de nanopartículas sólidas lipídicas como tratamiento farmacológico, disminuirá la metástasis pulmonar derivada del cáncer de mama en un modelo preclínico.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Desarrollar una formulación de nanopartículas sólidas lipídicas con doxorubicina utilizando la técnica de homogenización a altas velocidades y evaluar su actividad farmacológica para disminuir la metástasis pulmonar en un modelo *in vivo*.

4.2 Objetivos Particulares

- 1.- Realizar la caracterización fisicoquímica de las nanoformulaciones de Dox-NSL a partir de la determinación del tamaño de partícula, el índice de polidispersión, el potencial zeta y la eficiencia de encapsulación para su posterior aplicación en modelos preclínicos.
- 2.- Efectuar un ensayo de hemocompatibilidad de las formulaciones de Dox-NSL para comprobar su seguridad biológica en modelos animales.
- 3.- Implementar un modelo *in vivo* de metástasis pulmonar en ratones NOD/SCID a partir de la línea celular de cáncer de mama MDA MB 231, para la evaluación de la actividad farmacológica del nanosistema de Dox-NSL.
- 4.- Evaluar el efecto antitumoral del nanosistema de Dox-NSL en un modelo animal de metástasis pulmonar por medio de la determinación del volumen tumoral y el seguimiento de la pérdida de peso.
- 5.- Evaluar la actividad farmacológica de las nanoformulaciones de Dox-NSL sobre la disminución de la metástasis pulmonar a través de fluorescencia cercana al infrarrojo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos y materiales

El Pluronic® F127 (F127), el Ácido esteárico (AE), el clorhidrato de Doxorubicina (DOX·HCl), el Bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB) y el Matrigel® fueron obtenidos de Sigma Aldrich (Saint Louis, Misuri, EE. UU.). El Compritol® 888 ATO fue una donación del laboratorio Gattefossé (Saint Priest, Francia). La Acetona $\geq 99.5\%$ (J.T. Baker®) y el alcohol etílico absoluto anhidro (94.0-96.0% J.T. Baker®) se adquirieron de Thermo Scientific (Massachussets, EE. UU.). El marcador IRDye® 800CW-RGD fue adquirido de LI-COR Biosciences (Lincoln, Nebraska, EE. UU.). El agua desionizada (18.2 M Ω ; 25°C) se obtuvo mediante un sistema MilliQ de la compañía Merck Millipore (Saint Louis, Misuri, EE. UU.).

5.2 Elaboración de NSL cargadas con doxorubicina.

Antes de la preparación de las NSL, el clorhidrato de Doxorubicina (Dox·HCl) se transformó en la base hidrofóbica. Para ello, se disolvieron 10 mg de Dox·HCl en 5 mL de DMSO y 500 μ L de trietanolamina con agitación constante durante toda la noche. Posteriormente con un embudo de separación se agregó una disolución 1:1 de diclorometano/agua y se recuperó la fase de diclorometano con DOX base. Para la formulación de las NSL, se realizó una emulsión de aceite/agua (O/W), la composición de la formulación se muestra en la tabla 4. La homogenización de ambas fases se realizó a una temperatura de trabajo de 75-80°C con un ULTRA-TURRAX® (T25 Digital Disperser, IKA Works) a 15,000 rpm por 10 minutos. Posteriormente se llevó a cabo un segundo ciclo de agitación de 10 min a temperatura ambiente. El fármaco no encapsulado se eliminó por diálisis en PBS durante 6 horas con tubos de diálisis SPECTRA/POR (8000 kDa) y se almacenó a 4°C para su posterior uso. Para la preparación de las nanopartículas blanco se realizó la misma metodología antes mencionada omitiendo la adición del fármaco durante la preparación de la fase oleosa.

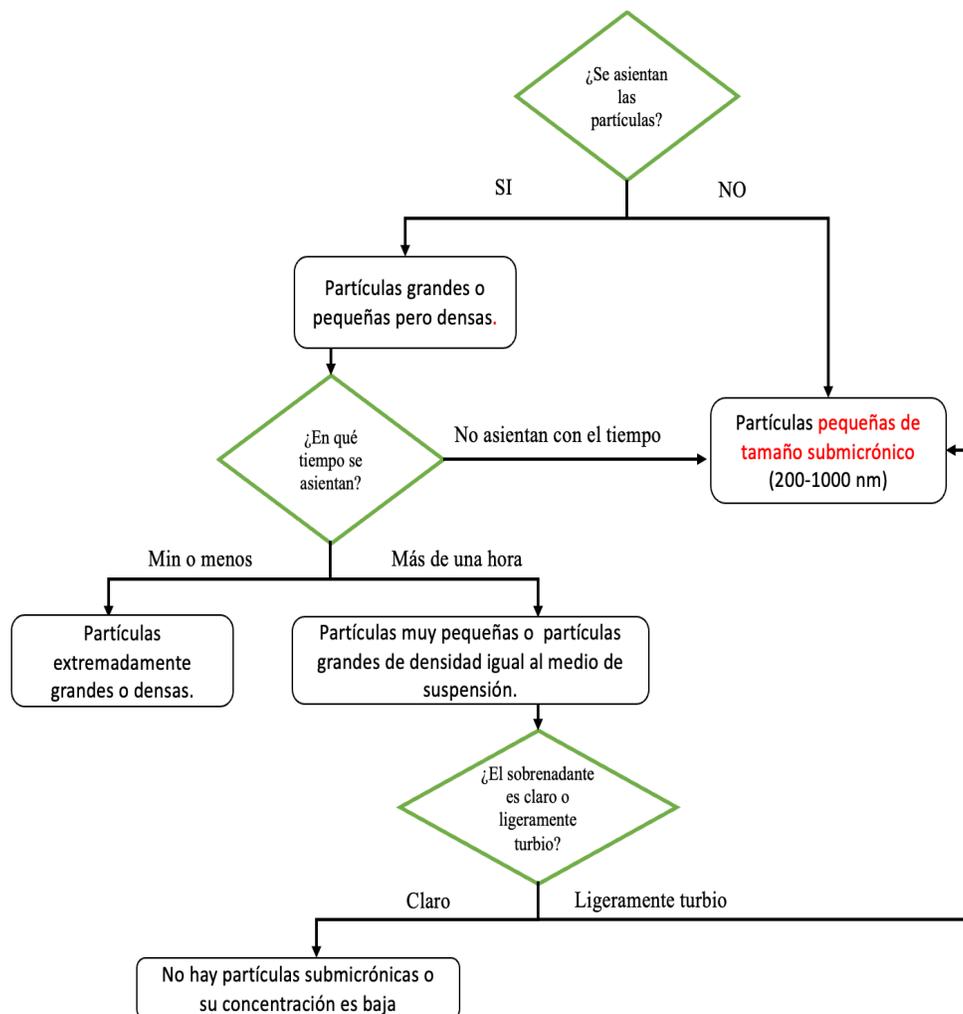
Tabla No. 4 Composición química de formulaciones de NSL vacías y con doxorubicina.

Reactivo	Cantidades en la formulación (%m/m)
AE	0.1%
COMPRITOL	1.5%
DDAB	0.4%
F127	1%
Doxorubicina	1mg/mL

5.3 Caracterización de formulaciones de NSL

5.3.1 Análisis macroscópico de nanoformulaciones.

Para la observación y clasificación macroscópica de las formulaciones se siguió el siguiente diagrama de flujo para caracterizar visualmente las dispersiones de NSL obtenidas:



5.3.2 Determinación del tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial Z.

Para evaluar el tamaño de partícula (TP), el índice de polidispersión (PDI) y la potencial zeta (PZ) de las formulaciones se usó el instrumento Nanoparticle Size Analyzer 90 plus (Holtsville, New York, EE. UU.).

Tamaño de partícula e índice de polidispersión: Las muestras fueron diluidas para su análisis 1:100 y se leyeron a temperatura de 25 °C, viscosidad de 0.890 cP, índice de refracción de 1.33, un ángulo de 90°. Para comprobar el correcto funcionamiento del equipo previamente a la lectura de las muestras se leyó un estándar con un tamaño de partícula de 92 ± 3 nm (Duke Scientific®).

Potencial z: Las muestras fueron diluidas para su análisis 1:50 y se leyeron a temperatura de 25 °C, pH de 7.4 y una constante dieléctrica de 78.54. Para comprobar el correcto funcionamiento del equipo previamente a la lectura de las muestras se leyó un estándar con un potencial z de -53 ± 4 mV.

5.3.3 Determinación de la eficiencia de encapsulación

Para determinar el porcentaje de la eficiencia de encapsulación, las formulaciones se ultracentrifugaron a 1000 g durante 10 min usando filtros Amicon (30000 kDa) y se cuantificó tanto el concentrado como el sobrenadante. La medición de DOX se realizó empleando un método espectrofotométrico a 480 nm y 560 nm, longitudes de onda de excitación y emisión de la doxorubicina.

La cantidad de DOX encapsulada se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$\%EE = \frac{\text{Cantidad de DOX encapsulada en NSL}}{\text{Cantidad total de DOX añadida en la preparación de la formulación}} \times 100$$

5.4 Ensayo de Hemo-compatibilidad

Para el ensayo de hemo-compatibilidad se siguió la metodología recomendada por la ASTM standard E2524-08 (Standard Test Method for Analysis of Hemolytic Properties of Nanoparticles por sus siglas en inglés). Brevemente, distintas concentraciones de las nanopartículas se incubaron con un concentrado eritrocitario libre de plasma al 4% y se midió la liberación de hemoglobina a través de espectrofotometría a una longitud de onda de 405 nm en lector de placas Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU.).

5.5 Línea celular

La línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB -231 fue obtenida de la American Type Culture Collection, ATCC (Rockville, U.S.A). Estas células se cultivaron en condiciones de esterilidad en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM (Gibco, Grand Island, NY., U.S.A) suplementado con el 10% de suero fetal bovino e incubadas a 37°C con una atmósfera de 5 % de CO₂.

5.6 Animales de experimentación

Se emplearon ratones NOD/SCID hembra, entre 6 y 8 semanas de edad, los cuales fueron obtenidos del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, mantenidos en condiciones libres de patógenos, con agua y alimento *ad libitum*, fotoperiodo día/noche de 12-12 h, temperatura de 27°C y humedad adecuada. Los estudios se realizaron de acuerdo con las reglas para el cuidado y el uso de animales de experimentación aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Cancerología de México (CLAVE: 023/032/IBI).

5.7 Modelo ortotópico de cáncer de mama en ratones NOD/SCID

Las células de mama se inyectaron (2×10^6 cel/ 50 μ L) ortotópicamente en la glándula mamaria inguinal en ratones inmunodeficientes NOD/SCID (de entre 6 y 8 semanas de edad). Para la inoculación intramaria los ratones fueron anestesiados con isoflurano (2%) y se colocaron en posición decúbito prono o ventral y se realizó una pequeña incisión para exponer el panículo adiposo mamario. Posteriormente se inocularon las células utilizando una aguja de 30G de manera lenta. Desde la inoculación se realizó un seguimiento del estado del animal y del crecimiento tumoral mediante un vernier calibrado. Para el cálculo del volumen tumoral se utilizó la siguiente fórmula:

$$VT = D \cdot d^2 \cdot \frac{\pi}{6}$$

Donde:

VT: Volumen del tumor (mm³)

D: Diámetro mayor (mm)

d: Diámetro menor (mm)

5.8 Tratamientos.

Posterior a las tres semanas post-inoculación, los animales se aleatorizaron en tres grupos de tratamiento; control sin tratamiento (vehículo), doxorubicina libre (2 mg/kg) y doxorubicina encapsulada (2 mg/kg). Los tratamientos fueron administrados vía intravenosa dos veces por semana durante tres semanas. El grupo control fue administrado con NSL blanco como vehículo. Para evaluar la posible toxicidad del tratamiento se monitoreo la pérdida de peso corporal de los animales. Lo animales se pesaron tres veces por semana durante las 8 semanas de duración del estudio.

5.9 Evaluación de metástasis pulmonar.

5.9.1 Obtención de imágenes NIRF de los pulmones ex vivo.

Transcurridas las 7 semanas post-inoculación, los ratones fueron administrados con el marcador IRDye 800CW-RGD (1 nmol) por vía intravenosa. Transcurridas las 48 h post administración del marcador, se procedió a la eutanasia de los animales para el análisis *ex vivo* de los pulmones. Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron utilizando el Sistema de Imágenes de Infrarrojo Odyssey (LI-COR) a un enfoque de 4.0 nm, una resolución de 337 μm y una calidad de imagen media.

5.9.2 Análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia

El análisis cuantitativo de la fluorescencia emitida por el marcador IRDye 800CW-RGD se realizó a través del Sistema de Imágenes de Infrarrojo Odyssey (LI-COR). Para la determinación de la intensidad de fluorescencia, se estableció una región de interés (ROI) en los pulmones de cada grupo y se les restó la señal de fondo. Finalmente, los datos obtenidos se normalizaron con respecto al área seleccionada.

5.9.3 Estudios Histológicos

Al final del estudio, los animales fueron eutanizados y los pulmones se fijaron con una solución de formaldehído al 4% para posteriormente incluirlos en parafina y realizar cortes de 5 μm . Se realizó una tinción de H&E para observar la presencia de metástasis pulmonar.

5.10. Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los resultados se realizó a través del software GraphPad Prism Versión 8.0.1. En el caso específico de los datos de volumen tumoral, se realizó mediante un análisis de varianza de dos vías con medidas repetidas (RM ANOVA). Por otro lado, para la intensidad de fluorescencia se realizó un análisis de varianza de una vía, seguida de una prueba de Tukey efectuando múltiples comparaciones entre los grupos. Todos los resultados se reportan como el promedio \pm DE y un valor de $p < 0.05$ indicó diferencia significativa.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterización Físicoquímica de formulaciones de NSL.

Las nanopartículas sólidas lipídicas presentaron una apariencia opaca, sin presencia de precipitados, de acuerdo con los criterios de la guía para la determinación de tamaño de partícula de Brookhaven Instruments la formulación desarrollada se encuentra dentro de partículas de tamaño submicrónico, es decir, con un tamaño de partícula entre los 200-1000 nm.

En la tabla 5 se encuentra un resumen de los resultados obtenidos para cada parámetro físicoquímico empleado para caracterizar las nanoformulaciones de doxorrubicina. Los valores de tamaño de partícula promedio obtenidos mediante dispersión dinámica de luz fueron 236.1 ± 4.0 nm (PDI= 0.21 ± 0.02) y 209.03 ± 6.5 nm (PDI= 0.22 ± 0.03) para las NSL vacías y las Dox-NSL, respectivamente. El promedio del potencial zeta fue de 27.5 ± 6.0 mV y 31.90 ± 0.78 mV para las NSL vacías y Dox-NSL respectivamente, las Dox-NSL mostraron una eficiencia de encapsulación de 97.0 ± 5.2 %.

Tabla No. 5. Resumen de resultados de la caracterización físicoquímica de Dox-NSL. Los valores de cada columna representan el promedio \pm DE equivalente a tres lotes diferentes de Dox-NSL.

Parámetro	Resultados	
Tipo de formulación	NSL vacías	Dox-NSL
Evaluación macroscópica	Dispersión con partículas de tamaño submicrónico (Homogénea, ligera turbidez y sin asentamiento).	Dispersión con partículas de tamaño submicrónico (Homogénea, ligera turbidez y sin asentamiento).
Tamaño de partícula	236.1 ± 4.0 nm	209.03 ± 6.5 nm
Índice de polidispersión	0.21 ± 0.02	0.22 ± 0.03
ζ Potencial	27.5 ± 6.0 mV	31.90 ± 0.78 mV
Eficiencia de encapsulación	NA	97.0 ± 5.2 %

6.2 Ensayo de Hemo-Compatibilidad

En la tabla 6 se presentan los resultados obtenidos de la prueba de hemólisis realizada a las NSL vacías (libre de fármaco), a la doxorubicina libre (Dox-Libre) y a la formulación cargada con Doxorubicina (Dox-NSL). Como se detalla en la tabla, tanto la formulación libre de fármaco como la Dox-NSL presentaron un porcentaje de hemólisis menor al 2%, por lo que ambas muestras resultaron ser hemo-compatibles, constatando su seguridad para ser administradas vía intravenosa en los animales. Por otro lado, la doxorubicina presentó un porcentaje mayor al 5% de hemólisis.

Con respecto a los resultados visuales del ensayo, en la figura 6 se puede observar que tanto las formulaciones NSL vacías como Dox-NSL presentaron una compactación eritrocitaria similar a la del control negativo (solución PBS), es decir que no se presentó rompimiento de los eritrocitos en esas muestras. Por el contrario, las muestras de Dox-Libre no mostraron compactación celular en el fondo de los tubos, lo cual se confirmó al compararlo con el control positivo de Tritón-X100 al 0.5%.

Tabla No. 6. Resumen de resultados del ensayo de hemo-compatibilidad. n=3

Formulación/solución	Resultado	Rango	Interpretación
NSL vacía	0.0%	%Hemólisis <2%	No hemolítica
Dox-NSL (1 mg/mL)	0.0%	%Hemólisis <2%	No hemolítica
Dox-Libre (1 mg/mL)	25.0%	%Hemólisis >5%	Hemolítica

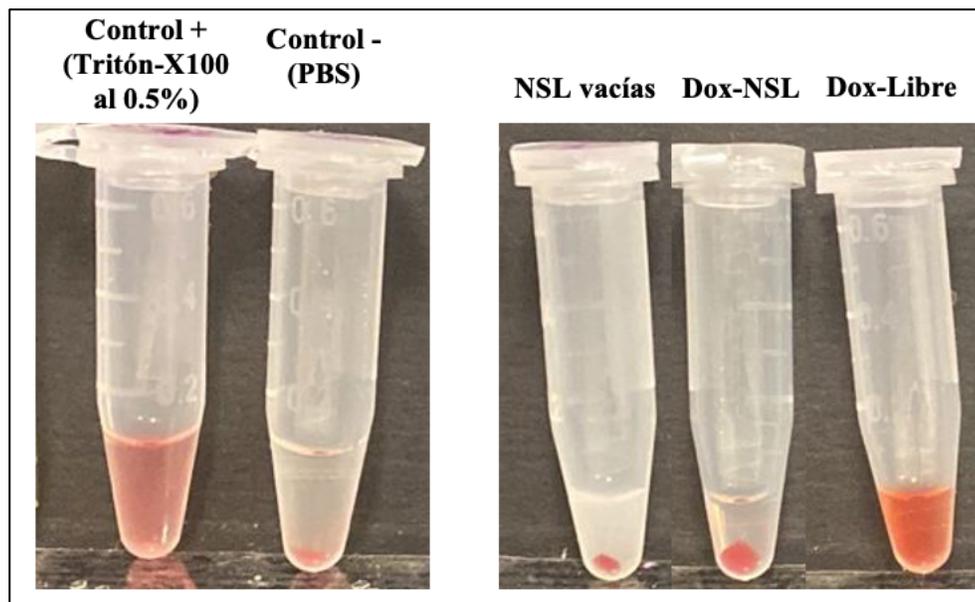


Figura 6. Resultados visuales del Ensayo de hemo-compatibilidad. Cada panel muestra la imagen representativa del ensayo de hemo-compatibilidad de cada tratamiento, el cual se realizó por triplicado para cada uno de los casos. (Control +: Tritón al 0.5%, Control -: PBS (1X)).

6.3 Implementación del Modelo ortotópico de cáncer de mama en ratones NOD/SCID.

Para poder determinar si las NSL desarrolladas lograban disminuir la velocidad de crecimiento tumoral y la aparición de metástasis a los pulmones se implementó un modelo ortotópico de cáncer de mama en ratones NOD/SCID. Los animales fueron inoculados en glándula mamaria inguinal y 7 semanas post-inoculación se evaluó la aparición de metástasis pulmonar por imágenes ópticas usando un marcador de fluorescencia cercano al infrarrojo. Como se puede observar la Figura 7.a, se puede apreciar una captación mayor del marcador en la zona pulmonar de los ratones inoculados con células tumorales en comparación con la imagen del ratón sano, estas se encuentran señaladas con las flechas color naranja, confirmando de esta manera la presencia de células cancerosas de mama a nivel pulmonar.

A manera de confirmar que lo observado en las imágenes de fluorescencia se trataba de células tumorales, se realizó un análisis histológico de los tejidos pulmonares de los ratones. Los cortes histológicos de la tinción de H&E (figura 7.b), mostraron que los pulmones de los ratones implantados con células de cáncer de mama presentaban mayor hiper celularidad, mayor formación de vasos sanguíneos y menor organización celular en comparación con el ratón sin tumor.

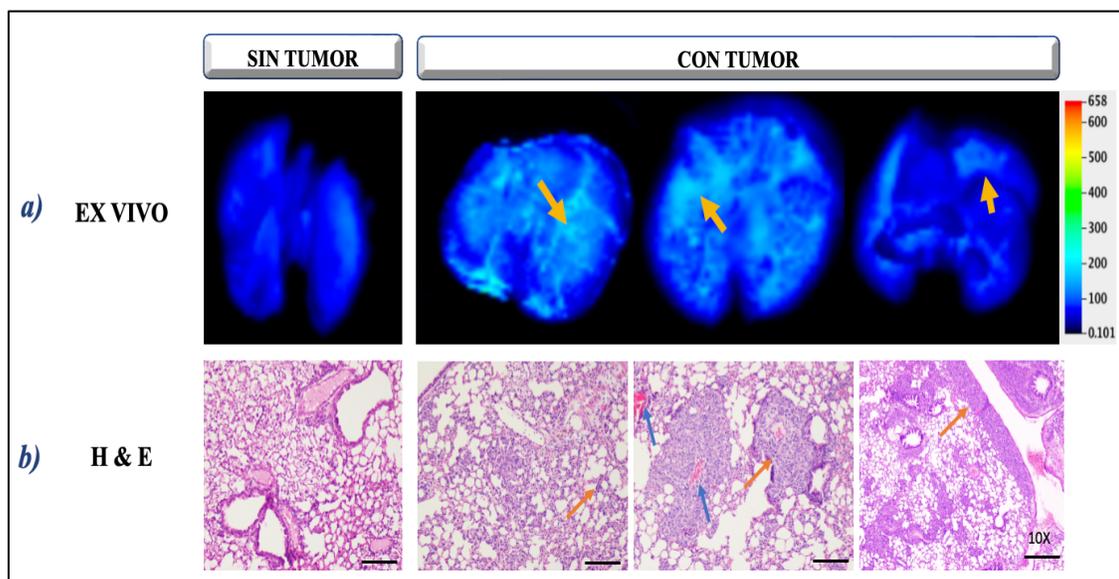
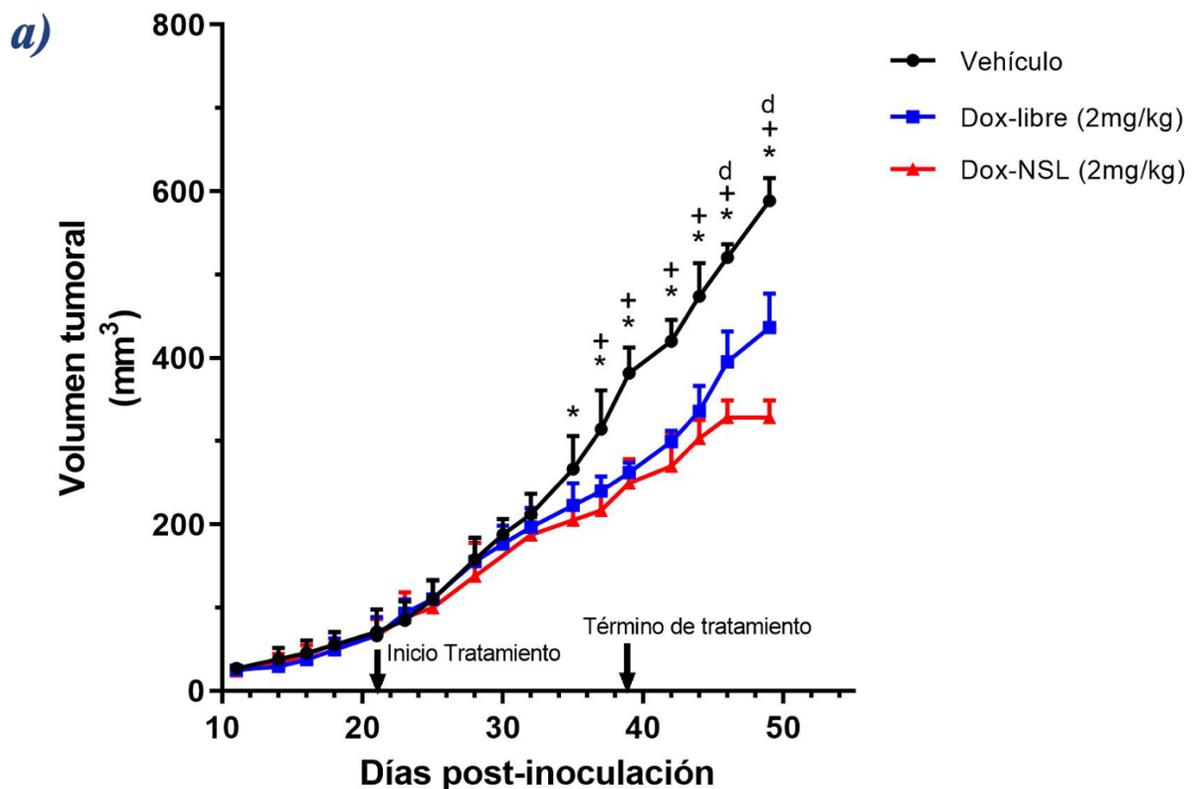


Figura 7. Resultados de la implementación del modelo ortotópico de cáncer de mama en ratones NOD/SCID. a) Panel de imágenes ex vivo de los pulmones extraídos a las 48 h post-administración del marcador IRDye 800CW RGD a las 7 semanas post-inoculación; las flechas naranjas indican las zonas donde hay mayor captación de marcador (Enfoque = 4.0 nm; resolución= 337 μ m y calidad de imagen media). b) Tinción de Eosina y Hematoxilina (H&E) en cortes histológicos de los pulmones ex vivo extraídos de los animales; las flechas naranjas indican algunas zonas de hiper celularidad y las flechas azules vasos sanguíneos.

6.4 Evaluación de la actividad farmacológica de Dox-NSL sobre el crecimiento tumoral.

Para evaluar la actividad farmacológica del nanosistema de Dox-NSL sobre la disminución del crecimiento tumoral, se midió el volumen del tumor primario implantado en la mama de los ratones durante 7 semanas. Con los datos obtenidos de este parámetro se construyó la gráfica de la Figura 8.a, en la que podemos observar una disminución del volumen tumoral en los tratamientos de Dox-Libre y Dox-NSL con respecto al grupo vehículo y a partir de la sexta semana existe una diferencia significativa entre Dox-Libre y Dox-NSL.

La figura 8.b muestra el tamaño de los tumores de los diferentes tratamientos, observándose que el tumor de Dox-NSL y Dox-libre es menor en comparación al del grupo vehículo; sin embargo, el grupo de Dox-NSL presentó un tamaño tumoral menor que el de Dox-libre.



b) Tumores *ex-vivo*

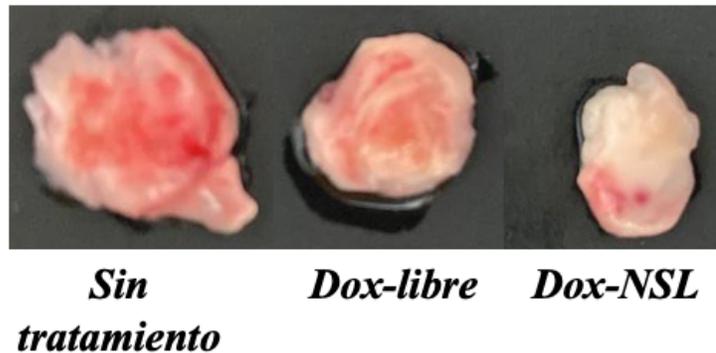


Figura 8. a) Gráfica de crecimiento tumoral en ratones hembra NOD/SCID con los diferentes tratamientos. i) Vehículo, ii) Dox-Libre y iii) Dox-NSL. Cada punto representa el promedio \pm DE. $n=5$. * Diferencia significativa entre el grupo vehículo y Dox-NSL. $p<0.05$. + Diferencia significativa entre el grupo vehículo y Dox-Libre. $p<0.05$. d Diferencia significativa entre los grupos de Dox-Libre Y Dox-NSL. $p<0.05$. b) Tumores ex vivo de los diferentes tratamientos.

6.5 Evaluación del peso corporal en los animales NOD/SCID durante los tratamientos.

Para evaluar la toxicidad sistémica de los distintos grupos de tratamientos se realizó un seguimiento del peso corporal de los animales, los resultados obtenidos se muestran en la figura 9. En la gráfica mostrada, se puede observar una disminución gradual del peso corporal de los animales del grupo de Doxorubicina libre durante todo el tratamiento, logrando observar una parcial recuperación del peso una vez se deja de administrar el tratamiento. Por el contrario, el grupo vehículo y Dox-NSL no mostraron una disminución del peso corporal mayor al 10%.

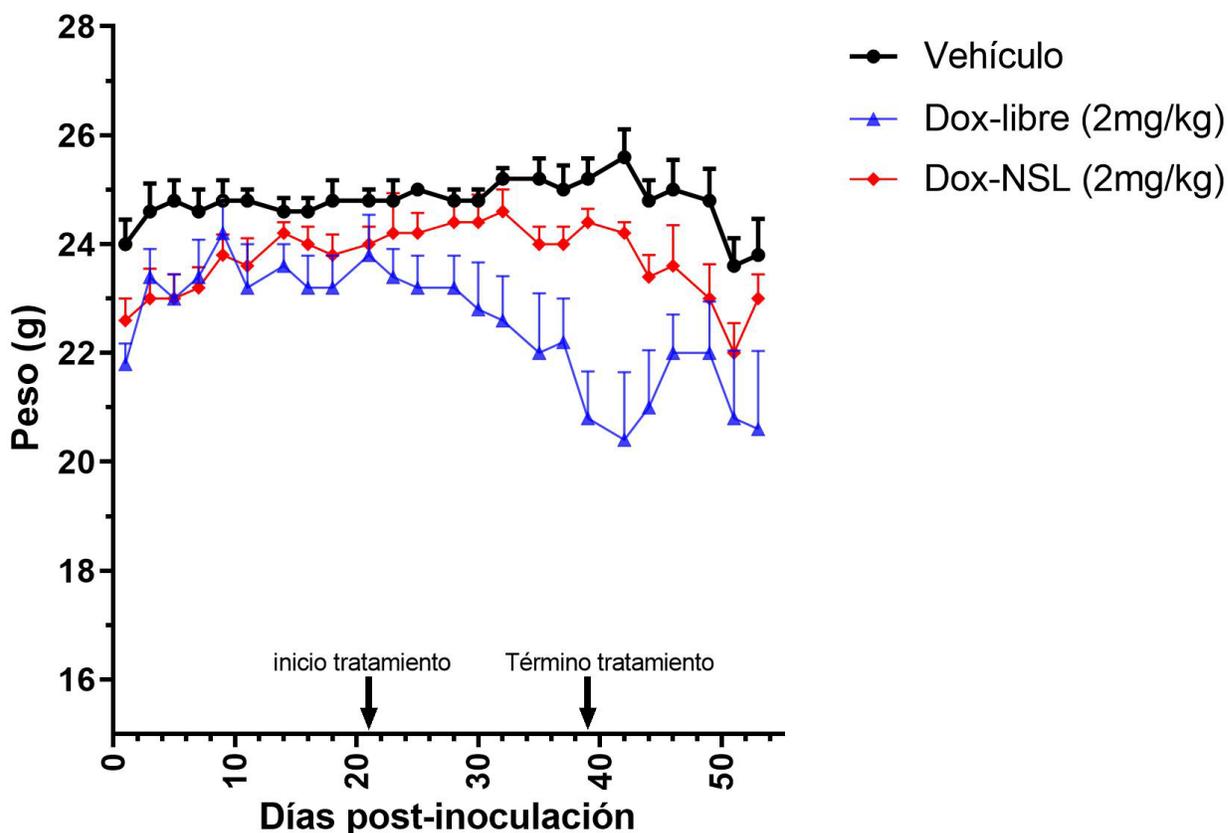


Figura 9. Registro de peso corporal de ratones NOD/SCID en los tres grupos de tratamientos. Cada punto representa el promedio de $n=5 \pm$ EEM.

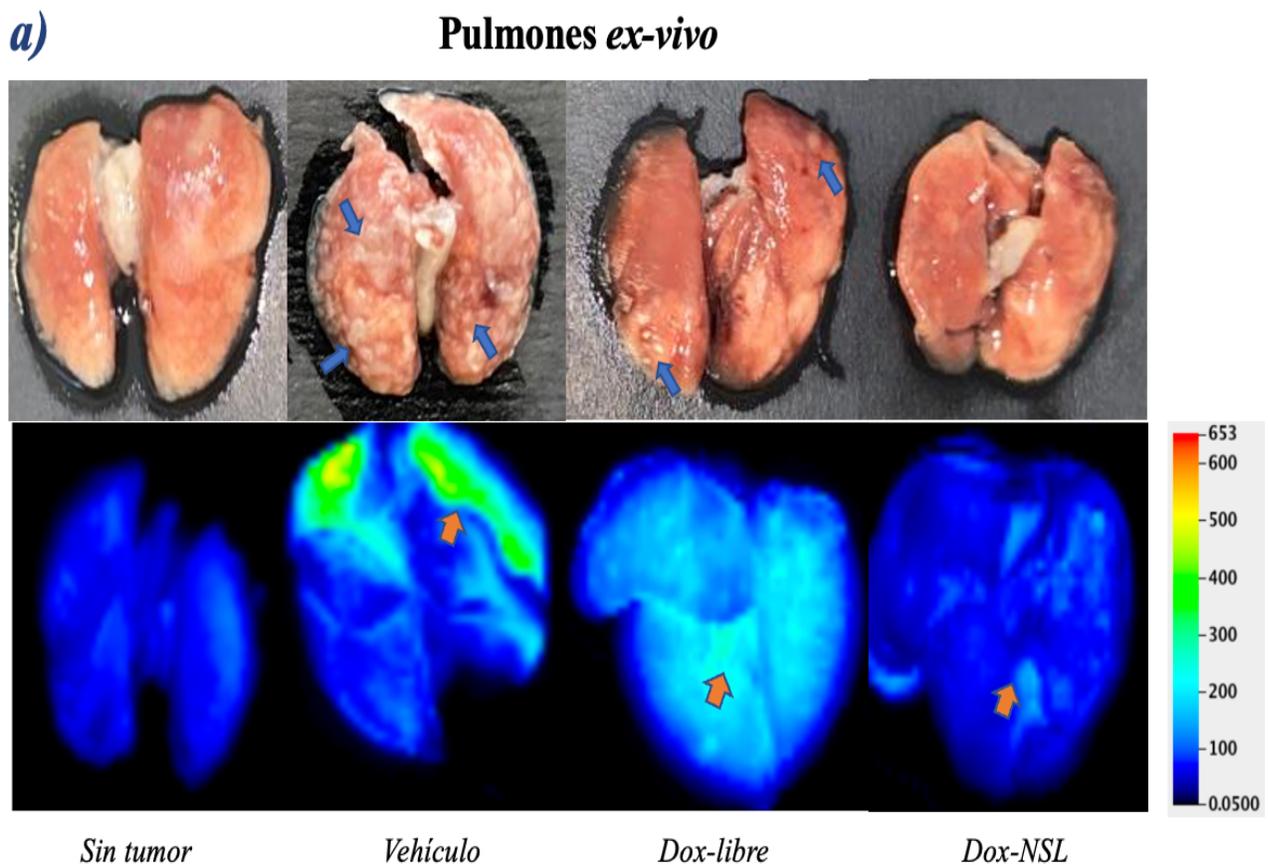
6.6 Evaluación de la actividad farmacológica de Dox-NSL sobre la metástasis pulmonar

Con la finalidad de evaluar el potencial de la Dox-NSL como tratamiento farmacológico para combatir a las células tumorales, también se evaluó su efecto para disminuir la metástasis pulmonar en el modelo ortotópico desarrollado. Para ello, posterior a las 8 semanas post-inoculación de las células de la línea celular MDA-MB-231 se administró el marcador fluorescente IRDye 800CW-RGD y pasadas las 48 h de su administración, se extrajeron los pulmones para su posterior análisis.

En la inspección visual de los pulmones ex vivo se observaron lesiones metastásicas en los pulmones del grupo vehículo y el grupo de Dox-libre. En el caso de los pulmones del grupo de Dox-NSL la presencia de nódulos metastásicos fue menor en comparación con los otros grupos (señalados con flechas de color azul en la figura 10.b).

Como se puede apreciar en las imágenes de la parte inferior de la figura 10, la intensidad de fluorescencia emitida por el marcador fue mayor en el grupo vehículo en comparación con el grupo de Dox-libre (señalados con las flechas de color naranja), mientras que los pulmones tratados con Dox-NSL presentan una intensidad de fluorescencia menor en comparación con los grupos vehículo y Dox-libre.

La intensidad emitida por el marcador IRDye 800CW-RGD se cuantificó, los resultados obtenidos se muestran en la figura 11b, los datos mostraron una diferencia significativa ($p < 0.05$) en la intensidad de fluorescencia de los pulmones del grupo Dox-NSL con respecto a los pulmones del grupo vehículo y el grupo tratado con Dox-Libre.



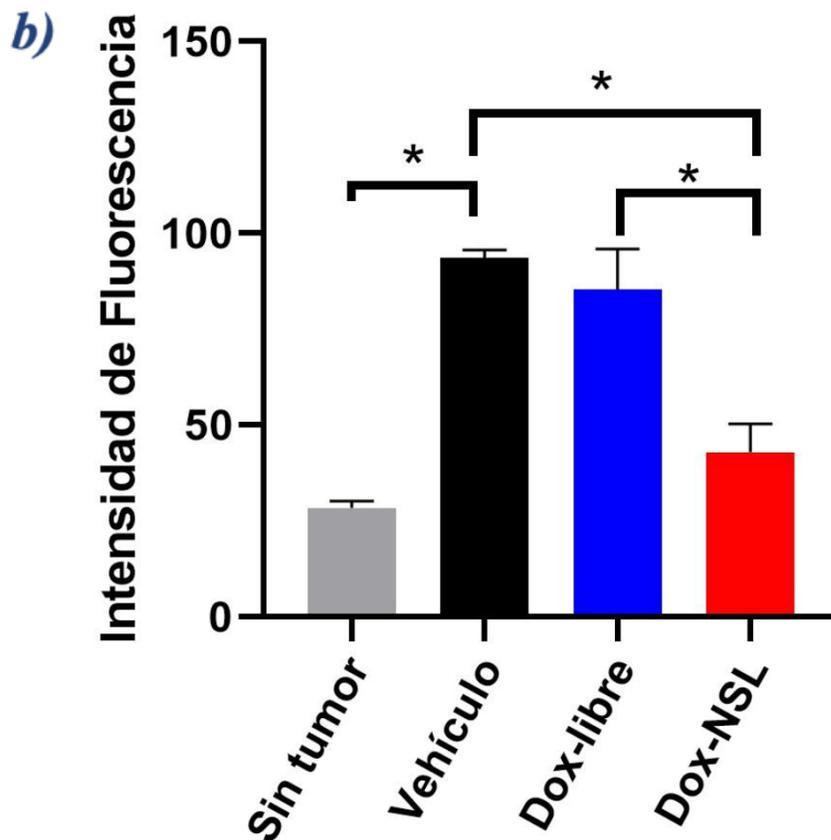


Figura 10. a) Imágenes NIRF y ex vivo de los pulmones de los distintos tratamientos al término del estudio; las flechas azules indican algunas zonas donde se pueden apreciar algunos nódulos metastásicos y las flechas naranjas las zonas donde hay una mayor captación del marcador. b) Gráfica de intensidad de fluorescencia emitida por el marcador IRDye 800CW RGD en los diferentes grupos de tratamiento, evaluados en el canal de 800 nm. (Enfoque = 4.0 nm; resolución = 337 μ m y calidad de imagen media). Cada barra representa el promedio \pm DE de tres animales. * Indica una diferencia significativa ($p < 0.05$).

7. DISCUSIÓN

El cáncer de mama continúa siendo la neoplasia maligna de mayor incidencia a nivel mundial, reportándose un incremento en sus tasas de mortalidad cada año (IARC, 2020). Este hecho ha requerido que las instituciones de salud pública a nivel global incrementen sus esfuerzos para brindar un diagnóstico y tratamiento oportuno para las y los pacientes con esta enfermedad, promoviendo a su vez campañas y programas especializados para su prevención y detección temprana.

Todos estos esfuerzos han contribuido de manera positiva para que miles de mujeres sean diagnosticadas en etapas tempranas de la enfermedad y en medida de lo posible puedan recibir un tratamiento oportuno. Sin embargo, en la práctica clínica el cáncer de mama sigue siendo un problema de salud difícil de abordar, ya que, aunque existen tratamientos que han comprobado su efectividad para eliminar a las células cancerosas, estos no tienen el mismo efecto en todos los pacientes (Waks & Winer, 2019). Además de esto, muchos de los tumores desarrollan resistencia farmacológica a los antineoplásicos, quedando sin alternativas terapéuticas para detener la progresión de las células tumorales, teniendo como resultado el desarrollo de etapas avanzadas de la enfermedad que culminan en la muerte (Astudillo et.al., 2010).

Por otro lado, el cáncer de mama triple negativo suele ser el de peor pronóstico y el más agresivo que se presenta en las pacientes, esto se debe a la baja o nula expresión de los receptores de estrógeno, progesterona o la proteína HER2+ que se utilizan como blancos terapéuticos de los tratamientos actuales (Alcaide et.al., 2021).

En ese sentido, la quimioterapia combinada con agentes antineoplásicos es la que presenta mayor eficacia en los pacientes de cáncer de mama triple negativo sobre todo en los primeros estadios de la enfermedad. Lamentablemente para los pacientes de este subtipo, la quimioresistencia a los antineoplásicos aparece rápidamente y representa el 90% del fracaso terapéutico (Nedeljković & Damjanović, 2019). A consecuencia de esto los pacientes tienen mayor probabilidad de recaídas y generar metástasis a otros órganos, principalmente a pulmón y cerebro (Wang et.al, 2016).

Todos estos inconvenientes que se presentan durante la terapia de pacientes con cáncer de mama triple negativo han incentivado a la búsqueda y desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas que nos permitan ofrecer un tratamiento más efectivo para combatir a las células cancerosas. Y aunque día con día nuevas moléculas aparecen con un potencial uso terapéutico dentro de la oncología, la mayoría de éstas se quedan en el camino por no poder demostrar su seguridad en sistemas vivos (Astudillo et.al., 2010).

Por esta razón, en los últimos años la industria farmacéutica y la medicina moderna han cambiado de horizonte hacia la nanotecnología, teniendo como resultado el nacimiento y auge de la nanomedicina (Bayón et. al., 2019). El desarrollo de esta disciplina ha generado que en la última década se hayan efectuado una infinidad de estudios e investigaciones centradas en el desarrollo y diseño de nuevos sistemas de administración de medicamentos de tamaño nanométrico, como lo son los liposomas, micelas, nanocápsulas, nano esferas, nanopartículas de óxidos metálicos y las nanopartículas basadas en lípidos como las NSL y las NLL (Rojas, et. al., 2016). Estos estudios han tenido historias de éxito como lo son los casos de Doxil® y Myocet®, nanosistemas hechos a base de liposomas que fueron aprobados por la FDA y la EMA respectivamente para su uso en el tratamiento de cáncer de mama y que actualmente se emplean dentro de la clínica (Anselmo & Mitragotri, 2019).

Las nanopartículas sólidas lipídicas se han convertido en una estrategia farmacológica prometedora para administrar fármacos antineoplásicos, ya que se ha reportado que estos nanosistemas mejoran las propiedades farmacológicas y farmacocinéticas de los fármacos que transportan (Scioli, 2020). Entre las ventajas que ofrecen estos nanosistemas se encuentra la capacidad de incorporar y transportar moléculas tanto hidrofílicas como hidrofóbicas, además de que las estructuras lipídicas que los constituyen presentan una alta estabilidad física y química proporcionando un perfil de liberación controlada y sostenida de los fármacos. Otras ventajas relevantes incluyen la disminución de la toxicidad y efectos adversos de los fármacos, además de ser sistemas biodegradables y biocompatibles con el ambiente (Ghasemiyeh & Mohammadi 2018).

Si bien las NSL prometen ser una potencial alternativa terapéutica, aún son pocos los estudios preclínicos que brindan información sobre la seguridad y eficacia del uso de estos nanosistemas en el tratamiento del cáncer de mama triple negativo y su eficacia para la disminución de la metástasis pulmonar. Es a partir de estos hechos, que surge el interés de este proyecto de desarrollar un nanosistema de NSL que encapsule un antineoplásico como la doxorubicina para evaluar su actividad farmacológica sobre la disminución de la metástasis pulmonar en un modelo ortotópico de cáncer de mama.

La primera parte de este estudio se centró en desarrollar formulaciones de Dox-NSL y evaluar sus propiedades fisicoquímicas. La caracterización fisicoquímica de los sistemas de nanopartículas sólidas lipídicas es necesaria para evaluar la estabilidad y calidad de las formulaciones (Duan, Y. et.al. 2020). En este estudio se evaluó el tamaño de partícula, el índice de polidispersión, el potencial zeta y la eficiencia de encapsulación (tabla 5).

En cuanto al tamaño de partícula nuestras formulaciones de Dox-NSL presentaron un diámetro promedio de 209.03 ± 6.5 nm. El tamaño de nuestro nanosistema se encuentra en el rango promedio del tamaño de partícula recomendado en la literatura para que los nanosistemas de NSL no sean reconocidos fácilmente por el sistema inmune, dicho rango se encuentra entre los 150-200 nm (Gastaldi, L. et. al. 2014). Esto podría tener implicaciones importantes en la eficacia terapéutica de nuestro nanosistema, ya que, con ese tamaño de partícula, las NSL tienen mayor oportunidad de llevar la doxorubicina hasta la vecindad tumoral para cumplir su función citotóxica sobre las células cancerosas.

En adición a esto, el índice de polidispersión obtenido fue de 0.22 ± 0.03 , un valor aceptable según lo reportado en la literatura (Chutoprapat, R., et.al. 2022), donde se reporta que un valor por debajo de 0.3 indica una homogeneidad en el tamaño de partícula, es decir, que nuestra formulación presenta una sola población predominante de partículas.

Los resultados de tamaño de partícula e índice de polidispersión obtenidos concuerdan con lo reportado por otros autores, Tahir y colaboradores, obtuvieron tamaños de partícula en un rango de los 182-208 nm y un índice de polidispersión menor a 0.16 en un nanosistema de doxorubicina encapsulada en Nanopartículas híbridas de polímeros lipídicos (Tahir, N. et.al. 2019).

Otro parámetro muy importante para conocer la estabilidad coloidal de las formulaciones de Dox-NSL fue la determinación del potencial zeta. En el caso particular de nuestro sistema que está constituido por un lípido catiónico como el DDAB, obtuvimos un valor de potencial positivo promedio de 31.90 ± 0.78 mV. En la literatura, se recomiendan valores de potencial Z mayores o iguales a ± 30 mV para asegurar la suficiente repulsión entre las partículas dentro de la suspensión para que esta sea estable (Scioli, 2020). Esto significa que nuestras nanopartículas cuentan con la suficiente repulsión electrostática para que se repelen entre sí, evitando así la agregación o coalescencia (Mishra, V. et. al. 2018.). Los valores reportados en la literatura sobre el potencial z de los nanosistemas varían según la carga de los lípidos que los constituyen, al comparar nuestra formulación con otros nanosistemas catiónicos, Zheng y colaboradores reportaron en el 2019, un potencial zeta de 35.6 ± 3.4 mV para un nanosistema de RGD-DOX cargadas en NSL, lo cual se asemeja mucho a los resultados encontrados en este estudio (Zheng, G. et.al., 2019).

En cuanto a la eficiencia de encapsulación, el valor promedio obtenido fue de 97.0 ± 5.2 %. Otros estudios con NSL reportan %EE >90%, ejemplo de ello es un estudio realizado por Zhao y colaboradores donde obtuvieron un porcentaje de encapsulación de 93.6 ± 2.7 % para un nanosistema de nanopartículas lipídicas cargadas con doxorubicina empleado para el tratamiento de cáncer de hígado (Zhao, X. et al. 2015), por lo que nuestra formulación mostró tener una alta capacidad de encapsulación.

Complementario a la caracterización fisicoquímica, se realizó un ensayo de hematocompatibilidad para constatar que nuestro sistema no causaría la hemólisis de los componentes celulares de la sangre y con ello evaluar si este sería seguro para ser administrado en los ratones. Los resultados arrojaron que el nanosistema de Dox-NSL no presentaba actividad hemolítica, pues presentó una hemólisis <2% en el ensayo de hemocompatibilidad, se ha demostrado que para que un sistema sea considerado como no hemocompatible debe de presentar una hemólisis mayor al 5% (Barry, N. et.al, 2018). Por lo que nuestro resultado fue un criterio cuantitativo que demostró que nuestra nanoformulación era segura para ser administrada en los animales.

Los resultados del ensayo de hemo compatibilidad también evidenciaron que el nanosistema de Dox-NSL disminuyó considerable la toxicidad de la Doxorubicina libre, pues como se presenta en la tabla No.7 la doxorubicina presentó una hemólisis >5%, algo que era de esperarse pues se ha reportado en ensayos in vitro que la doxorubicina puede causar hemólisis por encima del 10% a partir de concentraciones de 0.2 mg/mL (Shuai, X. et.al. 2004). Los datos obtenidos de este ensayo respaldan las evidencias que se han reportado sobre el efecto positivo que tienen las nanopartículas sólidas lipídicas para disminuir los efectos tóxicos de los fármacos que transportan (Bayón, L. et. al. 2019).

La segunda parte de este estudio tuvo como objetivo generar un modelo animal ortotópico de cáncer de mama que desarrollara metástasis a pulmón, para ello se emplearon células tumorales humanas de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231). Para estandarizar el modelo de metástasis pulmonar, se adquirieron imágenes moleculares 7 semanas post-inoculación de las células tumorales. Los resultados obtenidos de las imágenes de fluorescencia (figura 7), muestran que los animales inoculados con las células tumorales lograron generar un patrón de metástasis a pulmón en un tiempo aproximado de siete semanas post-inoculación. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por otros autores, un ejemplo de ello es un estudio realizado por Jenkins y colaboradores que desarrollaron un modelo ortotópico de cáncer de mama empleando las células MDA-MB-231, ellos observaron metástasis en los ganglios linfáticos y los pulmones a las seis y nueve semanas post-inoculación, respectivamente (Jenkins, 2005).

Estos resultados fueron corroborados en los pulmones ex vivo donde los pulmones de los ratones inoculados con células cancerosas mostraron una mayor captación del marcador tumoral IRDye 800CW RGD con respecto a los ratones sanos. Este aumento en la intensidad de fluorescencia es resultado de la distribución del marcador en la zona pulmonar debido a su acoplamiento con la integrina $\alpha v \beta 3$ con la cual tiene una alta afinidad de unión (Huang, 2012). Esta integrina es una proteína que se encuentra sobreexpresada en la mayoría de las células cancerosas (Cheng, 2005), por lo que este aumento en la intensidad de fluorescencia en el tejido pulmonar comprueba la migración de las células tumorales de la glándula mamaria a los pulmones de los ratones NOD/SCID.

Complementario a estos resultados, el análisis histológico de los tejidos pulmonares de los ratones mostrados en la parte inferior del panel (Figura 7.b), mostraron que los pulmones provenientes de los ratones inoculados con células tumorales presentaban mayor hipercelularidad, mayor formación de vasos sanguíneos y menor organización celular en comparación con los pulmones de los ratones sanos. Estas características celulares son propias de las células cancerosas, se ha reportado que las células cancerosas se caracterizan por una morfología irregular con núcleos grandes y predominantes y un citoplasma escaso, lo que se refleja con una coloración púrpura predominante en la tinción de H&E por la afinidad de los componentes nucleares con la hematoxilina (Baba 2007, Fischer 2008). Por otro lado, la presencia de vasos sanguíneos en las imágenes histológicas pulmonares comprueba el patrón metastásico pulmonar ya que como se ha reportado en la literatura la formación de nuevos vasos sanguíneos, también llamada angiogénesis, es un factor determinante para el desarrollo, diseminación y la generación de metástasis en las neoplasias malignas (Baba 2007, Thoenes 1973).

Los resultados en conjunto con las imágenes NIRF y los estudios de histología demuestran un modelo reproducible para generar un patrón de metástasis pulmonar en ratones NOD/SCID.

Una vez desarrollado un modelo animal adecuado y haber comprobado buenas propiedades fisicoquímicas del nanosistema de NSL desarrollado, se procedió a evaluar su efecto sobre el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis pulmonar en los ratones.

El seguimiento del volumen tumoral mostró (Figura 8.a) que los animales tratados con Dox-Libre y Dox-NSL tuvieron una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la velocidad de crecimiento del tumor primario en comparación con el grupo vehículo, este resultado se logró apreciar a partir de la última semana de tratamientos, aproximadamente a los 37 días post-inoculación. Esto demostró, que la Doxorubicina aún encapsulada en NSL lograba ejercer su efecto citotóxico sobre las células cancerosas de cáncer de mama.

En el caso de los animales tratados con el fármaco libre, una vez que se dejó de administrar la Doxorubicina la velocidad de crecimiento del tumor comenzó a aumentar, caso contrario a los animales tratados con la doxorubicina encapsulada en las NSL, ya que, en el caso de este grupo, una vez que se dejó de administrar la nanoformulación se logró observar un estancamiento en el crecimiento tumoral.

Este resultado, sugiere que el efecto antitumoral de la doxorubicina cuando se encuentra encapsulada en NSL persiste en el organismo aún después de que este deja de administrarse, lo cual respalda una de las ventajas más grandes de la utilización de estos nanosistemas, pues las NSL han reportado proporcionar un perfil de liberación sostenido y controlado de los fármacos que transportan (Ghasemiyeh, 2018). Aunado a lo antes mencionado, los tumores ex vivo de los ratones tratados con Dox-NSL mostraron un tamaño tumoral menor en comparación con los tumores extraídos de los grupos vehículo y Dox-Libre, lo cual confirmó de manera visual que nuestro nanosistema disminuyó el volumen tumoral en los ratones NOD/SCID y con ello que mejora el efecto antitumoral de la doxorubicina cuando se encapsula en NSL.

Los resultados del efecto antitumoral de nuestro nanosistema de Dox-NSL concuerdan con los resultados obtenidos por otros nanosistemas que encapsulan doxorubicina en NSL. Un ejemplo de estos es un nanosistema de RGD-Dox-NSL desarrollado por Zheng y colaboradores, Ellos demostraron que su nanosistema de RGD-Dox-NSL logró mostrar una mayor inhibición del crecimiento tumoral en comparación de sólo administrar la doxorubicina libre, ellos se lo atribuyen a una mayor acumulación de las nanopartículas en la vecindad tumoral y una encapsulación efectiva de la Doxorubicina en las cadenas lipídicas de su nanosistema (Zheng, 2019).

La monitorización de los pesos corporales de los ratones durante el estudio fue necesaria para evaluar la toxicidad sistémica de los tratamientos. Como se muestra en la figura 9, una vez que se inició con la administración intravenosa de los tratamientos, los animales del grupo de doxorubicina libre tuvieron una reducción gradual en el peso corporal, alcanzando una pérdida máxima promedio de casi el 18%, un valor muy cercano al límite permitido de variación de peso de $\pm 20\%$ (OECD, 2023). Por el contrario, no se observó ningún cambio aparente en el peso corporal de los animales tratados con Dox-NSL, lo cual nos indica que la toxicidad sistémica asociada a la doxorubicina libre disminuye considerablemente cuando esta se encuentra encapsulada en las NSL. Este resultado es particularmente interesante, pues no sólo respalda los hechos que han demostrado que las NSL disminuyen los efectos tóxicos de los fármacos que transportan (Scioli, 2020) sino que también muestra la potencial aplicación clínica que pueden tener las NSL para la administración de fármacos como la doxorubicina, ya que su uso como antineoplásico siempre ha estado limitado en gran medida a los efectos tóxicos a los que se asocia, como lo son la cardiotoxicidad o la nefrotoxicidad (Gammella, 2014).

Finalmente, como uno de los ejes más relevantes de nuestro estudio se evaluó la actividad farmacológica que tenía nuestro sistema de Dox-NSL para disminuir la metástasis pulmonar que se deriva del cáncer de mama, ya que los pulmones son uno de los órganos donde principalmente se propagan las células cancerosas en la etapa metastásica de los carcinomas de mama (Neuman, 2015).

Las imágenes de los pulmones ex vivo (figura 10.a) evidenciaron que, a diferencia de los pulmones de los ratones sanos, los del grupo vehículo tenían muchos nódulos metastásicos. Por el contrario, los pulmones de los ratones tratados con Dox-Libre y Dox-NSL mostraron una reducción considerable de lesiones metastásicas, siendo los pulmones del grupo de Dox-NSL los que prácticamente no presentaban nódulos metastásicos y la apariencia del tejido era muy similar a la de los pulmones del grupo de los ratones sanos. Estos resultados sugieren, que Dox-NSL tiene una mayor capacidad para disminuir o inhibir la metástasis pulmonar que el fármaco libre, y en conjunto con los resultados de tamaño tumoral, se puede afirmar que nuestro nanosistema de Dox-NSL tiene un papel importante en la disminución de la progresión tumoral en los ratones NOD/SCID.

Se ha reportado que la encapsulación de fármacos como paclitaxel, etopósido y Docetaxel en NSL son nanosistemas efectivos contra la metástasis que se deriva de distintos tipos de cáncer. Un ejemplo de ello, es un nanosistema de NSL con Docetaxel encapsulado que demostró inhibir la metástasis pulmonar con mayor eficacia que el Docetaxel libre en un modelo de cáncer de mama en ratones 4T1, este estudio no sólo demostró la eficacia de las NSL para disminuir la metástasis sino que también mostró resultados que hacían evidente su papel para prevenir su aparición (Rocha, 2020).

Aunado a esto, la metástasis pulmonar se confirmó y evaluó mediante el análisis de intensidad de fluorescencia de los pulmones ex-vivo. Las imágenes NIRF de los pulmones, comprobaron de manera cuantitativa que existía una diferencia significativa en la intensidad de fluorescencia entre el grupo de Dox-NSL con respecto a los grupos vehículo y Dox-Libre, este resultado evidenció una disminución en la progresión metastásica pulmonar de los ratones que fueron tratados con Dox-NSL, es decir, que la intensidad de fluorescencia emitida por el marcador en los pulmones de los ratones pertenecientes a este grupo fue menor en comparación al grupo vehículo y el grupo de Dox-Libre. Estos datos confirmaron la actividad farmacológica que tiene nuestro nanosistema de Dox-NSL para disminuir la metástasis pulmonar que se deriva del cáncer de mama en los ratones NOD/SCID.

Si bien, anteriormente otros estudios de doxorubicina encapsulada en NSL ya han establecido la eficacia antitumoral de estos nanosistemas en modelos de cáncer de mama, nuestro estudio se ha centrado en el efecto de Dox-NSL sobre la disminución de la metástasis pulmonar, ya que, aunque existen estudios al respecto, estos se centran en el estudio de otros antineoplásicos (Rocha, 2020) o en la metástasis que se deriva de otras neoplasias malignas como los melanomas (Valdivia, 2021). En ese sentido, nuestro nanosistema no sólo demostró tener efecto para disminuir la metástasis pulmonar que se deriva del cáncer de mama, sino que también aporta un nanosistema de nanopartículas sólidas lipídicas con excelentes propiedades fisicoquímicas con un gran potencial para seguir siendo estudiado.

Aunque la Doxorubicina es uno de los principales fármacos para tratar el cáncer de mama, su uso no se limita únicamente a esta neoplasia maligna. De hecho, otros nanosistemas de Dox encapsulada en NSL han demostrado esto, tal es el caso de un nanosistema de Bn-DOX/SLN que demostró disminuir el crecimiento tumoral en ratones BALB/c con tumores gástricos (Wang, 2015). Lo antes mencionado, abre la posibilidad a nuestro nanosistema a ser evaluado no sólo en tumores de mama sino a otros tumores en los que la doxorubicina se emplea como tratamiento como lo son el cáncer de ovario, vejiga, estómago o tiroides (Johnson, 2017).

En resumen, el nanosistema de Dox-NSL mostró incrementar el efecto antitumoral de la Doxorubicina sobre las células cancerosas de cáncer de mama, así como de tener un efecto farmacológico sostenido, lo cual tuvo como consecuencia una disminución considerable en la aparición espontánea de la metástasis pulmonar. También, se logró observar una reducción en la toxicidad sistémica de la Doxorubicina cuando esta se encontraba encapsulada en nuestro sistema de NSL. Esto hace evidente que la nanotecnología puede contribuir en gran medida a mejorar las propiedades farmacocinéticas de los fármacos y hacer de las terapias intervenciones más seguras, además de contribuir en gran medida mediante el desarrollo de nanosistemas de administración como las NSL a inhibir o detener la progresión tumoral de muchos tipos de cáncer y, al mismo tiempo, prevenir la aparición de metástasis.

8. CONCLUSIÓN

Los resultados mostraron que el nanosistema de NSL cargado con Doxorubicina presentó buenas propiedades fisicoquímicas, mostrando una alta actividad farmacológica para la disminución del tamaño tumoral y la metástasis pulmonar derivada del cáncer de mama.

9. FUENTES DE CONSULTA

1. Abdel-Mageed, H. et. al. (2022). The tiny big world of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: an updated review. *Journal of microencapsulation*, 39(1), 72–94. <https://doi.org/10.1080/02652048.2021.2021307>
2. Akram, M. et. al. (2017). *Awareness and current knowledge of breast cancer*. *Biological Research*, 50(1). doi:10.1186/s40659-017-0140-9
3. Alcaide, L. et.al. (2021). *Clasificación actual del cáncer de mama. Implicación en el tratamiento y pronóstico de la enfermedad*. *Cir Andal*, 32(2):155-59. doi:10.37351/2021322.9
4. Almansour, N. (2022). Triple-Negative Breast Cancer: A Brief Review About Epidemiology, Risk Factors, Signaling, Pathways, Treatment and Role of Artificial Intelligence. *Front. Mol. Biosci*. 9:836417. doi: 10.3389/fmolb.2022.836417
5. Anderson, B. et. al. (2008). *Guideline implementation for breast healthcare in low-income and middle-income countries*. *Cancer*, 113(S8), 2221–2243. doi:10.1002/cncr.23844
6. Anselmo, A. & Mitragotri, S. (2019). *Nanoparticles in the clinic: An update*. *Bioengineering & translational medicine*, 4(3), e10143. <https://doi.org/10.1002/btm2.10143>
7. Astudillo, H. et. al. (2010). *El papel de la quimiorresistencia en los tumores sólidos*. Elsevier, 9 (3), 117-126. Recuperado el 03/01/2023 de: <https://www.elsevier.es/es-revista-gaceta-mexicana-oncologia-305-articulo-el-papel-quimiorresistencia-tumores-solidos-X1665920110543914>
8. ATCC. (2023). *MDA-MB-231*. Recuperado el 02/02/2023 de: <https://www.atcc.org/products/htb-26>.
9. Baba, A. (2007). *Oncología Comparativa*. Bucarest (RO): La Editorial de la Academia Rumana; 2007. Capítulo 3, MORFOLOGÍA DE CÉLULAS TUMORALES. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9553/>
10. Barry, W. et.al (2019). Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1682, DOI:10.1007/978-1-4939-7352-19.
11. Bayón, L. et. al. (2019). *Application of Solid Lipid Nanoparticles to Improve the Efficiency of Anticancer Drugs*. *Nanomaterials*, 9(3), 474. doi:10.3390/nano9030474
12. Bondi, M. L., & Craparo, E. F. (2010). *Solid lipid nanoparticles for applications in gene therapy: a review of the state of the art*. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 7(1), 7–18. doi:10.1517/17425240903362410
13. Chang, J. et.al. (2019). A Deep Learning Model Based on Sparse Auto-Encoder for Prioritizing Cancer-Related Genes and Drug Target Combinations. *Carcinogenesis* 40, 624–632. doi:10.1093/carcin/bgz044
14. Chen, K., & Chen, X. (2011). *Positron Emission Tomography Imaging of Cancer Biology: Current Status and Future Prospects*. *Seminars in Oncology*, 38(1), 70–86. doi:10.1053/j.seminoncol.2010.11.005

15. Chen, M. *et al.* (2017). *Comparison of patterns and prognosis among distant metastatic breast cancer patients by age groups: a SEER population-based analysis*. *Sci Rep* 7, 9254. doi: 10.1038/s41598-017-10166-8
16. Cheng, Z. *et al.* (2005). *Near-Infrared Fluorescent RGD Peptides for Optical Imaging of Integrin $\alpha\beta 3$ Expression in Living Mice*. *Bioconjugate Chemistry*, 16(6), 1433–1441. doi:10.1021/bc0501698
17. Chutoprapat, R. *et al.* (2022). A Mini-Review on Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Topical Delivery of Phytochemicals for the Treatment of *Acne Vulgaris*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(11), 3460. <https://doi.org/10.3390/molecules27113460>
18. Coleman, M. *et al.* (2008). *Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD)*. *The Lancet Oncology*, 9(8), 730–756. doi:10.1016/s1470-2045(08)70179-7
19. Dent, R. *et al.* (2007). Triple-negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clin. Cancer Res.* 13, 4429–4434. doi:10.1158/1078-0432.ccr-06-3045
20. DrugBank. (2023). Doxorubicin: Uses, Interactions and Mechanism of action. Recuperado el 07/02/2023 de: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00997>
21. Duan, Y. *et al.* (2020). A brief review on solid lipid nanoparticles: part and parcel of contemporary drug delivery systems. *RSC advances*, 10(45), 26777–26791. <https://doi.org/10.1039/d0ra03491f>
22. Eng, L. *et al.* (2016). *Ten-year survival in women with primary stage IV breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 160, 145-152. <https://doi.org/10.1007/s10549-016-3974-x>
23. Fairhurst, D., & Weiner, B. (2023). A guide to determination of particle size- Making effective and reliable measurement. Brookhaven Instruments. Recuperado el 29/01/2023 de: <https://www.brookhaveninstruments.com/wp-content/uploads/2021/02/guide-determination-of-particle-size-brookhaven-instruments-new.pdf>
24. Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., & Zeller, R. (2008). Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH protocols*, 2008, pdb.prot4986. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4986>
25. Gammella, E. *et al.* (2014). The role of iron in anthracycline cardiotoxicity. *Frontiers in pharmacology*, 5, 25. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00025>
26. Gastaldi, L. *et al.* (2014). *Solid lipid nanoparticles as vehicles of drugs to the brain: Current state of the art*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2014, 87, 433–444.
27. Ghasemiyeh, P., & Mohammadi-Samani, S. (2018). *Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages*. *Research in pharmaceutical sciences*, 13(4), 288–303. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.235156>
28. Huang, R. *et al.* (2012). *Integrin $\alpha\beta 3$ -targeted IRDye 800CW near-infrared imaging of glioblastoma*. *Clinical Cancer Research*, 18(20), 5731–5740. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0374.
29. IARC. (2020). Globocan 2020: Global. Cancer Today- Global Cancer Observatory. Recuperado el 03/01/2023 de: <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-populations>
30. IARC. (2020). Globocan 2020: México. Cancer Today- Global Cancer Observatory Recuperado el 03/01/2023 de: <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-populations>
31. Jenkins, D. *et al.* (2005). *Bioluminescent human breast cancer cell lines that permit rapid and sensitive in vivo detection of mammary tumors and multiple metastases in immune deficient mice*. *Breast Cancer Research*, 7(4). doi:10.1186/bcr1026

32. Johnson, K. & Dubey, R. Doxorubicin. [Actualizado el 8 de agosto de 2022]. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459232/>
33. Kohler, B. et al. (2015). Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/ethnicity, Poverty, and State. *J. Natl. Cancer Inst.* 107, djv048. doi:10.1093/jnci/djv048
34. Lee, V. (2022). *Metastatic Breast Cancer*. Recuperado el 18/01/2023 de: <https://www.breastcancer.org/types/metastatic#articleEndAdvisors>
35. Lv, Z. et al. (2022). Metastasis patterns and prognosis of octogenarians with metastatic breast cancer: A large-cohort retrospective study. *PLoS ONE* 17(2): e0263104. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263104>
36. MacDonald, I., Nixon, N. A., & Khan, O. F. (2022). Triple-Negative Breast Cancer: A Review of Current Curative Intent Therapies. *Current Oncology*, 29(7), 4768–4778. <https://doi.org/10.3390/curroncol29070378>
37. Mendonça, M. et al. (2019). *The in vivo toxicological profile of cationic solid lipid nanoparticles*. *Drug Delivery and Translational Research*. doi:10.1007/s13346-019-00657-8
38. Merino, J. et al. (2017). *El cáncer de mama en el siglo XXI: de la detección precoz a los nuevos tratamientos*. *Radiología*, 59 (5), 368-379. doi:10.1016/j.rx.2017.06.003
39. Mersin, H. et al. (2008). The Prognostic Importance of Triple Negative Breast Carcinoma. *The Breast* 17, 341–346. doi:10.1016/j.breast.2007.11.031
40. Mishra, V. et al. (2018). Solid Lipid Nanoparticles: Emerging Colloidal Nano Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics*, 10(4), 191. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040191>
41. Musielak, E. et al. (2022). *Optimization of the Conditions of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) Synthesis*. *Molecules*, 27(7), 2202. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27072202>
42. Nedeljković, M., & Damjanović, A. (2019). Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer-How We Can Rise to the Challenge. *Cells*, 8(9), 957. <https://doi.org/10.3390/cells8090957>
43. Nguyen, D. & Massagué, J. (2007). Genetic Determinants of Cancer Metastasis. *Nat. Rev. Genet.* 8, 341–352. doi:10.1038/nrg2101.
44. Noone, A. et al. (2018). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2015, National Cancer Institute*. Recuperado el 18/01/23 de: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/
45. OECD. (2023). OECD Guideline for testing of chemicals. Recuperado el 22/05/2023 de: https://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_TG478_Revision_Sept_2013.pdf
46. Parhi, R., & Suresh, P. (2012). Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles-a review. *Current drug discovery technologies*, 9(1), 2–16. <https://doi.org/10.2174/157016312799304552>
47. Paulus, M. et al. (2000). *High resolution X-ray computed tomography: an emerging tool for small animal cancer research*. *Neoplasia*, 2 (1-2), 62–70.
48. Rashid, O. M., & Takabe, K. (2015). Animal models for exploring the pharmacokinetics of breast cancer therapies. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 11(2), 221–230. <https://doi.org/10.1517/17425255.2015.983073>
49. Reske, S. (2001). *FDG-PET for clinical use*. *Eur J Nucl Med* 2001;28(11):1707–23.
50. Rocha, M. et al. (2020). Docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles prevent tumor growth and lung metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells. *J Nanobiotechnol* 18, 43 <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00604-7>
51. Rojas, Y. et al. (2016). *La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la revolución de la terapia contra el cáncer?* *Educación química*, 27(4), 286-291. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2016.07.002>

52. Sastri, K. et.al. (2020). Solid lipid nanoparticles: Preparation techniques, their characterization, and an update on recent studies. *J Appl Pharm Sci*, 2020; 10(06):126-141. doi:10.7324/JAPS.2020.10617
53. Scioli, S. (2020). *Solid Lipid Nanoparticles for drug Delivery: Pharmacological and Biopharmaceutical Aspects*. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7. doi:10.3389/fmolb.2020.587997
54. Shuai, X. et.al. (2004). *Micellar carriers based on block copolymers of poly(ϵ -caprolactone) and poly(ethylene glycol) for doxorubicin delivery*. *Journal of Controlled Release*, 98(3), 415–426. doi:10.1016/j.jconrel.2004.06
55. Silva, A. et.al. (2019). *Soft Cationic Nanoparticles for Drug Delivery: Production and Cytotoxicity of Solid Lipid Nanoparticles (SLNs)*. *Applied Sciences*, 9(20), 4438. doi:10.3390/app9204438
56. Tahir, N. et.al. (2019). Lipid-polymer hybrid nanoparticles for controlled delivery of hydrophilic and lipophilic doxorubicin for breast cancer therapy. *Int J Nanomedicine*. 2019; 14:4961-4974. <https://doi.org/10.2147/IJN.S209325>
57. Thi, T. et.al. (2021). *Lipid-Based Nanoparticles in the Clinic and Clinical Trials: From Cancer Nanomedicine to COVID-19 Vaccines*. *Vaccines*, 9(4), 359. doi:10.3390/vaccines9040359
58. Thoenes, W. (1973). Zytoplasmatische Aspekte der Onkozytologie (Referat) [Cytoplasmic aspects in oncocytopathology (report) (author's transl)]. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie*, 57, 61–81.
59. Thorn, C. et.al. (2011). *Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects*. *Pharmacogenetics and genomics*, 21(7), 440–446. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833ffb56>
60. Valdivia, L. et. al. (2021). Solid Lipid Particles for Lung Metastasis Treatment. *Pharmaceutics*, 13(1), 93. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010093>
61. Waks, A. & Winer, E. (2019). Breast Cancer Treatment. *JAMA*, 321(3), 288. doi:10.1001/jama.2018.19323
62. Wang, C. et.al (2015). Breast cancer targeted chemotherapy based on doxorubicin-loaded bombesin peptide modified nanocarriers. *Drug Delivery*, 23(8), 2697–2702. doi:10.3109/10717544.2015.1049721
63. Wang, H. et.al. (2016). *The prognosis analysis of different metastasis pattern in patients with different breast cancer subtypes: a SEER based study*. *Oncotarget*, 8(16). doi:10.18632/oncotarget.14300
64. Wang, Z. et.al. (2017). *Use of Imaging for Preclinical Evaluation. A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development*, 921–938. doi:10.1016/b978-0-12-803620-4.00035-9
65. Wellstein, A. et.al. (2017). Cytotoxic drugs. Brunton L.L., & Hilal-Dandan R, & Knollmann B.C.(Eds.), *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 13e. McGraw Hill.
66. Zeichner, S. et.al. (2016). A Review of Systemic Treatment in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Breast Cancer (Auckl)* 10, 25–36. doi:10.4137/BCBCR.S32783
67. Zhang, G. et.al. (2019). Orthotopic Injection of Breast Cancer Cells into the Mice Mammary Fat Pad. *J. Vis. Exp.* (143), e58604, doi:10.3791/58604.
68. Zhao, X. et. al (2015). Codelivery of doxorubicin and curcumin with lipid nanoparticles results in improved efficacy of chemotherapy in liver cancer. *Int J Nanomedicine*. 2015;10 (1):257-270. <https://doi.org/10.2147/IJN.S73322>

69. Zheng, G. et.al. (2019). *Improving breast cancer therapy using doxorubicin loaded solid lipid nanoparticles: Synthesis of a novel arginine-glycine-aspartic tripeptide conjugated, pH sensitive lipid and evaluation of the nanomedicine in vitro and in vivo*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 116, 109006. doi:10.1016/j.biopha.2019.109006