Universidad de Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo fin de Máster

Estudio de la encapsulación de metalofármacos y su efecto sobre el trasporte celular

Lucía Gutiérrez Romero

Oviedo, Julio, 2019

Índice

1. Abreviaturas y simbología ……..1
2. Prólogo ……2
3. Introducción ……3
3.1. Empleo de metalofármacos en el tratamiento contra el cáncer..... 3
3.2. Metalofármacos basados en platino: cisplatino y oxaliplatino 5
3.3. Mejora en la eficacia de incorporación de metalofármacos: terapias dirigidas. 11
3.4. La ferritina como vehículo para la encapsulación de metalofármacos. 14
4. Objetivos ……18
5. Metodología experimental ……19
5.1. Material y reactivos. 19
5.2. Instrumentación..... 21
5.3. Procedimientos experimentales 24
5.3.1. Encapsulación de los metalofármacos de platino. 24
5.3.2. Condiciones para tratamiento de cultivos celulares. 25
5.3.3. Digestión de las células tratadas en los cultivos celulares. 26
6. Resultados y discusión ……27
6.1. Optimización de condiciones de encapsulación: control y seguimiento por HPLC-UV y HPLC-ICP-MS. 27
6.2. Cuantificación de cisplatino y oxaliplatino encapsulado. Estudio y comparación de resultados..... 33
6.3. Estudio de incorporación del fármaco desde nanoestructura proteica: evaluación cuantitativa de incorporación en el interior celular vía FIA-ICP-MS. 35
7. Conclusiones ……..43
8. Anexos ……..44

8.1. Preparación patrones de Platino. 44

8.2. Preparación fase móvil separación cromatográfica HPLC. 45

8.3. Preparación patrón ferritina. 45

8.4. Cromatogramas de metalofármacos encapsulados. 46

8.5. Calibrados de platino para cuantificación de metalofármacos en encapsulado y en cultivos celulares. 47

8.6. Datos cuantificación metalofármacos en tratamientos de incorporación celular. 50

María Montes Bayón, Catedrática de Química Analítica y Profesora del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

Jörg Bettmer, Profesor del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo y

Mario Corte Rodríguez, Doctor del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo, titulado "**Estudio de la encapsulación de metalofármacos y su efecto sobre el transporte celular**"

ha sido realizado por la alumna Lucía Gutiérrez Romero bajo su dirección, constituyendo su Trabajo Fin de Máster del Máster Internacional en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas de la Universidad de Oviedo en el curso académico 2018-19, y cuya presentación autorizo.

Oviedo, 12 de Julio de 2019

Fdo: María Montes Bayón | Jörg Bettmer | Mario Corte Rodríguez

1. Abreviaturas y simbología

ICP-MS: Espectrometría de masas con fuente de ionización de plasma de acoplamiento inductivo.

HPLC: Cromatografía de líquidos de alta resolución.

FIA: *Flow Injection Analysis* o sistema de inyección en flujo.

SEC: *Size Exclusion Chromatography* o cromatografía de exclusión por tamaños.

DAD: *Diode Array Detector.*

CTR-1 y CTR-2: *Copper Transporter*- 1 y 2.

OCT: *Organic Cation Transporters.*

TfR1: Receptor de transferrina 1.

CDDP: Cisplatino.

LODH: Oxaliplatino.

A2780: Células de carcinoma de ovario.

2. Prólogo

Aquellos fármacos donde el ingrediente activo es un metal se denominan metalofármacos. Algunos de ellos, como los que contienen platino, son ampliamente utilizados como agentes en quimioterapia. En este sentido, compuestos como el oxaliplatino y cisplatino que pertenecen a este grupo de fármacos presentan ciertas limitaciones en su aplicación clínica, algunas de ellas asociadas a la reducida entrada de dichos fármacos en las células o sus importantes efectos secundarios.

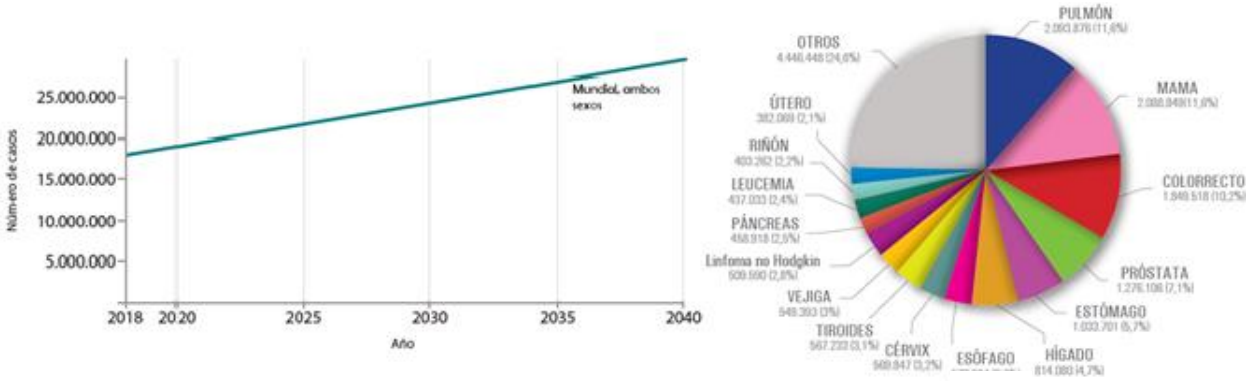
Para mejorar dicho transporte, las terapias dirigidas se presentan como una de las alternativas más novedosas. Dichos sistemas se aprovechan de las diferencias entre tejidos sanos y tumorales para presentar una mejor eficacia del tratamiento. Una estrategia prometedora consiste en el empleo, además, de sistemas nanoestructurados de transporte dirigido. Gracias a ellos, se pueden llegar a solventar problemas como los bajos tiempos de residencia de estos fármacos dentro del organismo, o minimizar la eliminación de los mismos.

En este trabajo fin de máster se pretende evaluar la encapsulación de metalofármacos de platino en nanoestructuras biocompatibles (p.e. proteínas) con el fin de mejorar su efectividad reduciendo sus efectos secundarios. Los estudios que se realizarán abordarán técnicas instrumentales novedosas como la espectrometría de masas (ICP-MS) o la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Así mismo se realizarán estudios en cultivos celulares para discernir las características del metalofármaco en su forma encapsulada, comparándolas con las que tiene en su forma original.

3. Introducción

3.1. Empleo de metalofármacos en el tratamiento contra el cáncer

A pesar de los grandes avances que se han estado logrando a lo largo de las últimas décadas, el cáncer sigue siendo una de las principales fuentes de mortalidad a nivel mundial. En 2018, aproximadamente 18.1 millones de personas fueron diagnosticadas de esta patología, por lo que se puede estimar que este número aumente considerablemente, llegando a los casi 30 millones en 2040[1] (Fig. 1). Este gran aumento se debe principalmente a factores como el envejecimiento poblacional de la sociedad y la exposición a factores de riesgo, tales como el tabaco, el alcohol, la obesidad o la contaminación, entre otros.



(a) **(b)**

Figura 1. Datos sobre incidencia de tumores mundialmente para ambos sexos 2018-2040 (**a**) y sobre los tumores más diagnosticados en el último año 2018 (**b**); datos estimados por SEOM.

Aunque las cifras de mortalidad son bastante altas, ya que constituyó la segunda causa de muerte en España en el pasado año[2], también cabe destacar que la supervivencia de los pacientes diagnosticados ha ido en aumento en los últimos años gracias a los grandes avances en el tratamiento y detección precoz de numerosas de estas patologías.

[1] Datos estimados en 2019 diagnósticos de cáncer por proyecto GLOBOCAN.
[2] *Las cifras del cáncer en España 2019*; Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM)

En este sentido, el descubrimiento de nuevos fármacos y tratamientos permite combatir de forma cada vez más eficaz la mortalidad producida por esta enfermedad[3], ya que se están consiguiendo superar muchas limitaciones presentes en terapias anteriores. Dentro de las diferentes estrategias de terapia como pueden ser la radioterapia, inmunoterapia o la cirugía, uno de los tratamientos más estudiados y extendidos es la quimioterapia, la cual está basada en la incorporación de fármacos en el organismo del paciente que ayudan a estimular la muerte de la célula cancerígena por distintos medios. Un buen ejemplo de ellos es el uso de fármacos basados en la presencia de un metal en su estructura.

Los metalofármacos[4] se han convertido en unos de los tratamientos quimioterapéuticos más extendidos. El descubrimiento de estos complejos metálicos como agentes anticancerígenos se inició con el fortuito hallazgo de un complejo de platino (II) como inhibidor del crecimiento bacteriano. El efecto de este complejo fue descubierto en 1979 por Rosenberg, quien comprobó mediante diferentes ensayos su teoría, llegando finalmente al desarrollo del primer metalofármaco desarrollado y que continúa con gran importancia en la actualidad: el cisplatino, del cual se hablará con más detenimiento a lo largo de este trabajo.

La relevancia de este descubrimiento supuso el inicio de lo que es conocido como la Química Inorgánica Médica; una rama de la Química Bioinorgánica que se encarga del desarrollo y estudio de las interacciones de iones metálicos y compuestos no derivados del carbono dentro del ciclo biológico de organismos vivos. Gracias a la potente investigación iniciada en este campo en los últimos años, el empleo de los metalofármacos se ha incrementado notablemente gracias a la alta eficacia que presentan, así como el amplio espectro de acción que ofrece este tipo de terapia, aunque no exenta de problemas.

[3]Asociación Española Contra el Cáncer (AECC), **6.Jun.2019**, http://observatorio.aecc.es/?_ga=2.17830768.81925334.1560264411-1853863399.1553706452#datos-informes

[4] Hill, J. M.; Loeb, E.; MacLellan, A.; Hill, N. O.; Khan, A.; King, J. J. "*Clinical studies of Platinum Coordination compounds in the treatment of various malignant diseases*", **1975**, Cancer Chemother Rep, (59), 647-659.

Aunque el primer y principal elemento metálico para el desarrollo de metalofármacos es y sigue siendo el platino[5], el número de estas especies metálicas que se están desarrollando, caracterizando y ensayando como agentes terapéuticos continua en expansión[6]. Algunos de ellos pueden ser el rutenio, en sus estados de oxidación más comunes II y III, el cual ha mostrado una gran eficacia citotóxica durante su etapa de ensayos clínicos. Complejos como pueden ser NAMI-A o el NKP 1339 están mostrando diferentes rutas de ataque contra la enfermedad, como es el ataque tanto al ADN como a las proteínas implicadas en el proceso cancerígeno[7]. Como explicación básica general, estos compuestos de rutenio presentan una gran afinidad de unión al ADN, provocando la inhibición de la replicación, así como la reducción de la síntesis del ARN celular y/o la alteración del medio intracelular por procesos redox. Otros metales, como pueden ser titanio (IV), galio (III) u oro (I) y (III) entre otros, se encuentran en etapas iniciales de estudio, pero apuntando a grandes avances que nos ayudarán a avanzar un paso más en la lucha contra esta extendida enfermedad.

3.2. Metalofármacos basados en platino: cisplatino y oxaliplatino

Como ya se ha avanzado en la anterior sección, el primer y más extendido tipo de metalofármacos utilizados en la lucha contra el cáncer son los complejos basados en platino. Este tipo de compuestos se basan en estructuras de platino en estado de oxidación (II) con diferentes ligandos. En la Tabla 1 se pueden ver representados algunos de los fármacos antineoplásicos basados en este metal utilizados en la actualidad.

[5] A. Terenzi; C. Pirker; B. K. Keppler; W. Berger; "*Anticancer metal drugs and immunogenic cell death*", **2016**, J. Inorg Biochem, (165), 71-79.
[6] S. Spreckelmeyer; C. Orvig; A. Casini; "*Cellular transport mechanisms of cytotoxic metallodrugs: an overview beyond cisplatin*", **2014**, *Molecules*, (19), 15584-15610.
[7] A. Bergamo; C. Gaiddon, J.H.M. Schellens, J.H. Beijenen, G. Sava;" Approaching *tumor therapy beyond platinum drugs: status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates"*, **2012**; J. Inorg. Biochem, (106),90-99.

Tabla 1. Compuestos de platino de uso clínico.

Nombre	Año de descubrimiento	Estructura	Uso clínico
Cisplatino	1979		Cáncer de testículo, ovario, vejiga, cabeza, cuello, gástrico y anal.
Carboplatino	1989		Cáncer de ovario, melanoma, cabeza, cuello timo y mama.
Nedaplatino	1996		Cáncer de esófago, cabeza, cuello y vejiga.
Oxaliplatino	2002		Cáncer colonrectal.
Lobaplatino	2004		Cáncer de mama y leucemia mieloide crónica.

Aunque los estados de oxidación más comunes para este metal sean II y IV, es el II el estado de oxidación en el que el platino ejerce su actividad terapéutica. Este estado de oxidación del platino presenta gran tendencia de coordinación con ligandos donadores de electrones, principalmente con el azufre presente en las proteínas en forma de grupos tiol, entre otros. Dentro de este tipo de fármacos, podemos encontrar el **cisplatino** (*cis*-diaminodicloroplatino(II) o CDDP), el cual está extendido para el tratamiento, en combinación con otros fármacos, de un gran número de tumores sólidos, como los indicados en la Tabla 1. Este agente alquilante (así se le conoce por su acción sobre el ADN) descubierto por Rosenberg, comenzó a ser utilizado

clínicamente en 1978 y, aunque está altamente extendido a día de hoy, presenta grandes problemas de toxicidad y resistencia en un 50% de los pacientes tratados. Se trata de un complejo de coordinación neutro con un átomo central de platino (II) unido a dos átomos de cloro y a dos moléculas de amoniaco dispuestos en posición *cis*. Aunque los enlaces con los átomos de nitrógeno presentes son casi irreversibles, las uniones Cl-Pt se presentan como notablemente lábiles en determinadas condiciones de pH y temperatura.

Su mecanismo de funcionamiento comienza con su incorporación al interior celular, pero previamente se administra por vía intravenosa. Como en el torrente sanguíneo la concentración de sales (alrededor de 100 mM) es bastante alta, no se produce la hidrólisis de los iones cloruro presentes en el complejo y se transporta interaccionando con algunas proteínas séricas[8]. Su incorporación al interior celular puede tener lugar mediante mecanismos de difusión pasiva, aunque gran parte de este compuesto se introduce por mecanismos activos gracias a transportadores transmembrana específicos para metales (*Copper Transporter-1* y *Copper Transporter-2*; CTR-1 y CTR-2) o transportadores de cationes orgánicos (*Organic Cation Transporters*; OCT). Es una vez que se encuentra en el interior celular cuando comienza la activación del fármaco. Al disminuir la concentración de sales, el cisplatino se activa por el desplazamiento en los enlaces lábiles Pt-Cl de uno o ambos iones cloruro mediante una reacción de hidrólisis, dando lugar a acuo(hidroxi) complejos[9] , como el que se encuentra representado en la Figura 2. Este tipo de complejos presentan una gran reactividad, por lo que pueden sustituir estos ligandos por otros nucleófilos, como puede ser S o N por el cual el platino presenta gran afinidad. Por ello, tras la activación se produce la unión preferente del complejo, a través del metal, a los residuos de guanina y/o adenina a través del nitrógeno 7 del anillo imidazol de estas bases nitrogenadas. Esta coordinación se encuentra más favorecida con los residuos de guanina al presentarse en el surco mayor de la hebra de ADN.

[8] R.A. Alderden; M.D. Hall: T.W. Hambley;" Discovery *and development of cisplatin"* ;**2006**; J. Chem. Educ.; (83), 728-734.
[9] L. Kelland; *"The resurgence of Platinum-based cancer therapy"*,**2007**, Nat. Rev. Cancer, (7), 573-584.

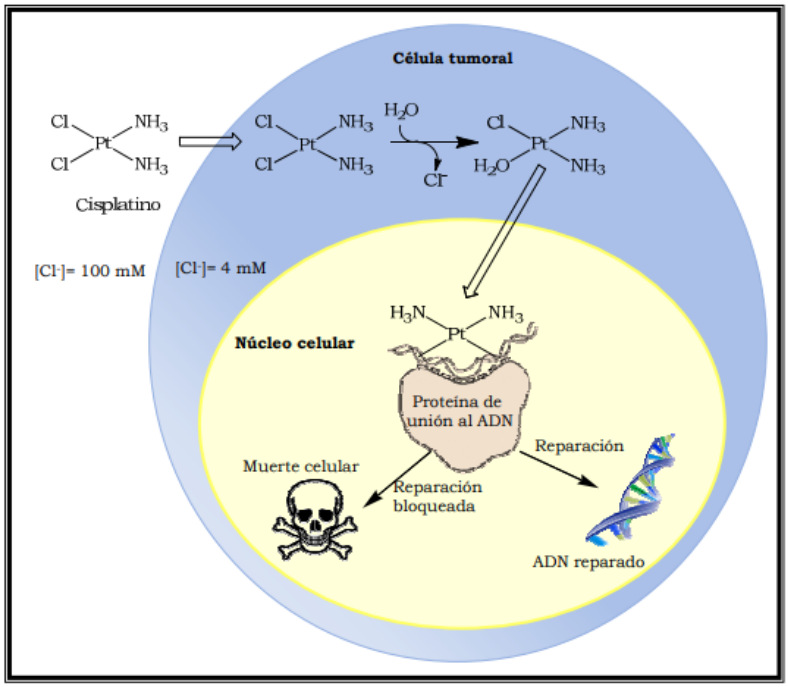


Figura 2. Esquema del funcionamiento de acción del cisplatino.[10]

De esta manera, se forman los denominados aductos cisplatino-ADN formando uniones tanto intracatenarias como intercatenarias, como se puede ver esquematizada en la Figura 3. Aunque la unión del cisplatino con residuos de guanina adyacentes dentro de la misma hebra es la más favorable y mayoritaria, también existe la posibilidad de unión a residuos de guanina y/o adenina de hebras de ADN diferentes que se encuentren cercanas en el espacio. Los aductos formados producen una deformación en la estructura secundaria de la hebra de ADN, evitando tanto la replicación como la transcripción de las hebras, concluyendo en la detención del ciclo celular. La deformación producida sobre la estructura del ADN se reconoce al mismo tiempo a través de una serie de proteínas intracelulares que llevan a la célula a la apoptosis[11].

[10] María de los Ángeles Medrano Chacón; Tesis doctoral *Estudio y diseño de complejos antitumorales de Pt (II) y Pt (IV), usando nuevas estrategias para conseguir una mayor actividad y especificidad.*; **2019**, Universidad Autónoma de Madrid.

[11] D.Wang, S. J. Lippard; "*Cellular Processing of Platinum Anticancer drugs";* **2005;** Nat. Rev. Drug Discovery, (4), 307-320.

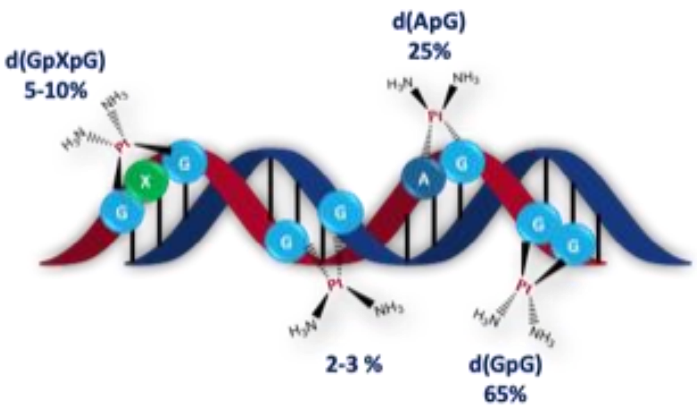


Figura 3. Esquema de los principales aductos formados entre el cisplatino con las hebras de ADN.

Sin embargo, y a pesar de su amplio uso, el cisplatino presenta limitaciones importantes. Entre ellas la resistencia de los tumores al fármaco que presentan en un gran porcentaje de los pacientes tratados a lo largo del tratamiento es quizás la más importante. Esta resistencia se puede presentar tanto de manera intrínseca (sin que se haya tenido contacto previo con el fármaco) como adquirida (adquirida mediante el tratamiento). Las causas de ambos tipos de resistencia se encuentran en investigación debido a la complejidad y diversidad que presentan[12]. Entre los mecanismos que pueden explicar la resistencia en el caso concreto del cisplatino podemos hablar de: la disminución de captación del cisplatino desde el medio extracelular o la sobre-activación del flujo de eliminación del mismo, un aumento en la capacidad de reparación del ADN dañado por el complejo una vez que el cisplatino ha llegado a su diana, o una disminución en la capacidad de producir la apoptosis celular que es debida a la hipermetilacion de sus genes promotores, entre otros. Estos mecanismos se pueden clasificar en tres principales grupos: *pre-target* (resistencia debida a procesos previos a la unión cisplatino-ADN), *on-target* (debida a procesos que involucran la unión con el ADN y el daño celular que provoca) y *off-target* (alteraciones en rutas de señalización que no se relacionan con la interacción directamente)[13].

[12] Z.H.Siddik; "*Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance*"; **2003**, Oncogene;(47); 7265-7279

[13] L.Galluzi, I. Vitale, J. Michels, C. Brenner, G. Szabadkai, A. Harel-Bellan, M. Castedo, G. Kromer; *Review" Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future"*; **2014**; Cell Death Dis.; (5); e1257.

A día de hoy estos mecanismos no se han conseguido descifrar con exactitud para su estudio, aunque se encuentran en proceso.

Debido a los fenómenos de resistencia, entre otros, se ha impulsado en desarrollo de compuestos alternativos basados en el platino. Uno de los más importantes y del cual también se tratará en este trabajo es el **oxaliplatino**[14] ([*Trans*(L-1,2-diaminociclohexanooxalatoplatino(II)] o LOHP). Este compuesto se sintetizó por la sustitución de los ligandos amino del cisplatino, por lo que es conocido como uno de los compuestos de platino de tercera generación. Se ha comprobado que es un compuesto muy útil para el tratamiento de cánceres resistentes al cisplatino por presentar bajos niveles de resistencia contra este, así como su uso para algunos tipos de cáncer que el cisplatino no es capaz a combatir. Se piensa que esta diferencia en actividad de ambos complejos se debe a las diferencias estructurales entre las moléculas, pese a que, en ambos casos, los dos actúan formando aductos con las cadenas de ADN en las zonas ricas en pares GG. Ambos compuestos forman el mismo tipo de aductos entre la guanina presente en la cadena de ADN con el Pt (II) presente en la molécula (Fig. 4), independientemente del resto de ligandos de la misma[15]. Se intuye que la actividad del oxaliplatino en células resistentes al cisplatino se sustenta en los procesos de detección de daños y/o reparación del ADN, los cuales pueden ser distintos dependiendo del ataque de uno u otro fármaco, aumentando el porcentaje de reparación de las células atacadas con cisplatino sobre las de oxaliplatino[16].

[14] B. Stordal, N. Pavlakis, R. Davey; "*Oxaliplatin for the treatment of cisplatin-resistant cancer: A systematic review"*; **2007**, Cancer Treatment Reviews, (33), 347-357.
[15] S. G. Chaney, S. L. Campbell, B. Temple, E. Bassett, Y. Wu, M. Faldu; "*Protein interaction with protein-DNA adducts: from structure to function";***2004**; J. Inor. Biochem., (98), 1551-1559.
[16] D. Esteban-Fernández; E. Moreno-Gordaliza; B. Cañas; M.A. Palacios; M.M. Gómez-Gómez; *"Analytical methodologies for metallomics studies of antitumor Pt-containing drugs";***2010**; Metallomics; (2); 19-38.

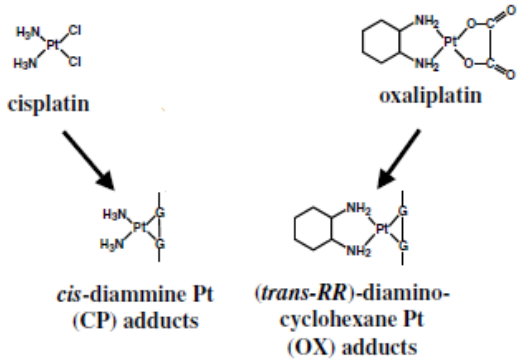


Figura 4. Formación de aductos del cisplatino y oxaliplatino con el ADN.

A día de hoy, las diferencias de reparación celular y, con ello, en resistencia al fármaco entre el cisplatino y oxaliplatino[17] no son claras a través de sus estructuras moleculares.

3.3. Mejora en la eficacia de incorporación de metalofármacos: terapias dirigidas.

Aunque algunos fármacos, como es el caso del cisplatino, están extendidos como fármacos antitumorales de amplio espectro, el uso clínico de estos compuestos está bastante limitado debido a fenómenos de resistencia y también toxicidad. Por ejemplo, el empleo de CDDP causa problemas de neurotoxicidad y nefrotoxicidad en muchos casos; otros como el carboplatino presenta resistencia cruzada al cisplatino entre sus principales problemas; y el oxaliplatino produce daños nerviosos sensoriales en los pacientes. Estos problemas de toxicidad se cree que se deben a las diferentes interacciones entre el platino presente en los fármacos con los tejidos sanos del organismo, produciendo una ineficacia del tratamiento.[18]. Debido a esta problemática, a lo largo de estos años, ha aumentado significativamente el empleo de terapias dirigidas con el objetivo de obtener una mayor especificidad en la administración de los metalofármacos.

[17] R. K. Mehmood, *Review of cisplatin and oxaliplatin in current immunogenic and monoclonal antibody treatments,* **2014**, Oncology Rev., (8), 36-43.
[18] R. Xing, X. Wang, C. Zhang, Y. Zhang, Q. Wang, Z. Yang, Z. Guo, *"Characterization and cellular uptake of platinum anticancer drugs encapsulated in apoferritin",* **2009**, J. Inorg. Biochem., (103), 1039-1044.

Uno de los puntos que se estudia para aumentar esta eficacia es la especificidad de entrega del fármaco dentro del organismo a los tejidos afectados por el tumor. De esta manera, el fármaco llegaría de forma directa al sitio localizado de acción, disminuyendo las interacciones indeseadas que producen los efectos adversos del tratamiento. Para ello, se están estudiando muchos sistemas específicos de transporte y liberación controlada de fármacos. Algunos de ellos implican el empleo de sistemas a escala micro o nanométrica que puedan ayudar a la liberación selectiva, así como otras mejoras - prolongación de los plazos de liberación y, con ello, la disminución del número de dosis inyectadas en el paciente; aumento en los tiempos de residencia del fármaco dentro del organismo, minimizar la eliminación de los mismos por parte del riñón, etc[19].

El desarrollo de este tipo de estrategias implica, generalmente la encapsulación del fármaco en una estructura transportadora de tipo nanométrico como las que se muestran en la Figura 5. La idea de su empleo se basa en la compartimentalización, es decir, en la regulación de la liberación de sustancias necesarias para un fin mediante la encapsulación de las mismas dentro de otras estructuras secundarias que no influyen negativamente ni en el propósito ni en el organismo. Este tipo de estructuras pueden ser nanocápsulas, que se definen como sistemas vesiculares en los que se presenta una cavidad donde se encuentra el fármaco rodeada por una membrana; o nanoesferas, que son sistemas matriciales dentro de los cuales el compuesto se encuentra uniformemente disperso en su interior. Existen muchas estructuras posibles, entre las que podemos destacar, por ejemplo, las estructuras liposómicas. Se realizaría la incorporación interna del agente citotóxico (p.e. cisplatino) dentro de ellas, de forma que el fármaco circulante se encuentre oculto hasta llegar al intersticio del tumor. Esta estrategia fundamenta su mejora en el aumento de permeabilidad y retención de las macromoléculas en los tumores dada por el movimiento pasivo de los liposomas a través de las paredes tumorales. La desventaja de esta

[19] K. Cho, X. Wang, S. Nie, Z. Chen, D.M. Shin, *Review "Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer"*,**2008**, Clin. Cancer. Res, (5),1310-1316.

estrategia se encuentra en la distribución alterada de los tejidos afectados, por la cual da lugar a nuevos efectos tóxicos diferentes a los comunes dados por el tratamiento normal[20].

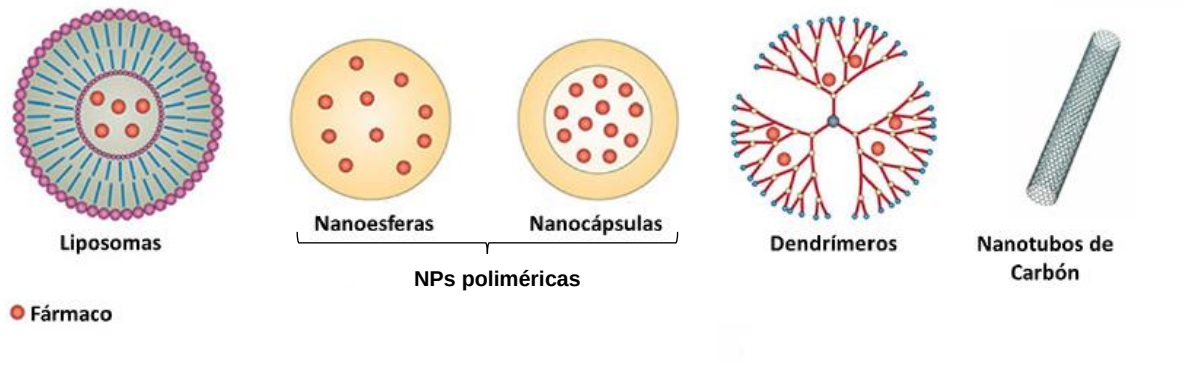


Figura 5. Diferentes tipos de sistemas empleados en la liberación de fármacos.

También se han probado estructuras como los dendrímeros para este tipo de aplicaciones de encapsulación de fármacos. Sin embargo, en este caso, los estudios realizados observaron que presentaban una gran dificultad a la hora de controlar la liberación de los fármacos desde estas estructuras. Gracias a estudios posteriores combinados con química de polímeros, hoy en día se han desarrollado nuevas estructuras conocidas como polímeros dendrionizados. Con ellos se han mejorado tanto la capacidad de carga por la posibilidad de múltiples sitios adjuntos, como la liberación de los fármacos a través del uso de enlaces de dentrímeros sensibles al pH[21].

Por otra parte, el ámbito de estudio más reciente en la nanomedicina, y en la química de manera análoga, se está centrando en el uso de nanopartículas como portadores de fármacos. Las nanopartículas son partículas coloidales sólidas de tamaño de entre 10 y 100 nm y que pueden estar hechas de polímeros tanto naturales como sintéticos biodegradables para su uso como materiales biomédicos compatibles. Estas estructuras se han convertido en un gran foco de atención debido a su gran estabilidad y facilidad de modificación de la superficie de la partícula. En este caso, los fármacos se anclan a la superficie de la partícula, utilizando a esta

[20] S.C. White, P. Lorigan, G.P. Margison, J.M. Margison, F. Martin, N. Thatcher, H. Anderson, M. Ranson, "*Phase II study of SPI-77 (sterically stabilized liposomal cisplatin) in advanced non-small-cell lung cancer",* **2006**, British J. of Cancer, (95), 822-228.

[21] S. Alcalá-Alcalá; D. Quintanar-Guerrero; *"Las terapias a nanoescala: ensamblaje de estructuras liberadoras de fármacos"*;**2014**; Mundo Nano; (7); 32-48.

simplemente como un transportador que lo lleva hacia el lugar de interés, donde se desprenderá para actuar. Dependiendo de la naturaleza de esta superficie, se puede jugar con factores como el tiempo de liberación del fármaco, mejorando su biodisponibilidad y pudiendo comportarse como depósitos de liberación prolongada. Atendiendo a las dos características fundamentales de estas estructuras (tamaño de partícula y naturaleza de superficie), se están desarrollando muchas nanotecnologías en el campo de la liberación de fármacos, como pueden ser el uso de partículas de hidrogel, nanotubos de carbono o incluso *quantum dots* [22]. Aunque ya existe un gran número de publicaciones relacionadas, parece que es un campo que muestra buenas perspectivas.

3.4. La ferritina como vehículo para la encapsulación de metalofármacos.

A parte de las estrategias ya nombradas en la sección anterior, el empleo de proteínas como vehículos de transporte y liberación controlada de fármacos es un área de creciente interés. En particular, el empleo de ferritina se ha empleado ya en numerosos estudios y nos detendremos en su descripción por ser el tema central del presente trabajo.

La ferritina es una proteína citosólica que constituye el mayor depósito de almacenamiento de hierro en la mayoría de seres vivos, principalmente en los humanos[23]. Se trata de una proteína globular compuesta por 24 subunidades que se autoensamblan esféricamente formando una estructura de 12 nm de diámetro con una cavidad hueca en su interior de 7-8 nm. Esta cavidad es capaz de almacenar hasta un máximo de unos 4500 átomos de hierro por molécula, que se incorporan en forma de cristales de hidróxido fosfato férrico [$(FeOOH_8) \cdot FeO \cdot PO_3H_2$)]. Esta proteína se puede encontrar mayoritariamente en el interior celular como en el espacio extracelular, aunque en mucha menor medida, viajando a través de la sangre.

[22] R. Singh, J. W. Lillard Jr.; *Rewiew "Nanoparticle-based targeted drug delivery",* **2009**, Exp. and Mole. Pathol., (86), 215-223.
[23] M.A. Knovich, J.A. Storey, L.G. Coffman, S. V. Torti, F. M. Torti; *Blood Review "Ferritin for the clinician",* **2009**, (23), 95-104.

En realidad, nuestro principal interés se centra en la cubierta globular proteica que constituye la ferritina, la cual se conoce como apoferritina. Esta estructura presenta una buena estabilidad térmica y una estabilidad química bastante característica. A pH fisiológico (pH ~7.4), la ferritina se encuentra en su conformación globular compacta vista anteriormente. Cuando la molécula se encuentra en condiciones de acidez o basicidad altas (pH_{acido}~2 o $pH_{básico}$~10), la estructura proteína se disocia en sus subunidades de manera espontánea. Una vez que el pH en el que se encuentra vuelve a condiciones fisiológicas, la proteína vuelve a autoensamblarse, retomando su forma original[24]. Es en esta capacidad de ensamblaje/disociación en la que se basa la metodología de encapsulación de fármacos en la ferritina, la cual se encuentra representada en la Figura 6.

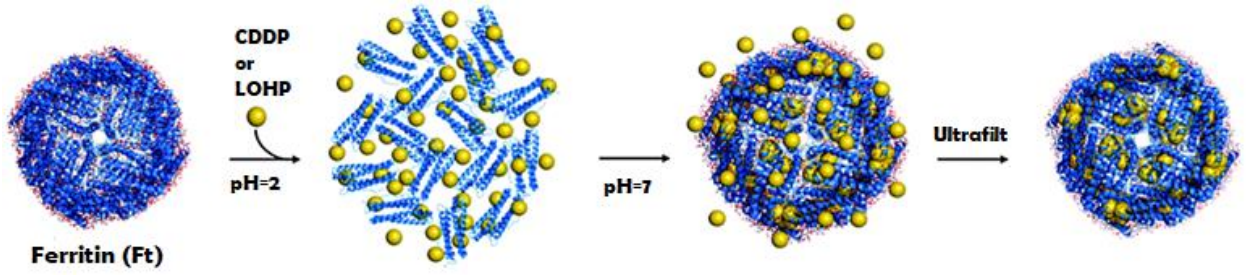


Figura 6. Representación esquemática del proceso de encapsulación del cisplatino (CDDP) o el oxaliplatino (LOHP) dentro de la ferritina.

Las ventajas que proporciona este sistema de encapsulación son muchas, como pueden ser: la biocompatibilidad de la estructura proteica dentro del organismo, al tratarse de una proteína necesaria en él y, por tanto, la ausencia de respuesta inmune ante su incorporación; su estabilidad, tamaño y la capacidad de modificar su superficie a demanda con gran facilidad. Pero una de las ventajas más importantes se encuentra en su capacidad específica de incorporación[25]. La ferritina es reconocida para su incorporación intracelular a través de los receptores específicos de la ferritina además de los receptores de transferrina 1 (TfR1), los cuales además se encuentran

[24] D. He, J. Marles-Wright*; Review "Ferritin family proteins and their use in bio nanotechnology"*; **2015**, New Biotech., (32); 651-657.
[25] E. Simsek, M.A. Kilic, *"Magic ferritin: A novel chemotherapeutic encapsulation bullet"*,**2005**, J. of Mag. And Mag.Mat., (293), 509-513.

sobre expresados en un gran número de células tumorales[26]. Además, en caso de que estos receptores se lleguen a saturar, otro modo de incorporación de ferritina en células neoplásicas se basa en la endocitosis directa de la proteína. De esta manera, las opciones de incorporación del fármaco encapsulado dentro de la ferritina son mayores que las que presenta el fármaco libre ya nombradas anteriormente. La ferritina, una vez incorporada al interior de la célula de una de estas maneras, se vuelve a desensamblar debido al pH ácido de los lisosomas e intracelular presentado en las células tumorales debido a su metabolismo anaerobio, pudiendo liberar de esta manera el fármaco encapsulado dentro de la célula[27,28] (Fig. 7). Una vez que el fármaco se encuentra en su forma libre dentro de la célula, comienza sus mecanismos de actuación característicos para actuar contra el tumor.

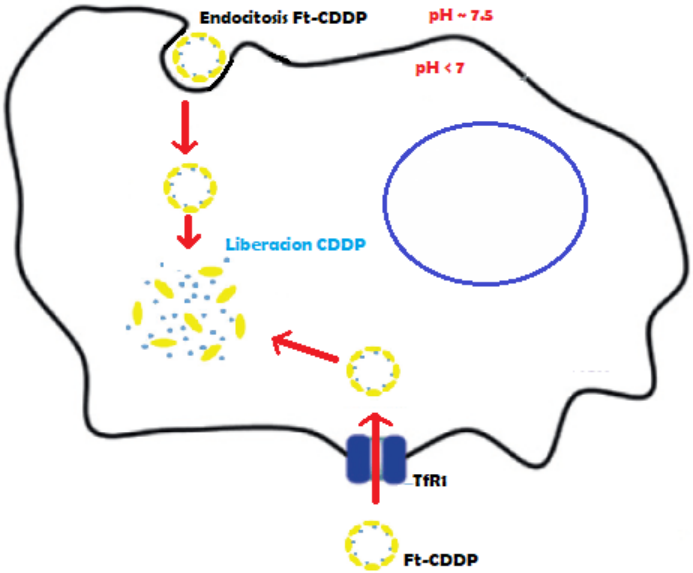


Figura 7. Mecanismo propuesto de incorporación de cisplatino (CDDP) encapsulado en ferritina (Ft) al interior celular.

[26] X-T. Ji; L. Huang; H-Q. Huang; *"Construction of nanometer cisplatin core-ferritin (NCC-F) and proteomic analysis of gastric cancer cell apoptosis induced with cisplatin released from the NCC-F";* **2012**; J. Proteomics; (75); 3145-3157.
[27] M. Truffi, L. Fiandra, L. Sorrentino, M. Monieri, F. Corsi, S. Mazzucchelli, *"Ferritin nanocages: A biological platform for drug delivery, imaging and theranostics in cancer",* **2016**, Pharma. Res., (107),57-65.
[28] N. Pontillo, F. Pane, L. Messori, A. Amoresano, A. Merlino, *Review "Cisplatin encapsulation within a ferritin nanocage: a high-resolution crystallographic study",* **2016**, ChemComm, (52), 4136-4139.

Con esta metodología, la incorporación de los metalofármacos de platino como pueden ser el cisplatino, carboplatino u oxaliplatino aumentaría en comparación con el tratamiento con el fármaco libre; además, su toxicidad disminuye al ir directamente el fármaco a la célula sin ninguna interacción con tejidos sanos.

4. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es el *empleo de la ferritina humana como transportador nanoestructurado de fármacos basados en platino para su uso en tratamientos de quimioterapia*. Se establecerán las mejores estrategias de encapsulación, se evaluará la incorporación de cisplatino y oxaliplatino y se estudiará el efecto en cultivos celulares frente al fármaco libre según los siguientes objetivos parciales planteados a continuación:

- Optimización de las condiciones de encapsulación del oxaliplatino y del cisplatino dentro de la ferritina humana a través de su control y seguimiento por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detección por espectrometría de masas con fuente de ionización de plasma con acoplamiento inductivo (ICP-MS) para el seguimiento del platino. Estudio del rendimiento del proceso.
- Comparación cuantitativa de los resultados con la encapsulación de ambos fármacos en la ferritina humana.
- Estudio de la incorporación del fármaco desde la nanoestructura proteica mediante el ensayo sobre cultivos celulares de cáncer de ovario (línea celular A2780), los cuales ya han sido empleados en el grupo de investigación. Evaluación cuantitativa de fármaco incorporado al interior celular empleando sistema FIA-ICP-MS para la medida de platino.

5. Metodología experimental

5.1. Material y reactivos.

El material general empleado durante todo el proceso experimental se encuentra recogido a continuación:

- Micropipetas de volúmenes 0.5-10 µL, 10-100 µL, 20-200 µL y 100-1000 µL.
- Tips de micropipeta de distintos volúmenes.
- Pipetas Pasteur de 1.5 mL y 3 mL.
- Tubos eppendorf de 1.5 mL.
- Tubos de plástico de 20 mL y 45 mL.
- Filtros de 0.5 mL Ultracel para 100 kDa Amicon Ultra (Darmstard, Alemania)

El agua utilizada para realizar disoluciones acuosas y/o limpiar el material se trata de Agua Milli-Q obtenida del sistema de purificación de agua PureLab Flex de Veolia Water Technologies (Paris, Francia).

En el proceso de encapsulación son necesarios varios reactivos. La ferritina empleada es ferritina de bazo humano de concentración de 10 mg/mL en 0.15 M de NaCl, 10 mM de Tris y 0.1% de NaN_3 a pH 8.0 adquirida de la compañía Sigma Aldrich (San Luis, MO, USA). El cisplatino utilizado es un estándar de referencia obtenido de Sigma Aldrich; el oxaliplatino fue provisto por la empresa Phosphoplatin Therapeutics (Heraeus GmbH, Hanau, Alemania) en forma de polvo altamente activo de una sola fabricación. La disolución 0.9% (p/v) de cloruro de sodio se preparó a partir de NaCl en su forma sólida, adquirido de Merck (Darmstadt, Alemania), con agua Milli-Q. Tanto el ácido clorhídrico 0.5 M como el hidróxido de sodio 0.5 M se obtienen mediante la dilución con agua Milli-Q a partir de HCl 37% (p/v) y NaOH sólido, respectivamente, ambos de la casa Fisher Scientific (Madrid, España). Como material específico en este proceso se utilizó el pHmetro SENSION+ de la casa comercial Dismed (Gijón, España) y la centrifuga Minispin Plus de la casa Eppendorf (Hamburgo, Alemania).

Para la preparación de la fase móvil utilizada para la cromatografía de líquidos, se utiliza acetato de amonio como cristal de pureza certificada de la casa Fisher Scientific, el cual se utiliza en disolución acuosa en concentración 50 mM a pH 7.4. Para el ajuste del pH de la disolución reguladora, se emplea amoniaco diluido.

El ácido nítrico empleado, tanto para fase de arrastre en las medidas por FIA-ICP-MS como para la preparación de las mismas muestras, se trata de una disolución al 0.1% de ácido nítrico a partir de ácido nítrico concentrado 65% (p/v) de Merck purificado por destilación "*sub-boiling*".

Para el calibrado de Pt necesario para la cuantificación de fármaco, se utiliza un patrón de Pt obtenido de Merck. A partir del patrón de 1000 mg/L o ppm, se obtiene un patrón intermedio de 1 ppm. Las disoluciones del calibrado de platino se realizan en concentraciones de 0 a 10 µg/L o ppb a partir del stock intermedio de 1 ppm de platino. Todas estas disoluciones se preparan en HNO_3 "*sub-boiling*" al 0.1%.

En el tratamiento de los cultivos celulares, se tratan células de la línea celular de carcinoma de ovario sensible a cisplatino A2780, las cuales han sido provistas por Dr. J.M. Pérez Freije (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Oviedo). Para la lisis de las células tratadas, además del HNO_3 *sub-boiling* concentrado, se utiliza H_2O_2 al 30% (p/v) de Fisher Scientific.

Todos los reactivos empleados a lo largo del proceso experimental fueron de grado analítico.

5.2. Instrumentación.

Para la medida de detección de platino presente en los fármacos utilizados en el trabajo, se utilizó el sistema ICP-MS de triple cuadrupolo iCAP TQ de la casa comercial Thermo Fisher Scientific (Bremen, Alemania). El plasma de acoplamiento inductivo es una fuente de ionización muy fuerte, que genera iones elementales monopositivos. La información que proporciona esta técnica es, por lo tanto, elemental. A cambio, los espectros generados son sencillos de interpretar y la ionización es prácticamente independiente de la matriz, lo que facilita su uso con fines cuantitativos. Además, el ICP-MS presenta sensibilidades muy buenas, por debajo de los pg mL^{-1} (ppt) para la mayor parte de los elementos de la tabla periódica y un amplio intervalo lineal. Este sistema consta de un analizador de masas de triple cuadrupolo (QqQ), el cual está compuesto por dos cuadrupolos con una celda de colisión/reacción entre ambos. Esta disposición ofrece mucha más sensibilidad de medida frente a un equipo convencional de un simple cuadrupolo, ya que permite eliminar interferencias tanto poliatómicas, isobáricas o iones que estén asociados de manera natural al ion de interés de la muestra para dar señales con mejor resolución. En nuestro caso, al tratarse el platino de un elemento poco interferido, no necesitaremos el uso de ambos cuadrupolos como detectores de masa. Por ello, en la configuración de nuestra medida, utilizaremos tanto el primer cuadrupolo como la celda de colisión/reacción simplemente como guía de iones hacia el segundo cuadrupolo, que actuará de analizador de masas; modo de medida descrito por ello como "*SQ-none*" y por no necesitar ningún gas de colisión en la celda. Como isótopo de medida, nos fijaremos en el ^{195}Pt, nuestro elemento de interés, por ser el de mayor abundancia isotópica, aunque en muchos casos se monitorizarán también otros isótopos para confirmar. Las condiciones necesarias para llevar a cabo las medidas se encuentran recogidas en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de medida ICP-MS.

ICAP TQ, Thermo Fisher Scientific	
Isótopo monitorizado	^{195}Pt
Potencia de radiofrecuencia	1550 W
Flujo de gas refrigerante	14 L/min
Flujo de gas auxiliar	0.8 L/min
Flujo de gas portador	0.95 L/min
Tiempo de integración	100 ms

Para llevar a cabo la especiación de la muestra de fármaco encapsulado en la proteína, se utilizó un sistema de cromatografía de líquidos HPLC 1200 Series de Agilent (Tokio, Japón). Esta separación se llevó a cabo en una columna de exclusión por tamaños (SEC) Superdex 200 (10/300 GL) de la casa GE Healthcare (Chicago, IL, USA) que posee un intervalo de fraccionamiento de 10-600 KDa. La calibración de la columna se llevó a cabo con patrones de: Tiroglobulina (660 kDa), ferritina (450 kDa), inmunoglobulina G (150 kDa), albúmina (66 kDa) y alfa-lactoalbúmina (15 kDa). Como sistema de detección, en lugar de utilizar el detector UV/VIS presente en el equipo cromatográfico, se empleó el espectrómetro de masas indicado anteriormente, el cual se acopla a la salida de la columna cromatográfica con un tubo de Peek® directamente con la entrada del sistema de nebulización. Las condiciones cromatográficas se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de medida de cromatografía HPLC 1200.

HPLC 1200 Series, Agilent	
Columna cromatográfica	Superdex 200 (10/300 GL), GE Healthcare (10-600 KDa)
Volumen de inyección	20 µL
Fases móviles	**A:** Disolución de acetato de amonio 50 mM a pH=7.4
Flujo de fase móvil	0.7 mL/min
Proporciones fases móviles	Isocrático 100% A

Para la cuantificación de platino se emplea un sistema de introducción de muestras de inyección por flujo (FIA). Para ello, se bombea una fase de arrastre (HNO_3 "*sub-boiling*" al 0.1%) de forma continua a un flujo de 0.5 mL/min con una bomba peristáltica Gilson (Middleton, WI, USA). La muestra se inyecta en dicho flujo mediante una jeringa de 50 µL de la casa Hamilton (Bonaduz, Suiza). La inyección de la muestra se realiza a través de una válvula de seis vías Rheodyne (Lake Forest, IL, USA), en un bucle de inyección de 20 µL. La salida de la muestra se conecta a la entrada del nebulizador del sistema ICP-MS a través de un tubo de Peek®.

Tabla 4. Condiciones de medida FIA.

Sistema FIA: Condiciones Bomba peristáltica	
Volumen de inyección	20 µL
Fases de arrastre	HNO_3 *sub-boiling* 0.1%
Flujo	0.5 mL/min

En ambas medidas (FIA y HPLC acopladas a ICP-MS), las condiciones de medida del sistema ICP-MS se mantienen y se recogen en la Tabla 2.

Por último, para la cuantificación de proteína, se emplea un sistema de cromatografía de líquidos HPLC 1100 Series de la casa Agilent con la misma columna cromatográfica SEC utilizada anteriormente. En este caso, para la detección de la ferritina, utilizamos un sistema de detección DAD de UV/VIS, incorporado como modulo del equipo.

Las condiciones empleadas para esta cromatografía coinciden con las utilizadas para las medidas realizadas con el sistema HPLC 1200, descritas específicamente en la Tabla 3. La única diferencia a tener en cuenta es la que involucra al sistema de detección. Para la detección, que en este caso se lleva a cabo por UV/VIS, se realiza a la longitud de onda apropiada para la detección de la ferritina: 280 nm.

Todas las condiciones de medida se encuentran especificadas en las distintas Tablas dependiendo de la medida llevada a cabo.

5.3. Procedimientos experimentales

5.3.1. Encapsulación de los metalofármacos de platino.

El siguiente procedimiento de encapsulación de los fármacos de platino estudiados en este trabajo (cisplatino y oxaliplatino) dentro de la ferritina se encuentra descrito en la bibliografía[29] consultada. Se realizó el mismo procedimiento para ambos fármacos.

Se prepara una disolución de concentración final de 1 mg/mL del fármaco de platino por lo que se realiza una disolución con 1 mg del fármaco, el cual se encuentra en polvo sólido. El otro reactivo principal, la ferritina, se añade a esta disolución para presentar la concentración final también de 1 mg/mL, para lo cual añadiremos sobre el fármaco 100 µL de la proteína. Además de estos dos reactivos, se añade a la disolución los volúmenes de 400 µL de Agua Milli-Q y 500 µL de la disolución de NaCl 0.9% para llegar a las concentraciones finales de la disolución de 1 mg/mL. La disolución de cloruro de sodio al 0.9% se emplea para simular las condiciones salinas fisiológicas de la sangre en las que la ferritina se encuentra en su forma estable.

Esta disolución, que inicialmente se encuentra en un pH cercano al fisiológico, se trata con HCl 0.5 M hasta llevarla a un pH cercano a 2.2. Este procedimiento se realiza mediante pequeñas adiciones del ácido (1-0.5 µL), controlando el pH en cada adición, para no realizar la bajada de forma brusca y dañar así lo mínimo posible la proteína. Una vez aquí, se deja un tiempo de espera de 15 min a temperatura ambiente para permitir que la ferritina se disocie en sus subunidades. Se continúa con una adición de la misma manera de NaOH 0.5 M hasta llevar la disolución a un pH cercano a 7.5, próximo al inicial. Se deja la disolución 1 h en agitación a temperatura ambiente para permitir el reensamblaje de las subunidades de la proteína y la captura en el proceso del fármaco en su interior.

[29] E. Falvo, E. Tremante, R. Fraioli, C. Leonetti, C. Zamparelli, A. Boffi, V. Morea, P. Ceci, P. Giacomini, *"Antibody–drug conjugates: targeting melanoma with cisplatin encapsulated in protein-cage nanoparticles based on human ferritin"*, **2013**, Nanoscale.

La disolución obtenida se ultrafiltró con los filtros de 100 KDa en la centrífuga durante 8 min a 13000 g. Nuestro producto encapsulado se encontrará retenido en el filtro tras este procedimiento, ya que la ferritina tiene una masa molecular de unos 440 kDa; el líquido transparente filtrado serán restos de fármaco no encapsulado que se desechan. El compuesto naranja presente en el filtro se lava añadiendo 400 µL de NaCl 0.9%, con su consiguiente ultrafiltrado durante 5 min a 13000 g. Este proceso se realiza un mínimo de 3 veces para asegurarse de que todo producto en la disolución que no es el fármaco encapsulado en la ferritina es eliminado. En caso de que sea necesario, tras comprobar la pureza de nuestro compuesto por HPLC-ICP-MS como se verá más adelante, este proceso de lavado puede repetirse más veces.

Tras el último lavado, el contenido del filtro -el fármaco encapsulado en ferritina- se transfiere a un tubo Eppendorf limpio donde se diluye con 100 µL de NaCl 0.9%. El producto puede guardarse en el congelador para usos posteriores.

5.3.2. Condiciones para tratamiento de cultivos celulares.

Para estudiar el efecto de la encapsulación en el tratamiento anticancerígeno, se realizó un tratamiento, tanto con los fármacos en su forma libre como encapsulada, en cultivos celulares de carcinoma de ovario sensibles al cisplatino (A2780).

Estas células se cultivaron para su proliferación en una incubadora a 37 °C y un 5% de CO_2 con un medio de cultivo de RPMI 1640 con un 10% de suero fetal bovino y 5 mg/L de plasmocina. Estos cultivos fueron sometidos a un tratamiento con el fármaco libre (cisplatino u oxaliplatino) y a la misma concentración del fármaco en su forma encapsulada para poder estudiar sus diferencias en células del mismo cultivo celular. El medio de crecimiento es eliminado una vez que las células han proliferado en los pocillos de la placa para cambiarlo por un medio que contiene el fármaco. Tanto el libre como el encapsulado se administraron en una concentración final de 2 µM en medio de cultivo (1.5 mL) para tener una distribución homogénea del tratamiento en los pocillos. Se incuban con el tratamiento durante un ciclo de 24 h a 37 °C, tras el que se limpian con una disolución de PBS (5 veces) y se recogen por tripsinación. Los pocillos

para las células que no son tratadas con el fármaco, conocidos como pocillos de control, se tratan de igual manera con medio de cultivo normal durante el tratamiento con el fármaco de las demás células de la placa.

5.3.3. Digestión de las células tratadas en los cultivos celulares.

Para el estudio de la captación de fármaco por las células, se realiza la digestión de las muestras de cultivo. Una vez recogidas las células de los correspondientes pocillos con PBS, se centrifuga la suspensión celular para hacer precipitar el *pellet* de células en el fondo del tubo y se decanta la disolución sobrenadante desechando lo máximo posible. Estas células deben recogerse en unos tubos eppendorf previamente agujereados por su tapa y pesados. Los *pellets* de células se congelaron con N_2 (liq) y se liofilizan durante un ciclo de unas 24 h para obtenerlas en forma de polvo, el cual se pesa con precisión para saber el peso celular en seco utilizando una metodología previamente establecida en nuestro grupo de investigación[30] . El peso seco de las células se utilizará para normalizar los resultados del contenido de platino.

Finalmente, para la lisis de las células liofilizadas, se añaden 500 µL de HNO_3 *sub-boiling* concentrado al 65%. Los Eppendorf agujereados se cubren con Parafilm y se dejan en un baño caliente a 70 °C durante una hora. Después, se añade a la mezcla otros 500 µL de H_2O_2 concentrado al 30% y se deja incubar en el mismo baño entre 3-4 h.

Una vez terminado el proceso, se pesa el producto final a temperatura ambiente para conocer con exactitud el volumen de disolución final.

[30] M. Corte-Rodríguez, M. Espina, L.M. Sierra, E. Blanco, T. Ames, M. Montes-Bayón, A. Sanz-Medel; "*Quantitative evaluation of cellular uptake, DNA incorporation and adduct formation in cisplatin sensitive and resistant cell lines: Comparison of different Pt-containing drugs"*;**2015;** Biochem. Pharma.; (98); 69-77.

6. Resultados y discusión

6.1. Optimización de condiciones de encapsulación: control y seguimiento por HPLC-UV y HPLC-ICP-MS.

Debido a que el proceso de encapsulación es un proceso realizado manualmente por un operario, se puede ver influido por muchas variaciones debido al modo de ejecución (p.e. sucesivas adiciones de ácido/base) o a las condiciones del laboratorio del momento (p.e. temperatura ambiental). Por ello, es necesario realizar un estudio del proceso de encapsulación para comprobar su rendimiento y sus posibles fallos en caso de que se puedan mejorar, así como para estudiar el porcentaje de platino presente en su forma encapsulada de manera diferencial sobre la forma libre

Al tratarse la ferritina de una proteína globular (~400 kDa), una buena opción para su separación de otras moléculas de otros tamaños que pueden estar presentes en la disolución de encapsulado y que no son el producto deseado es una separación por tamaños, conocida como SEC. Este tipo de cromatografía, debido al tipo de su fase estacionaria, nos permite separar biomoléculas que en función de su peso molecular penetrarán más o menos en la matriz del gel que constituye la fase estacionaria. La diferencia entre el peso molecular de la ferritina (~400 kDa) y el cisplatino libre (300 Da) es suficiente para poder discriminar las dos especies, aunque se produzcan interacciones secundarias con el relleno cromatográfico.

Debido a la naturaleza proteica de ferritina y a la presencia de aminoácidos aromáticos en su estructura, esta absorbe luz a una longitud de onda de 280 nm, por lo que su elución cromatográfica se podría estudiar con un detector UV/VIS monitorizando esa longitud de onda. Por otra parte, al tratarse nuestros fármacos de compuestos de platino, podemos estudiarlos elementalmente monitorizando este elemento. Para ello, la mejor metodología por sus características es el estudio por ICP-MS, con la cual podemos estudiar los isótopos del platino en cualquiera de las formas en las que se encuentre en la disolución. Como la separación previa es la misma, en el momento en el que la señal de UV/VIS correspondiente a la ferritina coincida con

la señal de platino en el tiempo, nos indicará la señal correspondiente a nuestro producto de interés: el fármaco encapsulado.

Tras la encapsulación de ambos fármacos por separado (cisplatino y oxaliplatino) siguiendo los pasos descritos en el "Procedimiento Experimental", llevamos a cabo la medida de las muestras de la encapsulación por cromatografía de líquidos HPLC. Este análisis se realizará para la detección de la ferritina presente en la muestra, utilizando los detectores UV/VIS e ICP-MS.

Una vez estabilizados la columna y el sistema cromatográfico se inyectaron las muestras de cisplatino y oxaliplatino encapsulado, previa dilución en la fase móvil utilizada para el análisis. Además de estas muestras, también inyectamos un patrón diluido de ferritina, preparado con la misma proteína que se emplea en el proceso experimental, que nos asegurará el tiempo de elución de la proteína. Los cromatogramas obtenidos están representados en la Figura 8.

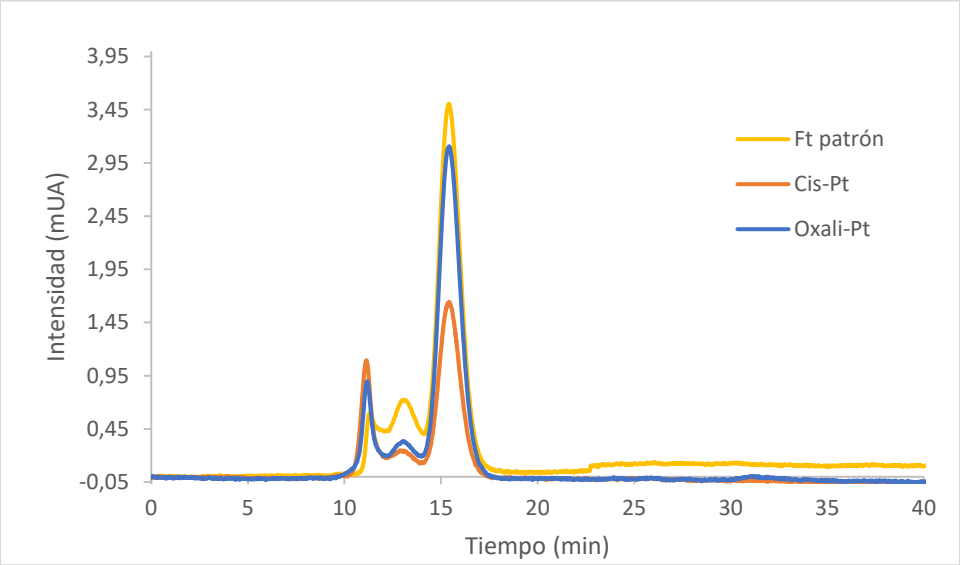


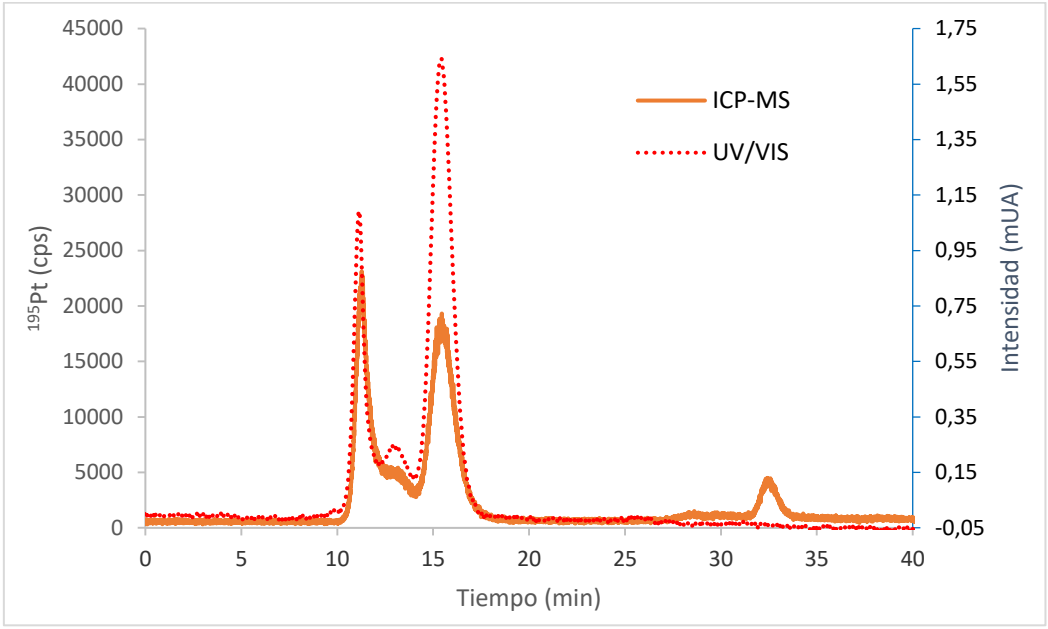
Figura 8. Cromatogramas obtenidos por HPLC 1100 Series con detección UV/VIS a λ=280 nm para el análisis de las muestras diluidas de cisplatino y oxaliplatino encapsulado y patrón de ferritina.

Atendiendo a los resultados obtenidos, se puede observar un pico mayoritario común a ambos fármacos encapsulados a 15.5 min. Este pico coincide, también, con el más intenso del patrón de ferritina, lo que confirma que el pico de proteína principal tras el proceso de

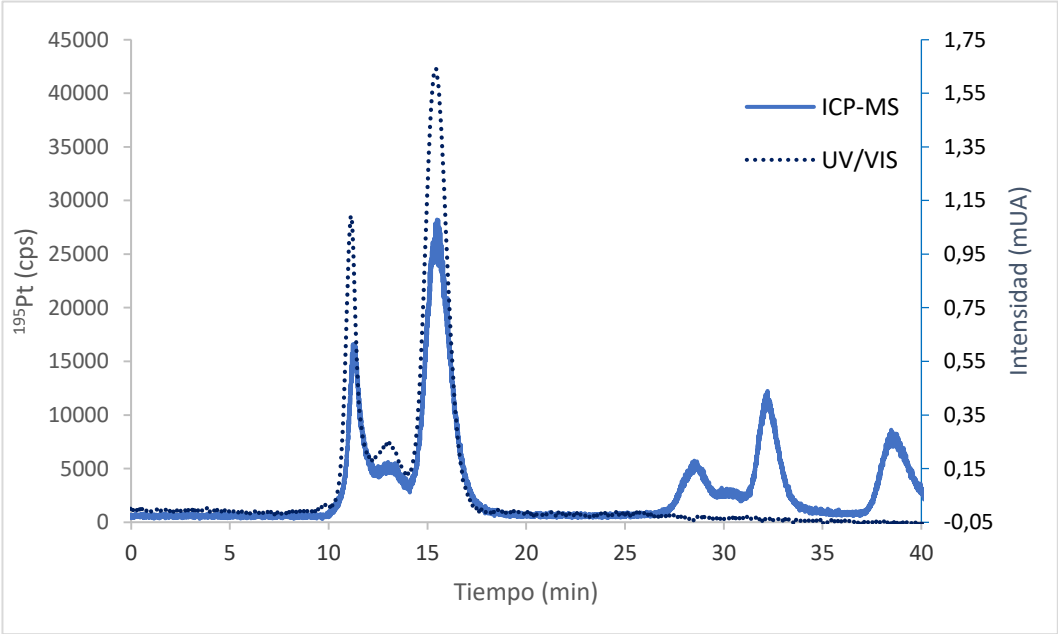
encapsulación sigue siendo el de la ferritina. Tanto en el patrón de ferritina como en los encapsulados, aparecen también algunos picos a menores tiempos de retención. Dado que la separación se produce por un mecanismo de exclusión por tamaños, estos picos corresponden a especies de mayor peso molecular que la ferritina, y podrían deberse a oligómeros de ferritina. Esta formación ocurre fácilmente de manera espontánea, por lo que es difícil de evitar y, por ello, aparecen incluso en el patrón de ferritina, y su formación se incrementa durante el proceso de encapsulado. Sin embargo, no tiene ninguna influencia sobre el producto final de la encapsulación.

Para comprobar si la encapsulación de los fármacos ha tenido lugar, se lleva a cabo el análisis por HPLC-ICP-MS de las muestras de encapsulados diluidas en fase móvil. La dilución de las muestras previo análisis por este método es necesaria para reducir los posibles efectos de memoria y para evitar la saturación del detector en el ICP-MS, ya que esta técnica proporciona una elevada sensibilidad para la medida de platino. Los cromatogramas resultantes se muestran en la Figura 9 combinando la señal UV con la de ICP-MS.

En los cromatogramas obtenidos se puede observar, entre otros, una señal de platino que eluye a unos 15 minutos. Este tiempo de retención coincide con el obtenido anteriormente con la detección UV/VIS tanto para el patrón como para los encapsulados. Esto indica que ambos fármacos se han encapsulado dentro de la ferritina. Podemos destacar que, en el caso del oxaliplatino (Fig. 9 (b)), la intensidad de esta señal es mayor, indicando que la encapsulación de este fármaco fue más satisfactoria. En ambos casos, volvemos a observar un pico anterior al de nuestro encapsulado, que corresponde a oligómeros de ferritina. Esto indica que estos oligómeros son capaces de unir también una parte del fármaco o que lo que se produce en primer lugar es la encapsulación seguida de la oligomerización de la proteína.



(a)



(b)

Figura 9. Cromatogramas obtenidos por HPLC 1200 Series con detección por ICP-MS. Comparación con cromatogramas obtenidos por HPLC 1100 con detección UV/VIS. **(a)** muestra diluida de cisplatino encapsulado; **(b)** muestra diluida de oxaliplatino encapsulado.

En ambos cromatogramas de la Figura 9 se pueden apreciar algunas señales con tiempos de retención de alrededor de 33 minutos, que corresponderían a especies de menor tamaño que la ferritina. Se cree que estas especies corresponden a productos de hidrolisis de fármaco libre que ha quedado en el producto final. Estas moléculas que se forman presentan carga, por lo que se retienen también en la columna cromatográfica dependiendo de esta y eluyen a estos tiempos de retención menores. Los monómeros de la proteína, tras los cambios de pH durante el proceso de encapsulación, se pueden ver afectados y pueden no ser capaces de volver a reconstruirse en su forma original. Por ello, estas subunidades de la proteína que no se reensamblan pueden formar distintos tipos de oligómeros de menor tamaño que la proteína completa, los cuales se podrían detectar en esta franja de la separación. Sin embargo, es llamativo que no aparezca señal alguna en el perfil UV.

Además, tanto el cisplatino como el oxaliplatino en disolución acuosa pueden perder parte de sus ligandos de coordinación. Estas conformaciones del fármaco libre en la disolución pueden formar aductos con los monómeros de proteína que no se ha reensamblado, por lo que su tamaño sigue siendo menor que el de la ferritina normal y se ven reflejados en la separación. Por último, el otro tipo de picos que se pueden obtener corresponden a la detección del fármaco libre. Como tanto el cisplatino (~300 Da) como el oxaliplatino (~397 Da) tienen un menor peso molecular que el rango de separación de nuestra columna (entre 10-600 kDa), estos compuestos no se pueden separar en este tipo de columna cromatográfica. Por ello, al ser tan pequeños, su elución tiene lugar al final del cromatograma en el llamado volumen de permeación total, donde eluyen todas las especies restantes de menor tamaño presentes en la muestra y sin poder distinguir tanto el fármaco libre completo, como el mismo tras la pérdida de posibles ligandos o de platino iónico en disolución, si lo hubiera. Estos tipos de compuestos presentes en la muestra no son deseables, ya que pueden contribuir en estudios posteriores del encapsulado dándonos resultados finales falseados. Su presencia en la muestra se debe a un mal o insuficiente lavado de la muestra centrifugada. Por ello, para su eliminación sería necesario realizar un limpiado de la muestra más exhaustivo.

Hay que remarcar, finalmente, que no hay diferencias entre el perfil cromatográfico del patrón de la ferritina antes del proceso de encapsulación y después. Esto implica un correcto re-ensamblaje de la proteína después de su desnaturalización. Una vez que se ha asegurado la formación correcta de nuestro producto deseado, es necesario conocer el rendimiento del proceso que hemos llevado a cabo para el atrapamiento del compuesto de platino en la ferritina. Para ello, se estudia la relación entre la cantidad de ferritina inicial y la obtenida al final del proceso de encapsulación para ver la cantidad de proteína perdida por las distintas etapas llevadas a cabo. Como se conoce la concentración exacta del patrón de ferritina analizado por HPLC con detección UV/VIS, se puede relacionar el área de esta señal con las correspondientes para las muestras después de encapsular el cisplatino y oxaliplatino y, así, conocer la concentración y el peso de ferritina en cada una de las encapsulaciones. Con este estudio y conociendo las cantidades de ferritina añadidas inicialmente en cada encapsulación, se obtienen los resultados representados en la Tabla 5.

Tabla 5. Recuperación de la ferritina después de la encapsulación de cisplatino y oxaliplatino.

	Área	**Concentración ferritina en encapsulado (mg/mL)**	**Peso ferritina en encapsulado (mg)**	**Peso ferritina inicial (mg)**	**Rendimiento encapsulación en ferritina (%)**
Cis-Pt	3,601	5,574	0,602	9,928	**6,06**
Oxali-Pt	5,522	8,001	0,585	11,68	**5,01**

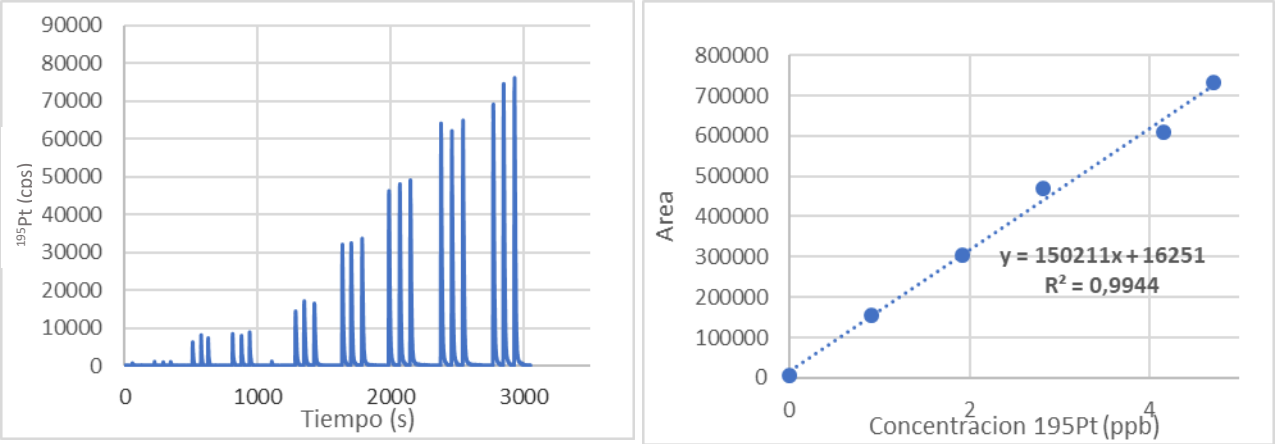
Ante los cálculos realizados, se obtiene una recuperación de la proteína cercana al 5% en ambos casos. Durante la encapsulación, se somete a la proteína a unos cambios bastante bruscos de pH para llevar a cabo el desensamblaje de sus subunidades y su posterior reagrupación. Aunque se intenta hacerlo de la manera más lenta y progresiva posible, es inevitable que haya pérdidas (p.e. debido al parcial re-ensamblaje de las subunidades que pueden ser posteriormente eliminadas durante el proceso de ultrafiltración).

Con este estudio se puede comprobar que el proceso de encapsulación proporciona recuperaciones relativamente bajas, pero bastante constantes.

6.2. Cuantificación de cisplatino y oxaliplatino encapsulado. Estudio y comparación de resultados.

Ya que la finalidad del trabajo es el estudio de las propiedades de los fármacos nanoencapsulados como tratamiento alternativo con metalofármacos, es necesario conocer la concentración del fármaco que ha resultado finalmente encapsulado en el proceso. Para ello, se hará un análisis del platino contenido en las estructuras proteicas de nuestra muestra de encapsulado mediante ICP-MS. En este caso, como la medida será para el contenido total de platino en la muestra; no se necesita una separación previa como se realizó anteriormente. Para ello, la inyección de la muestra se llevará a cabo gracias al acoplamiento de un sistema de inyección por flujo (FIA), en el que la muestra se inyectará transportada por un flujo continuo de una fase de arrastre. Con este modo de inyección, podemos llevar a cabo medidas de muestras de muy pequeño volumen, como es el caso. Las condiciones necesarias para la medida se encuentran especificadas en la sección de “Instrumentación”.

Para poder cuantificar el fármaco en cada una de las muestras, se realiza un calibrado de Pt de concentraciones entre 0 y 5 ppb de platino a partir de un patrón de este elemento. Para cada muestra o patrón inyectado, se realizó un triplicado de la medida como mínimo, incluyendo un blanco o disolución de 0 ppb de platino (compuesto solo por HNO_3 0.1%). Se realiza primero la medida de las muestras, las cuales se supone que tendrán menor contenido en platino que el máximo del calibrado, seguido de los patrones del calibrado, como se puede apreciar en el la Figura 10. Por relación con las áreas obtenidas, se realiza el calibrado del elemento de interés (Fig.10 (b)), el cual nos ofrece una buena correlación de resultados indicada por el valor de R^2.



(a) **(b)**

Figura 10. (a) FIA-grama con inyección de muestras y calibrado; **(b)** Calibrado de ^{195}Pt.

Para la determinación del fármaco contenido en las muestras de encapsulados de cisplatino y oxaliplatino, se realiza el cálculo de la concentración de platino total en las muestras mediante la extrapolación de sus señales obtenidas por FIA-ICP-MS con el calibrado llevado a cabo. A partir de esta medida, se puede obtener la concentración total de cada uno de los fármacos en sus respectivas muestras de encapsulado, las cuales se encuentran recogidas en la siguiente tabla.

Tabla 6. Resultados cuantificación de fármaco total en muestras.

	Concentración fármaco (µM)	**SD**
Cis-Pt	**62,62**	5,64
Oxali-Pt	**96,98**	4,12

Sin embargo, estos resultados obtenidos reflejados en la Tabla 6 no muestran la concentración real en las muestras. Como se pudo ver en los cromatogramas obtenidos para las muestras en la sección anterior (Fig. 9), además de platino en forma encapsulada había en ambos casos diferentes conformaciones de fármaco encapsulado degradadas o aductos del complejo metálico, las cuales contribuyen en la cuantificación total de platino en la muestra pero que no forman parte del fármaco encapsulado correctamente en la ferritina. Por lo tanto, la opción óptima sería la limpieza total de la muestra de especies indeseadas y, tras la verificación por SEC-ICP-MS, se repetiría su cuantificación por esta metodología. En este caso, al tener muy poco volumen de muestra y que, al filtrar, además de los productos para desecho también

perderíamos algo de nuestro producto en el filtro, se asignó al pico correspondiente al fármaco encapsulado la concentración de fármaco en función del porcentaje que representa dicho pico frente al área total de picos en el cromatograma, obteniendo finalmente los siguientes resultados.

Tabla 7. Resultados reales cuantificación de fármaco encapsulado.

	Porcentaje de fármaco encapsulado	Concentración fármaco (µM)	µg fármaco/mg ferritina final
Cis-Pt	45,20 %	**28,30**	0,55
Oxali-Pt	62,30 %	**60,42**	3,0

De esta manera, podemos comprobar cómo una gran parte del platino que se estaba cuantificando en los resultados reflejados en la Tabla 6 no era más que contaminación de especies de platino que influyen negativamente en la cuantificación real del producto. Los datos recalculados de la Tabla 7 nos ofrecen la concentración de fármaco en cada una de las muestras dentro del encapsulado correcto. Atendiendo a estos resultados, se puede comprobar cómo la encapsulación del oxaliplatino ha sido más productiva, ya que su concentración ha sido más del doble que la obtenida para el cisplatino aun teniendo en cuenta la baja recuperación de la proteína que se mostró en la Tabla 5, lo cual es el factor que más nos interesa desde el punto de vista del tratamiento anticancerígeno.

6.3. Estudio de incorporación del fármaco desde nanoestructura proteica: evaluación cuantitativa de incorporación en el interior celular vía FIA-ICP-MS.

Puesto que la finalidad de este trabajo es el estudio de la distribución celular del cisplatino y el oxaliplatino por distintas metodologías, la última parte del mismo se centra en el tratamiento de cultivos celulares con los fármacos tanto libres como encapsulados para la comparación de su incorporación. Para ello, se emplean en este caso cultivos celulares de la línea A2780; línea celular de carcinoma de ovario sensible al cisplatino. El cultivo celular ha sido llevado a cabo por el grupo

de Genotoxicidad y Reparación del ADN en el Área de Genética del Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo.

Para poder llevar a cabo este estudio con el suficiente número de réplicas, se necesita repetir el proceso de encapsulación de ambos fármacos las veces necesarias para llegar a tener en disolución una concentración de fármaco necesaria para exponer las células a una concentración de entre 2-3 µM; concentración que es fisiológicamente relevante en este tipo de estudios. Concretamente, se repite el proceso 4 veces para cada uno de los antineoplásicos, recolectándolos todos en un mismo volumen de muestra final. La disolución final se limpia 4 veces más para asegurar la eliminación de todo el fármaco libre en disolución sin tener excesivas pérdidas de encapsulado. En este punto, necesitamos obtener el producto completamente limpio ya que, si en disolución todavía hay complejo de platino libre, estas también actuarán al llevar a cabo el tratamiento celular con el fármaco encapsulado y, por lo tanto, los resultados estarán falseados por no ser solo el compuesto dentro de la proteína el que actúe.

Para asegurar la limpieza del producto final, se hace un análisis del mismo por HPLC-ICP-MS al igual que en anteriores análisis. Los cromatogramas obtenidos representados en las Figuras 15 y 16 de la Sección 8.4 ("Anexos") muestran en ambos casos únicamente las señales correspondientes a la ferritina encapsulada con su pico previo de oligómeros de ferritina con el fármaco. De esta manera se puede confirmar que el producto está en las condiciones óptimas para el tratamiento celular.

Con el fin de asegurar que en nuestro volumen final de producto tenemos la concentración necesaria – indicada en el "Procedimiento experimental" – para el tratamiento celular, es necesaria la cuantificación de las muestras encapsuladas limpias. Para ello, se realiza el mismo proceso de análisis por FIA-ICP-MS empleado anteriormente. En este caso, el calibrado empleado se encuentra en el rango de 0-10 ppb de Pt, ya que la concentración de platino en las muestras ahora será mayor que en el estudio hecho para una encapsulación y queremos asegurar que nuestra muestra, pese a las diluciones necesarias, entre dentro del calibrado.

Tabla 8. Resultados cuantificación total de fármaco en muestras encapsulados limpias.

	Concentración fármaco (µM)	SD
Cis-Pt	49,37	1,43
Oxali-Pt	70,87	2,96

Con estos resultados de cuantificación (Tabla 8), podemos corroborar las conclusiones expuestas en el apartado 6.2 de esta discusión. La concentración de oxaliplatino para el mismo número de procesos de encapsulación es bastante mayor que para el cisplatino, aunque en este caso no llega a ser el doble. Cabe recordar que el proceso de encapsulación depende mucho de las condiciones en las que se lleva acabo para su rendimiento y optimización, y por esto los resultados obtenidos varían ligeramente.

Los fármacos encapsulados se diluyen en el medio de cultivo para tener una concentración final de 2 µM en cada uno de los experimentos. Se realizan cultivos celulares en placas de 6 pocillos, separadamente para el cisplatino y para el oxaliplatino. Siguiendo las condiciones explicadas en el "Proceso Experimental", cada placa constará de dos pocillos para control del tratamiento, dos para el estudio de incorporación celular tratados con el fármaco libre y los dos restantes para el tratamiento con el mismo fármaco encapsulado dentro de la ferritina. Las disoluciones de fármaco libre para el tratamiento se hacen de la misma concentración que la presentada en la muestra de encapsulado. De esta manera, se añadirá el mismo volumen de muestra de encapsulado que de fármaco libre a ambos tratamientos para obtener la concentración en el medio final de 2 µM, asegurando que los pasos para ambos tratamientos sean lo más iguales posible para asegurar mejor reproducibilidad.

En nuestro estudio de incorporación celular, se tratan las células en ciclos de 24 h, tras las cuales se limpian y recogen las células tratadas, seguido de un proceso de liofilización y digestión celular. Tras la liofilización, se pesa con exactitud el contenido de células en seco obtenido para cada muestra, ya que nuestros resultados finales estarán referidos al peso de células en seco para normalizar por la variación entre el número de células. Al referir el resultado final al peso de células en cada muestra, estamos normalizando todos los resultados para poder compararlos.

Tras la digestión celular, se lleva a cabo la cuantificación del platino contenido en cada una de las muestras por FIA-ICP-MS. Como se realiza una dilución 1:10 previa al análisis, la concentración de las muestras entrará en el rango del calibrado (0-10 ppb de Pt), y estas se inyectarán al principio del análisis para evitar que los posibles efectos de memoria de los patrones más altos del calibrado tengan una influencia sobre la cuantificación de las muestras. Por la misma razón, se procede a la inyección primero las muestras de control, las cuales no están tratadas con el fármaco de platino, seguidas de las muestras tratadas con fármaco libre y encapsulado, y finalizando el análisis con los patrones del calibrado. En la Figura 11, se muestra el FIA-grama obtenido para el análisis de las células control y las tratadas con oxaliplatino libre y encapsulado.

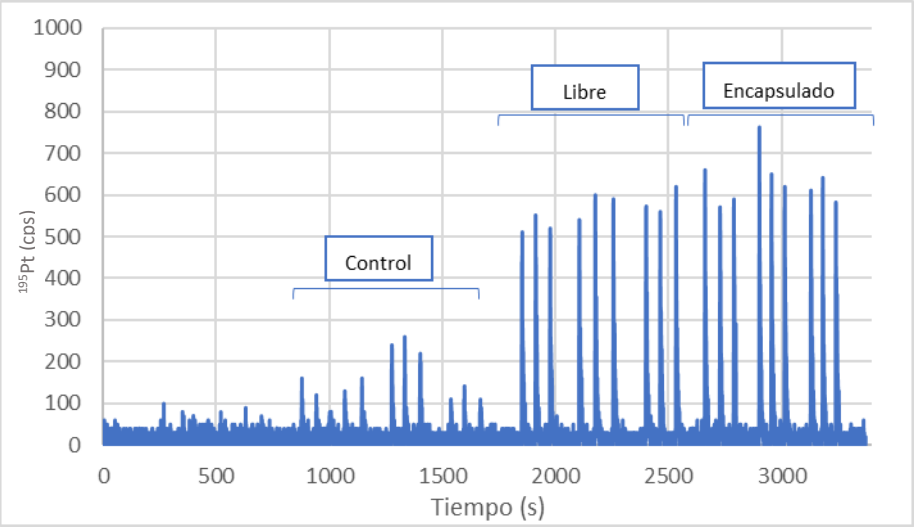
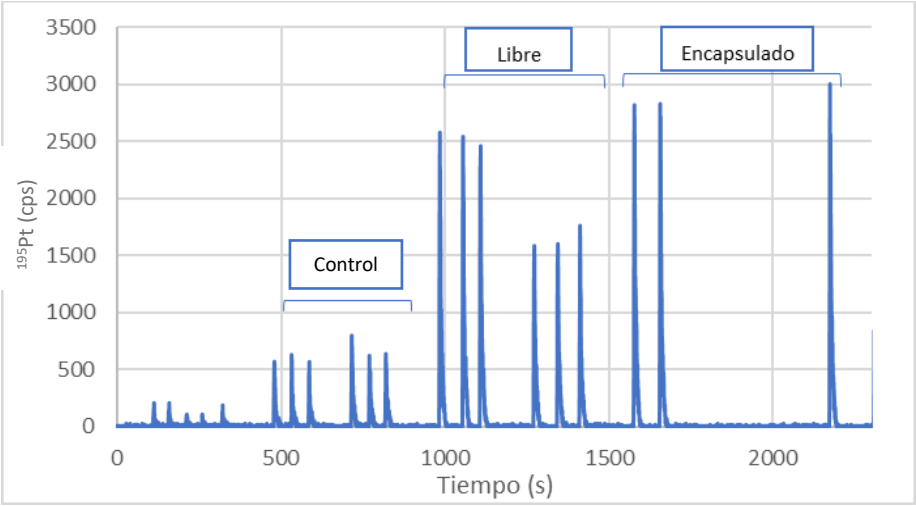


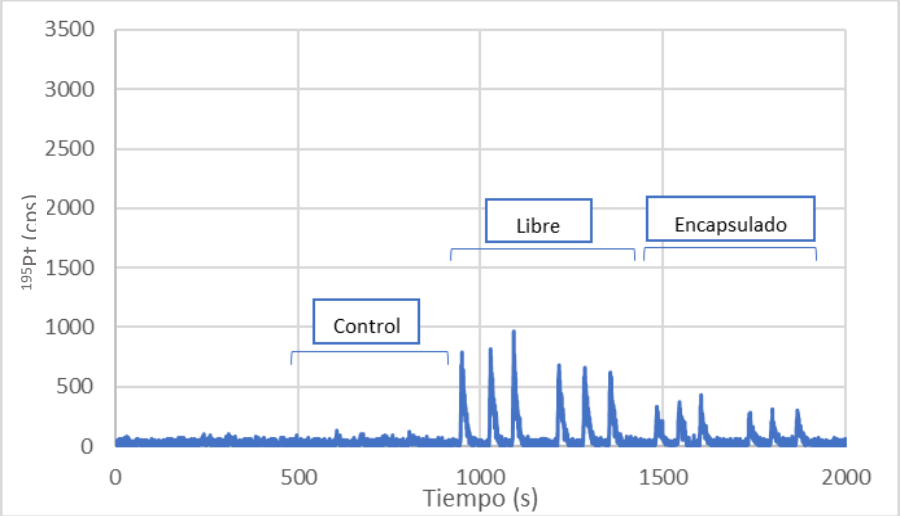
Figura 11. FIA-grama para estudios de incorporación celular con oxaliplatino.

En el caso del tratamiento con oxaliplatino, se tenía una mayor concentración en la disolución inicial de encapsulado y, por ello, era necesario un menor volumen de la misma para llegar a la concentración del tratamiento (2 µM). Por esto, se pudo realizar un triplicado de cada tipo de cultivo. Por otro lado, en el estudio con cisplatino, la baja concentración de la forma encapsulada solo permitió que se hiciera un duplicado de cada muestra. Por asegurar los resultados, al final del tiempo de experimentación de este estudio, se volvió a repetir la incorporación en las células con el cisplatino al haber quedado muestra suficiente para volver a

hacer otro tratamiento. Los FIA-gramas que reflejan estos dos procesos son los representados en ambas Figuras 12 (a) y (b).



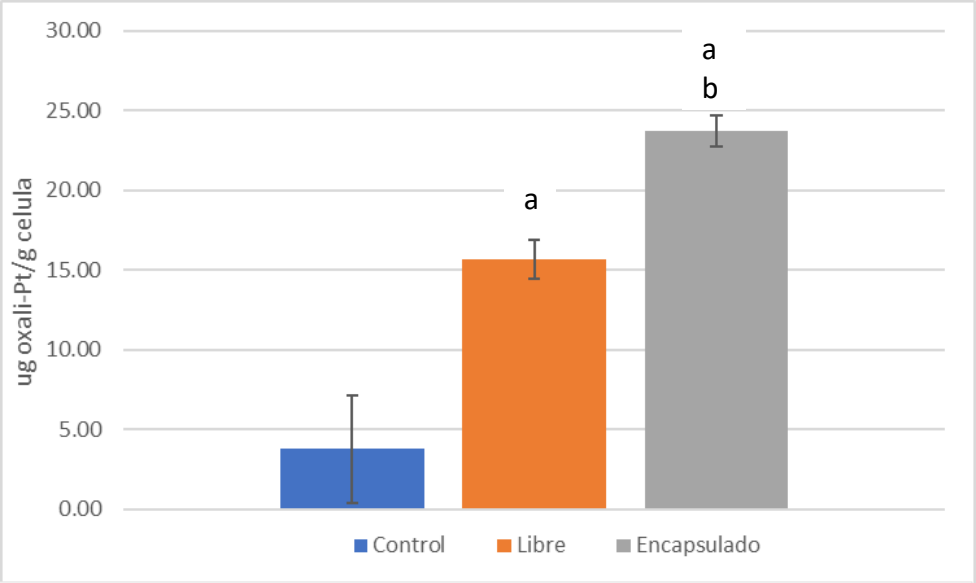
(a)



(b)

Figura 12. FIA-gramas para estudios de incorporación celular con cisplatino **(a)** Primer tratamiento; **(b)** Tratamiento tras tiempo de almacenamiento del producto encapsulado.

Con estos resultados y el correspondiente calibrado – representados en los "Anexos"– para cada estudio, se calculó la concentración del correspondiente fármaco. Para poder comparar los resultados como se ha explicado anteriormente, el peso final calculado de fármaco obtenido se relaciona con el peso de células obtenido para cada muestra analizada.



(a) vs control; estadísticamente diferentes por test "t *student*" (P=0.05; 4 grados libertad)

(b) vs libre; estadísticamente diferentes por test "t *student*" (P=0.05; 4 grados de libertad)

Figura 13. Relación de la concentración de oxaliplatino respecto al peso de células para cada cultivo.

Como se observa en la Figura 13, el proceso de encapsulación del metalofármaco dentro de una estructura proteica como es la ferritina ofrece una mejora en el tratamiento frente al empleo del fármaco libre en términos de penetrabilidad del fármaco a las células. Además, cabe destacar la buena reproducibilidad obtenida en este estudio, dando certeza a los datos obtenidos. Concretamente, los resultados nos ofrecen una relación de 1.5 veces mayor la introducción celular del fármaco en forma encapsulada frente al libre. De esta manera, se está corroborando que la eficacia del tratamiento obtenida gracias a la incorporación del metalofármaco dentro de la ferritina es mejorada considerablemente, por lo que esta opción de mejora del tratamiento podría ser bastante satisfactoria. Además, cabe volver a resaltar que el tratamiento con este tipo de estructuras disminuye los efectos secundarios que se pueden presentar.

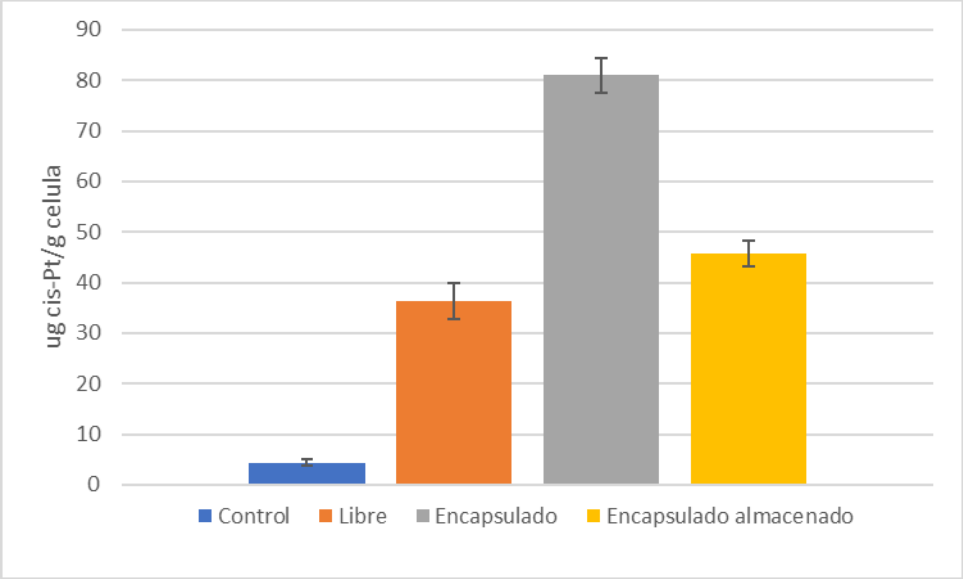


Figura 14. Relación de peso de cisplatino por peso de células para cada tipo de muestra de cultivo.

Para el caso del cisplatino, se analizaron y estudiaron los resultados tanto para el primer tratamiento como para el tratamiento con el encapsulado almacenado durante 6 semanas a -20 °C, obteniendo los resultados representados. Con los resultados obtenidos en el primer tratamiento se pudo volver a corroborar nuestras expectativas, concordando con resultados obtenidos anteriormente en el Grupo de Investigación en el que se realizó este estudio. La incorporación de cisplatino en su forma encapsulada supera en más del doble la cantidad obtenida para las muestras tratadas con el mismo liberado. En este tratamiento, se tuvo algún problema con una de las muestras tratadas con fármaco encapsulado, por lo que para este tratamiento solo se pudo analizar una réplica. Para el tratamiento posterior con la muestra de encapsulado almacenada, se observó que la cantidad incorporada al interior celular disminuye considerablemente frente a la muestra anterior, superando al tratamiento con fármaco libre en una proporción muy pequeña. Ante esto, se puede deducir que, debido al paso del tiempo, la ferritina con cisplatino encapsulado se pudo ir degradando. Por tanto, el producto encapsulado almacenado puede no estar en las condiciones óptimas para su uso y no se empleó para hacer la media.

En el caso de los resultados obtenidos para el tratamiento con el oxaliplatino encapsulado, se llevó a cabo un estudio estadístico de significación entre muestras. Este estudio no se pudo llevar a cabo con los resultados obtenidos para el tratamiento con el cisplatino debido al limitado número de réplicas. Con los resultados obtenidos para el oxaliplatino, se realizó el test estadístico "t de *student*" para las combinaciones de los tres tipos de muestra: control, libre y encapsulado. Los resultados obtenidos se reflejan en la Figura 13, los cuales reflejan que, en todos los casos, por la comparación con el valor critico de t, existe una diferencia significativa entre los resultados para un intervalo de confianza de un 95%.

Tras la discusión de ambos grupos de resultados, se puede observar que la incorporación del fármaco sin encapsular es más favorable en el caso de cisplatino que en el oxaliplatino, cosa que se ha podido ver en este modelo celular confirmando estudios anteriores. Igualmente, en ambos casos, podemos asegurar que la mejora de incorporación celular mediante la encapsulación del fármaco es notable, convirtiendo esta vía de tratamiento en una metodología ideal y con un elevado potencial tanto para el cisplatino como para el oxaliplatino.

7. Conclusiones

En este trabajo fin de máster, el cual se basa en el estudio de la ferritina como nanoestructura modificada para la mejora del tratamiento quimioterapéutico con metalofarmacos frente a las propiedades de los mismos en su forma libre sobre ciertas líneas celulares, se sacaron las siguientes conclusiones.

- Tanto la encapsulación de cisplatino como la de oxaliplatino es factible dentro de la cápsida de la ferritina, aunque la recuperación de la ferritina después de todo el proceso está en torno a un 5%.
- Con la cuantificación realizada para las muestras de ambos fármacos encapsulados se pudo observar que, pese al menor rendimiento obtenido en punto anteriores, la encapsulación del oxaliplatino es notablemente más productiva que la realizada con cisplatino. Este punto también se pudo volver a comprobar en estudios posteriores.
- Los estudios de incorporación celular en la línea A2780 con ambos fármacos en la forma encapsulada muestran un incremento notable de la incorporación celular del fármaco encapsulado frente al libre, así como una buena reproducibilidad de resultados. Para el cisplatino, las expectativas vuelven a confirmarse pese a problemas durante el proceso que permitieron menor cantidad de resultados finales fiables, por lo que en un futuro podría ser interesante evaluar con mayor detalle.

8. Anexos

8.1. Preparación patrones de Platino.

Para la preparación de los patrones de platino necesarios para llevar a cabo la calibración y posterior cuantificación de nuestras muestras, se prepararon a lo largo del trabajo patrones de concentración entre 0 y 10 ppb de platino. Las siguientes concentraciones realizadas a lo largo del trabajo se realizaron a partir de un patrón intermedio de 1 ppm de Pt preparada de una disolución patrón certificada de 1000 ppm del elemento.

Tabla 9. Volúmenes para preparación de disoluciones patrón de platino.

DISOLUCIONES PARA PATRONES DE CALIBRADO DE PLATINO		
Muestra patrón intermedio	**Volumen patrón 1000 ppm Pt**	**Volumen HNO_3 0.1% final**
1 ppm	10 µL	10 mL
Muestra	**Volumen patrón 1 ppm Pt**	**Volumen HNO_3 0.1% final**
0 ppb	0 µL	5 mL
1 ppb	5 µL	5 mL
2 ppb	10 µL	5 mL
3ppb	15 µL	5 mL
4ppb	20 µL	5 mL
5ppb	25 µL	5 mL
6 ppb	30 µL	5 mL
8 ppb	40 µL	5 mL
10 ppb	50 µL	5 mL

8.2. Preparación fase móvil separación cromatográfica HPLC.

Para llevar a cabo la separación tanto con HPLC 1100 series para la detección de ferritina como con HPLC 1200 series acoplada a ICP-MS para el análisis de platino, es necesaria la misma composición de fase móvil A: 50 mM de acetato de amonio, pH 7.4.

Tabla 10. Preparación fase móvil A empleada en ambas cromatografías por HPLC.

DISOLUCION 50 mM ACETATO DE AMONIO	
Peso acetato de amonio	**Volumen final Agua Milli-Q**
1.927 g	500 mL

La disolución final resultante se ajusta con amoniaco diluido, controlando el valor de pH con el pHmetro.

8.3. Preparación patrón ferritina.

En la identificación de los picos cromatográficos de proteína, así como para el cálculo del rendimiento del proceso de encapsulación, se necesitó la preparación de un patrón de ferritina preparado a partir de ferritina comercial, la cual también fue empleada en el proceso.

Tabla 11. Preparación disolución patrón de ferritina.

DISOLUCIÓN PATRÓN FERRITINA	
Volumen ferritina comercial	**Volumen final fase móvil A**
5 µL	1 mL

La disolución obtenida fue llevada a un volumen final de 100 µL de fase móvil A tras dos diluciones 1:10 consecutivas con la misma fase.

8.4. Cromatogramas de metalofármacos encapsulados.

Tras la repetición del proceso de encapsulación para cada uno de los antineoplásicos, así como su posterior limpieza exhaustiva, se obtuvieron los siguientes cromatogramas para asegurar la limpieza del producto final previo uso sobre cultivos celulares.

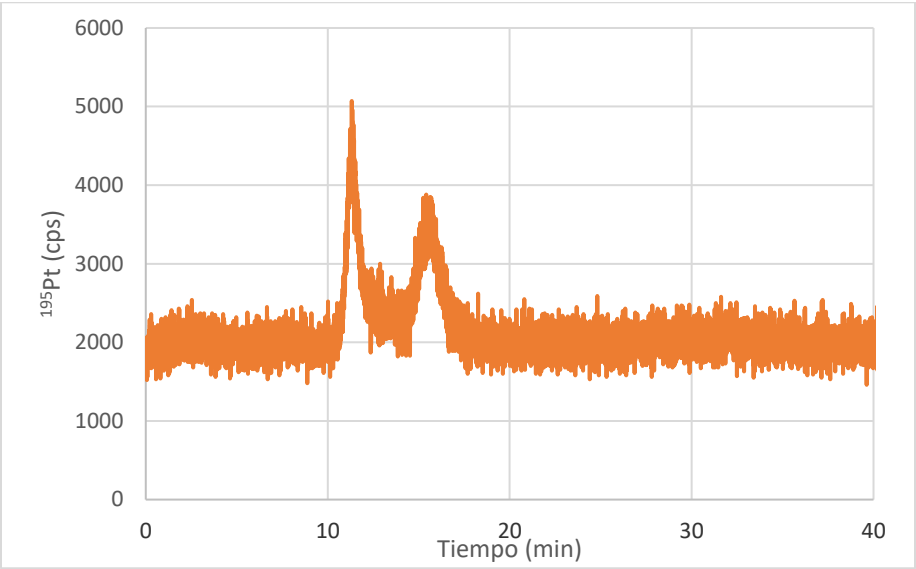


Figura 15. Cromatograma obtenido por HPLC-ICP-MS para encapsulado de cisplatino.

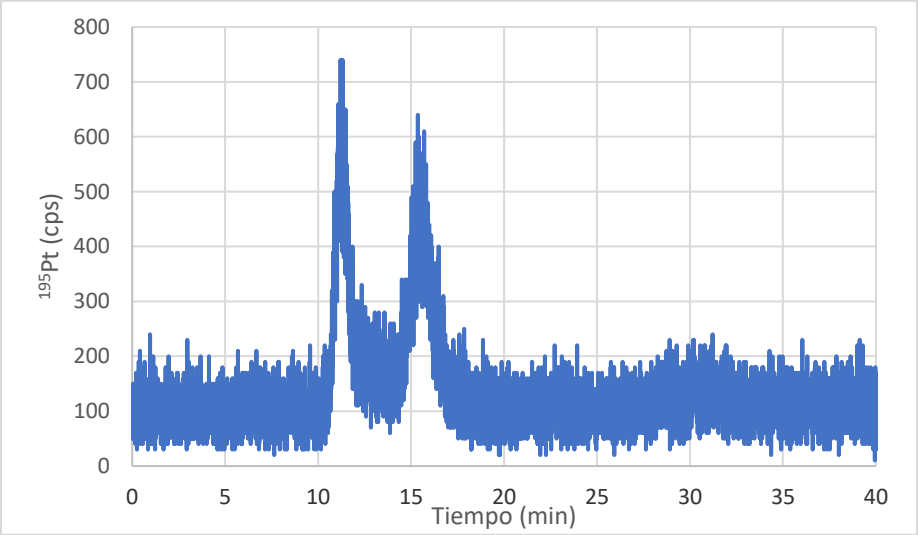
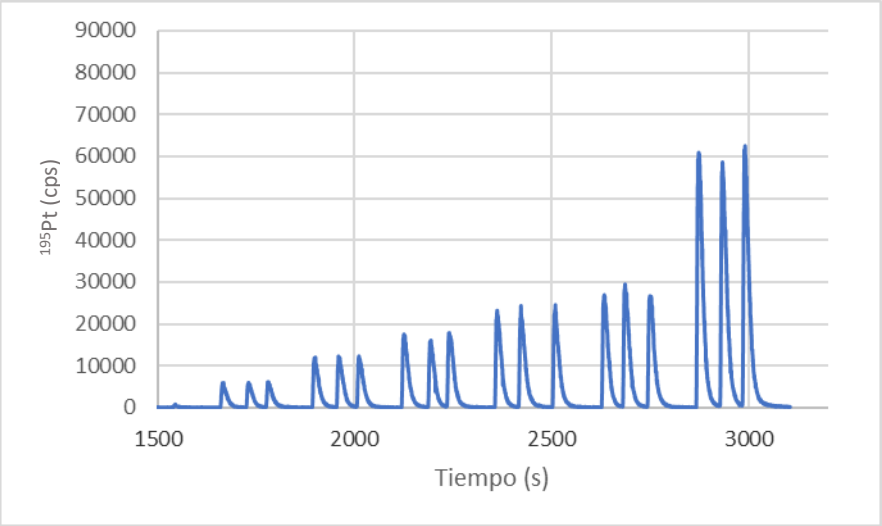


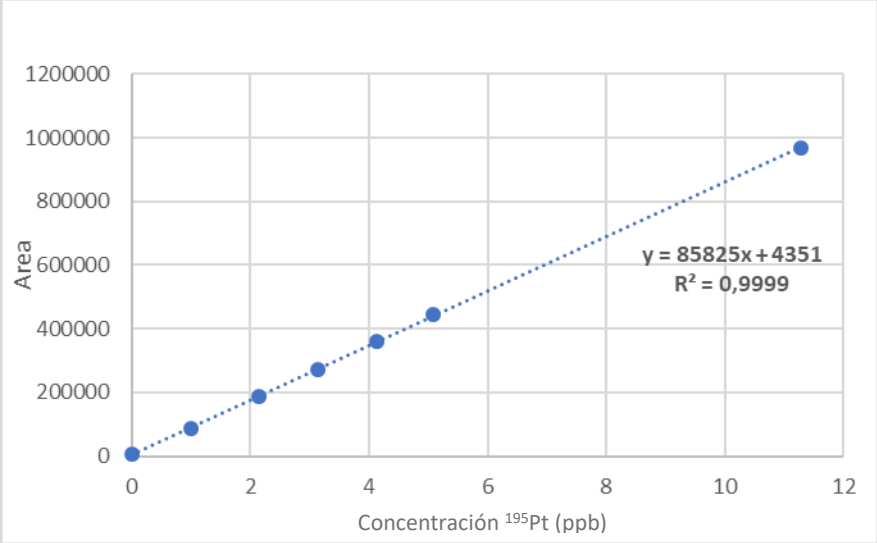
Figura 16. Cromatograma obtenido por HPLC-ICP-MS para encapsulado de oxaliplatino.

8.5. Calibrados de platino para cuantificación de metalofármacos en encapsulado y en cultivos celulares.

La cuantificación de oxaliplatino y cisplatino, tanto tras su encapsulación como tras su tratamiento celular, se llevó a cabo gracias a la calibración del platino mediante FIA-ICP-MS. Los calibrados y sus correspondientes FIA-gramas se encuentran recogidos a continuación.

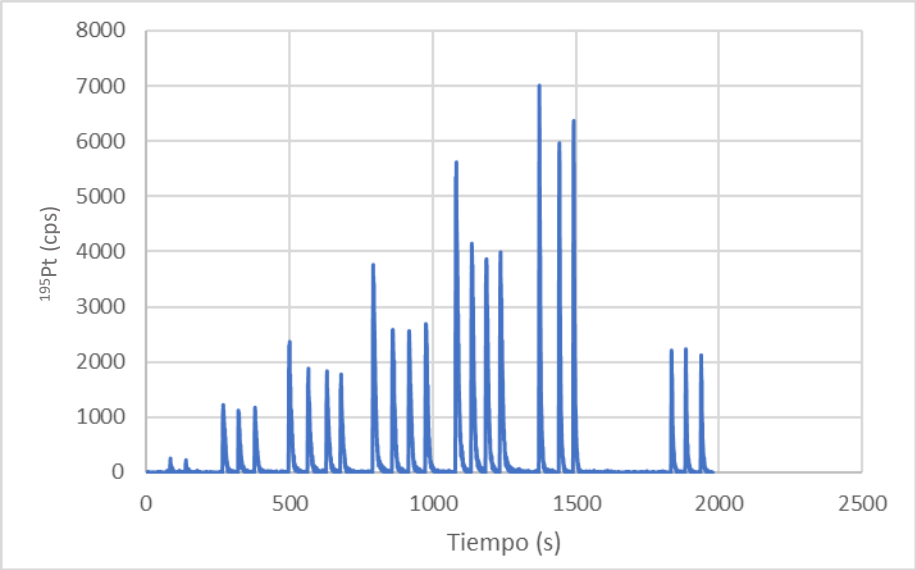


(a)

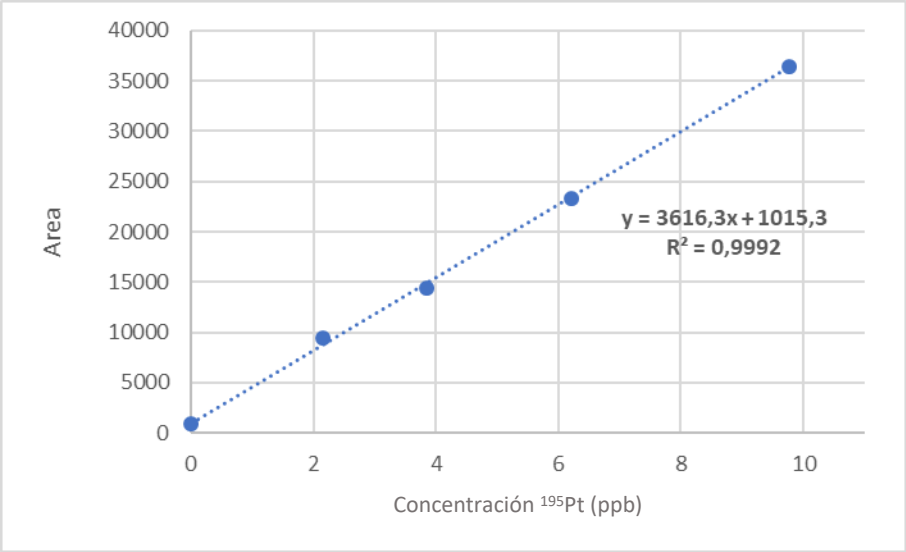


(b)

Figura 17. (a) FIA-grama calibración Pt; **(b)** Calibrado Pt para la cuantificación de cisplatino previo tratamiento de citotoxicidad.

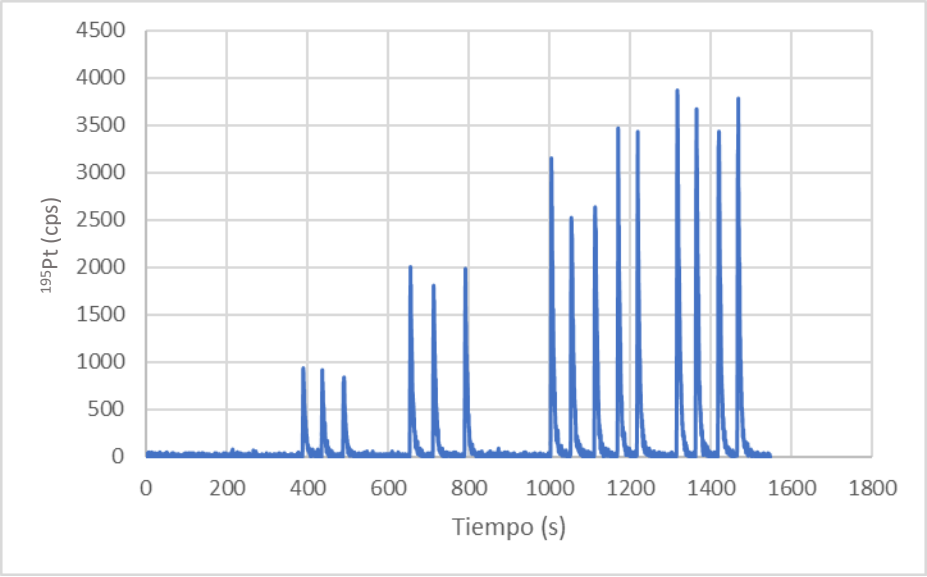


(a)

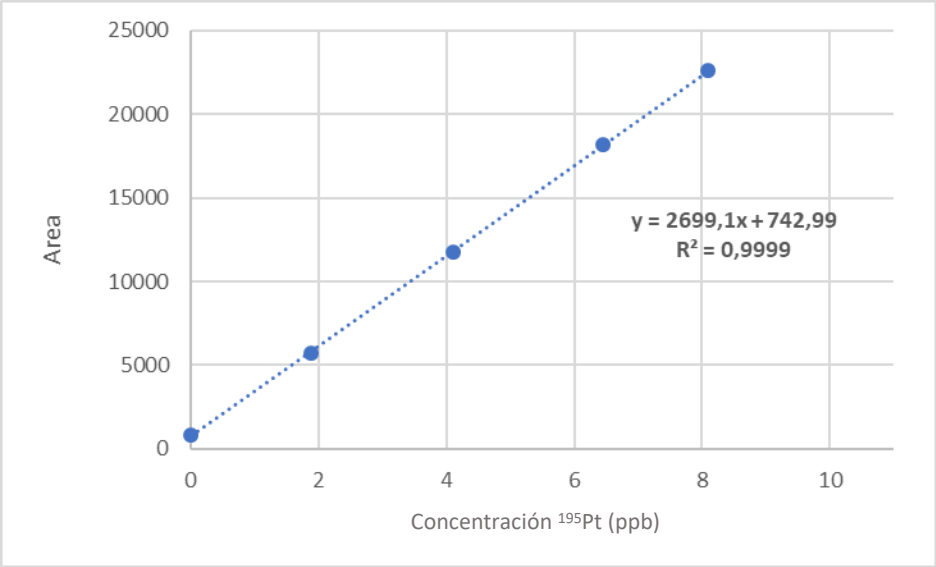


(b)

Figura 18. (a) FIA-grama calibración Pt; **(b)** Calibrado Pt para la cuantificación de oxaliplatino previo tratamiento de citotoxicidad y cuantificación de cisplatino en tratamiento de citotoxicidad.



(a)



(b)

Figura 19. (a) FIA-grama calibración Pt; **(b)** Calibrado Pt para la cuantificación de oxaliplatino en tratamiento de citotoxicidad.

8.6. Datos cuantificación metalofármacos en tratamientos de incorporación celular.

Pese a las representaciones gráficas reflejadas en los Resultados de este trabajo, a continuación, se presentan los datos numéricos medios obtenidos en el estudio de incorporación celular con oxaliplatino y cisplatino en sus dos formas de trabajo.

Tabla 12. Resultados cuantificación cisplatino por peso de células tratadas durante estudio de incorporación celular.

ESTUDIO DE INCORPORACIÓN CELULAR LINEA A2780 CON CISPLATINO		
Muestras	**µg cis-Pt/g células**	**SD**
Control	4,40	0,68
Libre	36,45	3,56
Encapsulado	81,02	3,45
Encapsulado almacenado	45,63	2,54

Tabla 13. Resultados cuantificación oxaliplatino por peso de células tratadas durante estudio de incorporación celular.

ESTUDIO INCORPORACIÓN CELULAR LINEA A2780 CON OXALIPLATINO		
Muestras	**µg oxali-Pt/g células**	**SD**
Control	3,76	3,40
Libre	15,68	1,22
Encapsulado	23,72	0,97