



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**



**CICATA IPN/ LEGARIA  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA APLICADA  
Y TECNOLOGÍA AVANZADA**

**Evaluación Citotóxica en Cáncer de Mama con  
Nanocápsulas de Extracto de Aranto (*Kalanchoe  
daigremontiana*), elaboradas por Nanospray Dryer.**

**Tesis:  
Para obtener el grado de Doctora en Tecnología Avanzada**

**Presenta:  
M. en T. A. Alvarado Palacios Quetzalitzli Gloria**

**Directores de Tesis:  
  
Dr. Eduardo San Martín Martínez  
  
Dra. María del Consuelo Gómez García**

**México D.F. Julio del 2016.**



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

SP-14-DS

*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de México siendo las 13 horas del día 10 del mes de Junio del 2016 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICATA - LEGARIA para examinar la tesis titulada:

**EVALUACIÓN CITOTÓXICA EN CÁNCER DE MAMA CON NANOCAPSULAS DE EXTRACTO DE ARANTO (*Kalanchoe daigremontiana*) ELABORADAS POR NANOSPRAY DRYER.**

Presentada por el alumno:

Alvarado Palacios Quetzalitzli Gloria  
 Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)  
 Con registro: 

B	1	2	0	1	7	9
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Doctorado en Tecnología Avanzada

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISIÓN REVISORA**

Directores de tesis

Dr. Eduardo San Martín Martínez

Dra. María del Consuelo Gómez García

Dra. Mónica Rosalía Jaime Fonseca

Dr. Miguel Ángel Aguilar Méndez

Dra. Berta Quintana Zavala

**PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES**

Dra. Mónica Rosalía Jaime Fonseca



SEP  
 CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA  
 APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA  
 CICATA - LEGARIA



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México, D.F. el día 10 del mes de Junio del año 2016, el (la) que suscribe Alvarado Palacios Quetzalitzli Gloria alumno(a) del Programa de Doctorado en Tecnología Avanzada, con número de registro B120179, adscrito(a) al CICATA IPN, manifiesto(a) que es el (la) autor(a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del (de la, de los) Dr. Eduardo San Martín Martínez y Dra. María del Consuelo Gómez García cede los derechos del trabajo titulado

Evaluación citotóxica en cáncer de mama con nanocapsulas de extracto

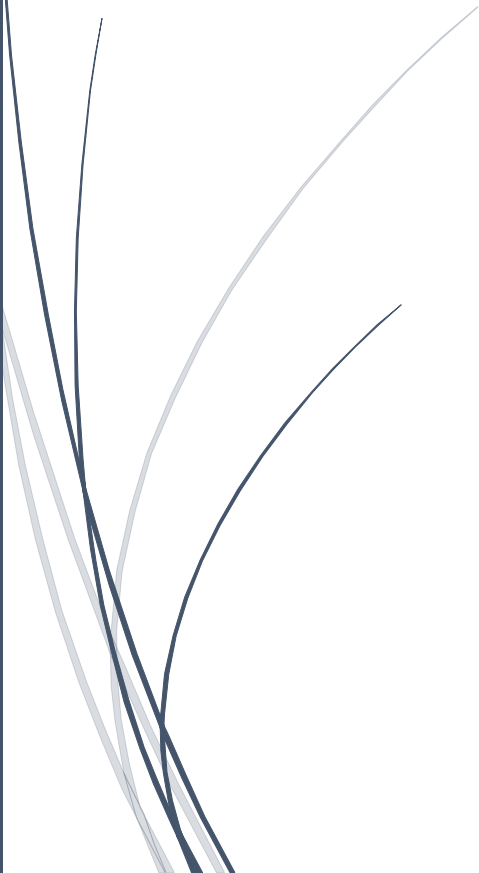
de aranto (*Kalanchoe daigremontiana*) elaboradas por nanospray dry,  
al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del (de la) autor(a) y/o director(es) del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del IPN, Legaria, 649, Col. Irrigación, México, D.F., C.P. 11500. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

M. en T. Alvarado Palacios Quetzalitzli Gloria



# RESUMEN



En los últimos años se han reportado diversos trabajos en todo el Mundo, en los cuales se ha demostrado que la Nano medicina es una aplicación de la Nanotecnología para la prevención y tratamiento de patologías con gran impacto en la población mundial y es una de las vertientes más prometedoras en la Ciencia y Tecnología.

Diversos trabajos, han reportado resultados con potencial citotóxico, proponiendo la elaboración de nanopartículas con diferentes métodos y materiales, todos ellos con el propósito de ofrecer una mejor y mayor esperanza de vida, en personas que están siendo afectadas por enfermedades mortales, tal como es el caso del Cáncer.

El cáncer es la principal causa de muerte tanto en México como en el Mundo; por lo que se han buscado diversas formas, en las que sea posible eliminar o disminuir a las células cancerosas. La Etnomedicina es una ciencia, multidisciplinaria que ha traído consigo un intercambio cultural y de conocimiento que incluye el empleo de plantas con propiedades biológicas, como por ejemplo la capacidad antitumoral; además, que éstas presentan una menor toxicidad y mejor eficacia para el tratamiento del cáncer, comparado con algunos otros fármacos.

Se ha elegido, *Kalanchoe* perteneciente a la familia *Crasulaceae*, ya que en México se utiliza para tratar el cáncer de una manera tradicional.

En este trabajo, fueron estudiadas diferentes fracciones que se obtuvieron del extracto acuotanolico del *Kalanchoe daigremontiana* o también conocido como Aranto, (previamente se obtuvieron resultados satisfactorios) de acuerdo con una polaridad decreciente, con la finalidad de evaluar el posible efecto citotóxico en alguna de ellas.

El método que se utilizó para obtener diferentes fracciones a partir del extracto acuotanolico del Aranto, fue la Técnica por Cromatografía Preparativa.

La línea celular que se utilizó, fue la de cáncer de mama MDA-MB-231 y se realizaron ensayos de viabilidad (ensayo MTT) en las células de cáncer de mama, los cuales indicaron que la fracción 3 del extracto, tuvo el mejor efecto citotóxico comparada con los controles y las otras fracciones, fue el procesado con etanol/ agua en una proporción 3:1, obteniendo un valor  $IC_{50}$  de 69.37  $\mu\text{g}/\text{ml}$  al tiempo de 24 h.

Se realizaron ensayos de viabilidad, en células normales en línea celular de epitelio mamario MCF10A; en el que también tuvo un efecto citotóxico positivo, teniendo un valor de  $IC_{50}$  de 105.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para el tiempo de 24h. Por lo que se decidió realizar la nanoencapsulación, por el método de secado por aspersion (spray dryer), debido a las ventajas que ofrece en el tamaño y morfología que presenta la nanocápsula al final del proceso, y su presentación como producto final siendo polvos. También, se realizó la caracterización de la Fracción, por técnicas químicas; UV-Vis, FTIR, y por Técnicas cromatográficas de HPLC.

Posteriormente, se realizaron 5 formulaciones para obtener nanocápsulas como sigue:

1. Nanocápsulas de PLGA (NPPLGA), esta formulación funciona como control, únicamente es el polímero nanoencapsulado.
2. Nanocápsulas de Extracto Crudo de Aranto (NPEC).
3. Nanocápsulas de Fracción obtenida del Extracto Crudo de Aranto (NPF).
4. Nanocápsulas de Paclitaxel o también conocido como Taxol (NPT).
5. Nanocápsulas de Bufalin (NPB).

Una vez que se obtuvieron las nanocápsulas, se realizaron las pruebas pertinentes a la caracterización, para determinar su tamaño, morfología (por SEM) y carga superficial (Potencial Z).

Nuevamente se realizaron ensayos de viabilidad usando las dos líneas celulares, cabe mencionar que para el caso de NPF se obtuvieron resultados muy buenos; para los ensayos con la línea MDA-MB-231, su  $IC_{50}$  fue de 37.92  $\mu\text{g/ml}$  y para MCF10A el valor de  $IC_{50}$  fue de 582.5  $\mu\text{g/ml}$  lo cual nos indica que no hubo muerte celular significativa, todos los ensayos fueron hechos por triplicado.

Por último se determinó la eficiencia de encapsulación y el tiempo de liberación In vitro para cada una de la nanocápsulas, por el modelo matemático propuesto por los autores (Hai Wang, 2011) Estos resultados podrían ser prometedores para trabajos a futuro, ya que sería importante conocer de forma más detallada, cual es la causa por la cual estas nanocápsulas están siendo selectivas entre una línea celular y otra. De esta forma podrían proponerse nuevas formulaciones farmacéuticas en el área de nano medicina y una buena alternativa para combatir diferentes tipos de enfermedades.



# ABSTRACT



In recent years they have reported various jobs around the world, which have shown that Nano medicine is an application of nanotechnology to the prevention and treatment of diseases with great impact on the world population and is one of the slopes most promising in Science and Technology. Various papers have reported results with potential, proposing the development of nanoparticles with different methods and materials, all with the purpose of offering a better and longer life expectancy in people who are being affected by deadly diseases, as is the case Cancer.

Cancer is the leading cause of death in Mexico and in the World; so they have sought various ways in which possible eliminate or reduce the cancer cells.

Ethnomedicine is a science that has brought multidisciplinary cultural exchange and knowledge which includes the use of plants with biological properties, such as anti-tumor capacity; moreover, they present lower toxicity and improved efficacy for the treatment of cancer, compared to some other drugs. Has been chosen, *Kalanchoe crassulaceae* belonging to the family, because in Mexico it is used to treat cancer in a traditional way.

In this work were studied different fractions that were obtained from acuoetanolico extract of *Kalanchoe daigremontiana* or also known as Aranto, (previously satisfactory results were obtained) according to a decreasing polarity, in order to assess the possible cytotoxic effect on some of them. The method used to obtain different fractions from acuoetanolico Aranto extract was the technique by preparative chromatography. The cell line used was breast MDA-MB-231 cancer and viability assays (MTT assay) in the cells of breast cancer, which indicated that the fraction 3 extract, had a better cytotoxic effect were made compared with the rest it was processed with ethanol / water in a 3: 1 to give an  $IC_{50}$  value of  $69.37 \mu\text{g} / \text{ml}$  at 24 h time. Viability tests were performed on normal cells in mammary epithelial cell line MCF10A; which also it had a positive cytotoxic effect, having an  $IC_{50}$  value of  $105.6 \mu\text{g} / \text{ml}$  for 24h time. So it was decided to nano-encapsulation, by the method of spray drying (spray dryer), due to the advantages in size and morphology that presents the nanocapsules at the end of the process, and its presentation as a final product being powders.

Fraction characterization was also carried out, by chemical techniques; UV-Vis, FTIR, and by HPLC chromatographic techniques.

Subsequently, five formulations were conducted to obtain nanocapsules as follows:

1. Nanocapsules of PLGA (NPPLGA), this formulation serves as control, is only the nanoencapsulated polymer.
2. Extract Crude nanocapsules Aranto (NPEC).
3. Fraction nanocapsules crude extract obtained from Aranto (NPF).
4. Paclitaxel or Taxol Nanocapsules (NPT).
5. Nanocapsules bufalin (NPB).

Once the nanocapsules were obtained evidence relevant to the characterization were performed to determine its size, morphology (SEM) and surface charge (Z potential).

Again viability assays were performed using both cell lines, it is noteworthy that for the case of MPN very good results were obtained; for assays with MDA-MB-231 line, its  $IC_{50}$  was  $37.92 \mu\text{g} / \text{ml}$  and MCF10A the  $IC_{50}$  value was  $582.5 \text{ mg} / \text{ml}$  which indicates no significant cell death, all tests were done by triplicate.

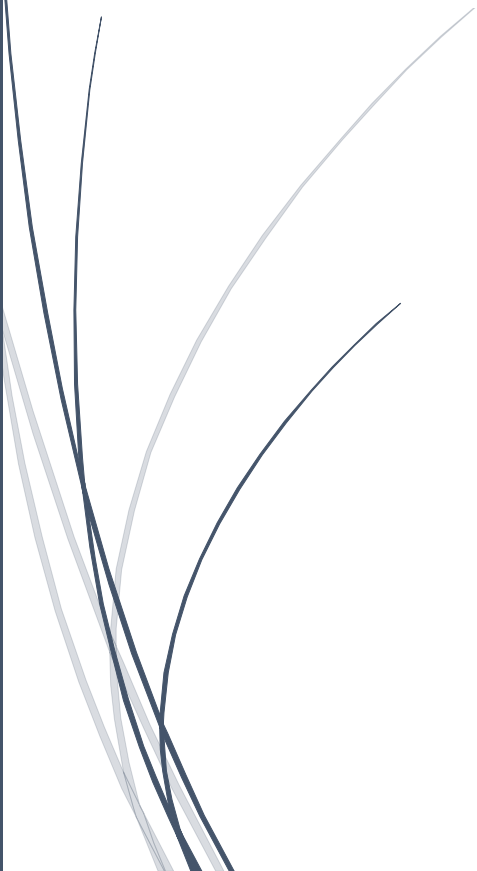
Finally encapsulation efficiency and release time in vitro was determined for each of the nanocapsules, by the mathematical model proposed by the authors (Hai Wang, 2011)

These results could be promising for future work, since it would be important to know in a more detailed, which is the reason why these nanocapsules are being targeted from a cell line and another. In this way they could be proposed new pharmaceutical formulations in the area of nanomedicine and a good alternative to fight different types of diseases.





# AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA



תודה לאלוהים על אלה ארבע שנים

הייתה תמיד איתי

Κύριέ μου ΙΗΣΟΥ ΧΡΙΣΤΟ

παντοδύναμος Θεός ,

Δημιουργός του ουρανού,

Στεριά και θάλασσα .

ΣΤΗ ΘΑΛΑΣΣΑ όλη τη δόξα ,

την τιμή και την τιμή για πάντα και πάντα.

**Cuando la sabiduría entrare en tu corazón,**

**Y la ciencia fuere grata a tu alma,**

**La discreción te guardará;**

**Te preservará la Inteligencia,**

**Proverbios 2:10-11.**

**Da al Sabio, y será más sabio;**

**Enseña al justo, y aumentará su saber.**

**El temor de Jehová es el principio de la sabiduría,**

**Y el conocimiento del Santísimo es la Inteligencia.**

**Proverbios 9: 9 -10.**

Esta tesis se realizó en Laboratorio de Pruebas Físicas del Centro de Investigación de Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada (CICATA) del Instituto Politécnico Nacional, a cargo del Dr. Eduardo San Martín Martínez; así como también agradeciendo todo el apoyo brindado por parte del Laboratorio I de Biomedicina Molecular, de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. María del Consuelo Gómez García.

Durante el desarrollo de este proyecto se contó con la beca de Doctorado otorgada por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

De una forma especial quiero Agradecer al Dr. Eduardo San Martín, por ser la persona que siempre estuvo en la mejor disposición para atender mis dudas, su gran apoyo tanto en conocimiento como en material y dirigir el proyecto de la mejor manera, el brindarme la oportunidad de realizar investigación bajo su dirección.

Así como a la Dra. Consuelo Gómez, porque siempre estuvo al tanto en que pudiera tener todo lo necesario, para realizar este proyecto, agradezco su fina atención para conmigo.

A los Doctores, del CICATA, Dr. Miguel Ángel Aguilar, Dra. Mónica Fonseca, Dra. Delia Quintana, Dr. Fernando Trejo, Dr. Alejandro Rosas, por mencionar algunos de ellos, pero todos contribuyeron de alguna forma para hacer posible este Proyecto.

A la M. en C. Carolina Estanislao por ser la persona que me enseñó las bases para el manejo de las líneas celulares de este trabajo, agradezco tu apoyo incondicional, y tu invaluable amistad.

A mis amigos que conocí durante la Maestría y Doctorado que compartimos muchos buenos momentos: Eduardo, Rodrigo, Adán, Pablo, Olivia, Nathaly, Matilde, y al equipo de Biomateriales, gracias por todo su gran Apoyo, al Sr. Miguel, al Sr. Javier, y a Isabel.

A mi Familia por su amor Indubitable para conmigo...

A mi Papá y A mi Mamá, por todo su amor y comprensión, por toda su ayuda en momentos buenos pero también los más difíciles de mi vida.

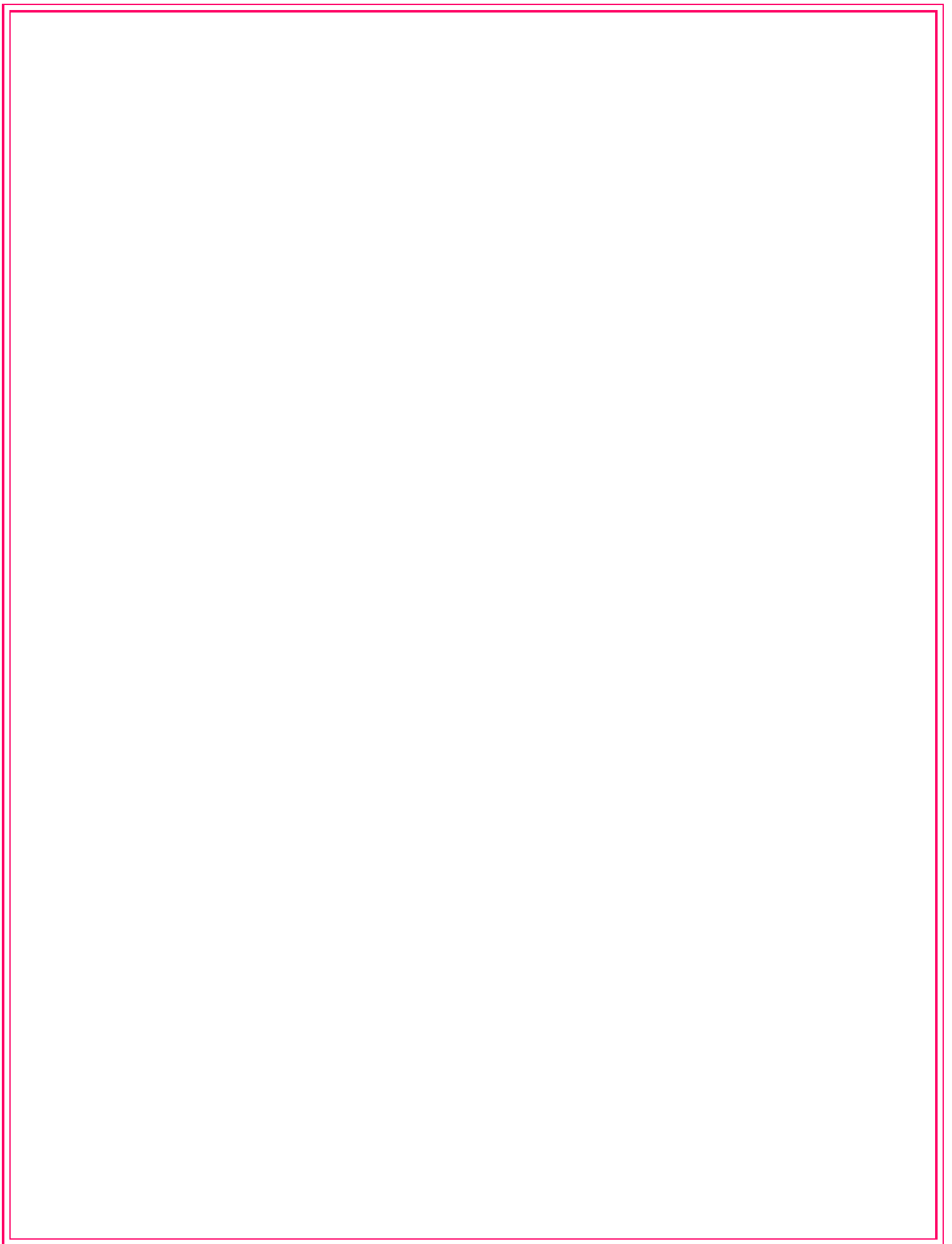
A mi Hermano y A mi Hermana, porque siempre han estado conmigo alentándome a seguir, a pesar de las circunstancias adversas.

A mi Novio, por todo tu amor, consejos y tiempo que has dedicado hacia mí, para que juntos podamos salir adelante.

## INDICE

ANTECEDENTES	1
1.- El cáncer.	2
1.2.- Cáncer de mama.	5
1.3.-Estadísticas de cáncer de mama.	10
1.4.-Tipos generales de tratamiento para el cáncer de mama.	10
1.5.- <i>Kalanchoe daigremontiana</i> (Aranto)	19
1.6.- Nanotecnología	27
1.7.- Polímeros empleados en la encapsulación de fármacos.	29
1.8.- Nanomedicina	31
1.9.- Tipos de nanopartículas para el tratamiento del cáncer.	37
2. JUSTIFICACIÓN	44
3. OBJETIVOS	45
4. MATERIALES Y MÉTODOS	46
4.1. Obtención de información etnobotánica, colecta e identificación taxonómica de la planta	51
4.2 Técnica de extracción por Maceración.	52
4.3 Técnica por Cromatografía Preparativa.	53
4.4 Técnicas de Caracterización para el fitofármaco	55
4.4.1. Identificación de grupos funcionales por la Técnica de UV-Vis.	55
4.4.2. Barrido en UV-Vis de las diferentes fracciones obtenidas con los solventes propuestos.	56
4.4.3. Identificación de grupos funcionales por la Técnica de FTIR.	56
4.4.4 Identificación de compuestos químicos por la Técnica de HPLC.	57
4.5 Ensayos de viabilidad	57
4.5.1. Evaluación de las fracciones del extracto acuotanolico de Aranto por la técnica MTT	58
4.6 Técnica de Spray dryer para la elaboración de partículas.	58
4.6.1. Método de encapsulación por Secado Nano Spray Dryer	60
4.6.2.- Caracterización de las nanocápsulas	61
4.6.2.1. Tamaño y morfología	61
4.6.2.2. Carga Superficial	62
4.6.2.3. Eficiencia de encapsulación	62
4.6.2.4. Liberación <i>in vitro</i>	62
4.6.2.5. Análisis de eficiencia de encapsulación, de fármaco <i>in vitro</i> por la técnica de ELISA.	63
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	65
5.1. Identificación Taxonómica	66
5.2 . Separación por Cromatografía Preparativa	68

5.2.1. Espectros UV- Vis de las Fracciones del extracto acuoetanólico del <i>K. daigremontiana</i>	69
5.3. Efecto citotóxico.	75
5.3.1. Evaluación de las Fracciones obtenidas de la Separación con Acetato de Etilo en la línea celular MDA-MB-231.	75
5.3.2. Evaluación de las fracciones obtenidas de la separación con la mezcla Etanol: Agua en la línea celular MDA-MB-231.	76
5.4 Caracterización del extracto crudo acuoetanólico y la F3 por la técnica de FTIR.	81
5.5. Técnica de HPLC, para la F3 del extracto acuoetanólico Aranto.	84
5.6. Ensayos de Citotoxicidad en línea celular MCF10 A.	86
5.6.1. Extracto Crudo Y Fracción con Efecto citotóxico.	86
5.7. Nanoencapsulación por Secado Nano Spray Dryer	88
5.7.1. Determinación de Morfología y Tamaño por Microscopía Electrónica de Barrido.	89
5.7.2. Determinación de Tamaño (Dispersión de Luz Dinámica) y Análisis de carga superficial (Potencial Z).	93
5.8. Ensayos de Viabilidad y Citotoxicidad, en línea celular MDA-MB-231.	95
5.8.1. Nanocápsulas de Extracto crudo de Aranto	95
5.8.2. Nanocápsulas que contienen la Fracción con mayor efecto citotóxico.	96
5.8.3. Nanocápsulas que contienen Paclitaxel (Taxol)	98
5.8.4. Ensayos de citotoxicidad tratamiento con Bufalin.	100
5.8.5. Nanocápsulas que contienen Bufalin	101
5.9. Ensayos de Viabilidad y Citotoxicidad, en línea celular MCF10A.	102
5.9.1. Nanocápsulas que contienen la Fracción.	103
5.9.2. Nanocápsulas que contienen Taxol.	104
5.9.3. Nanocápsulas que contienen Bufalin	106
5.9.4. Morfología frente al tratamiento en línea celular MDA-MB-231.	107
5.9.5. Morfología frente al tratamiento en línea celular MCF10A.	109
5.9.6. Análisis de eficiencia de encapsulación y Liberación In Vitro por ELISA.	112
5.9.6.1. Extracto Crudo	114
5.9.6.2. Fracción de Aranto	117
5.9.6.3. Bufalin	119
5.9.6.4. Paclitaxel	121
6. CONCLUSIONES	123
7. BIBLIOGRAFÍA	126





# ANTECEDENTES



# 1.- El cáncer.

El cáncer se desarrolla mediante una acumulación de cambios genéticos. Las alteraciones de este tipo pueden heredarse o adquirirse mediante la acción de carcinógenos físicos, infecciosos o químicos. El cáncer proviene de una interacción entre la genética y las exposiciones ambientales.

**Aspectos genéticos del cáncer: El cáncer es una enfermedad genética.**

- Aparece como consecuencia de una serie de alteraciones somáticas del DNA, que culminan en una proliferación celular desmedida.
- Presenta cambios de secuencias del ácido nucleico (mutaciones).
- Las mutaciones son el resultado de errores aleatorios de réplica, exposición a carcinógenos (como la radiación), o deficiencia de los procesos de reparación del DNA.

Prácticamente todos los cánceres nacen de una sola célula y este origen clonal constituye un signo decisivo para diferenciar entre neoplasia e hiperplasia. Se necesitan indefectiblemente múltiples mutaciones acumulativas para que un tumor evolucione de su fenotipo normal a otro totalmente canceroso. Se creen necesarias de cinco a diez mutaciones acumuladas para que una célula evolucione de su fenotipo normal a otro totalmente maligno. (Harrison. Principios de Medicina Interna, 19e Dennis Kasper, et. al, pp. 492 2016)

## **Clases generales de genes cancerígenos.**

Se conocen dos grandes clases de genes vinculados con el cáncer:

Aquellos que de manera directa alteran de forma positiva (oncogenes) o negativa (genes oncosupresores), el crecimiento y proliferación de las células. Estos genes actúan en la proliferación tumoral gracias a su capacidad de controlar la división celular. Los oncogenes son regulados de manera muy estricta en las células normales. En las células neoplásicas dichos genes experimentan mutaciones que anulan tal control y originan una mayor actividad del producto génico. La mutación surge en un sólo alelo del oncogén y actúa de forma dominante. La función normal de los genes oncosupresores es frenar la proliferación celular, función de control que se pierde en el cáncer. Debido a la naturaleza diploide de las células es necesario que queden inactivados ambos alelos para que se pierda totalmente la función de un gen oncosupresor y ello culmine en un mecanismo recesivo a nivel celular, indicando que es necesaria la inactivación de ambas copias de un gen oncosupresor para que surja el cáncer. (Harrison. Principios de Medicina Interna, 17e Dennis Kasper, et. al, pp. 492, 2009)

La segunda clase de genes del cáncer, que son los “cuidadores”, estos no afectan directamente la proliferación celular, sino más bien a la capacidad de la célula para conservar la identidad de su genoma, al haber deficiencia de los genes mencionados, las células muestran una cifra mayor de mutaciones en todos sus genes, incluidos los oncogenes y los oncosupresores. Loeb et al., 2015, planteo la existencia de este fenotipo mutador para explicar la forma en que durante la vida de una persona se suceden fenómenos múltiples de mutación necesarios para la cancerogénesis. Se ha constatado un fenotipo de mutación del cáncer, tanto en la secuencia de nucleótidos como en niveles cromosómicos.



## Mecanismo de inactivación de los genes oncosupresores.

- **Mutaciones puntuales:** Cambios en una o varias bases en la región codificadora de los genes oncosupresores, generan productos proteínicos truncados o proteínas no funcionales.
- **Deleciones:** Hacen que se pierda algún producto funcional, a veces todo el gen o incluso todo un brazo del cromosoma, y con esto se pierde la heterocigosidad en el DNA del tumor, en comparación con el DNA correspondiente del tejido normal.

## Biología de la célula cancerosa y angiogénesis.

El cáncer es una enfermedad genética, el fenotipo maligno o canceroso, implica mutaciones en genes diferentes que regulan en la célula, su proliferación, supervivencia, reparación de DNA y otros aspectos como motilidad, invasión y angiogénesis (Harrison. Principios de Medicina Interna, 17e Dennis Kasper, et. al, pp. 498, 2009).

Dos rasgos característicos definen al cáncer:

- El crecimiento celular no regulado.
- La invasión histica/ metástasis.

Las mutaciones cancerígenas suelen activar vías de transducción de señales que culminan en la proliferación aberrante de células y perturbaciones de programas de diferenciación histoespecíficas (Harrison. Principios de Medicina Interna, 17e Dennis Kasper, et. al, pp. 498, 2009).

Por otro lado la célula normal posee mecanismos de protección que le permiten los daños en el DNA que ocurren durante la síntesis del mismo y la mitosis. No obstante si una célula normal ha sido dañada al grado en que es imposible su reparación, activa una vía suicida y así evita la lesión al órgano (Harrison. Principios de Medicina Interna, 17e Dennis Kasper, et. al, pp. 498, 2009).

Las vías de muerte celular están alteradas comúnmente en las células cancerosas, lo cual hace que vivan células lesionadas que normalmente morirían (Harrison. Principios de Medicina Interna, 17e Dennis Kasper, et. al, pp. 498, 2009).

Las células cancerosas suelen existir en un medio con baja tensión de oxígeno (hipoxia) y privación de nutrientes y la presión selectiva culmina en la perpetuación de variantes neoplásicas que sobreviven en estas circunstancias.

La aparición de nuevas características fenotípicas incluye las que facilitan la invasión y la metástasis, así como la capacidad de atravesar las membranas basales, emigrar a través de la matriz extracelular y de allí al compartimiento vascular y generar vasos nuevos para que sustenten la colonización en sitios remotos (Harrison. Principios de Medicina Interna, 17e Dennis Kasper, et. al, pp. 498, 2009).

## Características fenotípicas de las células cancerosas.

- **Proliferación celular desregulada:**

Aunque las células cancerígenas anormales mueren más rápido que las normales, la tasa de muerte celular no es suficiente para compensar la formación de nuevas células.

La pérdida de los reguladores negativos (oncogenes supresores como Rb y p53) y el incremento de los reguladores (oncogenes como Ras y Myc) ocasionan un control aberrante del ciclo celular y comprende la pérdida de las respuestas restrictivas normales (Harrison. Principios de Medicina Interna, 17e Dennis Kasper, et. al, pp. 499, 2009).

- **Incapacidad para la diferenciación:**

Este desequilibrio es el resultado tanto de defectos genéticos en las células cancerígenas, como de (- la incapacidad del organismo para detectar y destruir estas células), lo que ocasiona una detención en una fase anterior a la diferenciación terminal (Harrison. Principios de Medicina Interna, 17e Dennis Kasper, et. al, pp. 499, 2009).

- **Pérdidas de las vías apoptóticas normales:**

La inactivación de p53 aumenta en miembros de la familia Bcl – 2; este defecto prolonga la supervivencia de células con mutaciones oncogénicas e inestabilidad genética y permite la expansión y diversificación clonales dentro del tumor, sin activar vías de muerte fisiológicas de la célula (Harrison. Principios de Medicina Interna, 17e Dennis Kasper, et. al, pp. 499, 2009).

- **Inestabilidad genética:**

Defectos en las vías de reparación de DNA que culminan en mutaciones de un solo nucleótido u oligonucleótidos (como la inestabilidad de microsatélites, MIN) o más frecuentemente inestabilidad cromosómica (CIN) que ocasiona aneuploidía. Es causada por la pérdida de función p53, BRCA1 / 2, genes de reparación de discordancia y otros (Harrison. Principios de Medicina Interna, 17e Dennis Kasper, et. al, pp. 499, 2009).

- **Pérdida de senectud replicativa:**

Las células normales dejan de dividirse después de 25 a 50 duplicaciones de población. El paro o detención son regulados por Rb, p16<sup>Ink4a</sup> y por vías de p53. La réplica ulterior ocasiona pérdida de telomeros con crisis. Las células supervivientes a menudo quedan con graves anormalidades cromosómicas, y la pérdida de la función de p53 anula las vías restrictivas y permite que las células neoplásicas escapen a la detención del ciclo celular (Harrison. Principios de Medicina Interna, 17e Dennis Kasper, et. al, pp. 499, 2009).

- **Intensificación de la angiogénesis:**

Es causada por la mayor expresión génica de factores proangiogénicos (VEGF, FGF, IL -8) por parte de células del tumor, del estroma o por pérdida de los reguladores negativos (endostatina, tumstatina, trombospondina) (Harrison. Principios de Medicina Interna, 17e Dennis Kasper, et. al, pp. 499, 2009).

La división celular normal o anormal dependerá de una serie de eventos extracelulares e intracelulares; dentro de estos eventos mitogénicos y de diferenciación celular, el EGF (del Inglés Epidermal Growth Factor) y el PDGF (del Inglés Platelet Derived Growth Factor) como proteínas inductoras de estos efectos y su sitio receptor como modulador y ejecutor de los mismos; juegan un papel esencial. La unión del EGF a su sitio receptor provoca la activación del receptor con su consecuente internalización intracelular y por vía de la tirosina cinasa envía las señales de

transducción al núcleo y de esta forma estimula el crecimiento celular. Muchos tumores malignos sobreexpresan y amplifican los sitios receptores de membrana para el factor de crecimiento epidérmico, este hecho le transfiere un índice de crecimiento, invasión y metástasis que los convierte en muy agresivos. (Osorio, et al. 2009)

- **Invasión:**

En este evento se presenta la pérdida de contactos intracelulares (como uniones de nexos, cadherens) y una mayor producción de metaloproteínas de matriz (MMP). A menudo asume la forma de transición epitelial a mesenquimatosa (EMT), con células epiteliales ancladas que se transforman en fibroblastos muy similares a los móviles.

- **Metástasis:**

Propagación de células tumorales a los ganglios linfáticos o tejidos distantes. Fenómeno limitado por la capacidad de las células tumorales para sobrevivir en un entorno extraño (Harrison. Principios de Medicina Interna, 17e Dennis Kasper, et. al, pp. 499, 2009).

- **Evasión del sistema inmunitario:**

Disminución del número de moléculas de MHC, clases I y II; inducción de la tolerancia de células T; inhibición de la función normal de las células dendríticas, de las células T; o de ambos tipos, variantes de pérdida antigénica y heterogenicidad clonal.

En circunstancias normales, la actividad de tirosincinasa es breve y es revertida por las tirosinfosfatasas proteínicas.

En muchos cánceres de humanos, las tirosincinasas o componentes de las vías subsiguientes son activadas por mutación, amplificación génica o translocaciones cromosómicas (Bruce Alberts, et al 1996).

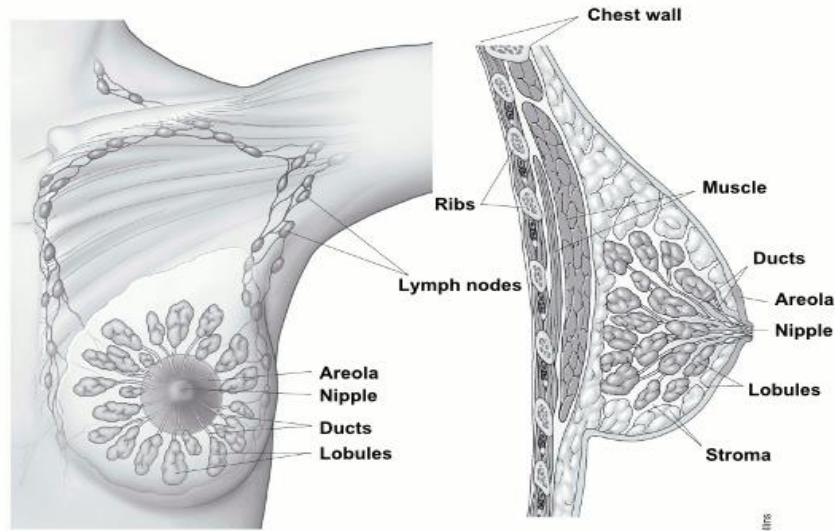
Los cánceres se clasifican de acuerdo con el tejido y con el tipo celular a partir de los que se originan. Los cánceres procedentes de células epiteliales se denominan carcinomas; los que proceden de tejido conjuntivo o de células musculares se denominan sarcomas. Entre los cánceres que no encajan en ninguna de estas dos amplias categorías se encuentran las diversas formas de leucemia, derivadas de células hematopoyéticas, y los cánceres derivados de células del sistema nervioso (Bruce Alberts, et al 1996).

## **1.2.- Cáncer de mama.**

El cáncer de mama es un tumor maligno que se origina en las células de la mama. Un tumor maligno es un grupo de células cancerosas que crecen en un determinado órgano o tejido y posteriormente pueden propagarse a áreas distantes del cuerpo (metástasis) (American Cancer Society, 2014).

Las influencias que provocan que la célula iniciada progrese a través del proceso carcinogénico y sufra cambios en su fenotipo se denominan “promotores”, como los estrógenos para el cáncer de mama.

La glándula mamaria normal en la mujer se compone principalmente de los lobulillos (glándulas productoras de leche), conductos (pequeños tubos que llevan la leche de los lobulillos al pezón) y estroma (tejido graso y tejido conectivo que rodea los conductos y lóbulos, los vasos sanguíneos, y vasos linfáticos) (American Cancer Society, 2014).



**Fig. 1 Esquema en el que se muestra glándula mamaria normal, tomado de Sam and Ammy Collins (American Cancer Society, 2014).**

La mayoría de los cánceres de seno comienzan en las células que recubren los conductos (cáncer ductal), otros en las células que recubren los lobulillos (cáncer lobular).

### **Clasificación del cáncer de mama.**

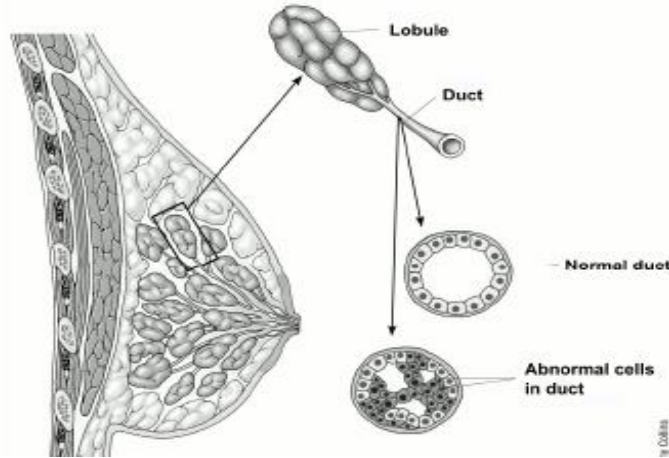
El cáncer de mama se divide en categorías de acuerdo a diferentes esquemas, cada uno basado en diferentes criterios y para servir a un propósito diferente; las clasificaciones se basan principalmente en: el tipo histopatológico, el grado del tumor, el estadio del tumor y la expresión de proteínas y genes (American Cancer Society, 2014).

#### **o Tipo histopatológico.**

La mayoría de los cánceres de mama son carcinomas, un tipo de cáncer que comienza en las células epiteliales de la mama. De hecho, los cánceres de mama son a menudo un tipo de carcinoma llamado adenocarcinoma, que es el carcinoma que comienza en el tejido glandular (American Cancer Society, 2014).

#### **Carcinoma ductal *in situ*.**

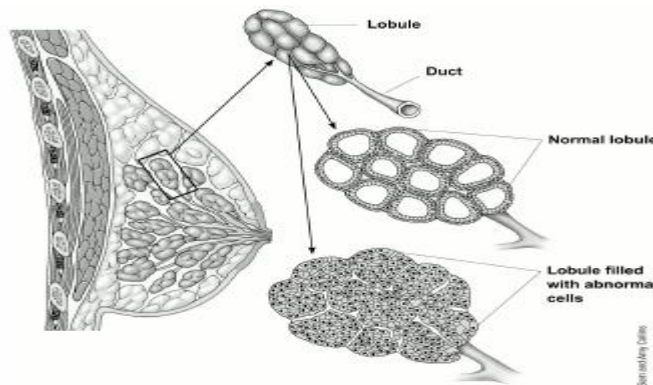
El carcinoma ductal *in situ* (DCIS; también conocido como carcinoma intraductal) se considera no invasiva o cáncer de mama pre-invasiva. La diferencia entre DCIS y cáncer invasivo es que las células no se han diseminado (invadido) a través de las paredes de los conductos en que rodea el tejido mamario. Debido a que no ha invadido, el DCIS no puede propagarse (metástasis) fuera de la mama.



**Fig. 2** Esquema en el que se muestra carcinoma ductal *in situ*, tomado de Sam and Ammy Collins (American Cancer Society, 2014).

### Carcinoma lobular *in situ*.

En el carcinoma lobular *in situ* (LCIS) las células cancerosas crecen en los lóbulos de las glándulas productoras de leche de la mama, pero no crecen a través de la pared de los lóbulos. LCIS (también llamado neoplasia lobular) a veces se agrupa con el carcinoma ductal *in situ* (DCIS), como un cáncer de mama no invasivo, pero podría convertirse en un cáncer invasivo si no es tratado. Las mujeres con esta condición tienen de 7 a 11 veces más riesgo de desarrollar cáncer invasivo en cualquiera de los senos (American Cancer Society, 2014).



**Fig. 3** Esquema en el que se muestra carcinoma lobular *in situ*, tomado de Sam and Ammy Collins (American Cancer Society, 2014).

### Carcinoma ductal Invasivo (o infiltrante).

El carcinoma ductal Invasivo o infiltrante (IDC) es el tipo más común de cáncer de mama se inicia en un conducto de leche de la mama, las células localizadas a través de la pared del conducto se lisan, y entonces las células de cáncer crecen en el tejido graso de la mama. En este punto, puede ser capaz de propagarse (metástasis) a otras partes del cuerpo a través del sistema linfático y el torrente sanguíneo. Sobre 8 de 10 los cánceres de mama invasivos son carcinomas ductales infiltrantes.

## Carcinoma lobular Invasivo (o infiltrante).

El Carcinoma lobular invasivo (CDI) comienza en las glándulas productoras de leche (lobulillos). Como IDC, puede propagarse (metástasis) a otras partes del cuerpo. Aproximadamente 1 de cada 10 cánceres de mama invasivo es una CIT. Carcinoma lobular invasivo puede ser más difícil de detectar por una mamografía que el carcinoma ductal invasivo (American Cancer Society, 2014).

### o Grado de cáncer de mama

Esta clasificación se basa en la observación del tejido de mama obtenido de una biopsia en el cual se detecta el grado de diferenciación de las células y las alteraciones estructurales del tejido. La determinación del grado puede ayudar a predecir el pronóstico de una mujer.

De tal forma que un menor grado indica un cáncer de crecimiento lento que es menos probable que se extienda, mientras que un número más alto indica un cáncer de crecimiento más rápido que es más probable que se propague. El grado del tumor es un factor para decidir si se necesita un tratamiento adicional después de la cirugía.

Para los cánceres invasivos, el grado histológico del tumor se llama a veces la floración- Grado Richardson, grado Nottingham, grado Scarff-Bloom-Richardson, o grado Elston-Ellis. A veces, el grado se expresa con palabras en lugar de los números:

Grado 1 es el mismo que bien diferenciado

Grado 2 es el mismo que moderadamente diferenciado.

Grado 3 es el mismo que pobremente diferenciado

Cánceres de Grado 3 tienden a crecer y diseminarse más rápidamente (American Cancer Society, 2014).

### o Receptores hormonales y el estado de HER2.

Los médicos a menudo dividen los cánceres de mama invasivos en grupos basados en la presencia de receptores hormonales (ER y PR) y si el cáncer expresa HER2 (American Cancer Society, 2014).

Los receptores hormonales son proteínas que se expresan diferencialmente en las células mamarias normales y en las células de cáncer de mama lo que hace que esta característica sea considerada para aplicar el tratamiento correspondiente.

Los cánceres de mama que tienen receptores de estrógeno se refieren a menudo como ER-positivo (o ER +), mientras que los que contienen receptores de progesterona se denominan cánceres PR-positivo (o PR +).

**Receptores hormonales positivos:** Si las células de cáncer de mama contienen receptores a estrógeno o progesterona, pueden ser llamados receptores hormonales positivos (o simplemente hormonal positivo).

Los cánceres de mama que son receptores hormonales positivos pueden ser tratados con medicamentos que reducen los niveles de estrógeno o receptores que bloquean a los de estrógeno. Esto incluye cánceres que son ER-negativo, pero PR-positivo. Cánceres con receptores hormonales positivos tienden a crecer más lentamente que los que son receptores hormonales negativos.

Cánceres con receptores hormonales positivos son más común en las mujeres después de la menopausia (American Cancer Society, 2014).

**Receptores hormonales negativos:** Si las células de cáncer de mama no presentan los receptores de estrógeno o receptores de progesterona.

El tratamiento con medicamentos de terapia hormonal no es útil para estos tipos de cáncer. Estos cánceres tienden a crecer más rápidamente que los cánceres con receptores hormonales positivos. Cánceres negativos de la hormona receptor-son más comunes en mujeres que aún no han pasado por la menopausia (American Cancer Society, 2014).

**HER2 positivo:** Las células cancerosas expresan la proteína HER2. Estos cánceres pueden ser tratados con fármacos que se dirigen HER2 (American Cancer Society, 2014).

**HER2 negativos:** Cuando las células tumorales no expresan HER2 (American Cancer Society, 2014).

**Triple negativo:** Si las células de cáncer de mama no tienen receptores de estrógeno o progesterona y no expresan HER2, se les llama triple negativo. Estos cánceres tienden a ocurrir con más frecuencia en las mujeres más jóvenes y en las mujeres que son afro-americano o Hispano / Latina. Los cánceres de mama triple negativo tienden a crecer y diseminarse más rápidamente que la mayoría de otros tipos de cáncer de mama. Debido a que las células tumorales no tienen receptores ER o PR, la terapia hormonal no es útil en el tratamiento de estos cánceres.

**Triple-positivo:** Este término se utiliza para describir los cánceres que son ER-positivo, PR-positivos, y tienen demasiada HER2. Estos cánceres pueden ser tratados con medicamentos hormonales, así como fármacos que se dirigen HER2.

- **Expresión génica**

De acuerdo con características moleculares, se divide en cuatro grupos:

**Los tipos luminales son receptor de estrógeno (ER) -positivo.**

Los patrones de expresión génica de estos cánceres son similares a las células normales que revisten el conductos mamarios y las glándulas (el interior de un conducto o glándula se llama su lumen).

**Luminal A:** Estos cánceres son de bajo grado, tienden a crecer con bastante lentitud, y tienen el mejor pronóstico.

**Luminal B:** Estos cánceres en general crecen algo más rápido que el cáncer Luminal A y su pronóstico no es tan bueno.

**Tipo de HER2:** Estos cánceres tienen copias adicionales del gen HER2. Estos tipos de cáncer tienden a crecer más rápidamente y tienen un peor pronóstico, aunque a menudo se pueden tratar exitosamente con terapias específicas dirigidas a HER2 que a menudo se dan junto con quimioterapia.

**Tipo Basal:** La mayoría de estos cánceres son la llamada de tipo triple negativo, es decir, carecen de receptores de estrógeno o progesterona y tienen HER2. Este tipo es más común entre las mujeres con gen BRCA1 mutaciones. Por razones que no se entienden bien, este tipo de cáncer es más

común entre las mujeres más jóvenes y afro-americanos. Estos son cánceres de alto grado que tienden a crecer rápidamente y tienen un pronóstico desalentador.

### **1.3.-Estadísticas de cáncer de mama.**

A nivel mundial, el cáncer de mama se ubica entre las principales causas de muerte por cáncer junto con el cáncer de pulmón, hígado, estómago y colon (OMS, 2014). En México, para la población de 20 años y más, es la cuarta causa de mortalidad por tumores malignos (7.9%); en tanto que en los hombres, apenas representa 0.1% de las defunciones por cáncer (OMS, 2014).

Por grupos de edad, los fallecimientos de mujeres de 20 años y más muestran un incremento conforme aumenta la edad. Entre las mujeres de 40 a 49 años, la tasa de mortalidad observada por cáncer de mama es de 14.36 y de 29.50 para las mujeres de 50 a 59 años; en las de 75 a 79 años es de 47.27, alcanzando la tasa de mortalidad más alta en el grupo de 80 años y más con 64 fallecimientos por cada 100 mil mujeres de ese grupo de edad.

Por entidad federativa, Coahuila tiene la tasa más alta de mortalidad por cáncer de mama entre mujeres mayores de 20 años, con 28.58 % por cada 100 mil, superando ligeramente al Distrito Federal, con 20.12 % y a Sonora con 19.75 % fallecimientos por cada 100 mil mujeres. Por otro lado, Quintana Roo, Campeche y Oaxaca, son los estados con las tasas más bajas (8.00 %, 7.60 % y 7.13% por cada 100 mil mujeres de 20 años y más, respectivamente). De manera general, se observa que en el norte del país, así como en Jalisco, Colima, Aguascalientes, Morelos y el Distrito Federal, presentan tasas superiores a 15.92 %, mientras en el sur, no rebasan el 10.69%.

Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2015) señalan que cada año se detectan 1.38 millones de casos nuevos y ocurren 458 mil muertes por esta enfermedad en la Ciudad de México (OPS, 2014).

Según datos de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), en el continente americano, el cáncer de mamá es el más común entre las mujeres (29% respecto del total de casos de cáncer) y es la segunda causa de muerte por tumores malignos para este grupo de población, superada únicamente por el cáncer de pulmón (15 contra 18 por ciento); para el año 2030, la OPS estima más de 596 000 casos nuevos y más de 142 100 muertes en la región, principalmente en la zona de América Latina y el Caribe (OPS, 2014 )

### **1.4.-Tipos generales de tratamiento para el cáncer de mama.**

Los principales tipos de tratamiento para el cáncer de mama son:

- Cirugía
- Radioterapia
- Quimioterapia
- Hormonoterapia
- Terapia dirigida



Los tratamientos pueden ser clasificados en grupos amplios, sobre la base de cómo funcionan y cuando son usados.

### **Terapia Local y Terapia sistémica.**

La terapia local está destinada a tratar un tumor en el sitio sin afectar al resto del cuerpo; la cirugía y la radioterapia son ejemplos de terapias locales.

La terapia sistémica se refiere a los medicamentos que se pueden dar por vía oral o directamente en el torrente sanguíneo para llegar a las células cancerosas en cualquier parte del cuerpo; la quimioterapia, la hormonoterapia y terapia dirigida son tratamientos sistémicos (American Cancer Society, 2014).

### **Terapia Adyuvante y terapia neoadyuvante**

Se conoce como terapia adyuvante, al tratamiento adicional a la quimioterapia, radioterapia, que se les da a los pacientes después de la cirugía para ayudar a evitar que el cáncer regrese. Se cree que, incluso en las primeras etapas de cáncer de mama, las células cancerosas pueden desprenderse del tumor primario de mama y comienzan a extenderse. Estas células no se pueden detectar en un examen físico o visto en las radiografías u otras pruebas de imagen, y que no causan síntomas. Pero pueden migrar hasta convertirse en nuevos tumores en los tejidos cercanos, pueden ser en otros órganos e incluso en los huesos. El objetivo de la terapia adyuvante consiste en matar a estas células ocultas. Tanto la terapia sistémica (como la quimioterapia, la hormonoterapia, y la terapia dirigida) y la radiación pueden ser utilizados como terapia adyuvante (American Cancer Society, 2014).

La terapia neoadyuvante, es un tratamiento que tiene como objetivo reducir el tumor con la esperanza de evitar una operación extensa. Algunos pacientes reciben tratamiento, como la quimioterapia o la terapia hormonal, antes de la cirugía. También disminuye la posibilidad de que el cáncer regrese después. Muchos pacientes que reciben terapia neoadyuvante no necesitarán terapia adyuvante, o sería mínima (American Cancer Society, 2014).

### **La cirugía para el cáncer de mama**

La cirugía a menudo es necesario para extirpar un tumor de mama. Opciones para esto incluyen la cirugía conservadora de la mama y mastectomía.

La cirugía también se utiliza para comprobar la propagación del cáncer en los ganglios linfáticos de la axila, opciones para esto incluyen una biopsia de ganglio linfático centinela y disección en los ganglios linfáticos axilares (American Cancer Society, 2014).

### **La radioterapia para el cáncer de mama**

La radioterapia es un tratamiento con rayos de alta energía o partículas que destruyen las células cancerosas. La radiación en la mama a menudo se administra después de la cirugía conservadora de la mama para ayudar a eliminar a las células tumorales que hubieran quedado después de la cirugía (American Cancer Society, 2014).

## La quimioterapia para el cáncer de mama

La quimioterapia es el tratamiento con medicamentos contra el cáncer que se pueden administrar por vía intravenosa o por vía oral. Los medicamentos viajan a través del torrente sanguíneo para llegar a las células cancerosas presentes en diferentes órganos o tejidos del cuerpo. La quimioterapia se administra en ciclos, en donde después de cada período de tratamiento se da un período de recuperación. El tratamiento suele durar varios meses (American Cancer Society, 2014).

Cuando la terapia se administra a pacientes sin evidencia de cáncer después de la cirugía, se llama terapia adyuvante. La cirugía se utiliza para eliminar todo el cáncer que se puede ver, pero la terapia adyuvante se usa para destruir cualquier célula cancerosa que puede haber sido dejado o propagado, pero no se puede ver, incluso en las pruebas de imagen. Si estas células se dejan crecer, pueden establecer nuevos tumores en otros lugares en el cuerpo.

La terapia adyuvante después de la cirugía conservadora de la mama o mastectomía reduce el riesgo de que vuelva el cáncer de mama.

**Antes de la cirugía (quimioterapia neoadyuvante):** es tomar los tratamientos antes de la cirugía en lugar de después; la quimioterapia neoadyuvante tiene dos beneficios.

En primer lugar, la quimioterapia puede reducir el tamaño del tumor de manera que se puede extirpar con cirugía menos extensa. También, dando quimioterapia antes de la extirpación del tumor, los médicos pueden ver mejor cómo responde el cáncer. Si el primer grupo de medicamentos no reducen el tumor, el médico sabrá que otros fármacos son necesarios.

Para el cáncer de mama avanzado: La quimioterapia también se puede usar como el principal tratamiento para las mujeres cuyo cáncer se ha diseminado fuera de la zona del pecho y las axilas, ya sea cuando es diagnosticado o después de los tratamientos iniciales. La duración del tratamiento depende de si el cáncer se reduce y qué tan bien tolera el tratamiento (American Cancer Society, 2014).

En la mayoría de los casos (especialmente adyuvante y tratamiento neoadyuvante), la quimioterapia es más eficaz cuando se utilizan combinaciones de más de un medicamento. Se están usando muchas combinaciones, y no está claro que cualquier combinación única es claramente la mejor. Los estudios clínicos siguen para comparar los tratamientos más eficaces de hoy en contra de algo que puede ser mejor (American Cancer Society, 2014).

Los medicamentos de quimioterapia más comunes utilizados para el cáncer de mama incluyen las antraciclinas (tales como doxorubicina / Adriamycin® y epirubicina / Ellence®) y los taxanos (por ejemplo, paclitaxel / Taxol® y docetaxel / Taxotere®). Estos se pueden usar en combinación con ciertas otras drogas, como el fluorouracilo (5-FU), ciclofosfamida (Cytosan®), y carboplatino (American Cancer Society, 2014).

Para los cánceres que son HER2 positivo, el fármaco dirigido trastuzumab (Herceptin®) es a menudo dado con uno de los taxanos. El pertuzumab (Perjeta®) también se puede combinar con trastuzumab y docetaxel (American Cancer Society, 2014).

Algunos de los medicamentos utilizados en la quimioterapia para el tratamiento de mujeres con cáncer de mama avanzado, son:

- Docetaxel
- Paclitaxel
- Agentes Platinum (cisplatino, carboplatino)
- Vinorelbine (Navelbine®)
- Capecitabine (Xeloda®)
- Doxorubicina Liposomal (Doxil®)
- Gemcitabine (Gemzar®)
- Mitoxantrone
- Ixabepilone (Ixempra®)
- Paclitaxel Albumina (nab-paclitaxel o Abraxane®)
- Eribulin (Halaven®)

Todavía algunas combinaciones, tales como carboplatino o cisplatino y gemcitabina se utilizan comúnmente para tratar el cáncer de mama avanzado (American Cancer Society, 2014).

Los mecanismos generales por los que los antineoplásicos citostáticos controlan el cáncer, se basan en la inhibición de la multiplicación celular y del crecimiento tumoral, que pueden tener lugar en la célula a varios niveles: síntesis y función de las macromoléculas; organización citoplasmática; síntesis y función de la membrana celular; entorno de la célula cancerosa en crecimiento (American Cancer Society, 2014).

Los fármacos citotóxicos bloquean el ciclo celular (Fig. 4). Cuando las lesiones en el ADN son detectadas, el gen supresor p53, detiene a las células en la fase G1 del ciclo celular, impidiéndoles pasar a la fase S. Entonces el gen supresor induce mecanismos reparadores o proteínas desencadenantes, que causan apoptosis (American Cancer Society, 2014).

Todos los fármacos tumorales citotóxicos pueden interferir con la progresión de las células a lo largo del ciclo celular, lo que conlleva la sincronización y enlentece a las células que proliferan rápidamente. Esto conduce a una disminución de la sensibilidad a los fármacos de fase S.

El número de interacciones individuales entre un fármaco y las moléculas blanco requeridas para matar a una única célula puede ser enorme. Se estima, que deben unirse un millón de moléculas de cisplatino al ADN de una única célula para eliminarla (American Cancer Society, 2014). Según su relación con el ciclo celular, se ha demostrado para ciertos fármacos citotóxicos como los alcaloides de la vinca y antimetabolitos, actúan sólo sobre las células en proliferación activa; otros pueden ejercer su acción también sobre células, en vasos de neoformación y que desemboca en la fase de crecimiento exponencial, que durará mientras no se haga crítica la masa respecto de su nutrición vascular (American Cancer Society, 2014).

Otros pueden ejercer su acción también sobre células en G<sub>0</sub>, como algunos alquilantes y antibióticos. Los antimetabolitos, al interferir en la incorporación del sustrato normal en las cadenas, de ácidos nucleicos, sólo actúan en fase S; los alcaloides de la vinca inician su acción en esta misma fase, pero su efecto letal ocurre en el momento de la metafase en que la ausencia del huso mitótico impide la migración de los cromosomas para originar dos células (American Cancer Society, 2014). Para los agentes alquilantes, al impedir los fenómenos de replicación del material genético, el momento de mayor toxicidad corresponde al fin de las fase SG<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>, aunque, no está restringido al ciclo de multiplicación. Estas diferencias de objetivo son una de las bases de la poliquimioterapia, que intenta potenciar la citotoxicidad de varios agentes utilizados en forma conjunta (American Cancer Society, 2014).

La mayoría de los antineoplásicos se pueden agrupar, de acuerdo a si dependen de que la célula esté en una determinada fase de ciclo y en este caso, de si su actividad es mayor, cuando la célula esté en una fase específica de éste (American Cancer Society, 2014).

Los fármacos que son más activos contra las células que están en una fase específica, del ciclo celular se denominan fármacos específicos de una fase del ciclo celular, (Fig. 4 y Tabla 1) La ciclofosfamida y otros agentes alquilantes son activos sobre todas las células, pero tienen una mayor actividad sobre las células en fase  $G_1/S$ . En otros agentes cicloespecíficos como los antimetabolitos, que matan sólo a las células en crecimiento activo, el aumento de la dosis tiene un efecto meseta, ya que el crecimiento celular se vuelve más lento con la quimioterapia y prolongar la duración de la exposición, aumentará la muerte celular (American Cancer Society, 2014). Las curvas de supervivencia específicas de fase muestran una meseta, sin aumento de muertes a dosis mayores. Sin embargo, puede alcanzarse una mayor mortalidad, cuando se aumenta el tiempo de exposición, pero no la dosis.

Los fármacos que producen este tipo de curva son: los fármacos citotóxicos antimetabolitos como citarabina, tioguanina e hidroxiurea, que son activos sólo en la fase S; epipodofilotoxinas y alcaloides de la vinca, que tienen una toxicidad letal máxima durante la fase M; bleomicina, con una actividad máxima en la fase  $G_2$ . Con los fármacos específicos de fase, existe una limitación de número de células, que pueden ser destruidas con una única exposición al fármaco instantánea, ya que solamente morirían aquellas células que estén en la fase sensible. Una dosis más alta, no matará más células. La destrucción de un mayor número de células, requiere o una exposición prolongada al fármaco o dosis repetidas de éste, lo que permitirá a las células entrar en la fase sensible del ciclo. Fármacos no específicos del ciclo celular. Existe otro grupo de fármacos, que muestra actividad matando a las células en cualquier etapa del ciclo celular, incluso células en descanso. Los agentes incluidos en esta categoría, se denominan fármacos no específicos del ciclo celular e incluyen a la mecloretamina, melfalán, 5-fluorouracilo, cisplatino, glucocorticosteroides, y las nitrosoureas. Para los agentes no dependientes del ciclo como la radiación o los agentes alquilantes, el aumento de la dosis incrementa la muerte celular (Osorio, et al., 2006).

Los medicamentos de quimioterapia funcionan al atacar a las células que se dividen rápidamente, lo cual es por qué funcionan contra las células cancerosas. Sin embargo, otras células en el cuerpo, como las de la médula ósea, el revestimiento de la boca y los intestinos, y los folículos pilosos, también se dividen rápidamente. Estas células también pueden verse afectadas por la quimioterapia (American Cancer Society, 2014).

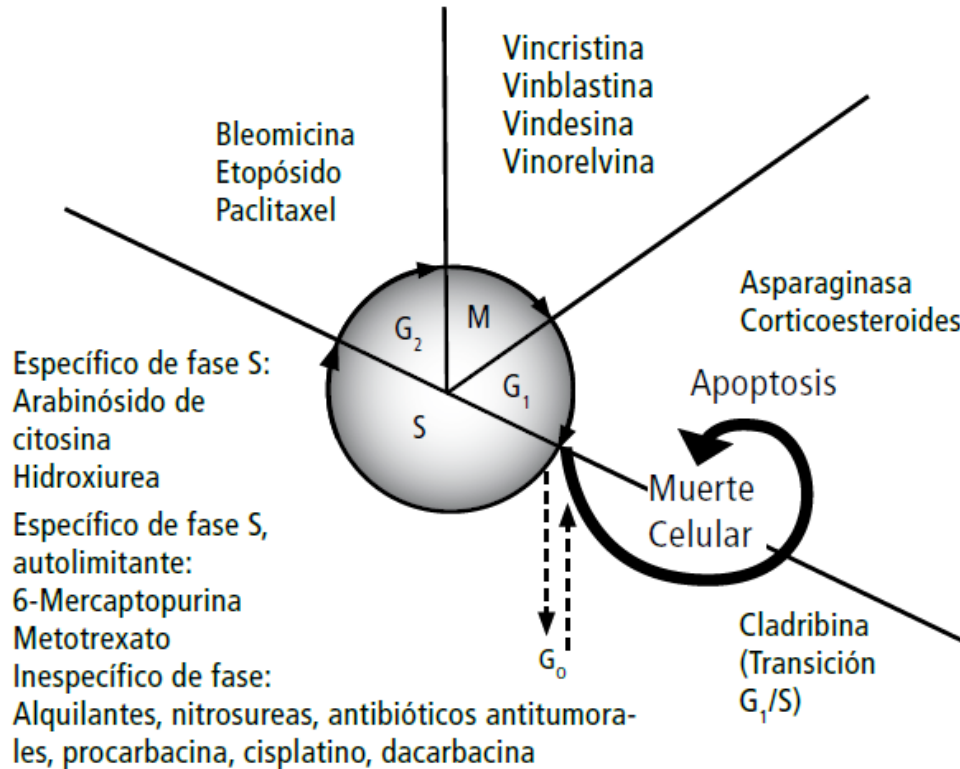


Fig. 4 Sitio de acción de agentes quimioterápicos en relación al ciclo celular.

Tabla 1. Antineoplásicos específicos de una fase del ciclo celular

Fase de mayor actividad	Clase	Tipo	Fármacos típicos
<b>Intervalo 1 (G<sub>1</sub>)</b>	Producto natural Hormona	Enzima Corticosteroide	Asparaginasa Prednisona
<b>Transición G<sub>1</sub>/S</b>	Antimetabolito	Análogo de purina	Cladribina
<b>Síntesis de ADN (S)</b>	Antimetabolito Antimetabolito Antimetabolito Producto natural Varios	Análogo de pirimidina Análogo de ácido fólico Análogo de purina Inhibidor de la topoisomerasa I Urea sustituida	Citarabina, fluorouracilo, gemcitabina Metotrexato Tioguanina, fludarabina Topotecan Hidroxiurea
<b>Intervalo 2 (G<sub>1</sub>)</b>	Producto natural Producto natural Producto natural	Antibiótico Inhibidor de la topoisomerasa II Polimerización y estabilización de microtúbulos	Bleomicina Etoposido Paclitaxel (taxol)
<b>Mitosis (M)</b>	Producto natural	Inhibidor mitótico	Vinblastina, Vincristina, Vindesina, Vinorelvina.

### Posibles efectos colaterales

- Pérdida de cabello y cambio en uñas
- Llagas en la boca
- Pérdida del apetito o aumento del apetito
- Náusea y vómitos
- Bajo recuento de células sanguíneas

La quimioterapia puede afectar la formación de células de la médula ósea lo que puede provocar:

- Incremento de infecciones (de bajo recuento de glóbulos blancos)
- Moretones o sangrado (de recuentos bajos de plaquetas)
- Fatiga (de los recuentos de glóbulos rojos bajos y otras razones)

Estos efectos secundarios suelen durar poco tiempo y desaparecen después de finalizar el tratamiento (American Cancer Society, 2014).

Para las mujeres jóvenes, los cambios en los períodos menstruales son muy comunes, la menopausia prematura (no tener más periodos menstruales) y también infertilidad puede ocurrir y puede ser permanente. Cuando esto sucede, hay un mayor riesgo de pérdida ósea y osteoporosis (American Cancer Society, 2014).

Neuropatía: Muchos de los medicamentos utilizados para tratar el cáncer de mama, incluyendo los taxanos (docetaxel y paclitaxel), agentes de platino (carboplatino, cisplatino), vinorelbina, eribulina, y la ixabepilona, pueden dañar los nervios fuera del cerebro y la médula espinal. A veces esto puede conducir a síntomas (principalmente en las manos y pies), como entumecimiento, dolor, ardor, hormigueo, sensibilidad al frío o al calor, o debilidad. En la mayoría de los casos estos síntomas desaparecen una vez que se detiene el tratamiento, pero puede durar mucho tiempo en algunas mujeres (American Cancer Society, 2014).

El daño del corazón: La doxorubicina, epirubicina, y algunos otros medicamentos puede causar permanente daño cardíaco (llamada cardiomiopatía). El riesgo de que esto ocurra depende de la cantidad de fármaco administrada, y es más alto si el medicamento se utiliza durante un período prolongado o en dosis altas (American Cancer Society, 2014).

En muy raras ocasiones, ciertos medicamentos de quimioterapia pueden dañar de forma permanente la médula ósea, conduciendo a una enfermedad llamada síndrome mielodisplásico o incluso leucemia aguda mieloide, un cáncer que amenaza la vida de las células blancas de la sangre. Cuando esto sucede, es generalmente dentro de 10 años después del tratamiento (American Cancer Society, 2014).

### **La terapia hormonal para el cáncer de mama**

Es otra forma de terapia sistémica. Se utiliza más a menudo como una terapia adyuvante para ayudar a reducir el riesgo de que el cáncer regrese después de la cirugía, pero se puede utilizar como tratamiento neoadyuvante, también se utiliza para tratar el cáncer que ha llegado después del tratamiento o se ha diseminado (American Cancer Society, 2014).

Los ovarios de una mujer son la principal fuente de la hormona estrógeno hasta la menopausia. Después de la menopausia, cantidades más pequeñas todavía se segregan en el tejido graso del cuerpo, donde una hormona producida por la glándula suprarrenal se convierte en estrógeno. El estrógeno promueve el crecimiento de cánceres que son receptores hormonales positivos. Aproximadamente 2 de 3 de los cánceres de mama son receptores hormonales positivos - contienen receptores para hormonas de estrógeno (cánceres ER-positivo) y / o progesterona (cánceres PR-positivo) (American Cancer Society, 2014).

### Fármacos que bloquean el estrógeno.

Tamoxifeno: El tamoxifeno bloquea a los receptores de estrógeno receptores en las células del cáncer de mama, impidiendo que el estrógeno se una a ellos y por lo tanto detiene el crecimiento de las células. Mientras que el tamoxifeno actúa como un anti-estrógeno en las células mamarias, actúa como un estrógeno en otros tejidos, como el útero y los huesos (American Cancer Society, 2014).

Los efectos secundarios más comunes de estos medicamentos incluyen fatiga, sofocos, sequedad vaginal o descarga, y cambios de humor. Estos medicamentos pueden aumentar el riesgo de desarrollar cáncer de útero (cáncer de endometrio y sarcoma uterino) en mujeres que han pasado por la menopausia. Raras veces puede ocasionar trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, riesgo de un ataque al corazón, y adelgazamiento de los huesos (American Cancer Society, 2014).

Los beneficios de tomar estos medicamentos superan los riesgos para la mayoría de mujeres con la hormona receptor positivo de cáncer de mama invasivo.

Toremifeno (Fareston®): es un medicamento similar al tamoxifeno. También es un SERM (marcador selectivo del receptor estrogénico) y tiene efectos secundarios similares. Sólo se aprobó para tratar el cáncer de mama metastásico. Este medicamento no es probable que funcione si el tamoxifeno se ha utilizado y dejado de funcionar (American Cancer Society, 2014).

El fulvestrant (Faslodex®): es un medicamento que bloquea el receptor primario estrógeno. No es un SERM - actúa como un anti-estrógeno a través del cuerpo, es usado para tratar cáncer de mama metastásico (American Cancer Society, 2014).

### Tratamientos para bajar los niveles de estrógeno

Inhibidores de la aromatasa (IA): Existen tres fármacos que detienen la producción de estrógeno en la posmenopausia y son el letrozol (Femara), anastrozol (Arimidex), y exemestano (Aromasin). Ellos trabajan al bloquear la enzima aromatasa en el tejido graso que se encarga de producir pequeñas cantidades de estrógeno en las mujeres posmenopáusicas. Los ovarios no pueden dejar de producir estrógeno, por lo que sólo son eficaces en mujeres cuyos ovarios no están funcionando, ya sea debido a la menopausia o debido al tratamiento con la hormona luteinizante liberadora de hormona (American Cancer Society, 2014).

Megestrol de etilo (Megace®) es un medicamento similar a la progesterona usado que se puede utilizar como una hormona tratamiento del cáncer de mama avanzado, por lo general para las mujeres cuyos cánceres no responden a los otros tratamientos hormonales. Su principal efecto

secundario es el aumento de peso, y que a veces es utilizado en dosis más altas para revertir la pérdida de peso para las personas con cáncer avanzado (American Cancer Society, 2014).

Los andrógenos (hormonas masculinas) rara vez pueden ser considerados después de que otros tratamientos hormonales para cáncer de mama avanzado se han intentado. A veces son eficaces, pero pueden causar características masculinas para desarrollar tales como un aumento de vello corporal y una voz más profunda (American Cancer Society, 2014).

## La terapia dirigida para el cáncer de mama

Estos medicamentos dirigidos funcionan de forma diferente de los medicamentos de quimioterapia estándar (quimioterapia). Ellos a menudo son diferentes (y menos severos) en efectos secundarios.

Los fármacos que se dirigen a la / neu HER2

En aproximadamente 1 de cada 5 pacientes con cáncer de mama, las células cancerosas tienen sobreexpresado promotor de crecimiento, proteína conocida como HER2 / neu (o simplemente HER2) en su superficie. Los cánceres de mama con demasiada cantidad de esta proteína tienden a crecer y propagarse más agresivamente.

Un número de fármacos han sido desarrollados que se dirigen a esta proteína:

- Trastuzumab (Herceptin)
- Pertuzumab (Perjeta®)
- Emtansina Ado-trastuzumab (Kadcyla™)
- Lapatinib (Tykerb)

El trastuzumab y pertuzumab son anticuerpos monoclonales - versiones artificiales de una proteína del sistema inmune específica, se administran en la vena. Trastuzumab se puede utilizar para tratar el cáncer de mama en etapa temprana y tardía. Cuando se utiliza para tratar el cáncer de mama temprana, este medicamento generalmente se administra durante un año. Para el cáncer de mama avanzado, el tratamiento no se detiene después de un año y puede durar mucho tiempo. Pertuzumab se puede dar con la terapia de trastuzumab y quimioterapia para tratar cáncer de mama avanzado. Esta combinación también se utiliza para tratar el cáncer de mama temprano antes de la cirugía (American Cancer Society, 2014).

Emtansina Ado-trastuzumab es un anticuerpo monoclonal unido a un medicamento de quimioterapia, ello también se da Intravenosa, se utiliza para tratar el cáncer de mama avanzado en mujeres que ya han sido tratados con trastuzumab (American Cancer Society, 2014).

Lapatinib es un fármaco dirigido que no es un anticuerpo. Se administra en forma de pastilla, se utiliza para tratar el cáncer de mama avanzado.

Los efectos secundarios de estos fármacos son a menudo leves.

Algunas mujeres han desarrollado daño cardíaco durante o después del tratamiento con los fármacos de anticuerpos (trastuzumab, pertuzumab y trastuzumab-ado emtansina). Esto puede llevar a un problema llamada insuficiencia cardíaca congestiva. El riesgo de problemas del corazón es mayor cuando estos medicamentos se administran con ciertos medicamentos de quimioterapia



que también pueden causar daño al corazón, tales como doxorubicina (Adriamycin) y epirubicina (Elevance).

El lapatinib puede causar diarrea severa, También puede causar síndrome mano-pie, en la que que las manos y los pies pueden presentar enrojecimiento y causar ampollas.

Los medicamentos que ayudan a medicamentos de terapia de hormonas:

Palbociclib (Ibrance®) es un medicamento que se puede utilizar junto con un inhibidor de aromatasa para tratar a las mujeres con cáncer de mama con receptores hormonales positivos HER2-negativo. Este medicamento bloquea proteínas en la célula llamada quinasa dependiente de ciclina (CDK) 4 y CDK6, el bloqueo de estas proteínas ayuda a detener las células que se reproducen rápidamente (American Cancer Society, 2014).

Los efectos secundarios suelen ser leves e incluyen bajos niveles de glóbulos rojos (anemia), fatiga, náuseas, úlceras bucales, pérdida de cabello y diarrea. Bajos recuentos de glóbulos blancos severos también pueden ocurrir, que aumentan el riesgo de infección grave.

Everolimus (Afinitor®) es un medicamento que se puede utilizar junto con un medicamento para la terapia hormonal para tratar a las mujeres con cáncer de mama con receptores hormonales positivos. Este fármaco bloquea a mTOR, una proteína en las células que normalmente promueve su crecimiento y división. Al bloquear esta proteína, everolimus puede ayudar a detener el crecimiento de células cancerosas, también puede dejar de desarrollar nuevos vasos sanguíneos en el tumor, lo que limita su crecimiento. (American Cancer Society, 2014).

Exemestano (Aromasin) este medicamento está aprobado para el tratamiento de estadios avanzados en cánceres con receptores hormonales positivos, HER2-negativo, y en mujeres que han pasado por la menopausia. Está destinado a ser utilizado en estas mujeres si sus cánceres han crecido mientras estaban en tratamiento con letrozol o anastrozol o bien (o el cáncer comenzó a crecer en breve después de que se suspende el tratamiento con estos fármacos). Esta aprobación se basó en un estudio que mostró que la administración de everolimus con exemestano fue mejor que el exemestano sólo en reducir los tumores y detener su crecimiento en las mujeres post-menopáusicas con la hormona receptor positivo, cáncer HER2-negativo de mama que habían dejado de responder a letrozol o anastrozol (American Cancer Society, 2014).

Los efectos secundarios comunes de este medicamento incluyen llagas en la boca, diarrea, náuseas, fatiga, sensación, recuentos de cansancio o debilidad bajos de sangre, dificultad para respirar y tos. Everolimus puede también aumentar los lípidos en sangre (colesterol y triglicéridos) y azúcar en la sangre, también puede aumentar su riesgo de infecciones graves (American Cancer Society, 2014).

## **1.5.- *Kalanchoe daigremontiana* (Aranto)**

El género *Kalanchoe*, es propio de Madagascar (la cuarta isla más grande del mundo, situada a 400 km de la costa este de África), que también cuenta con algunas especies diseminadas por el sur y sureste africano, India, China y Brasil. Este género comprende, 125 especies y pertenece a la familia de las crasuláceas, a las que se les puede identificar con facilidad mediante un análisis floral; posee flores gametopétalas (con los pétalos soldados entre sí), tetrámeras (dividida en cuatro sépalos,

cuatro pétalos, cuatro ovarios, con cuatro glándulas en su base, y cuatro estilos) y diplostémonas (el número de estambres es doble). Es una planta suculenta y xerófila, que se adapta fácilmente a la sequía, por lo que se puede desarrollar bien en regiones donde no hiela (Cárdenas, 2009). *Kalanchoe* proviene del vocablo chino “kalan-chowi” (que cae y se desarrolla), y actualmente despierta un gran interés en su actividad biológica (Cárdenas, 2009) (Fig. 5).



**Fig. 5 *Kalanchoe daigremontiana*.**

### **Compuestos químicos del *K. daigremontiana***

Las sustancias más notables, biosintetizadas por las diferentes especies de este género, pertenecen a dos familias químicas: los glucósidos de flavonoides, un conjunto de pigmentos vegetales y los ácidos grasos y triterpenoides como los bufadienólidos que tienen actividad citotóxica ante diferentes líneas celulares cancerígenas (López, et al., 2009), y cuyo nombre se debe a que se aislaron por primera vez, de las secreciones de piel de sapo *B. regularis* (africano) y *B. melanostictus* (asiático) (Cárdenas, 2009), (Ellison, et. al, 1962).

Las cutículas de las plantas constan de cutina, un poliéster insoluble de los ácidos grasos y glicerol (Pollard et al., 2008), y complejas mezclas de ceras que son solubles en disolventes orgánicos (Jetter et al., 2007); (Maarseveen, et al., 2009).

Estas ceras comprenden típicamente, varios compuestos tales como: derivados de ácidos grasos de cadena larga (VLCFAs), aldehídos, cetonas, alcoholes primarios y secundarios, alcanos y ésteres de alquilo, además, triterpenoides, tocoferoles y compuestos aromáticos, pueden estar presentes en

cantidades características que van desde concentraciones traza en algunas especies y para otras aproximadamente > 50% de las ceras totales (Maarseveen, et al., 2009).

Los bufadienólidos, son esteroides cardioactivos cuya eficacia en el tratamiento de enfermedades cardíacas ya era conocida por los antiguos egipcios (Cárdenas, 2009). Poseen el núcleo tetracíclico típico de los esteroides (ciclopentano- perhidrofenantreno) al que se le une un anillo pentadienólido, una estructura química semejante a otros compuestos, con actividad biológica, como el ácido ursólico un triterpeno pentacíclico presente en muchas plantas medicinales, que ha sido descrito como inhibidor de varios pasos clave de la angiogénesis (proceso morfogénico en el que se generan nuevos capilares a partir de vasos sanguíneos preexistentes) (Cárdenas, 2009). Fue examinada la composición del *K. daigremontiana* en raíces, hojas, estambres y flores por las técnicas de TLC, HPLC, y  $H^+$  NMR y se identificaron catorce esteroides los cuales fueron: colesterol, 24 (28) – metilcolesterol, 24 – metil – 23 dehidrocolesterol, 24 – metil- 24 – dehidrocolesterol, 24  $\alpha$ -metilcolesterol, 24  $\beta$ -metilcolesterol, 24-  $\beta$ - etil-22, 25 (27) bis- dehidrocolesterol, 24- dimetil- 25 (27)- dehidrocolesterol, 24  $\beta$  – etil – 25 (27)- dehidrocolesterol (clerosterol), 24 – etil – 24 – dehidrocolesterol (24-etildesmosterol), trans – 24- etilidenecolesterol (isofucosterol), 24  $\alpha$ -etilcolesterol (sitosterol) y 24  $\alpha$  – etilcolesta – 5, 22- dienol (stigmasterol) (Kalinowska, 1990).

Las hojas producen primordialmente 24  $\beta$ - etilesteroles, estambres y flores producen en igual proporción 24  $\alpha$  y 24  $\beta$  – etilesteroles y las raíces 24  $\alpha$ -etilesteroles (Kalinowska, 1990). Además las hojas de *K. daigremontiana* en ambas superficies adaxial y abaxial presentan ceras intracuticular y epicuticular, conteniendo cantidades aproximadamente iguales de triterpenoides y derivados de ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA) (Maarseveen, et al., 2009). La fracción de triterpenoides consistió de: glutinol (8-19% de la cera total) y friedelin (4-9%), junto con pequeñas cantidades de glutanol, acetato de glutinol, epifriedelanol, germanicol y  $\beta$ -amirina. Y para los compuestos derivados (VLCFA) alcanos de  $C_{27}$ - $C_{35}$  (19-37% de la cera total), aldehídos  $C_{32}$  –  $C_{34}$  (3 - 7%), y ácidos grasos de  $C_{32}$  y  $C_{34}$  (0.2-3%), alcoholes primarios de  $C_{26}$ - $C_{36}$  (4-8%), y ésteres de alquilo de  $C_{42}$ - $C_{52}$  (2-9%). Se encontró que las ceras tienen diferentes cantidades de triterpenoides, en donde la cera intracuticular, contiene un mayor porcentaje de triterpenoides que la epicuticular y la única cetona triterpenoide presente, mostró una distribución opuesta con mayor proporción en la cera epicuticular, los derivados de ácidos (VLCFA) también se acumulan con mayores porcentajes en la epicuticular que en la intracuticular los cristales de cera epicuticular se observaron en ambas superficies de las hojas adaxial y abaxial (Maarseveen, et al., 2009).

En 1984 dos principios tóxicos de *K. daigremontiana* fueron aislados y estructuralmente identificados como bufadienólidos con un patrón de sustitución inusual. Daigremontianin, un nuevo compuesto, y bersaldegenin-1,3,5-ortoacetato que también se encontró en *Kalanchoe tubiflora* por Hamet, estos compuestos muestran una pronunciada actividad sedante, un efecto inotrópico positivo y actividad a nivel del sistema nervioso central (SNC) (Wagner, et al., 1984).

Se han estudiado dos especies de Crassulaceae (*K. daigremontiana* Hamet et Perr y *K. tubiflora* Hamet), que han sido reportadas como tóxicas en la literatura (Friedrich, et al., 1968), y de los cuales lograron aislar y determinar la estructura de los dos principales principios activos de *K. daigremontiana*.

Los compuestos, 1 y 2, (ver Fig. 6 y Fig. 7 respectivamente) mostraron un fuerte efecto sedante en ratones a dosis bajas (0.1-0.5 mg/ kg de ratón, según las pruebas de motilidad) y pueden llegar a ser

tóxicos a altas concentraciones, induciendo la parálisis y la contracción espasmódica del músculo (Wagner, et al., 1984).

Una mezcla de 1 y 2 se obtuvo a partir de la fracción de diclorometano de un extracto metanólico se preparó una columna de cromatografía y también se realizó TLC en sílice gel, utilizando acetato de etilo / tolueno / acetona = 10:3: 2 v/v/v como eluyente.

Se preparó una columna RP-18 en HPLC con un 30% acetonitrilo obteniendo los compuestos 1 y 2 puros (Wagner, et al., 1984).

Las fórmulas moleculares determinadas son  $C_{26}H_{30}O_9$  para 1 (MW = 486) y  $C_{26}H_{32}O_7$  para 2 (MW = 456) por MS y análisis elemental cuantitativo (Wagner, et al., 1984).

El espectro de H-RMN indicó una lactona insaturada formada por seis miembros, un grupo aldehído, 2-grupos  $CH_3$ -y un sistema de anillos aromáticos terpenoides (Wagner, et al., 1984), (Fig. 6).

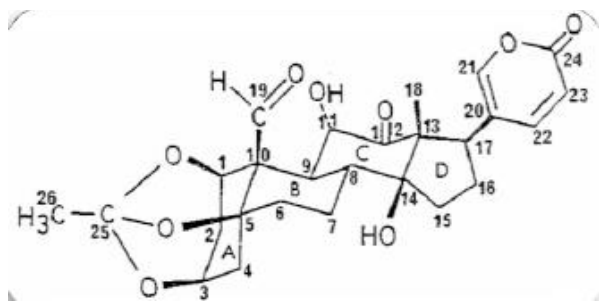


Fig.6 Daigremontianin (1)

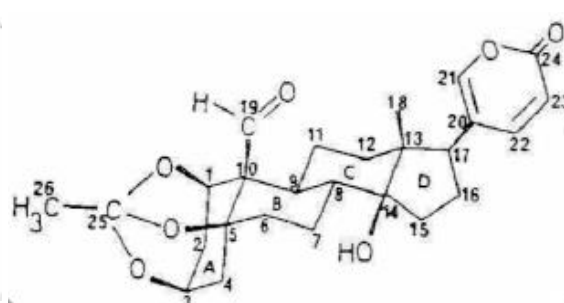


Fig. 7 Bersaldegenin 1,3,5 ortoacetato (2)

La Fig. 6 muestra que este bufadienólido, Daigremontianin (1) tiene una estructura formada por anillos A, B, C y D en configuración cis / trans / cis, un grupo ortoéster acético unido al anillo A y a su vez un grupo hidroxilo / ceto en el C 11 y C 12 respectivamente, (poco común) hasta el momento; se ha encontrado en el bufadienólido Arenobufagin ( Kalinowska, et al., 1990).

El compuesto, llamado Daigremontianin parece representar el primer hallazgo encontrado de un bufadienólido en una especie de *Kalanchoe* (Wagner, et al., 1984). El compuesto 2 difiere del compuesto 1 en 30 unidades masa; según la técnica de H-NMR este compuesto (2) no presenta sustituyentes en las posiciones del C 11 y 12, según como lo muestra la Fig. 7 (Wagner, et al., 1986). Se han aislado y elucidado estructuralmente por rayos X y espectroscopía de H y C –NMR , cinco bufadienólidos biosintéticamente del *K. daigremontiana*. Los compuestos fueron identificados como bersaldegenin 1,3,5-ortoacetato(2), bersaldegenin 1-acetato (4), bersaldegenin 3-acetato (3), 1,3,5-ortoacetato (daigremontianin 1) y daigremontianin 3- acetato (5) (Lotter, et al., 1986).

Para llevar a cabo, la localización y el aislamiento de estos principios activos se ocuparon diversos solventes para así obtener diferentes fracciones; se usó éter de petróleo  $CH_2Cl_2$ , BuOH y  $H_2O$  (Lotter, et al., 1986).

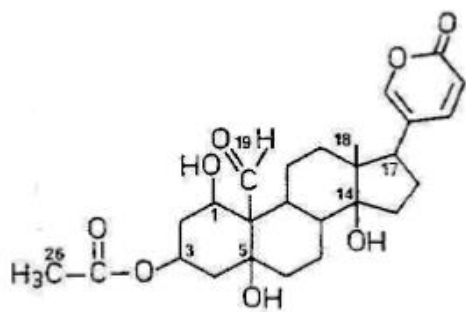


Fig.8 Bersaldegenin 3-acetato (3)

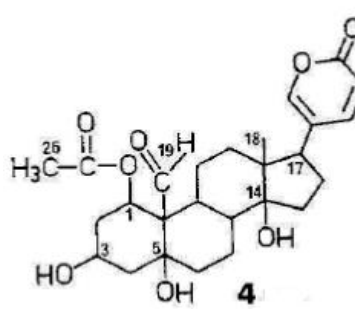


Fig. 9 Bersaldegenin 1-acetato (4)

Se observa que ambos compuestos 3 y 4 Fig. 8 y 9; han tenido un cambio con respecto a los compuestos 1 y 2 (Wagner, et al., 1986), formando el grupo acetilo (Lotter, et al., 1986).

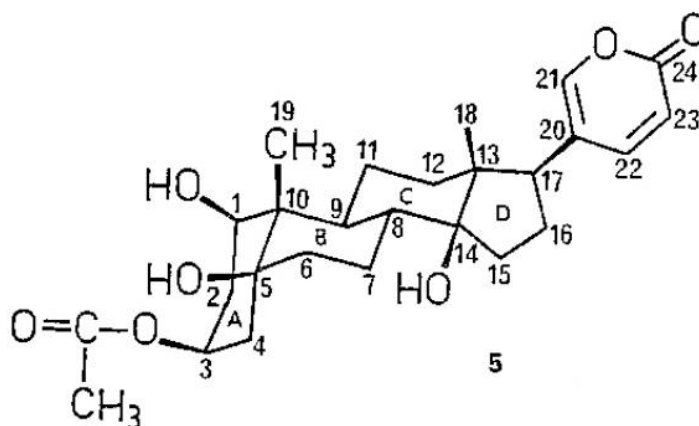


Fig. 10 Estructura de daigremontianin 3- acetato (5)

Se puede observar la presencia de un nuevo grupo metil, Fig.10 esto puede ser debido a los desplazamientos químicos reasignando así a un grupo acetil. "Compuesto 5" (Lotter, et al., 1986).

### Usos del *Kalanchoe daigremontiana*

Los compuestos insecticidas son muy importantes en el campo Agrícola, ya que son necesarios en el control de plagas de insectos. En especial el *Kalanchoe* es una fuente natural prometedora de compuestos insecticidas (Maharani, et al., 2008).

La planta es usada en Indonesia por la medicina tradicional para el tratamiento de infecciones reumatismo, tos, fiebre y la inflamación (Hutapea, 1994).

El uso de las especies de *Kalanchoe* en la medicina tradicional, se ha enfocado al tratamiento de enfermedades infecciosas, inflamatorias y cancerosas; estudios recientes han demostrado su capacidad antitumoral, antihistamínica, antiinflamatoria (independiente de ciclooxigenasa-2) e inmunomoduladora así como actividad citotóxica sobre células procedentes de la leucemia linfoblástica (Cárdenas, 2009).

De una serie de bufadienólidos naturales se ha estudiado, mediante la determinación de su actividad antitumoral a varias líneas celulares como las células KB, el carcinoma de pulmón humano A 549, células tumorales de colon HCT - 8 (11, 12), carcinoma humano de la nasofaringe, y en carcinosarcoma intramuscular, reportando así actividad inhibitoria como sigue para el compuesto (1)  $IC_{50}= 0.4 \mu M$ , para (2)  $IC_{50}= 1.6 \mu M$ , para (3)  $IC_{50}=3\mu M$ , para el (4) y (5)  $IC_{50}>4 \mu M$  (Supratman, et al., 2001).

Actualmente han evaluado *in vitro* la citotoxicidad de algunas especies de *Kalanchoe* (*K. pinnata*, *K. daigremontiana*, y *K. flammula*) en líneas celulares de cáncer cérvico – uterino y de próstata y de acuerdo con lo reportado el mejor extracto, con base en la disminución de la proliferación celular

fué el hexánico de *K. flammaea*, ya que desde una concentración de 1.562 µg/ml mata a las células HeLa y el extracto alcohólico y acetílico de *K. flammaea* a la misma concentración mata a las células PC3. Ninguno de los extractos a las diferentes concentraciones utilizadas daño a los linfocitos (células sanas) (Herrera, et al., 2009). También se ha estudiado la especie *Kalanchoe tubiflora H.* Para su evaluación citotóxica en las siguientes líneas celulares de cáncer Kb (nasofaríngeo), Hep (laríngeo), MCF-3 (mama) y PC – 3 (próstata). Se encontró que los extractos obtenidos de *K. tubiflora* de solventes de mediana y alta polaridad, tuvieron una respuesta selectiva favorable en las líneas Kb y Hep – 2, la línea MCF-7 fué menos sensible y la PC-3 no presentó respuesta positiva al tratamiento con los extractos, por lo que *Kalanchoe tubiflora H.* pudiera presentar actividad antineoplásica contra algunos otros tipos de cáncer (Martinez, et al., 2009).

En otro contexto, Williams y Smith (1984) han informado de que las hojas de esta planta eran tóxicas para polluelos en una dosis de 8.12 mg por gramo de peso corporal, pero los principios químicamente caracterizados no fueron tóxicos. Varios componentes fenólicos y flavonoides glucósidos aislados por Gaind y Gupta de las hojas de *K. daigremontiana* no se caracterizaron totalmente ( Homans y Fuchs, 1970; Gaind y Gupta, 1971).

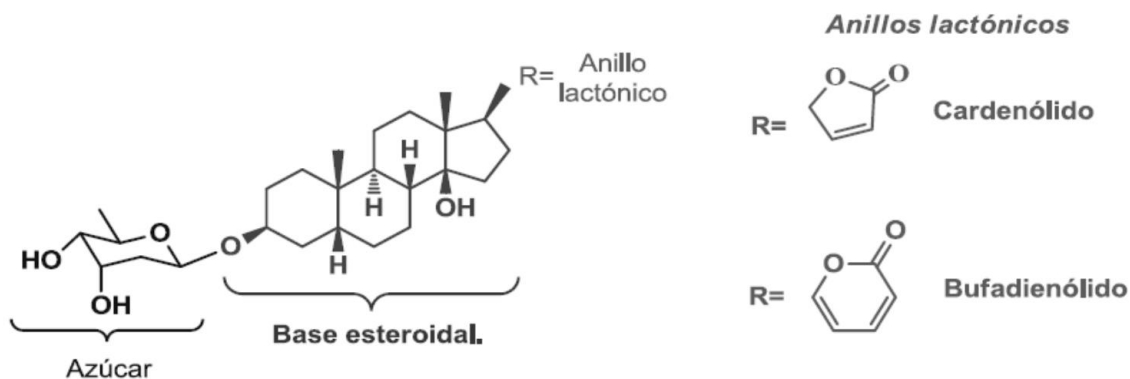
El Metil daigremontiani, es un insecticida bufadienólido que se aisló de las hojas de *K. daigremontiana x tubiflora* (Crassulaceae) junto con cuatro bufadienólidos conocidos. Su estructura fue establecida por espectroscopía, este compuesto se evaluó contra el tercer estadio de larvas de gusanos de seda (*Bombyx mori*). Los resultados sugieren que el ortoéster y  $\alpha$ - pirona han desempeñado un papel muy importante como actividad insecticida (Supratman, et al., 2001).

El extracto metanólico de las hojas secas de *K. daigremontiana* fué concentrado y se extrajo con clorhidro de metileno, compararon sus resultados con los estándares que son los compuestos 1 y 2 mencionados anteriormente y observaron que los componentes que aislaron de acuerdo con su metodología fueron el ortoacetato y la  $\alpha$ - pirona, así también apreciaron que cuando está presente el oxígeno en los sustituyentes en la posición del C11 y C12 existe una actividad insecticida mejorada probada en gusanos de seda, ( Maharani, et al., 2008). Hasta ahora, se conocen 9 bufadienólidos en total, 2 de ellos extraídos del *K. pinnata* (briofilin C “6”, y briofilin A “7”), 5 extraídos del *K. daigremontiana* y 2 modificados químicamente tratados con una base y posteriormente con un ácido para poder fraccionarlos y así obtener el metil – isobriofilinato A (8) y el metil – isobersaldegenin -1, 3, 5 – ortoacetato (9) todos ellos mostrando actividad insecticida (Supratman, et al., 2001).

Cinco bufadienólidos aislados de las hojas de la planta *Kalanchoe* fueron extraídos usando MeOH, fué concentrado y sometido a presión reducida hasta obtener un residuo café oscuro, posteriormente se utilizó CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O para fraccionar sus componentes, todo esto para realizar pruebas con efectos inhibitorios, en principios de antígeno en virus Epstein Barr (EBV - EA) para activación en células Raji inducidas por promotor de tumor, 12 – O – tetradecanoilforbol – 13- acetato. Todos estos bufadienólidos presentan actividad inhibitoria, principalmente el briofilin A (7) exhibe la mejor marca de inhibición (IC<sub>50</sub> = 0.4 µM), estos resultados muestran una fuerte esperanza en que los bufadienólidos tengan un gran potencial como nuevos agentes quimiopreventivos para el cáncer (Supratman, et al., 2001).

### **Bufadienólidos, actividad antitumoral y mecanismo de acción.**

Los glucósidos cardíacos tienen como molécula base, el ciclopentanoperhidrofenantreno, sustituido en el carbono 17 con un pentadienólido para los cardenólidos y un butenólido en los bufadienólidos, (Steyn et. al., 1997).



**Fig. 11 Estructura química de los glucosidos cardiacos, tomada de (Tesis Universidad de El Salvador, Jorge Martinez, et. al., 2011)**

Los bufadienólidos son triterpenos, esteroides de 24 carbonos, y tienen como característica estructural la presencia de 6 anillos de lactona ( $\alpha$ -pirona) y una doble insaturación en la posición  $17\beta$ , ver Fig. 11.

Los bufadienólidos poseen un amplio rango de bioactividades incluyendo cardiotónicas, excreción sodio – renal / estimulación en presión sanguínea, inmunoregulación y antineoplasia. De todas las actividades descritas para los bufadienólidos, la actividad antitumoral es un dato muy interesante en las investigaciones, en donde los bufadienólidos se obtienen de fuentes como plantas, animales y biotransformación (Huimin Gao, et. al, 2010).

Estos han sido evaluados en una variedad de células de cáncer, incluso humanas, leucemia, hepatoma, carcinoma, pulmón, gastrointestinal y cánceres de mama. Todos los bufadienólidos mostraron una actividad potencialmente citotóxica. Interesantemente, existen diferencias características en el potencial de estos compuestos con estructuras similares (Huimin Gao, et. al, 2010).

Para esta instancia los compuestos: bersaldegenin – 1 – acetato, bersaldegenin 3- acetato, y kalanhybrin A, B, C y daigredorigenin – 3 – acetato, de la familia crassulaceae fueron evaluados su citotoxicidad para MCF- 7 (mama), NCI – H460 (pulmón) y SF -268 (derivado de glioma) líneas celulares (Huimin Gao, et. al, 2010).

El compuesto, bersaldegenin 3- acetato y daigredorigenin – 3 – acetato, mostraron casi una completa inhibición de las líneas celulares MCF-7 y NCI – H460, a una concentración de  $4 \mu\text{g/ml}$ . El compuesto bersaldegenin – 1 – acetato, mostro una citotoxicidad más débil en MCF-7 (línea celular) y tuvo una actividad inhibitoria similar en línea celular NCI – H460.

Los bufadienólidos monoglicosidos, particularmente mostraron una respuesta similar, para carcinoma en células escamosa (HSC-2), y cáncer en piel (A375). Aunque los bufadienólidos glucósidos indican actividad citotóxica en ambas líneas celulares; tanto células tumorales y en células normales, los bufadienólidos glucósidos, prevén una alta especificidad al tumor y por lo tanto una citotoxicidad similar más débil en células normales. Estos resultados sugieren que los monosacáridos unidos en la aglicona del bufadienólido contribuyen a la mediación de la especificidad del tumor (Huimin Gao, et. al, 2010).

De acuerdo con (Huimin Gao, et. al, 2010), proponen que la 1 –  $\beta$  hidroxilación y 3- epimerización, podría mejorar la citotoxicidad de los derivados del cinobufagin. En contraste con una mínima modificación en la estructura de los bufadienólidos como es una sustitución con (3 –  $\beta$ - hidroxilo, 3- cetona, o 16 – deacetil), estos grupos conseguidos por una transformación microbial, resultado de disminuir el efecto citotóxico, es decir estos metabolitos de cinobufagin fueron menos citotóxicos que el cinobufagin.

El bufalin ha demostrado que induce la diferenciación de células y apoptosis, eventos que se entrelazan y son regulados por distintas proteínas. El bufalin induce apoptosis, y fue caracterizado por el arresto del ciclo celular en la fase  $G_0 / G_1$  en la baja regulación de las proteínas pro – supervivencia, Bcl-2 y Bcl-XL y sobrerregulación de las proteínas pro- apoptóticas, Bax y hendidura de caspasa – 9 (Huimin Gao, et. al, 2010).

En andrógeno – dependiente y células de cáncer de próstata independientes el bufalin y cinobufagin, incrementa los niveles de calcio intracelular y causa apoptosis vía mitocondrial, junto con la translocación de Bax, liberando el citocromo c, y la activación de caspasas. En una revisión de Mijatovic, discute el potencial de los esteroides cardiotónicos, que ejercen actividad antineoplásica debido a su interacción con la bomba de sodio (Huimin Gao, et. al, 2010).

Los bufadienólidos y los cardenólidos son descritos como glucósidos cardíacos y entre ellos son similares en su actividad biológica debido a que incrementan la fuerza contráctil del corazón por la inhibición de la enzima  $Na^+ - K^+ - ATPasa$  así como en su estructura (Xie y col., 2002 citado por Mijatovic y col., 2007). La enzima  $Na^+ - K^+ - ATPasa$  es el único receptor en la célula para los glucósidos cardíacos y es la responsable de la extrusión activa del  $Na^+$  intracelular en el intercambio con el  $K^+$  extracelular (Xie y col., 2002 citado por Mijatovic y col., 2007). Los bufadienólidos actúan uniéndose a un receptor extracelular específico: la subunidad  $\alpha$  del sodio, de la adenosina trifosfatasa  $Na^+, K^+ - ATPasa$  activada por potasio (Xie y col., 2002 citado por Mijatovic y col., 2007). La  $Na^+, K^+ - ATPasa$ , es una enzima membranal altamente conservada esencial para la homeostasis celular. La descripción clásica de la función de esta enzima es de un papel de “housekeeping” en el mantenimiento de los gradientes de  $Na^+$  y  $K^+$ , a través de la membrana plasmática. Esos gradientes son esenciales para la preservación del potencial eléctrico de la membrana de todas las células, en el control del volumen celular y en el transporte de muchos substratos orgánicos e inorgánicos a través de la membrana celular (Blanco y Mercer, 1998; Kaplan, 2002 citados por Mijatovic y col., 2007). Esta enzima es un oligómero compuesto por tres polipéptidos, las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ , y FXYD, hasta el momento se han descubierto en humanos diferentes isoformas de estas subunidades, 4 $\alpha$ , 3 $\beta$  y 7 FXYD (seis no se asocian con la  $Na^+, K^+ - ATPasa$ ) (Lingrel y Kuntzweiler, 1994; Blanco y Mercer, 1998; Mohasberi y col., 2000; Kaplan, 2002 citados por Mijatovic y col., 2007). La subunidad  $\alpha$  es una proteína membranal que es responsable del transporte y de la función catalítica de la enzima y contiene los sitios de unión para los cationes, ATP y los bufadienólidos (Lingrel y Kuntzweiler, 1994; Blanco y Mercer, 1998; Mohasberi y col., 2000; Kaplan, 2002 citados por Mijatovic y col., 2007). La subunidad  $\beta$  es un polipéptido transmembranal, tienen tres sitios de glicosilación y 3 puentes disulfuro. Esta subunidad aparentemente está involucrada en la oclusión del  $K^+$  y en la modulación de la afinidad de la enzima con el  $Na^+$  y el  $K^+$  y actúa como chaperona estabilizando la plegación del polipéptido  $\alpha$  para facilitar su liberación a la membrana plasmática (Chow y Forte, 1995; Pressley, 1996; Blanco y Mercer, 1998 citados por Mijatovic y col., 2007). El tercer componente es una proteína transmembranal segmentada denominada FXYD, la cual aparentemente modula la función



de la Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPasa, y por lo tanto, la adaptación de las propiedades cinéticas del transporte activo de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> a las necesidades específicas de las diferentes células (Garty y Karlish, 2006; Geering, 2006 citados por Mijatovic y col., 2007). Está bien establecido que el sitio de unión de los bufadienólidos en la Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -ATPasa, está compuesto de aminoácidos locales entre la primera y la segunda hélices transmembranales frente al medio extracelular (López Díaz, 2011).

Por otro lado los requerimientos esenciales estructurales del bufalin para el incremento de la citotoxicidad han sido identificados: Un anillo esteroide en posición Cis C/D unido con un C14 b – grupo hidroxilo y un anillo C17 b- 2 –pirona (Biao Ma, et. al., 2013).

## 1.6.- Nanotecnología

La nanotecnología representa actualmente un muy importante papel en la medicina y su aplicación al tratamiento, diagnóstico, seguimiento y control de los sistemas biológicos, es bien conocida como Nanomedicina (Vila, 2008).

El tamaño total de la partícula puede desempeñar un papel importante, ya que las partículas grandes pueden potencialmente inducir un daño permanente a la membrana celular, mientras que las partículas pequeñas pueden pasar a través de la membrana y ocasionar daños dentro de la célula (Yoshida et al., 2003). Partículas no esféricas, por otro lado, podrían generar una respuesta biológica diferente en comparación con las nanopartículas esféricas (Geng et al., 2007; Suh, et al., 2008). Actualmente existe una diversidad de nanosistemas que se pueden utilizar en el campo de la tecnología farmacéutica, como por ejemplo nanopartículas poliméricas o metálicas, liposomas, niosomas, micelas poliméricas, nanopartículas lipídicas, dendrimeros, quantum, dots etc. Cuya finalidad es incrementar la eficiencia *in vivo* de numerosos fármacos fundamentalmente antineoplásicos (Vila, 2008).

Los nanosistemas en la nanotecnología farmacéutica tienen como finalidad lo descrito a continuación:

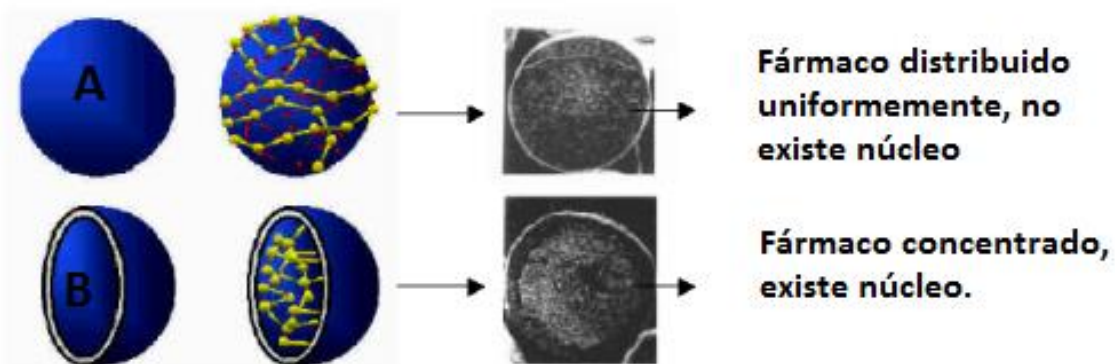
- Proteger el fármaco de su degradación, tanto física, como química, es un aspecto esencial cuando se piensa en la utilización de los nuevos principios activos.
- Incrementar la absorción de fármacos facilitando su difusión a través de los epitelios, importante para administración parenteral de fármacos.
- Modificar las características farmacocinéticas de los fármacos y con ello su perfil de distribución a ciertos tejidos u órganos, para incrementar su eficacia o disminuir efectos indeseables.
- Incrementar la penetración y distribución intracelular, aspecto importante cuando la diana sobre la que va a actuar el fármaco se encuentra en la célula.
- Mejorar las técnicas de imagen y diagnóstico *in vivo*.

Y a su vez los nanosistemas farmacéuticos en general deben de cumplir con las siguientes especificaciones:

- Deben de ser biocompatibles y biodegradables.
- Tener un tamaño de nanométrico.
- Poseer una elevada capacidad de incorporación del principio activo.
- Presentar un prolongado tiempo de circulación en el torrente circulatorio.
- Es deseable que el sistema presente una específica o inespecífica capacidad de acumulación en determinados lugares del organismo.
- Ser razonablemente sencillos de preparar y de forma reproducible (Vila, 2008).

## Nanopartículas

El uso de nanopartículas es una importante área de la investigación en el campo de la nanomedicina, ya que parecen prometedores como sistemas de administración de fármacos debido a su liberación controlada y sostenida, tamaño subcelular, y biocompatibilidad con el tejido y con las células (Reis, et al., 2006). Además, el uso de nanopartículas minimiza la degradación del principio activo, incrementa su semivida en el interior del órgano a tratar y disminuye su toxicidad. Nanopartículas implica la formación, de partículas cargadas de fármacos con diámetros que van desde 1 a 1000 nm. (Reis, et al., 2006). El término nanopartícula engloba las nanocápsulas y nanoesferas; las nanocápsulas son sistemas vesiculares en los que el fármaco se localiza en el interior de la partícula, generalmente disuelto en un vehículo oleoso rodeado por una membrana polimérica. Las nanoesferas, en cambio, son sistemas de tipo matricial donde el fármaco se suele encontrar encapsulado en el interior de la matriz, (Rocha, 2009) es decir los medicamentos pueden ser absorbidos en la superficie de la esfera o encapsulados dentro de la partícula (Fig. 12) (Reis, et al., 2006).



**Fig. 12** Esquema de una nanoesfera (A) y una nanocápsula (B).

La superficie de las nanopartículas, es una característica muy importante ya que es una de las formas por las que se puede seleccionar, la vía de administración de fármacos. Una vez que están en el torrente sanguíneo, las nanopartículas en general (no modifican su superficie) y las partículas con carga negativa pueden ser rápidamente opsonizadas y eliminadas. Es bien sabido que el retículo endotelial, el hígado y el bazo, son un gran obstáculo para las nanopartículas, ya que estos órganos tienen la capacidad de reconocer estos sistemas, y sacarlos de la circulación sistémica, y, en

consecuencia, evitar la entrega efectiva de las nanopartículas en los órganos diana (Reis, et al., 2006).

Por esta razón se ha optado por la modificación superficial de las nanopartículas con polímeros hidrofílicos, esta es la forma más común para controlar el proceso de opsonización y para mejorar las propiedades de la superficie o revestimiento del sistema.

Esto se ha logrado, con la fijación de polietilenglicol (PEG) a las cadenas de polímeros biodegradables, tales como el ácido poliláctico (PLA) y poli lactico-co-glicólico (PLGA), además que presentan una buena biodegradabilidad y biocompatibilidad, y han sido aprobados por la FDA. Así, las cadenas de PEG hidrofílicas permiten el control de la absorción de proteínas y péptidos, y además le permitirá regulación del comportamiento de células con respecto a la superficie del polímero (Reis, et al., 2006).

Se conoce que modificando el peso molecular, su grado de hidrofilia y la proporción de cada uno de los polímeros, se puede controlar la velocidad de degradación de los mismos, el grado de encapsulación y el de liberación del fármaco o principio activo (F. Rocha, et al., 2009). Así como la composición polimérica de las nanopartículas, cualquier sustancia adyuvante, y la droga asociada (sus características fisicoquímicas, peso molecular, la carga, etc), tienen una gran influencia en la absorción, el patrón de biodistribución y eliminación (Reis, et al., 2006). Entre las distintas moléculas encapsuladas en nanopartículas formuladas con poliésteres se encuentran fármacos antitumorales, antígenos, péptidos y proteínas, genes, etc, para el tratamiento y prevención de distintas enfermedades (Kim, et al., 2007; Pandey, et al., 2006).

## **1.7.- Polímeros empleados en la encapsulación de fármacos.**

El desarrollo de un sistema inteligente, se suele iniciar diseñando un nuevo material, que generalmente, es un polímero semisintético o sintético, por lo tanto, el progreso de la Ciencia de Polímeros ha marcado decisivamente la evolución de los sistemas inteligentes.

Muchos polímeros naturales, como la celulosa o la goma arábiga, se vienen utilizando desde hace siglos y hoy en día otros muchos polímeros están presentes, en la mayor parte de los medicamentos desempeñando papeles muy diversos. Los seres vivos cuentan con mecanismos propios de reconocimiento específico, de captación selectiva y de transporte controlado de sustancias que actúan en las células y en los orgánulos celulares, en los que las macromoléculas juegan un papel fundamental (Corcheiro, 2007).

Los sistemas inteligentes reproducen, en mayor o en menor medida, el comportamiento propio de los sistemas biológicos, haciendo posible que se active o se module la liberación del fármaco en respuesta a señales, emitidas desde el exterior o por efecto de cambios en el entorno biológico. Como consecuencia del proceso evolutivo, los seres vivos están creando continuamente nuevos biopolímeros, (por ejemplo anticuerpos para agentes exógenos o sustancias desconocidas) que tienen un gran valor como modelos, cuando se aborda el desarrollo de materiales sintéticos, destinados a desempeñar funciones similares a las de las macromoléculas naturales (Corcheiro, 2007).

Frente a las macromoléculas naturales, los polímeros sintéticos tienen algunas ventajas importantes: *a)* se puede predecir su estructura de manera precisa; *b)* se obtienen por

procedimientos versátiles y fáciles de ajustar, para conseguir propiedades adaptadas a distintas necesidades; y c) su producción industrial resulta más económica. Para que un polímero se pueda utilizar como componente de un sistema inteligente de liberación de medicamentos tiene que estar dotado de funcionalidad. Por funcionalidad se entiende un efecto macromolecular específico, derivado de unas determinadas características químicas y estructurales, que se pueden manifestar con diferentes niveles de complejidad. La hidrofobicidad superficial o la capacidad para inmovilizar proteínas, son ejemplos de funcionalidad a un nivel muy básico. La funcionalidad más compleja de los polímeros sensibles, a estímulos se manifiesta, por ejemplo, como una aptitud para cambiar la solubilidad, la forma, el volumen o el estado de agregación en respuesta a un estímulo externo (por ejemplo, irradiación, aplicación de calor o de un campo eléctrico o magnético o compresión) o a una alteración del medio (cambio de pH o incorporación de una determinada sustancia). Además, el polímero debe ser capaz de transformar el estímulo en una función específica, que se pueda desempeñar en el entorno biológico. Los polímeros sensibles a estímulos que responden reversiblemente, activándose cuando se aplica el estímulo y desactivándose cuando cesa, se conocen como polímeros inteligentes. Para desarrollar sistemas inteligentes de liberación de medicamentos, se pueden incorporar polímeros dotados de esta cualidad a sistemas convencionales, como liposomas, vesículas, dendrímeros o partículas sólidas (Corcheiro, 2007).

Los sistemas de transporte a base de materiales poliméricos, en forma de nanopartículas requieren polímeros biocompatibles y biodegradables, estos polímeros deben ser completamente degradados y eliminados del organismo. Así estos, por su baja inmunogenicidad, pueden ser combinados con una amplia variedad de fármacos y otras moléculas de interés terapéutico (Rocha, et al., 2009).

### **Poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL)**

Polímero en que sus principales ventajas son las de aumentar la semivida biológica de eliminación (es el tiempo necesario para que la cantidad de dicho medicamento presente en el organismo o en el plasma sanguíneo se reduzca a la mitad) como consecuencia de diversos procesos de eliminación) de las moléculas encapsuladas, lo que permite su uso en formulaciones nanoparticuladas para la administración de principios activos, para los cuales es necesaria una liberación mantenida durante periodos de tiempo muy largos. Y de generar durante su degradación una cantidad menor de productos ácidos comparada con el PLGA (Sinha, et al., 2004).

### **Poli ( $\beta$ -hidroxibutirato) (PHB)**

Otro poliéster biodegradable es el poli ( $\beta$ -hidroxibutirato) (PHB), es estable a temperatura ambiente y semicristalino, con una velocidad de degradación más lenta que otros poliésteres empleados en formulaciones de nanopartículas, el PHB puede facilitar la liberación de fármacos de bajo peso molecular debido a la penetración de agua y formación de poros en la matriz polimérica nanoparticulada (Pouton, et al., 1996).

### **Ácido poli ( $\beta$ , L - málico) (PMLA)**

Las nanopartículas de PMLA han sido preparadas con el propósito de encapsular proteínas de distintos puntos isoeléctricos, manteniendo así su actividad enzimática durante períodos de tiempo prolongados comparados con la enzima libre (Arias, et al., 2008). Actualmente existen distintas combinaciones de polímeros principalmente con dos objetivos: modificar las propiedades de

superficie de las nanopartículas y disminuir la degradación de las moléculas encapsuladas (Mundargi, et al., 2008; Rieux, et al., 2006). La modificación del PLGA juega un papel muy importante ya que puede optimizar la estabilidad del fármaco encapsulado, su perfil de liberación y/o dirigir las nanopartículas a una diana específica. La pegilación (modificación superficial de la partícula con PEG), incrementa la semivida biológica de las moléculas encapsuladas en las nanopartículas. Así se ha comprobado que nanopartículas pegiladas de docetaxel posibilitan una mayor acumulación del antineoplásico en tumores sólidos en ratón (Senthilkumar, et al., 2008).

Danhier (2009) observaron un mayor efecto inhibitorio inducido por el paclitaxel encapsulado en nanopartículas de PLGA pegiladas sobre el crecimiento tumoral en hígado de ratón, comparado con la administración de Taxol® (Rocha, 2009).

### **Ácido Poli – Láctico (PLA)/ Ácido Poli – láctico- co- glicólido (PLGA).**

Los poliésteres alifáticos, están formados por una sucesión de unidades monoméricas de ácido láctico o bien de dímeros láctico-co-glicólico estos biopolímeros han sido aprobados por la FDA. El L-PLA y el PLGA son compuestos que corresponden respectivamente al homopolímero lineal del ácido poli-L-láctico y a copolímeros lineales del D, L ácido láctico y glicólico, los cuales se pueden encontrar en proporciones monoméricas variables, el peso molecular de PLA/PLGA es un parámetro que influye en la homogeneidad de la muestra. Por lo general, los polímeros de elevado peso molecular dan lugar a sistemas nanoparticulados con un bajo índice de polidispersión (Zambaux, et al., 1998). La ausencia de toxicidad de sus productos de degradación y su modulable velocidad de degradación han hecho que el PLGA sea el poliéster más utilizado en formulaciones nanoparticuladas de aplicación terapéutica (Gu, et al., 1992; Lemoine, et al., 1998; Fonseca, et al., 2002; Dillen, et al., 2004; Ayalasonmayajula, et al., 2004). Otra importante ventaja del PLGA sobre el L-PLA, es que al presentar una velocidad de degradación más rápida, la probabilidad de que ocurran reacciones adversas debido a fragmentos cristalinos liberados por estos últimos, es menor (Bergsma, et al., 1995).

## **1.8.- Nanomedicina**

La Nanomedicina, es una rama de la nanotecnología, que se refiere a un área muy específica, a escala molecular, y llevar a cabo la intervención médica para el tratamiento de enfermedades o para reparar los tejidos dañados.

La nanomedicina, es un campo en el que se incluye el uso de polímero-ADN complejos (polyplexes), los conjugados polímero-fármaco, y las micelas poliméricas obteniendo fármacos hidrofóbicos, ha tenido un gran impacto y cada vez más por su capacidad para mejorar la eficacia de la terapéutica del cáncer. Debido a su pequeño tamaño y excelente biocompatibilidad, los polímeros en que agentes terapéuticos nanométricos pueden circular en el torrente sanguíneo durante largos períodos de tiempo, les permite llegar al sitio de destino. La biodistribución de un determinado fármaco es otro factor importante, cuando es administrado por vía intravenosa, los fármacos convencionales se distribuyen a lo largo de todo el cuerpo a través del torrente sanguíneo y afectan tanto a células malignas como a células normales.

La meta ideal es entregar una gran parte del fármaco que se administra al sitio de destino con una duración suficientemente larga. Para lograr este objetivo, medicamentos contra el cáncer deben mostrar una liberación sostenida, controlada y dirigida.

En la modificación química además, se están diseñando agentes terapéuticos de polímeros con ligandos capaces de unirse específicamente a receptores que están sobre-expresados en células de cáncer y así poder aumentar notablemente la eficiencia terapéutica (Hyung, et al., 2008; Wang, et al., 2010).

La nanoencapsulación de los medicamentos (Nanomedicina) aumenta la eficacia, la especificidad, la tolerabilidad y el índice terapéutico de los medicamentos correspondientes. Estos nanomedicamentos tienen muchas ventajas en la protección del principio activo en cuanto a su degradación y la interacción con el entorno biológico, como por ejemplo, la biodisponibilidad, el tiempo de retención y la mejora de la penetración intracelular (Acharya, et al., 2010).

## Angiogenesis en el cáncer

Casi todos los tejidos vasculares que tienen redes proporcionan a las células el oxígeno y los nutrientes. La red vascular es un sistema estable, donde la formación de los nuevos vasos sanguíneos normalmente sólo se ve durante el desarrollo embrionario o cicatrización de la herida, y en respuesta de la ovulación (Hyung, et al., 2008). En el caso del cáncer, los tumores sólidos más pequeños que son de 1-2 mm<sup>3</sup> no están vascularizados, porque el oxígeno y los nutrientes pueden llegar al centro del tumor por difusión simple. Sin embargo, los tumores sólidos (Fig.13) más grandes que presentan un volumen crítico, de 2 mm<sup>3</sup> de entran en un estado de hipoxia celular que marca el inicio de la angiogenesis tumoral, es decir, el surgimiento de nuevos vasos sanguíneos de los vasos ya existentes (Hyung, et al., 2008).

El desarrollo de vasos sanguíneos nuevos es un acontecimiento importante en la progresión tumoral ya que apoya el crecimiento del tumor y permite la diseminación de las células cancerosas en todo el cuerpo, lo que llamamos metástasis (Hyung, et al., 2008). La angiogenesis está regulada por un delicado equilibrio entre los factores capaces de estimular e inhibir- la formación de vasos sanguíneos.

Esta balanza se inclina en favor de la angiogenesis en la hipoxia, el cáncer induce a las células para liberar moléculas proangiogénicas como factores de crecimiento. Más de 20 reguladores endógenos positivos de la angiogenesis han sido identificados hasta la fecha, incluyendo el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento transformador, factores de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epidérmico, y angiogenina. Las células endoteliales de los vasos sanguíneos existentes responden a estas moléculas angiogénicas al someterse a la diferenciación, la migración y proliferación, y también secretan las metaloproteinasas proteasas (MMP) en la matriz intracelular, que digieren a la matriz extracelular lo que permite que los vasos sanguíneos puedan irrigar el tumor en el tejido. Actualmente se están desarrollando medicamentos contra el cáncer, que se basan en el concepto que la eliminación de los vasos sanguíneos angiogénicos limitara el suministro de nutrientes y oxígeno a las células cancerígenas provocando su muerte o bien reduciendo su tasa de crecimiento. En términos de nanomedicina, ésta ha elaborado recientemente una nanocélula que comprende una central nuclear a base de nanopartículas con polímeros y dentro lípidos pegilados. Esta nanocélula se basa en la liberación de dos agentes terapéuticos donde un agente antiangiogénico se libera desde el exterior, sobre la vascularización de bloqueo, y luego un agente de quimioterapia libera nanopartículas desde el interior para eliminar las células cancerosas. Este estudio demostró que la combinación de la quimioterapia tradicional con agentes antiangiogénicos acoplado a nanopartículas poliméricas mejora el índice terapéutico y reduce la toxicidad significativamente (Hyung, et al., 2008).

## Difusión pasiva en el tumor

Estudios más recientes han demostrado que el polímero conjugado con los fármacos y la nanopartículas muestran la circulación prolongada en la sangre y se acumulan pasivamente en los tumores, incluso en ausencia de ligandos, lo que sugiere la existencia de un mecanismo pasivo de retención.

Vasos sanguíneos del tumor se caracterizan en general por anomalías tales como una proporción relativamente alta de la proliferación de células endoteliales, el aumento de tortuosidad, la deficiencia de pericitos (células del sistema circulatorio) y aberrante formación de la membrana. Este defecto vascular estructural, que probablemente puede ser resultado de la rápida vascularización necesaria para proporcionar oxígeno y nutrientes para el crecimiento rápido del tumor, disminuye el drenaje linfático y hace que los vasos sean permeables a macromoléculas. Las macromoléculas no son fácilmente permeables de eliminar, por lo que son retenidas en el tumor. Este fenómeno pasivo de orientación, se ha llamado efecto de la penetración y la retención (EPR), cabe señalar que la permeabilidad del vaso sanguíneo constituye la piedra angular del efecto EPR, y este varía durante la progresión tumoral (Hyung, et al., 2008).

## Efecto EPR

(Maeda et al., 2010) descubrió una gran diferencia en la absorción de tumor entre los fármacos de bajo peso molecular y fármacos macromoleculares biocompatibles (SMANCS) en tumores sólidos. En una serie de estudios, el efecto EPR- fue descubierto usando macromoléculas biocompatibles tales como la albúmina (65 kDa), la transferrina (90 kDa), IgG (inmunoglobulina, 150 kDa),  $\alpha$ 2-macroglobulina (240 kDa), ovomucoide de pollo obtenido de la clara de huevo (29 kDa, y glicos-proteínas), SMANCS (16 kDa, con el carácter de unión a la albúmina se convierte en 80 kDa) y neocarzinostatín (12 kDa). Macromoléculas como la albúmina, transferrina, IgG, SMANCS y partículas lipídicas (Lipiodol) acumulado en el tumor sólido tan notable, fueron retenidos por un período muy prolongado de hasta 3 meses o más (Maeda, et al., 2010). A partir de estos resultados se concluyó específicamente en el campo de la oncología, que moléculas de elevado peso molecular (40 kDa o más), y con un largo tiempo de permanencia en la sangre, así como vehículos farmacéuticos nanoparticulares, son capaces de acumularse en diversos tejidos patológicos como tumores sólidos. Esto se debe a la infiltración y la retención llamado efecto EPR (Vila, 2008).

Se reportó qué relación existe entre el peso molecular (MW) y la dependencia del tiempo asociado al fenómeno llamado "el aumento de la permeabilidad y retención" (EPR) con respecto a tumores sólidos, en particular para determinar y definir la acumulación de la fase inicial de las macromoléculas en el tumor y tejidos normales así como la relación entre la concentración de la sangre y la eliminación del tejido. El aumento de copolímeros MW (> 50 K) mostraron significativamente la acumulación mayor en el tumor después de 6 h, mientras que en copolímeros de menor peso MW (<40 K) se elimina rápidamente debido a la rápida difusión en el torrente sanguíneo. La depuración de la sangre también fue MW-dependiente; los copolímeros con MW inferior muestran la rápida eliminación.

Estos resultados sugieren que el "efecto EPR" en tumores sólidos surge de la diferencia en la tasa de espacio libre entre el tumor sólido y los tejidos normales después de la penetración inicial de los polímeros en estos tejidos (Maeda, et al., 2010).

Este fenómeno se basa en el hecho que el endotelio de los capilares que poseen estos tejidos con células tumorales, en un esfuerzo por su rápido crecimiento, y estimular la producción de nuevos vasos sanguíneos que están mal organizados presentan fugas en sus fenestraciones esto permite el

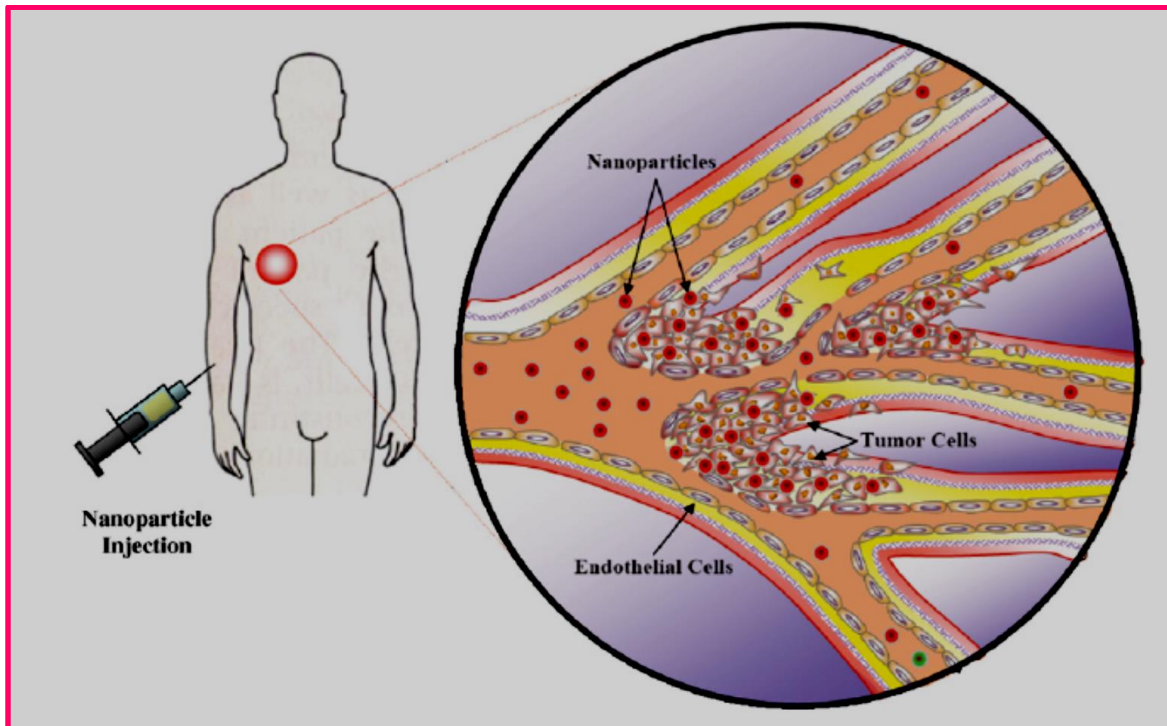
paso de macromoléculas y sistemas nanoparticulares por lo que se ven presentes en el tejido tumoral, y posteriormente existe acumulación selectiva de estos agentes o a una "orientación pasiva" en el espacio intersticial, a esto se une una disminución de la circulación linfática, responsable del aclaramiento de macromoléculas en tejidos normales. Por lo que ha impulsado el desarrollo de tecnologías destinadas a mejorar la administración de fármacos a estos tejidos siendo un objetivo importante de numerosas investigaciones (Vila, et al., 2008, Orive, et al., 2010; Maeda, et al., 2010).

### Los factores que facilitan el efecto EPR son:

- Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF / VPF).
- Bradykinin/3-hydroxyprolyl bradisinina (BK).
- Presencia de óxido nítrico (NO).
- Presencia de peroxinitrito (ONOO) (producto de reacción de superóxido anión radical y NO).
- Las prostaglandinas (PG).
- Metaloproteinasas de matriz (MMP); proMMP se activa para MMP por ONOO.
- Otras proteasas (por ejemplo, la quinina / sistema calicreína) la participación de cascada de proteasas diferentes.
- Otras citocinas (factor de necrosis tumoral, por ejemplo, IL-2 y TNF- $\alpha$ ). (H. Maeda, et al., 2010)

De acuerdo con el concepto EPR, macromoléculas biocompatibles se acumulan en concentraciones mucho más elevadas en los tejidos tumorales que en los tejidos u órganos normales, incluso superiores a las del plasma (Mo, et al., 2005; Pandey, et al., 2006; Jain, 2000). La mayoría de los medicamentos convencionales tienen una actividad media en plasma de menos de 20 minutos en ratón o en humano. Sin embargo, se necesitan al menos 6 horas en circulación para ejercer el efecto EPR en los medicamentos. Esto significa que cualquier fármaco candidato debe tener un gran tamaño molecular, por encima del umbral de eliminación renal, por otra parte los medicamentos no deben ser poliméricos catiónicos, pero si neutrales o aniónicos, porque la superficie luminal de los vasos sanguíneos está altamente cargada negativamente y por lo tanto los fármacos con polímeros catiónicos son absorbidos en la superficie vascular y entonces tendrían poco tiempo de vida media *in vivo* (Acharya, et al., 2010).





**Fig.13 Difusión pasiva de un fármaco debido al efecto EPR (Hyung et. al, 2008)**

Todos estos estudios demuestran que la arquitectura vascular anormal y el efecto EPR juegan un papel importante en la permeabilidad vascular excesiva del tumor como muestra la Fig. 13. A continuación se muestran las características de un tumor:

- La alta densidad vascular de la angiogénesis (hipervascularura) del tumor.
- La falta de músculo liso de la capa; pericitos, sin AT-II inducida vasoconstricción, más fugas en los vasos del tumor en estado de hipertensión.
- Defectuosa arquitectura vascular, red de vasos irregulares, grandes aberturas, (fenestración) que ocasionan aumento en la permeabilidad.
- El flujo de sangre caprichosos, no hay flujo de sangre constante ni dirección.
- Eliminación linfática pobre que conduce a una mayor retención de fármacos macromoleculares y partículas lipídicas en los intersticios de los tumores.
- El retorno venoso lento que conduce a la acumulación de macromoleculas-fármaco molecular y partículas lipídicas en el intersticio del tumor (Noguchi, et al., 1998 y Maeda, et al., 2010).

### **Difusión activa en el tumor**

Las células cancerosas a menudo muestran una mayor superficie celular y expresión de proteínas que se pueden encontrar disminuidos en comparación con los niveles en las células normales (antígenos tumor-asociados), así como las proteínas que se encuentran exclusivamente en células de cáncer (Antígenos específicos de tumor).

Esto se logra generalmente por medios químicos, el apego a un componente de focalización que fuertemente interactúa con los antígenos (o receptores) que aparecen en el tejido diana, lo que lleva a la acumulación preferencial de la droga en el órgano blanco, tejido o las células.

El uso de una fracción de la focalización no sólo disminuye los efectos secundarios adversos, permitiendo la droga para ser entregados a los sitios de acción específicos, sino también facilita la captación celular del fármaco por el receptor mediado de endocitosis, que es un proceso activo que requieren un gradiente de concentración significativamente menor en la membrana plasmática que la simple endocitosis, un enfoque activo a menudo hace uso de anticuerpos monoclonales, el folato es un objetivo interesante AP- enfoque para el tratamiento del cáncer porque que ofrece varias ventajas sobre el uso de anticuerpos monoclonales.

Los folatos son vitaminas de bajo peso molecular siendo necesarias para células eucariotas, teniendo la capacidad de ofrecer una variedad de drogas a agentes patológicos sin causar daño a la los tejidos normales (Hyung, et al., 2008).

## **Nanotecnología en la Terapia del cáncer.**

El desarrollo continuo de partículas cargadas con medicamento es probable que proporcione muchos y mejores avances, dada la flexibilidad en sus propiedades físicas y químicas que estos sistemas ofrecen (Orive, et al., 2010; Wang, et al., 2010).

El diseño de nuevos sistemas de administración de fármacos, junto con la evolución de los biomateriales y los avances de la nanotecnología han permitido a los tratamientos de cáncer más sofisticados presentar menos efectos secundarios y con una mejora en la biofarmacia y la farmacocinética de sus propiedades como consecuencia se puede aumentar la vida de un fármaco en la circulación y esto mejora las posibilidades de alcanzar concentraciones terapéuticas del fármaco en el lugar de destino.

Por ejemplo, sistemas de administración pegilados (polietilenglicol conjugado con portadores de fármacos) permiten una mejora en la circulación sanguínea; el tiempo y la estabilidad del fármaco como la modificación de su superficie con polímeros hidrofílicos reduce su aprobación por el sistema retículo endotelial, es decir las partículas cargadas que han sido fabricadas con polímeros como el polietilenglicol suprimen el reconocimiento de los macrófagos mediante la reducción de adsorción y debido a la superficie evitan ser opsonizadas. Lo cual prolonga la circulación de las nanopartículas y esto permite la liberación controlada de la terapéutica.

Se ha reportado que partículas inyectadas por vía intravenosa son secuestradas y eliminadas de la circulación por las células de Kupffer y macrófagos en un proceso facilitado por la deposición superficial de los factores de opsonización de sangre y proteínas del complemento.

Tanto el aclaramiento como opsonización están influenciados por las características de tamaño y superficie de las partículas inyectadas. En relación con las partículas muy pequeñas, las partículas < 200 nm de diámetro se eliminan más rápidamente.

Arquitecturas de escala nanométrica penetran los tumores debido a la naturaleza discontinua de la microvasculatura del tumor, que contiene poros más grandes de lo normal (100-1000 nm de diámetro), (Orive, et al., 2010).

A pesar de la vasculatura irregular y porosa de los tumores, estructural y funcionalmente impiden, hasta cierto punto, la fluencia eficiente de partículas en la regulación sistémica (Orive, et al., 2010). Es importante considerar las características tanto de la formulación de las nanopartículas (superficie carga e hidrofobicidad) como las del cáncer (por ejemplo, altas presiones hidrostáticas, altos requerimientos de la nutrición, la presencia de sobreexpresado receptores, etc.)

Cabe mencionar que a diferencia de la mayoría de los tejidos normales, el intersticio, de un tejido tumoral se caracteriza por altas presiones hidrostáticas, que conduce a un flujo de salida de convección intersticial que puede vaciar el medicamento lejos del tumor.

Además, incluso si el medicamento es entregado con éxito al intersticio tumoral, su eficacia puede ser limitada si las células cancerosas han adquirido resistencia a múltiples fármacos (MDR). La MDR se atribuye a la sobre-expresión de la P-glicoproteína (P-gp), en la membrana plasmática que es capaz de causar de la célula una repulsión de los fármacos. Varias estrategias se han propuesto para eludir la MDR mediada por la P-gp, incluyendo la administración de P-gp , lo que permite el suministro de las nanopartículas a la célula en el citoplasma o el núcleo (Hyung, et al., 2008).

## **1.9.- Tipos de nanopartículas para el tratamiento del cáncer.**

Aunque el número de diferentes tipos de nanopartículas está aumentando rápidamente, la mayoría se pueden clasificar en dos tipos principales: las partículas que contienen moléculas orgánicas como material de construcción más importante y los que utilizan elementos inorgánicos, por lo general los metales, para establecer como núcleo.

Liposomas, dendrímeros, los nanotubos de carbono, emulsiones y otros polímeros son grupos establecidos de partículas orgánicas.

El uso de estas nanopartículas orgánicas ya ha producido resultados interesantes. Los liposomas están siendo utilizados como vehículos para la administración de fármacos en diferentes tumores humanos, incluyendo el cáncer de mama. Dendrímeros, que se utilizan como agentes de contraste, han ayudado a la visualización de distintos procesos patológicos (Wang, 2010; Maksym, et al., 2006). Conjugados con agentes farmacológicos y moléculas dirigidas, nanovectores orgánicos son vehículos potentes para la administración de fármacos y de imagen selectiva de los diferentes tipos de cáncer humano. Los liposomas son estructuras cerradas de auto - ensamblado con compuestos coloidales de capas de lípidos. Los dendrímeros son macromoléculas globulares en que todos sus enlaces emergen radialmente desde un punto de contacto central con patrón regular de ramas y unidades repetidas. Las nanopartículas de carbono; contienen nanotubos de carbono. La mayoría de las nanopartículas inorgánicas comparten la misma estructura básica de un núcleo central que define las propiedades de fluorescencia, óptica, magnética y electrónica de la partícula, con una capa protectora orgánica en la superficie. Esta capa exterior protege el núcleo de la degradación en un ambiente fisiológicamente agresivos y pueden formar enlaces covalentes o electrostáticas, o ambos, con carga positiva (Maksym, et al., 2006).

### **Aplicaciones de nanopartículas**

Las nanopartículas poliméricas son soportes sólidos que van desde 10 a 1000 nm de diámetro, hecha de polímeros naturales o sintéticos biodegradables y por lo general, en los que los fármacos terapéuticos pueden ser adsorbidos, disueltos, atrapados, encapsulados o unidos covalentemente (Orive, et al., 2010).

Una de las ventajas debidas al tamaño de las nanopartículas, es su captación por parte del sistema fagocítico mononuclear. Así, se ha aprovechado esta característica para su empleo como vector de fármacos dirigidos a estas células. Se ha descrito además el uso de nanopartículas de PLGA para la administración en infecciones bacterianas intracelulares como micobacterias, para la cual se ha probado la administración oral del antibiótico estreptomycin así como nanopartículas conteniendo tres fármacos eficaces contra esta bacteria (la rifampicina, la isoniazida y la pirazinamida) y administradas por vía pulmonar. Un campo de investigación de creciente interés es la aplicación de estas nanopartículas en la terapia frente al cáncer. El empleo de nanopartículas de poliésteres se

fundamenta en su capacidad de disminuir la toxicidad sistémica intrínseca de los agentes quimioterápicos, hecho que limita en gran parte la dosis administrada a los pacientes, así como la mejora de la eficacia de los tratamientos. Las nanopartículas son dirigidas al foco del tumor, desde el que van liberando de manera controlada el fármaco antineoplásico, prolongando la semivida del fármaco y ejerciendo una acción local (Pillai, et al., 2008).

Las nano y micropartículas de PLGA han sido utilizados para entregar agentes antitumorales, como el factor plaquetario 4 fragmentos, mitoxantrona, mesilato y doxorubicina, entre otros (Orive, et al., 2010).

## Nanopartículas de PLGA

Debido a su excelente biocompatibilidad, el poliéster biodegradable llamado PLGA es el más utilizado como biomaterial y ya está comercializado por una variedad de sistemas de administración de fármacos (mezclas, películas, matrices, las microesferas, las nanopartículas, pellets, etc.) Nanopartículas poliméricas de este polímero se utilizan para la entrega de diversos fármacos (antipsicóticos, anestésicos, antibióticos, antiparasitarios, antitumorales, hormonas, proteínas, etc)

## Biodegradación de PLGA

Tanto in vitro como in vivo, el co-polímero PLGA experimenta una degradación en un medio acuoso (degradación hidrolítica o biodegradación) a través de sus enlaces éster. Las cadenas de polímeros se degradan y la degradación general ocurre a una velocidad uniforme en toda la matriz de PLGA, se ha registrado que la biodegradación de PLGA se produce al azar un rompimiento en la cadena del polímero ya hinchado.

Esto se debe a los grupos carboxílicos presentes en el incremento de las cadenas de PLGA.

Estos son reconocidos para catalizar el proceso de biodegradación, también se ha informado de que grandes fragmentos se degradan más rápido internamente y en regiones amorfas se degradan más rápido que las regiones cristalinas, las tasas de biodegradación de la PLGA co-polímeros dependen de la relación molar de los ácidos láctico y glicólico en la cadena polimérica, peso molecular del polímero, el grado de cristalinidad y de la Tg del polímero.

Un mecanismo de tres etapas para PLGA biodegradación se ha propuesto:

1. Proceso de escisión de la cadena al azar. El peso molecular del polímero disminuye de manera significativa, pero no la pérdida de peso considerable y no los productos monómeros solubles se forman.
2. En la fase intermedia, una disminución en peso molecular, acompañado de una rápida pérdida de masa y oligómeros solubles y productos monómeros se forman.
3. Productos solubles monómero formados por fragmentos de oligómeros solubles. Esta fase es que la completa solubilización del polímero.

El papel de las enzimas en cualquier biodegradación PLGA no está claro. La mayor parte de la literatura indica que la biodegradación PLGA no implica ninguna actividad enzimática y es únicamente a través de la hidrólisis. Algunos hallazgos han sugerido la ruptura enzimática del PLGA basada en la diferencia de pruebas in vitro e in vivo de acuerdo con las tasas de degradación.

Sin embargo, se sabe que el PLGA se biodegrada en ácidos láctico y glicólico (Fig. 14). El ácido láctico entra en el ciclo del ácido tricarbóxico y es metabolizado y eliminado posteriormente del cuerpo como dióxido de carbono y agua.

El ácido glicólico o es excretado sin cambios en el riñón o entra en el ciclo del ácido tricarbóxico y finalmente se elimina el dióxido de carbono y agua (Muthu, 2009).

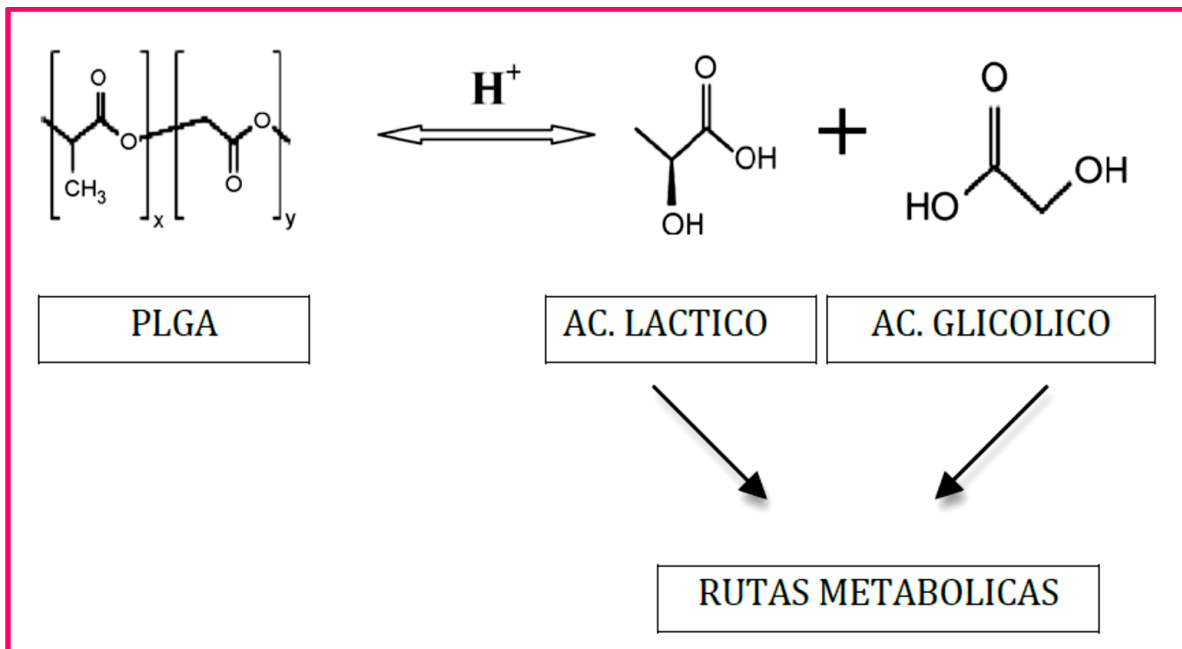


Fig. 14 Hidrólisis de PLGA (Kumari, et al., 2009)

## Nanopartículas de PLGA que contienen agentes antitumorales y el efecto EPR

Algunas ventajas de las nanopartículas con respecto a las micropartículas son las siguientes: Micropartículas grandes pueden embolizar los vasos con el mismo diámetro, y esta propiedad se puede utilizar para obstruir intencionalmente el flujo sanguíneo, con o sin la administración de fármacos simultáneamente.

Esto podría llevar a las partículas a que se alojen en los órganos terminales, causando un infarto (por ejemplo, accidente cerebrovascular). Por el contrario, si las nanopartículas son demasiado pequeñas para causar fenómenos embólicos, pueden circular por todo el árbol vascular (Pandey, et al., 2006). Otra diferencia importante entre los dos es que se mantiene la eficiencia para atravesar las barreras biológicas. En general, las micropartículas es poco probable que puedan cruzar las barreras biológicas, y, por lo tanto, a menudo deben ser entregadas directamente al sitio de interés.

Las nanopartículas, por virtud de su menor tamaño, pueden atravesar barreras y entregar directamente el fármaco a su sitio de acción por los mecanismos de difusión pasiva.

Además de que el coeficiente de partición membranal amortiguador, determina la probabilidad de que el fármaco, sustancia o fármaco contenido en las nanopartículas permanezcan en la fase acuosa o penetre al material graso de la membrana celular cuando llega a ella.

A partir de los valores  $P_m/a$  correspondientes a las estructuras de la droga madre y los factores  $P$  de radicales sustitutos comunes, si el factor de partición ( $P$ ) para un sustituto es mayor de 1, significa que ese radical hace aumentar la solubilidad del fármaco o nanopartículas en la membrana o en grasa, aceite u octanol.

No obstante, si el ( $P$ ) del sustitutivo resulta menor de 1, el radical hace que el medicamento se disuelva menos durante la fase de membrana o en aceite. Por ejemplo, metano ( $P=0.6$ ), Anillo de benceno ( $P=25$ ) Ciclohexano ( $P=16$ ). En consecuencia, las micropartículas sólo puede ser entregadas en las células que están en fagocitosis, mientras que las nanopartículas pueden ser entregadas a

todas las células; cabe mencionar que las moléculas de tamaño muy grande de 1000 Da o más, solo pueden ser absorbidas por pinocitosis (Acharya, et al., 2010).

Finalmente, el rendimiento de las nanopartículas *in vivo* se ve influenciada por las características morfológicas, la química de superficie, y el peso molecular.

Las propiedades de las nanopartículas como precursor de la nanomedicina espera buenos resultados como el tamaño de las partículas, distribución de tamaño, morfología de la superficie, la química de superficie, carga superficial, la adherencia de la superficie, la erosión superficial, porosidad interior, la difusividad de drogas, la eficiencia de la encapsulación de fármacos, la estabilidad del fármaco, la cinética de liberación del fármaco y la hemodinámica.

La carga de la superficie de las nanopartículas es importante para la internalización celular, la agrupación en el flujo sanguíneo, la adhesión, y la interacción con la membrana de las células de carga opuesta (Kumari, et al., 2009).

Especificando que la carga de las células normales en su interior es positiva y en el exterior negativa generando una diferencia de potencial en la membrana de hasta + 70 mV, y en células tumorales se encuentran cargadas negativamente en su interior, por lo que en el exterior se encuentran cargadas positivamente, dando como resultado una diferencia de potencial de hasta -30 mV (Horsman, 2007).

**Tabla 2. Nanopartículas de PLGA con diferentes fármacos encapsulados.**

Nanopartículas de PLGA con fármaco encapsulado	Sitio de acción	Aplicación in vitro	Aplicación in vivo	Referencia de los autores
<b>Dexametasona</b>	Receptores citoplasmáticos	La proliferación de supresión eficaz de las enfermedades vasculares en células musculares lisas.	Una mayor eficacia in vivo de nanotransportadores, el tratamiento es local para la artritis y la angiogénesis	Panyam et al. [2003] Butoescu et al. [2009]
<b>Paclitaxel</b>	microtúbulos (astringente con subunidad β de la tubulina) muerte en la división celular.	La eficacia de esta presentación de paclitaxel mediada se ha probado en las líneas celulares de humanos con cáncer de pulmón (NCI-H69 SCLC), adenocarcinoma humano (HT-29), cáncer de laringe en humanos (Hep-2), carcinoma de mama (MCF-7) y el carcinoma cervicis de (HeLa)	Eficacia in vivo de paclitaxel nanopartículas cargadas se ha consultado en tumor en el hígado para trasplantes en hombres, En ratones y en modelo en tumores de glioblastoma	Patil et al. [2007] Feng et al. [2004] Fonseca et al. [2002] Danhier et al. [2009] Jin et al. [2009] Ranganath et al. [2009] A. kumari 2009

<b>Sulfato de Vincristina</b>		Tubulina	Nanopartículas PLGA al mismo tiempo cargado de sulfato de vincristina y clorhidrato de verapamilo para el tratamiento del cáncer	Además, los estudios mostraron que al mismo tiempo Administrando las nanopartículas y la quimioterapia podría potencializar la formulacion para el tratamiento de cánceres resistentes in vivo.	Ong et al. [2009] Song et al. [2008,2009]
<b>Curcumina</b>	Proteínas citoplasmáticas	Mejora la biodisponibilidad de la curcumina, y fue efectiva en contra de cáncer de ovario, de mama y del cáncer de próstata	La biodisponibilidad in vivo de la curcumina de nanopartículas cargadas con PLGA se llevó a cabo en ratones Balb / c. Otro estudio independiente demostrado la eficacia de la curcumina marcado contra el cáncer micropartículas en ratones desnudos teniendo MDA-MB-231injertos	Shaikh et al. [2009] Yallapu et al. [2010] Mukerjee et al. [2009] Anand et al. [2010] Bisht et al. [2007] Shahani et al. [2010]	
<b>Camptotecina</b>	Tipo I	Eficacia que fueron investigados en las células del melanoma murino B16 y de células escamosas en carcinoma humano	Las características del antitumoral in vitro de metoxi poli (Etilenglicol)-que contienen la camptotecina han sido examinados en ratones portadores de tumores sólidos del sarcoma	Tong et al. [2003] Mallery et al. [2001] Miura et al. [2004]	
<b>Doxorrubicina</b>	Tipo II	Nanopartículas multifuncional PLGA se utilizaron en línea celular contra la MDA-MB-231 células de cáncer de mama y contra el carcinoma hepatocelular de hígado humano (HepG2)	En la farmacocinética in vivo de DOX cargado PN se evaluó en mujeres y SD en intracraneal 101 / 8 glioblastoma en ratas	Park et al. [2009] Yoo et al. [2000] Kalaria et al. [2009] Gelperina et al. [2010] Avgoustakis et al. [2002]	

<b>Cisplatino</b>	Para entrecruzar molécula de ADN de varias maneras para interferir la división celular por mitosis	cisplatino en nanopartículas PLGA mostraron una mayor eficacia terapéutica en células del cáncer de próstata humano LNCaP	Farmacodinamia de nanopartículas de PLGA o PLGA mPEG-cargado con cisplatino- en la administración a ratones con tumores / Balb Ratones C fue investigado por los diferentes grupos	Agrahari et al. [2009] Moreno et al. [2010] Mattheolabakis et al. [2009]
<b>Etopósido</b>	Tipo II	Se cargó la droga en presencia de Pluronic F68 para el tratamiento del cáncer eficiente	Formulaciones de nanopartículas PLGA se ha marcado radiactivamente y su biodistribución y farmacocinética fueron estudiados tras la administración intravenosa en ratones sanos y conejos	Reddy et al. [2004] Snehalatha et al. [2008]
<b>Rapamicina</b>	Tirosina quinasa	Incremento de la actividad supresora de las células dendríticas, células del músculo liso vascular (HUASMC) y células de cáncer de mama MCF-7 se investigó	La mejora en la retención en vivo y la absorción de las nanopartículas en el las paredes arteriales para la localización eficiente de los agentes terapéuticos en el sitio de la restenosis	Haddadi et al. [2007] Miao et al. [2010] Zou et al. [2009] Acharya et al. [2009]
<b>9-Nitrocamptotecina</b>	Derivada de la camptotecinadirigidas a la enzima topoisomerasa nuclear I	El perfil in vitro la liberación del fármaco mostró un sostenido 9 - comunicado de Carolina del Norte hasta 160 h indicando la idoneidad de las nanopartículas de PLGA de liberación controlada 9 NC	Aun no hay reporte	A.Kumari [2009]
<b>Xantonas</b>	Estas moléculas inhiben la producción de óxido nítrico de los macrófagos y esto causa una fuerte acción inhibitoria	En líneas celulares de cáncer humano	No ha sido reportado	A. Kumari [2009]



<b>Rosa de bengala</b>	como sensibilizador para producir oxígeno	Se usa para tratamiento en células de cáncer de melanoma y en células tumorales	Aun no hay reportes	A.Kumari [2009]
<b>Triptorelina</b>	Reduce los niveles de producción y acumulación de testosterona	Líneas celulares de cáncer humano	Aun no existe reportes	A.Kumari [2009]

Como se ha descrito anteriormente, existen numerosos fármacos que han sido encapsulados recientemente, con la finalidad de reducir efectos secundarios en el paciente y ser más efectivos en cuanto a citotoxicidad en líneas celulares de cáncer, y esto se ha logrado para cáncer de mama en pruebas in vitro, la ventaja que ofrece este trabajo, no es identificar un nuevo agente natural, si no que aprovechar investigaciones anteriores que reportaron citotoxicidad de diferentes extractos del *K. daigremontiana* en otros tipos de cáncer, realizar una nueva presentación (nanoencapsulación), y cuyo objetivo principal es eliminar selectivamente a células cancerosas, sin matar a células normales.

## 2. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es la primera causa de muerte en mujeres tanto a nivel mundial, como nacional. Y si bien existen diferentes tratamientos para su eliminación y/ o control, éstos no son suficientes, ni totalmente efectivos y además los efectos secundarios que generan conllevan a que los pacientes no concluyan sus tratamientos. Por tal motivo es necesaria la búsqueda de nuevos fármacos que de forma individual o asociados a otras moléculas permitan la generación de nuevos y mejores tratamientos frente al cáncer de mama. *K. daigremontiana* contiene compuestos con potencial efecto citotóxico específico frente a las células de cáncer de mama, por lo que el aislamiento, purificación e identificación del componente químico de esta planta y su asociación con nanopartículas podría generar una nueva formulación que elimine de forma más eficaz y selectiva a las células de cáncer de mama.

# 3. OBJETIVOS

## Objetivo general

- Nanoencapsular la fracción citotóxica aislada del extracto acuotanolico de *K. daigremontiana* y evaluar el efecto citotóxico en la línea celular de cáncer de mama MDA – MB -231 (cáncer de mama).

## Objetivos específicos

- Realizar la separación en fracciones del extracto acuotanolico con diferentes solventes con base a la diferencia en sus polaridades por la Técnica de Cromatografía Preparativa.
- Evaluar el efecto citotóxico de las fracciones del extracto acuotanolico de *K. daigremontiana* en la línea celular de cáncer de mama MDA – MB -231.
- Analizar la fracción con potencial citotóxico obtenida de cromatografía preparativa para su identificación o elucidación por las técnicas de UV-Vis, FTIR, y por Técnicas cromatográficas de HPLC.
- Elaborar las nanocápsulas por el método de secado (spray Dryer) con la fracción con potencial citotóxico, aislada e identificada del extracto acuotanolico de Aranto, el estándar de bufadienólido (Bufalin), un fármaco antineoplásico (Paclitaxel).
- Caracterizar fisicoquímicamente a las nanocápsulas con la fracción de extracto acuotanolico de *K. daigremontiana*.
- Realizar ensayos in vitro para evaluar su citotoxicidad con las nanocápsulas previamente caracterizadas, en línea celular tumoral MDA-MB-231 en contraste con la línea celular MCF10A.

# 4. MATERIALES Y MÉTODOS



***K. daigremontiana*: datos etnobotánicos, colecta e identificación taxonómica.**



**Obtención del extracto acuoetanólico del *K. daigremontiana*.**



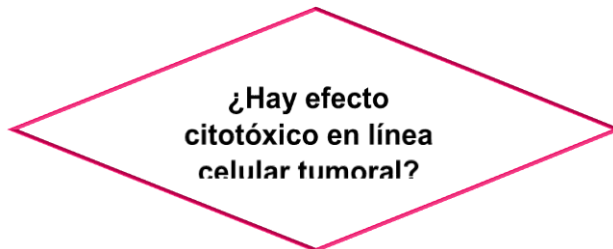
**Separación por la técnica de Cromatografía Preparativa con: hexano - acetato de etilo - cloruro de etileno - etanol/agua 3:1**



**Evaluación del efecto de las fracciones con los diferentes solventes (25 - 200  $\mu\text{g/ml}$ ) en línea celular tumoral (MDA-MB-231)**



**Ensayos de viabilidad y citotóxicidad (MTT).**



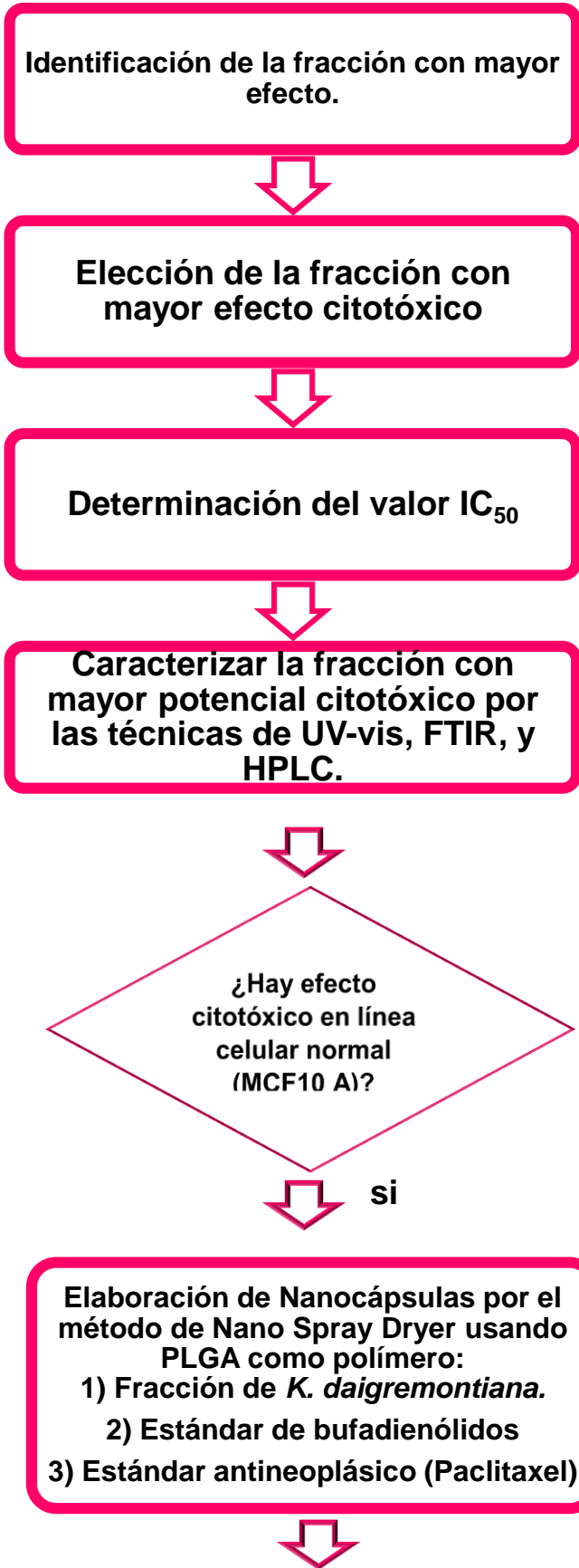
no

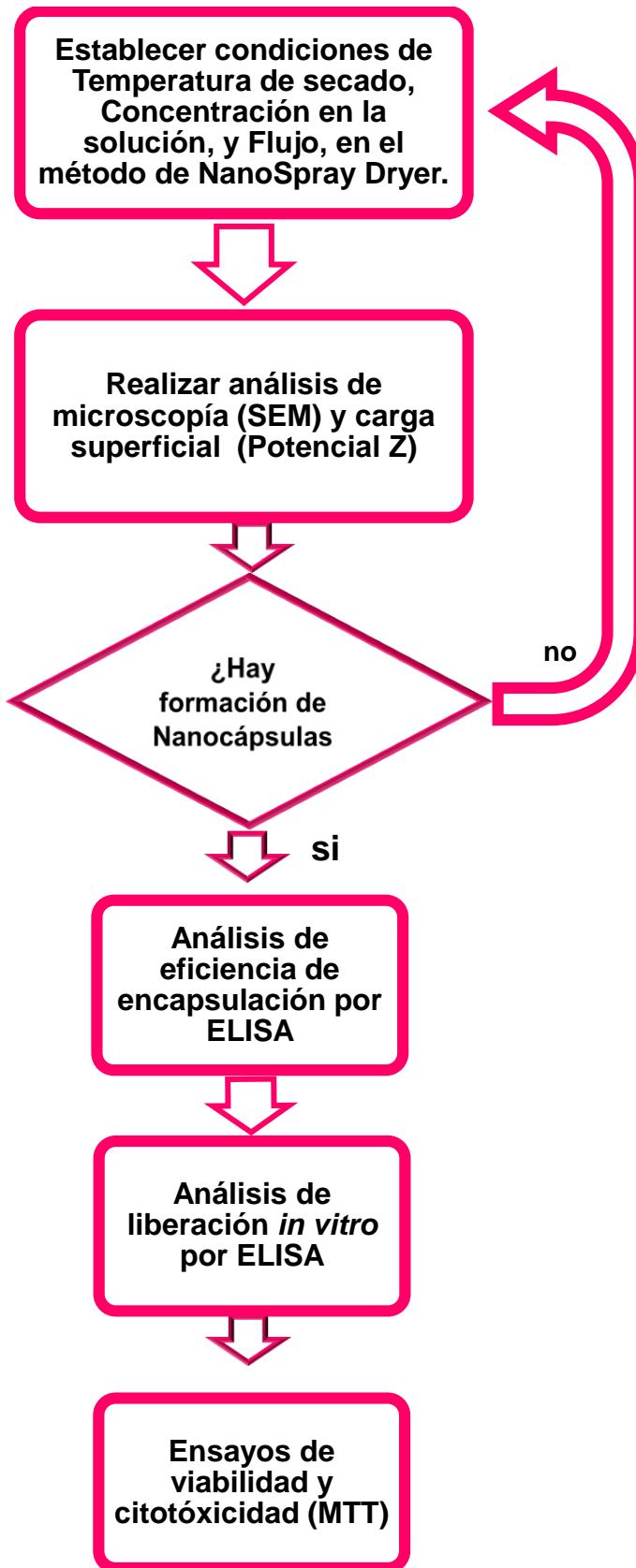


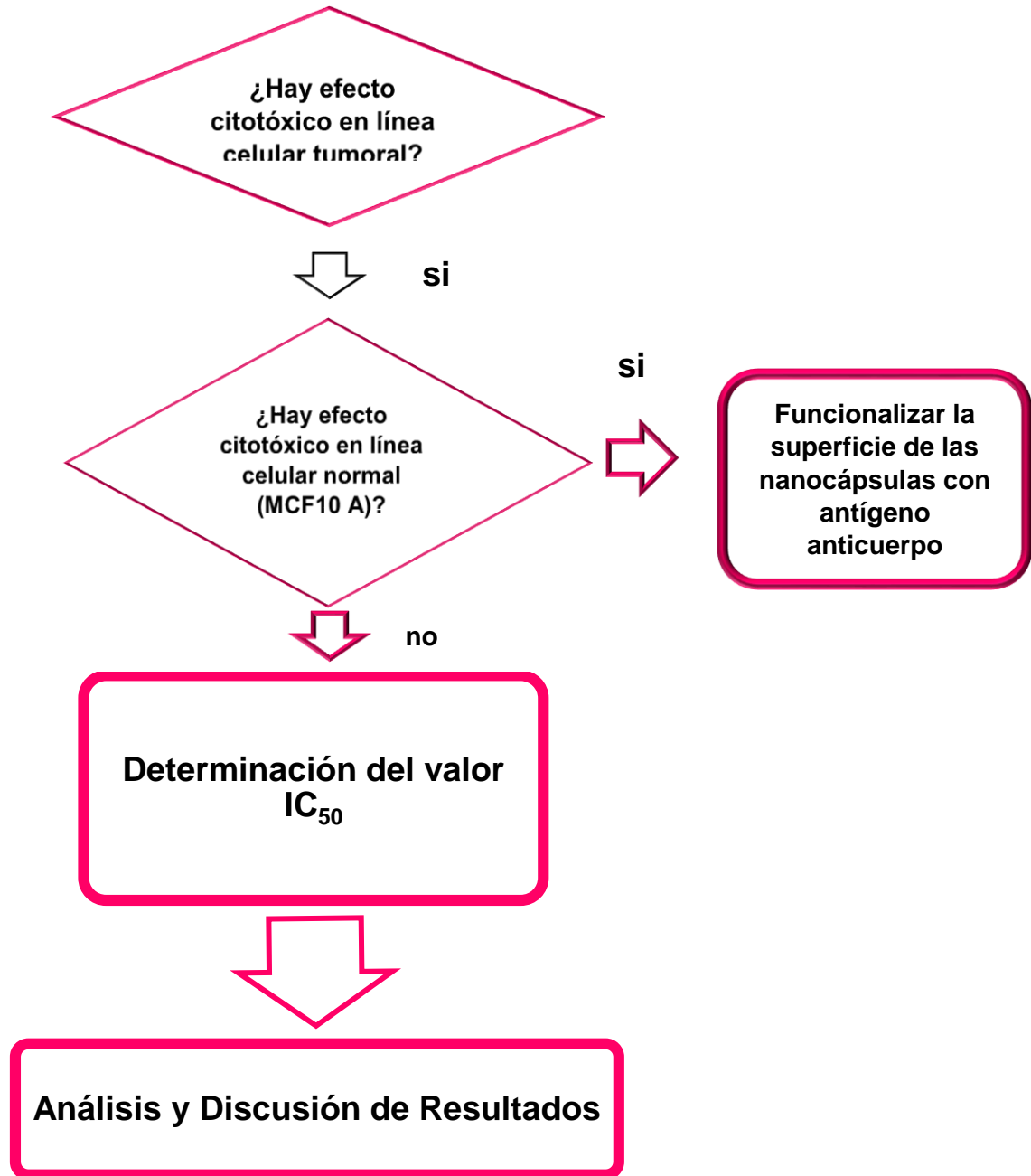
**Separación por Cromatografía Preparativa con otros solventes**



si









#### 4.1. Obtención de información etnobotánica, colecta e identificación taxonómica de la planta

El municipio de Ixmiquilpan, se encuentra localizado en la parte central poniente del Estado de Hidalgo, la cabecera municipal está situada geográficamente entre los paralelos 20° 22' y 20° 34' de latitud norte y 98° 04' y 98° 21' de longitud oeste con respecto al meridiano de Greenwich. El territorio municipal, limita al norte con los municipios de Zimapán y de Nicolás Flores; al sur con Chilcuautla y una pequeña porción del municipio de San Salvador; al oriente con Cardonal y Santiago de Anaya y al occidente con los municipios de Alfajayucan, Tasquillo y parte de Zimapán. Su territorio, comprende 559.87 kilómetros cuadrados que corresponden a 2.69 % del Estado. Ixmiquilpan, está situada a una altitud de 1730 m sobre el nivel del mar. Ixmiquilpan, como todos los municipios del Estado y del país, está dividido en pueblos y a su vez se subdividen en colonias o "manzanas", la división de los pueblos en la actualidad se basa en forma administrativa y política sumando 110 comunidades.

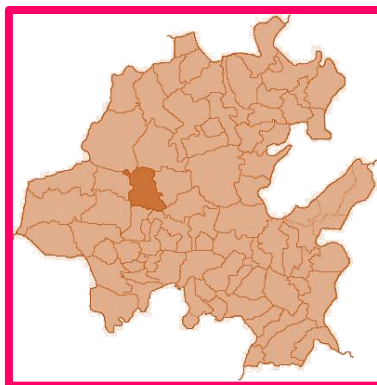


Fig.15 Ubicación de la zona de colecta, Ixmiquilpan, Estado de Hidalgo.

Los pueblos son los siguientes: Hacia el Norte: San Nicolás, Remedios, San Juanico, Orizabita, Nequetejé, El Espíritu, El Defai, Gundhó, Lagunita y La Pechuga. Hacia el Sur: El Alberto, Maguey Blanco, El Meye y Panales. Al Oriente: Dios Padre, El Tephé, Pueblo Nuevo, Capula, El Nith, Julián Villagrán y Bagandhó. Al Poniente: El Pueblo de López Rayón, antiguamente conocido como Tamaleras, El Mandhó, El Barrio de Progreso o de la Otra Banda. Considerado el crecimiento urbano del asentamiento de la población, los Barrios de la Reforma, antiguamente La Canoa, el de San Antonio y el Cortijo que comprende el Fitzhi y Jesús Barrio, forman parte de la cabecera municipal.

El río Tula, que nace en la presa Endhó del municipio de Tula de Allende, cruza Ixmiquilpan de Sur a Noroeste, pasando escasos metros del centro de la población. El clima de la cabecera municipal es templado con un promedio de 17.7 grados media anual de temperatura y un promedio pluvial de 470 milímetros anuales. La carretera nacional México Laredo, atraviesa el municipio de Oriente al Oeste; desde el kilómetro 146 por el Pueblo de Julián Villagrán hasta el kilómetro 167 en el Pueblo de López Rayón (<http://www.hidalguia.com.mx/ixmiquilpan/1/index.htm>)

Se eligieron y colectaron plantas de *K. daigremontiana* con sus hojas, tallos, flores y botones todos estos ejemplares saludables, y libres de cualquier plaga o contaminantes y en buenas condiciones para su futuro estudio.

Se tomaron dos ejemplares ya sanitizados y se colocaron sobre papel periódico, y se dejaron secar a temperatura ambiente por un periodo de un mes. Estos ejemplares fueron llevados al Instituto de Biología, en el Herbario de la UNAM, así fué como el especialista corroboró género y especie.

El resto se procedió a seleccionar y cortar únicamente las hojas del *K. daigremontiana*. El total de hojas colectadas fue de 3.14 Kg.

Para llevar a cabo la desecación primeramente se sanitizó el material biológico con una solución al 0.1 N de NaClO (Hipoclorito de sodio) en agua, se retiró el exceso de esta solución, y después se extendió en 3 charolas aproximadamente de 1 metro de longitud y se secó en estufa al vacío con una presión de 1 atmósfera y 45 °C de temperatura por 3 días, cada día se movía el material de estudio para garantizar un secado uniforme.

## 4.2 Técnica de extracción por Maceración.

La maceración es un proceso de extracción sólido – líquido, donde la materia prima posee una serie de compuestos solubles en el líquido de extracción que son los que se pretende extraer. El proceso de maceración genera dos productos que pueden ser empleados dependiendo de las necesidades de uso, el sólido ausente de esencias o el propio extracto.

La naturaleza de los compuestos extraídos depende de la materia prima empleada, así como el líquido de extracción (Ferraroli's, 1975).

Existen dos métodos de maceración de acuerdo a la temperatura, Caliente y Frío.

### Maceración en Frío.

Consiste en sumergir el producto a macerar en un recipiente con la cantidad suficiente de solvente, para cubrir totalmente lo que se desea macerar. Esto se lleva a cabo por un tiempo dependiendo de la materia prima que se vaya a macerar. Las ventajas de la maceración en frío, son que se usan equipos muy simples, que requieren mínimas cantidades de energía y en la capacidad de extraer la mayoría de las propiedades de lo que se macera (dependiendo del solvente), prácticamente sin alterarla por efectos de temperatura, pero se necesitan tiempos extensos para lograr una extracción adecuada ([www.Fisicoquimicadelamaceración.pdf](http://www.Fisicoquimicadelamaceración.pdf),2016).

La velocidad y eficiencia de la extracción es afectada por diversos factores, principalmente los que tienen relación directa con la solubilidad de los componentes que se desean extraer.

Los factores son: Temperatura, concentración, el solvente, tamaño de las partículas, porosidad y agitación.

### Maceración en Calor.

Al aumentar la temperatura, se aumenta la velocidad de interacción entre las moléculas porque la solubilidad es mayor, la temperatura máxima para cada sistema, está limitada por el punto de ebullición del solvente, el punto de degradación del producto, la solubilidad de impurezas y la economía ([www.Fisicoquimicadelamaceración.pdf](http://www.Fisicoquimicadelamaceración.pdf),2016).

La concentración del solvente es importante para soluciones acuosas, debido a la saturación y a la existencia de reacciones químicas, sin embargo es de poca importancia cuando la extracción es controlada por difusión. La reducción de partículas tiene gran importancia, porque aumenta el área de contacto y disminuye el tiempo necesario para la extracción, sobre todo para sólidos de baja porosidad; por otra parte la porosidad permite que el líquido penetre a través de los canales formados por los poros hechos dentro del sólido, aumentando así el área activa para la extracción ([www.Fisicoquimicadelamaceración.pdf](http://www.Fisicoquimicadelamaceración.pdf),2016).

Finalmente la agitación otorga una mayor eficiencia en la extracción debido a que disminuye la resistencia a la difusión, eliminando la película de fluido que cubre la superficie del sólido en reposo. ([www.Fisicoquimicadelamaceración.pdf](http://www.Fisicoquimicadelamaceración.pdf),2016).

#### **Obtención del extracto acuoetanólico de Aranto.**

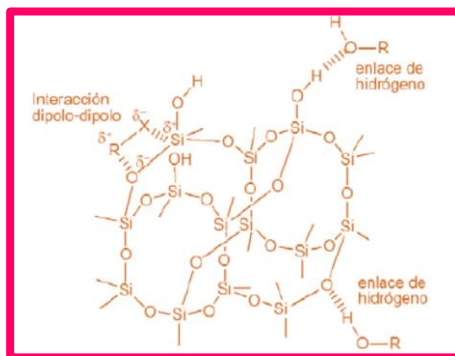
Una vez seco el material, se procedió a molerlo para obtener polvo, de lo que resultó 591.6 g de polvo de Aranto, posteriormente se tamizó en malla 80 y 100 garantizando así, un tamaño de partícula de 0.0070 a 0.0059 mm, después se almacenaron en bolsas de plástico en un lugar oscuro y a temperatura ambiente para abastecer la experimentación.

Para llevar a cabo la extracción se usó el método de maceración en frío y como primer paso se pesaron 10 g de muestra del polvo y 200 ml del solvente acuoetanólico en una proporción 3:1 es decir etanol (150 ml) y / agua (50 ml) y se dejó 24 h en agitación, después se llevó a centrifugación a 1750 rpm durante 5 min, se filtró para obtener el sobrenadante y al precipitado se le repitió el procedimiento de maceración por triplicado. El sobrenadante que se obtuvo se llevó a concentrar en un rota vapor a 40 rpm en baño maría a 35 °C.

Posteriormente se concentró a sequedad en una estufa al vacío a una temperatura de 30 °C y presión de 15 lb. Al finalizar se pesó el producto (es un residuo café oscuro) para calcular el rendimiento y almacenar a temperatura de refrigeración (4 °C) y en frascos para su posterior uso.

#### **4.3 Técnica por Cromatografía Preparativa.**

Los dos adsorbentes (fase estacionaria), más ampliamente utilizados son: gel de sílice ( $\text{SiO}_2$ ) y la alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) ambas de carácter polar. La alumina anhidra es el más activo de los dos, es decir es el que retiene con más fuerza a los compuestos: por ello se utiliza para separar compuestos relativamente apolares. El gel de sílice, por el contrario, se utiliza para separar sustancias más polares. El proceso de adsorción se debe a interacciones intermoleculares de tipo dipolo – dipolo, o enlaces de Hidrogeno entre el soluto y el adsorbente. El adsorbente debe ser inerte con las sustancias a analizar y no actuar como catalizador en reacciones de descomposición (<https://www.uam.es/docencia/jppid/documentos/practicas/actuales/guion-p6.pdf>).



**Fig.16 Representación esquemática de interacciones entre sílice y algunos grupos funcionales tomado de (<https://www.uam.es/docencia/jppid/documentos/practicas/actuales/guion-p6.pdf>).**

Una buena cromatografía con fases móviles interactivas, requiere un equilibrio adecuado entre las fuerzas intermoleculares existentes entre los tres participantes activos en el proceso de la separación (el soluto, la fase móvil, la fase estacionaria).

El orden de elución de un compuesto se incrementó al aumentar la polaridad de la fase móvil o eluyente. Este puede ser un disolvente único o dos miscibles de distinta polaridad. En el siguiente recuadro se describe por orden creciente de fuerza eluyente los disolventes más comúnmente empleados (<https://www.uam.es/docencia/jppid/documentos/practicas/actuales/guion-p6.pdf>).

**Hexano < tetraclorometano < cloroformo < diclorometano < acetato de etilo < acetona < 2-propanol < metanol < agua**

En general, estos disolventes se caracterizan por tener bajos puntos de ebullición y viscosidad, lo que les permite moverse con rapidez. Raramente se emplea un disolvente más polar que el metanol. Usualmente se emplea una mezcla de dos disolventes en proporción variable; la polaridad de la mezcla será el valor promediado en función de la cantidad de cada disolvente empleada. El eluyente idóneo para cada caso ha de encontrarse por "el método del ensayo y del error".

El mejor método sería; si las polaridades del soluto y de la fase móvil son parecidas pero difieren mucho con respecto a la fase estacionaria a menudo no puede competir efectivamente por los componentes de la muestra y los tiempos de retención son demasiado cortos (<https://www.uam.es/docencia/jppid/documentos/practicas/actuales/guion-p6.pdf>).

**Separación por Cromatografía Preparativa con los solventes: Hexano, Acetato de Etilo, Diclorometano, Etanol/Agua.**

- 1) Se lavó el equipo de Cromatografía Preparativa (SEPACORE), se pasó el disolvente de interés (Hexano), el solvente que está contenido en el matraz de alimentación primeramente pasó por la bomba, después por la columna que es de sílice gel (RP-18 Fase reversa) hasta que quedó totalmente impregnada del disolvente, así finalmente terminó en desechos.
- 2) Una vez limpio el equipo, se prendió la bomba, se fijó un flujo (2.5 ml/min), se encendió el controlador y se fijó la presión a 19.9 bar y  $\lambda = 298$  nm.
- 3) Se Encendió el colector de fracciones, y se programó el volumen y la separación de fracciones por picos de colección.

- 4) La muestra se preparó de la siguiente manera: Se pesaron 0.5 g de muestra (residuo café oscuro), se preparó una mezcla 3:1 etanol /agua y se resuspendió la muestra en ésta.
- 5) Se Inyectó la solución ya preparada (3 ml) al equipo.
- 6) Se hizo pasar el solvente (Hexano) a través de la bomba de alimentación en las condiciones establecidas anteriormente, en el selector de longitud de onda, después en la columna de separación y finalmente por el colector de fracciones.
- 7) Se Observó que hay diferencia e incluso ausencia de color en el solvente recolectado en los tubos de acuerdo con las diferentes fracciones obtenidas.
- 8) Una vez obtenidas las fracciones se realizó un barrido de longitud de onda y se agruparon de acuerdo con gráficas similares (corroborando que sea una misma fracción).
- 9) Finalmente se concentró en un rotavapor a 40 rpm en baño maría a 35 °C, cada fracción obtenida.
- 10) Las muestras se colectaron en viales y se pesó el producto (fue del orden de miligramos).

NOTA: Los solventes que se utilizaron fueron: **Hexano, Acetato de Etilo, Diclorometano, Etanol/Agua**, esto de acuerdo con su polaridad creciente, este proceso se realizó para cada uno de los solventes a partir del paso 2.

#### **4.4 Técnicas de Caracterización para el fitofármaco**

La caracterización es necesaria y de suma importancia para poder adecuar la formulación de una aplicación terapéutica específica. Para lo cual fue necesario realizar: la identificación de compuestos químicos y grupos funcionales por diferentes técnicas complementarias, así como el tamaño y la distribución granulométrica, la morfología, las propiedades de superficie, la eficiencia de encapsulación, el contenido del principio activo en la nanopartícula y el perfil de liberación del fármaco encapsulado.

##### **4.4.1. Identificación de grupos funcionales por la Técnica de UV-Vis.**

La absorción de radiación UV o visible corresponde a la excitación de los electrones externos. La absorción de radiación ultravioleta y visible en las moléculas orgánicas está restringida a ciertos grupos funcionales (cromóforos) que contienen electrones de valencia de baja energía de excitación. El espectro de una molécula que contiene estos cromóforos es complejo. Esto es debido a la superposición de transiciones rotacionales y vibracionales en las transiciones electrónicas que da una combinación de líneas sobrepuestas. Esto da como resultado una banda de absorción continua. Muchas moléculas absorben radiación a longitudes de onda diferentes. Un espectro de absorción mostrará un número de bandas de absorción correspondientes a grupos estructurales que están dentro de la molécula (Amézquita et. al, 2008).

#### **4.4.2. Barrido en UV-Vis de las diferentes fracciones obtenidas con los solventes propuestos**

El equipo a usar para realizar el corrimiento de las muestras fue ELISA, y se seleccionó un intervalo de barrido de longitud de onda desde: 200 – 950 nm.

En una placa de 96 pozos se colocaron 100 µl en cada pozo de cada uno de los tubos que se obtuvo del equipo de cromatografía (SEPACORE) y se realizó el barrido; así es como se generan diversos picos con diferentes longitudes de onda cada uno con su respectiva absorbancia a determinada longitud de onda en un mismo gráfico.

Por cada pozo, existe una muestra, y genera un gráfico de tal forma que en el análisis de resultados se observará cada gráfico, que si resulta similar entre dos gráficos significa que es una misma fracción, de lo contrario ha existido una separación y por lo tanto hay distintas fracciones.

Este procedimiento se realizó para cada uno de los solventes que han sido propuestos.

#### **4.4.3. Identificación de grupos funcionales por la Técnica de FTIR.**

La eficacia de la espectroscopia de infrarrojo se basa en que cada compuesto tiene un comportamiento único frente a un haz de infrarrojos. Esta técnica detecta la presencia o no de un determinado compuesto, en una mezcla o en una muestra pura, puede hacer la caracterización de un compuesto nuevo o llevar a cabo el seguimiento de la evolución de una síntesis (señales huella): señales elegidas para que informen inequívocamente sobre el compuesto objeto de análisis (Técnicas Espectroscópicas, María Font).

Los movimientos vibracionales de los componentes de un enlace químico tienen frecuencias naturales dentro del rango de frecuencias del infrarrojo. Las oscilaciones inducidas por ciertos modos vibracionales pueden provocar que cuando un haz de radiación infrarroja incide sobre la materia, si las frecuencias están en resonancia, se produzca un intercambio de energía entre el haz y las moléculas constituyentes. Los tipos atómicos implicados en el enlace, el entorno químico de dicho enlace y la concentración de los enlaces presentes, tienen un comportamiento característico. Prácticamente todos los compuestos moleculares pueden manifestar una serie de bandas de absorción (eficacia en espectroscopia). Cada banda corresponde con un movimiento de vibración de un enlace en concreto dentro de la molécula: el conjunto constituye la huella dactilar del compuesto (Técnicas Espectroscópicas, María Font).

#### **Identificación de los grupos funcionales presentes en la fracción con mayor efecto citotóxico positivo obtenida del extracto acuotánico del Aranto por la Técnica de FTIR.**

Se tomó un botón de la fracción en polvo y se realizó un escaneo para analizarla por la técnica de FT-IR (Spectrum One, FT-IR, Perkin Elmer), desde 4000 hasta 600 cm<sup>-1</sup>, de la fracción con mayor efecto citotóxico positivo del extracto acuotánico, y también al extracto en crudo, para realizar alguna posible identificación de las principales familias de compuestos químicos, presentes en dicha fracción, el análisis se realizó mediante el software Essential FT –IR v 1.50.

#### 4.4.4 Identificación de compuestos químicos por la Técnica de HPLC.

La cromatografía líquida (HPLC), es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla. Consiste en una fase estacionaria (columna) y una fase móvil. La fase estacionaria es sílica. La fase móvil actúa de portador de la muestra. La muestra en solución es inyectada en la fase móvil. Los componentes de la solución emigran de acuerdo a las interacciones no-covalentes de los compuestos con la columna. Estas interacciones químicas, determinan la separación de los contenidos en la muestra. La utilización de los diferentes detectores dependerá de la naturaleza de los compuestos a determinar (<http://www.ucm.es/>).

#### 4.4.5. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Primeramente se preparó una mezcla de etanol: agua (3:1) con volumen final de 2ml, y se pesó 5mg de la fracción de *K. daigremontiana*, de esta forma se resuspendió la fracción en la mezcla del disolvente. Para la solución estándar se pesó 2mg del bufalin y se disolvió en 2 ml de la mezcla etanol: agua (3:1), se filtró con una membrana de tamaño de poro 0.22  $\mu\text{m}$  y se colocaron en un vial cada solución finalmente se almacenó a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Se inyectaron 5  $\mu\text{l}$  de la solución preparada en el sistema HPLC.

Las condiciones Cromatográficas del equipo HPLC fueron las siguientes:

- Columna Cromatográfica Zorbax C 18 (4.6 x 100 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ )
- Preparar una solución al 0.3 % ácido acético y agua mQ.
- Preparar solución (se pesó la Fracción y adicionar 2ml de etanol 3:1), filtrar la fase móvil tres veces con un filtro millipore con un tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  y colocar en un vial con una jeringa, (Min Ye et. al., 2006; Jianfeng Xing et. al., 2012).

#### Cultivo Celular

Se utilizó la línea celular tumoral de adenocarcinoma mamario MDA-MB-231, ATCC HTB – 26 y la línea celular epitelial no tumorigénica MCF10A, ATCC CRL-10317 proporcionadas por la ENMyH y las líneas celulares se manejaron en condiciones estériles, en campana de flujo laminar, usando material y soluciones estériles. La línea celular tumoral MDA-MB-231 se cultivó en medio DMEM (Dubelco's Modified Eagle Medium, Gibco), suplementado con 5% de suero fetal bovino (Invitrogen).

Mientras que la línea MCF10A se cultivó en medio DMEM-F12, suplementado con 10% de suero fetal bovino, además de EGF (100mg/ml, Sigma), Insulina (100 mg/ml, Sigma) e Hidrocortisona (1 mg/ml, Sigma). La incubación se realizó en una incubadora a  $37^{\circ}\text{C}$ , en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% y en condiciones de humedad constante (Estanislao, et al., 2010).

#### 4.5 Ensayos de viabilidad

##### Ensayo de MTT

Para llevar a cabo la evaluación del porcentaje de citotoxicidad inducida por las fracciones del extracto acuotánico se realizó la técnica colorimétrica MTT. Y a su vez de esta forma se seleccionó las fracciones del extracto que dieron un efecto citotóxico positivo. El fundamento de esta técnica

se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo) 2,5 difeniltetrazol (MTT, compuesto de coloración amarilla); esta reacción es realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa para tener como producto las sales de formazán (color azul), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. El anillo de tetrazolio es reducido en la mitocondria activa, así la reacción ocurre sólo en células vivas, ya que las células muertas son incapaces de reducir el MTT después de 30 min. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular, además de tener un valor para la medición rápida y cuantitativa de muerte celular (Estanislao, et al., 2010). La cantidad del formazán producido se puede determinar una vez que el formazán es disuelto. El formazán producido se disuelve completamente en dimetilsulfóxido (DMSO), el cual es el disolvente más conveniente y más usado para el ensayo, el compuesto colorido absorbe a una longitud de onda de 540 nm. La cantidad de células viables es directamente proporcional a dicha absorbancia, la cual es estable durante 2 h (Estanislao, et al., 2010).

#### **4.5.1. Evaluación de las fracciones del extracto acuotánico de Aranto por la técnica MTT.**

Con este procedimiento se evaluó el efecto de las fracciones del extracto acuotánico tanto en el cultivo de la línea celular tumoral MDA-MB-231, así como en la línea epitelial MCF10A. Las células se resuspendieron en medio (DMEM y DMEM F12) respectivamente y se realizó un conteo celular para sembrar 7000 células en cada pozo de una microplaca de 96 pozos, e incubar a 37 °C durante 24 h, al 5% de CO<sub>2</sub> y humedad. Posteriormente las células se trataron con los controles y el problema. Como controles negativos se sembraron las células sin tratamiento y DMSO 0.2%; como control positivo se utilizó 0.25 µg/ml de Taxol y estándar de bufadienolido; y como problema se utilizaran diferentes concentraciones de las fracciones del resultado de los 4 solventes propuestos (25, 50, 100, 200 µg/ml) a tiempos de 24, 48 y 72 h. Al cabo de este tiempo se adicionó el MTT (5 mg/ml, Sigma) y se dejó incubar por 90 min a 37 °C en oscuridad. Una vez terminado el tiempo de incubación se eliminó el sobrenadante de las placas, posteriormente se agregaron 100 µl de DMSO y se realizó la lectura en el equipo de ELISA (Labsystem Multiskan Ms) a 570 nm y se calculó la viabilidad (%) (Estanislao, et al., 2010).

$$\text{Viabilidad (\%)} = (\text{D. O. Problema} / \text{D. O. del testigo}) \times 100$$

Posteriormente mediante el programa GraphPad Prims5.0 se realizó una regresión no lineal entre el porcentaje de supervivencia y el Log de la concentración, para calcular el valor del IC<sub>50</sub>. Al término de estas pruebas se eligió la fracción que tuvo el mayor efecto citotóxico positivo sobre las células, para realizar su nanoencapsulación.

#### **4.6 Técnica de Spray dryer para la elaboración de partículas.**

El secado por pulverización (Spray dryer) es un método establecido que se inicia por atomización / pulverización de una suspensión, el resultado son gotitas seguido por un proceso de secado, lo que resulta en la producción de partículas sólidas (K. Masters, 1991). Es un secado eficiente debido a la gran superficie disponible para la transferencia de calor y masa, como resultado de la atomización del líquido en gotitas muy pequeñas del orden de decenas a cientos de micrómetros (M. Fareed,



2003). El secado por pulverización se utiliza con éxito en la industria farmacéutica para producir productos con propiedades físicas y químicas definidas. En la elaboración de la tecnología de alimentos, los métodos de secado son ampliamente utilizados en la industria manufacturera. En el procesamiento de materiales, el secado por pulverización se ha usado para producir partículas de polvo submicrométricas, estas partículas de tamaño micrométrico de metales, semiconductores y óxidos con una forma esférica, no aglomerada y casi monodispersa, con un tamaño de partícula controlado (K. Okuyama et al. 2003). La formación de nanopartículas dispersas individualmente derivados de soles coloidales a través de secado por pulverización a baja presión se ha investigado recientemente (Wang et al. 2005). Polvos con partículas esféricas son de importancia práctica, ya que, en general, tienen mejores propiedades reológicas que los polvos con partículas irregulares (P.Luo et al. 1995). Con el fin de generar gotitas, la alimentación líquida puede ser atomizada por los discos rotatorios, boquillas de dos fluidos o nebulizadores ultrasónicos, dependiendo del tamaño de la gota que se requiera. Las gotitas se pulverizan en una cámara de secado se calienta a una temperatura del disolvente usando un vehículo. El tiempo necesario para secar las gotitas depende del tiempo de residencia de la gotita en la fase gaseosa, la cual, a su vez, está determinada por la geometría de la cámara, las tasas de flujo de gas portador, la temperatura y la presión. La recogida de polvo se puede lograr utilizando un ciclón, filtro de bolsa. Debido a su simplicidad y el procesamiento rápido, el secado por pulverización tiene un gran potencial para el diseño de nuevos materiales. Durante el proceso, la temperatura de pulverización no es generalmente muy alta y el tiempo de residencia de la gotita / partículas es muy corto, de modo que, después de la pulverización, las propiedades inherentes de las nanopartículas no cambian apreciablemente. Por ejemplo, cuando se utiliza agua como el medio de dispersión, una temperatura de funcionamiento de alrededor de 150 ° C es suficiente para secar completamente las gotitas dentro de unos pocos segundos. Además, aunque la temperatura del aire para el secado puede ser relativamente alta, la temperatura real de las gotitas de evaporación es significativamente inferior, debido al enfriamiento, como resultado del calor latente de vaporización. Durante la pulverización, la humedad evaporada forma una cubierta alrededor de las gotitas, que absorbe la mayoría del calor. Generalmente, la temperatura media de la gotita es de 15 - 20 ° C por debajo de la temperatura del medio ambiente circundante. Por lo tanto, el secado por pulverización también es ventajoso para la producción de tamaño micrométrico de bajo punto de fusión así como materiales tales como lípidos, que son muy importantes para la producción de partículas y que son normalmente utilizados en la administración de fármacos (J. Broadhead et al, 1992).

### **Técnica de Nano Spray Dryer para la elaboración de nanopartículas.**

La técnica de secado por pulverización por Nano spray Dryer utiliza un enfoque simple para la preparación de nanopartículas que implica la pulverización, la evaporación de la solución de fármaco, y la colección de las partículas del fármaco; por esta razón numerosos fármacos son candidatos viables para la preparación de nanopartículas utilizando esta técnica. Es difícil preparar partículas menores de 2 micras utilizando técnicas convencionales de secado por pulverización, y también es difícil de recoger las partículas más finas. En otras palabras, las partículas submicrométricas, es decir, nanopartículas, no se pueden producir usando secadores de pulverización convencionales. Recientemente, se ha desarrollado una avanzada tecnología de secado por pulverización, el Nano Spray Dryer, éste fue desarrollado por Büchi. La malla vibratoria

piezoeléctricamente conducida y el colector de partículas electrostático permiten la preparación exitosa y colección de las nanopartículas. Los diferentes tamaños de abertura de malla se pueden utilizar para crear diferentes tamaños de nanopartículas. Hasta la fecha, se han podido encapsular fármacos dando lugar a las nanopartículas poliméricas, también se han realizado las nanopartículas de proteínas, y esferas huecas de carbonato de litio ( $\text{Li}_2\text{CO}_3$ ) usadas en las baterías de litio todas estas se han preparado con éxito utilizando el Nano Spray Dryer (Koichi, et al., 2013).

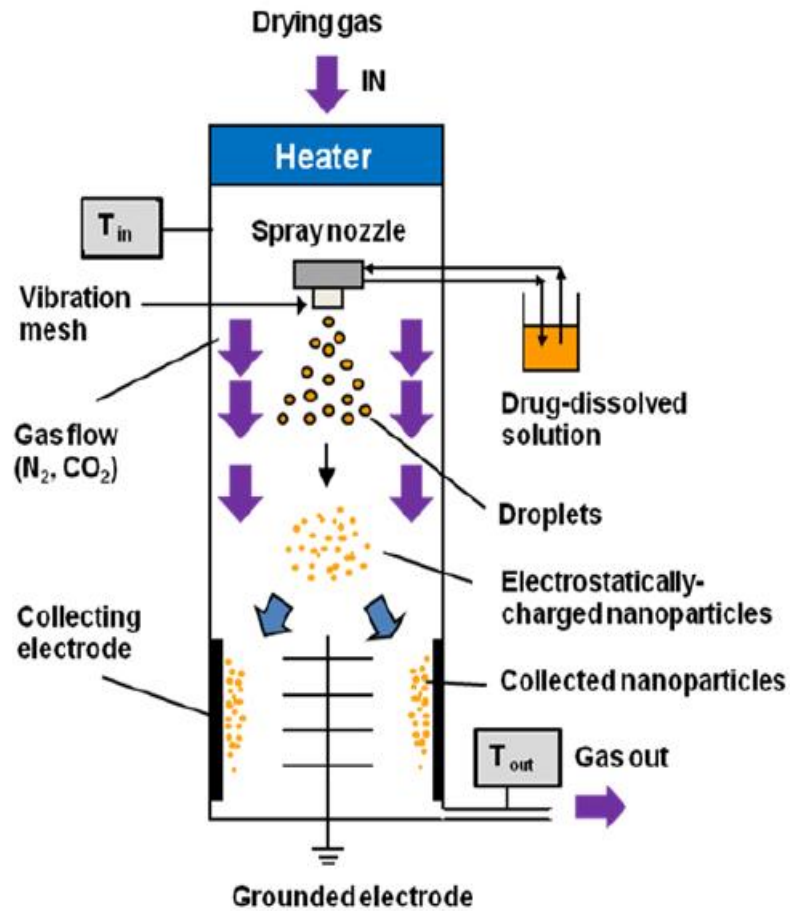


Fig 17. Representación Esquemática del Nano Spray Dryer.

#### 4.6.1. Método de encapsulación por Secado Nano Spray Dryer

1) Se Lavó el equipo; se pasó agua bidestilada del frasco de alimentación y paso por la bomba para finalmente terminar en desechos.

2) Una vez limpio el equipo (Spray Dryer B-90); se prendió la bomba y con la perilla se reguló el flujo (127 L CO<sub>2</sub>/min), se encendió el interruptor del panel de control, y se seleccionó heat y el botón pump en nivel 2 y 80 % de aspersion (spray), temperatura de entrada 60 °C, temperatura de salida 25 °C, temperatura del cabezal 58 °C y Presión de 39 mbar.

3) Se Preparó una solución al 0.5 % en la que el disolvente es acetona, y contiene PLGA como polímero y el extracto acuotánico de Aranto, ambos están en una proporción del 50% de sólidos totales.

4) Se Realizó un filtrado, con un tamaño de poro 0.22  $\mu\text{m}$ , y se dejó en agitación por 24h a temperatura de 4°C, después de las 24 h de agitación se volvió a filtrar con un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, y se mantuvo a Temperatura de 4°C.

5) Se pasó la solución problema a través de la bomba de alimentación en las condiciones establecidas del paso 2, se observó que haya presencia de muestra en el colector y se esperó aproximadamente 3 hrs.

6) Se Recuperó la muestra del colector y se pesó el producto.

7) Para finalizar se llevó a hacer análisis de microscopía por SEM y se observó la formación de nanocápsulas, así como su morfología y tamaño.

#### **4.6.2.- Caracterización de las nanocápsulas**

##### **4.6.2.1. Tamaño y morfología**

El tamaño de los nanosistemas debe ser evaluado mediante microscopia electrónica, la microscopia electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy –SEM), además del tamaño, permite estudiar la morfología de las nanopartículas. El análisis morfológico llevado a cabo por SEM permite además determinar la distribución del principio activo encapsulado, lo que posibilita una evaluación más detallada de la eficiencia de encapsulación y del comportamiento del fármaco en la superficie. (Rocha et al. 2009)

##### **Análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM).**

El tamaño y la morfología de las nanopartículas se determinaron por microscopía electrónica de barrido (SEM, JSM-6390LV, JEOL, Japón).

1) Se preparó la muestra para su análisis, se colocó la muestra sobre el soporte y se recubrió con plata durante 30 segundos, por un proceso de pulverización catódica de vacío (Desk IV, Denton vacuum, USA).

2) Se sacó la muestra (se hizo el recubrimiento para evitar que se cargue la muestra y poder hacer el análisis de SEM)

3) Se colocó la muestra en el soporte del microscopio, y se hizo un vacío, se fijó el voltaje para el cañón de electrones y también para la muestra (20 KV).

4) Se hizo incidir los electrones sobre la muestra penetrándola, en el detector se reciben electrones que salen de la muestra (electrones secundarios), formando así la imagen.

5) Se observó la morfología, y tamaño, de nanocápsulas. Las micrografías se realizaron en 5000 y 10 000 aumentos.

#### **4.6.2.2. Carga Superficial**

El potencial zeta proporciona información sobre la carga superficial de las nanopartículas, que condiciona las interacciones de las mismas membranas celulares. El potencial zeta puede determinarse mediante técnicas electroforéticas. La formación de agregados suele ocurrir cuando las fuerzas de Van der Waals son dominantes, lo que resulta en una reducción de los valores del potencial zeta y la pérdida de estabilidad del sistema. El potencial zeta también depende de las condiciones del medio de dispersión sobretodo de la concentración de electrolitos y del pH (Rocha et al. 2009).

#### **Análisis de carga superficial (Potencial Z)**

El tamaño de diámetro de las nanopartículas (nm), el índice de polidispersidad (PDI) y el potencial  $\zeta$  de las nanocápsulas de PLGA sintetizadas, se midieron mediante dispersión de luz dinámica (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Ltd., Malvern, modelo ZEN 3600, Reino Unido) a 25 ° C, y la carga superficial ( potencial zeta, mV ) se midió por la movilidad electroforética; se analizó en las celdas capilares con el mismo instrumento y bajo las mismas condiciones experimentales.

Se preparó una solución con nanocápsulas a una concentración de 1mg de polvo disuelto en 2ml de buffer de fosfatos (PBS) a un pH de 7 y 11. Las muestras antes de ser evaluadas fueron filtradas en disco millipore de 0.45  $\mu\text{m}$ .

#### **4.6.2.3. Eficiencia de encapsulación**

La eficiencia de encapsulación (%) es la relación entre la cantidad encapsulada del fármaco y la cantidad total del fármaco añadido en la preparación. El contenido en principio activo revela la cantidad real del fármaco encapsulado por unidad de masa del polímero o de la mezcla polimérica empleada en la formulación. Los procedimientos para la determinación de la eficiencia de encapsulación y del contenido en principio activo dependerán del polímero utilizado y del fármaco encapsulado. En general, el contenido en principio activo se determina tras la disolución de las nanopartículas en un disolvente apropiado seguido de la ultracentrifugación o ultrafiltración de las mismas. El fármaco se cuantifica empleando distintos métodos dependiendo de la naturaleza del principio activo (espectrofotometría UV, HPLC, ELISA, etc.) (Govender, et al., 1999).

#### **4.6.2.4. Liberación in Vitro**

La liberación del fármaco a partir de un sistema polimérico nanoparticulado depende de diversos factores: 1) desorción del fármaco de la superficie de las nanopartículas; 2) difusión del fármaco a través de la matriz polimérica de las nanoesferas; 3) difusión a través de la pared polimérica de las nanocápsulas; 4) erosión de la matriz polimérica; y 5) combinación de los procesos de difusión y erosión. Las propiedades de liberación y los mecanismos implicados están basados en el coeficiente de difusión del fármaco y en la velocidad de biodegradación del polímero. La difusión en bolsas de diálisis y la separación basada en ultracentrifugación o filtración a presión reducida han sido utilizadas para la determinación del perfil de liberación de fármacos a partir de nanopartículas. Las

nanocápsulas y las nanoesferas presentan distintos perfiles de liberación debido a la naturaleza del compartimento donde el fármaco está encapsulado (vesicular o matricial). Las nanoesferas encapsulan el principio activo en el interior de la matriz polimérica, lo que produce una distribución uniforme del fármaco, por lo que la liberación desde dicha matriz ocurre mediante la combinación de los procesos de difusión y erosión. Si la difusión ocurre más rápidamente que la degradación de la nanoesfera, el proceso de liberación del fármaco es difusión dependiente. En caso contrario, la degradación es altamente influyente en el perfil de la liberación.

En primer lugar, se produce la liberación rápida del fármaco adsorbido en la superficie de la nanopartícula (efecto *burst*) seguido de la liberación más lenta del fármaco atrapado en el interior de las mismas. En general, los sistemas matriciales presentan una cinética de liberación de primer orden. En las nanocápsulas, en cambio, el fármaco contenido en el núcleo debe difundir a través de la pared polimérica. La morfología vesicular de este tipo de nanopartículas es responsable de una cinética de liberación de orden cero. En general, los estudios de liberación de fármacos a partir de nanopartículas son complicados debido al tamaño nanométrico de dichos sistemas, lo que dificulta la separación de las nanopartículas del medio de liberación. La concentración del fármaco en dicho medio se determina a lo largo del tiempo y utilizando el método más adecuado en cada caso y que dependerá de la molécula encapsulada (Gref, et al., 2006).

#### **Análisis liberación de fármaco *in vitro* por la técnica de ELISA.**

Para el análisis de liberación *in vitro*, las nanocápsulas cargadas con fármacos, "Taxol, estándar (bufalin), extracto acuotético de *K.daigremontiana* y fracción de *K.daigremontiana*," (2 - 3mg) se reconstituyó en PBS (5 ml, pH 7.4) y se transfirió a bolsas de diálisis (MWCO: 3.500 Da) con 10 ml de PBS con agitación a 110 rpm 37 °C. A intervalos apropiados, la solución tampón se reemplazó con PBS fresco, y la concentración del taxol, estándar (bufalin), extracto acuotético de *K.daigremontiana* y fracción de *K.daigremontiana*," liberado en el PBS eliminado se determinó usando una curva de calibración en la longitud de onda donde se observó su absorbancia máxima de cada uno al cuantificar en un espectrofotómetro UV-Visible a  $\lambda$  de 950 nm. Después, las proporciones acumulativas del Taxol, estándar (bufalin), extracto acuotético de *K.daigremontiana* y fracción de *K.daigremontiana*, liberado se calcularon con una función del tiempo para cada generada por sus datos experimentales.

#### **4.6.2.5. Análisis de eficiencia de encapsulación, de fármaco *in vitro* por la técnica de ELISA.**

Para el análisis de eficiencia de encapsulación, las nanocápsulas cargadas con fármacos, "*K.daigremontiana*" (2 – 3 mg), Taxol y estándar de bufadienólidos (0 – 10  $\mu$ g), y se reconstituyeron en 2 ml de acetona, para extraer el fármaco o fitofármaco, y estimar el contenido de carga y encapsulación.

Las muestras en acetona se agitaron suavemente con un agitador, por 12 h a temperatura ambiente y 36 h a 4 °C. Estas soluciones fueron centrifugadas a 14000 rpm y el sobrenadante fue colectado.

La suspensión (20  $\mu$ l) fue diluida con 1 ml de acetona. Y las concentraciones fueron determinadas por UV – VIS a 450 nm.

La eficiencia de encapsulación de las nanocápsulas se calculó mediante la siguiente ecuación. La eficiencia de encapsulación (EE)

$$EE (\%) = (A / B) * 100$$

Para calcular el contenido de la carga de fármaco en las nanocápsulas (LC)

$$LC (\%) = (A/C)*100$$

Donde A representa la cantidad de fármaco que se obtiene de las nanocápsulas, B es la cantidad inicial de fármaco que se pone en el sistema *in vitro* y C es el peso de las nanocápsulas.

La liberación de fármaco en las nanocápsulas se calculó con la siguiente ecuación:

$$m_{t-act} = (C_t + v / V \sum C_t)V$$

Donde  $m_{t-act}$  es la cantidad real de los medicamentos lanzados en el tiempo t,  $c_t$  es la concentración del fármaco en el líquido de liberación en el tiempo t medido por ELISA, v es el volumen de muestras recogidas en un intervalo de tiempo predeterminado, y V es el volumen total de fluido de liberación (H. Wang et al., 2011; W. Tao et al., 2013).

# 5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS



## 1.1. Identificación Taxonómica

La identificación taxonómica fue realizada por el Instituto de Biología de la UNAM, quien clasificó a la planta perteneciente a la Familia Crassulaceae y especie *Kalanchoe daigremontiana* (Figura 18).



Fig. 18 Identificación Taxonómica de *Kalanchoe daigremontiana* (Raym – Houmet and H. Perrier).



Se realizó una entrevista al azar, a la población del municipio de Ixmiquilpan, en el estado de Hidalgo, para saber el uso que se le da a la planta en estudio, lo que se preguntó fué lo siguiente:

- Nombre común de la planta: Aranto o Lagarto
- Parte de la planta que utilizan: Tallo, flor, hojas.
- Padecimiento para el cual utilizan la planta: Cáncer
- Forma y cantidad de preparación de la planta para su uso: en forma de té, (un puñado de la planta seca en 2 litros de agua, a ebullición y tomar)
- Época de colecta de la planta: Noviembre – Diciembre.
- Número de colectas: 3

### Obtención del *K.daigremontiana* y extracto acuotanólico por Maceración en Frío.

Una vez que se obtuvieron los ejemplares del *K. daigremontiana* se procedió a moler la planta y obtener los extractos con los diferentes disolventes, por la técnica de maceración en Frío, con la metodología anteriormente citada; posteriormente se eligió el extracto acuotanólico ya que en investigaciones preliminares, éste extracto fué el que presentó un mejor efecto citotóxico en línea celular MDA-MB-231, se procedió a calcular el rendimiento, con la siguiente fórmula:

$$\eta (\%) = (\text{masa seca} / \text{masa total}) * 100.$$

**Tabla 3. Rendimiento obtenido del extracto acuotanólico.**

Extracto Etanol/ agua (3:1)	Porcentaje de rendimiento
Muestra 1	16.082%
Muestra 2	12.822%
Muestra 3	17.019 %
Promedio	15.307%



**Fig.19 Extracción por maceración**



**Fig.20 Obtención del producto (Extracto acuotanólico de Aranto)**

## 5.2. Separación por Cromatografía Preparativa

### Inyección de la muestra

Solvente de inyección etanol: agua

A continuación se muestra la columna de silica, saturada con la muestra (extracto crudo acuoetanólico de Aranto) Fig. 21.

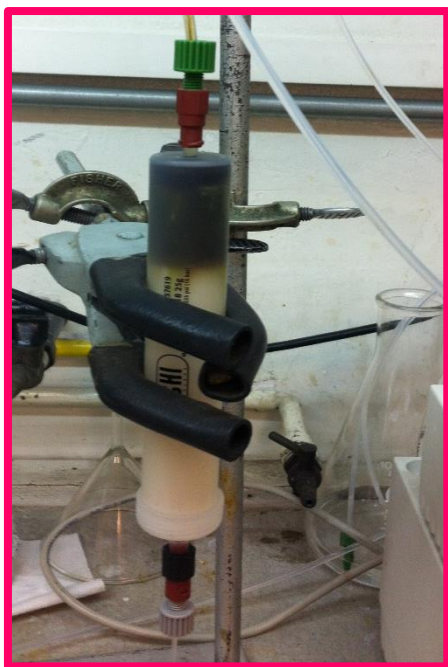
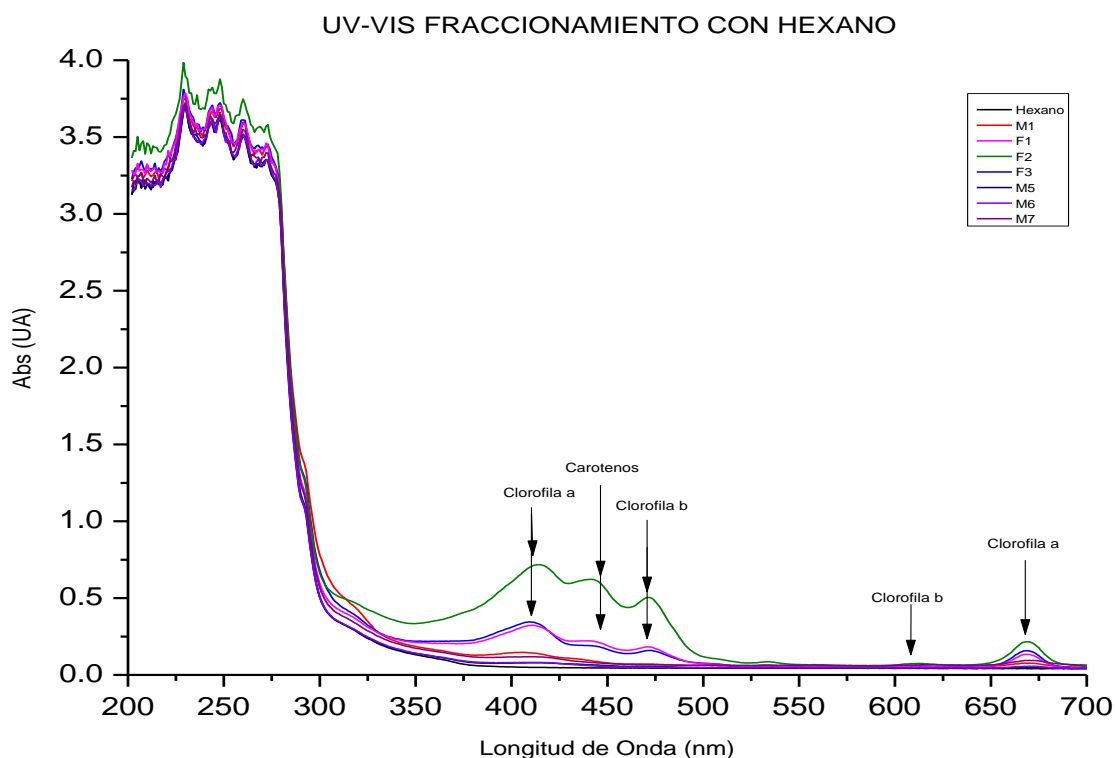


Fig.21 Inyección de la muestra (extracto acuoetanólico de Aranto).



Fig.22 Fraccionamiento con hexano.

### 5.2.1. Espectros UV-Vis de las Fracciones del extracto acuoetanólico del *K. daigremontiana*.



**Fig.23 Barrido por UV-Vis del extracto acuoetanólico de *K. daigremontiana* usando Hexano.**

Se puede observar según la gráfica que de las siete muestras (M) que genera el SEPACORE, solo se obtuvieron tres fracciones (F), existe fraccionamiento del extracto acuoetanólico usando el solvente Hexano cuyo índice de polaridad tiene un valor de 0.06, Fig.23. Teóricamente la clorofila a, absorbe en las regiones del rojo y del azul, los valores de absorción son en un intervalo de (400 – 450 nm y 680 – 700 nm). Se puede observar la expresión de estas señales en las Fracciones (F1, F2, y F3). Por otro lado la clorofila b, se presenta en un rango de (490-530 nm y 620 – 680 nm), haciéndose mas notoria en la F2, así mismo se podría sugerir la presencia de carotenos, ya que el segundo pico observado en las tres Fracciones se detectó en un intervalo de (428 – 461 nm) y este cae dentro del rango para diferentes carotenos, de acuerdo con la siguiente Tabla 4:

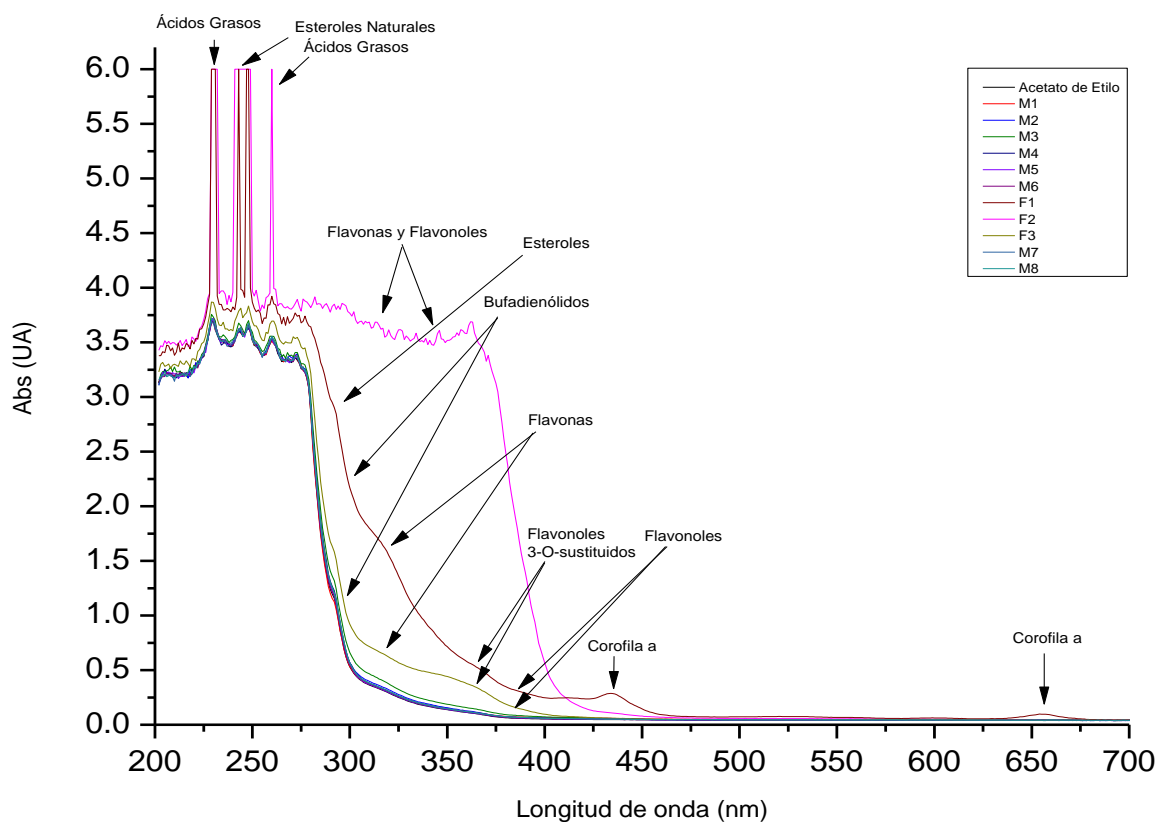
**Tabla 4. UV- Vis de Carotenos.**

Caroteno	n-Hexano (Longitud de onda en nm)
$\alpha$ - caroteno	422, 444, 473
$\beta$ - caroteno	425, 451, 482
$\gamma$ - caroteno	437, 462, 494
$\epsilon$ - caroteno	419, 444, 475



**Fig.24 Fraccionamiento con Acetato de Etilo**

**UV-VIS FRACCIONAMIENTO CON ACETATO DE ETILO**



**Fig.25 Barrido por UV-Vis del extracto acuoetanólico de *K. daigremontiana* usando Acetato de Etilo.**

El fraccionamiento realizado al extracto acuetanólico de *K. daigremontiana* utilizando el solvente acetato de etilo con un índice de polaridad de 4.3, el SEPACORE produjo once muestras (M), pero solo se obtuvieron tres fracciones (F) (Fig. 25). Interesantemente se puede apreciar que las tres

fracciones obtenidas presentan familias químicas similares; sin embargo en la F1 aún podemos encontrar presencia de clorofila a, a diferencia de las F2, y F3 en las que ya no se detecta, y en la F3 además no se aprecian ni ácidos grasos ni esteroides; mientras que el resto de las demás familias químicas se encuentran en las tres Fracciones aunque en diferentes concentraciones.

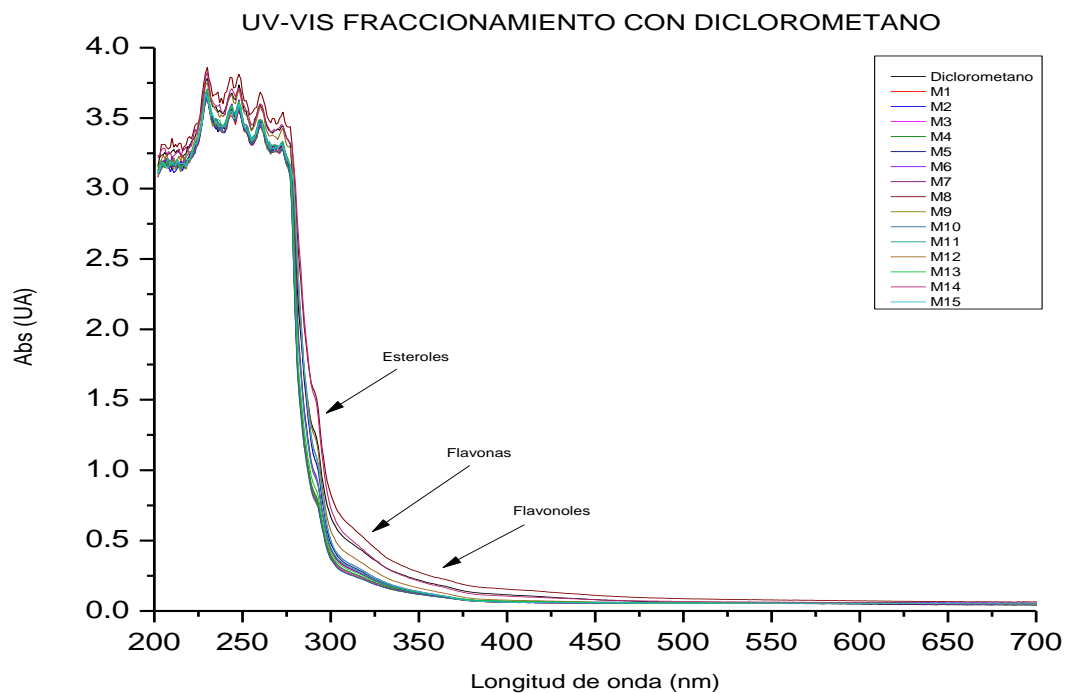
**Tabla 5. Principales familias químicas presentes en el fraccionamiento del extracto acuoetanólico de *K. daigremontiana* con Acetato de Etilo.**

Familia Química	Rango de absorción en (nm) Fig.5			Rango de absorción en (nm)
	F1	F2	F3	
Flavonas y Flavonoles		276-363		250 - 280 y 300 - 390
Flavonas	312-350	310-350	311-345	310 - 350
Flavonoles 3- O- sustituidos	330-360	330-360	330-360	330 - 360
Flavonoles	360-385	350-385	350-395	350 - 385
Bufadienólidos	296-300	296-300	296-300	296 - 300
Ácidos Grasos	229-231	231-270	-----	230 - 235 y 260 - 280
Esteroides	240,290	242-248	-----	240,270,280,290,310,325,340-360
Clorofila a	400-450	-----	-----	400 - 450 y 680 - 700



**Fig.26 Fraccionamiento con Diclorometano**

Ahora bien, al realizar el fraccionamiento pero ahora utilizando como disolvente el diclorometano con un índice de polaridad de 3.4, no se logró fraccionar más el extracto.

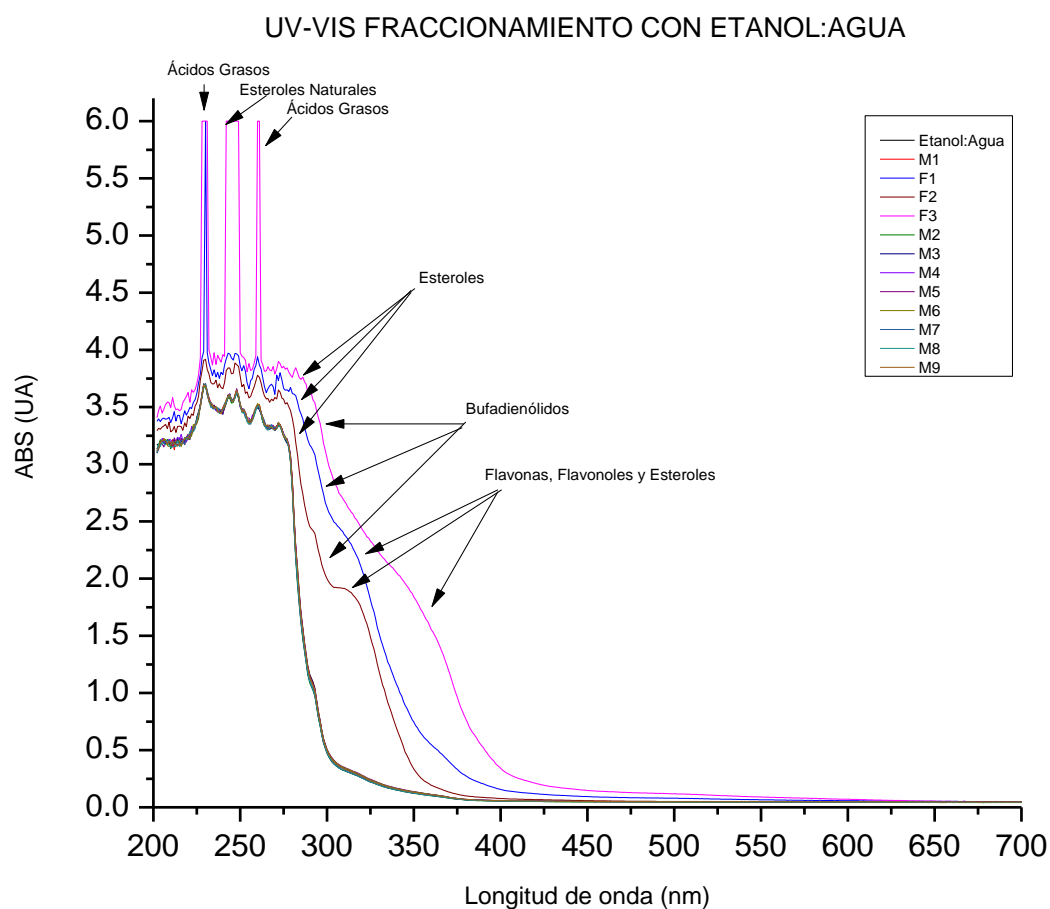


**Fig.27 Barrido por UV-Vis del extracto acuotanolico de *K. daigremontiana* usando Diclorometano.**

Se puede observar según la gráfica que de las quince muestras (M) que genera el SEPACORE, no se obtuvieron fracciones (F), la presencia en muy baja concentración de Esteroles a 290 nm, Flavonas en un rango de 310 – 350 nm, y Flavonoles entre 350 – 385 nm (Fig.27).



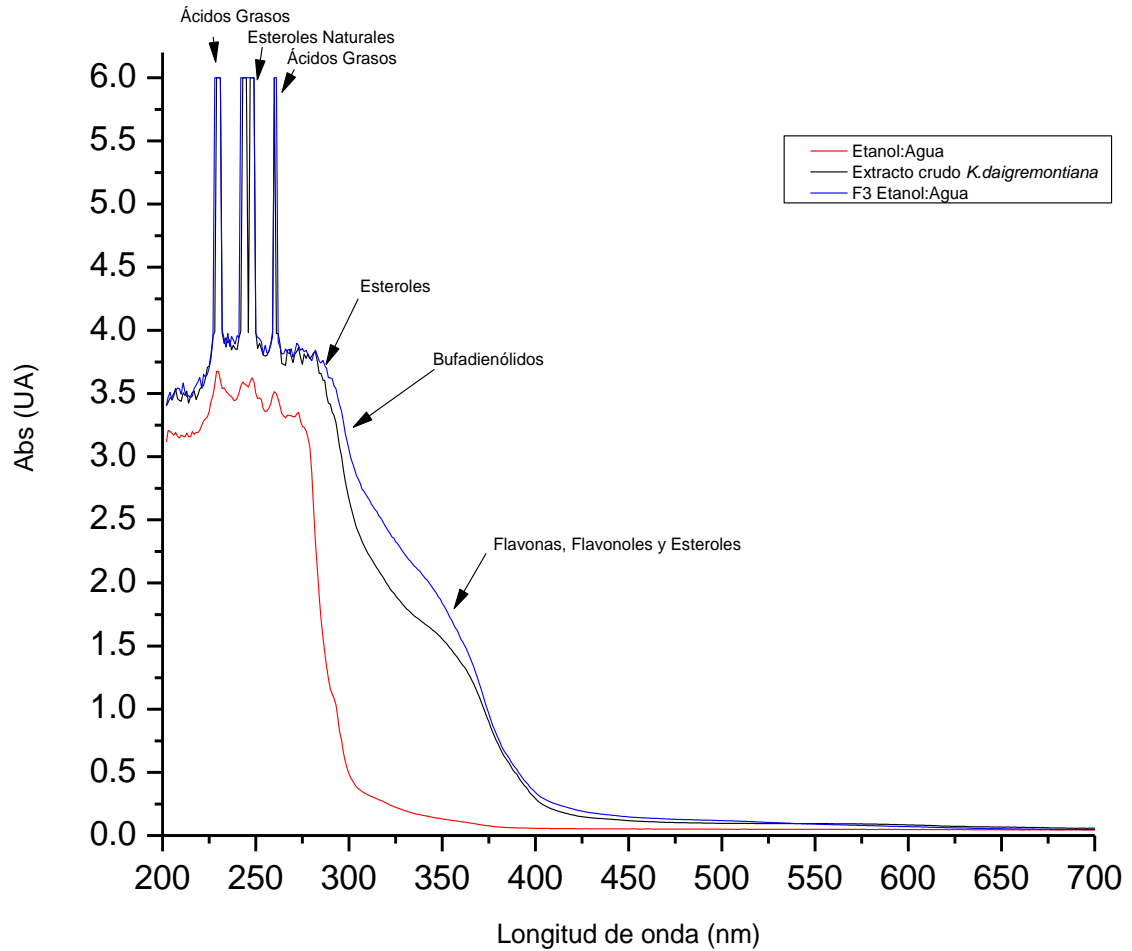
**Fig.28 Fraccionamiento con Etanol: Agua**



**Fig.29 Barrido por UV-Vis del extracto acuotanolico de *K. daigremontiana* usando Etanol: Agua.**

Con esta mezcla de solventes Etanol: Agua, se puede observar según la gráfica (Fig. 29) que de las nueve muestras (M) que genera el SEPACORE, se obtuvieron tres fracciones (F), y se puede observar un poco más definidos los picos, para la F1 presencia de Ácidos Grasos únicamente en (228 nm), Esteroles en (280 y 290 nm), Bufadienólidos (296 - 300 nm) y Flavonas y Flavonoles en (316 – 390 nm). Para la F2, sugerimos la presencia de Esteroles en (270 y 290 nm), Bufadienólidos en (296 – 300 nm) y Flavonas en (310 -347 nm). Para la F3, Esteroles (242 -249 nm, 280 y 290nm) y Ácidos grasos en (260 nm), Bufadienólidos (296 – 300 nm) y Flavonas y Flavonoles (323 -385 nm).

### UV-VIS de *K. daigremontiana*



**Fig. 30 Barrido por UV-Vis del extracto acuoetanolico y la F3 obtenida del Fraccionamiento Etanol: Agua de *K. daigremontiana*.**

En esta Fig.30 se hace una comparación de los barridos por UV-Vis entre el extracto crudo y la F3, de lo cual se observa que tanto el extracto crudo como la F3 de *K. daigremontiana* podrían presentar algún tipo de bufadienolidos, cabe mencionar que de acuerdo con los autores (Clare Van y col., 2009) afirman que el *K. daigremontiana* contiene compuestos como el Glutinol, Glutanol, Acetato Glutinol, Friedelin, Epifriedelanol, Germanicol, b- Amiryn. Los autores (Malgorzata Kalinowska y col., 1990), sugieren que *K. daigremontiana* está compuesto por los siguientes grupos funcionales:

**Tabla 6. Grupos Funcionales del *K. daigremontiana***

Grupo Funcional	Longitud de onda (nm)
n-alcanos	<b>Menor a 150</b>
n-aldehídos	<b>190 y 290</b>
n-ácidos grasos	<b>230 – 235 y 260 -280</b>
n-alcoholes	<b>180 y 188</b>
n-esteres alquilo	<b>208, 217 y 225</b>



### Rendimiento para las Fracciones obtenidas.

Se obtuvieron tres fracciones de acuerdo para cada disolvente utilizado, excepto para el Diclorometano, inyectando 2 g de muestra (Extracto acuoetanólico de *K. daigremontiana*) en la columna de Cromatografía Preparativa.

**Tabla 7. Rendimiento de las Fracciones del *K. daigremontiana***

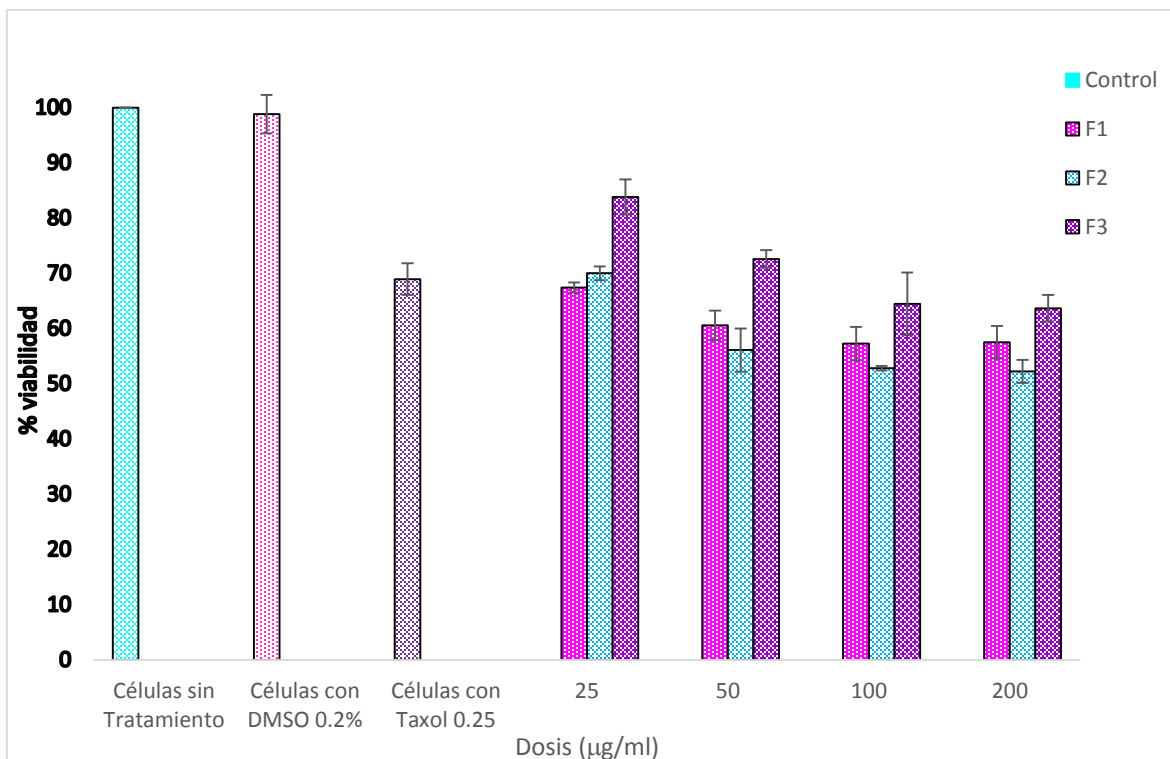
Fracción	Hexano	Acetato de Etilo	Etanol: Agua (3:1)
F1	0.065%	0.07%	1.175%
F2	0.05%	0.075%	0.295%
F3	0.075%	0.05%	15.52%

El producto final obtenido (F3) del extracto acuoetanólico, fue el que tuvo el rendimiento más alto comparado con el resto de las fracciones obtenidas con los otros disolventes, la cual se sugirió usar para las demás pruebas.

### 5.3. Efecto citotóxico.

#### 5.3.1. Evaluación de las Fracciones obtenidas de la Separación con Acetato de Etilo en la línea celular MDA-MB-231.

Una vez obtenidas las fracciones con el acetato de etilo como disolvente, se procedió a evaluar éstas en línea celular MDA-MB-231, las tres Fracciones resultantes se probaron a concentraciones de (25, 50, 100, 200 µg/ml), a tiempos de 24 h y cada ensayo se realizó por triplicado, en la Fig.31 se pueden apreciar los porcentajes de viabilidad obtenidos para dicho tratamiento.

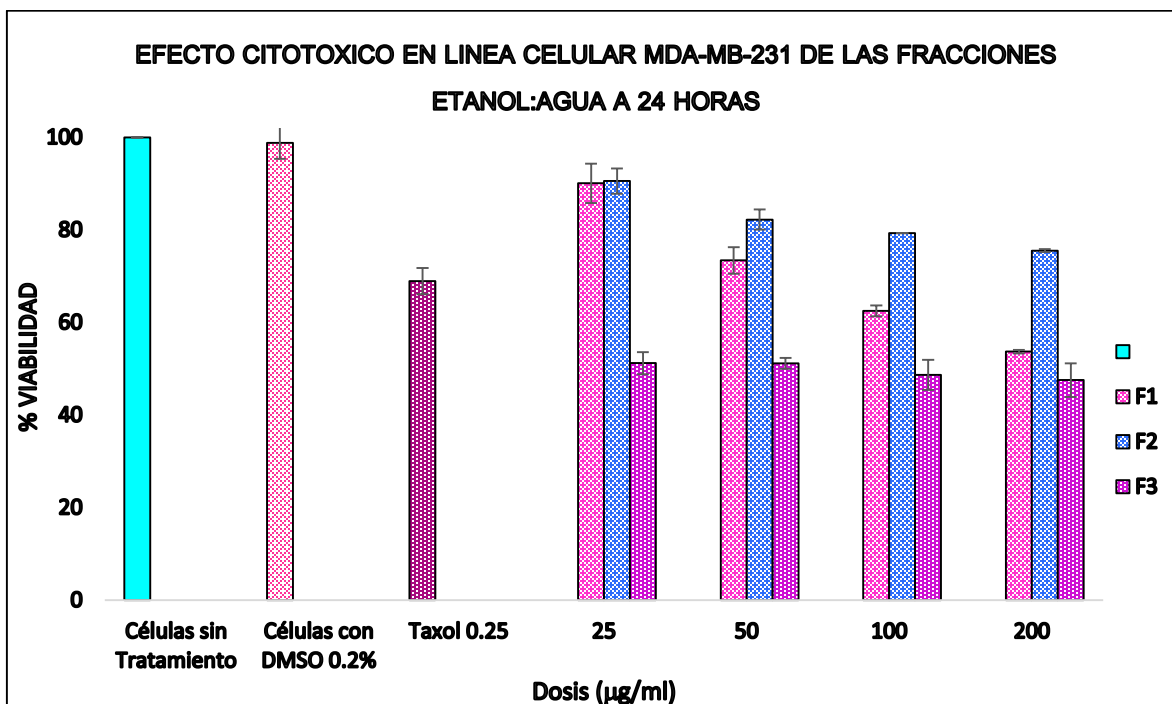


**Fig.31 Efecto de las Fracciones obtenidas de usar Acetato de etilo para la separación**

De acuerdo con los resultados se puede apreciar que el porcentaje de viabilidad de las células que no se sometieron a ningún tratamiento es del 100%, con respecto a las células tratadas con el DMSO al 0.2%, se considera que no hay un descenso celular significativo, este tratamiento es de suma importancia ya que el DMSO se usó como disolvente en los diferentes tratamientos, por lo que sabemos que esta concentración es la adecuada, ya que no afecta la viabilidad de las células tumorales. Por el contrario al usar el control positivo el Taxol, la viabilidad disminuyó hasta en un 68% para las 24 h. Mientras que las células con tratamiento en el que se probaron las tres Fracciones a las diferentes concentraciones, se observa que a las 24 h, si existe efecto citotóxico presentándose a partir de la dosis más baja que es de 25 µg/ml, así la F2, exhibiéndose como la mejor de ellas, alcanzando hasta en un 52% de viabilidad celular para la dosis de 200 µg/ml. Sin embargo en ensayos realizados anteriormente para el extracto crudo etanol:agua del *K. daigremontiana*, se alcanzó hasta un 45% de viabilidad para la dosis de 200 µg/ml. Por lo que se decidió continuar probando ahora con las Fracciones obtenidas tras usar como fase móvil la mezcla Etanol:Agua para la separación.

### **5.3.2. Evaluación de las fracciones obtenidas de la separación con la mezcla Etanol: Agua en la línea celular MDA-MB-231.**

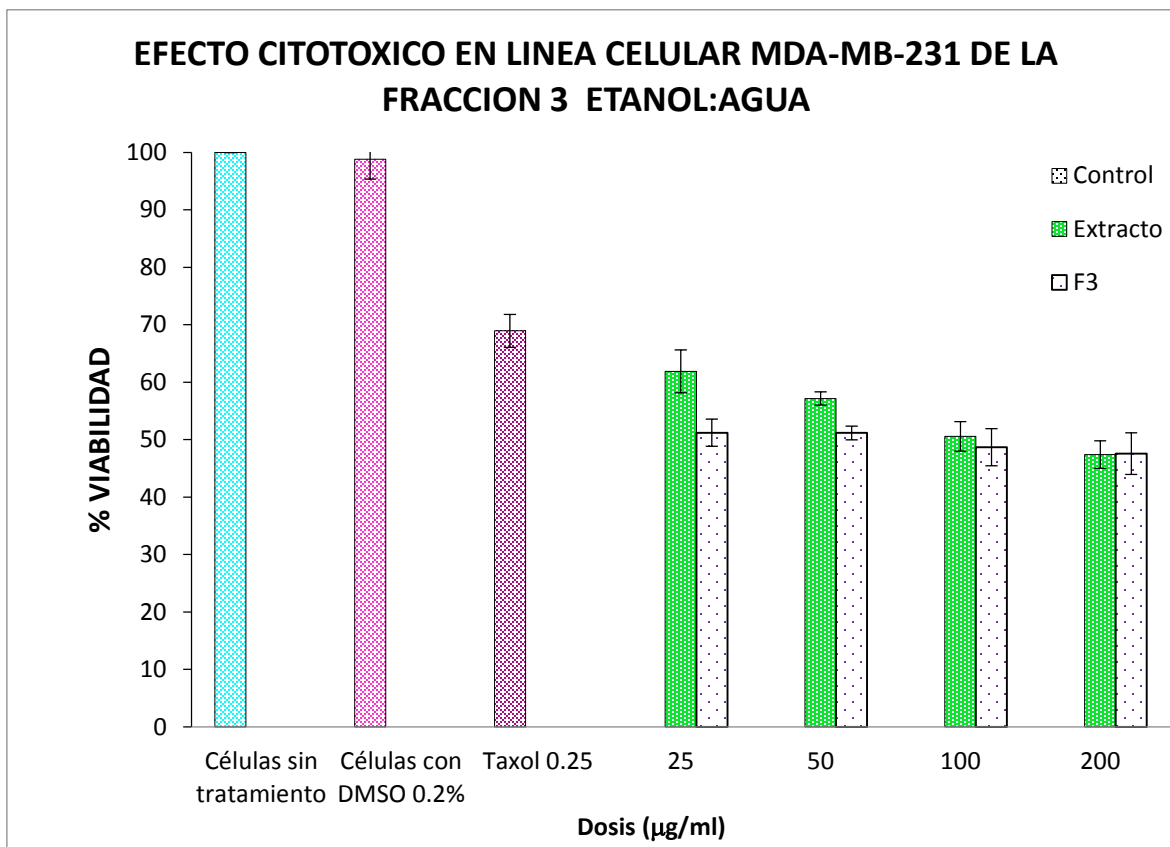
Este tratamiento se realizó bajo las mismas concentraciones y al tiempo de 24 h, los resultados se muestran a continuación en la Fig.32. Nuevamente para las células sin tratamiento y las tratadas con DMSO al 0.2% la viabilidad observada fue del 100%. Y el control positivo (Taxol) mostro 68.94 % de viabilidad.



**Fig.32 Efecto de las Fracciones obtenidas de usar Etanol: Agua para la separación**

No obstante para las células tratadas con las fracciones 1, 2 y 3, resultó que la viabilidad disminuyó de forma dosis dependiente. Mostrando la F3 un mejor efecto citotóxico, a partir de la dosis más baja de 25 µg/ml con un 51.2% de viabilidad hasta alcanzar el 47.5% para la dosis de 200 µg/ml.

En seguida en la Fig.33 se presenta la comparación del extracto crudo con la F3 etanol: agua, del extracto acuotánico del *K. daigremontiana* en línea celular tumoral MDA-MB-231, observando un efecto similar desde la dosis más baja de 25 µg/ml, donde se aprecia para el extracto crudo un 61.86% de viabilidad y para la F3 51.2%, hasta alcanzar un 47 % de viabilidad para la dosis de 200 µg/ml en ambos tratamientos.



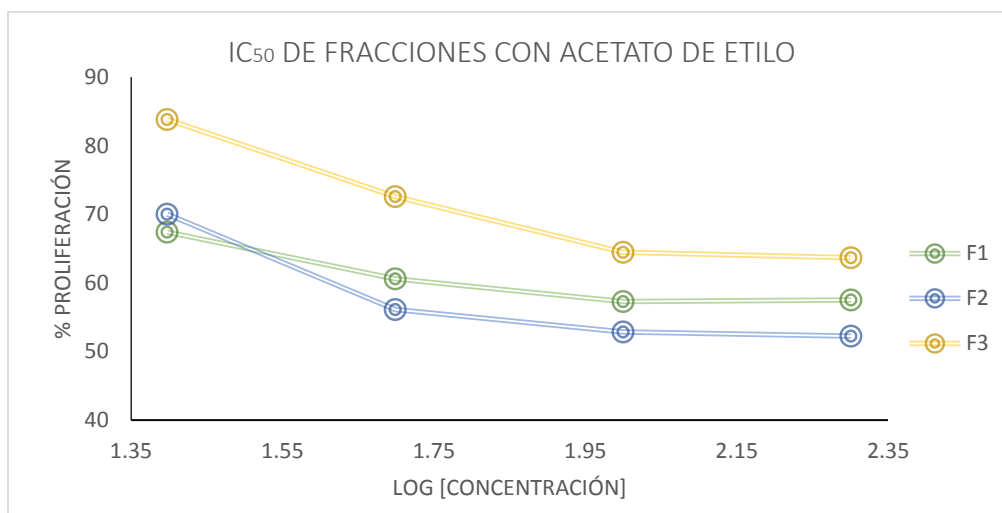
**Fig.33 Efecto citotóxico del extracto crudo comparado con la F3 del *K. daigremontiana*.**

**Obtención del IC<sub>50</sub> de las fracciones en línea celular MDA-MB-231.**

Una vez analizado el efecto citotóxico de cada fracción sobre la línea MDA-MB-231, se calculó la IC<sub>50</sub>.

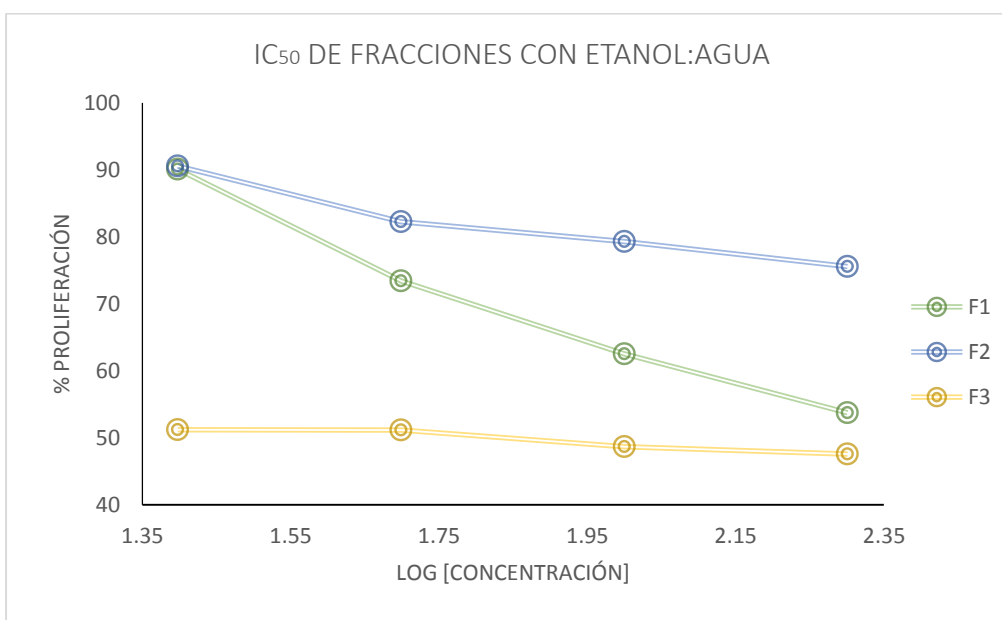
Debido a los resultados obtenidos se eligió la F3 de Etanol: agua del extracto acuoetanólico, ya que es la fracción que presentó el IC<sub>50</sub> más bajo y aun mejorado comparado con el extracto acuoetanólico, sabiendo que este, ha generado buenos resultados por los ensayos hechos con anterioridad.

Con la finalidad de conocer la concentración óptima en que se reduce la viabilidad al 50 % en las células tumorales se calculó el IC<sub>50</sub>, para esto se usó el programa Graph Pad Prism 5.0, en donde por una regresión no lineal, se grafica el log de la concentración vs el porcentaje de viabilidad (Porcentaje de células que resultan vivas frente a un tratamiento) Fig.34



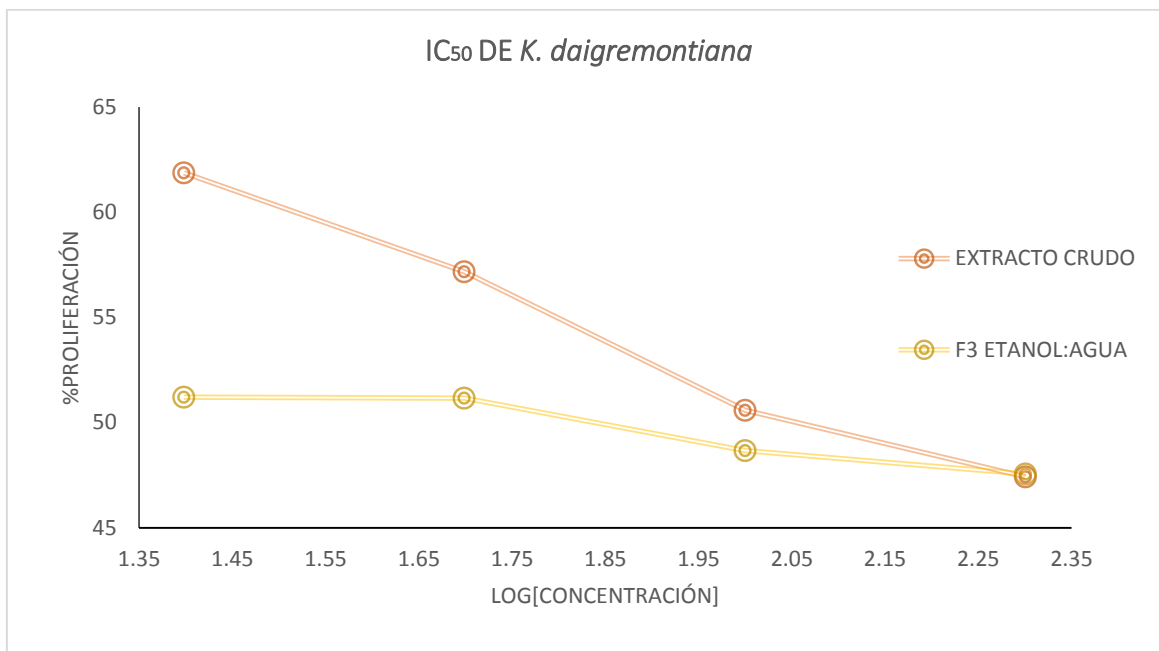
**Fig.34 Gráfico del IC<sub>50</sub> de las fracciones obtenidas del Acetato de Etilo en línea celular MDA-MB-231.**

Como se puede apreciar en la Fig.33 Se observa un descenso en la viabilidad de las células al tratarlas con la F3, sin embargo las IC<sub>50</sub> de estas tres fracciones, son muy altas comparadas con el extracto acuotánico.



**Fig. 35 Gráfico del IC<sub>50</sub> de las fracciones resultantes de usar Etanol: agua en línea celular MDA-MB-231.**

De acuerdo con la Fig. 35 se muestra que la F3 tiene un mejor efecto citotóxico comparando con las F1 y F2, ya que el IC<sub>50</sub> de la F3 es de  $69.37 \pm 1.841 \mu\text{g/ml}$ , por lo que las siguientes pruebas de viabilidad se realizaron con la F3 de Etanol: Agua, en esta concentración.



**Fig. 36 Grafico del IC<sub>50</sub> del extracto acuoetanólico de *K. daigremontiana*.**

En la Fig. 36 se presenta la comparación de los resultados del IC<sub>50</sub> para el extracto acuoetanólico crudo contrastado con la F3 obtenida de la mezcla Etanol: Agua, en donde se puede evidenciar que se mejoró el valor del IC<sub>50</sub>, al realizar la separación con la Técnica de Cromatografía Preparativa, para el tiempo de 24 horas.

En resumen, en la Tabla 8. Se muestra, el IC<sub>50</sub> calculado para cada Fracción.

**Tabla 8. Determinación de IC<sub>50</sub> de las diferentes fracciones a las 24 h.**

Fracción	IC <sub>50</sub> µg/ml	Error ( ± µg/ml)
F1 Acetato de Etilo	129.5	2.112
F2 Acetato de Etilo	106.5	2.027
F3 Acetato de Etilo	220.1	2.343
F1 Etanol:Agua	187.4	2.273
F2 Etanol:Agua	453.8	2.657
F3 Etanol:Agua	69.37	1.841
Extracto Crudo	89.34	1.951

## 5.4 Caracterización del extracto crudo acuotánico y la F3 por la técnica de FTIR.

### Espectro FTIR del Extracto Crudo de *K. daigremontiana*.

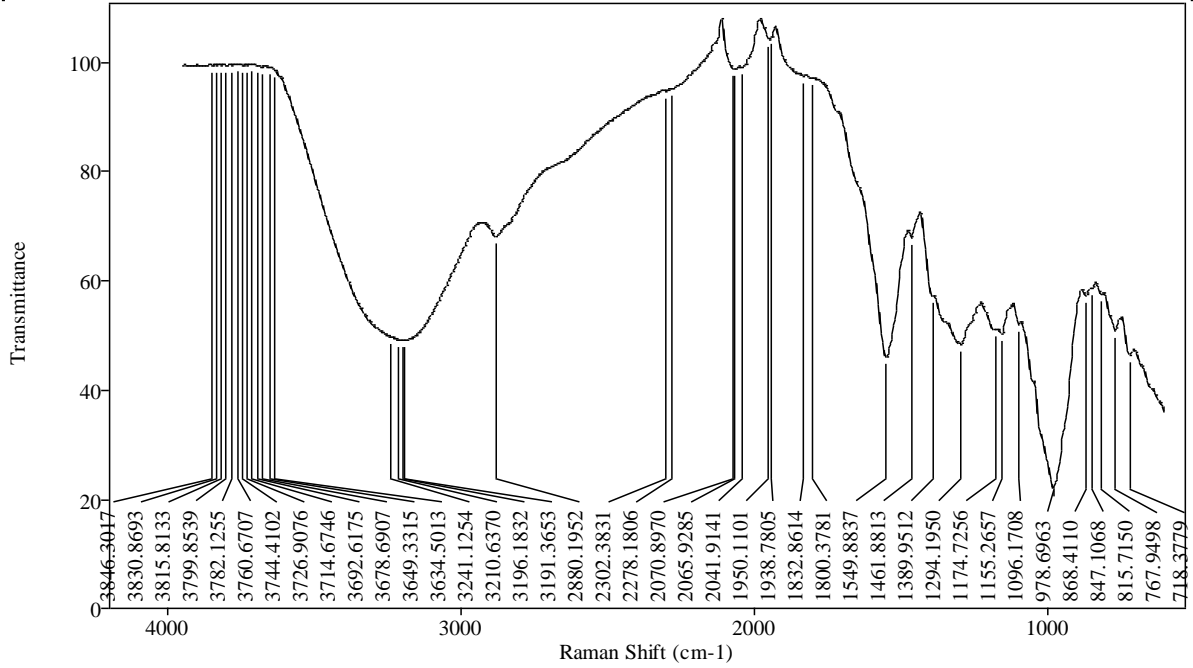


Fig.37 Espectro FTIR del extracto acuotánico crudo del *K. daigremontiana*.

### Espectro FTIR de la Fracción 3 Etanol: Agua de *K. daigremontiana*.

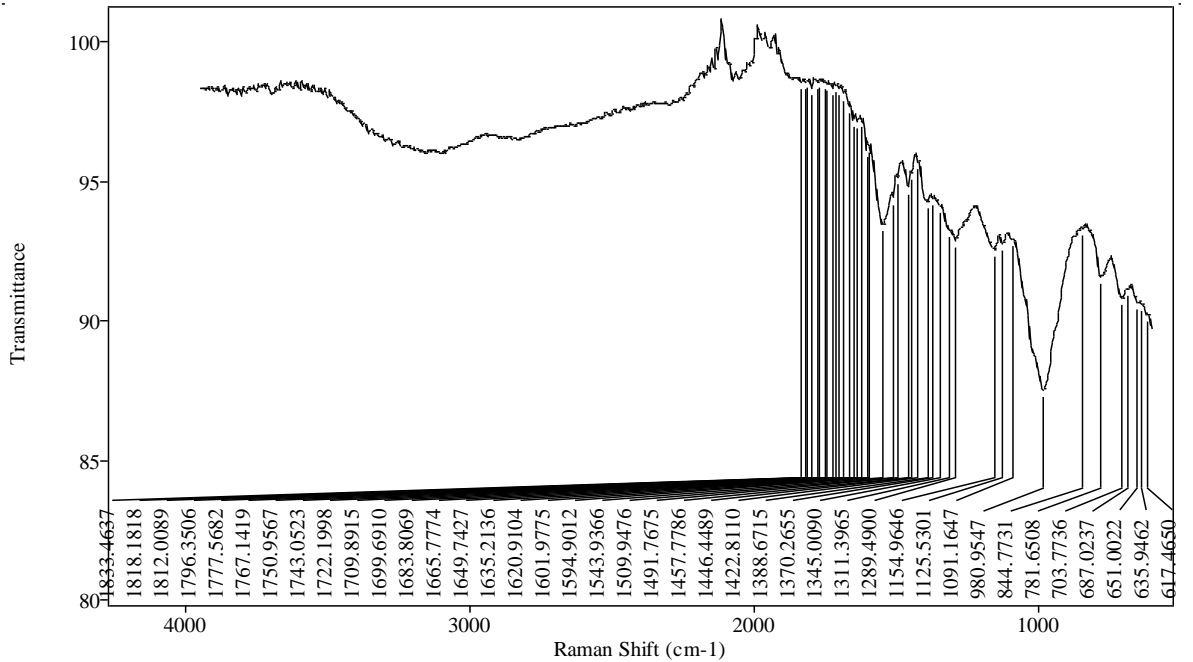


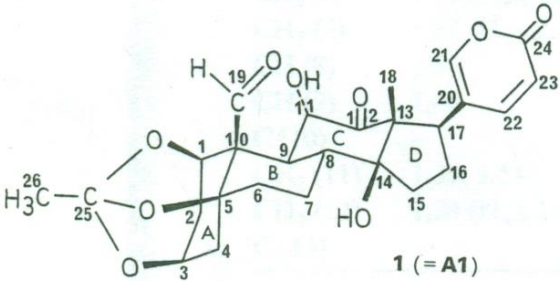
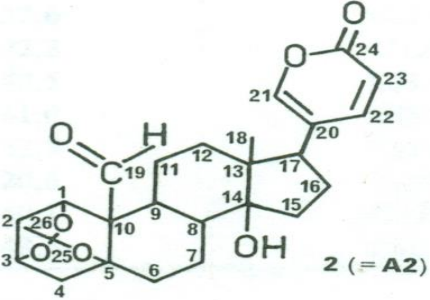
Fig. 38 Espectro FTIR de la Fracción 3 del Etanol:Agua.

**Tabla 9. Grupos Funcionales.**

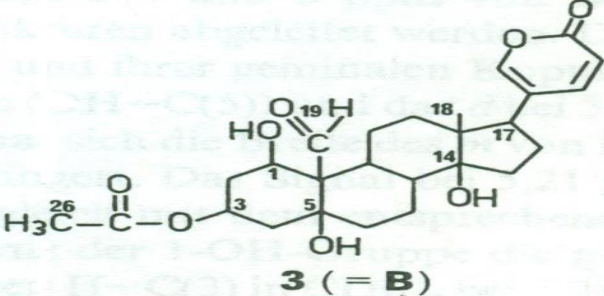
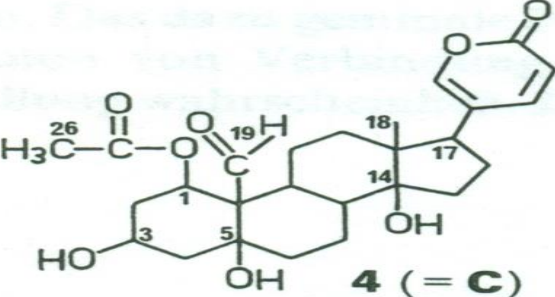
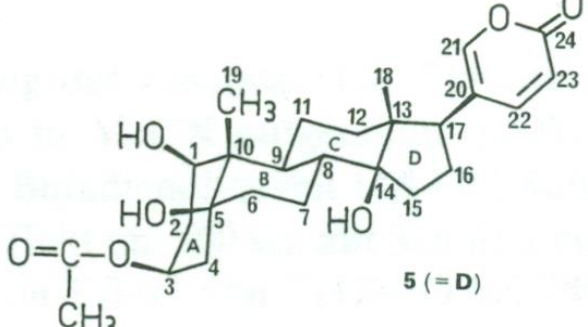
Banda	Grupo Funcional	Rango (cm <sup>-1</sup> )	Rango (cm <sup>-1</sup> ) del extracto crudo de <i>K.daigremontiana</i>	Rango (cm <sup>-1</sup> ) de la F3 Etanol:Agua <i>K.daigremontiana</i>
(OH)	Alcohol	3440-3680	3634, 3649,3678	3405,3453,3465, 3498, 3533
(C-H)	Alcanos	2850-2970	2880	2865,2873,2884,2899,2910,2932,2969
(C-H)	CH <sub>2</sub>	1355-1390	1389	1370,1388
(C-H)	CH <sub>3</sub>	1450-1475	1461	1457
(C=O)	Aldehído	1709,1710,1714	----	1709
(C=O)	Aldehído, Alifático	1742-1744	----	1743
(C=O)	Ácidos, Alifáticos	1770-1782	----	1777
(C=O)	Ester, Alifático	1748-1761	----	1750
(C=O)	Aromáticos	1757-1774	----	1767
(C-O)	Éter	1103-1375	1155,1174,1294	1125,1154,1289,1311,1345,1370
	Insaturados	700-730	718	703

De acuerdo con Hildebert Wagner, y col., 1986; y con Rani Maharanni, y col., 2008, se han aislado 5 bufadienólidos del *K. daigremontiana*, cuyos nombres son los siguientes:

**Tabla 10. Bufadienólidos**

Bufadienólido	Nombre	Estructura Química
1	Daigremontianin	 <p>1 (= A1)</p>
2	Bersaldegénin 1,3,5, - ortoacetato.	 <p>2 (= A2)</p>



3	Bersaldegén 3 – acetato.	 <p style="text-align: center;"><b>3 (= B)</b></p>
4	Bersaldegén 1- acetato.	 <p style="text-align: center;"><b>4 (= C)</b></p>
5	Daigredorigén – 3 – acetato	 <p style="text-align: center;"><b>5 (= D)</b></p>

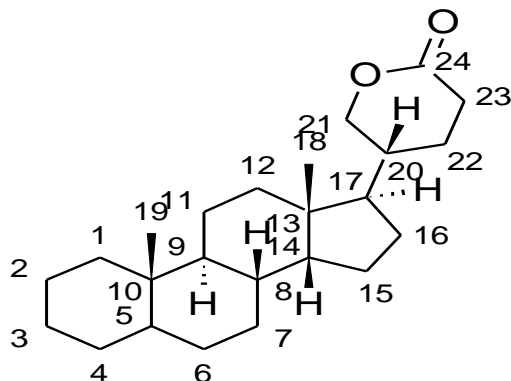
Y reportaron los siguientes resultados de UV, y de IR para los compuestos:

- (1) UV=298, IR: 3450 (OH), 1710(C=O), 1630(C-O); UV=300, IR: 3445 (OH), 2882, 1709(C=O), 1122(C-O).
- (2) UV=298, IR: 3480 (OH), 1710(C=O), 1300(C-O); UV=299, IR: 3464 (OH), 2877, 1714(C=O), 1122(C-O).
- (3) UV=298, IR: 3400 (OH), 1710(C=O), 1370(C-O).
- (4) UV=298, IR: 3490 (OH), 1710(C=O), 1250(C-O).
- (5) UV=298, IR: 3530 (OH), 1740,1710(C=O), 1370(C-O).

Comparando con los resultados obtenidos por el programa Essential FTIR en la F3 del aislamiento realizado con Etanol: Agua de *K. daigremontiana* podemos sugerir, la presencia de los principales grupos funcionales que componen a los bufadienólidos como sigue:

- (1) IR: 3453(OH), 1709(C=O), 1125(C-O).
- (2) IR: 3465(OH), 1709(C=O), 1125(C-O).
- (3) IR: 3405(OH), 1709(C=O), 1370(C-O).
- (4) IR: 3498(OH), 1709(C=O).
- (5) IR: 3533(OH), 1709(C=O), 1370(C-O).

Así mismo se puede corroborar comparando los resultados obtenidos por la técnica UV-Vis (Tabla 4) y los de la Técnica por FTIR (Tabla 9), la existencia de grupos funcionales, citados por los autores (Clare Van y col., 2009) presentes en el *K. daigremontiana*.



**Fig. 39 Estructura base del bufanol.**

### 5.5. Técnica de HPLC, para la F3 del extracto acuotánico Aranto.

Para la determinación del espectro de bufalin por HPLC, se fijaron las siguientes características:

La columna se acondicionó con los siguientes parámetros.

Flujo 0.4 ml/min Presión Max 400 bar

**Tabla 11. Disolventes usados para el método por la técnica de HPLC.**

A	0.0%	AGUA
B	19.0 %	ACETONITRILLO
C	OFF %	ISOPROPANOL
D	81.0 %	AGUA: AC. ACETICO

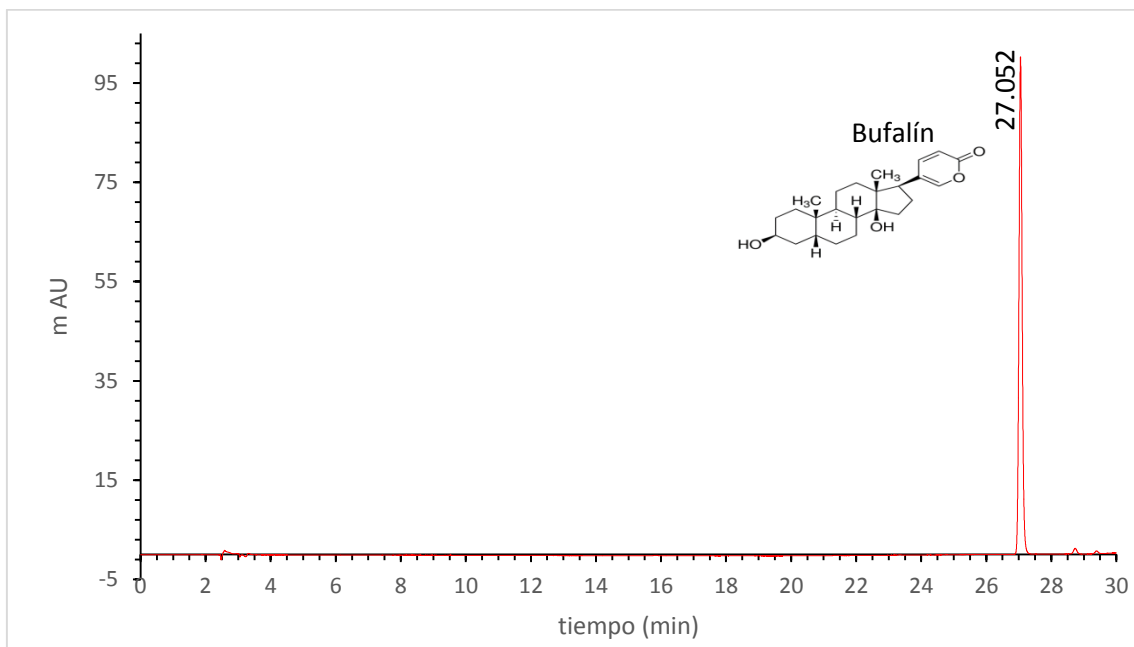
Para correr la muestra se ocuparon las siguientes condiciones:

Flujo 0.4 ml/min , T= 30°C, se ocuparon tres longitudes de onda, (290,296, 298 y 300 nm), siendo la de mejor resolución la de 290 nm.

Y las condiciones adecuadas, fueron las siguientes, proporcionando la mejor resolución:

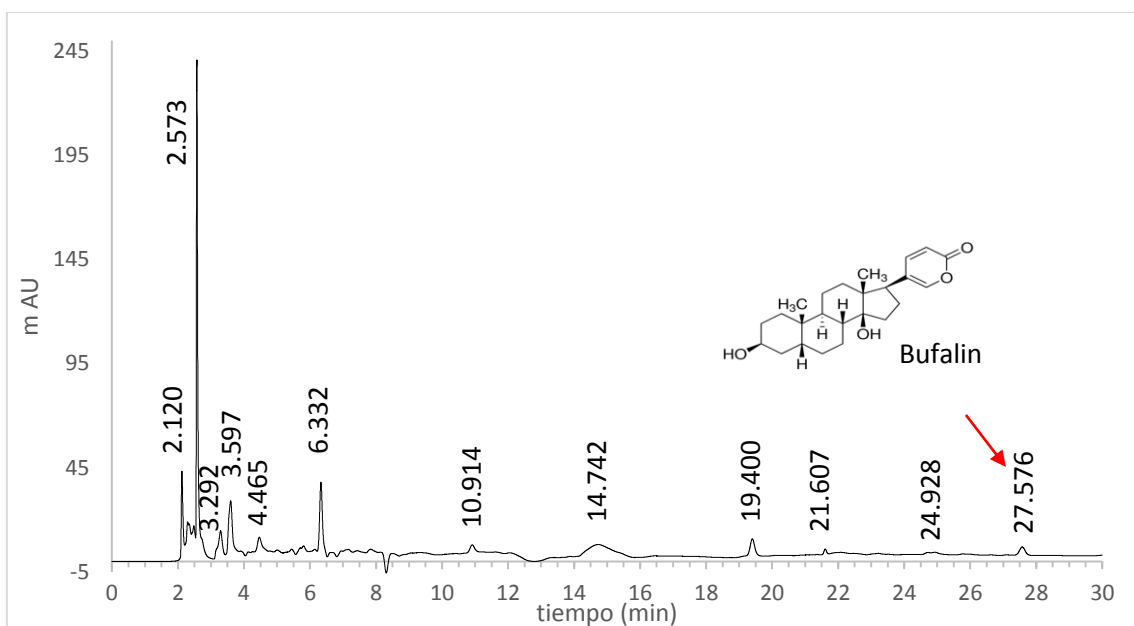
**Tabla 12. Método usado para la técnica de HPLC.**

	Time	%B	%D
1	0	23	77
2	10	25	75
3	15	28	72
4	25	52	48
5	30	60	40



**Fig. 40** Espectro del bufalin usando una fase móvil de ACN: AGUA /AC.ACETICO (19: 81 v/v) y una absorbancia de 290 nm.

Ademas de obtener un tiempo de retención de 27.052 min. Fig. 40. Para el caso de la F3, se ocupo el mismo método, bajo las mismas condiciones proporcionando la mejor resolución y evidenciando el pico de bufalin a un tiempo de retención de 27.576 min. Fig. 41.



**Fig. 41** Espectro de la F3 usando una fase móvil de ACN: AGUA /AC.ACETICO (19: 81 v/v) y una absorbancia de 290 nm.

Comparando con Min Ye, et al. , 2006, determinaron por medio de la técnica HPLC, en ChanSu (veneno obtenido de las glándulas en la piel de sapos gigantes), siendo el tiempo de retención para el bufalin de 18.07 min.

## 5.6. Ensayos de Citotoxicidad en línea celular MCF10 A.

### 5.6.1. Extracto Crudo Y F3 con Efecto citotóxico.

Con la finalidad de estudiar si el efecto citotóxico presentado por el extracto acuotánico es específico para las células tumorales de cáncer de mama, realizamos los ensayos de citotoxicidad utilizando las mismas dosis y tiempos antes trabajados en la línea MDA- MB- 231, pero ahora en la línea epitelial no tumorigénica MCF – 10A.

Se utilizó el mismo extracto acuotánico en una proporción 3:1 y se pudo detectar que las células tratadas con DMSO no fueron afectadas manteniéndose aproximadamente el 100% de viabilidad y por el contrario con el Taxol, existe una pequeña disminución en el porcentaje de viabilidad dependiendo la concentración y el tiempo de tratamiento, hasta llegar en un 82% a las 72 h.

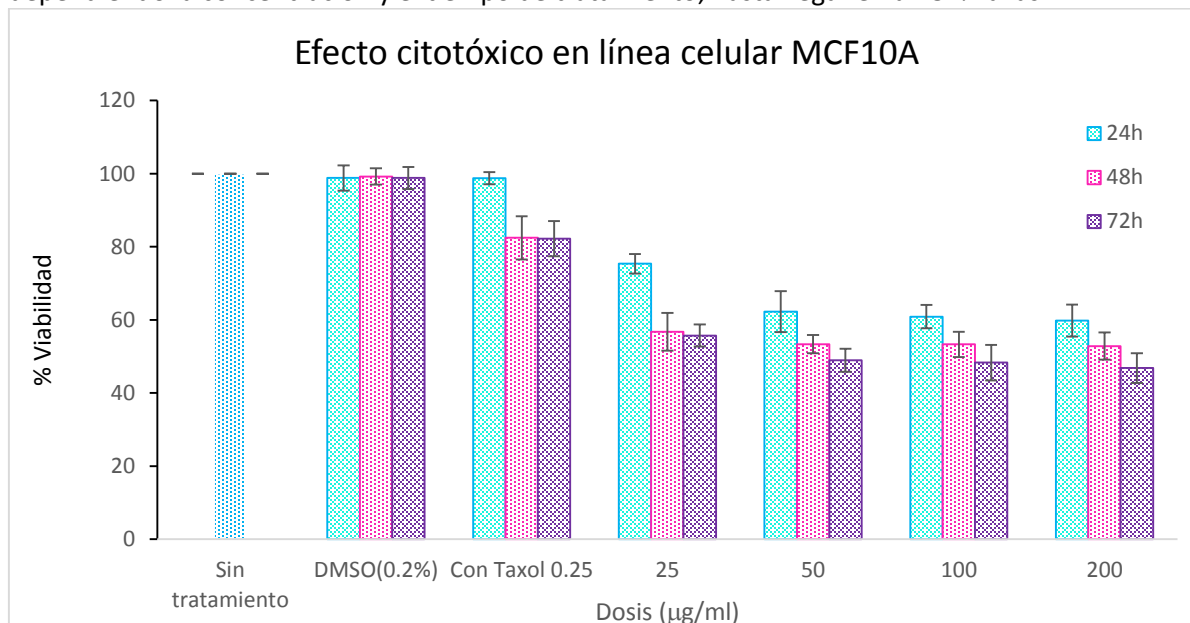
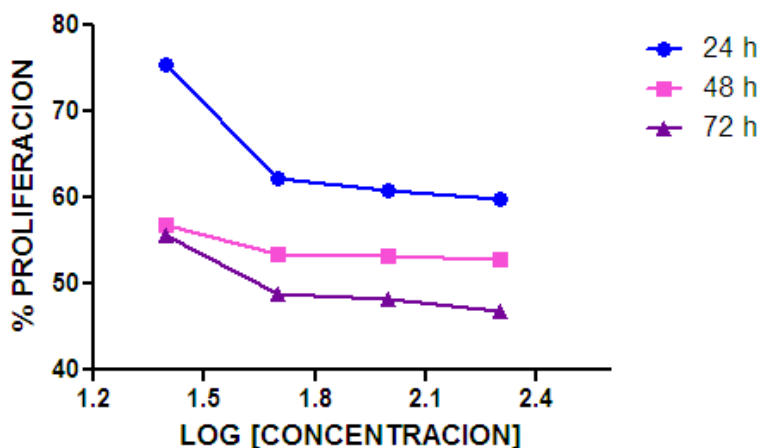


Fig.42 Efecto citotóxico del extracto crudo del *K. daigremontiana*.

Como se puede observar en la Fig. 42, de acuerdo con los resultados obtenidos al igual que con la línea celular tumoral MDA-MB-231 una vez que se alcanzó el efecto máximo permanece casi constante, aunque la viabilidad es un poco más alta en la línea celular MCF10A; existe un decaimiento significativo en el porcentaje de viabilidad incluso a partir de la dosis más baja esto es a 25 µg /ml, es decir una muerte celular de casi el 25%, a un tiempo de 24 h y de aproximadamente un 50% a las 72 h.

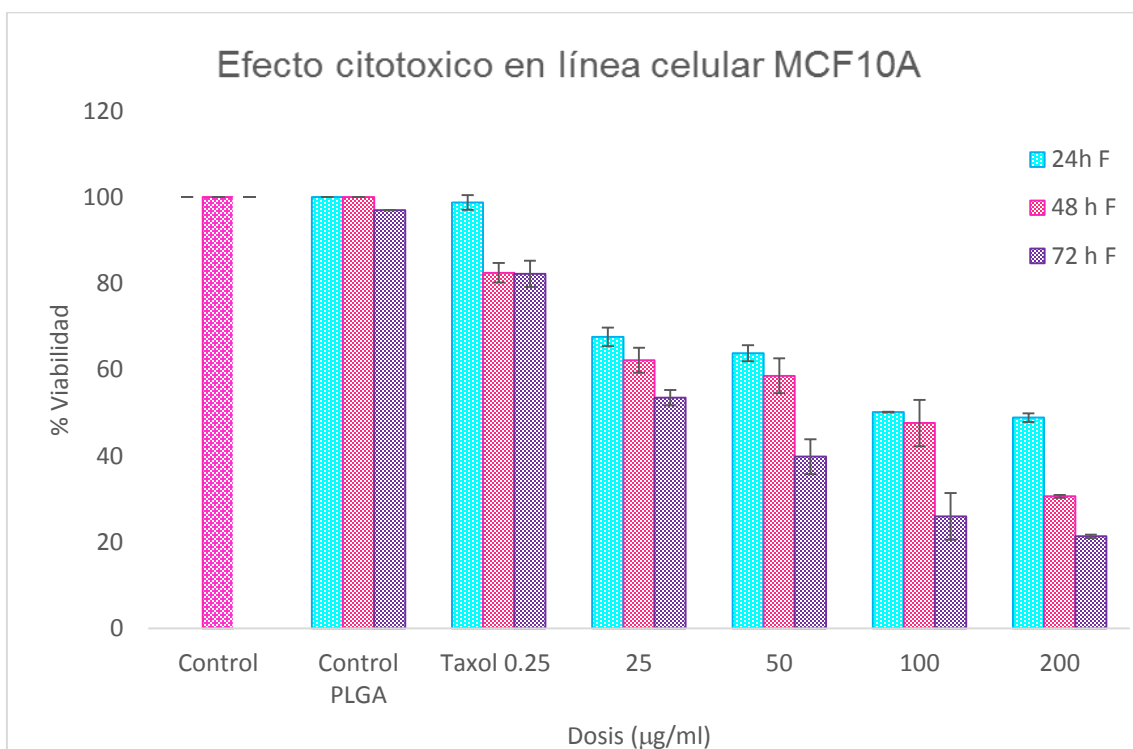
Ahora bien, cuando las células fueron tratadas con una dosis de 100 µg /ml la viabilidad disminuyó hasta un 60% a las 24 h y cuando las células fueron tratadas a una dosis de 200 µg /ml la viabilidad permanece constante a las 24 h y disminuye hasta un 47% a las 72 h. Estos resultados indican que el extracto tiene un efecto citotóxico positivo también en la línea celular MCF10A.

También se calculó el IC<sub>50</sub>, en esta línea celular con la finalidad de conocer la concentración óptima en que se reduce la viabilidad al 50%. Para esto se usó el programa Graph Pad Prims 5.0, en donde por una regresión no lineal, grafica el *log* de la concentración vs el porcentaje de viabilidad.



**Fig. 43 Grafico del IC<sub>50</sub> del extracto acuotánico de *K. daigremontiana*, en línea celular MCF10A.**

Por lo que el cálculo del IC<sub>50</sub> del extracto acuotánico es de 100.2 + 2.001 µg/ml, y esto a su vez se puede corroborar con los resultados de la Fig.43.



**Fig.44 Efecto citotóxico de la F3 obtenida del extracto crudo del *K. daigremontiana*.**

En cuanto a la gráfica Fig.44 se muestra el efecto citotóxico que presenta al someterse al tratamiento con la fracción de Aranto y para el tiempo de 24 h con la dosis más baja usada de 25  $\mu\text{g/ml}$ , presenta una viabilidad del 67.589 %, para la dosis más alta usada que es la de 200  $\mu\text{g/ml}$ , y para el tiempo de 72 h, se observa el 21% de viabilidad, comparando con los controles e incluso con el taxol a la concentración de 0.25  $\mu\text{g/ml}$ , en la línea celular normal MCF10A.

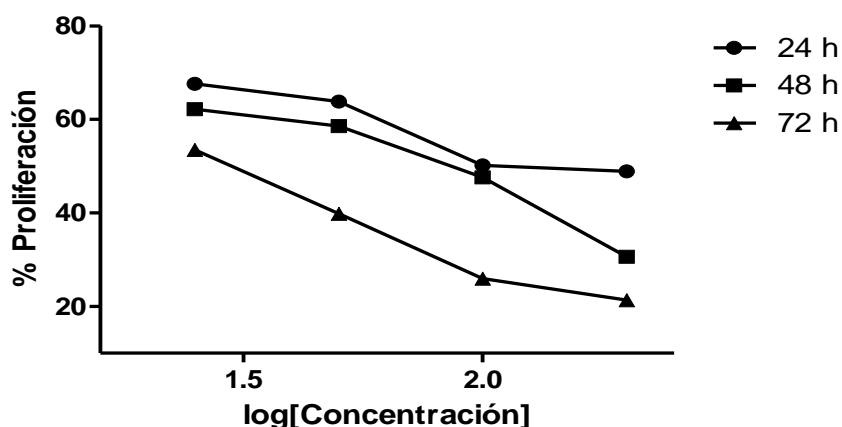


Fig. 45 Grafico del IC<sub>50</sub> de la F3 de *K. daigremontiana*.

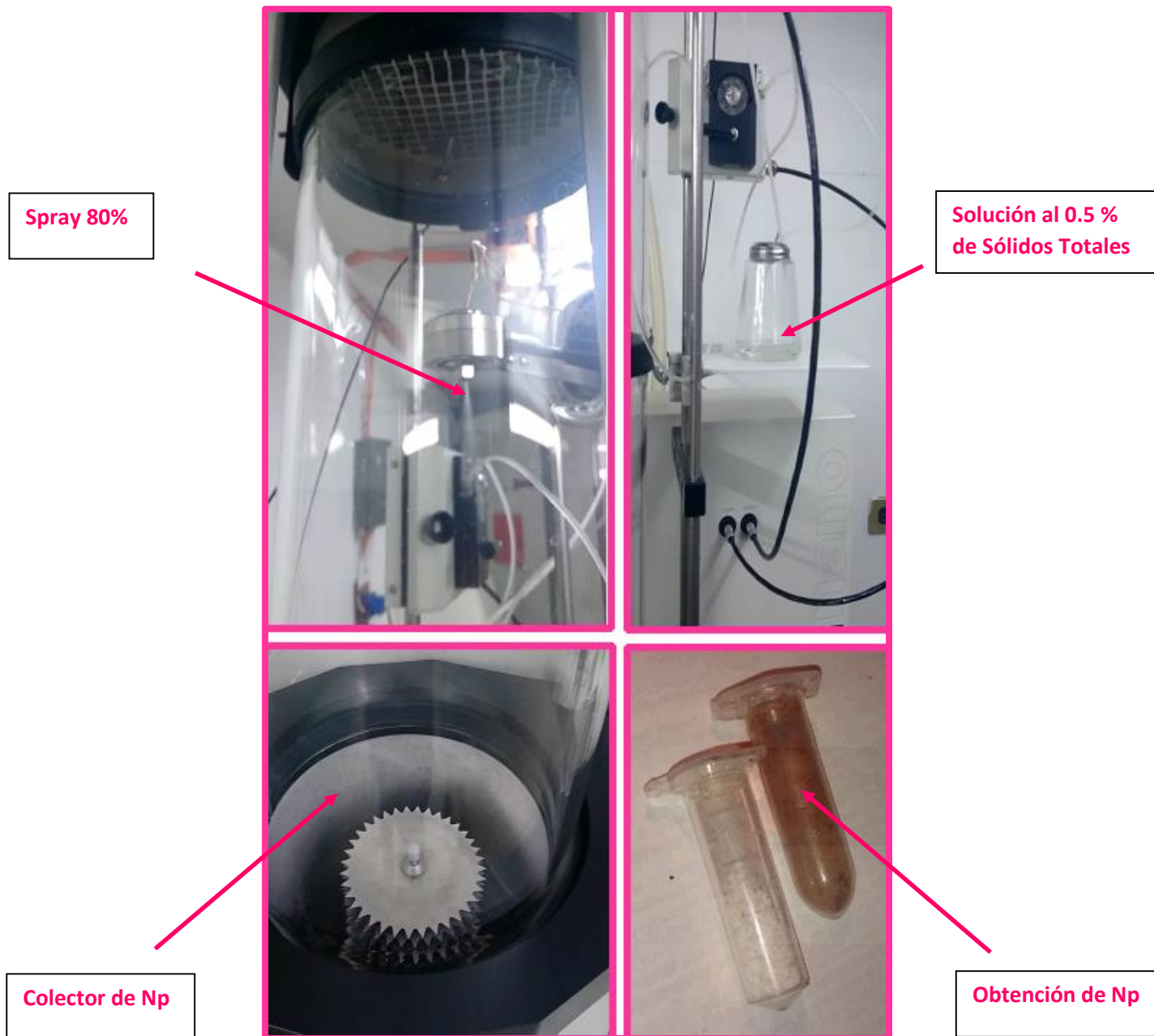
Por consiguiente al realizar el análisis para obtener la curva del IC<sub>50</sub>, en la línea celular normal MCF10A, tanto del extracto crudo como de la F3 de *K. daigremontiana* se obtuvieron valores de  $100.2 + 2.001 \mu\text{g/ml}$ , y  $62.33 \pm 1.183 \mu\text{g/ml}$  respectivamente (Fig. 45), determinando así que la Fracción obtenida del extracto acuotánico de Aranto tiene un mayor potencial citotóxico para ambas líneas celulares, por lo que es necesario encapsular el principio activo, y proponer una formulación adecuada como vehículo para contener dicha Fracción, y evitar muerte celular en la línea normal MCF10A.

### 5.7. Nanoencapsulación por Secado Nano Spray Dryer.

Se elaboraron cinco tipos de nanocápsulas (NP) por este método, las cinco soluciones utilizadas para elaborar las NP se prepararon al 0.5 % de sólidos totales bajo las siguientes condiciones: flujo 127 L CO<sub>2</sub>/min, pump en nivel 2 y 80 % de aspersion (spray), temperatura de entrada 60 °C, temperatura de salida 25 °C, temperatura del cabezal 58 °C y Presión de 39 mbar. Y se determinó el rendimiento del proceso para cada una de las nanocápsulas, arrojando los siguientes resultados.

Tabla 13. Formulación de las nanocápsulas.

Nanocápsulas (NP)	Material	Disolvente	Producto (mg)	Rendimiento del proceso de encapsulación (%)
NPP	PLGA	Acetona	210	89.36
NPEC	PLGA + Extracto Crudo de Aranto	Acetona	105.3	50.14
NPF	PLGA + Fracción Aranto	Acetona	96.5	53.61
NPT	PLGA + Taxol	Acetona	79.3	41.73
NPB	PLGA + Bufalin	Acetona	87.8	47.45



**Fig.46 Proceso de Nanoencapsulación por Secado Nanospray Dryer.**

### **5.7.1. Determinación de Morfología y Tamaño por Microscopía Electrónica de Barrido.**

A continuación se presentan las micrografías para las cinco Np (NPP, NPEC, NPF, NPT, NPC) obtenidas, se realizaron a 5000X aumentos observando, una morfología porosa en la mayoría de ellas a excepción del bufalin ya que este último presenta una textura más lisa, acercándose a la esférica. Se realizaron cinco tipos de NP, en todas se ocupó como disolvente acetona, en la primera "NPP" únicamente se hizo pasar el polímero (PLGA), esto para tener un control, es decir, un placebo de PLGA, ya que en los ensayos de citotoxicidad se tiene que probar que el polímero no contribuye en la muerte celular, y de esta forma asegurar que el efecto citotóxico es producido completamente por el principio activo.

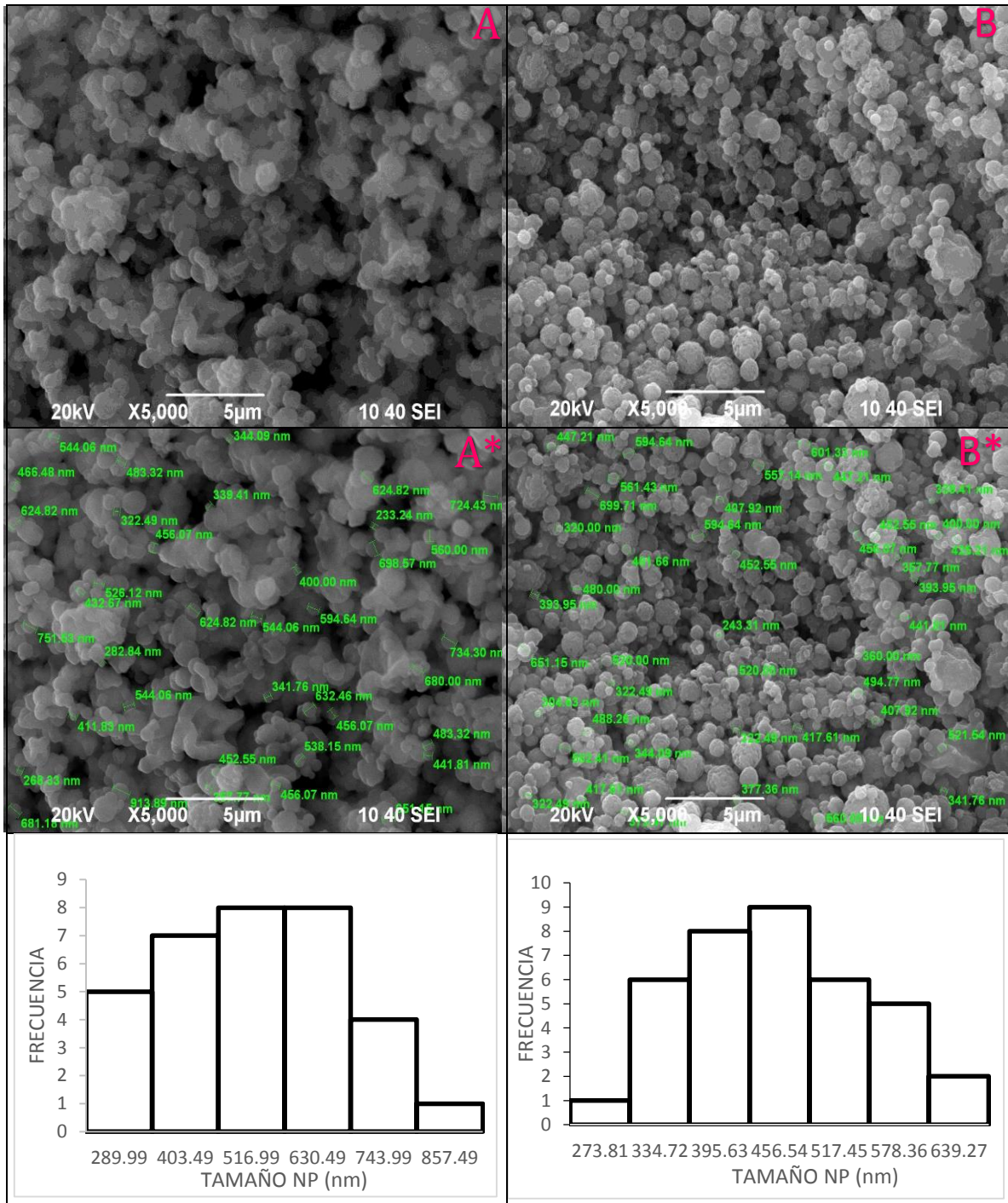


Figura	A*	B*
Nanocápsulas (NP)	NPP	NPEC
Material	PLGA	PLGA + Extracto Crudo de Aranto
Distribución de Tamaño (nm)	532.97 ± 153.31 nm	453.36 ± 95.18 nm

**Fig.47 Micrografía SEM a 5000X encapsulación con PLGA.**



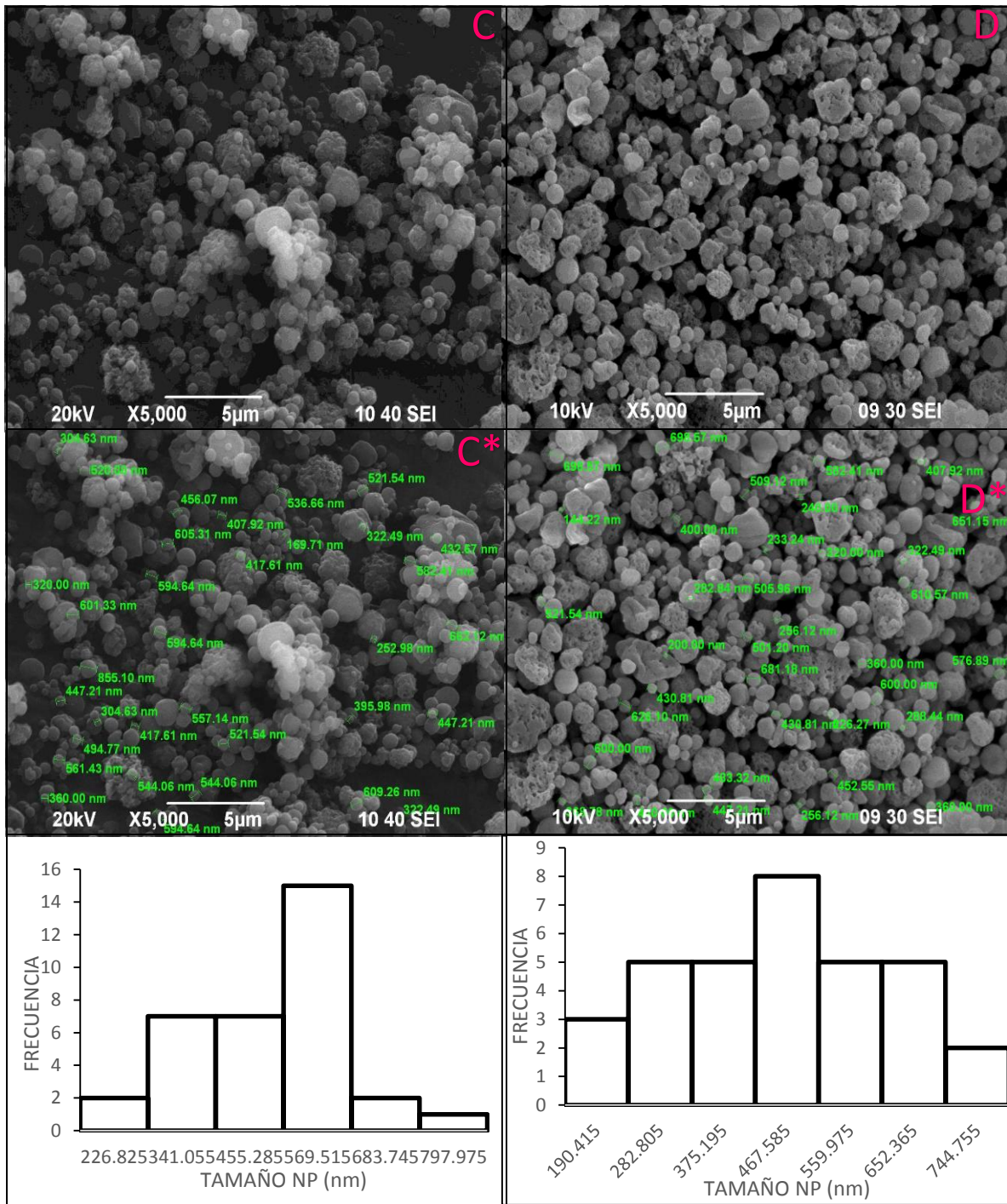


Figura	C*	D*
Nanocápsulas (NP)	NPF	NPT
Material	PLGA + Fracción Aranto	PLGA + Taxol
Distribución de Tamaño (nm)	485.99 ± 125.06 nm	460.34 ± 154.71 nm

**Fig.48 Micrografía SEM a 5000X encapsulación con PLGA.**

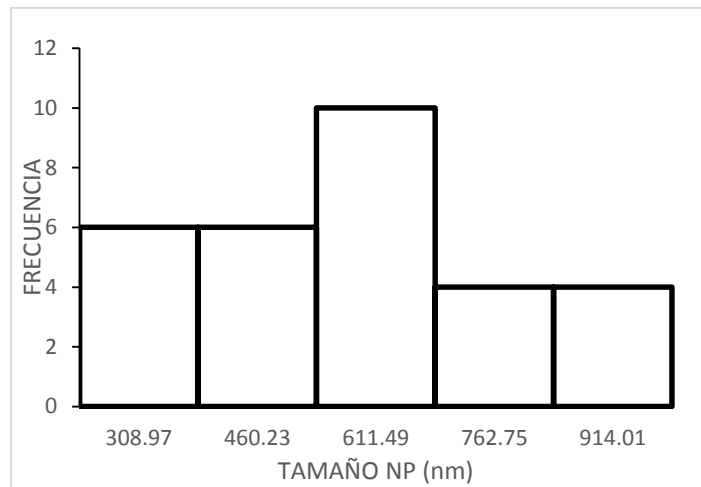
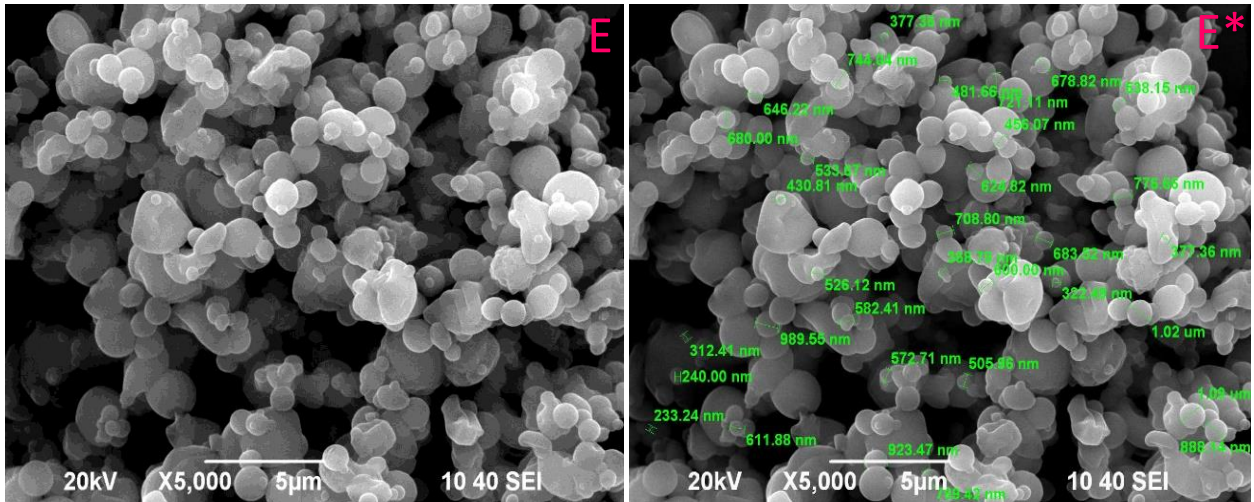


Figura	E*
Nanocápsulas (NP)	NPB
Material	PLGA + Bufalin
Distribución de Tamaño (nm)	595.98 ± 393.57 nm

**Fig.49 Micrografía SEM a 5000X encapsulación con PLGA.**

Se puede apreciar la distribución de tamaños de los cinco tipos de nanocápsulas sintetizadas (Figuras 47, 48 y 49), en donde se observa una distribución similar a la campana gaussiana oscilando con valores entre 450 a 600 nm, siendo las NPEC las de menor tamaño y las NPB de mayor tamaño, además que estas últimas presentan mayor aglomeración entre ellas y una morfología entre esféricas y ovoides, con una textura lisa. Cabe mencionar que aunque todas ellas fueron sintetizadas bajo las mismas condiciones de proceso por el método de Secado por Spray dryer, e incluso fue utilizado el mismo polímero y el mismo disolvente, todas presentaron diferente composición química entre ellas, de acuerdo con el principio activo encapsulado.

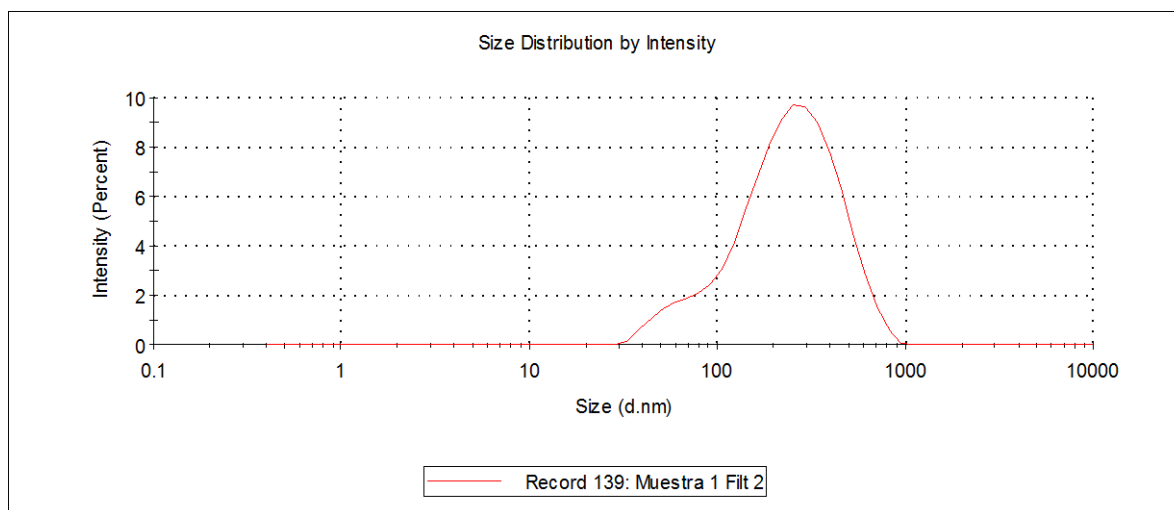
### 5.7.2. Determinación de Tamaño (Dispersión de Luz Dinámica) y Análisis de carga superficial (Potencial Z).

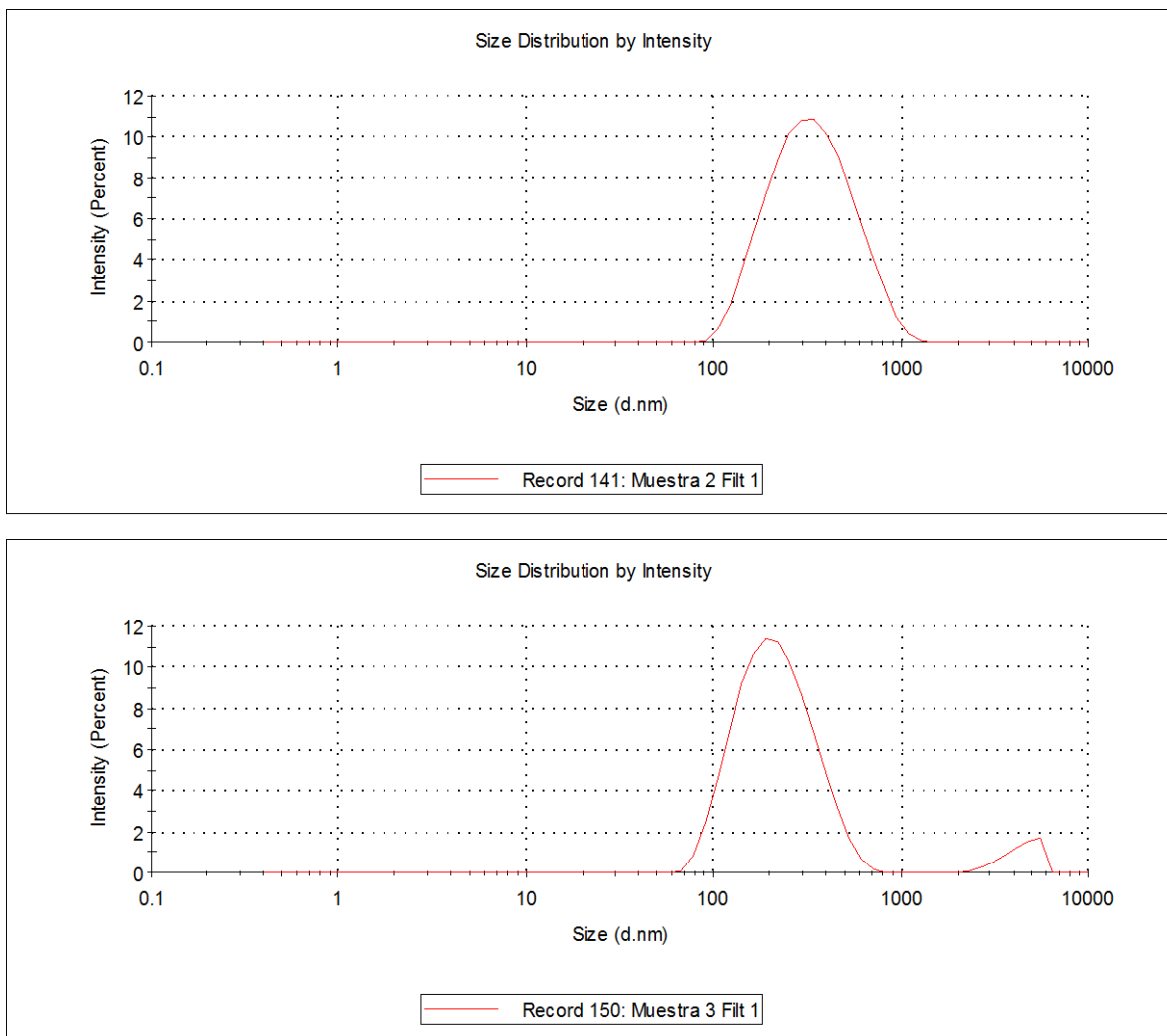
Los resultados obtenidos para el tamaño de diámetro de las nanocápsulas (nm) y potencial zeta (mV), fueron los siguientes:

**Tabla 14. Determinación de Tamaño y Análisis de carga superficial.**

Grupos	Tamaño de Partícula (nm) <sup>a</sup>	Índice de polidispersión	Potencial Zeta (mV) <sup>a</sup>	
			PBS	DMEM
<b>Medio de Disolución</b>			PBS	DMEM
<b>NPP (M1)</b>	197.13 ± 4.56	0.328	- 13.76 ± 0.55	-0.09 ± 0.17
<b>NPEC (M2)</b>	267.66 ± 6.32	0.266	-14.73 ± 1.81	-0.10 ± 0.04
<b>NPF (M3)</b>	196.13 ± 5.05	0.338	-20.23 ± 2.20	-0.01 ± 0.10
<b>NPT</b>			-15.73 ± 0.58	0
<b>NPB</b>			-15.60 ± 0.1	0
<b>DMEM</b>	---	---	---	-0.21 ± 0.40
<b>PBS</b>	---	---	0.04 ± 0.15	---
<b>LINEA CELULAR (MDA – MB -231)</b>	---	---	-15.23 ± 0.80	-9.93 ± 1.42
<b>LINEA CELULAR (MCF10A)</b>	---	---	+6.91 ± 0.98	

<sup>a</sup> Se determinó mediante dispersión de luz dinámica ( DLS ). Las muestras se prepararon disolviendo directamente los cinco tipos de NP en DMEM o PBS, a una concentración de 1 mg de nanocápsulas en 2 ml de medio, seguido de 5 min de sonicación a 25 KHz y filtración a 0.45 µm, y pH 11, para las líneas celulares se manejó pH de 7. Los resultados son las medias ± SD (n = 3).





**Fig 50. Dispersión de luz dinámica (DLS) de las NP. A) NPP (M1), B) NPEC (M2) y C) NPF (M3).**

De acuerdo con los resultados obtenidos por la técnica de (SEM) para el tamaño de partícula en comparación con los resultados que se tienen por la técnica de (DLS), se observa en todas ellas un menor tamaño por la técnica de (DLS), esto debido a que todas ellas están disueltas en un determinado medio y fueron filtradas, las tres muestras presentan buena calidad, en el caso de las NPEC, existe un tamaño de partícula homogéneo, y con un comportamiento monomodal ver Fig. 50 B; y para el caso de las NPP Y NPF (Fig.50 A y C) se observa un comportamiento bimodal, además de que los tres tipos de NP poseen carga negativa en su superficie, siendo las NPF las que tienen mayor carga negativa con  $-20.23$  mV, a un pH de 11; lo que sugiere que no hay estabilidad a largo plazo puesto que para asegurar la estabilidad se requieren valores superiores a  $\pm 30$  mV.

Sin embargo para el caso de las nanocápsulas que contienen paclitaxel, comparando con otros autores como (Hai Wang, et. al, 2011), que realizó nanopartículas con MPEG-PLGA, por el método de doble emulsión y que contienen doxorubicina – paclitaxel, muestra resultados muy similares para el potencial zeta de  $-21.6 \pm 0.14$  mV y tamaño de partícula de  $243.63 \pm 12.36$  nm, y polidispersidad (PDI) de 0.131. Y el autor (Wei Tao, et al, 2013), que sintetizó nanopartículas con (M-PLGA-TPGS)

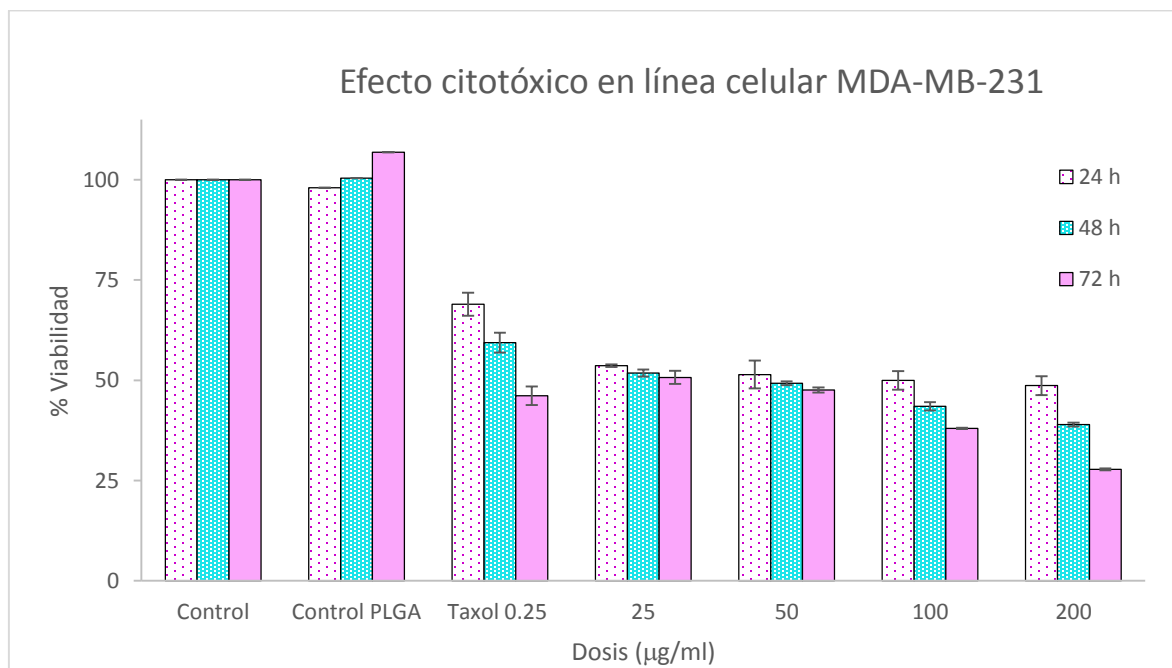
por el método de nanoprecipitación conteniendo Docetaxel obtuvo un potencial zeta de  $-11.7 \pm 1.9$  mV, y con un tamaño de partícula de  $91.3 \pm 3.9$  nm con PDI de 0.127.

Y para el caso de nanopartículas cargadas con bufalin, los autores Peihao Yin, et. al, 2012, hechas con (m PEG-PLGA-PLL-cRGD) por el método de emulsión, los resultados obtenidos fueron de  $+ 2.77$  mV y tamaño de partícula de  $164 \pm 84$  nm, y cuya finalidad es para el tratamiento de cáncer de colon. Nuestros resultados con respecto a estos últimos si difieren mucho, ya que las NPB nos dan un potencial zeta de  $-15.60$  mV, y bastante similar al resto de las NP, y todas ellas teniendo efecto citotóxico positivo para línea celular tumoral (MDA – MB -231), a excepción de las NPP, que es el control, cabe mencionar que estas nanocápsulas tienen menor carga negativa superficial que todas las demás nanocápsulas sintetizadas siendo de  $- 13.76 \pm 0.55$  mV y comparando con los autores (Wei Tao, et al, 2013), tienen como resultado  $-21.6 \pm 2.8$  mV para las nanocápsulas de PLGA .

### 5.8. Ensayos de Viabilidad y Citotoxicidad, en línea celular MDA-MB-231.

Se evaluó el efecto citotóxico de las nanocápsulas que contienen el Extracto Crudo acuotanólico, en línea celular MDA-MB-231, se probaron a concentraciones de (25, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), a tiempos de 24, 48 y 72 h. Cada ensayo se realizó por triplicado, en la Fig. 51 se pueden apreciar los porcentajes de viabilidad obtenidos para dicho tratamiento.

#### 5.8.1. Nanocápsulas de Extracto crudo de Aranto.



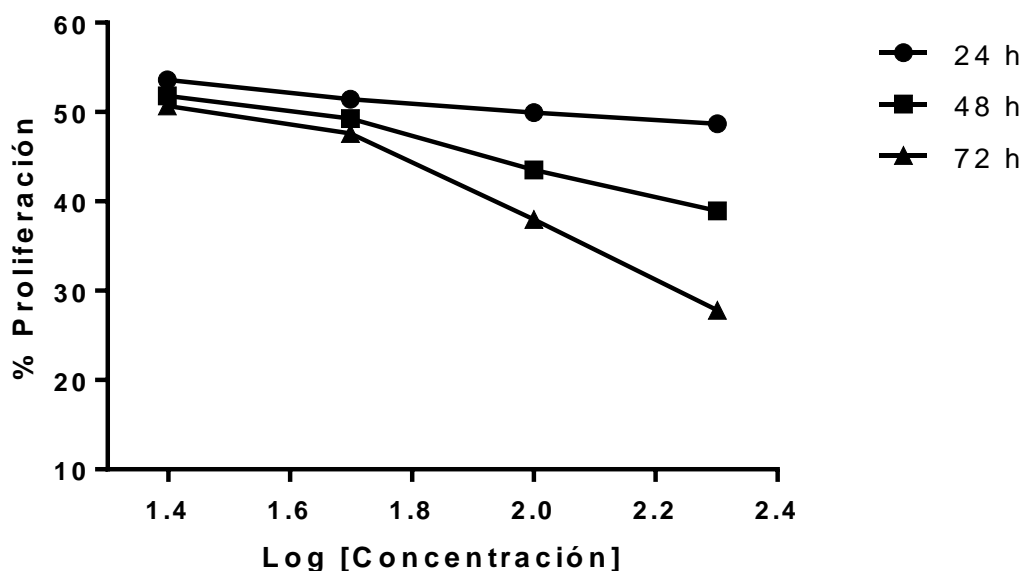
**Fig.51 Efecto citotóxico de nanocápsulas de extracto crudo del *K. daigremontiana*.**

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede apreciar que el porcentaje de viabilidad de las células que no se sometieron a ningún tratamiento es del 100%, con respecto a las células tratadas con el Control de PLGA, se considera que no hay un descenso celular significativo para las 24 h, y por el contrario para los tiempos de 48 y 72 h se observó un incremento no significativo, este tratamiento es de suma importancia ya que el PLGA se usó para la preparación de los cinco tipos de

nanocápsulas en los diferentes tratamientos, por lo que estos resultados muestran que este polímero no genera un efecto citotóxico en la línea MDA – MB – 231 y por lo tanto fue adecuado para la elaboración de nanocápsulas. Por otro lado al usar el Taxol, la viabilidad disminuyó hasta en un 54% para las 72 h. Mientras que las células con tratamiento en el que se probaron las nanocápsulas con el extracto crudo de *K. daigremontiana* demostraron que al tiempo de 24 h, si existe efecto citotóxico positivo presentándose a partir de la dosis más baja que es de 25 µg/ml alcanzando hasta en un 53.6 % de viabilidad celular y 50 % para las 72 h. No obstante se observa mayor muerte celular proporcionalmente al tiempo y a una mayor dosis respectivamente, ya que para la dosis de 200 µg/ml a las 24 h se presentó el 48.6 % de viabilidad celular y para las 72 h de 27.8 %.

Por otra parte comparando nuestros resultados del efecto citotóxico del extracto crudo de Aranto con respecto a las Nanocápsulas que contienen el extracto crudo de Aranto se observa una mayor efectividad.

Más aun al determinar los valores de IC<sub>50</sub> de las nanocápsulas con el extracto crudo de *K. daigremontiana* obtuvimos un IC<sub>50</sub> de 56.50 + 1.091 µg/ml (Fig. 50). Mientras que el IC<sub>50</sub> de extracto solo fue de 89.34 ± 1.951 µg/ml lo que muestra que las nanocápsulas si potencian el efecto citotóxico sobre las células de cáncer de mama MDA – MB – 231.



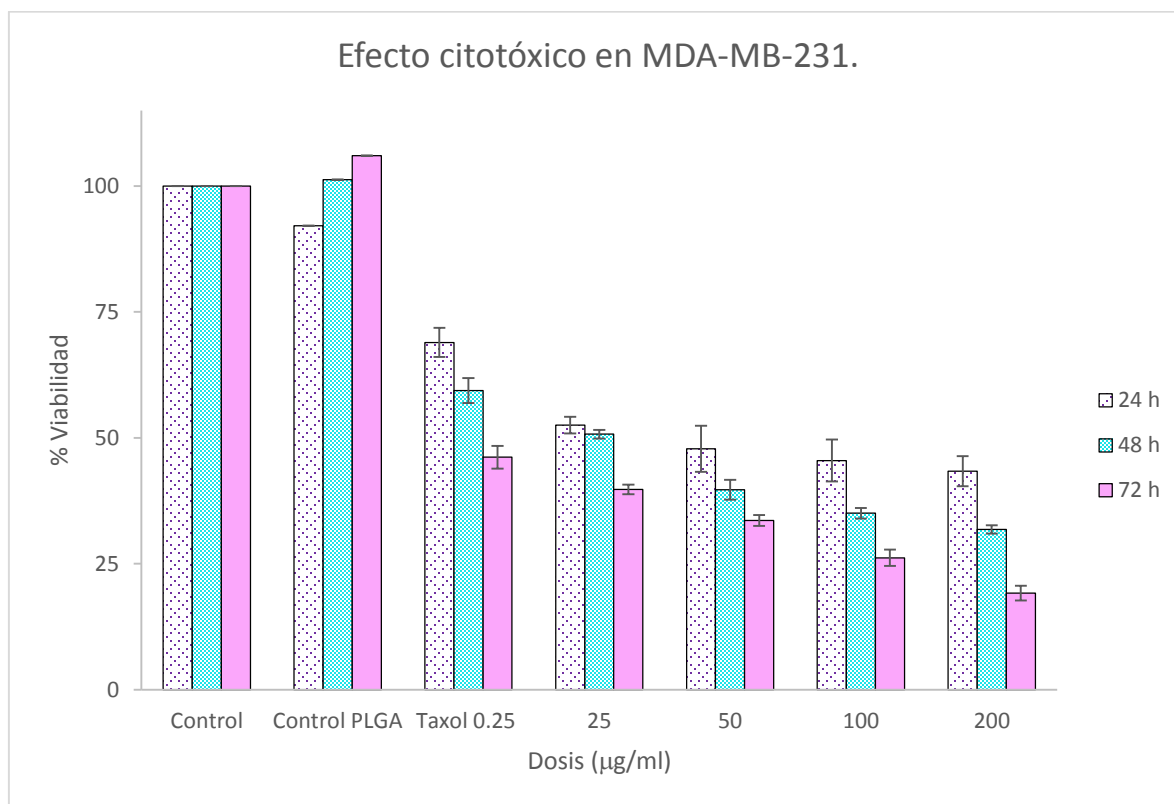
**Fig. 52 Gráfico del IC<sub>50</sub> para NP EC de *K. daigremontiana*, en línea celular MDA-MB-231.**

Resultando que el IC<sub>50</sub> para NP EC fue de 56.60 ± 1.091 µg/ml como se ve en la Fig.52.

### **5.8.2. Nanocápsulas que contienen la Fracción (F3) con mayor efecto citotóxico.**

Ahora bien, al realizar los ensayos con MTT pero utilizando ahora las nanocápsulas con la fracción F3 bajo las mismas concentraciones y tiempos trabajados, observamos que las células sin tratamiento la viabilidad es del 100% y las células tratadas con nanocápsulas de PLGA no afecta la

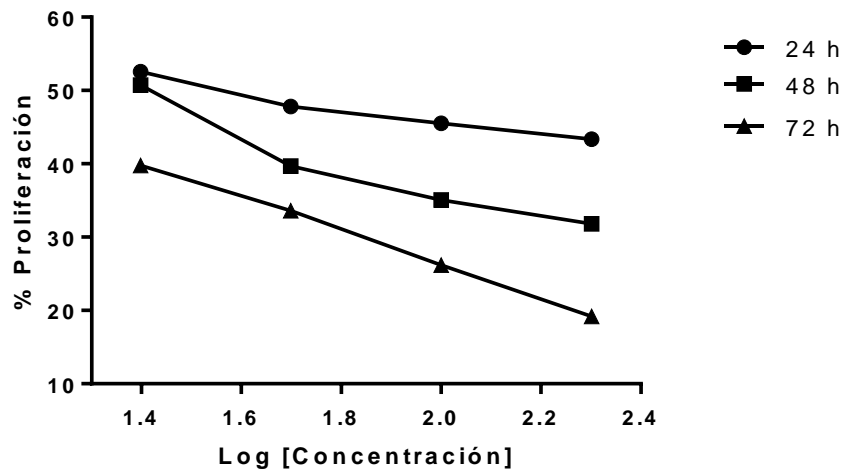
viabilidad de las células. Y para el control positivo (Taxol) es bien sabido que la viabilidad de las células disminuye conforme se incrementa el tiempo de tratamiento y aumenta la dosis, Fig.53.



**Fig.53 Efecto citotóxico de las NPF de *K. daigremontiana*.**

Para las células tratadas con nanocápsulas conteniendo la fracción de Aranto, resultó que la viabilidad de las células disminuyó de forma dosis dependiente con respecto al tiempo. Mostrando la NPF un mejor efecto citotóxico positivo, a partir de la dosis más baja de 25 µg/ml con un 52.5 % de viabilidad hasta alcanzar el 43.3 % para la dosis de 200 µg/ml a las 24 h (Fig. 51)

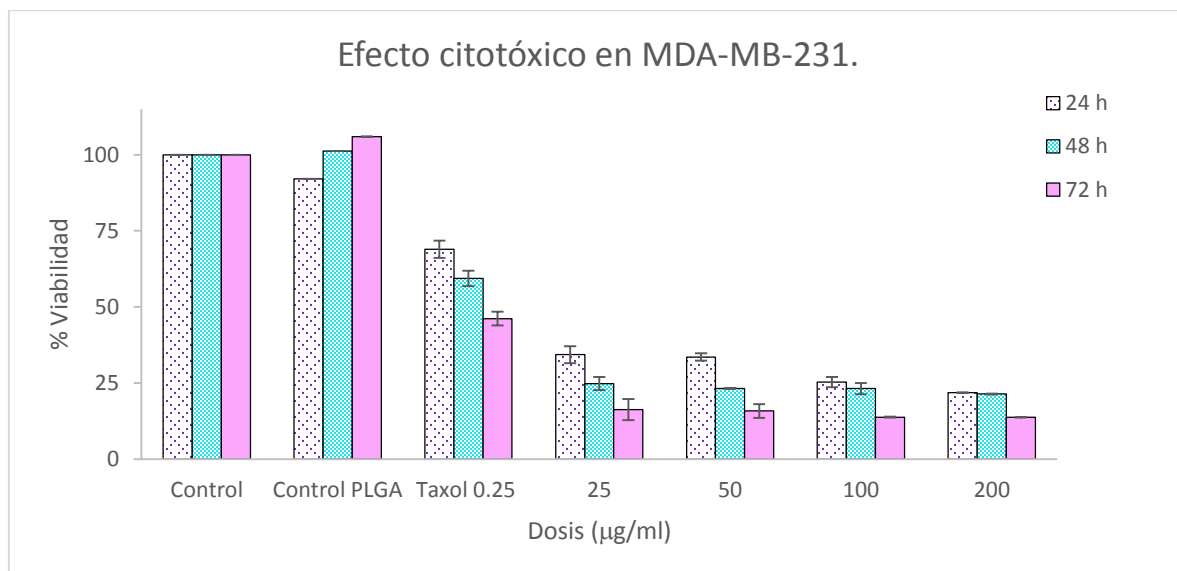
Comparando el efecto citotóxico generado por la F3 etanol: agua contra las NPF, en línea celular tumoral MDA-MB-231, se puede observar un efecto similar desde la dosis más baja de 25 µg/ml a las 24 h, donde se aprecia para la F3 un 51.2% de viabilidad y para la NPF del 52.5% de viabilidad, hasta alcanzar un 19.17 % de viabilidad respectivamente para la dosis de 200 µg/ml a las 72 h.



**Fig. 54 Grafico del IC<sub>50</sub> de NPF de *K. daigremontiana*, en línea celular MDA-MB-231.**

El IC<sub>50</sub> para las NPF fue de  $37.92 \pm 1.0861$   $\mu\text{g/ml}$ , de acuerdo con la Fig.54, se aprecia que las NPF, tienen un efecto citotóxico positivo con alto potencial, ya que la nanoencapsulación ha demostrado optimizar el efecto de la fracción de Aranto.

### 5.8.3. Nanocápsulas que contienen Paclitaxel (Taxol)



**Fig.55 Efecto citotóxico de nanocápsulas que contienen Paclitaxel.**

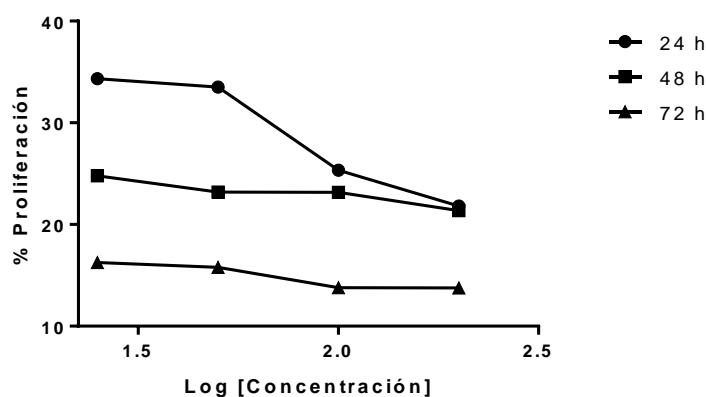
Los resultados muestran que el control presenta una viabilidad del 100 % de viabilidad en los tres tiempos, y para el caso del control de NP PLGA, para el tiempo de 24h cuenta con el 92 % de viabilidad, incrementando para los tiempos de 48 y 72 h, no significativos (Fig.55). Nuestros resultados concuerdan con los publicados por W. Tao et al. , 2013, donde sus resultados para los controles de las NP PLGA, oscilan entre el 90 y 96% viabilidad para los tres mismos tiempos. Ahora bien, el objetivo de este ensayo fué determinar el efecto citotóxico que tienen estas nanocápsulas de Taxol, sintetizadas por este método y su IC<sub>50</sub>, ya que del estándar de Paclitaxel (Taxol), es bien



conocido su  $IC_{50}$  con un valor de 200 nM o bien 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . El ensayo se evaluó a los tiempos de 24, 48 y 72 h. Debido al efecto citotóxico observado en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, al sintetizar las nanocápsulas con el extracto o a con la F3 del *K. daigremontiana*, decidimos encapsular también el Taxol con la finalidad de observar si era posible potenciar su efecto citotóxico por lo que nuestros resultados generados para el tratamiento con Taxol a la dosis de 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  se presentaron del 68.9%, 59 % y 46% de viabilidad a los tiempos de 24 h, a 48 h y 72 h respectivamente contrastando con los resultados de W. Tao et al., 2013 quienes usaron Taxotere encapsulado como control a la misma dosis de 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y obtuvieron 82 %, 70 %, y 68% de viabilidad a las 24, 48 y 72 h respectivamente.

Más aun el efecto citotóxico que presentaron nuestros resultados dado por las NPT a la concentración de 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para las 24 h fue de 34.33 %, a las 48 h de 24.7 % y para las 72 h del 16.2%. Mientras que para la misma dosis a 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de las Nanocápsulas que contienen Taxotere elaboradas con PLGA (Tao, et. al, 2013) a las 24 h presentaron 42 % de viabilidad, para las 48 h del 35 % y para las 72h del 30 % de viabilidad, mostrando nuevamente porcentajes de viabilidad más altos con respecto a nuestros resultados, lo que muestra que nuestras NPT son más eficientes en encapsular y “liberar” el Taxol generando un mayor efecto citotóxico. Entonces podemos decir que la viabilidad de las células disminuye conforme se incrementa el tiempo de tratamiento y aumenta la dosis, cabe mencionar que la línea celular utilizada por W. Tao es la MCF-7.

De acuerdo con la Fig.56 se presenta el gráfico para  $IC_{50}$  que fue de  $13.34 \pm 1.0222 \mu\text{g}/\text{ml}$ , para las NPT. Y realizando la comparación con los autores Wei Tao, et. al., 2013, que elaboraron nanopartículas de PLGA-TPGS cargadas con docetaxel, reportan los siguientes  $IC_{50}$ , para sus ensayos de citotoxicidad en línea celular MCF7; para los tiempos de 24, 48, y 72 h, ver tabla 13.



**Fig. 56 Gráfico del  $IC_{50}$  de NPT en línea celular MDA-MB-231.**

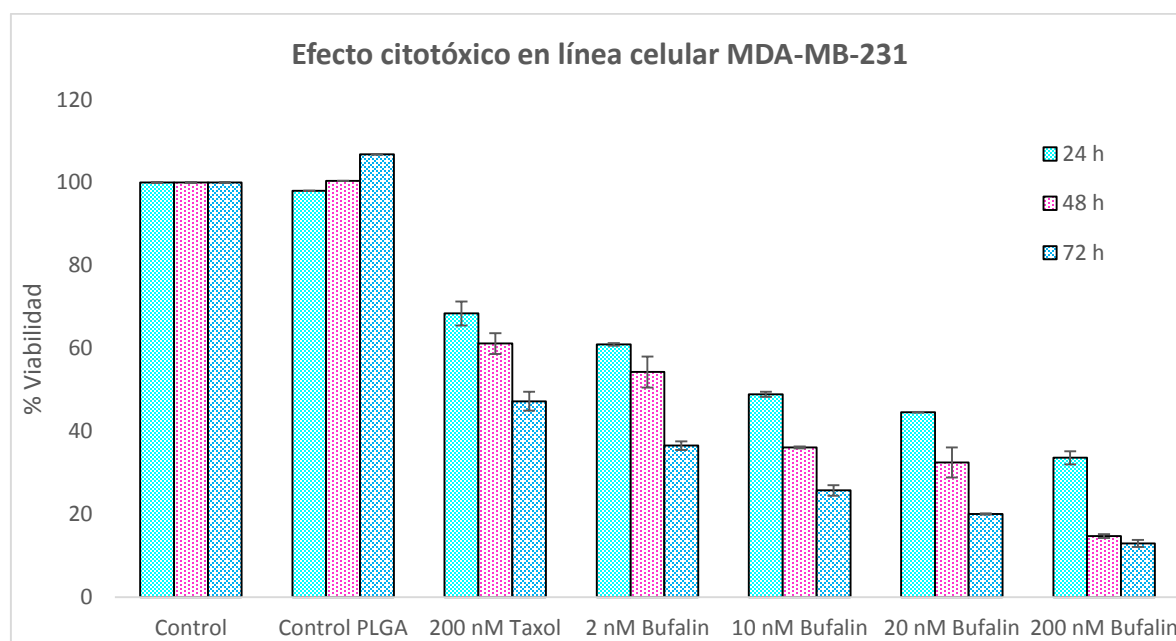
**Tabla 15. Comparación de IC<sub>50</sub> de Nanocápsulas de Taxol.**

Tiempo de Incubación (h)	IC <sub>50</sub> (μg ml <sup>-1</sup> )	IC <sub>50</sub> (μg ml <sup>-1</sup> ) ; (Wei Tao, et. al., 2013)
24	21.39 ± 1.347	20.87 ± 1.78
48	13.59 ± 1.495	9.00 ± 0.82
72	7.331 ± 1.453	3.51 ± 0.06

Como se aprecia en la Tabla 15. Los resultados obtenidos para el IC<sub>50</sub>, a los diferentes tiempos son similares a los reportados por los autores Wei Tao, *et. al.*, 2013; cabe mencionar que se usó el mismo polímero pero el método de elaboración de las NP es diferente utilizando nanoprecipitación con un 84% de eficiencia de encapsulación, con 120 nm de tamaño, y  $-15.3 \pm 3.2$  mV.

#### 5.8.4. Ensayos de citotoxicidad tratamiento con Bufalin.

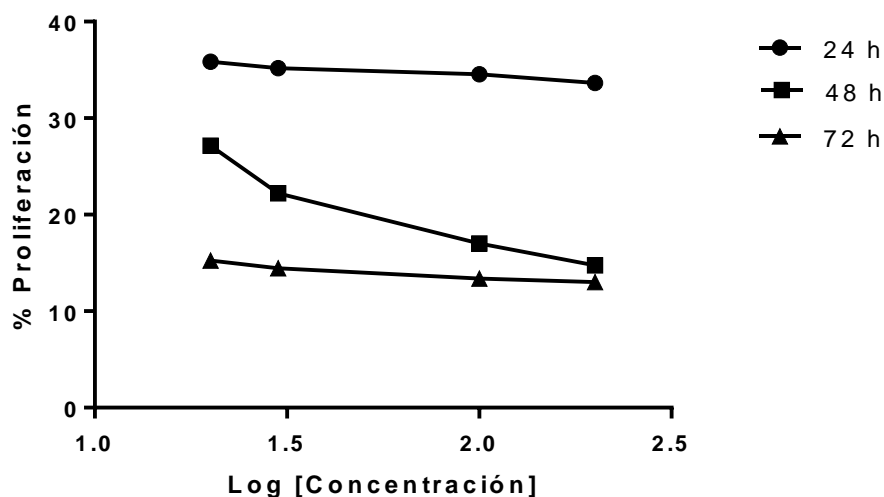
De acuerdo con la Fig.57 como se muestra, el objetivo principal fue determinar el IC<sub>50</sub> para el estándar de bufadienólido (bufalin), para obtener esta información previamente se tuvieron que realizar ensayos de citotoxicidad a diferentes concentraciones, se eligieron a 200 y 20 nM de acuerdo con lo propuesto por (Jian-Yang Hu, et. al, 2015), y otras dos concentraciones por debajo de 20 nM, las cuales fueron a 10 y 2 nM, para obtener un intervalo mayor, de datos.



**Fig.57 Efecto citotóxico del Bufalin en línea celular MDA-MB-231.**

Como se aprecia en la Fig.57 a partir de la menor dosis (2nM de Bufalin), se observa un decaimiento significativo en la viabilidad celular del 40% aproximadamente, para el tiempo más corto de 24 h, y comparando con el Taxol incluso se aprecia mayor muerte celular, utilizando una concentración cien veces menor, para la dosis de 200 nM y al tiempo más largo (72h) se observa el 13 % de Viabilidad celular, con respecto a los controles que mostraron un 100 % de viabilidad celular. En general se

observa una respuesta dosis y tiempo dependiente mostrando una clara diferencia significativa con respecto a los controles.

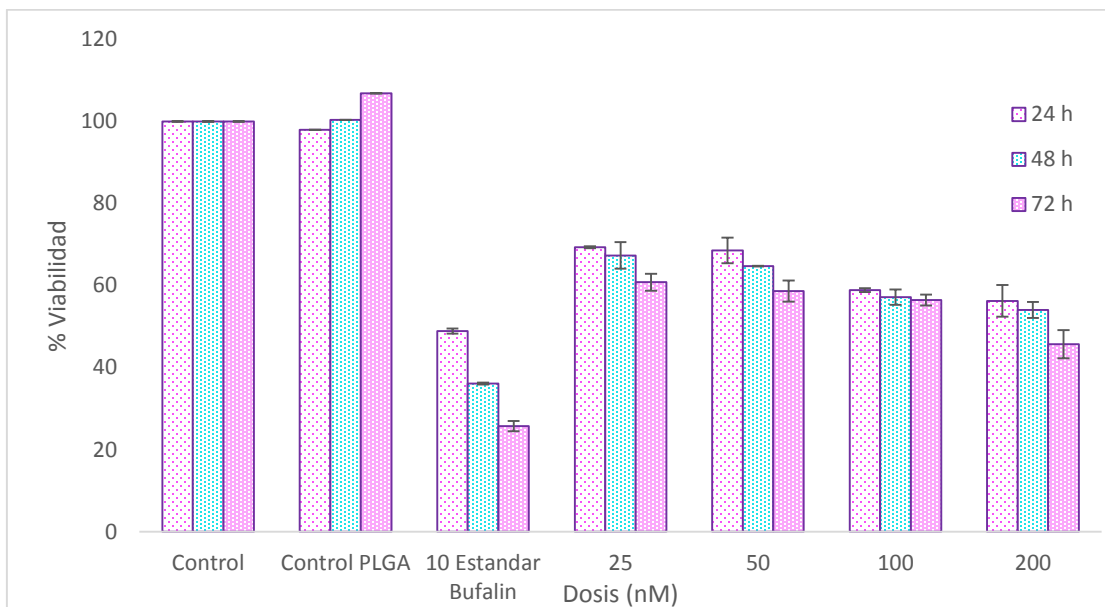


**Fig. 58 Grafico del IC<sub>50</sub>, del Bufalin en línea celular MDA-MB-231, para 24, 48 y 72h.**

El IC<sub>50</sub> para el estándar de bufalin fue de  $9.932 \pm 0.9222$  nM, de acuerdo con la Fig.58, se aprecia que incluso a una dosis mucho menor que la del Taxol, el estándar de bufalin tiene un alto efecto citotóxico positivo, siendo alrededor de 10 nM.

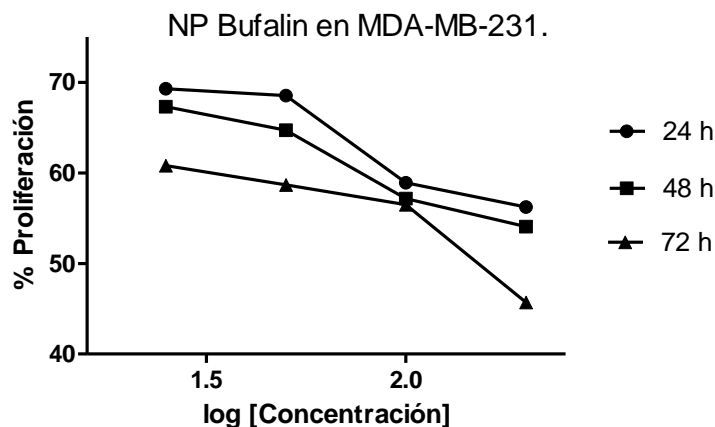
#### **5.8.5. Nanocápsulas que contienen Bufalin**

Para el tratamiento que se efectuó con nanocápsulas que contienen Bufalin, podemos apreciar efecto citotóxico positivo, de las nanocápsulas a las 24 h y a partir de la dosis de 25  $\mu\text{g/ml}$ , observando el 69% de viabilidad, y esto comparando con los controles es un decaimiento significativo, sin embargo comparando las nanocápsulas que contienen el estándar de bufalin con respecto al estándar de bufalin podemos ver que se usa una dosis muy pequeña que es del 10 nM, tiene un efecto citotóxico positivo mucho mayor que las NPB, viendo que para el estándar tiene un 50% de viabilidad al tiempo de 24h. Entonces se observa que el efecto citotóxico es tiempo dependiente, como se aprecia en la Fig. 59.



**Fig.59 Efecto citotóxico de NPB, en línea celular MDA-MB-231.**

De acuerdo con las figuras 59 y 60, se puede decir que el estándar de Bufalin tiene un alto potencial citotóxico, sin embargo cuando se realiza la nanoencapsulación del estándar de bufalin, se observa que disminuye su potencial citotóxico. Esto se puede corroborar al hacer el análisis de  $IC_{50}$ , como sigue:



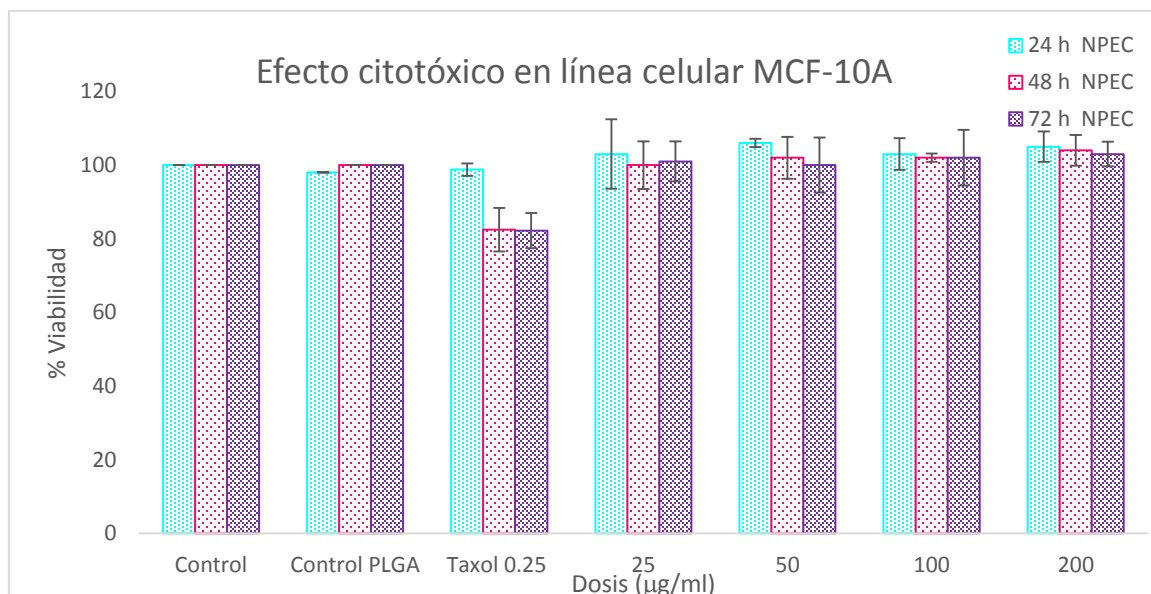
**Fig. 60 Grafico del  $IC_{50}$  de NPB, en línea celular MDA-MB-231, para 24,48 y 72h.**

El  $IC_{50}$  para las NPB fue de  $122.8 \pm 1.119 \mu\text{g/ml}$ , y comparado con el  $IC_{50}$  del estándar de 10 nM, se puede decir, que disminuye su potencial citotóxico positivo al nanoencapsular.

### 5.9. Ensayos de Viabilidad y Citotoxicidad, en línea celular MCF10A.

Se evaluó el efecto citotóxico de las nanocápsulas que contienen el Extracto Crudo acuotanólico, en línea celular MCF10A, se probaron a concentraciones de (25, 50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ ), a tiempos de 24, 48 y 72 h. Cada ensayo se realizó por triplicado, en la Fig.61 se pueden apreciar los porcentajes de viabilidad obtenidos para dicho tratamiento. Se puede detectar que las células control mantienen

aproximadamente el 100% de viabilidad, también se observó un comportamiento igual con las células que se incubaron con las nanocápsulas de PLGA a la dosis máxima esto es a (200  $\mu\text{g/ml}$ ) y por el contrario con el Taxol, existe una disminución significativa en el porcentaje de viabilidad dependiendo la concentración y el tiempo de tratamiento.



**Fig.61 Efecto citotóxico de NPEC del *K. daigremontiana* en línea Celular MCF10A.**

Como observa de acuerdo con la Fig. 61 los resultados obtenidos; no muestran un decaimiento en el porcentaje de viabilidad al tratar a las células con nanocapsulas que contiene el extracto crudo de *K. daigremontiana*, por el contrario incluso a partir de la dosis más baja esto es a 25  $\mu\text{g/ml}$ , hasta dosis más altas de 200  $\mu\text{g/ml}$  se aprecia un leve incremento por arriba del 100% a un tiempo de 24 h y al igual que a las 72 h, siendo no significativo con respecto a las células sin tratamiento.

Estos resultados nos muestran la encapsulación del extracto acuotánico con el PLGA genera que el extracto no induzca la muerte de las células MCF10A contrario a lo mostrado, anteriormente en donde el extracto sin encapsulación si indujo la muerte celular en esta línea por lo que la nanoencapsulación del extracto acuotánico ha cumplido con el principal objetivo, de no causar muerte en línea celular MCF10A. Cabe mencionar que para el tratamiento con NPEC, no se pudo determinar el  $\text{IC}_{50}$  ya que no se pudo medir ni observar efecto citotóxico positivo en esta línea celular.

### 5.9.1. Nanocápsulas que contienen la Fracción.

Para el tratamiento que se efectuó con nanocápsulas que contiene la Fracción, podemos apreciar que o existe efecto citotóxico positivo significativo de las nanocápsulas a las 24 h y a partir de la dosis de 25  $\mu\text{g/ml}$ , observando el 97 % de viabilidad, y esto comparando con los controles, se podría decir que se mantiene en el porcentaje de viabilidad, para las 72h a la dosis de 25  $\mu\text{g/ml}$ , se observa el alrededor del 82% de Viabilidad, y para la dosis más alta utilizada a 200  $\mu\text{g/ml}$ , presenta cerca del 70% de viabilidad, ver Fig.62.

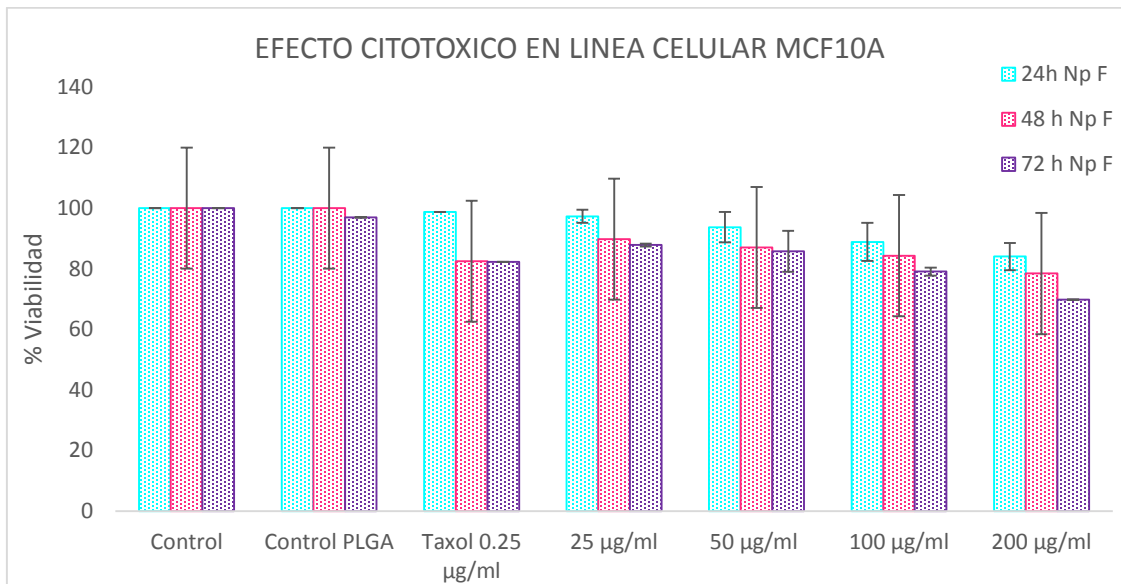


Fig.62 Efecto citotóxico de NPF de *K. daigremontiana*.

Con esto podríamos decir que el proceso de nanoencapsulación ayudo a evitar considerablemente la muerte celular en la línea normal MCF10A, también se realizó el análisis para determinar el IC<sub>50</sub>, en donde se determinó que fue de 582.5 ± 1.23 µg/ml, como se muestra en la Fig. 63, en donde se requeriría una dosis muy alta, o bien tiempos muy prolongados, para apenas observar efecto citotóxico positivo.

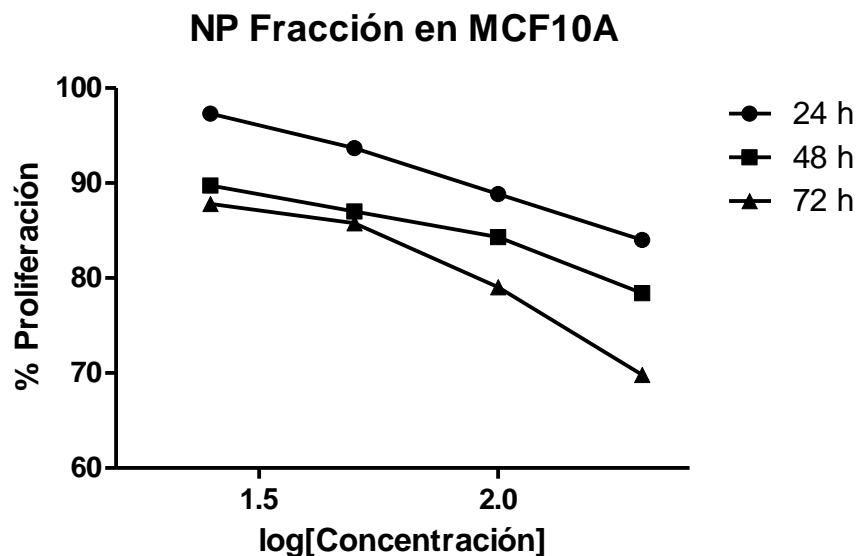
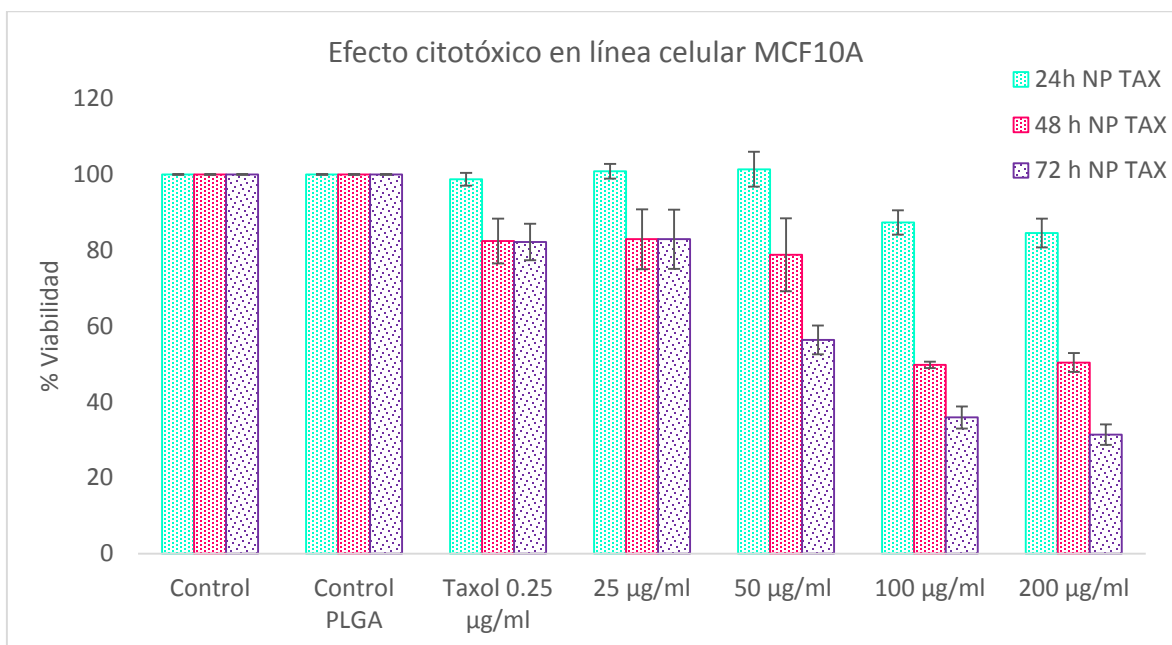


Fig. 63 Grafico del IC<sub>50</sub> de NPF de *K. daigremontiana* en línea celular MCF10A.

### 5.9.2. Nanocápsulas que contienen Taxol.

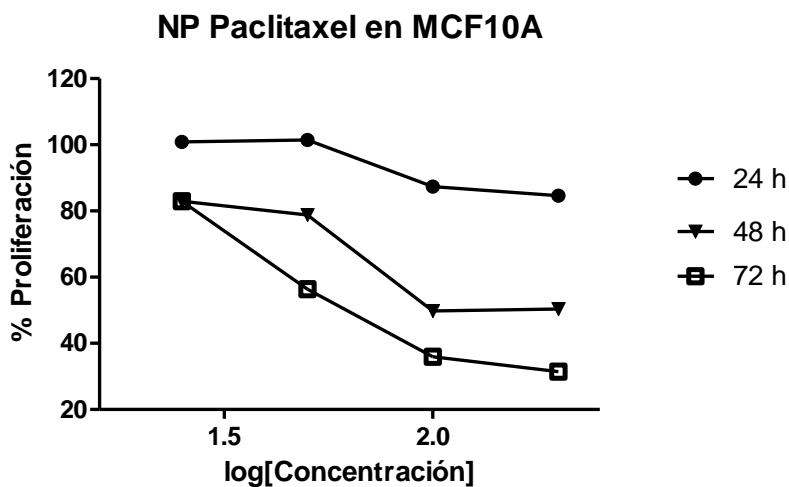
De acuerdo con la Fig. 64 se observa que para el tiempo de 24h, no existe un efecto citotóxico positivo considerable, sin embargo para los tiempos de 48 y 72 h, se aprecia que hay un decaimiento en el porcentaje de viabilidad esto aumentando respectivamente de acuerdo con la dosis y mayor

tiempo de exposición del tratamiento, que va desde un 82 % para la dosis de 25  $\mu\text{g/ml}$ , hasta a 31% para la dosis de 200  $\mu\text{g/ml}$  a las 72h, que comparado con el Taxol sin encapsular como control presenta un decaimiento significativo.



**Fig.64 Efecto citotóxico de NPT en línea celular MCF10A.**

También se determinó el  $\text{IC}_{50}$  en donde el resultado fue de  $189.1 \pm 0.889 \mu\text{g/ml}$ , como se puede apreciar en la sig. Fig. 65

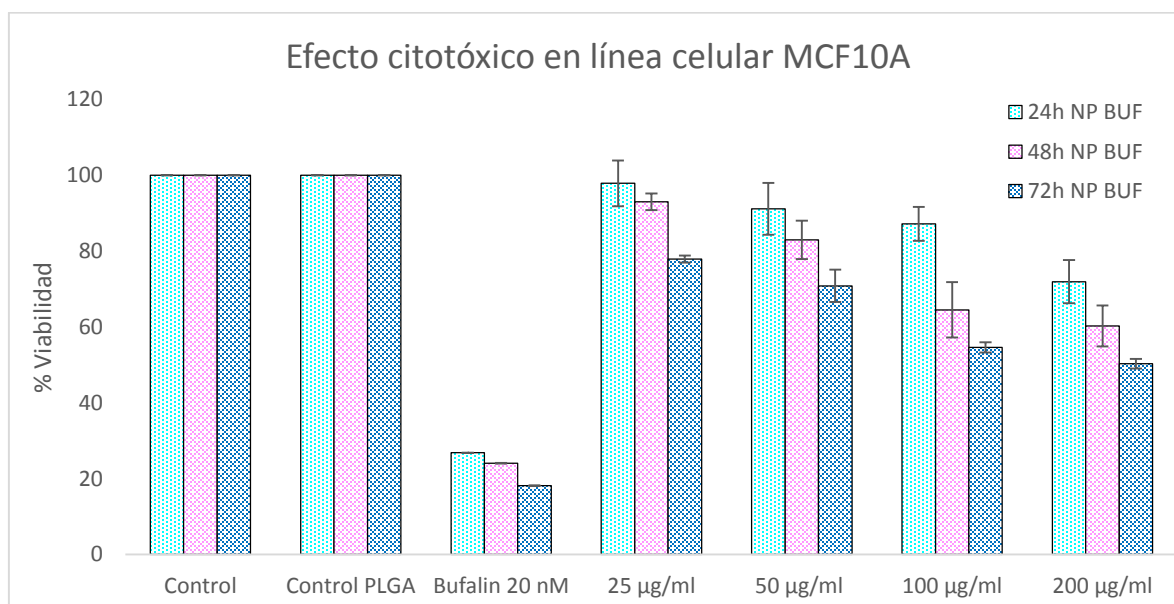


**Fig. 65 Grafico del  $\text{IC}_{50}$  de NPT en línea celular MCF10A.**

En la Fig.65 se puede ver que el  $\text{IC}_{50}$  del taxol nano encapsulado es elevado con respecto al reportado para el  $\text{IC}_{50}$ , (0.25  $\mu\text{g/ml}$ ) del taxol sin encapsular.

### 5.9.3. Nanocápsulas que contienen Bufalin.

Para el tratamiento que se efectuó con nanocápsulas que contiene el bufalin, podemos apreciar ver Fig.65 que existe efecto citotóxico positivo sin embargo no es tan alto con respecto al control de estándar de bufalin a dosis muy baja de tan solo 20 nM, presenta un alto porcentaje de muerte celular, teniendo así únicamente el 20 % de viabilidad, para el caso del tratamiento con las nanocápsulas a las 24 h y a partir de la dosis de 25 µg/ml, observando el 97 % de viabilidad, y para las 72h a la dosis de 25 µg/ml se observa el alrededor del 77 % de Viabilidad, y para la dosis más alta utilizada a 200 µg/ml, presenta cerca del 70% de viabilidad, para las 24 h, y del 50% de viabilidad para las 72 h.



**Fig.65 Efecto citotóxico de NPB en línea celular MCF10A.**

Se determinó el  $IC_{50}$  en donde el resultado fue de  $259 \pm 1.113$  µg/ml, como se puede apreciar en la sig. Fig.66



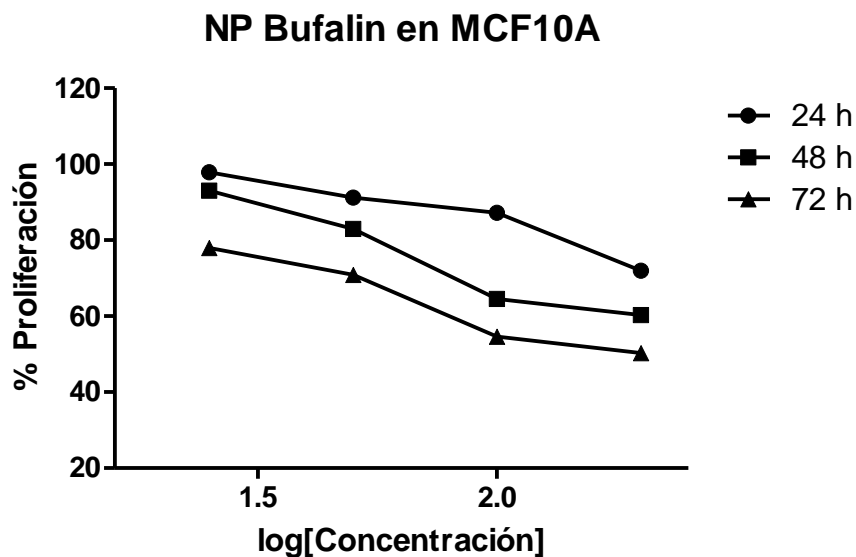


Fig. 66 Grafico del IC<sub>50</sub> de NPB en línea celular MCF10A.

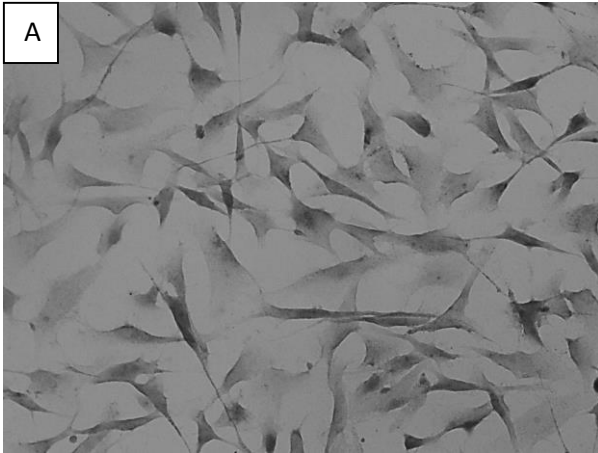
#### 5.9.4. Morfología frente al tratamiento en línea celular MDA-MB-231.

Los primeros signos de muerte celular consisten en la separación de las células preapoptóticas de sus vecinas, con lo cual adquieren una forma más redondeada. En el núcleo, inicialmente la cromatina (ADN + proteínas) se agrupa o condensa en grandes masas, y luego el ADN se fragmenta debido a la acción de enzimas (endonucleasas). A nivel citoplasmático se forman vacuolas y el citoplasma se fragmenta, manteniéndose la membrana plasmática intacta. Los fragmentos citoplasmáticos se denominan cuerpos apoptóticos y juegan un papel importante en la estimulación de la fagocitosis de estas células por parte de células vecinas y/o macrófagos. En estos casos no existe respuesta inflamatoria ya que la eliminación de los fragmentos celulares se realiza sin que haya liberación del contenido celular hacia la matriz extracelular, además la célula apoptótica induce en el fagocito la síntesis y secreción de moléculas antiinflamatorias, y por el contrario en la necrosis sí existe respuesta inflamatoria ya que existe liberación del contenido celular hacia la matriz extracelular (Estanislao, 2010).

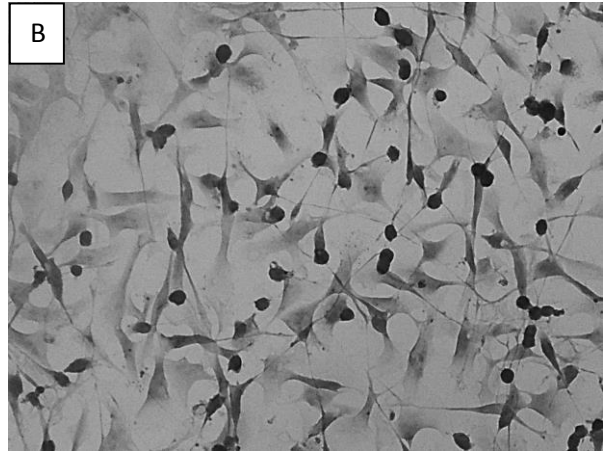
A continuación se muestran algunas fotografías de células tumorales expuestas a los diferentes tratamientos realizados en este trabajo, apreciando así la morfología que presentan después de haber sido expuestas al tratamiento. Las células tumorales fueron expuestas al extracto acuotánico, la fracción del extracto, Taxol, y Bufalin, así como las nanocápsulas con extracto, con la fracción, Taxol, y Bufalin, también se presentan los controles, que fueron células sin tratamiento y con nanocápsulas de PLGA.

Como se muestra en la fig 67, se observa que las células sin tratamiento (A) y células con NP PLGA (B) poseen una forma alargada, y muy cercanas una de la otra formando parte de una monocapa. Por otro lado las células que han sido tratadas con Taxol (D) han desarrollado cambios importantes existe un redondeamiento (forma esférica) y disminución de su tamaño, observando así la formación de cuerpos apoptóticos.

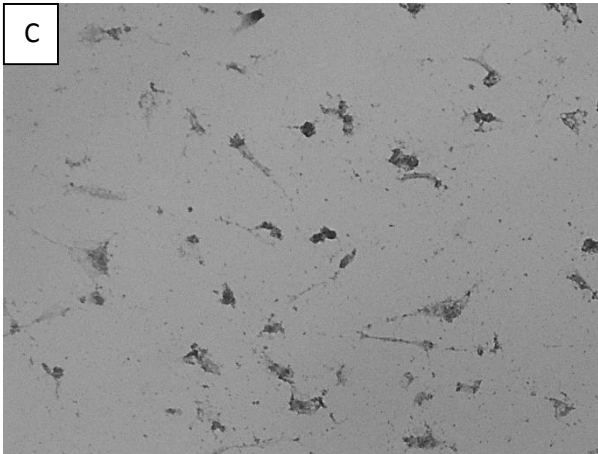
**CONTROL**



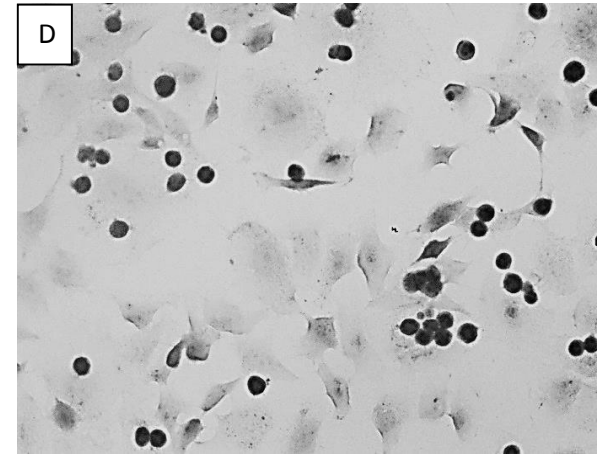
**EXTRACTO CRUDO ARANTO**



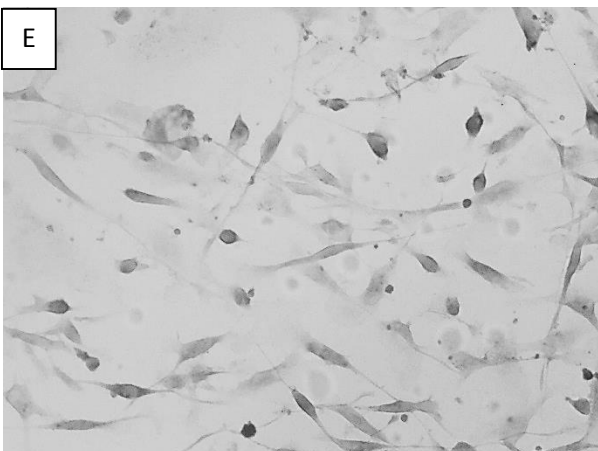
**FRACCIÓN ARANTO**



**PACLITAXEL**



**BUFALIN**

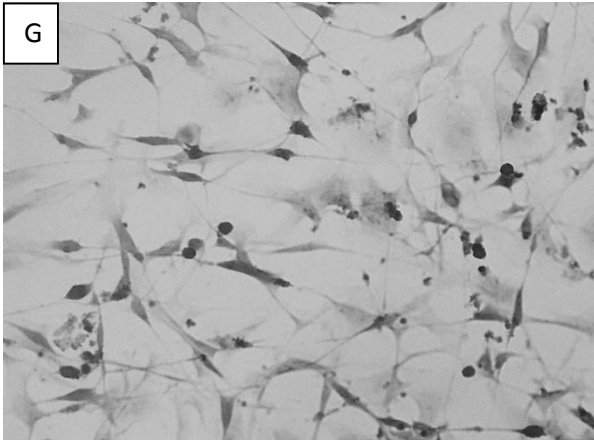


**NP PLGA (CONTROL)**

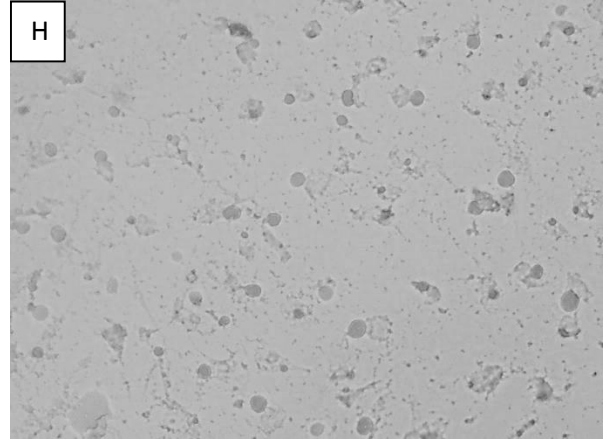


**Fig. 67** Línea celular MDA-MB-231 tiempo de tratamiento 24 h. A-F) Muestras a 40x.

### NP EXTRACTO CRUDO ARANTO



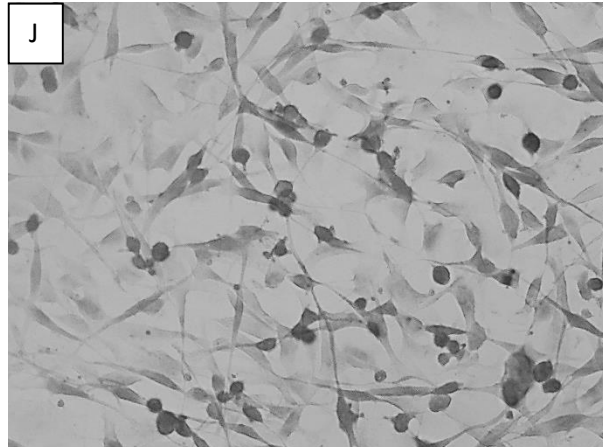
### NP FRACCIÓN ARANTO



### NP PACLITAXEL



### NP BUFALIN



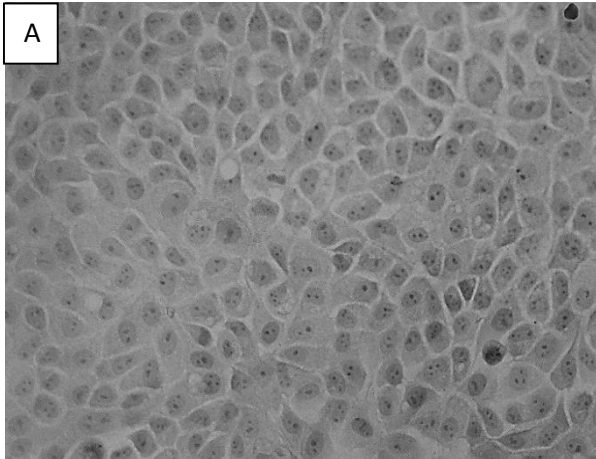
**Fig. 68** Línea celular MDA-MB-231 tiempo de tratamiento 24h. G-J) Muestras a 40x.

Con respecto a las células que fueron tratadas B, C, D, E, G, H, I y J, Fig.68 se observaron cambios morfológicos significativos, a partir de las 24 h de tratamiento y la dosis empleada fue el  $IC_{50}$  respectivamente para cada tratamiento, se observó reducción en el tamaño celular en las células, en algunas otras se aprecia su típica forma alargada, pero en C y H, evidentemente se aprecia la forma redondeada de las células, sugiriendo que el extracto, la F3, bufalin, taxol, NPEC, NPF, NPT y NPB, están induciendo una muerte por apoptosis, en las células MDA-MB-231.

#### **5.9.5. Morfología frente al tratamiento en línea celular MCF10A.**

Las células normales fueron tratadas con las nanocápsulas de PLGA con cada uno de los tratamientos la dosis que se usó fue respectivamente su  $IC_{50}$ , también se realizaron los controles (células sin tratamiento y células expuestas a nanocápsulas de PLGA sin contener el extracto acuotánico de *K. daigremontiana*) y el positivo (Taxol). Como se muestra en la Fig. 69, se observa que las células sin tratamiento (A) y células con control PLGA (F) así como células tratadas a su  $IC_{50}$  respectivo de las nanoencapsulas (G,H y J) poseen una forma bien definida, y muy cercanas una de la otra, mostrando ser un cultivo de células viables.

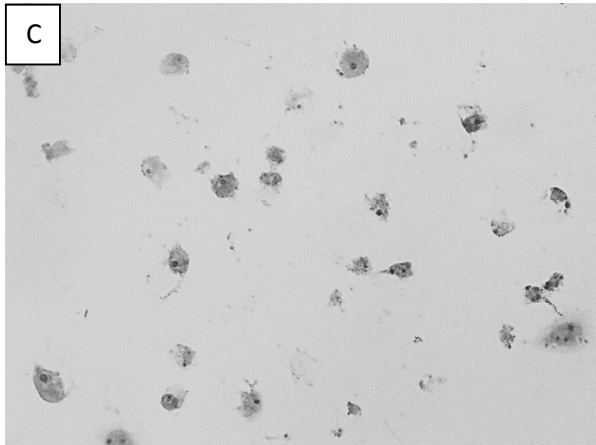
**CONTROL**



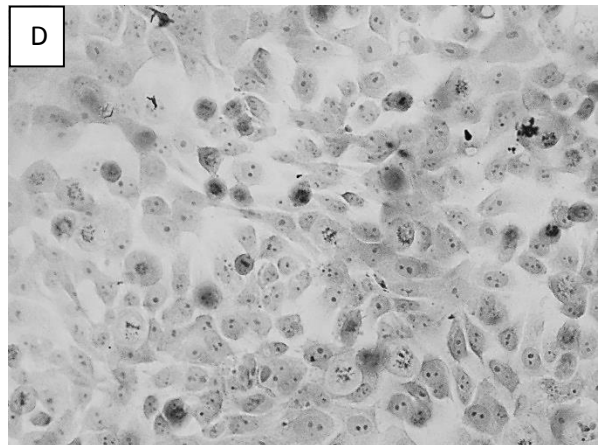
**EXTRACTO CRUDO ARANTO**



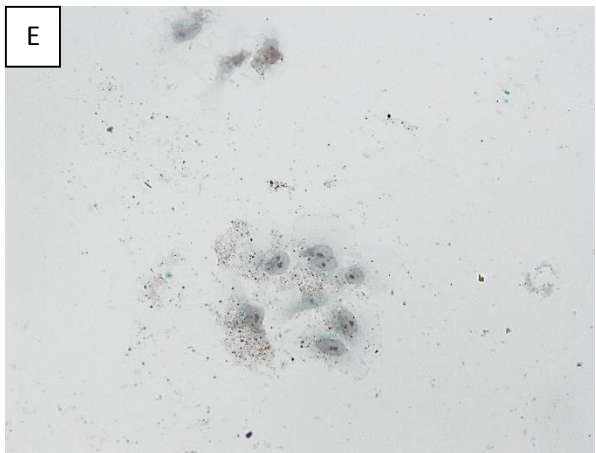
**FRACCIÓN ARANTO**



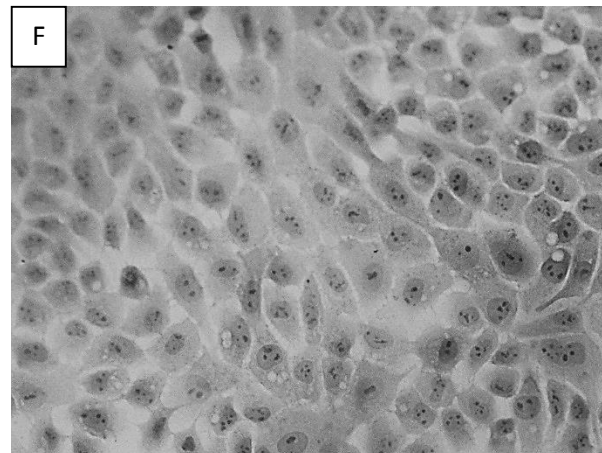
**PACLITAXEL**



**BUFALIN**

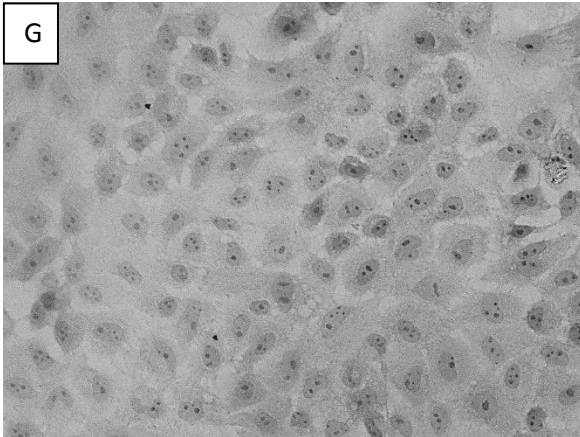


**NP PLGA (CONTROL)**

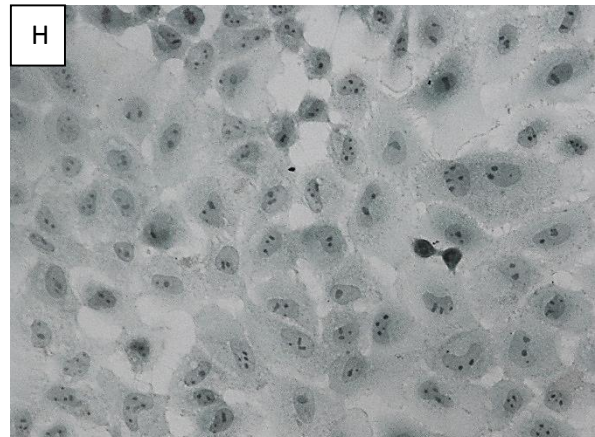


**Fig. 69** Línea celular MCF10A tiempo de tratamiento 24h. G-J) Muestras a 40x.

### NP EXTRACTO CRUDO ARANTO



### NP FRACCIÓN ARANTO



### NP PACLITAXEL



### NP BUFALIN

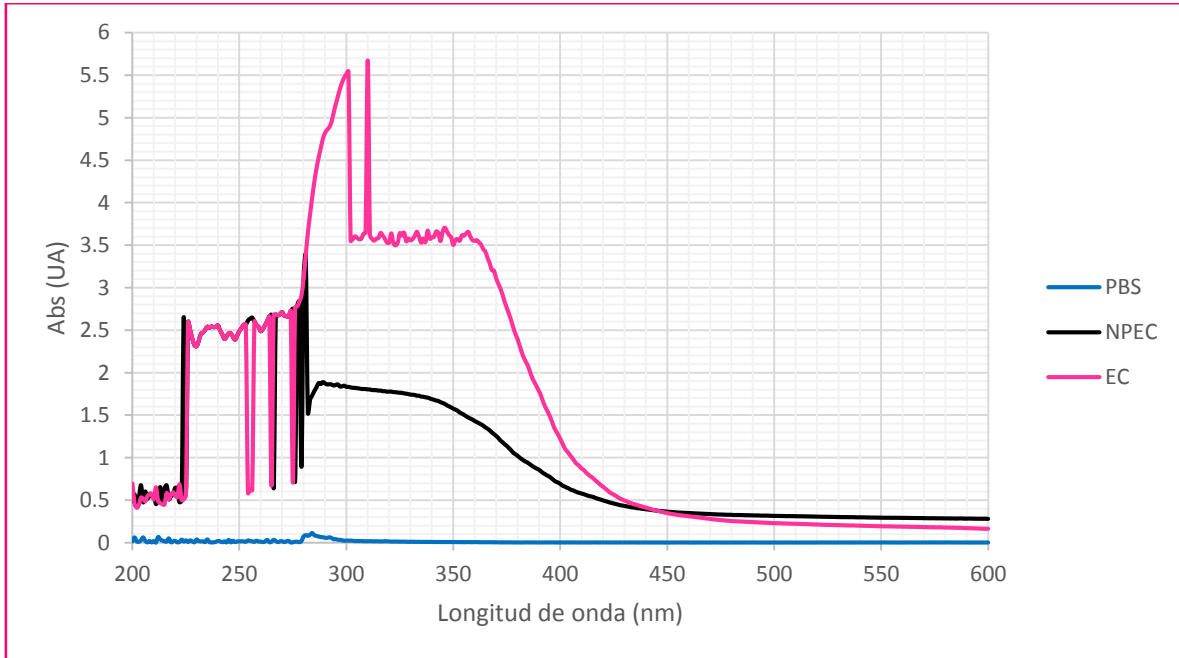


**Fig. 70** Línea celular MCF10A tiempo de tratamiento 24h. G-J) Muestras a 40x.

Con respecto a las células que fueron tratadas Fig.70 B, C, y E se observaron cambios morfológicos significativos, a partir de las 24 h de tratamiento y la dosis empleada fue el  $IC_{50}$  respectivamente para cada tratamiento, se observó reducción en el tamaño celular en las células, presentando una forma redondeada, pero en I, evidentemente se aprecia la forma redondeada de las células, mostrando que las células están entrando en un proceso de muerte celular.

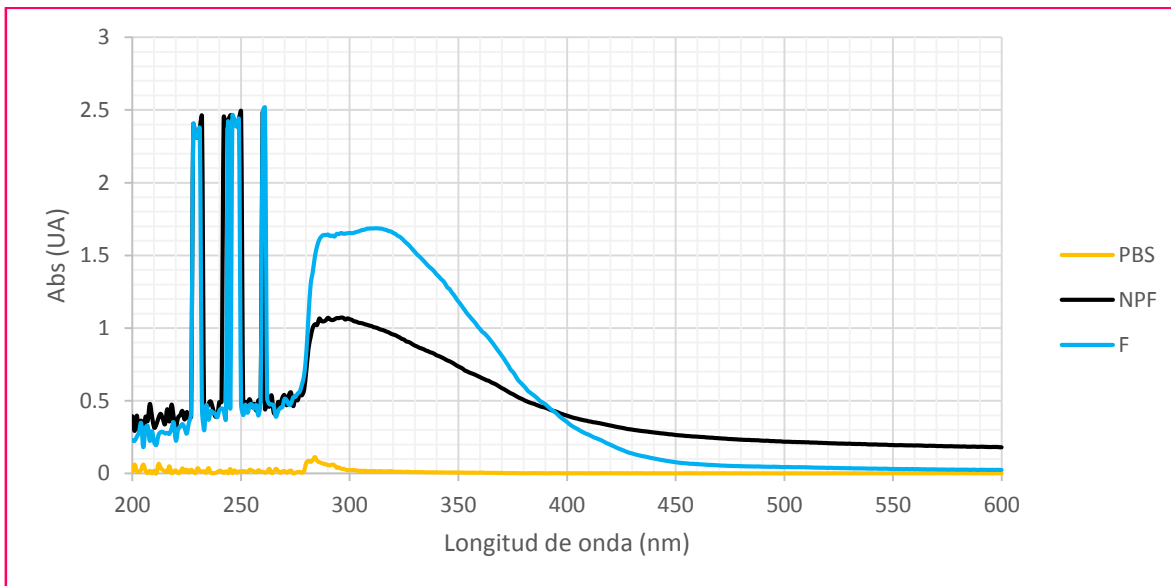
### 5.9.6. Análisis de eficiencia de encapsulación y Liberación *in vitro* por ELISA.

Para determinar la longitud de onda a la cual se debían realizar los ensayos se decidió hacer un barrido de 200 a 600 nm, en solución de buffer de fosfatos a pH 7, (PBS), solubilizando los diferentes tipos de NP por separado así como también los estándares, Extracto Crudo de Aranto y la Fracción de Aranto ya aislada.



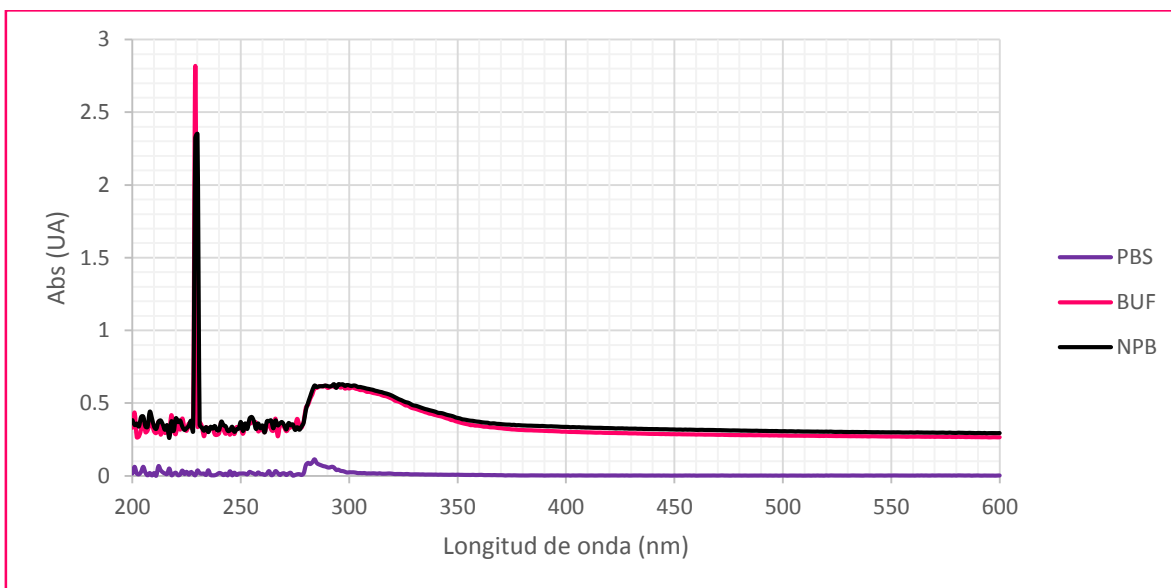
**Fig.71 Barrido por UV-Vis del extracto acuotanolico de *K. daigremontiana* comparado con las Nanocápsulas del mismo (NPEC), en PBS.**

En este espectro se puede observar, (Fig. 71) que existen diversos picos absorbiendo a diferentes longitudes de onda esto se debe a que el extracto de Aranto está en crudo (aún no ha sido purificado), pero se puede apreciar que existen picos significativos, y que absorben a la longitud de onda en la que están los compuestos de interés, (en el intervalo de 298 a 300 nm). Así mismo se puede apreciar que las NPEC, emiten señal a absorbancias menores, sin embargo se siguen apreciando los picos que son de nuestro interés.



**Fig.72 Barrido por UV-Vis de la Fracción de *K. daigremontiana* comparado con las Nanocápsulas del mismo (NPF), en PBS.**

De acuerdo con la Fig.72 se analizó la Fracción de Aranto y se puede observar que se eliminaron varios de los picos que se encontraban en el extracto crudo, de tal manera que se encuentra de una forma más pura, se aprecia que los picos presentes tienen una menor pero significativa absorbancia en las longitudes de onda de interés, y de la misma forma que la Fig.73 al observar las NPF, se aprecia menor intensidad en la absorbancia comparada con la Fracción.



**Fig.73 Barrido por UV-Vis del estándar (bufalin) comparado con las Nanocápsulas del mismo (NPB), en PBS.**

Además de comparar con la literatura los cinco bufadienólidos encontrados en el *K. daigremontiana*, absorben 229, 298, 299, 300 nm, para el caso del bufalin de acuerdo con (Peihao Yin et. al, 2012) se tomó a 298 nm y para el Paclitaxel a 227 nm. Cabe mencionar que el bufalin presenta dos bandas de absorción una a 229 nm que fue la de mayor intensidad y la otra en 298 nm, en este caso fue la banda de menor intensidad. Para realizar el análisis de eficiencia de encapsulación y liberación *in vitro* del principio activo contenido en la NP, se tomó como longitud de onda a 298 nm para el caso del Extracto Crudo de Aranto, para la F3 de Aranto y para el bufalin, para el paclitaxel la longitud de onda que se usó fué a 227 nm.

### 5.9.6.1. Extracto Crudo

Para el análisis de liberación *in Vitro*, se realizó una curva de calibración en donde se grafican los tiempos seleccionados contra las absorbancias detectadas para la muestra a ese tiempo, con esta curva se determinó la ecuación a la recta:  $y = 0.0022x + 0.648$ , con un coeficiente de correlación de 0.9551; despejando la ecuación para calcular las concentraciones a un tiempo determinado,  $X = (Y - 0.648)/0.0022$

Los tiempos que se tomaron fueron a 0, 6, 12, 24, 48 y 72 h, por triplicado y así se pudieron determinar las concentraciones para cada tiempo propuesto, y posteriormente aplicar en el modelo de liberación propuesto por (Hai Wang, *et al.*, 2011), **Ecuación para la obtención de la liberación del fármaco a un tiempo determinado.**

$$m_t - act = \left( C_t + \frac{v}{V} \sum_0^{t-1} C_t \right) V$$

En donde  $m_t - act$  es la cantidad actual de fármaco liberado en el tiempo  $t$ ,  $C_t$  es la concentración del fármaco liberado en el fluido al tiempo  $t$ ,  $v$  es el volumen de muestra tomado a ciertos intervalos predeterminados, y  $V$  es el volumen total de fluido de liberación.

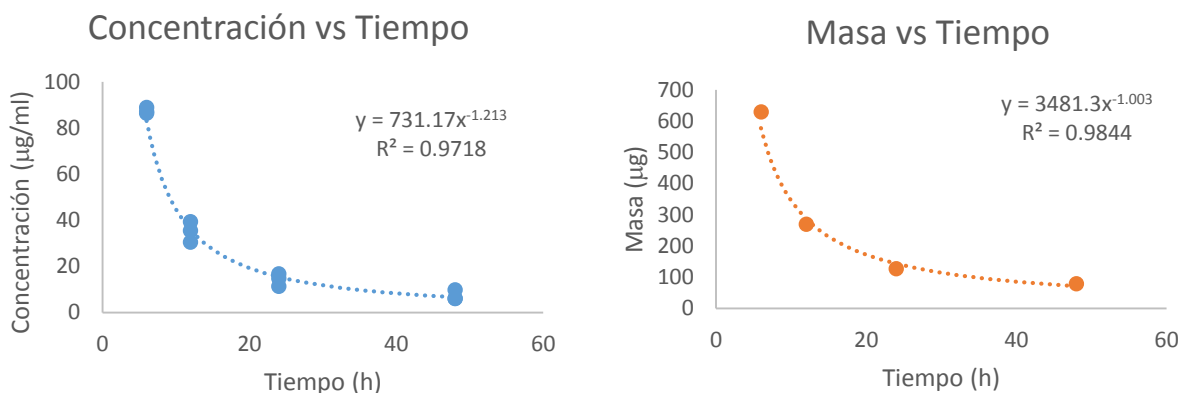
A continuación se presenta la cantidad de extracto liberado a un tiempo determinado.

**Tabla.16 Liberación *In vitro* del Extracto de Aranto nanoencapsulado.**

Tiempo (h)	Concentración (µg/ml)	Ecuación para la obtención de la liberación del Extracto nanoencapsulado a un tiempo determinado. $m_t - act = \left( C_t + \frac{v}{V} \sum C_t \right) V$ ; $v = 0.2 \text{ ml}$ , $V = 7 \text{ ml}$	Cantidad de Extracto liberado a un tiempo determinado. $m_t - act$ (µg)
0	$C_0 = 0$	$m_0 - act = \left( C_0 + \frac{v}{V} C_0 \right) V$	$m_0 - act = 0$
6	$C_1 = 87.424$	$m_1 - act = \left( C_1 + \frac{v}{V} (C_0 + C_1) \right) V$	$m_1 - act = 629.104$
12	$C_2 = 35.076$	$m_2 - act = \left( C_2 + \frac{v}{V} (C_0 + C_1 + C_2) \right) V$	$m_2 - act = 269.540$
24	$C_3 = 14.318$	$m_3 - act = \left( C_3 + \frac{v}{V} (C_0 + C_1 + C_2 + C_3) \right) V$	$m_3 - act = 127.043$
48	$C_4 = 7.348$	$m_4 - act = \left( C_4 + \frac{v}{V} (C_0 + C_1 + C_2 + C_3 + C_4) \right) V$	$m_4 - act = 79.696$
72	$C_5 = -5.758$	$m_5 - act = \left( C_5 + \frac{v}{V} (C_0 + C_1 + C_2 + C_3 + C_4 + C_5) \right) V$	$m_5 - act = 0$



Para determinar el tiempo al que el extracto es liberado, a la concentración de IC<sub>50</sub>, ver Fig. 74.



**Fig. 74 Gráfico de liberación In Vitro, para NPEC.**

Concentración IC<sub>50</sub> 56.60 µg/ml de nanocápsulas PLGA cargadas con Extracto Acuoetanólico de Aranto.

Ecuación para determinar el tiempo de liberación al IC<sub>50</sub> 56.60 µg/ml.

$$X = (Y / (731.17 \mu\text{g/ml} \cdot \text{h}))^{-1/1.2134e}$$

$$X = ((56.60 \mu\text{g/ml} / (731.17 \mu\text{g/ml} \cdot \text{h}))^{-1/1.213}$$

$$X = 8.2428 \text{ h}$$

Para determinar la cantidad de extracto que es liberado, a la concentración de IC<sub>50</sub>.

$$Y = 3481.3x^{-1.003}$$

$$Y = ((3481.3 \mu\text{g/h}) \cdot (8.2428\text{h}))^{-1.003}$$

$$Y = 419.6801 \mu\text{g}.$$

La cantidad de extracto que es liberado es de 419.6801 µg, a la concentración de IC<sub>50</sub>.

Para calcular la eficiencia de encapsulación de extracto crudo de Aranto de las nanocápsulas, a se realizó una curva de calibración y se determinó lo siguiente:  $y = 0.0005x + 3.4562$ ,  $R^2 = 0.987$

Despejando la ecuación.

$$X = (y - 3.4562) / 0.0005 \quad \text{si} \quad y = 3.662$$

$$X = 411.6 \mu\text{g}$$

Si 0.4116 mg perdido de Extracto de Aranto ----- 2mg NC de Extracto de Aranto

X ----- 105.3 mg NC de Extracto de Aranto

$$X = 21.67074 \text{ mg perdido de Extracto de Aranto}$$

$$EE = \frac{(\text{Extracto de Alimentación} - \text{Extracto de Aranto perdido})}{\text{Extracto de Alimentación}} * 100$$

Extracto de Alimentación

$$EE = \frac{(125 \text{ mg} - 21.670 \text{ mg})}{125 \text{ mg}} * 100$$

125 mg

$$EE = 82.663408\%$$

Para Temperatura a 4°C.

$$X = (y - 3.4562)/0.0005 \quad \text{si} \quad y = 3.6885$$

$$X = 464.6 \mu\text{g}$$

Si 0.4646 mg perdido de Extracto de Aranto ----- 2mg NC de Extracto de Aranto

X ----- 105.3 mg NC de Extracto de Aranto

X = 24.46119 mg perdido de Extracto de Aranto

$$EE = \frac{(\text{Extracto de Alimentación} - \text{Extracto de Aranto perdido})}{\text{Extracto de Alimentación}} * 100$$

Extracto de Alimentación

$$EE = \frac{(125 \text{ mg} - 24.46119 \text{ mg})}{125 \text{ mg}} * 100$$

125 mg

$$EE = 80.431048\%$$

### 5.9.6.2. Fracción de Aranto

A continuación se presenta la cantidad de Fracción de Aranto liberada a un tiempo determinado, y la ecuación a la recta determinada es  $y = 0.0022x + 0.648$ , con  $R^2 = 0.9551$ .

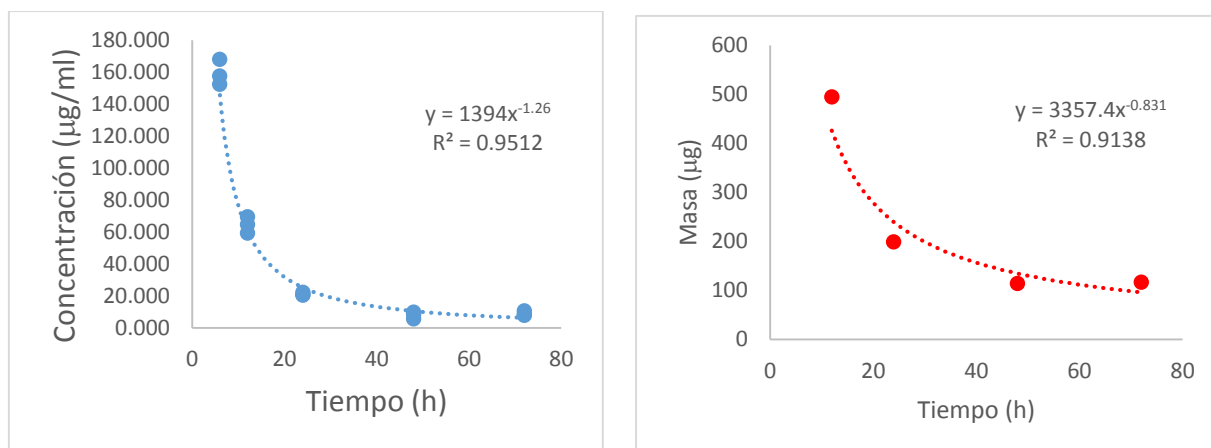
Y se usaron los mismos tiempos, se despejo la ecuación para calcular las concentraciones a un tiempo determinado

$$X = (Y - 0.648)/0.0022$$

**Tabla.17 Liberación In vitro de la Fracción de Aranto nanoencapsulado.**

Tiempo (h)	Concentración (µg/ml)	Ecuación para la obtención de la liberación de la Fracción nanoencapsulada a un tiempo determinado. $m_t - act = (C_t + \frac{v}{V} \sum C_i) V$ ; $v = 0.2 \text{ ml}$ , $V = 7 \text{ ml}$	Cantidad de Extracto liberado a un tiempo determinado. $m_t - act$ (µg)
0	$C_0 = 0$	$m_0 - act = (C_0 + \frac{v}{V} C_0) V$	$m_0 - act = 0$
6	$C_1 = 155.114$	$m_1 - act = (C_1 + \frac{v}{V} (C_0 + C_1)) V$	$m_1 - act = 1116.818$
12	$C_2 = 64.432$	$m_2 - act = (C_2 + \frac{v}{V} (C_0 + C_1 + C_2)) V$	$m_2 - act = 494.931$
24	$C_3 = 21.591$	$m_3 - act = (C_3 + \frac{v}{V} (C_0 + C_1 + C_2 + C_3)) V$	$m_3 - act = 199.363$
48	$C_4 = 9.205$	$m_4 - act = (C_4 + \frac{v}{V} (C_0 + C_1 + C_2 + C_3 + C_4)) V$	$m_4 - act = 114.500$
72	$C_5 = 9.318$	$m_5 - act = (C_5 + \frac{v}{V} (C_0 + C_1 + C_2 + C_3 + C_4 + C_5)) V$	$m_5 - act = 117.159$

Para determinar el tiempo al que la fracción de extracto es liberado, a la concentración de IC<sub>50</sub>.



**Fig. 75 Grafico de liberación In Vitro, para NPF.**

Concentración IC<sub>50</sub> 37.92 µg/ml de nanocápsulas PLGA cargadas con Fracción citotóxica de Extracto Acuoetanolico de Aranto.

Ecuación para determinar el tiempo de liberación al IC<sub>50</sub> 37.92 µg/ml, ver Fig. 75

$$X = (Y / (1394 \mu\text{g/ml} \cdot \text{h}))^{-1/1.26}$$

$$X = ((37.92 \mu\text{g/ml} / (1394 \mu\text{g/ml} \cdot \text{h}))^{-1/1.26}$$

$$X = 17.47 \text{ h}$$

Para determinar la cantidad de fracción de extracto que es liberado, a la concentración de IC<sub>50</sub>.

$$Y = 3357.4x^{-0.831}$$

$$Y = ((3357.4 \mu\text{g/h}) * (17.47\text{h}))^{-0.831}$$

$$Y = 311.6432 \mu\text{g}.$$

La cantidad de fracción de extracto que es liberado es de 311.6432  $\mu\text{g}$ , a la concentración de  $\text{IC}_{50}$ .

Para calcular la eficiencia de encapsulación de fracción de extracto de Aranto de las nanocápsulas, a Temperatura Ambiente se determinó lo siguiente:

$$y = 0.0004x + 3.4564, R^2 = 0.9851$$

Despejando la ecuación.

$$X = (y - 3.4564)/0.0004 \quad \text{si } y = 3.565$$

$$X = 271.5 \mu\text{g}$$

Si 0.2715 mg perdido de Extracto de Aranto ----- 2mg NC de Fracción de Extracto de Aranto

X ----- 96.5 mg NC de Fracción de Extracto de Aranto

X = 13.099875 mg perdido de Fracción de Extracto de Aranto

$$EE = \frac{(\text{Fracción de Alimentación} - \text{Fracción de Aranto perdido})}{\text{Fracción de Alimentación}} * 100$$

Fracción de Alimentación

$$EE = \frac{(125 \text{ mg} - 13.099 \text{ mg})}{125 \text{ mg}} * 100$$

125 mg

$$EE = 89.5208\%$$

Para Temperatura a 4°C.

$$X = (y - 3.4564)/0.0004 \quad \text{si } y = 3.6602$$

$$X = 509.5 \mu\text{g}$$

Si 0.5095 mg perdido de Fracción de Aranto ----- 2mg NC de Fracción de Aranto

X ----- 96.5 mg NC de Fracción de Aranto

X = 24.583375 mg perdido de Extracto de Aranto

$$EE = \frac{(\text{Fracción de Alimentación} - \text{Fracción de Aranto perdido})}{\text{Fracción de Alimentación}} * 100$$

Fracción de Alimentación

$$EE = \frac{(125 \text{ mg} - 24.583 \text{ mg})}{125 \text{ mg}} * 100$$

125 mg

$$EE = 80.3336 \%$$

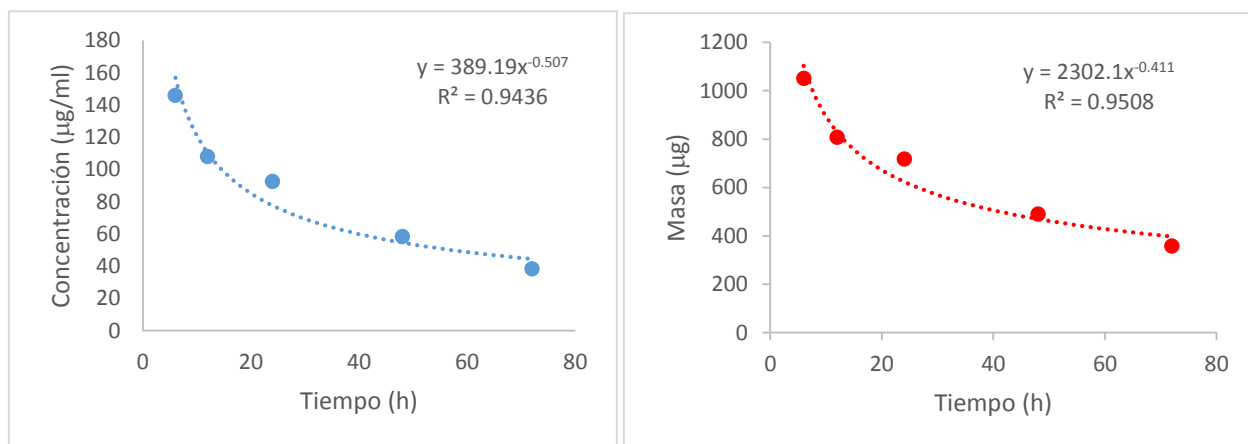
### 5.9.6.3. Bufalin

Se determinó la ecuación a la recta:  $y = 0.0004x + 0.3863$ , con un coeficiente de correlación de  $R^2 = 0.956$ ; despejando la ecuación para calcular las concentraciones a un tiempo determinado,  $x = (y-0.3863)/0.0004$ , y los tiempos que se tomaron fueron a 0, 6, 12, 24, 48 y 72 h, por triplicado.

**Tabla.18 Liberación In vitro del Bufalin nanoencapsulado.**

Tiempo (h)	Concentración (µg/ml)	Ecuación para la obtención de la liberación del Bufalin nanoencapsulado a un tiempo determinado. $m_t - act = (C_t + \frac{v}{V} \sum C_t) V$ ; $v = 0.2 \text{ ml}$ , $V = 7 \text{ ml}$	Cantidad de Extracto liberado a un tiempo determinado. $m_t - act$ (µg)
0	$C_0 = 0$	$m_0 - act = (C_0 + \frac{v}{V} C_0) V$	$m_0 - act = 0$
6	$C_1 = 145.91$	$m_1 - act = (C_1 + \frac{v}{V} (C_0 + C_1)) V$	$m_1 - act = 1050.552$
12	$C_2 = 108$	$m_2 - act = (C_2 + \frac{v}{V} (C_0 + C_1 + C_2)) V$	$m_2 - act = 806.782$
24	$C_3 = 92.58$	$m_3 - act = (C_3 + \frac{v}{V} (C_0 + C_1 + C_2 + C_3)) V$	$m_3 - act = 717.358$
48	$C_4 = 58.41$	$m_4 - act = (C_4 + \frac{v}{V} (C_0 + C_1 + C_2 + C_3 + C_4)) V$	$m_4 - act = 489.85$
72	$C_5 = 38.41$	$m_5 - act = (C_5 + \frac{v}{V} (C_0 + C_1 + C_2 + C_3 + C_4 + C_5)) V$	$m_5 - act = 357.532$

Para determinar el tiempo al que la fracción de extracto es liberado, a la concentración de  $IC_{50}$ .



**Fig. 76 Grafico de liberación In Vitro, para NPB.**

Concentración  $IC_{50}$  122.8 µg/ml de nanocápsulas PLGA cargadas con Estándar Bufalin.

Ecuación para determinar el tiempo de liberación al  $IC_{50}$  122.8 µg/ml.

$$X = (Y / (389.19 \mu\text{g/ml} \cdot h))^{-1/0.507}$$

$$X = ((122.8 \mu\text{g/ml} / (389.19 \mu\text{g/ml} \cdot h))^{-1/0.507}$$

$$X = 9.7295 \text{ h}$$

Para determinar la cantidad de bufalin que es liberado, a la concentración de IC<sub>50</sub>.

$$Y = 2302.1x^{-0.411}$$

$$Y = ((2302.1 \mu\text{g/h}) * (9.7295 \text{ h}))^{-0.411}$$

$$Y = 1.62 * 10^{-2} \mu\text{g}.$$

La cantidad de bufalin que es liberado es de  $1.62 * 10^{-2} \mu\text{g}$ , a la concentración de IC<sub>50</sub>, Ver Fig.75.

Para calcular la eficiencia de encapsulación de Bufalin de las nanocápsulas, a Temperatura Ambiente se determinó lo siguiente:  $y = 0.0003x + 3.45$ ,  $R^2 = 0.9505$

Despejando la ecuación.

$$X = (y - 3.45)/0.0003 \quad \text{si} \quad y = 3.4538$$

$$X = 12.66 \mu\text{g}$$

Si 0.0126 mg perdido de Bufalin ----- 2mg NC de Bufalin

X ----- 28.9 mg NC de Bufalin

X = 0.18207 mg perdido de Bufalin

$$EE = \frac{(\text{Bufalin de Alimentación} - \text{Bufalin perdido})}{\text{Bufalin de Alimentación}} * 100$$

Bufalin de Alimentación

$$EE = \frac{(2 \text{ mg} - 0.18207 \text{ mg})}{2 \text{ mg}} * 100$$

2 mg

$$EE = 90.8965 \%$$

Para Temperatura a 4°C.

$$X = (y - 3.45)/0.0003 \quad \text{si} \quad y = 3.4551$$

$$X = 17 \mu\text{g}$$

Si 0.017 mg perdido de Bufalin ----- 2mg NC de Bufalin

X ----- 28.9 mg NC de Bufalin

X = 0.24565 mg perdido de Bufalin

$$EE = \frac{(\text{Bufalin de Alimentación} - \text{Bufalin perdido})}{\text{Bufalin de Alimentación}} * 100$$

Bufalin de Alimentación

$$EE = \frac{(2 \text{ mg} - 0.24565 \text{ mg})}{2 \text{ mg}} * 100$$

2 mg

$$EE = 87.7175 \%$$

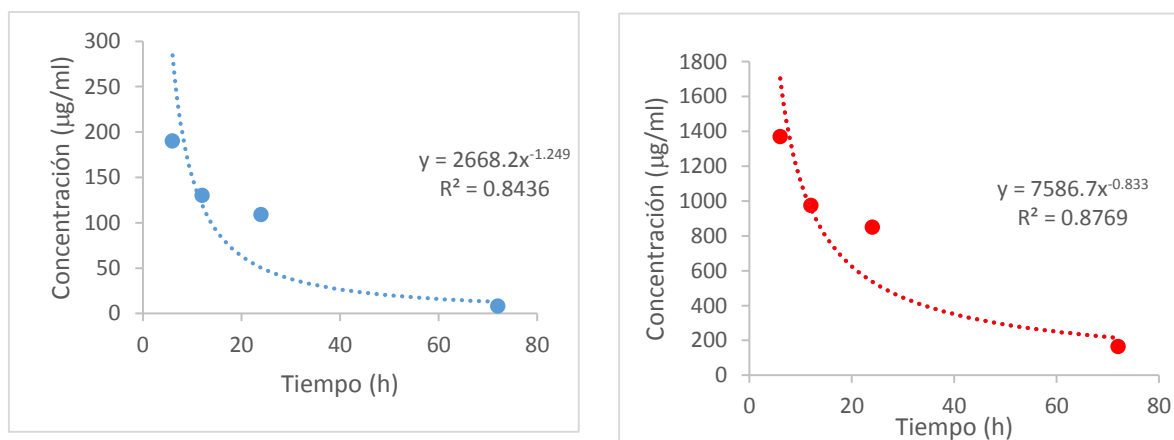
### 5.9.6.4. Paclitaxel

Se determinó la ecuación a la recta:  $y = 0.0003x + 3.5589$ , con un coeficiente de correlación de  $R^2 = 0.9918$ ; despejando la ecuación para calcular las concentraciones a un tiempo determinado,  $x = (y - 3.5589)/0.0003$ , y los tiempos que se tomaron fueron a 0, 6, 12, 24, 48 y 72 h, por triplicado.

**Tabla.19 Liberación In vitro del Taxol nanoencapsulado.**

Tiempo (h)	Concentración (µg/ml)	Ecuación para la obtención de la liberación del Paclitaxel nanoencapsulado a un tiempo determinado. $m_t - act = (C_t + \frac{v}{V} \sum C_i) V$ ; $v = 0.2 \text{ ml}$ , $V = 7 \text{ ml}$	Cantidad de Extracto liberado a un tiempo determinado. $m_t - act$ (µg)
0	$C_0 = 0$	$m_0 - act = (C_0 + \frac{v}{V} C_0) V$	$m_0 - act = 0$
6	$C_1 = 190.33$	$m_1 - act = (C_1 + \frac{v}{V} (C_0 + C_1)) V$	$m_1 - act = 1370.376$
12	$C_2 = 130.33$	$m_2 - act = (C_2 + \frac{v}{V} (C_0 + C_1 + C_2)) V$	$m_2 - act = 976.442$
24	$C_3 = 109.22$	$m_3 - act = (C_3 + \frac{v}{V} (C_0 + C_1 + C_2 + C_3)) V$	$m_3 - act = 850.516$
48	$C_4 = 104.77$	$m_4 - act = (C_4 + \frac{v}{V} (C_0 + C_1 + C_2 + C_3 + C_4)) V$	$m_4 - act = 840.32$
72	$C_5 = 8.11$	$m_5 - act = (C_5 + \frac{v}{V} (C_0 + C_1 + C_2 + C_3 + C_4 + C_5)) V$	$m_5 - act = 165.322$

Para determinar el tiempo al que el Taxol es liberado, a la concentración de  $IC_{50}$ .



**Fig. 77 Grafico de liberación In Vitro, para NPT.**

Concentración  $IC_{50}$  13.34 µg/ml de nanocápsulas PLGA cargadas con Estándar de Taxol (Fig. 77).

Ecuación para determinar el tiempo de liberación al  $IC_{50}$  13.34 µg/ml.

$$X = (Y / (2668.2 \text{ µg/ml} \cdot h))^{-1/1.249}$$

$$X = ((13.34 \text{ µg/ml} / (2668.2 \text{ µg/ml} \cdot h))^{-1/1.249}$$

$$X = 69.55 \text{ h}$$

Para determinar la cantidad de taxol que es liberado, a la concentración de IC<sub>50</sub>.

$$Y = 7586.7 x^{-0.833}$$

$$Y = ((7586.7 \mu\text{g/h}) * (69.55 \text{ h}))^{-0.833}$$

$$Y = 1.711 * 10^{-5} \mu\text{g}$$

La cantidad de Taxol que es liberado es de  $1.711 * 10^{-5} \mu\text{g}$ , a la concentración de IC<sub>50</sub>.

Para calcular la eficiencia de encapsulación de Taxol de las nanocápsulas, a Temperatura Ambiente se determinó lo siguiente: Despejando la ecuación.

$$X = (y - 3.735)/0.0004 \quad \text{si } y = 3.7376$$

$$X = 6.5 \mu\text{g}$$

Si 0.0065 mg perdido de Taxol ----- 2mg NC de Taxol

X ----- 95.1 mg NC de Taxol

$$X = 0.309075 \text{ mg perdido de Taxol}$$

$$EE = \frac{(\text{Taxol de Alimentación} - \text{Taxol perdido})}{\text{Taxol de Alimentación}} * 100$$

Taxol de Alimentación

$$EE = \frac{(2 \text{ mg} - 0.309075 \text{ mg})}{2 \text{ mg}} * 100$$

2 mg

$$EE = 84.54625 \%$$

Para Temperatura a 4°C.

$$X = (y - 3.735)/0.0004 \quad \text{si } y = 3.7365$$

$$X = 3.75 \mu\text{g}$$

Si 0.00375 mg perdido de Taxol ----- 2mg NC de Taxol

X ----- 95.1 mg NC de Taxol

$$X = 0.1783125 \text{ mg perdido de Taxol}$$

$$EE = \frac{(\text{Taxol de Alimentación} - \text{Taxol perdido})}{\text{Taxol de Alimentación}} * 100$$

Taxol de Alimentación

$$EE = \frac{(2 \text{ mg} - 0.1783 \text{ mg})}{2 \text{ mg}} * 100$$

2 mg

$$EE = 91.08 \%$$





# 6. CONCLUSIONES



El extracto acuotánico de *K. daigremontiana* induce un efecto citotóxico en la línea MDA-MB-231 ( $IC_{50}$   $89.34 \pm 1.951$   $\mu\text{g/ml}$ ).

La F3 de Etanol: agua del extracto acuotánico, es la fracción que presentó el mayor efecto citotóxico comparando con las F1 y F2, (el  $IC_{50}$  de la F3 es de  $69.37 + 1.841$   $\mu\text{g/ml}$ ).

La comparación de los resultados del  $IC_{50}$  para el extracto acuotánico en crudo contrastado con la F3 obtenida de la mezcla Etanol: Agua, muestra una evidencia de que se logró mejorar el  $IC_{50}$  mediante la separación, con la Técnica de Cromatografía Preparativa.

Mediante la técnica de caracterización FTIR de la F3, se observó la presencia de los principales grupos funcionales que componen a los bufadienólidos como sigue:

- (1) IR: 3453(OH), 1709(C=O), 1125(C-O).
- (2) IR: 3465(OH), 1709(C=O), 1125(C-O).
- (3) IR: 3405(OH), 1709(C=O), 1370(C-O).
- (4) IR: 3498(OH), 1709(C=O).
- (5) IR: 3533(OH), 1709(C=O), 1370(C-O).

La técnica UV-Vis da una clara evidencia de la existencia de Grupos funcionales en la F3.

La curva del  $IC_{50}$  en línea celular normal MCF10A, mostro que el tratamiento con la Fracción de Aranto fue de  $62.33 \pm 1.183$   $\mu\text{g/ml}$ , traduciéndose en un mayor potencial citotóxico para ambas líneas celulares.

La oscilación en la campana gaussiana entre 450 a 600 nm, indica que NPEC son las de menor tamaño y las NPB son de mayor tamaño, además que estas últimas presentan mayor aglomeración entre ellas y una morfología entre esféricas y ovoides, con una textura lisa.

Las NPB tienen un potencial zeta de  $-15.60$  mV, además de que todas ellas tienen un efecto citotóxico positivo para la línea celular tumoral (MDA – MB -231). Para las NPP, que es el control, resulta ser de  $-13.76 \pm 0.55$  mV.

El PLGA es el polímero adecuado para la elaboración de nanocápsulas, ya que no afecta la viabilidad de las células.

El efecto citotóxico de las Nanocápsulas que contienen el extracto crudo de Aranto mostro tener una mayor efectividad (El  $IC_{50}$  tiene el valor de  $56.60 \pm 1.091$   $\mu\text{g/ml}$ ).

El valor  $IC_{50}$  del estándar de bufalin tiene un alto efecto citotóxico positivo, siendo alrededor de 10 nM.

La nanoencapsulación del estándar de bufalin, provoca que disminuye su potencial citotóxico (El  $IC_{50}$  para las NPB fue de  $122.8 \pm 1.119$   $\mu\text{g/ml}$ )

La encapsulación es favorable en el extracto acuotánico con el PLGA, porque su efecto citotóxico es positivo en la línea celular tumoral. El extracto sin encapsulación si induce muerte celular en esta

línea por lo que la nanoencapsulación del extracto acuoetanólico ha cumplido con el principal objetivo, de no causar muerte en línea celular MCF10A.

La NPF, fueron la mejor opción ya que esta formulación se encuentra aún más pura y presenta muy buenos resultados ( $IC_{50}$  para línea celular tumoral de 37.92  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y el  $IC_{50}$  de 582.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para línea celular normal).

La cantidad de extracto que es liberado es de 419.6801  $\mu\text{g}$ , a la concentración de  $IC_{50}$ , para el caso de nanocápsulas PLGA cargadas con Extracto Acuoetanólico de Aranto con un valor de EE = 82.663408% de eficiencia de encapsulación. Y para Concentración  $IC_{50}$  37.92  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de nanocápsulas PLGA cargadas con Fracción citotóxica de Extracto Acuoetanólico de Aranto es La cantidad de fracción de extracto liberada de 311.6432  $\mu\text{g}$ , con una EE = 89.5208%. Para una concentración  $IC_{50}$  122.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de nanocápsulas PLGA cargadas con Estándar Bufalin se obtiene que la cantidad de bufalin que es liberado es de  $1.62 \cdot 10^{-2} \mu\text{g}$  con su respectivo valor de EE = 90.8965 %. Por último para una Concentración  $IC_{50}$  13.34  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de nanocápsulas PLGA cargadas con Estándar de Taxol se obtiene a cantidad de Taxol que es liberado es de  $1.711 \cdot 10^{-5} \mu\text{g}$ , con su respectivo valor de EE = 84.54625 %.



# BIBLIOGRAFÍA

1. Ana Osorio et al. 2009. Evaluation of the *BRCA1* interacting genes *RAP80* and *CCDC98* in familial breast cancer susceptibility. 113. pp 371-376.
2. Bruce Alberts et al. 1996. The Cell as a Collection of Protein Machines: Preparing the Next Generation of Molecular Biologists. 92. Pages 291–294.
3. Ana Osorio et al. 2006. A haplotype containing the p53 polymorphisms Ins16bp and Arg72Pro modifies cancer risk in BRCA2 mutation carriers. HUMAN MUTATION 27(3), pp 242-248
4. Lopez et al. 2009. Establecimiento de cultivo in vitro y de células diferenciadas de Aranto (*Kalanchoe daigremontiana*). Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras.
5. Cárdenas, 2009. *Kalanchoe* spp.: una fuente natural de nuevas sustancias bioactivas puestas de manifiesto por la Etnomedicina. Boletín. 6. Pp 29-30.
6. Pollard et al., 2008. Building lipid barriers. Trends in plant science. 13. Pp 236-246.
7. Harrison. Principios de Medicina Interna, 17e Dennis Kasper, et. al, pp. 492,498, 2009
8. Jetter et al.2007. Composicion of the plants. In biology of the plant. Pp 145-185.
9. Maarseveen, et al. 2009. Composition of the epicuticular and intracuticular wax layers on **Kalanchoe daigremontiana** (Hamet et Perr. de la Bathie) leaves. Phytochemistry. Pp 899-906.
10. Kalinowska. 1990. Stereochemical differences in the anatomical distribution of C-24alkylated sterols in *Kalanchoe daigremontiana*. Phytochemistry . 29: 3427–3434.
11. Wagner, H. et al. 1984. Isolation and structure determination of daigremontianin, a novel bufadienolide from *Kalanchoe daigremontiana*. Planta Med., 33. pp 169-171.
12. Friedrich, H.1968. Dtsch. Apoth. Ztg. 108, 35, pp 1273.
13. Wagner, et al., 1986. Isolation and Structure Determination of Daigremontianin, a Novel Bufadienolide from *Kalanchoe daigremontiana*. Pp 169.
14. Lotter, et al., 1986. New Bufadienolides from *Kalanchoe daigremontiana*. Zeitschrift für Naturforschung B. 40.
15. Maharani, et al., 2008. Insecticidal bufadienolides from the leaves of *Kalanchoe daigremontiana* (Crassulaceae). Proceeding of The International Seminar on Chemistry 2008 .pp. 236-239
16. Hutapea, J. R. 1994. Inventory of Indonesian Medicinal Plants. *Research and Development Agency, Ministry of Health, Jakarta, Indonesia*, 3, 117-118.
17. Supratman, et al., 2001. Anti-tumor Promoting Activity of Bufadienolides from *Kalanchoe pinnata* and *K. daigremontiana* × *butiflora*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 65(4), 947-949.
18. Herrera, et al., 2009. Reproductive and recruitment traits as indicators of the invasive potential of *Kalanchoe daigremontiana* (Crassulaceae) and *Stapelia gigantea* (Apocynaceae) in a Neotropical arid zone. *Journal of Arid Environments*, 73(11), 978-986.
19. Martinez, et al., 2009. La planta exótica *kalanchoe daigremontiana* incrementa el reservorio y flujo de carbono en el suelo. *Interciencia*. 36. pp. 937-942

20. Homans, A.L., and Fuchs, A. 1970. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *J. Chromatogr.* 51:327–329.
21. Gaiind, K.N., and Gupta, R.L. 1971. Flavonoids glycosides from *Kalanchöe pinnata*. *Planta Med.* 20:368–373.
22. Steyn, P. S., & van Heerden, F. R..1997. Bufadienolides of plant and animal origin. *Natural Product Reports*, 15(4), 397-413.
23. Gao, H., Popescu, R., Kopp, B., & Wang, Z. 2010. Bufadienolides and their antitumor activity. *Natural product reports*, 28(5), 953-969.
24. Mijatovic y col., 2007. Cardiotonic steroid on the road. *Biochimica et Biophysica Acta*.1776. pp 32-57.
25. Vila, 2008. An Assessment of Stakeholder Perceptions and Management of Noxious Alien Plants in Spain. *Environmental Management*. 43:1244.
26. Yoshida, K. (2003). Structural and functional analysis of a putative gene cluster for palatinose transport on the linear chromosome of *Agrobacterium tumefaciens* MAFF301001. *Journal of bacteriology*, 185(7), 2369-2373.
27. L. Vila. 2008. Nanotecnología farmacéutica de los siARN. In *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* (Vol. 77, No. 1).
28. Reis, A. (2006). Influencia de las unidades de curado led y luz halógena sobre la resistencia compresiva de las resinas compuestas. *Acta Odont Venezolana*, 45(2), 209-212.
29. Rocha, F.2009. Nanosistemas a base de poliésteres. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra.pp41.
30. Sinha, V.R., Mittal, B.R., Bhutani, K.K., Kumria, R., 2004. Colonic drug delivery of 5fluorouracil: an in vitro evaluation. *International Journal of Pharmaceutics* 269, 101–108.
31. Pouton, et al., 1996. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential. *Adv Drug Deliv.*18. pp 133-162.
32. ELLISON,W. L., R. E. ALSTON,Y B. L. TURNER.1962. Methods of presentation of crude biochemical data for systematic purposes, with particular reference to the genus *Bahia* (compoaitae) , *Amer. J. Bot.* 49 (6): 599 – 604.
33. Huimin Gao, Overview of the quality standard research of traditional Chinese medicine, [Frontiers of Medicine](#) 5(2):195-202 .
34. Xie Z,Peroxynitrite mediates neurotoxicity of amyloid beta-peptide1-42- and lipopolysaccharide-activated microglia. *J Neurosci* 22(9):3484-92.
35. Lingrel y Kuntzweiler, Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase, [J Biol Chem.](#) 1994 Aug 5;269(31):19659-62.
36. Biao Ma, 2013, Human Antibody Production in Transgenic Animals, *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2015; 63(2): 101–108.
37. Kim, 2007, Interlinked mutual inhibitory positive feedbacks induce robust cellular memory effects. *FEBS Lett.* 2007 Oct; 581(25): 4899-4904.
38. Pandey, 2006, Regulation of LIM-kinase 1 and cofilin in thrombin-stimulated platelets, [Blood](#). 2006 Jan 15;107(2):575-83.
39. Mundargi RC, et al. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(d,l-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J Controlled Release*. 2008;125:193–209.
40. Rieux, 2006, *Journal of Controlled Release* 116 (2006) 1–27.
41. Senthilkumar, 2008, [Journal of plant physiology](#) 165(13):1404-21.
42. **Gu M, et al. (1992)** Cloning and expression of a cytosolic megakaryocyte protein-tyrosine-phosphatase with sequence homology to retinaldehyde-binding protein and yeast SEC14p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(7):2980-4.

43. Dillen, 2004, Perceived relevance and information needs regarding food topics and preferred information sources among Dutch adults: results of a quantitative consumer study. *Eur. J. Clin. Nutr.* **58**, 1306–1313.
44. Ayalasomayajula SP, Amrite AC, Kompella UB. Inhibition of cyclooxygenase –2, but not cyclooxygenase-1, reduces prostaglandin E2 secretion from diabetic rat retinas. *Eur. J. Pharmacol.* 2004;498:275–278.
45. Acharya, 2010, Proc Natl Acad Sci U S A. 24 de agosto de 2010; 107 (34).
46. Hyung H, Kim JH. 2008. Natural organic matter (NOM) adsorption to multi-walled carbon nanotubes: effect of NOM characteristics and water quality parameters. *Environ Sci Technol* 42(12):4416–4421.
47. **Maeda T, (2010)** Purification, characterization and amino acid sequence of a novel enzyme, D-threo-3-hydroxyaspartate dehydratase, from *Delftia* sp. HT23. *J Biochem* 148(6):705-12.
48. Cruz-Orive, L.M. (2010) Comparative precision of the pivotal estimators of particle size. *Image Anal. Stereol.* 27, 17–22.
49. Clare Van, 2009, Everolimus in postmenopausal hormonereceptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med.*, 366(6):520–529.
50. Wei Tao, 2013, Risk of second non-hematological malignancies among 376,825 breast cancer survivors. *Breast Cancer Res Treat.*,106:439-451

References: Breast cancer detailed guide

1. Abeloff MD, Wolff AC, Weber BL, et al. Cancer of the Breast. In: Abeloff MD, Armitage JO, Lichter AS, et al, eds. *Clinical Oncology*. 4th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier; 2008: 1875–1943.
2. American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures 2016*. Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2016.
3. American Joint Committee on Cancer. Breast. In: *AJCC Cancer Staging Manual*, 7th ed. New York: Springer; 2010: 347–369.
4. Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, et al. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2004 Apr 14;291(14):1701–1712.
5. Anderson GL, Clebowski RT, Aragaki AK, et al. Conjugated equine oestrogen and breast cancer incidence and mortality in postmenopausal women with hysterectomy: extended follow-up of the Women's Health Initiative randomised placebo-controlled trial. *Lancet Oncol*. 2012 May;13(5):476–486. Epub 2012 Mar 7.
6. Avis N, Crawford S, Manuel J, et al. Quality of life among younger women with breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23:3322–3330.
7. Azim HA Jr, Santoro L, Pavlidis N, Gelber S, Kroman N, Azim H, Peccatori FA. Safety of pregnancy following breast cancer diagnosis: a meta-analysis of 14 studies. *Eur J Cancer*. 2011 Jan;47(1):74-83. Epub 2010 Oct 11.
8. Bachelot T, Bourcier C, Cropet C, et al. Randomized Phase II Trial of Everolimus in Combination With Tamoxifen in Patients With Hormone Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Metastatic Breast Cancer With Prior Exposure to Aromatase Inhibitors: A GINECO Study. *J Clin Oncol*. 2012 Aug 1;30(22):2718–2724. Epub 2012 May 7.
9. Bahcall O. Common variation and heritability estimates for breast, ovarian and prostate cancers. *Nature Genetics*. Accessed at [www.nature.com/icogs/primer/common-](http://www.nature.com/icogs/primer/common-)

[variationand-heritability-estimates-for-breast-ovarian-and-prostate-cancers/](#) on May 30, 2013.

10. Baselga J, Campone M, Piccart M, et al. Everolimus in postmenopausal hormonereceptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2012 Feb 9;366(6):520–529. Epub 2011 Dec 7.
11. Baselga J, Cortés J, Kim SB, et al. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2012 Jan 12;366(2):109–119. Epub 2011 Dec 7.
12. Baselga J, Semiglazov V, van Dam P, et al. Phase II randomized study of neoadjuvant everolimus plus letrozole compared with placebo plus letrozole in patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Jun 1;27(16):2630–2637. Epub 2009 Apr 20.
13. Beral V, Million Women Study Collaborators. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*. 2003;362:419–427.
14. Bertelsen L, Mellekjær L, Christensen J, Rawal R, Olsen JH. Age-specific incidence of breast cancer in breast cancer survivors and their first-degree relatives. *Epidemiology*. 2009;20:175–180.
15. Blackwell KL, Burstein HJ, Storniolo AM, et al. Randomized study of lapatinib alone or in combination with trastuzumab in women with ErbB2-positive, trastuzumab-refractory metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Mar 1;28(7):1124–1130. Epub 2010 Feb 1.
16. Boice JD Jr, Harvey EB, Blettner M, Stovall M, Flannery JT. Cancer in the contralateral breast after radiotherapy for breast cancer. *N Engl J Med*. 1992;326:781–785.
17. Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, et al. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: Ready for clinical application? *J Clin Oncol*. 2005;23:7350–7360.
18. Briot K, Tubiana-Hulin M, Bastit L, et al. Effect of a switch of aromatase inhibitors on musculoskeletal symptoms in postmenopausal women with hormone-receptor-positive breast cancer: the ATOLL (articular tolerance of letrozole) study. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Feb;120(1):127–34. Epub 2009 Dec 25.
19. Brown LM, Chen BE, Pfeiffer RM, et al. Risk of second non-hematological malignancies among 376,825 breast cancer survivors. *Breast Cancer Res Treat*. 2007;106:439–451.
20. Burstein HJ, Harris JR, Morrow M. Malignant tumors of the breast. In: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, eds. *DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 9th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins; 2011:1401–1456.
21. Burstein HJ, Sun Y, Dirix LY, et al. Neratinib, an irreversible ErbB receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced ErbB2-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Mar 10;28(8):1301–1307. Epub 2010 Feb 8.
22. California Environmental Protection Agency. Health Effects of Exposure to Environmental Tobacco Smoke. June 2005. Accessed at [www.oehha.ca.gov/air/environmental\\_tobacco/pdf/app3partb2005.pdf](http://www.oehha.ca.gov/air/environmental_tobacco/pdf/app3partb2005.pdf) on November 7, 2011.
23. Chen L, Malone KE, Li CI. Bra Wearing Not Associated with Breast Cancer Risk: A Population-Based Case-Control Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014 Sep 5.
24. Chen LC, Weiss NS, Newcomb P, et al. Hormone replacement therapy in relation to breast cancer. *JAMA*. 2002;287:734–741.
25. Chung AP, Sacchini V. Nipple-sparing mastectomy: where are we now? *Surg Oncol*. 2008 Dec;17(4):261–266.
26. Ciatto S, Houssami N, Bernardi D, et al. Integration of 3D digital mammography with tomosynthesis for population breast-cancer screening (STORM): a prospective comparison study. *Lancet Oncol*. 2013 Jun;14(7):583–9. Epub 2013 Apr 25.



27. Clarke M, Collins R, Darby S, et al. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomized trials. *Lancet*. 2005; 365:1687–1717.
28. Coleman RE, Winter MC, Cameron D, et al; AZURE (BIG01/04) Investigators. The effects of adding zoledronic acid to neoadjuvant chemotherapy on tumour response: exploratory evidence for direct anti-tumour activity in breast cancer. *Br J Cancer*. 2010 Mar 30;102(7):1099-1105. Epub 2010 Mar 16.
29. Coleman RE, Marshall H, Cameron D, et al. Breast Cancer Adjuvant Therapy with Zoledronic Acid. *N Engl J Med*. 2011 Oct 13;365(15):1396-1405. Epub 2011 Sep 25.
30. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet*. 1996 Jun 22;347(9017):1713-1727.
31. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet* 2001;358:1389-1399.
32. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet*. 2002 Jul 20;360(9328):187-195.
33. Curtis RE, Ron E, Hankey BF, Hoover RN. New Malignancies Following Breast Cancer. In: Curtis RE, Freedman DM, Ron E, Ries LAG, Hacker DG, Edwards BK, Tucker MA, Fraumeni JF Jr. (eds). *New Malignancies Among Cancer Survivors: SEER Cancer Registries, 1973-2000*. National Cancer Institute. NIH Publ. No. 05-5302. Bethesda, MD, 2006. Accessed on 4/18/2014 at [http://seer.cancer.gov/archive/publications/mpmono/MPMonograph\\_complete.pdf](http://seer.cancer.gov/archive/publications/mpmono/MPMonograph_complete.pdf).
34. Darbre PD, Aljarrah A, Miller WR, et al. Concentrations of parabens in human breast tumours. *J Appl Toxicol*. 2004;24:5–13.
35. Davies C, Pan H, Godwin J, et al. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet*. 2013 Mar 9;381(9869):805-16. Erratum in: *Lancet*. 2013 Mar 9;381(9869):804.
36. Dillon DA, Guidi AJ, Schnitt SJ. Pathology of invasive breast cancer. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, eds. *Diseases of the Breast*. 4th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott-Williams & Wilkins; 2010: 374–407.
37. Dorval M, Guay S, Mondor M, et al. Couples who get closer after breast cancer: Frequency and predictors in a prospective investigation. *J Clin Oncol*. 2005;23:3588– 3596.
38. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 1998 May 16;351(9114):1451-67.
39. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15- year survival: An overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005;366:2087–2106.
40. Farvid MS, Cho E, Chen WY, Eliassen AH, Willett WC. Dietary protein sources in early adulthood and breast cancer incidence: prospective cohort study. *BMJ*. 2014;348:g3437.
41. FDA briefing information, Avastin (bevacizumab), for the July20, 2010 Meeting of the Oncology Drugs Advisory Committee. Accessed at <http://www.fda.gov/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/OncologicDrugsAdvisoryCommittee/ucm219223.htm> on July 20, 2010.

42. Finn RS, Crown JP, Lang I, et al. The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): randomised phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2015 Jan;16(1):25-35. doi: 10.1016/S1470-2045(14)71159-3. Epub 2014 Dec 16.
43. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, et al. Tamoxifen for the prevention of breast cancer: current status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97:1652–1662.
44. Fizazi K, Lipton A, Mariette X, et al. Randomized phase II trial of denosumab in patients with bone metastases from prostate cancer, breast cancer, or other neoplasms after intravenous bisphosphonates. *J Clin Oncol.* 2009 Apr 1;27(10):1564–1571. Epub 2009 Feb 23.
45. Fong PC, Boss DS, Yap TA, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med.* 2009 Jul 9;361(2):123–134. Epub 2009 Jun 24.
46. Galimberti V, Cole BF, Zurrada S, et al. Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastases (IBCSG 23-01): a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2013 Apr;14(4):297-305. Epub 2013 Mar 11.
47. Gärtner R, Jensen MB, Nielsen J, Ewertz M, Kroman N, Kehlet H. Prevalence of and factors associated with persistent pain following breast cancer surgery. *JAMA.* 2009 Nov 11;302(18):1985–1992.
48. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, et al. Axillary Dissection vs No Axillary Dissection in Women With Invasive Breast Cancer and Sentinel Node Metastasis. *JAMA.* 2011;305(6):569-575.
49. Giusti RM, Iwamoto K, Hatch EE. Diethylstilbestrol revisited: a review of the long-term health effects. *Ann Intern Med.* 1995 May 15;122(10):778-788.
50. Gnant M, Mlineritsch B, Luschin-Ebengreuth G, et al. Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group (ABCSCG). Adjuvant endocrine therapy plus zoledronic acid in premenopausal women with early-stage breast cancer: 5-year follow-up of the ABCSCG- 12 bone-mineral density substudy. *Lancet Oncol.* 2008 Sep;9(9):840–849. Epub 2008 Aug 19.
51. Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI, et al. Prognostic Effects of 25-Hydroxyvitamin D Levels in Early Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2009 May 18.
52. Goss PE, Ingle JN, Alés-Martínez JE, et al. Exemestane for breast-cancer prevention in postmenopausal women. *N Engl J Med.* 2011;364(25):2381–2391.
53. Gray RG, Rea D, Handley K, et al. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years in 6,953 women with early breast cancer. *J Clin Oncol* (Meeting Abstracts) June 2013 vol. 31 no. 18\_suppl 5.
54. Hamajima N, Hirose K, Tajima K, et al. Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br J Cancer.* 2002 Nov 18;87(11):1234-1245.
55. Heiss G, Wallace R, Anderson GL, et al, WHI Investigators. Health risks and benefits 3 years after stopping randomized treatment with estrogen and progestin. *JAMA.* 2008;299:1036-1045.
56. Helvie MA. Imaging analysis: mammography. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, eds. *Diseases of the Breast.* 4th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott-Williams & Wilkins; 2010: 116–130.
57. Holmberg L, Anderson H. HABITS (hormonal replacement therapy after breast cancer -- is it safe), randomised comparison: trial stopped. *Lancet.* 2004;363:453–455.

58. Holmes MD, Chen WY, Feskanich D, et al. Physical activity and survival after breast cancer diagnosis. *JAMA*. 2005;293:2479–2486.
59. Hoover RN, Hyer M, Pfeiffer RM, et al. Adverse health outcomes in women exposed in utero to diethylstilbestrol. *New Engl J Med*. 2011;365:1304–1314.
60. Houssami N, Hayes DF. Review of preoperative magnetic resonance imaging (MRI) in breast cancer: should MRI be performed on all women with newly diagnosed, early stage breast cancer? *CA Cancer J Clin*. 2009 Sep-Oct;59(5):290-302. Epub 2009 Aug 13.
61. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975- 2010, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2010/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/), based on November 2012 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2013.
62. Kabat GC, Cross AJ, Park Y, et al. Meat intake and meat preparation in relation to risk of postmenopausal breast cancer in the NIH-AARP diet and health study. *Int J Cancer*. 2009 May 15;124(10):2430–2435.
63. Kabat GC, Kim M, Adams-Campbell LL, et al; WHI Investigators. Longitudinal study of serum carotenoid, retinol, and tocopherol concentrations in relation to breast cancer risk among postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*. 2009 Jul;90(1):162–169.
64. King MC, Wieand S, Hale K, et al. National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project. Tamoxifen and breast cancer incidence among women with inherited mutations in BRCA1 and BRCA2: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP-P1) Breast Cancer Prevention Trial. *JAMA*. 2001;286:2251–2256.
65. Kushi LH, Doyle C, McCullough M, et al. American Cancer Society guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: Reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA Cancer J Clin*. 2012;62:30-67.
66. Lawenda BD, Mondry TE, Johnstone PA. Lymphedema: a primer on the identification and management of a chronic condition in oncologic treatment. *CA Cancer J Clin*. 2009 Jan-Feb; 59(1):8–24.
67. Li CI, Beaber EF, Chen Tang MT, Porter PL, Daling JR, Malone KE. Effect of Depo-Medroxyprogesterone Acetate on Breast Cancer Risk among Women 20 to 44 Years of Age. *Cancer Res*. 2012 Apr 15;72(8):2028-2035. Epub 2012 Feb 27.
68. Marshall H, Gregory W, Bell R, et al. Adjuvant therapy with zoledronic acid (AZUREBIG 01/04): The influence of menopausal status and age on treatment effects. *J Clin Oncol*. 2012; 30(suppl; abstr 502)
69. McCloskey E, Paterson A, Kanis J, et al. Effect of oral clodronate on bone mass, bone turnover and subsequent metastases in women with primary breast cancer. *Eur J Cancer*. 2010 Feb;46(3):558-565. Epub 2009 Dec 22.
70. McTiernan A, Kooperberg C, White E, et al. Recreational physical activity and the risk of breast cancer in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Cohort Study. *JAMA*. 2003; 290:1331–1336.
71. Mirick DK, Davis S, Thomas DB. Antiperspirant use and the risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94:1578–1580.
72. Moskowitz AH, Anderson BO, Yeung RS, Byrd DR, Lawton TJ, Moe RE. Axillary web syndrome after axillary dissection. *Am J Surg*. 2001 May;181(5):434–439.
73. Moyer VA on behalf of the U.S. Preventive Services Task Force. Risk Assessment,
74. Genetic Counseling, and Genetic Testing for BRCA-Related Cancer in Women: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *Ann Intern Med*. 2014 Feb 18;160(4).
75. National Cancer Institute. Genetics of Breast and Ovarian Cancer (PDQ®). 7/25/2013. Accessed at <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/genetics/breast-andovarian/> HealthProfessional on 8/16/2013.

76. National Cancer Institute Fact Sheets. Antiperspirants/Deodorants and Breast Cancer. 1/4/2008.
77. Accessed at <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Risk/AP-Deo> on August 16, 2013.
78. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Practice Guidelines in Oncology: Breast Cancer. Version 3.2014. Accessed at [www.nccn.org](http://www.nccn.org) on June 10, 2014.
79. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Practice Guidelines in Oncology: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian. Version 1.2012. Accessed at [www.nccn.org](http://www.nccn.org) on 8/23/12
80. Nattinger A. Variation in the choice of breast-conserving surgery or mastectomy: Patient or physician decision making? *J Clin Oncol*. 2005;23:5429–5431.
81. Olsson HL, Ingvar C, Bladstrom A. Hormone replacement therapy containing progestins and given continuously increases breast carcinoma risk in Sweden. *Cancer*. 2003;97:1387–1392.
82. Pagani O, Regan MM, Walley BA, et al. Adjuvant Exemestane with Ovarian Suppression in Premenopausal Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2014 Jun 1.
83. Patil R, Clifton GT, Holmes JP, et al. Clinical and immunologic responses of HLA-A3+ breast cancer patients vaccinated with the HER2/neu-derived peptide vaccine, E75, in a phase I/II clinical trial. *J Am Coll Surg*. 2010 Feb;210(2):140-147. Epub 2009 Dec 22.
84. Pierce JP, Patterson RE, Senger CM, Flatt SW, Caan BJ, Natarajan L, Nechuta SJ, Poole EM, Shu XO, Chen WY. Lifetime cigarette smoking and breast cancer prognosis in the After Breast Cancer Pooling Project. *J Natl Cancer Inst*. 2014 Jan;106(1):djt359. Epub 2013 Dec 7.
85. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Basal-like breast cancer: a critical review. *J Clin Oncol*. 2008;26:2568–2581.
86. Rebbeck TR, Lynch HT, Neuhausen SL, et al. Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *N Engl J Med*. 2002;346:1616–1622.
87. Rosenberg RD, Yankaskas BC, Abraham LA, et al. Performance benchmarks for screening mammography. *Radiology*. 2006 Oct;241(1):55-66.
88. Ross J, Hatzis C, Symmans F, et al. Commercialized multigene predictors of clinical outcome for breast cancer. *Oncologist*. 2008;13:477–493.
89. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2002 Jul 17;288(3):321-333.
90. Santen RJ, Mansel R. Benign breast disorders. *N Engl J Med*. 2005;353:275-285. Saslow D, Boetes C, Burke W, et al for the American Cancer Society Breast Cancer Advisory Group. American Cancer Society guidelines for breast screening with MRI as an adjunct to mammography. *CA Cancer J Clin*. 2007;57:75-89. Available at: <http://caonline.amcancersoc.org/cgi/content/full/57/2/75>. Accessed July 17, 2008.
91. Schnitt SJ, Collins LC. Pathology of benign breast disorders. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, eds. *Diseases of the Breast*. 4th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins; 2010:69-85.
92. Sickles EA. The use of breast imaging to screen women at high risk for cancer. *Radiol Clin North Am*. 2010 Sep;48(5):859-78.
93. Simpson PT, Reis-Filho JS, Lakhani SR. Lobular Carcinoma In Situ: Biology and Pathology. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, eds. *Diseases of the Breast*. 4th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins. 2010: 333-340.
94. Skegg DC, Noonan EA, Paul C, Spears GF, Meirik O, Thomas DB. Depot medroxyprogesterone acetate and breast cancer. A pooled analysis of the World Health Organization and New Zealand studies. *JAMA*. 1995 Mar 8;273(10):799-804.

95. Smith GL, Xu Y, Buchholz TA, Giordano SH, Jiang J, Shih YC, Smith BD. Association between treatment with brachytherapy vs whole-breast irradiation and subsequent mastectomy, complications, and survival among older women with invasive breast cancer. *JAMA*. 2012 May 2;307(17):1827-1837.
96. Smith RA, Saslow D, Sawyer KA, et al. American Cancer Society guidelines for breast cancer screening: update 2003. *CA Cancer J Clin*. 2003 May-Jun;53(3):141-169.
97. Smith RE, Bryant J, DeCillis A, Anderson S. Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after doxorubicin-cyclophosphamide adjuvant therapy for operable breast cancer: the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Experience. *J Clin Oncol*. 2003;21:1195-1204.
98. Solin LJ, Gray R, Baehner FL, et al. A multigene expression assay to predict local recurrence risk for ductal carcinoma in situ of the breast. *J Natl Cancer Inst*. 2013 May 15;105(10):701-10. Epub 2013 May 2.
99. Stopeck AT, Lipton A, Body JJ, et al. Denosumab Compared With Zoledronic Acid for the Treatment of Bone Metastases in Patients With Advanced Breast Cancer: A Randomized, Double-Blind Study. *J Clin Oncol*. 2010 Dec 10;28(35):5132-5139. Epub 2010 Nov 8.
100. The American College of Radiology BI-RADS® ATLAS and MQSA: Frequently Asked Questions. 11/29/12. Accessed at <http://www.acr.org/~media/ACR/Documents/PDF/QualitySafety/Resources/BIRADS/BI-RADSFAQs.pdf> on February 6, 2013.
101. Thompson D, Easton D, and The Breast Cancer Linkage Consortium. Cancer incidence in BRCA1 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94:1358–1365.
102. US Department of Health and Human Services. The Health Consequences of Involuntary Exposure to Tobacco Smoke: A Report of the Surgeon General. 2006.
103. Accessed at [www.surgeongeneral.gov/library/secondhandsmoke/](http://www.surgeongeneral.gov/library/secondhandsmoke/) on November 3, 2011.
104. US Food and Drug Administration. Bio-Identicals: Sorting Myths from Facts. Accessed at <http://www.fda.gov/forconsumers/consumerupdates/ucm049311.htm> on 2/14/2012.
105. Vadivelu N, Schreck M, Lopez J, et al. Pain after mastectomy and breast reconstruction. *Am Surg*. 2008. 74:285–296.
106. Verma S, Miles D, Gianni L, et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2012 Nov 8;367(19):1783-91. Epub 2012 Oct 1.
107. Vilholm OJ, Cold S, Rasmussen L, Sindrup SH. The postmastectomy pain syndrome: An epidemiological study on the prevalence of chronic pain after surgery for breast cancer. *Br J Cancer*. 2008. 99:604–610.
108. Vogel VG, Costantino JP, Wickerham DL, et al. Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes: the NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 trial. *JAMA*. 2006;295:2727–2741.
109. Vogel VG, Costantino JP, Wickerham DL, et al. Update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 Trial: Preventing breast cancer. *Cancer Prev Res (PhilaPa)*. 2010 Jun;3(6):696-706. Epub 2010 Apr 19.
110. Walker EM, Rodriguez AI, Kohn B, et al. Acupuncture versus venlafaxine for the management of vasomotor symptoms in patients with hormone receptor-positive breast cancer: a randomized controlled trial. *J Clin Oncol*. 2010 Feb 1;28(4):634-640.
111. Whelan T, MacKenzie R, Julian J, et al. Randomized trial of breast irradiation schedules after lumpectomy for women with lymph node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94:1143–1150.

112. Winer EP, Carey LA, Dowsett M, Tripathy D. Beyond anatomic staging: Is it time to take a leap into the molecular era? *American Society of Clinical Oncology Educational Book*. Alexandria, Va: American Society of Clinical Oncology; 2005.
113. Wolff AC, Blackford AL, Visvanathan K, et al. Risk of marrow neoplasms after adjuvant breast cancer therapy: the national comprehensive cancer network experience. *J Clin Oncol*. 2015 Feb 1;33(4):340-8. Epub 2014 Dec 22