



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Multiterapia contra el cáncer mediante el uso de quimioterapia convencional
con cisplatino y su forma nanoparticulada

Multitherapy against cancer by using cisplatin conventional chemotherapy and
its nanoparticulate form

Autor

Natalia Calvo Sánchez

Director

José Javier Aramayona Alonso

Facultad de Veterinaria

2020/2021

Contenido

1. RESUMEN / ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	4
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	7
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
4.1. Modelo animal.....	8
4.2. Tumor VX2.....	8
4.3. Implantación del tumor	9
4.4. Cuidados postoperatorios	11
4.5. Controles ecográficos secuenciales.....	11
4.6. Terapia antitumoral.....	12
4.7. Protocolo de administración del tratamiento quimioterápico.....	12
4.8. Hemograma y bioquímica	13
4.9. Eutanasia, necropsia y toma de muestras	14
4.10. Histopatología	14
4.11. Viabilidad in vitro de las células Caco 2 sometidas a la acción de los fármacos.....	14
5. RESULTADOS	17
5.1. Implantación del tumor VX2 y cuidados postoperatorios.....	17
5.2. Controles ecográficos secuenciales	18
5.3. Hemograma y bioquímica	19
5.4. Necropsia	20
5.5. Histopatología.....	23
5.6. Viabilidad in vitro de las células Caco 2 sometidas a la acción de los fármacos.....	26
6. DISCUSIÓN	28
7. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS.....	32
8. VALORACIÓN PERSONAL	33
9. BIBLIOGRAFÍA	34

1. RESUMEN

El cisplatino o cisdiaminodicloroplatino (II) (CDDP) constituye uno de los fármacos quimioterápicos más eficaces en el tratamiento de tumores sólidos. Sin embargo, los efectos adversos derivados de su administración a dosis terapéuticas, junto con ciertas limitaciones relacionadas con su farmacocinética, ponen de manifiesto la necesidad de investigar nuevas formas de administración. Por ello, el objetivo de este trabajo es dar los primeros pasos en la evaluación de la eficacia terapéutica de una nueva forma de presentación del CDDP, basada en su conjugación con nanopartículas constituidas por un núcleo de óxido de hierro y protegidas por una envoltura de polietilenglicol (PEG).

Con el fin de obtener esta primera valoración, se diseñó un procedimiento experimental que permitiera comparar el efecto antitumoral *in vivo* de las formas de presentación convencional y nanoparticulada del CDDP. Para ello, se empleó un número reducido de animales, concretamente 10 conejos de raza Nueva Zelanda, a los que se les implantó quirúrgicamente en hígado un fragmento del carcinoma anaplásico de células escamosas VX2. Los animales fueron organizados en cuatro grupos en función del tratamiento farmacológico previsto para cada uno de ellos. La monitorización del crecimiento de la masa tumoral hepática se llevó a cabo mediante controles ecográficos seriados, de manera que la administración farmacológica se inició al detectarse un tamaño tumoral de aproximadamente 1x1 cm. Los animales fueron sacrificados 5 días después de recibir el tratamiento, evitando así un sufrimiento innecesario por parte de los individuos. Finalmente, se realizó la necropsia y la toma de muestras del tumor, lo que permitió su estudio histopatológico por medio de una tinción convencional con H&E de las muestras obtenidas.

Dado lo inesperado de los resultados obtenidos *in vivo*, se realizó una pequeña experiencia en la que se comprobó el efecto *in vitro* de ambas formas de presentación del CDDP sobre la línea celular Caco 2, ya que las células VX2 no se encuentran disponibles como línea para cultivo celular.

Los resultados así obtenidos permitieron establecer la validez del tratamiento con CDDP sobre la línea tumoral VX2 implantada en hígado de conejo, sin embargo, su forma de presentación vehiculizada por nanopartículas no pareció mostrar una mayor eficacia antitumoral en los ensayos realizados *in vitro* e *in vivo*.

Palabras clave: cisplatino, nanopartículas, núcleo de óxido de hierro, PEG, terapia dirigida, VX2, eficacia antitumoral

ABSTRACT

Cisplatin or cisdiaminedichloroplatin (II) (CDDP) is one of the most effective chemotherapeutic drugs in the treatment of solid tumors. However, the adverse effects derived from its administration at therapeutic doses, along with others limitations related to its pharmacokinetics, point to the need to investigate new forms of administration. Therefore, the aim of this paper is to obtain preliminary results to test the therapeutic efficacy of a new form of presentation of CDDP, based on its conjugation with nanoparticles made up of an iron oxide core and protected by a polyethyleneglycol shell (PEG).

In order to obtain preliminary data, we have designed an experimental procedure to compare the antitumor effect, *in vivo*, of both the conventional and nanoparticulate form of CDDP. We used a small number of animals, in particular, 10 New Zealand rabbits, which underwent surgical implantation of a fragment of anaplastic squamous cell carcinoma VX2 in the liver. The animals were organized into four groups according to the pharmacological treatment planned for each of them. Ultrasound controls were carried out to monitor the growth of the liver tumor, so that the pharmacological administration began when the tumor size was 1x1 cm, approximately. The animals were sacrificed 5 days after receiving the treatment, always avoiding an unnecessary suffering. Finally, the necropsy was done and tumor samples were taken, allowing the its histopathological study by a conventional H&E staining.

Given the unexpected of the *in vivo* results, a small experiment was carried out to verify the *in vitro* effect of both forms of presentation of CDDP on the Caco 2 cell line, since VX2 cells are not available for cell culture.

The results thus obtained allowed to establish the validity of the treatment with CDDP on the VX2 tumor implanted in rabbit liver, however, its form of presentation carried by nanoparticles did not seem to show a higher antitumor efficacy both in the *in vitro* and the *in vivo* tests.

Key words: cisplatin, nanoparticles, iron oxide core, PEG, targeted therapy, VX2, antitumor efficacy

2. INTRODUCCIÓN

El cisplatino o cisdiaminodicloroplatino (II) (CDDP) se erige como uno de los agentes quimioterápicos más eficaces en el tratamiento de tumores sólidos pulmonares, genitourinarios, digestivos y de cabeza y cuello (Aldossary, 2019; Rashtchizadeh et al., 2019), de distinta naturaleza histológica, como los carcinomas, los linfomas, los sarcomas y los tumores de células germinales (Dasari y Tchounwou, 2014).

Cuando el CDDP se encuentra en un medio con una baja concentración de iones cloro (Cl^-), como es el medio intracelular, éste se activa gracias a una reacción de hidrólisis por la cual los átomos de cloro del fármaco son sustituidos por moléculas de agua o grupos alcohólicos. En su forma activa, el CDDP puede unirse covalentemente a dos puntos del DNA, frecuentemente a bases de adenina o guanina, formando aductos o enlaces cruzados en función de si dichas uniones se localizan en la misma hebra o en dos hebras distintas de DNA, respectivamente (figura 1). Ambas estructuras se incrementan con el tiempo, inhibiendo así la replicación del DNA (Barabas et al., 2008; Ishikawa, 2009).

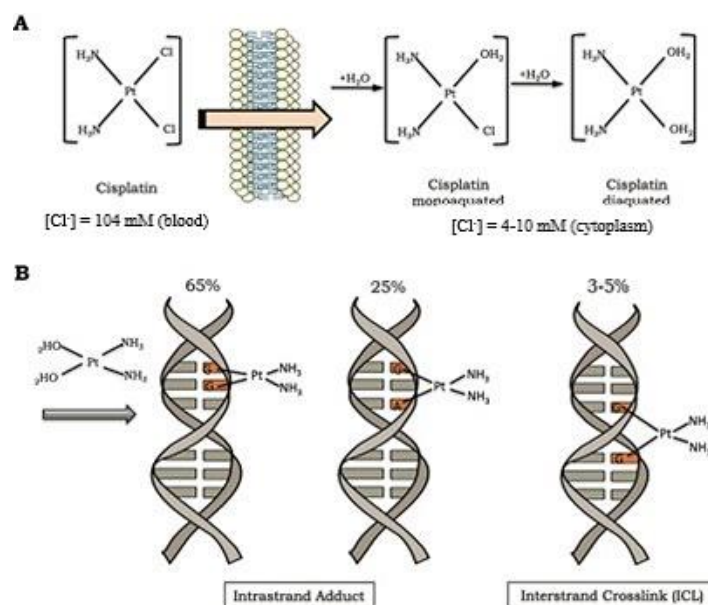


Figura 1. Activación del CDDP y formación de enlaces covalentes con el DNA, con el consiguiente daño celular. (A) Reacción de activación del CDDP por sustitución de uno o ambos de sus iones cloruro por moléculas de agua. (B) Formación de aductos por unión del CDDP a dos bases nitrogenadas de una misma hebra de DNA, y de un enlace cruzado por unión del CDDP a dos bases nitrogenadas localizadas en hebras distintas. Los porcentajes indican la frecuencia con la que se presenta cada uno de los distintos tipos de enlace. “DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship” (Rocha et al., 2018).

Desgraciadamente, se han detectado efectos adversos derivados de la administración de CDDP a dosis terapéuticas, siendo la nefrotoxicidad un factor especialmente limitante en la terapia (Barabas et al., 2008; Ishikawa, 2009). A su estrecho rango terapéutico, hay que añadirle su escasa solubilidad en el organismo, el desarrollo de resistencias por las células tumorales y la escasa especificidad de su distribución (Zhang et al., 2018), lo que finalmente implica una eficacia antitumoral limitada.

Con el fin de sortear dichos obstáculos, se están investigando nuevas modalidades de tratamiento, entre las cuales se encuentra la administración de CDDP conjugado con nanopartículas. Éstas constituyen una novedosa opción terapéutica, pues su diseño debería permitir una distribución más específica del fármaco gracias a la posibilidad de controlar su liberación por diferentes estímulos, como el valor del pH o el potencial redox del medio orgánico, así como mejorar la retención pasiva del quimioterápico en el órgano diana (Zhang et al., 2018; Mondal y Khuda-Bukhsh, 2020), minimizando sus efectos adversos sistémicos e incrementando su potencial terapéutico (Zhai et al., 2018; Jia et al., 2020).

En este estudio se optó por el empleo de nanopartículas con un núcleo de óxido de hierro protegidas por una envoltura de polietilenglicol (PEG), caracterizadas por una elevada biocompatibilidad y biodegradabilidad. Sus propiedades magnéticas y biológicas permiten dirigir la liberación del fármaco al órgano diana por medio de mecanismos activos, como la adición de moléculas capaces de interactuar específicamente con biomarcadores expresados en la superficie de las células tumorales, o bien pasivos, gracias al efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR) (Martinkova et al, 2017). Además, la envoltura de PEG evita la agregación de las nanopartículas en el momento de la administración, así como su opsonización y fagocitosis en el torrente sanguíneo, lo que incrementa su tiempo de permanencia en la circulación sistémica, y en consecuencia, las probabilidades de que el fármaco se acumule en el órgano diana en cuestión, pues allí donde se encuentra la masa tumoral los vasos que la irrigan suelen presentar una fenestración mayor (Suk et al., 2016).

En cualquier caso, aunque estas formas de presentación conjugadas han mostrado resultados satisfactorios *in vitro*, todavía se discute su comportamiento *in vivo*, dadas las disparidades encontradas en los resultados obtenidos por parte de los distintos autores (Comenge et al., 2012).

Los modelos experimentales son empleados de forma rutinaria en ensayos clínicos para valorar la eficacia de nuevos fármacos, pues constituyen un método biológico para la reproducción de características fisiológicas y/o patológicas. Si bien es cierto que los modelos *in vitro* constituyen

la primera aproximación como modelo predictor, presentan limitaciones que evidencian la necesidad de recurrir a modelos *in vivo*, tales como la acumulación de mutaciones celulares conforme el cultivo envejece, la excesiva homogeneidad de las células cultivadas y, sobre todo, el aislamiento de las células tumorales de su entorno, lo que imposibilita la valoración de aspectos como la angiogénesis tumoral, el desarrollo de metástasis, la influencia del metabolismo y la respuesta inmune del paciente sobre la eficacia del tratamiento, etc. (Armengol, Herrador y Rodríguez, 2009; Cekanova y Rathore, 2014; Katt et al., 2016).

Mientras que la evolución de la tasa de mortalidad en humanos ocasionada por afecciones de tipo cardiovascular o infeccioso ha mostrado una tendencia notablemente decreciente durante los últimos años, la incidencia de procesos cancerosos y, en consecuencia, la tasa de muerte asociada a los mismos ha disminuido solo marginalmente (Comenge et al., 2012).

El tumor VX2 es un carcinoma anaplásico de células escamosas, cuyo origen se encuentra en un papiloma cutáneo inducido por el virus de Shope (Yi et al., 2019). Actualmente, este modelo tumoral es empleado en estudios relacionados con procesos neoplásicos localizados en cabeza y cuello, riñón, hígado, útero y pulmón. Concretamente en el hígado, este tipo de tumor es frecuentemente utilizado como modelo de estudio por varios motivos: en primer lugar, por su gran capacidad de crecimiento, lo que le permite alcanzar un tamaño lo suficientemente grande como para ser detectado por métodos de diagnóstico por imagen en un corto período de tiempo; en segundo lugar, por su semejanza con los tumores hepáticos humanos en lo que respecta a su vascularización por la arteria hepática y, para finalizar, por su capacidad para desarrollarse en nuestro modelo animal, el conejo (Virmani et al., 2008).

Precisamente, el tumor VX2 implantado en hígado de conejo ha sido extensamente validado como modelo de estudio del hepatocarcinoma celular (HCC), una de las tres principales causas de muerte por cáncer en el mundo en la especie humana, y, por tanto, una de las neoplasias malignas más frecuentes (Paur et al., 2020). El tumor VX2 es capaz de expresar características tumorales similares al HCC en términos de irrigación y angiogénesis, pues se ha demostrado una fuerte correlación en la expresión del factor de crecimiento endotelial (FCE), y por tanto en el desarrollo de microvascularización, entre ambos tipos de tumores. La importancia del grado de expresión del FCE radica en su potente valor pronóstico en pacientes con HCC, dada su relación con el crecimiento tumoral y la progresión del cuadro clínico (van Breugel et al., 2019).

Por todo ello, y con el fin de obtener resultados *in vivo* sobre la eficacia terapéutica antitumoral de la nueva forma de presentación nanoparticulada del CDDP en comparación con su forma galénica convencional, se procedió a la implantación hepática del modelo tumoral VX2 en conejo.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La elección de esta temática para la realización de mi trabajo de fin de grado estuvo motivada por varias razones. En primer lugar, respondía a mi interés por la oncología y la farmacología, ramas del conocimiento que desde un primer momento suscitaron mi curiosidad. Y, en segundo lugar, esta elección me ofreció la posibilidad de participar en un proyecto de investigación, lo que me permitió conocer este campo como posible salida laboral, además de desarrollar mi trabajo por medio de un procedimiento experimental.

El objetivo de esta memoria es el de obtener evidencias preliminares sobre la eficacia, a corto plazo, de una nueva forma galénica de CDDP usando nanopartículas como vehículo en comparación con el empleo de CDDP en su forma de presentación convencional, empleando para ello un modelo experimental basado en la implantación quirúrgica de fragmentos de tumor VX2 en hígado de conejo. Por tanto, este estudio pretende sentar unas primeras bases en lo que respecta a la aplicación de una prometedora y novedosa terapia frente al cáncer, que habrá de ser complementada con estudios posteriores.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Modelo animal

En este estudio se emplearon 10 conejos de raza Nueva Zelanda, provenientes del Servicio de Apoyo a la Experimentación Animal (SAEA) de la Universidad de Zaragoza. Todos los procedimientos aquí descritos fueron aprobados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza.

Todos los conejos empleados en los experimentos eran machos, de 2 meses de edad y aproximadamente 2 kg de peso en el momento de su recepción en el laboratorio, para así minimizar la influencia de la variabilidad individual sobre los datos obtenidos. Además, antes de proceder se verificó su buen estado de salud.

Se procuró que las condiciones de alojamiento fueran lo más homogéneas y adecuadas posibles con el fin de proporcionar el máximo grado de bienestar a los animales. Así, cada uno de los individuos fue alojado en una jaula de estabulación individual homologada, y fue alimentado con pienso estándar y agua ad libitum. Se mantuvo un régimen de luz de 12 horas al día y una temperatura en un rango constante comprendido entre los 21-23°C.

4.2. Tumor VX2

Los fragmentos de tumor VX2 empleados en este experimento fueron obtenidos a partir de una masa tumoral hepática proveniente de un animal portador, denominado VX2-R1, implantado con la misma en 2015 en la Unidad de Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. El tumor VX2 original empleado para la implantación del animal portador fue generosamente cedido por el doctor David Melodelima (CERN, Unit 556, Lyon, France).

Los fragmentos tumorales se obtuvieron tras la resección y fragmentación de la masa neoplásica hepática en cuestión, hasta conseguir un tamaño de aproximadamente 1x1 mm³. Éstos fueron conservados desde entonces en recipientes individuales en medio RPMI 1640 (Gibco®, Thermo Fisher) con un 5% de suero fetal bovino, conteniendo un 10% de dimetilsulfóxido, a -150°C. Previamente a su implantación, el fragmento tumoral seleccionado se descongeló rápidamente al baño maría a 37°C.

4.3. Implantación del tumor

Previamente a la implantación del tumor, los animales fueron pesados y examinados con el fin de verificar su buen estado de salud. Con ello se pretendía partir de individuos con las características más homogéneas posibles, con el fin de reducir la influencia de la variabilidad individual sobre los resultados obtenidos.

La figura 2 es una representación esquemática que muestra los procedimientos seguidos en el protocolo experimental para la creación del modelo de estudio y la administración del quimioterápico.

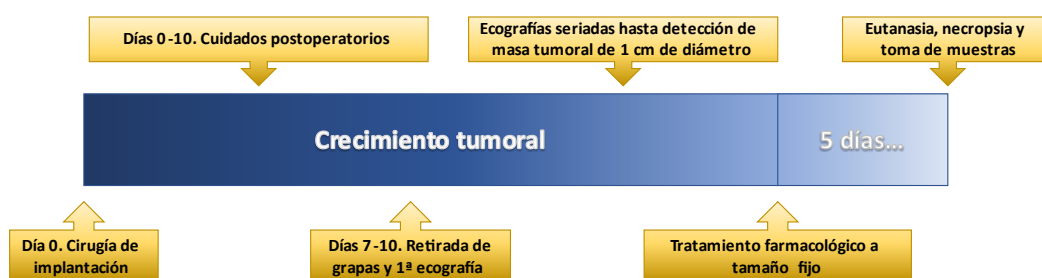


Figura 2. Representación esquemática, en orden cronológico, de los procedimientos llevados a cabo en el transcurso de este estudio.

Con respecto a la cirugía de implantación, el protocolo anestésico empleado pretendía proporcionar un apropiado grado de inconsciencia, analgesia y relajación muscular, para evitar de esta forma dolor en los animales intervenidos. Para ello, se optó primeramente por la administración de 0,1 mg/kg de medetomidina (Sedin®, Calier) por vía intramuscular (IM) como premedicación. Tras esperar aproximadamente 20 minutos para que ejerciera el efecto deseado, se procedió a la inducción con 50 mg/kg de ketamina (Ketamidor®, Karizoo) administrada por vía IM, con el fin de inducir una rápida depresión nerviosa controlada gracias a sus propiedades como anestésico disociativo y un adecuado grado de analgesia somática complementaria a la conferida por la medetomidina.

Conforme el animal iba alcanzando el grado de inconsciencia requerido, se procedió a su cateterización a través de la vena marginal de la oreja derecha por medio de un catéter venoso (Intracath®) de 22G, con el objetivo de mantener una vía venosa permeable por la que administrar la fluidoterapia o cualquier otro fármaco que pudiera ser necesario durante la intervención, pues en caso de detectarse una superficialización del plano anestésico o nocicepción intraquirúrgica por parte del animal, se previó prolongar la anestesia por medio de

la administración de bolus intravenosos de ketamina. Una vez llevada a cabo la cateterización, comenzó la administración de fluidos con suero salino fisiológico (SSF) a un ritmo de 5 ml/kg/hora.

A continuación, se dispuso al animal en decúbito supino para la preparación del campo quirúrgico. En primer lugar, se localizó la apófisis xifoides y se rasuró un área cuadrangular de unos 4x4 cm aproximadamente, situada 1 cm caudal a dicho punto. Previamente a la realización de la incisión, se llevó a cabo la desinfección del campo quirúrgico con povidona yodada al 10% (Acofar®, Acofarma) diluida con SSF, y se prosiguió con la infiltración intradérmica de 0,2 ml de lidocaína al 2% (Anesvet®, Ovejero), igualmente tomando como referencia la zona caudal a la apófisis xifoides, con el objetivo de desensibilizar el plano cutáneo de la región a intervenir.

La técnica quirúrgica consistió en una incisión subxifoidea de la piel y de los músculos abdominales de aproximadamente 3 cm de longitud, hasta visualizar el extremo caudal del lóbulo hepático izquierdo, punto en el cual debía implantarse el fragmento de tumor VX2. A continuación, se emplearon unas pinzas de disección finas para crear un pequeño desgarro en la cápsula hepática y se realizó la incisión en hígado por medio de un bisturí ocular de 0,5 cm de longitud. Para facilitar la manipulación y la posterior inserción del fragmento tumoral en su ubicación final, se emplearon un separador de 0,5 cm con borde romo y unas pinzas Mcpherson. Tras la introducción del fragmento tumoral en la incisión hepática, se presionó con una torunda durante unos 30 segundos para ejercer hemostasia y detener el ligero sangrado, así como para garantizar visualmente que el injerto permaneciera en el punto seleccionado.

Terminada la intervención, se procedió a la sutura por planos de la línea alba y del tejido muscular, para lo que se optó por una sutura continua con gliconato monofilamento absorbible 3/0 (Monosyn®, Braun). La incisión cutánea se cerró por medio de grapas estériles en lugar de puntos para facilitar la retirada posterior de las mismas (Manipler® AZ, Braun). La herida se desinfectó con povidona yodada al 10% diluida con SSF, aplicada cuidadosamente alrededor de la línea de sutura utilizando una gasa.

Posteriormente, se administraron 10 µg/kg de buprenorfina (Bupaq®, Karizoo) por vía IM, 5 mg/kg de enrofloxacin (Alsir®, Ecuphar) y 0,6 mg/kg de meloxicam (Meloxidyl®, Ceva), ambos por vía subcutánea (SC), con el fin de conferir una rápida cobertura analgésica y antibiótica a los animales intervenidos.

Para finalizar, se colocó una gasa sobre la herida para protegerla de posibles traumatismos y/o contaminaciones y se colocó un vendaje tubular.

4.4. Cuidados postoperatorios

Los cuidados postoperatorios se prolongaron durante 5 días tras la intervención. En este período, se realizó un protocolo de vigilancia y control pormenorizado, que consistió en una revisión del animal cada 24 horas. En dichas revisiones se realizó una evaluación del comportamiento del conejo (activo, exploratorio, letárgico...), se tomó la temperatura vía rectal, se examinó y curó la herida con povidona yodada al 10% diluida con SSF y, por último, se administró la medicación postoperatoria. Durante la exploración se valoró el estado del vendaje tubular, reemplazándolo cuando fuera necesario según su estado.

El tratamiento farmacológico postoperatorio consistió en la administración de 10 µg/kg de buprenorfina por vía IM tras la intervención y al día siguiente en caso de detectarse un dolor agudo, junto con 0,6 mg/kg de meloxicam y 5 mg/kg de enrofloxacin por vía SC durante 5 días. En aquellos casos en los que se detectó una temperatura corporal superior a 40°C, la terapia antibiótica se modificó, optando por la administración IM de 10 mg/kg de cefotaxima (Zeefobet®, Biochem) cada 12 horas durante 5 días

Los días siguientes al postoperatorio, se prosiguió con las revisiones diarias, en las que igualmente se valoró el comportamiento del animal, se tomó la temperatura por vía rectal y se procedió a la cura de la herida con povidona yodada al 10% diluida con SSF. Si el estado general del conejo y el aspecto de la cicatriz evolucionaban con normalidad, las grapas y el vendaje tubular eran retirados a los 7-10 días postcirugía, momento en el cual se procedió a la realización del primer control ecográfico con el fin de valorar el grado de desarrollo del fragmento tumoral implantado.

4.5. Controles ecográficos secuenciales

Todos los conejos fueron sometidos a varios controles ecográficos, que comenzaron el mismo día en el que se les retiraron las grapas y el vendaje tubular, con el fin de detectar de la manera más precisa posible el momento en el que la masa tumoral alcanzara aproximadamente 1 cm de diámetro, tamaño establecido para el inicio de la quimioterapia cuando fuera pertinente. Para ello se empleó un ecógrafo Midray DP-10 de sonda plana, con el que se obtuvieron las imágenes y se realizaron las mediciones ecográficas de la masa tumoral en modo B.

4.6. Terapia antitumoral

La administración de fármacos comenzó cuando los controles ecográficos sucesivos revelaron un tamaño tumoral de aproximadamente 1 cm de diámetro. En este momento los animales fueron divididos en cuatro grupos distintos en función del tipo de terapia antitumoral programada para los ellos:

- **Grupo 1:** constituido por un único individuo al que se le administró una solución de SSF suplementada con 20 mEq/L de ClK (SSF+ ClK). Este animal actuó como “blanco” o “control” en nuestro experimento y fue denominado “BK”.
- **Grupo 2:** constituido por tres individuos tratados con una solución idéntica a la anterior (SSF+ ClK), salvo por el hecho de que a ésta se le añadieron nanopartículas no conjugadas al agente quimioterápico. Este grupo fue denominado “Nano”.
- **Grupo 3:** constituido por tres individuos tratados con CDDP en su forma de presentación convencional. Este grupo fue denominado “CisPt”.
- **Grupo 4:** constituido por tres individuos tratados con CDDP conjugado con nanopartículas. Este grupo fue denominado “NanoCisPt”.

4.7. Protocolo de administración del tratamiento quimioterápico

Previamente a la administración de la terapia a los animales de los grupos 2, 3 y 4, se llevó a cabo una hidratación inicial, por infusión intravenosa (IV) a través de la vena auricular marginal derecha, con SSF al 0,9% suplementado con 20 mEq/L de ClK (SSF+ ClK) a una velocidad de 15 ml/kg/hora durante una hora. Una vez transcurrido este período de tiempo, se procedió a la administración de las distintas terapias en estudio a los animales de los grupos pertinentes a través de una vía colateral a aquella habilitada para la administración de fluidoterapia, de manera que el fármaco fuera vehiculizado por la misma.

El volumen de cisplatino (Accord®, Accord Healthcare), nanoparticulado o no, a administrar se calculó considerando una dosis de 40 mg/m² de superficie corporal. Éste fue cargado en una bomba de infusión continua programada para administrar el fármaco a una determinada velocidad de infusión en función del volumen calculado y del tiempo durante el cual se prolongaría la administración, que en todos los casos fue de una hora. Dado que el volumen total de fluidos (fluidoterapia con SSF+ ClK+ CisPt, SSF+ ClK+ NanoCisPt o SSF+ ClK+ Nano) debía

mantenerse constante a 15 ml/kg/hora, se tuvo en cuenta el volumen de fármaco a administrar en cada caso para reajustar el volumen de SSF+ ClK a infundir (figura 3).

Una vez finalizada la administración de fármacos, se procedió a inducir en los animales una diuresis forzada por medio de la infusión IV, por esa misma vía, de 1 g/kg de manitol al 10% (Manitol®, Braun) diluido en SSF+ ClK, administrado igualmente a lo largo de una hora a una velocidad de 15 ml/kg/hora. Posteriormente, el animal se mantuvo con SSF+ ClK hasta que se observó la eliminación de orina, momento en el que se le devolvió a su jaula de estabulación.

PESO	(gramos)	2000
VELOCIDAD DE INFUSIÓN	(ml/kg/h)	15
DOSIS DE CISPT	(mg/m ²)	40
DOSIS EQUIVALENTE DE CISPT	(mg/m ²)	26
DOSIS DE MANITOL	(g/kg)	1
SUPERFICIE CORPORAL	(m ²)	0,1572
FLUJO GOTERO	(ml/h)	30
DOSIS CISPT	(mg)	6,29

GOTERO CISPLATINO	
CisPt concentrado (ml)	NaCl + K (ml)
6,3	23,7

Volumen (ml)	Tiempo (minutos)	(ml/h)	(ml/min)	Flujo (ml/s)	Gotas	1 gota cada x s
30	60	30	0,50	0,008	0,17	6

		HORA DE INICIO	HORA DE FIN
Primera infusión (hidratación)	NaCl + KCl		
Segunda infusión (tratamiento)	NaCl + Nano		
Tercera infusión (diuresis)	Manitol + NaCl		
Cuarta infusión (lavado)	NaCl + KCl		

Figura 3. Ejemplo de un protocolo de administración de quimioterapia.

4.8. Hemograma y bioquímica

Todos los animales participantes en este experimento fueron sometidos a dos extracciones sanguíneas, una de ellas antes del tratamiento farmacológico y otra 24 horas después del mismo. Con las muestras obtenidas, se procedió a la realización de un hemograma completo a partir de sangre heparinizada por medio de un analizador automatizado (Catalyst One™, IDEXX) con el fin de valorar el estado de salud general de los animales, y a la determinación en sangre de los niveles de creatinina y de nitrógeno ureico (BUN) a partir de muestras de suero, con el objetivo de garantizar una correcta funcionalidad renal antes y después del tratamiento farmacológico, dados los posibles efectos tóxicos, principalmente a nivel renal, derivados de la administración del CDDP.

4.9. Eutanasia, necropsia y toma de muestras

A los 5 días tras la administración de la quimioterapia, y después de realizar el último control ecográfico, se llevó a cabo la eutanasia de los animales por medio de la administración IV a través de la vena marginal auricular derecha de 100 mg/kg de pentobarbital sódico (Dolethal®, Vetoquinol).

A continuación, se realizó la necropsia de los animales con el objetivo de examinar los órganos internos de la cavidad torácica y abdominal en busca de posibles focos de metástasis y otras lesiones macroscópicas, y para llevar a cabo la resección y medición de las masas tumorales hepáticas.

Para finalizar, se procedió a la toma de muestras de los tumores y a su posterior fijación en formaldehído al 10% tamponado con un pH de 7,4. Las muestras fueron remitidas y procesadas por el servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

4.10. Histopatología

Tras permanecer inmersas en formaldehído al 10% durante al menos 72 horas para su correcta fijación, las muestras de la masa tumoral VX2 se sometieron a su inclusión en parafina y al corte con microtomo en secciones de 3 μ m de grosor.

Una vez obtenidos los cortes histológicos, éstos fueron teñidos con una tinción convencional con hematoxilina-eosina (H&E) con la finalidad de valorar el aspecto microscópico de la masa tumoral y de las lesiones hepáticas ocasionadas por la misma. La evaluación de las muestras se llevó a cabo por medio de un microscopio óptico Axioskop 40, a través de los objetivos de x5, x10, x20 y x40 aumentos. Asimismo, las imágenes fueron tomadas con un sistema de captación digital (AxioCam MRc5) acoplado al propio microscopio óptico.

4.11. Viabilidad *in vitro* de las células Caco 2 sometidas a la acción de los fármacos

Dado lo inesperado de los resultados obtenidos *in vivo* en relación a la eficacia terapéutica de ambas formas de presentación del CDDP, se diseñó una pequeña experiencia en colaboración con la Unidad de Fisiología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, que aportó los materiales y el personal necesarios para su ejecución. Ésta consistió en la valoración de la viabilidad de la línea celular Caco 2 tras su exposición a concentraciones

crecientes de CDDP y CDDP nanoparticulado, con la finalidad de comprobar la fiabilidad de los resultados obtenidos *in vivo* y así descartar un posible fallo en el procedimiento experimental.

Las células Caco 2 fueron mantenidas por pasajes sucesivos en frascos de cultivo de 25 cm² en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) High Glucose (Gibco®, Thermo Fisher), conteniendo un 5% de suero fetal bovino, a 37°C y 5% de humedad. Tras una tripsinización suave, las células se resuspendieron en 2-3 ml de medio y se empleó una cámara de Neubauer para su conteo. A continuación, se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos de fondo plano a una densidad de 5x10³ células/cm² y se llevaron a incubar durante 24 horas a 37°C y un 5% de CO₂ con el fin de que las células quedaran adheridas.

El fármaco y su presentación nanoparticulada se añadieron por triplicado a los pocillos en volumen suficiente para alcanzar concentraciones de 0,25, 2,50 y 50,00 µM (por error no se incubó a 25 µM como estaba previsto), y se mantuvieron en incubación durante una hora. Transcurrido ese periodo, el medio fue aspirado y sustituido por medio fresco sin fármaco. Finalmente, la placa fue incubada durante un periodo adicional de 24 horas para permitir la acción del fármaco.

Transcurrido dicho tiempo, se procedió a valorar la supervivencia celular por el método MTT utilizando un kit comercial (Biomodel®). El ensayo MTT es un test colorimétrico que cuantifica indirectamente la viabilidad celular por medio de la determinación de la actividad de las enzimas oxidorreductasas mitocondriales dependientes de NAD(P)H. Esto nos permite determinar el número de células viables sin necesidad de realizar un recuento, por lo que suele emplearse para valorar el grado de citotoxicidad de un determinado fármaco a distintas concentraciones, tanto sobre líneas celulares comerciales como sobre cultivos primarios de células de pacientes. En las células viables, y sobre todo en las de rápido crecimiento, estas enzimas catalizan la transformación del MTT o tetrazolium (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol) de color amarillo, en su forma cristalizada y soluble en dimetilsulfóxido (DMSO), el formazán ((E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2il)- 1,3-difenilformazan) (figura 4). Dicha reacción da lugar a una solución de color morado de intensidad variable, directamente relacionada con la actividad enzimática mitocondrial e indirectamente relacionada con el número de células viables. De esta forma, un color morado intenso se traduciría en una elevada viabilidad celular y, por el contrario, un color morado débil implicaría una viabilidad celular reducida y a su vez, una mayor citotoxicidad de la sustancia a testar (Berridge, Herst y Tan, 2005; van Meerloo, Kaspers y Cloos, 2011; Bahuguna et al., 2017).

La intensidad del color de la solución se determinó por medio de la medición de la absorbancia con un espectrofotómetro (Beckman Coulter DTX-880 Multimode Detector) a 560 nm.

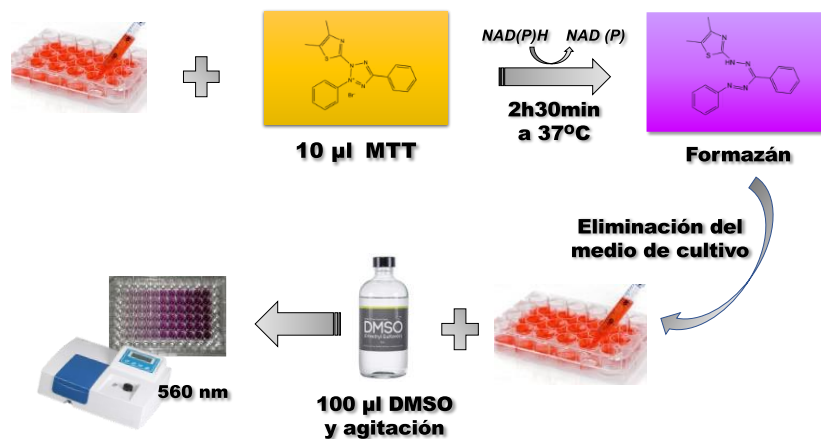


Figura 4. Representación esquemática de los pasos a seguir durante la realización del test MTT para la determinación de la viabilidad celular *in vitro*.

Para determinar el porcentaje de viabilidad celular resultante en cada caso, los valores de absorbancia obtenidos en las muestras problema se relacionaron con aquel obtenido en la muestra control, que representaría el 100% de viabilidad celular al no haber sido expuesto a ninguna de las formas de presentación del CDDP. La significación de los resultados fue valorada por medio del análisis de la varianza (ANOVA), tomando como referencia un valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Implantación del tumor VX2 y cuidados postoperatorios

La implantación quirúrgica del fragmento tumoral VX2 en hígado y consiguiente desarrollo de una masa neoplásica resultó exitosa en los 10 animales empleados en este estudio. Como ya se comentó previamente, los cuidados postoperatorios incluyeron un régimen de vigilancia exhaustivo, por el cual se controló y registró en cada caso el comportamiento de los animales, la temperatura rectal, el aspecto de la cicatriz fruto de la intervención, y además se procedió a la administración diaria de los fármacos que proporcionarían un adecuado grado de analgesia y cobertura antibiótica.

Como resultado de la monitorización periódica de los animales, se pudo concluir que en el tiempo durante el cual se prolongó este estudio no se detectaron signos de malestar o dolor en ninguno de los individuos, ni siquiera a la palpación de la zona donde se ubicaba la masa tumoral en crecimiento. En cualquier caso, se tomó la precaución de administrar buprenorfina por vía IM durante los primeros 2 días del postoperatorio y meloxicam por vía SC durante 5 días.

Por lo general, la actitud observada durante la exploración de los animales se caracterizó por un grado normal de actividad y por el típico comportamiento de juego, acicalamiento e interacción con el cuidador.

En lo que respecta al control de la temperatura corporal, si bien en todos los animales intervenidos se detectó un ligero descenso de la misma tras la operación achacable a la administración de medetomidina, los valores de temperatura registrados se mantuvieron en el rango de normalidad a excepción de un caso, en el cual se detectó un ligero aumento de la misma debido a un proceso febril. En estas circunstancias, se optó por la administración IM de 10 mg/kg de cefotaxima cada 12 horas durante 5 días adicionales como alternativa a la enrofloxacin. Como resultado, se observó una clara mejoría en los animales tratados al cabo de tan solo 24 horas.

Asimismo, se llevó a cabo el seguimiento y registro del peso de todos los animales, desde el momento de su recepción en la Unidad de Farmacología hasta su sacrificio (tabla 1). Se consideró que el peso podía constituir un aspecto valioso a la hora de valorar aspectos tales como la evolución postquirúrgica del estado del animal, los posibles efectos paraneoplásicos derivados de la presencia y crecimiento de la masa tumoral hepática, así como de la posible toxicidad sistémica derivada del tratamiento antitumoral basado en la administración de CDDP. Por ello, podría decirse que este parámetro fue empleado como un indicador del grado de bienestar animal.

Tabla 1. Valores obtenidos tras la determinación del peso (g) de cada individuo previamente a la intervención quirúrgica, a la administración del tratamiento farmacológico y al sacrificio.

ID. ANIMAL	Peso pre-cirugía	Peso pre-tratamiento	Peso pre-sacrificio
BK	1786	1880	2045
Nano 1	2427	2317	2567
Nano 2	2478	2240	2530
Nano 3	2381	2170	2393
CisPt1	1913	1935	2256
CisPt2	2081	2040	2308
CisPt3	2438	2590	2952
NanoCisPt1	2189	2233	2671
NanoCisPt2	2228	2300	2692
NanoCisPt3	2200	2209	2526

5.2. Controles ecográficos secuenciales

Cada animal incluido en este estudio fue sometido a una serie de controles ecográficos tras la intervención, de manera que el primero de ellos se realizó coincidiendo con la retirada de las grapas, aproximadamente a los 7-10 días postimplantación. Durante este periodo, solo dos de los animales intervenidos mostraron indicios de crecimiento tumoral, detectable por ecografía como una masa nodular ecogénica de aproximadamente 0,5 cm de diámetro.

Los controles ecográficos prosiguieron según lo previsto, realizándose sobre todos los animales hasta obtener una imagen ecográfica compatible con la presencia de una masa tumoral hepática de aproximadamente 1x1 cm (figura 5), momento en el cual daría comienzo la terapia farmacológica asignada en cada caso.

Las ecografías realizadas sobre los animales no tratados con CDDP, es decir, pertenecientes a los grupos 1 y 2, a los días 17 y 18 postimplantación, proporcionaron una imagen compatible con la presencia de una masa tumoral esférica o elipsoidal de aproximadamente 2x2 cm, bien delimitada y fácilmente distinguible del parénquima hepático normal por su textura heterogénea y mayor ecogenicidad.

En algunos de estos individuos, la imagen ecográfica obtenida mostró un patrón “en ojo de buey”, caracterizado por la presencia de una masa esferoidal cuyo centro mostraba una mayor ecogenicidad en comparación con el parénquima hepático sano, y rodeado inmediatamente por un halo anecoico (figura 6). Esta descripción se correspondía con la existencia de tejido necrótico en el centro de la masa tumoral rodeado de una intensa reacción inflamatoria como respuesta

al progresivo avance de las células carcinomatosas, tal y como se pudo confirmar posteriormente gracias al estudio histopatológico de las muestras. Estas características se atribuyeron al rápido crecimiento tumoral no acompañado de la neovascularización necesaria como para mantener la viabilidad de las células malignas, que en consecuencia murieron por hipoxia.

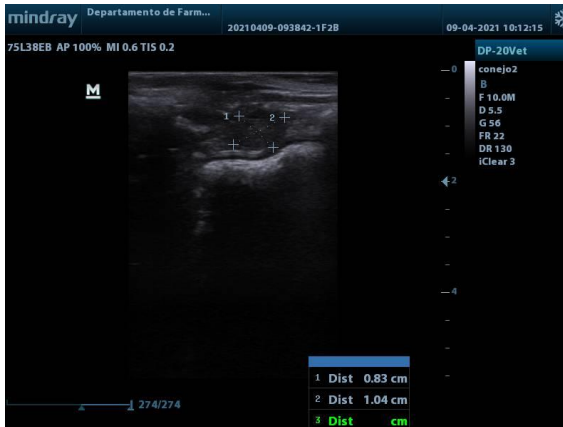


Figura 5. Imagen ecográfica compatible con una masa tumoral hepática de 0,83x1,04 cm obtenida a día 12 postimplantación, antes de iniciarse la terapia farmacológica.



Figura 6. Imagen ecográfica compatible con la presencia de una masa tumoral hepática de 1,52 cm de diámetro mostrando un patrón en ojo de buey, obtenida a día 14 postimplantación.

En lo que respecta a los controles ecográficos realizados a día 17 y 18 postimplantación sobre los animales de los grupos 3 y 4, cabe destacar que, en aquellos individuos en los que se administró la forma convencional del CDDP no se obtuvo una imagen ecográfica compatible con la presencia y desarrollo de una masa tumoral en ninguno de los dos controles, sin embargo, y al contrario de lo que cabría esperar, en los tres animales que recibieron como tratamiento antitumoral la forma nanoparticulada del CDDP, sí se detectó una imagen ecográfica compatible con la presencia de una masa tumoral hepática, de tamaño bastante variable entre los conejos pertenecientes a este grupo, pero siempre claramente inferior al observado en aquellos animales no tratados con CDDP.

5.3. Hemograma y bioquímica

Los parámetros determinados por medio de la realización del hemograma, así como los niveles de creatinina y BUN obtenidos tras la realización del perfil bioquímico renal, antes y después del tratamiento farmacológico, no revelaron ningún hallazgo que pudiera hacer sospechar de anomalías en la función orgánica (tabla 2).

En consecuencia, se puede afirmar que no se detectaron diferencias en lo que respecta al estado general de salud y a la función renal antes y después de la terapia farmacológica, ni siquiera entre aquellos animales tratados con CDDP en su forma de presentación convencional con respecto a aquellos tratados con su forma galénica nanoparticulada.

Tabla 2. Valores de creatinina (mg/dl) y BUN (mg/dl) obtenidos para cada uno de los animales antes y después del tratamiento farmacológico.

		CREATININA		BUN	
		ANTES	DESPUÉS	ANTES	DESPUÉS
BK	1	0,4	--	11,0	--
Nano	1	0,6	0,5	9,0	9,0
	2	0,4	0,7	13,0	13,0
	3	0,6	0,6	12,0	13,0
CisPt	1	0,4	0,7	10,0	14,0
	2	0,5	0,6	10,0	13,0
	3	0,4	0,8	10,0	17,0
NanoCisPt	1	0,3	0,7	11,0	13,0
	2	0,7	0,7	16,0	11,0
	3	0,3	0,7	12,0	15,0

5.4. Necropsia

Todos los animales intervenidos fueron eutanasiados 5 días después de la administración del tratamiento farmacológico, tras la realización de su último control ecográfico, dando así por finalizada la monitorización del crecimiento de la masa neoplásica y evitando en todo caso un desarrollo tumoral excesivo que pudiera comprometer el bienestar animal. Se procedió entonces a la realización de la necropsia, en la cual se llevó a cabo el examen de los órganos internos en busca de posibles metástasis y la exéresis de la región hepática donde se asentaba la masa tumoral, con el fin de determinar su tamaño real por medio de mediciones y de proceder a la toma de muestras para el estudio histopatológico.

Ninguno de los animales incluidos en la investigación sufrió el desarrollo de metástasis aparentes en el período durante el cual se prolongó el estudio. La necropsia reveló la presencia de una masa tumoral hepática única de tamaño variable según la terapia farmacológica recibida por el sujeto, sin más indicios de lesiones macroscópicas en otros órganos. Este hallazgo fue considerado como satisfactorio, pues en ningún caso se persiguió un excesivo desarrollo de la masa tumoral ni el desarrollo de focos de metástasis.

La necropsia del animal BK y de aquellos animales que recibieron únicamente una solución de SSF+ ClK+ Nano, reveló la presencia de una masa tumoral hepática nodular de color blanquecino, aspecto liso y homogéneo, con bordes bien delimitados, que protruía del parénquima hepático dado su tamaño (figura 7).

Por otro lado, al realizar la necropsia de los animales tratados con CDDP en su forma nanoparticulada, se detectó una masa tumoral de iguales características a las descritas, pero de un tamaño menor a aquel observado en los animales no tratados con el agente quimioterápico en cuestión y superior al observado en animales tratados con la forma convencional del CDDP, lo que podría indicar una menor efectividad del fármaco nanoparticulado en comparación con su forma de presentación convencional.

Tal y como se observó en los controles ecográficos, aquellos animales que recibieron un tratamiento con CDDP en su forma farmacológica convencional no mostraron un elevado grado de desarrollo del tumor, sin embargo, sí se detectó la presencia de una pequeña lesión macroscópica de aspecto tumoral a nivel hepático en aquella zona en la que se supone se ubicó el fragmento implantado (figura 8), lo que evidenciaría, por una parte, el éxito de la implantación y por otra, la efectividad de la terapia antitumoral de la forma galénica convencional del CDDP. Solamente en uno de los individuos tratados con CDDP se observó un decrecimiento total de la masa neoplásica, quedando únicamente la cicatriz resultante de la implantación como remanente.

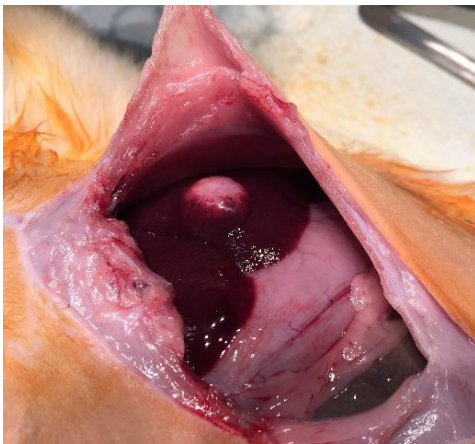


Figura 7. Masa tumoral hepática de 2x2 cm observada durante la necropsia del animal Nano 2.



Figura 8. Masa tumoral hepática de <0,5 cm de diámetro observada durante la necropsia del animal CisPt 3.

Una vez realizada la exéresis de las masas tumorales, se procedió a la estimación de su volumen de la forma más precisa posible (tabla 3). Dado que la mayor parte de los tumores observados mostraban una forma elipsoidal, se recurrió a la medición de sus tres ejes principales con el fin de calcular su volumen real a partir de la siguiente ecuación:

$$Volumen\ del\ tumor = \frac{4}{3} \pi a b c \quad (1)$$

Donde *a*, *b* y *c* se correspondían con los valores obtenidos tras la medición de los tres ejes principales.

En aquellas masas neoplásicas cuya morfología se correspondía más bien con una forma esférica, se consideró que el cálculo del volumen tumoral sería más preciso por medio de la aplicación de la siguiente ecuación:

$$Volumen\ del\ tumor = \frac{4}{3} \pi (eje\ mayor)^2 \times eje\ menor \quad (2)$$

Tabla 3. Valores (en mm) obtenidos tras la medición de los ejes *a*, *b* y *c*, y tras el cálculo del volumen (mm³) de cada masa tumoral hepática por medio de la aplicación de las ecuaciones 1 y 2.

GRUPO	ID	Eje a	Eje b	Eje c	VOLUMEN
BK	1	20	22	18	33175
	1	22	20	22	40547
Nano	2	19	20	18	28651
	3	19	18	20	28651
CisPt	1	No aparente	No aparente	No aparente	0
	2	2	4	No aparente	134
	3	2	3	No aparente	75
NanoCisPt	1	3	5	No aparente	189
	2	10	10	7	2932
	3	5	6	4	502

5.5. Histopatología

La observación de las preparaciones histológicas por microscopía óptica a 50 aumentos permitió detectar zonas de hemorragia junto con una región central débilmente teñida, lo que se correspondería con un proceso de necrosis celular por hipoxia debido a un deficiente desarrollo de la neovascularización dada la gran velocidad de crecimiento tumoral (figura 9).

En la zona periférica del tumor, se apreció una “corona” de proliferación celular activa, caracterizada por una elevada densidad de células neoplásicas. Además, se observó una clara delimitación entre la masa tumoral y el tejido hepático normal por la presencia de una cápsula de tejido conjuntivo de grosor variable entre las distintas preparaciones (figura 10). Sobre esta “zona de transición”, localizada entre la masa tumoral en crecimiento y el tejido hepático sano adyacente, se asentaba un importante infiltrado de células inflamatorias y tumorales, junto a sus respectivos detritus, como resultado de la respuesta inmune ofrecida por el organismo ante el avance del proceso neoplásico.

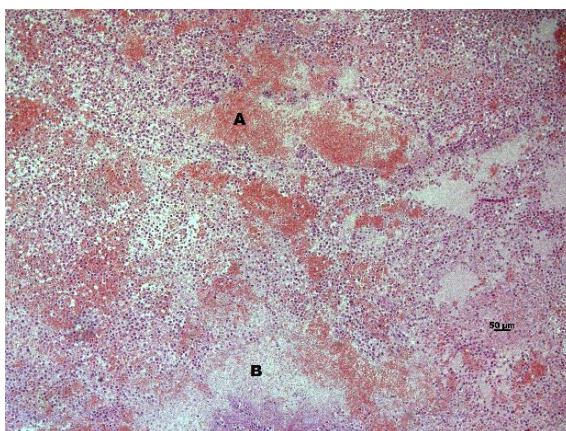


Figura 9. (A) Hemorragia y (B) zonas necróticas difusas intratumorales (5x).

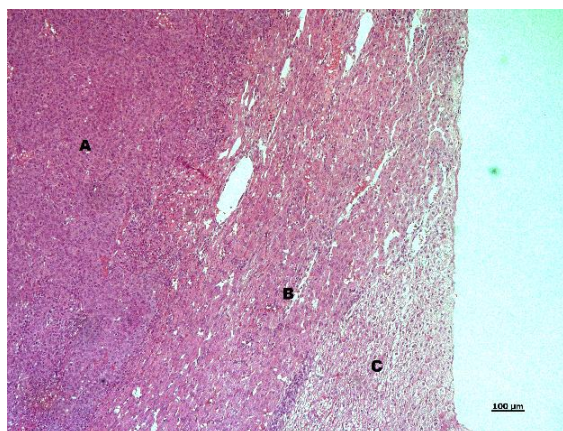


Figura 10. Zona de transición entre la masa tumoral y el tejido hepático sano adyacente (5x): (A) Células neoplásicas en proliferación; (B) Gruesa cápsula de tejido conjuntivo con infiltración de células inflamatorias y tumorales; (C) Tejido hepático con degeneración grasa.

Asimismo, el estudio microscópico de las secciones histológicas a estos aumentos permitió distinguir una distribución intratumoral de las células neoplásicas en acúmulos, formando islotes regulares con un elevado número de núcleos celulares delimitados por una fina cápsula de estroma conjuntivo (figura 11).

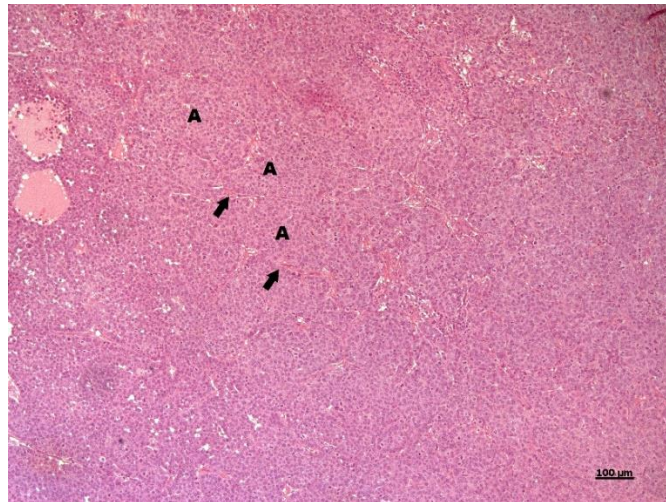


Figura 11. Distribución intratumoral de las células neoplásicas en forma de islotes regulares (A) separados por una fina capa de tejido conjuntivo (➡) (5x).

Curiosamente, se observó un aplanamiento de los hepatocitos localizados en el parénquima hepático circundante a la masa neoplásica debido a la compresión ejercida por la misma, lo que es indicativo de un crecimiento tumoral de tipo expansivo, mientras que los tumores de comportamiento maligno como el que nos ocupa, suelen presentar un patrón de crecimiento invasivo caracterizado por la infiltración del tejido sano por parte de las células neoplásicas, aspecto que también se apreció en este caso.

En los cortes histológicos obtenidos a partir de conejos pertenecientes al grupo CisPt, se observó el mayor grado de regresión tumoral, coincidiendo con el aspecto macroscópico observado durante la necropsia. En estos casos, se apreció una gruesa cápsula de tejido conjuntivo delimitando un número de células neoplásicas manifiestamente inferior al observado en los cortes histopatológicos pertenecientes a los conejos de los otros grupos. Asimismo, se detectó cierto grado de fibrosis intratumoral, lo que podría corresponderse con zonas de cicatrización estimulada por la liberación tumoral de factores de crecimiento (figura 12). Además, en estas preparaciones resulta relevante mencionar la presencia de calcificaciones rodeadas de una reacción inflamatoria de cuerpo extraño caracterizada por la presencia de células gigantes multinucleadas (figura 13).

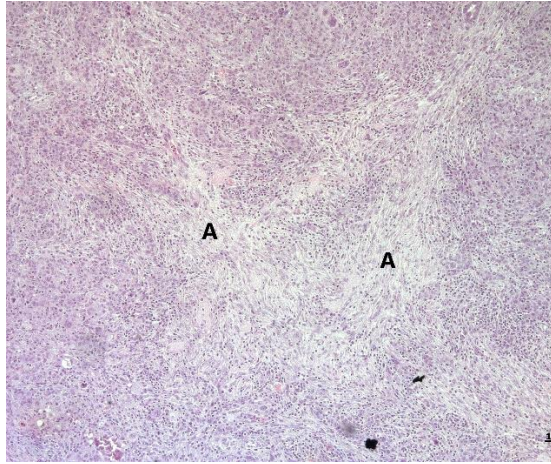


Figura 12. (A) Fibrosis intratumoral visualizada como un área más débilmente teñida debido a la presencia de fibras de tejido conjuntivo (5x).

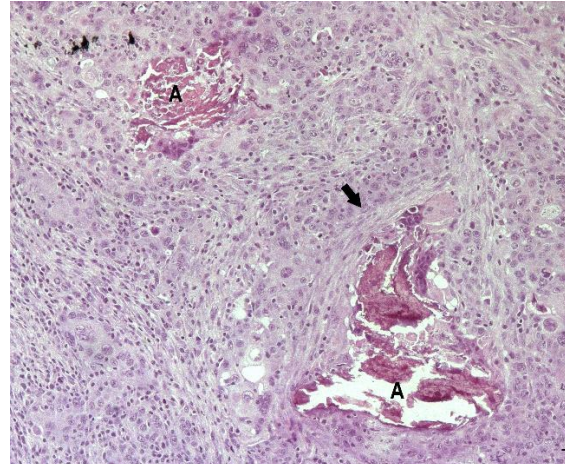


Figura 13. Puntos de calcificación (A) rodeados de una reacción de cuerpo extraño (➡) dada la cronicidad de la lesión tumoral (10x).

A partir de los 200 aumentos, el estudio histopatológico de las muestras permitió valorar características microscópicas vinculadas a la malignidad del tumor, ya evidenciada en parte por las áreas de necrosis y hemorragia visualizadas previamente, propias de tumores de rápido crecimiento, y secundadas por un elevado grado de celularidad y atipia. Esta imagen se caracterizó por la presencia de un importante número de células basófilas con una elevada relación núcleo-citoplasma, que además presentaban diferencias relevantes en lo que respecta a su tamaño y forma. También se detectó un elevado número de nucleolos evidentes y una cromatina dispersa o vacuolizada, junto con numerosas mitosis atípicas (figura 14).

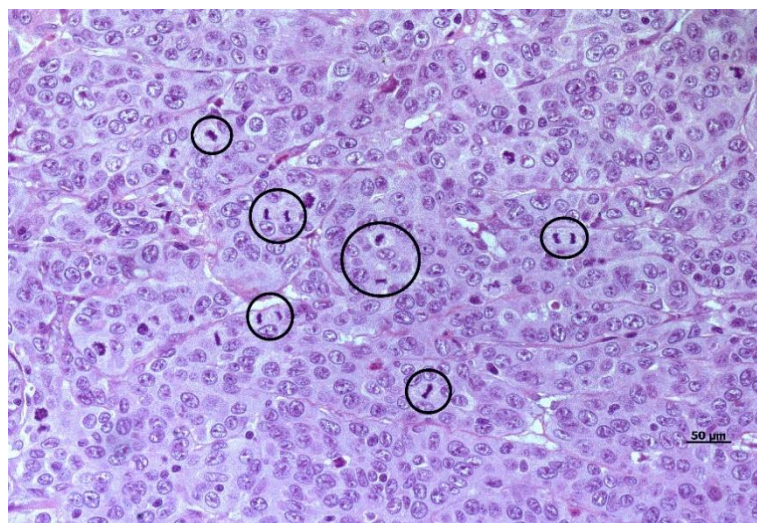


Figura 14. Gran celularidad intratumoral con un elevado grado de atipia y presencia de abundantes mitosis atípicas intratumorales (○) (x20).

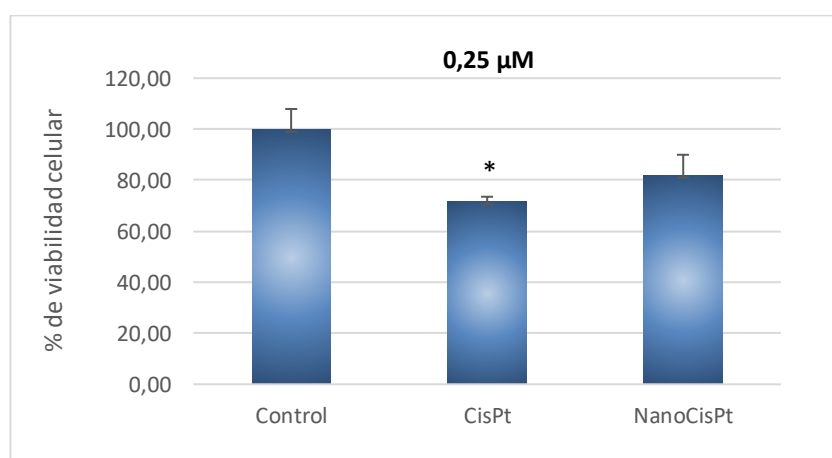
5.6. Viabilidad *in vitro* de las células Caco 2 sometidas a la acción de los fármacos

Como ya se ha mencionado previamente, y dado lo inesperado de los resultados obtenidos *in vivo*, se optó por comprobar la efectividad *in vitro* de las formas de presentación convencional y nanoparticulada del CDDP por medio de la exposición de la línea celular Caco 2 a las terapias en estudio y la posterior determinación del grado de viabilidad celular.

La exposición de la línea celular Caco 2 al CDDP y al CDDP nanoparticulado a una concentración de 0,25 μM , dio como resultado un porcentaje de viabilidad celular promedio de 71,5% y 82,0%, respectivamente. Siguiendo con el protocolo, la exposición del cultivo celular a CDDP y a CDDP nanoparticulado a una concentración de 2,5 μM , dio como resultado promedio un 89,05% y un 98,75% de viabilidad celular, respectivamente. Y para finalizar, la adición de CDDP y de CDDP en su forma nanoparticulada a una concentración de 50 μM , dio como resultado valores de viabilidad celular media del 52,4% y 67,6%, respectivamente.

Por medio de la aplicación del análisis de varianza (ANOVA), se pudo determinar que los únicos resultados de viabilidad celular que mostraban diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a aquellos observados en el cultivo celular control, fueron los resultantes de la exposición de las células Caco 2 al CDDP en su forma de presentación convencional a una concentración de 0,25 μM , y aquellos obtenidos tras la exposición del cultivo celular al CDDP convencional y nanoparticulado a una concentración de 50 μM (figura 15).

Resulta relevante mencionar la inexistencia de diferencias significativas entre los resultados de viabilidad celular obtenidos tras la exposición del cultivo a ambas formas de presentación del CDDP en estudio, lo que parece indicar una falta de efecto protector o potenciador de las nanopartículas al conjugarlas con el CDDP.



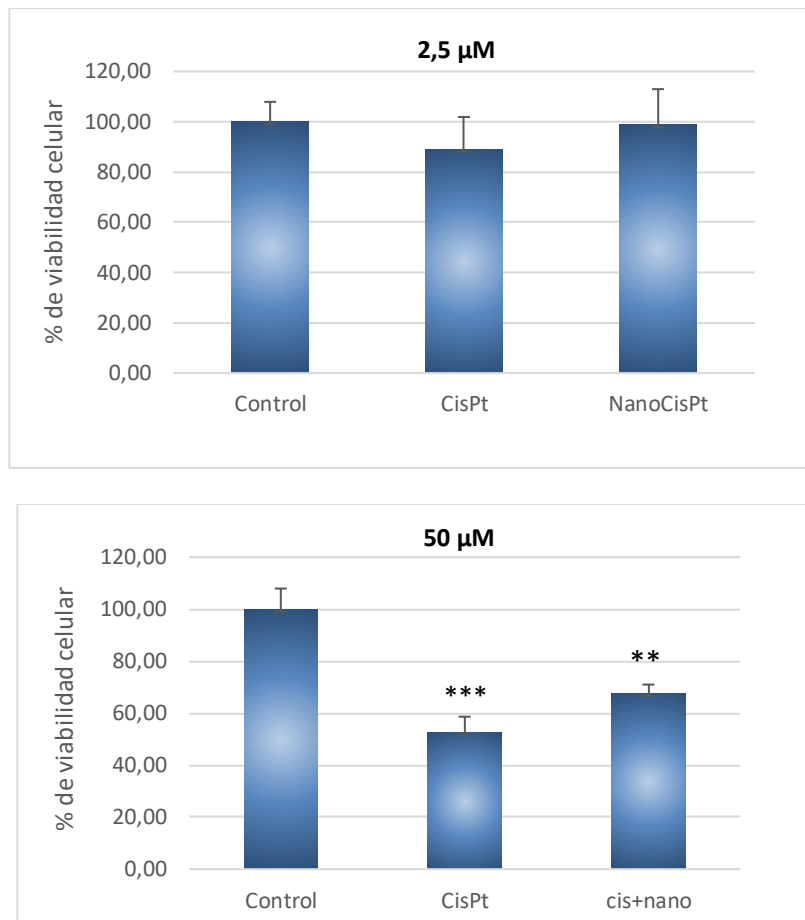


Figura 15. Viabilidad celular (%) de la línea Caco 2/TC7 tras su exposición a dosis crecientes (0,25 μM, 2,5 μM y 50 μM) de CDDP y de su forma nanoparticulada. Los asteriscos señalan aquellos valores de viabilidad celular significativamente diferentes con respecto aquellos obtenidos en el cultivo celular control (*p < 0,05, **p < 0,001, ***p < 0,0001).

6. DISCUSIÓN

Por medio del empleo de un número reducido de animales de experimentación, este estudio ha pretendido obtener datos preliminares que permitieran comparar la eficacia, a corto plazo, del CDDP con respecto a su forma de presentación nanoparticulada como tratamiento quimioterápico frente al modelo tumoral VX2 implantado en hígado de conejo. El escaso tamaño muestral empleado en este estudio constituye una importante limitación, de manera que los datos así obtenidos no poseen la significación estadística necesaria para la formulación de conclusiones sólidas. Por este motivo, sería recomendable emprender investigaciones posteriores relativas al uso de nanopartículas como vehículo de fármacos quimioterápicos con el fin de obtener resultados adicionales.

En el diseño experimental de este estudio se optó por la implantación de un fragmento tumoral de aproximadamente 1 mm³ en el extremo caudal del lóbulo hepático lateral izquierdo de cada conejo por medio de la realización de una laparotomía media, procedimiento que se ejecutó con éxito en el 100% de los casos. A pesar de existir técnicas de implantación tumoral alternativas menos cruentas, como la inoculación percutánea en hígado de una suspensión de células tumorales de concentración conocida por medio de técnicas de imagen avanzadas, los resultados obtenidos por este procedimiento ofrecen una tasa de éxito variable. Así, mientras Luo et al. (2010) y Wang et al. (2013) obtuvieron el mismo porcentaje de éxito y la misma velocidad de crecimiento en masas tumorales VX2 implantadas en hígado vía laparotomía media que en aquellas implantadas por vía percutánea con la ayuda de tomografía computerizada (TC), Chen et al. (2004), Virmani et al. (2008) y Sun et al. (2012) obtuvieron tasas de éxito de alrededor del 92% en aquellos casos en los que se llevó a cabo la implantación tumoral hepática por medio de una laparotomía media, frente al 47% cuando ésta se realizó por medio de la inoculación de células tumorales por vía percutánea.

A pesar de no poseer un origen hepático, numerosos argumentos avalan el empleo del carcinoma anaplásico de células escamosas VX2 como modelo en el estudio de nuevas terapias frente al HCC, entre los que cabe citar su propia naturaleza histológica, su rápido crecimiento, la semejanza de la vascularización tumoral desarrollada durante su crecimiento con respecto al HCC humano, así como su potencial para generar metástasis tempranas tanto por vía hematogena como por vía linfática, siguiendo incluso el mismo patrón metastático que el HCC (Lee et al., 2009). Sin embargo, el empleo de este modelo tumoral no está exento de dificultades. Uno de los principales desafíos encontrados en el transcurso de esta investigación fue determinar el momento conveniente para iniciar la terapia farmacológica. Así, mientras

numerosos estudios experimentales (Sonoda et al., 2011; Li et al., 2020; Shi et al., 2020) optaron por comenzar la administración de fármacos a tiempo fijo (en la mayoría de los casos, a las 2 semanas postimplantación tumoral), en el diseño de este estudio se programó el comienzo de la administración farmacológica no a tiempo fijo, sino a tamaño fijo. De esta forma, se priorizó el tamaño de la masa tumoral en desarrollo, determinado por medio de controles ecográficos seriados, como parámetro indicador del momento conveniente para iniciar la terapia antitumoral. Esta decisión se vio en parte motivada por la metodología empleada en medicina humana para el tratamiento de pacientes que padecen HCC, basada en las directrices del Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC), según las cuales las distintas opciones de tratamiento se barajan en base al estadio del tumor, atendiendo a aspectos tales como su tamaño, el número de masas tumorales, la invasión de vasos adyacentes por las células malignas, etc. En este caso, se determinó que el momento óptimo para comenzar el tratamiento farmacológico se correspondía con un tamaño tumoral no superior a 1x1 cm, equivalente según el BCLC a un HCC en un estadio 1 o de desarrollo temprano (Wang et al., 2013; Richani et al., 2016; Raoul et al., 2018).

En ningún caso se permitió que la masa tumoral alcanzase un tamaño superior a los 2 cm de diámetro, lo que suele producirse a partir de los 21 días postimplantación. Un crecimiento tumoral excesivo se ha visto vinculado a una pérdida de apetito y de peso notable por parte de los animales implantados, con la pérdida de bienestar que ello conlleva. Asimismo, con esta decisión se pretendió evitar el desarrollo de metástasis extrahepáticas, ya que, aunque este hecho proporcionaría datos de interés acerca de los posibles patrones metastáticos y la influencia de las distintas formas galénicas administradas sobre su desarrollo, en ningún caso este estudio persiguió dicho objetivo (Luo et al., 2010; Wang et al., 2013).

En lo que respecta al estudio de la eficacia terapéutica de ambas formas de presentación del CDDP frente al tumor VX2 hepático en conejo, los resultados obtenidos *in vivo* parecen indicar que la forma nanoparticulada del CDDP no ejerce un mayor efecto antineoplásico, determinado por el grado de regresión de la masa tumoral hepática, en comparación con el CDDP en su forma de presentación convencional administrado a la misma dosis (40 mg/m² de superficie corporal). Por otro lado, el estudio de los efectos citotóxicos *in vitro* de la terapia farmacológica con CDDP en sus dos formas de presentación proporcionó resultados un tanto dispares y no concluyentes, pues resulta contradictorio que el grado de viabilidad celular obtenido tras la exposición de las células Caco 2 al CDDP a una concentración de 2'5 µM no presente diferencias significativas ($p > 0,05$) con respecto al control, y en cambio, estos mismos resultados sean significativos al exponer el cultivo celular a concentraciones 10 veces menores de fármaco.

Además, la revisión de la bibliografía generada a partir de investigaciones con líneas de trabajo similares proporcionó datos no coincidentes a los obtenidos en este estudio. Así, Mondal y Khuda-Bukhsh (2019), observaron una mayor citotoxicidad *in vitro* sobre la línea de células hepatocarcinomas HepG2 tras su exposición a la nanoforma coencapsulada de CDDP y farnesol en comparación con la exposición de las mismas a la forma de presentación convencional del CDDP, y del mismo modo, Zhai et al. (2018), observaron que el CDDP vehiculizado por nanopartículas lipídicas presentaba una mayor citotoxicidad *in vitro* al ser añadido a un cultivo de células hepatocarcinomas HepG2 en comparación con su forma de presentación convencional.

En cualquier caso, es importante considerar que actualmente el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer surge fruto de un planteamiento integrado de las mismas, por ende, aunque administrado de forma única, el NanoCisPt ha resultado no tener los efectos terapéuticos esperados, podría constituir un elemento prometedor en terapias combinadas frente a neoplasias de distinta naturaleza, incorporándolo a técnicas como la quimioembolización arterial transcateeteral o la termoterapia por medio de la aplicación de campos magnéticos alternos (Zhang et al., 2018).

Con respecto a los posibles efectos adversos derivados del tratamiento quimioterápico, cabe mencionar que, aunque en este estudio no se observaron evidencias de disfunción renal en ninguno de los animales tratados por medio de la determinación de los niveles sanguíneos de creatinina y BUN, son varios los autores que han reportado una menor nefrotoxicidad como resultado de la administración del CDDP vehiculizado por nanopartículas en comparación con su forma de presentación convencional. Así, Comenge et al. (2012), El-Gizawy et al. (2020) y El-Sheikh et al. (2021) pudieron apreciar un daño renal severo en aquellos animales de experimentación tratados con CDDP por medio del estudio histopatológico de las muestras, que no detectaron en los animales tratados con CDDP vehiculizado por nanopartículas de distinta naturaleza a la misma dosis.

Tras la preparación de los cortes histológicos y su tinción con H&E, éstos fueron examinados por medio de microscopía óptica. Resulta relevante mencionar que el aspecto microscópico ofrecido por la masa tumoral no respondía exactamente a las características histopatológicas típicas de un carcinoma de células escamosas, caracterizado por una diferenciación celular en queratinocitos displásicos, y frecuentemente acompañado de aspectos tales como hiperqueratosis, acantosis e incluso presencia de perlas de queratina (Goldschmidt y Goldschmidt, 2016). Una posible explicación a este hecho sería la elevada velocidad de

crecimiento de la masa tumoral, que podría haber provocado una degeneración de las células tumorales por hipoxia y/o falta de nutrientes antes de alcanzar dicho grado de diferenciación dada la escasa neovascularización.

En este caso, entre los hallazgos histológicos más reseñables cabe destacar un considerable grado de atipia celular, acompañado de una alta tasa de mitosis atípicas y una importante desorganización de la estructura histológica hepática normal debido a la presencia de amplias áreas de necrosis intratumorales (Kreuter et al., 2008; Luo et al., 2010; Yi et al., 2019).

7. CONCLUSIONES

A la luz de los resultados obtenidos en este estudio preliminar, la administración de CDDP conjugado con nanopartículas como tratamiento quimioterápico frente al carcinoma VX2 implantado en hígado de conejo, no parece mostrar una mayor eficacia terapéutica *in vivo* en comparación con la administración de CDDP en su preparación farmacológica convencional a la misma dosis. Por otro lado, y considerando el reducido tamaño muestral empleado, la forma convencional del CDDP parece constituir una opción de tratamiento antitumoral eficaz frente al tumor VX2 hepático en conejo.

En cualquier caso, y de cara a futuras investigaciones, sería interesante solventar aquellos aspectos considerados como una limitación del procedimiento experimental con el objetivo de obtener resultados más concluyentes. Algunas de las propuestas a considerar serían el empleo de un mayor tamaño muestral, la inclusión de procedimientos adicionales que permitan evaluar de forma más sensible los posibles efectos adversos sobre la función orgánica sistémica y, sobre todo, sobre la función renal, derivados de la administración de CDDP en sus dos formas de presentación, y la incorporación de nuevos elementos a la terapia, como bien podría ser la inclusión de mecanismos activos para dirigir específicamente la liberación del fármaco al órgano diana.

CONCLUSIONS

In light of the results obtained in this preliminary study, the administration of CDDP conjugated with nanoparticles as a chemotherapeutic treatment against VX2 carcinoma implanted in rabbit liver seems to show a lower therapeutic efficacy *in vivo* compared to the administration of CDDP in its conventional form at the same dose. On the other hand, and considering the small sample size used in this experiment, the conventional form of CDDP seems to be an effective antitumor treatment option against VX2 liver tumor in rabbit.

In any case, and with regard to future research, it would be interesting to solve some limitations of the experimental procedure in order to obtain more conclusive results. Some of the proposals to consider are the use of a larger sample size, the inclusion of additional procedures that allow a more sensitive evaluation of the adverse effects on systemic organic function and, especially, on renal function, derived from the administration of CDDP in its two pharmacological forms, and the incorporation of new elements to therapy, like the inclusion of active mechanisms to specifically direct the release of the drug to the target organ.

8. VALORACIÓN PERSONAL

Considero que la realización de esta memoria ha supuesto un desafío para mí, sobre todo en lo que respecta a su temática. Mis conocimientos teóricos de partida sobre quimioterapia y nanopartículas eran prácticamente inexistentes, y es gratificante observar cómo éstos se han ido desarrollando gracias a una exhaustiva revisión bibliográfica y a su puesta en práctica en el laboratorio de la Unidad de Farmacología de la Facultad de Veterinaria.

La elaboración de un trabajo de fin de grado experimental me ha permitido involucrarme en la ejecución de un proyecto de ámbito nacional y explorar el campo de la investigación, desconocido por mí hasta ahora, como posible salida laboral. Además, he podido asistir a múltiples sesiones prácticas de la asignatura de Farmacología a lo largo del curso, estando presente en las explicaciones impartidas y siendo partícipe del protocolo diseñado, desde la recepción de los conejos en el Laboratorio de Farmacología, hasta su eutanasia con el fin de valorar los resultados obtenidos.

Por otro lado, la contrastación de los resultados obtenidos experimentalmente en este trabajo con aquellos recogidos en otros estudios con líneas de investigación similares me ha permitido desarrollar mis habilidades de búsqueda bibliográfica, partiendo de la elección de fuentes de información fidedignas, y pasando por la selección de la información más relevante y pertinente para el desarrollo de mi trabajo. Además, durante la elaboración de esta memoria, he aprendido a hacer un uso responsable de los diferentes recursos, y he adquirido conocimientos acerca del uso de distintas herramientas y gestores de referencias bibliográficas.

Para concluir, me gustaría agradecerle a José Javier Aramayona Alonso, profesor titular de Farmacología, el haberme permitido colaborar con él en el desarrollo de esta investigación, así como por su tiempo e implicación en la creación de este trabajo, proporcionándome conocimientos valiosos fruto de su propia experiencia y enseñándome a afrontar las dificultades que pueden surgir durante el desarrollo de un procedimiento experimental. Además, también me gustaría agradecer su colaboración al personal del Departamento de Fisiología Animal, por su participación en la ejecución de los ensayos *in vitro* y en la interpretación de los datos estadísticos.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Aldossary, S.A. (2019). "Review on Pharmacology of Cisplatin: Clinical Use, Toxicity and Mechanism of Resistance of Cisplatin". *Biomedical and Pharmacology Journal*, 12(1), pp. 7. DOI: 10.13005/bpj/1608
- Armengol, C.A., Herrador, V.T. y Rodríguez, A.V. (2009). "Modelos experimentales de hepatocarcinoma". *Gastroenterología y Hepatología Continuada*, 8(2), pp. 91-94.
- Artursson, P., Palm, K. y Luthman, K. (2001). "Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport". *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1-3), pp. 27-43 DOI: 10.1016/s0169-409x(00)00128-9.
- Bahuguna, A., Khan, I., Kang, S.C. y Bajpai, V.K. (2017). "MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug". *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 12(2), pp. 115-118. DOI: 10.3329/bjp.v12i2.30892
- Barabas, K., Milner, R., Lurie, D. y Adin, C. (2008). "Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications". *Veterinary and comparative oncology*, 6(1), pp. 1-18. DOI: 10.1111/j.1476-5829.2007.00142.x
- Berridge, M.V., Herst, P.M. y Tan, A.S. (2005). "Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction". *Biotechnology annual review*, 11, pp. 127-152. DOI: 10.1016/S1387-2656(05)11004-7
- Bertuccio, P., Turati, F., Carioli, G., Rodriguez, T., La Vecchia, C., Malvezzi, M. y Negri, E. (2017). "Global trends and predictions in hepatocellular carcinoma mortality". *Journal of hepatology*, 67(2), pp. 302-327. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.03.011
- Cekanova, M. y Rathore, K. (2014). "Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations". *Drug Design, Development and Therapy*, 8, pp. 1911-1922. DOI: 10.2147/DDDT.S49584
- Chen, J.H., Lin, Y.C., Huang, Y.S., Chen, T.J., Lin, W.Y. y Han, K.W. (2004). "Induction of VX2 carcinoma in rabbit liver: comparison of two inoculation methods". *Laboratory animals*, 38(1), pp. 79-84. DOI: 10.1258/00236770460734434.
- Comenge, J., Sotelo, C., Romero, F., Gallego, O., Barnadas, A., Parada, T.G., Domínguez, F. y Puentes, V.F. (2012). "Detoxifying Antitumoral Drugs via Nanoconjugation: The Case of Gold Nanoparticles and Cisplatin". *Plos One*, 7(10). DOI: 10.1371/journal.pone.0047562
- Dasari, S. y Bernard Tchounwou, P. (2014). "Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action". *European journal of pharmacology*, 740, pp. 364-378. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025i
- Donovan, T.A., Moore, F.M., Bertram, C.A., Luong, R., Bolfa, P., Klopffleisch, R., Tvedten, H., Salas, E.N., Whitley, D.B., Aubreville, M. y Meuten, D.J. (2020). "Mitotic Figures-Normal, Atypical, and Imposters: A Guide to Identification.". *Veterinary pathology*, 58 (2), pp. 243-257. DOI: 10.1177/0300985820980049
- El-Gizawy, M.M., Hosny, E.N., Mourad, H.H. y Abd-El Razik, A.N. (2020). "Curcumin nanoparticles ameliorate hepatotoxicity and nephrotoxicity induced by cisplatin in rats". *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 393 (10), pp. 1941-1953. DOI: 10.1007/s00210-020-01888-0

El-Sheikh, S.M.A., Edrees, N., EL-Sayed, H., Khamis, T., Arisha, A.H., Metwally, M.M.M., Eleiwa, N.Z. y Galal, A.A.A. (2021). "Could Cisplatin Loading on Biosynthesized Silver Nanoparticles Improve Its Therapeutic Efficacy on Human Prostate Cancer Cell Line and Reduce Its In Vivo Nephrotoxic Effects?". *Biological Trace Element Research*. DOI: 10.1007/s12011-021-02677-3.

Goldschmidt, M.H. y Goldschmidt, K.H. (2016). "Epithelial and Melanocytic Tumors of the Skin". En: Meuten, D. J. (Coord.). *Tumors in domestic animals*, 5th Edition. Ames: John Wiley & Sons Inc, pp. 88-141.

Guan, L. (2015). "Angiogenesis dependent characteristics of tumor observed on rabbit VX2 hepatic carcinoma". *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(10), pp. 12014-12027.

Guan, Y., Yang, Y., Wang, X., Yuan, H., Yang, Y., Li, N. y Ni, C. (2020). "Multifunctional Fe₃O₄@SiO₂-CDs magnetic fluorescent nanoparticles as effective carrier of gambogic acid for inhibiting VX2 tumor cells". *Journal of Molecular Liquids*, 327. DOI: 10.1016/j.molliq.2020.114783.

Ishikawa, T. (2009). "Future perspectives on the treatment of hepatocellular carcinoma with cisplatin". *World journal of Hepatology*, 1(1), pp. 8-16. DOI: 10.4254/wjh.v1.i1.

Jia, Y., Zhang, J., Zhang, Y., Wang, W., Li, C., Zhou, S. y Zhang, B. (2020). "Construction of redox-responsive tumor targeted cisplatin nano-delivery system for effective cancer chemotherapy". *International journal of pharmaceuticals*, 580. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119190

Kreuter, K.A., El-Abbadi, N., Shbeeb, A., Tseng, L., Mahon, S.B., Narula, N., Burney, T., Colt, H. y Brenner, M. (2008). "Development of a Rabbit Pleural Cancer Model by Using VX2 Tumors". *Comparative medicine*, 58(3), pp. 287-293.

Lee, K., Liapi, E., Buijs, M., Anna Vossen, J., Prieto-Ventura, V., Syed, L.H. y Geschwind, J.H. (2009). "Percutaneous US-Guided Implantation of Vx-2 Carcinoma into Rabbit Liver: A Comparison With Open Surgical Method". *Journal of Surgical Research*, 155(1), pp. 94-99. DOI: 10.1016/j.jss.2008.08.036

Li, X., Chen, Y., Wang, J., Xu, L., Zhang, F., Zhuge, Y., Zou, X., Yu, H. y Huang, Y. (2020). "Preparation of microspheres encapsulating sorafenib and catalase and their application in rabbit VX2 liver tumor". *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 129. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110512

Lu, Y., Qi, J. y Wu, W. (2018). "Lipid nanoparticles: in vitro and in vivo approaches in drug delivery and targeting". En: Grumezescu, A. (Coord.). *Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems*. Oxford: Elsevier, pp. 749-774.

Luo, W., Zhou, X., Zheng, X., He, G., Yu, M., Li, Q. y Liu, Q. (2010). "Role of Sonography for Implantation and Sequential Evaluation of a VX2 Rabbit Liver Tumor Model". *Journal of ultrasound in medicine*, 29(1), pp. 51-60. DOI: 10.7863/jum.2010.29.1.51

Martinkova, P., Brtnicky, M., Kynicky, J. y Pohanka, M. (2017). "Iron Oxide Nanoparticles: Innovative Tool in Cancer Diagnosis and Therapy". *Advanced Healthcare Materials*, 7(5), PP. 1-14. DOI: 10.1002/adhm.201700932

Meunier, V., Bourrié, M., Berger, Y. y Fabre, G. (1995). "The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications". *Cell biology and toxicology*, 11(3-4), pp. 187-194. DOI: 10.1007/BF00756522

- Mondal, J. y Khuda-Bukhsh, A.R. (2020). "Cisplatin and farnesol co-encapsulated PLGA nanoparticles demonstrate enhanced anti-cancer potential against hepatocellular carcinoma cells in vitro". *Molecular biology reports*, 47(5), pp. 3615-3638. DOI: 10.1007/s11033-020-05455-x
- Katt, M. E., Placone, A. L., Wong, A. D., Xu, Z. y Searson, P. C. (2016). "In vitro tumor models: advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform". *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 4(12). DOI: 10.3389/fbioe.2016.00012
- Natoli, M., Leoni, B.D., D'Agnano, I., Zucco, F. y Felsani, A. (2012). "Good Caco-2 cell culture practices". *Toxicology in Vitro*, 26(8), pp. 1243-1246. DOI: 10.1016/j.tiv.2012.03.009
- Parvinian, A., Casadaban, L.C. y Gaba, R.C. (2014). "Development, growth, propagation, and angiographic utilization of the rabbit VX2 model of liver cancer: A pictorial primer and "how to" guide". *Diagnostic and Interventional Radiology*, 20(4), pp. 335-340. DOI: 10.5152/dir.2014.1341
- Paur, J., Valler, M., Siemel, R., Taxauer, K., Holzmann, K., Marian, B., Unterberger, A., Mohr, T., Berger, W., Gvozdenovich, A., Schimming, J., Grusch, M. y Grasl-Kraupp, B. (2020). "Interaction of FGF9 with FGFR3-IIIb/IIIc, a putative driver of growth and aggressive behaviour of hepatocellular carcinoma.". *Liver international*, 40(9), pp. 2279-2290. DOI: 10.1111/liv.14505.
- Raoul, J., Kudo, M., Finn, R.S., Edeline, J., Reig, M. y Galle, P.R. (2018). "Systemic therapy for intermediate and advanced hepatocellular carcinoma: Sorafenib and beyond". *Cancer treatment reviews*, 68, pp. 16-24. DOI: 10.1016/j.ctrv.2018.05.006.
- Rashtchizadeh, N., Argani, H., Ghorbanihaghjo, A., Sanajou, D., Hosseini, V., Dastmalchi, S. y Nazari Soltan Ahmad, S. (2019). "AMPK: A promising molecular target for combating cisplatin toxicities". *Biochemical pharmacology*, 163, pp. 94-100. DOI: 10.1016/j.bcp.2019.02.006.
- Richani, M., Kolly, P., Knoepfli, M., Herrmann, E., Zweifel, M., von Tengg-Kobligk, H., Candinas, D. y Dufour, J. (2016). "Treatment allocation in hepatocellular carcinoma: Assessment of the BCLC algorithm". *Annals of Hepatology*, 15(1), pp. 82-90. DOI: 10.5604/16652681.1184233.
- Rocha, C.R.R., Silva, M.M., Quinet, A., Cabral-Neto, J.B. y Menck, C.F.M. (2018). "DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship". *Clinics (São Paulo, Brazil)*, 73 (1), pp. 1-10. DOI: 10.6061/clinics/2018/e478s.
- Shi, Y., Wang, X., Qiao, Y., Bai, X., Wang, Q. y Lei, C. (2020). "The dynamic enhanced characterization with low mechanical index gray-scale harmonic imaging inflammatory pseudotumor of liver compared with hepatic VX2 tumor and normal liver". *Advances in clinical and experimental medicine*, 29(9), pp. 1073-1081. DOI: 10.17219/acem/110315.
- Sonoda, A., Nitta, N., Nitta-Seko, A., Ohta, S., Nagatani, Y., Mukaisho, K., Otani, H., Tsuchiya, K., Takahashi, M. y Murata, K. (2011). "Time-Course Studies of Implanted Rabbit VX2 Liver Tumors to Identify the Appropriate Time for Starting Hepatic Arterial Embolization in Animal Models". *Oncology basel*, 80(1-2), pp. 92-96. DOI: 10.1159/000328763.
- Suk, J.S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J. y Ensign, L.M. (2016). "PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery". *Advanced Drug Delivery Reviews*, 99(Part A), pp. 28-52. DOI: 10.1016/j.addr.2015.09.012.
- Sun, J.H., Zhang, Y.L., Nie, C.H., Yu, X. B., Xie, H. Y., Zhou, L. y Zheng, S.S. (2012). "Considerations for two inoculation methods of rabbit hepatic tumors: Pathology and image features". *Experimental and Therapeutic Medicine*, 3(3), pp. 386-390. DOI: 10.3892/etm.2011.435.

- Van Breugel, J. M. M., Savic, L.J., Lin, M., Miszczuk, M., Chapiro, J., Mirpour, S., Liapi, E., Zhang, X., Duran, R. y Geschwind, J.F. (2019). "Theranostic application of lipiodol for transarterial chemoembolization in a VX2 rabbit liver tumor model". *Theranostics*, 9(13), pp. 3674-3686. DOI: 10.7150/thno.32943.
- van Meerloo, J., Kaspers, G.J.L. y Cloos, J. (2011). "Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay". *Methods in molecular biology -clifton then totowa*, 731, pp. 237-245. DOI: 10.1007/978-1-61779-080-5_20.
- Vangijzegem, T., Stanicki, D. y Laurent, S. (2019). "Magnetic iron oxide nanoparticles for drug delivery: applications and characteristics". *Expert opinion on drug delivery*, 16(1), pp. 69-78. DOI: 10.1080/17425247.2019.1554647.
- Virmani, S., Harris, K.R., Szolc-Kowalska, B., Paunesku, T., Woloschak, G.E., Lee, F.T., Lewandowski, R.J., Sato, K.T., Ryu, R.K., Salem, R., Larson, A.C. y Omary, R.A. (2008). "Comparison of Two Different Methods for Inoculating VX2 Tumors in Rabbit Livers and Hind Limbs: Clinical and Laboratory Investigations". *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, 19, pp. 931-936. DOI: 10.1016/j.jvir.2008.02.019.
- Wang, Z., Yang, G., Nie, P., Fu, J., Wang, X., y Liu, D. (2013). "Dynamical Observation on Biological Progression of VX2 Liver Tumors to Identify the Optimal Time for Intervention in Animal Models". *PLoS ONE*, 8(8). DOI:10.1371/journal.pone.0074327.
- Xiao, J., Ma, L., Li, J., Yin, B., Liang, J. y Wang, J. (2021). "Primary Squamous Cell Carcinoma of the Liver is Rare but Hostile: Case Series and Comprehensive Review of the Literature". *Cancer Management and Research*, 13, pp. 829-837. DOI: 10.2147/CMAR.S290523.
- Yang, Y., Wang, F., Zheng, K., Deng, L., Yang L., Zhang N., Xu, C., Ran, H., Wang, Z., Wang, Z. y Zheng, Y. (2017). "Injectable PLGA/Fe3O4 implants carrying cisplatin for synergistic magnetic hyperthermal ablation of rabbit VX2 tumor". *PLoS ONE*, 12(5), pp. 1-21. DOI: 10.1371/journal.pone.0177049.
- Yang, Y., Zhao, Y., Yu, A., Sun, D. y Yu, L.X. (2017). "Chapter 12 - Oral Drug Absorption: Evaluation and Prediction". En: Qiu, Y., Y. Chen, G.G.Z. Zhang, L. Yu y R.V. Mantri. (Coord.). *Developing Solid Oral Dosage Forms (Second Edition)*. Boston: Academic Press, pp. 331-354.
- Yi, H., Cai, B., Ai, X., Li, K. y Zhang, W. (2019). "Establishment of Rabbit Liver VX2 Tumor Model Using Percutaneous Puncture Inoculation of Tumor Fragment Guided and Evaluated by Ultrasonography". *Current Medical Science*, 39(5), pp. 820-824. DOI: 10.1007/s11596-019-2111-6.
- Zhai, Q., Li, H., Song, Y., Wu, R., Tang, C., Ma, X. y Liu, Z. (2018a). "Preparation and Optimization Lipid Nanocapsules to Enhance the Antitumor Efficacy of Cisplatin in Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells". *AAPS PharmSciTech*, 19(5), pp. 2048-2057. DOI: 10.1208/s12249-018-1011-6.
- Zhang, X.T., Wu, Y., Liu, J., Zhuang, W., Li, H.W., Wang, L., Song, Q.H. y Xu, K. (2009). "VX2 carcinoma in rabbits after radiofrequency ablation: Differentiating residual tumor from inflammation using enhanced CT versus histopathology". *Chinese Journal of Interventional Imaging and Therapy*, 6(6), pp. 559.
- Zhang, H., Liu, L. L., Zhang, Y. F, Gao F., Li, G. L., He, Y., Peng, M. L y Fan, H. M. (2018). "Magnetic nanoparticles based cancer therapy : current status and applications", *Sci China Life Sci*, 61(4), pp. 400-414. DOI: 10.1007/s11427-017-9271-1.